

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.20.012

玉屏风颗粒对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺泡灌洗液代谢组学及肠道菌群的影响

刘海叶, 骆姗, 贾智玲, 董文军, 王媛媛, 王杰鹏, 于文涛✉

河北中医学院, 河北省石家庄市杏苑路3号, 050200

[摘要] **目的** 从“肺-肠轴”角度探讨玉屏风颗粒防治慢性阻塞性肺疾病(COPD)的可能作用机制。**方法** 32只大鼠随机分为正常组、模型组、罗红霉素组、玉屏风颗粒组, 每组8只。除正常组外, 其余各组大鼠采用气管滴注脂多糖(LPS)联合烟熏法制备COPD大鼠模型, 持续12周。造模第5~12周, 罗红霉素组和玉屏风颗粒组分别给予相应药物31.5 mg/(kg·d)、1.575 g/(kg·d)灌胃, 正常组和模型组给予10 ml/(kg·d)生理盐水。末次给药后24 h取材。HE染色观察各组大鼠肺组织病理形态改变情况。正常组、模型组及玉屏风颗粒组大鼠应用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术(UHPLC-QTOFMS)检测肺泡灌洗液(BALF)差异性代谢物; 16S rDNA测序技术检测肠道菌群的差异菌属, 并将差异性代谢物和差异菌属进行关联分析。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠小支气管壁杯状细胞增多, 支气管壁平滑肌层消失, 可见炎性细胞浸润; 与模型组比较, 罗红霉素组肺泡间质轻微水肿, 炎性细胞明显减少; 玉屏风颗粒组未见明显肺泡间质水肿, 伴有少量炎性细胞浸润。BALF差异性代谢物筛选结果显示, 与正常组比较, 模型组中12种物质上调, 19种物质下调; 与模型组比较, 玉屏风颗粒组中37种物质上调, 43种物质下调。KEGG分析共得出2条代谢通路, 分别是甘油磷脂代谢、不饱和脂肪酸的生物合成代谢; 与模型组比较, 玉屏风颗粒组胆碱、乙酰胆碱、甘油-3-磷酸、甘油磷酸胆碱、棕榈酸、花生四烯酸呈上升趋势; 硬脂酸、二十二碳六烯酸呈下降趋势($P<0.05$)。肠道菌群结果显示, 正常组和模型组有80种差异物种, 模型组和玉屏风颗粒组有65种差异物种; 与模型组比较, 玉屏风颗粒组相对丰度水平前五位的物种中普雷沃菌属_9、Ruminococcaceae_UCG-005、Ruminiclostridium_6水平升高, 乳杆菌属、拟杆菌属水平降低($P<0.05$)。相关性分析结果显示, 模型组vs正常组, 花生四烯酸与Oribacterium呈负相关($r=-0.753$, $P<0.01$); 玉屏风颗粒组vs模型组, 硬脂酸与拟杆菌属($r=0.788$)、分枝杆菌属($r=0.826$)、[Eubacterium]_ruminantium_group($r=0.770$)均呈正相关($P<0.01$); 花生酸与Roseiarcus($r=-0.779$)、甘油-3-磷酸与脱硫弧菌属($r=-0.758$)、花生四烯酸与Oribacterium($r=-0.753$)、棕榈酸与Pseudolabrys($r=-0.750$)均呈负相关($P<0.01$)。**结论** 玉屏风颗粒可影响COPD模型大鼠BALF代谢产物和肠道微生物的菌群结构, 调节“肺-肠轴”平衡可能是其防治COPD的可能作用机制之一。**[关键词]** 慢性阻塞性肺疾病; 玉屏风颗粒; 肺-肠轴; 代谢组学; 肠道菌群

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种高度异质性疾病, 在我国40岁以上人群中发病率为13.7%, 且有逐年升高的趋势^[1]。研究表明, COPD是一种多系统疾病, 肠道等多种肺外器官受累^[2]; COPD患者小肠黏膜在糖渗透性实验中表现出活性葡萄糖转运水平

降低, 证实COPD患者存在肠道功能障碍^[3], 由此人们常将“肺-肠轴”理论应用于COPD的研究中^[4]。“肺-肠轴”是指肺部和肠道之间相互影响、双向调节的关系^[5]。二者的主要通讯途径包括黏膜免疫、神经内分泌系统以及可溶性微生物组分及代谢物的循环运输等^[6-7]。玉屏风散出自《丹溪心法》, 前期研究发现, 其可调节COPD患者免疫反应, 有效改善肺功能^[8], 近年来有研究表明其对消化系统疾病如炎症性肠病等亦有一定治疗作用^[9]。

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划(2019072); 河北中医学院博士科研基金(BSZ2018013)

✉ 通讯作者: ywtawen@163.com

本研究从“肺-肠轴”角度探索玉屏风颗粒防治 COPD 的可能作用机理,为研究中药复方作用机制提供参考。本研究通过河北中医学院动物伦理审查(编号:DWLL2019006)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 32 只,体重(180±10) g, 5~6 周龄,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物合格证号:1103241911016851。饲养温度为 22~24℃,相对湿度为 45%~60%,自然昼夜节律光照环境,大鼠自由活动和进食饮水。

1.2 药物

玉屏风颗粒(广东环球制药有限公司生产,批号 181103),主要成分为黄芪、白术、防风,规格:5 g/袋,用生理盐水配置为浓度 0.158 g/ml 的溶液;罗红霉素胶囊(江苏祥瑞药业有限公司,批号 1812012),规格:0.15 g/粒,用生理盐水配置为浓度 3.150 mg/ml 的溶液。

1.3 主要试剂及仪器

钻石牌香烟(河北中烟工业有限责任公司,烤烟型,焦油量 11 mg,烟气烟碱量 0.8 mg,烟气一氧化碳量 13 mg);10% 水合氯醛(上海阿拉丁试剂有限公司,批号 H1821050);脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号 L2880);甲醇、乙腈、乙酸铵、氨水(德国 CNW Technologies 公司,货号分别为 B3830288、C3010432、BCCB9847、7218060),以上试剂纯度均为 LC-MS 级;琼脂糖(法国 BIOWEST 公司,货号 yi04370);4% 多聚甲醛(上海沪试实验器材股份有限公司,批号 20180713);苏木素染液、中性树胶、伊红(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 ZLI-9609、ZLI-9555、ZLI-9613);DNA 提取试剂盒、裂解液(德国 MN 公司,货号分别为 740787.4、740787.2)。

ASP200S 型全自动脱水机、G1150 H 型加热石蜡包埋系统、RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);1290 UHPLC 型超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Triple TOF 6600 型高分辨质谱仪(美国 AB Sciex 公司);Heraeus Frescol17 型离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BSA124S-CW 型天平(德国 Sartorius 公司);JXFSTPRP-24 型研磨仪(上海净信科技有限公司);明澈 D24 UV 型纯水仪(德国 Merck Millipore 公司);YM-080S 型超声仪(深圳市方奥微电子有限公司);ZK-26/100 型真空

泵(杭州米欧仪器有限公司);G560E 型振荡器(德国 SI 公司);5424EQ766751 型高速离心机(德国 EPPENDORF 公司);DM3000 型光学显微镜(德国 Leica 公司);EPS600 型电泳仪(上海天能科技有限公司)。

1.4 造模分组及给药

采用随机数字表法将 32 只大鼠分为正常组、模型组、罗红霉素组、玉屏风颗粒组,每组 8 只。除正常组外,其余 3 组大鼠采用气管滴注 LPS 联合烟熏的方法制备 COPD 大鼠模型^[10]:将大鼠置于 80 cm×60 cm×60 cm 自制烟熏箱(带透气孔)内,箱体侧面通过换气扇连接烟雾发生室,在烟雾发生室内依次放置香烟 10 支,烟熏每次 30 min,每日 2 次,烟熏期间适时换气;分别于第 1 天和第 14 天进行气管滴注 LPS 200 μg(滴注当天不进行烟熏),造模持续 12 周。正常组大鼠同时用 0.2 ml 生理盐水代替 LPS,不进行烟熏。模型大鼠肺组织出现炎症细胞浸润、肺泡结构受损等提示造模成功^[11]。

造模第 5~12 周罗红霉素组大鼠给予罗红霉素 31.5 mg/(kg·d)灌胃,玉屏风颗粒组给予玉屏风颗粒 1.575 g/(kg·d)灌胃,其余两组给予 10 ml/(kg·d)生理盐水灌胃,各组均每日 1 次。玉屏风颗粒组和罗红霉素组给药剂量为按照人与大鼠体表面积折算比率^[12]换算的等效剂量。

1.5 观察指标及方法

末次给药后 24 h 后,用 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉大鼠。暴露大鼠气管,注射器内抽取 3 ml 生理盐水,将针头刺入左肺气管,同时将针头和左侧气管一起结扎,防止肺泡灌洗液(BALF)外渗,轻轻推动注射器,推完后再慢慢吸出,重复 3 次,将最后一次吸出的 BALF 推入 EP 管备用。然后取出右肺,置于 4% 多聚甲醛固定液中,用于制备病理切片。取出结肠组织,无菌条件下剥离结肠中的粪便,液氮速冷,置于-80℃冰箱保存备用。

1.5.1 HE 染色观察各组大鼠肺组织病理形态 取大鼠右肺中叶,4% 多聚甲醛固定 24 h,全自动脱水机脱水、石蜡包埋、制备厚约 5 μm 切片,进行 HE 染色,光学显微镜下观察肺组织形态。

1.5.2 代谢组学技术检测大鼠 BALF 代谢物和代谢通路 应用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术(UHPLC-QTOFMS)技术对大鼠肺泡灌洗液进行检测。将 100 μl BALF 加入 400 μl 提取液[甲醇:乙腈=1:1(V/V),含同位素标记内标混

合物], 涡旋混匀 30 s, 冰水浴超声 10 min, -40°C 静置 1 h, 4°C 、12 000 r/min 离心 15 min (半径 8.6 cm), 取上清液 400 μl 于 EP 管中, 真空干燥; 加入 200 μl 50% 乙腈复溶, 涡旋 30 s, 冰水浴超声 10 min, 然后 4°C 、13 000 r/min 离心 15 min (半径 8.6 cm), 取 75 μl 上清液于进样瓶中上机检测, 另取 10 μl 上清液混合成质控样品上机检测。仪器参数设置为: 液相色谱 A 相为水相, 含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水, B 相为乙腈。采用梯度洗脱: 0~0.5 min, 95% B; 0.5~7 min, 95%~65% B; 7~8 min, 65%~40% B; 8~9 min, 40% B; 9~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12 min, 95% B。流动相流速: 0.5 ml/min, 柱温: 25°C , 样品盘温度: 4°C , 进样体积: 正离子 2 μl , 负离子 2 μl 。离子源参数为 GS1: 60 psi, GS2: 30 psi, CUR: 35 psi, TEM: 600°C , DP: 60 V, ISVF: 5000 V (Pos)/-4000 (Neg)。

使用 Proteo Wizard 软件 (V3.0) 将质谱原始数据转换为 mzXML 格式, 运用 XCMS 做保留时间矫正、峰识别等处理, minfrac 设为 0.5, cutoff 设为 0.3。同时使用自撰写 R 程序包和自建二级质谱数据库对峰进行物质鉴定。将 LC-QTOFMS 采集到的代谢组学原始数据进行去噪、过滤、归一化等处理后, 采用 SIMCA (V15.0.2) 软件对所得数据进行正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA)。采用 t 检验 $P<0.05$, 同时正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 模型第一主成分变量投影重要度变量权重值 (VIP) >1 的标准进行差异代谢物的筛选。将差异性代谢物对应的 HMDB (<http://www.hmdb.ca>) ID 在大鼠通路数据库 (KEGG) 进行映射, 通过富集分析和拓扑分析找到与差异代谢物具有相关性的关键通路。

1.5.3 16S rDNA 测序技术检测大鼠肠道菌群的变化 利用 DNA 提取试剂盒进行检测。取适量样品, 加入提前混匀的裂解液, 70°C 、1000~1200 r/min 震荡 10 min, 后 12 000 r/min 常温下离心 (半径 9 cm) 2 min, 并在 4°C 下孵育 5 min, 过滤去除抑制剂。调节真空泵至 $-0.2\sim-0.6$ bar 结合 DNA, 清洗、干燥硅基质膜, 洗脱 DNA 并转管备用。选择 16S V3+V4 区域进行扩增, 引物名称和序列分别为: 338F 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 806R 5'-GGAC-TACHVGGGTWTCTAAT-3'。之后通过带接头的引物进行 PCR, 定量及纯化后, 用 1.8% 的琼脂糖凝胶, 120 V 40 min 电泳, 切目的片段, Illumina HiSeq 2500 测序平台完成测序。利用 Metastats 软件

(<http://metastats.cbcb.umd.edu/>) 对所有物种按照分组进行置换检验, 按照 $P<0.05$ 的标准进行组间差异菌的筛选。

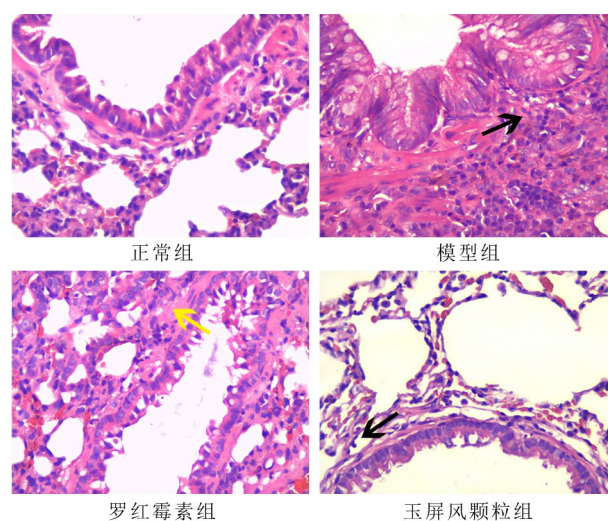
1.6 数据管理及统计学方法

采用 SIMCA (V15.0.2) 软件及 Metastats 软件 (<http://metastats.cbcb.umd.edu/>) 对数据进行统计学处理, 数据不满足正态分布用中位数 (四分位数) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示; 采用 Spearman 算法对 BALF 差异性代谢物及肠道属水平差异菌群进行相关性分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肺组织病理学结果

图 1 示, 正常组大鼠肺部结构清晰完整, 肺组织无炎性细胞浸润, 肺泡腔形态规则, 肺泡间连接厚度正常; 模型组大鼠小支气管壁杯状细胞增多, 支气管壁平滑肌层消失, 出现大量以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润。与模型组比较, 罗红霉素组肺泡间质轻微水肿, 炎性细胞明显减少; 玉屏风颗粒组未见明显肺泡间质水肿, 伴有少量炎性细胞浸润。玉屏风颗粒组与罗红霉素组比较, 炎性细胞浸润改善程度不明显。



注: 黑色箭头指示炎性细胞浸润; 黄色箭头指示间质水肿。

图 1 各组大鼠肺组织病理学形态 (HE 染色, $\times 400$)

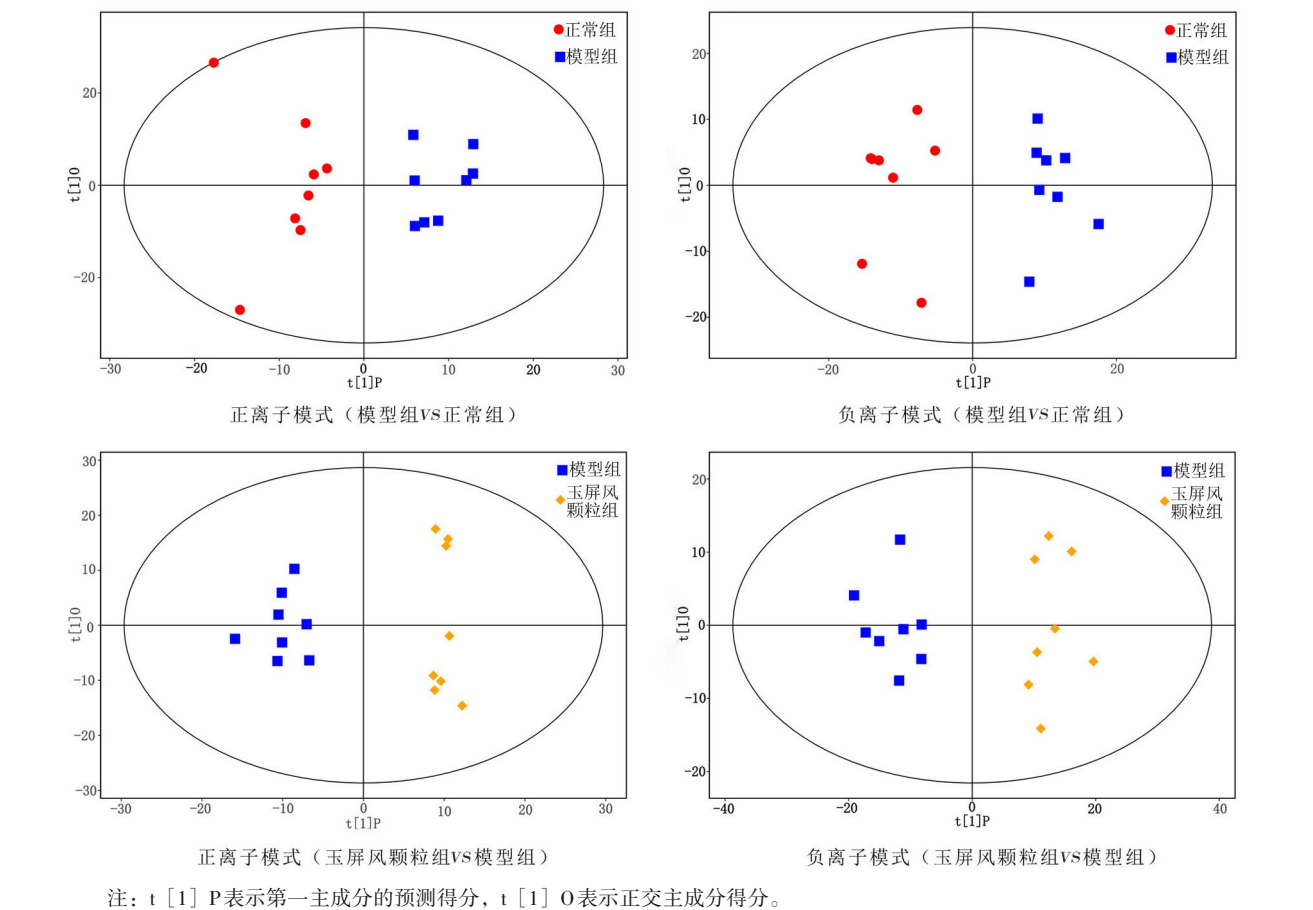
Figure 1 Histopathologic morphology of rat lungs in each group (HE staining, $\times 400$)

2.2 各组大鼠 BALF 代谢组学分析结果

由于本研究目的是探讨玉屏风颗粒的作用机制, 故仅对正常组、模型组、玉屏风颗粒组大鼠进行肺组织代谢组学和肠道菌群分析。该实验分别在正、负离子两种模式下进行。正、负离子模式的原

始数据均包含 5 个质控样本和 32 个实验样本，对原始数据进行去除噪音、过滤、模拟缺失值、归一化等处理后，正、负离子模式分别保留 824 个、636 个物质峰。

2.2.1 各组大鼠 BALF 代谢轮廓分析结果 图 2 示，在正、负离子模式下，样本全部处于 95% 置信区间内，各组样本区分显著，各组组内样本聚集紧密，说明模型组大鼠的代谢状态较正常组发生了改变，而玉屏风颗粒可以对该状态进行调节。



注：t [1] P 表示第一主成分的预测得分，t [1] O 表示正交主成分得分。

图2 各组大鼠肺泡灌洗液 OPLS-DA 得分图

Figure 2 Graph of OPLS-DA scores of alveolar lavage fluid of rats in each group

表 1 玉屏风颗粒组和模型组大鼠肺泡灌洗液潜在差异性代谢物及变化趋势

代谢物名称	质荷比	变化趋势	VIP 值	P 值	代谢途径
胆碱	104. 107	↑	1. 924	0. 024	甘油磷脂代谢
乙酰胆碱	146. 117	↑	1. 718	0. 011	甘油磷脂代谢
甘油-3-磷酸	173. 021	↑	2. 018	0. 032	甘油磷脂代谢
甘油磷酸胆碱	258. 112	↑	1. 968	0. 024	甘油磷脂代谢
棕榈酸	255. 235	↑	1. 154	0. 019	不饱和脂肪酸的生物合成
硬脂酸	283. 266	↓	1. 167	0. 030	不饱和脂肪酸的生物合成
花生四烯酸	303. 234	↑	1. 166	0. 004	不饱和脂肪酸的生物合成，花生四烯酸代谢
二十二碳六烯酸	365. 197	↓	1. 184	0. 034	不饱和脂肪酸的生物合成

注：VIP 值，变量权重值。

四烯酸呈上升趋势;硬脂酸、二十二碳六烯酸呈下降趋势($P<0.05$)。为观察玉屏风颗粒治疗 COPD 的代谢途径,将大鼠 BALF 差异性代谢物在 KEGG 进行映射,以富集分析的 P (Raw p 值) <0.01 作为筛选标准,共得出 2 条代谢通路,分别是甘油磷脂代谢 [代谢物总数 30 个,匹配个数 4 个, $P<0.001$, 拓扑分析的影响值 (Impact 值) $=0.112$]、不饱和脂肪酸的生物合成代谢 (代谢物总数 42 个,匹配个数 5 个, $P=0.001$, Impact 值 <0.001)。

2.3 各组大鼠肠道菌群属水平物种差异性分析结果

正常组和模型组有 80 种差异物种。表 2 示,相对丰度水平前五位的物种中,与正常组比较,模型组 *Agathobacter*、*Christensenellaceae_R-7_group*、*Prevotellaceae_UCG-003* 水平升高, *Prevotellaceae_NK3B31_group*、*密螺旋体属_2* 水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。模型组和玉屏风颗粒组有 65 种差异物种,

表 3 示,相对丰度水平前五位的物种中,与模型组比较,普雷沃菌属_9、*Ruminococcaceae_UCG-005*、*Ruminiclostridium_6* 水平升高,乳杆菌属、拟杆菌属水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 各组大鼠 BALF 差异性代谢物和肠道差异性菌群的关联分析结果

将大鼠 BALF 差异性代谢物和肠道差异菌属进行相关性分析,选取位于甘油磷脂代谢、不饱和脂肪酸生物合成代谢通路上的差异性代谢物为代表,按照相关性 $P<0.05$,相关性系数 r 绝对值 >0.75 的标准进行筛选。表 4 示,正常组和模型组的差异性代谢物花生四烯酸与差异菌属 *Oribacterium* 呈负相关 ($r=-0.753$, $P<0.01$);玉屏风颗粒组和模型组的差异代谢物硬脂酸与拟杆菌属 ($r=0.788$, $P<0.01$)、分枝杆菌属 ($r=0.826$, $P<0.01$)、[*Eubacterium*] *_ruminantium_group* ($r=0.770$, $P<0.01$)

表 2 正常组和模型组大鼠肠道菌群属水平前五位物种平均相对丰度比较

Table 2 Comparison of the mean relative abundance of the top five species at the genus level of the intestinal flora in the normal and model groups of rats [% , $M(P_{25}, P_{75})$]

组名	鼠数	<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	<i>密螺旋体属_2</i>	<i>Agathobacter</i>	<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	<i>Prevotellaceae_UCG-003</i>
正常组	8	22.232(8.339,29.678)	8.012(3.853,24.827)	0.343(0.185,0.565)	0.272(0.139,0.610)	0.365(0.202,0.558)
模型组	8	3.893(2.424,4.671)	0.261(0.133,0.915)	1.358(0.835,6.990)	2.088(0.315,3.951)	1.147(0.380,2.181)
P 值		0.001	0.013	0.001	0.016	0.025

表 3 模型组和玉屏风颗粒组大鼠肠道菌群属水平前五位物种平均相对丰度比较

Table 3 Potential Comparison of the mean relative abundance of the top five species at the genus level of the intestinal flora in rats in the model group and the *Yupingfeng Granules* group [% , $M(P_{25}, P_{75})$]

组名	鼠数	乳杆菌属	普雷沃菌属_9	<i>Ruminococcaceae_UCG-005</i>	拟杆菌属	<i>Ruminiclostridium_6</i>
模型组	8	38.267(32.551,41.861)	1.217(0.877,4.683)	2.080(1.314,3.428)	0.959(0.599,1.512)	0.041(0.036,0.123)
玉屏风颗粒组	8	8.737(3.853,20.567)	10.128(1.855,29.953)	7.309(4.434,10.000)	0.263(0.251,0.732)	0.376(0.115,0.693)
P 值		0.004	0.035	0.006	0.011	0.017

表 4 各组大鼠肠道差异菌属和肺泡灌洗液差异性代谢物相关性分析结果

Table 4 Results of correlation analysis of differential metabolites of intestinal differential bacterial genera and alveolar lavage fluid in each group of rats

组别	差异代谢物	差异菌属	r 值	P 值
模型组 vs 正常组	花生四烯酸	<i>Oribacterium</i>	-0.753	0.001
玉屏风颗粒组 vs 模型组	硬脂酸	分枝杆菌属	0.826	<0.001
	硬脂酸	拟杆菌属	0.788	<0.001
	硬脂酸	[<i>Eubacterium</i>] <i>_ruminantium_group</i>	0.770	<0.001
	花生酸	<i>Roseiarcus</i>	-0.779	<0.001
	甘油-3-磷酸	脱硫弧菌属	-0.758	0.001
	花生四烯酸	<i>Oribacterium</i>	-0.753	0.001
	棕榈酸	<i>Pseudolabrys</i>	-0.750	0.001

均呈正相关；花生酸与 *Roseiarcus* ($r=-0.779$, $P<0.01$)、甘油-3-磷酸与脱硫弧菌属 ($r=-0.758$, $P<0.01$)、花生四烯酸与 *Oribacterium* ($r=-0.753$, $P<0.01$)、棕榈酸与 *Pseudolabrys* ($r=-0.750$, $P<0.01$) 均呈负相关。

3 讨论

COPD 在中医学中属于“肺胀”“喘证”的范畴，肺气虚是其病性辨证的关键，贯穿 COPD 发生发展过程的始终^[13]。肺与大肠相表里，肺气虚导致大肠传导不利，局部阻塞引起肠道微生物的改变^[14]，最终使肺-肠轴平衡受到扰动。玉屏风散是益气固表的代表方，其中黄芪为君药，大补肺脾之气；白术助黄芪健脾益气，为臣药；防风合黄芪、白术扶正祛邪，共奏益气固表之功。本实验中，与正常组相比，模型组出现肺组织炎症，玉屏风颗粒组和罗红霉素组肺组织炎症均较模型组有所减轻，且两组差异不明显，提示玉屏风颗粒与罗红霉素均能改善肺组织炎症，且效果相当。因此，后面仅对正常组、模型组、玉屏风颗粒组进行代谢组学分析。鉴于中药多方位起效的特点，我们在对玉屏风颗粒药理作用进行阐释时，从“肺-肠轴”角度入手，符合中医学的整体观。系统生物学检测方法的介入则提供了技术层面的可行性，代谢组学可从整体水平描述机体的状态及对外界刺激的反应^[15]，16S rDNA 测序可对肠道菌群整体结构进行检测，二者的联合应用基于对中药多成分、多靶点起效特点的理解，是对整体观念的实践。

本实验中，COPD 大鼠 BALF 中多种代谢物及代谢通路发生改变。花生四烯酸位于不饱和脂肪酸和花生四烯酸代谢通路。研究表明，高花生四烯酸含量膳食会使 COPD 稳定期患者血清白细胞介素 6 (IL-6) 和 C 反应蛋白 (CRP) 水平升高^[16]；其还可被代谢为类花生酸和有活性的脂质介质，通过募集和激活 T 细胞、抗原呈递细胞等增强气道炎症反应^[17]。Fang 等^[18]亦证明花生四烯酸可通过直接或间接产生白三烯类物质等间接方式介导 COPD 大鼠的组织炎症，给予药物干预后其水平降低。本实验中，与模型组相比，玉屏风颗粒组花生四烯酸反而升高，与上述研究^[18]不一致，可能与其同时参与多条代谢通路有关。二十二碳六烯酸 (DHA) 位于不饱和脂肪酸的生物合成代谢通路，通过产生“专门促分解介质 (SPMs)”作用于中性粒细胞、巨噬细胞、内皮细胞以及淋巴细胞等炎症细胞，进而

调节机体炎症反应^[19-20]。临床研究^[21]表明，DHA 与体现气道炎症的重要指标第一秒用力呼气容积占预计值百分比 (FEV1%)、用力肺活量占预计值百分比 (FVC%) 呈显著正相关。本实验中，与模型组相比，DHA 等多种代谢产物在玉屏风颗粒组发生改变，提示玉屏风颗粒可能对 COPD 大鼠肺部炎症反应具有一定调节作用。另外研究^[22]表明，男性 COPD 患者体内存在甘油磷脂代谢异常，磷脂酰胆碱等物质可能通过参与氧化应激和炎症反应促进 COPD 的形成。Zhu 等^[23]证明甘油磷脂代谢在重度 COPD 患者的诱导痰中出现下调，其代谢产物胆碱与超氧化物歧化酶 (SOD)、髓过氧化物酶 (MPO)、8-异前列腺素 F2 α (8-iso-PGF2 α) 等呈负相关。甘油-3-磷酸作为甘油磷脂的核心结构，是形成其他甘油磷脂的基础^[24]。本实验中，经玉屏风颗粒干预后，甘油-3-磷酸、胆碱、乙酰胆碱、甘油磷酸胆碱等较模型组升高，说明玉屏风颗粒对甘油磷脂代谢具有一定调节作用，可能通过调节上述代谢物及其所在的代谢通路影响机体的氧化应激和炎症反应。HE 染色提示玉屏风颗粒组肺泡间质水肿和炎细胞浸润减轻，可能与其改善肺部代谢环境有关。

肠道菌群作为人体的“第二基因组”，能抵抗病原体、改善肠道免疫系统及人体新陈代谢。本实验中，正常组和模型组有 80 种差异菌种。研究^[25]表明，COPD 肠道菌群的改变可能与肺肠之间的串扰即肺肠轴有关。肺肠共同构成人体黏膜免疫系统，具有黏膜免疫相关性，当肺部病原体刺激肺部黏膜免疫则会影响到肠道黏膜免疫反应，反之亦然^[26-27]。Wang 等^[28]用香烟烟雾诱导 COPD 小鼠模型，发现肺部炎症介质可通过“外溢”方式引起血清 CRP 及角质形成细胞衍生趋化因子升高，继而扰乱肠道免疫及稳态。本实验中模型组 BALF 中与炎症有关的多种代谢产物如花生四烯酸、DHA 等发生改变，病理结果显示肺组织大量淋巴细胞浸润，由此导致的肺部炎症可能通过类似途径影响肠道菌群结构。而肠道微生态的破坏又可使革兰阴性菌释放的内毒素通过循环系统进入肺中，引起肺部及机体内环境的改变^[29]。有研究表明，人体共生菌可将膳食纤维发酵成短链脂肪酸^[30]，短链脂肪酸作用于 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体，可激活免疫细胞，影响肺部炎症^[31]。本实验中，模型组与玉屏风颗粒组有 65 种差异物种，推测玉屏风颗粒在改善肺部代谢环境的同时对肠道菌群亦产生影响，这种影响可能通过上述肺肠

之间的串扰机制实现。

Oribacterium 是一种厌氧杆菌, 稳定期 COPD 患者 Oribacterium 水平与病情恶化风险增加有关^[32]。脱硫弧菌属可还原硫酸盐产生硫化氢 (H₂S), 对肠道上皮产生一系列毒害作用, 其在急性肺损伤中与白细胞介素 1β (IL-1β)、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF-α) 的含量呈正相关^[33]。研究表明, 急性发作期 COPD 患者的体重指数 (BMI) 较稳定期低, 可能与急性加重期拟杆菌属丰度升高有关^[34]; 而拟杆菌属与厚壁菌门的比率可影响机体的黏膜免疫功能^[35]。本实验结果显示, 正常组和模型组的差异性代谢物花生四烯酸与 Oribacterium 呈负相关, 玉屏风颗粒组和模型组的差异代谢物甘油-3-磷酸与脱硫弧菌属呈负相关, 硬脂酸与拟杆菌属呈正相关, 说明 COPD 大鼠肺部炎症及氧化应激反应可能与这些肠道菌群有关, 从而进一步佐证了肺肠在病理状态下及治疗过程中可以相互影响。

综上所述, COPD 大鼠肺泡和肠道内环境均发生改变, 玉屏风颗粒可能通过肺肠之间的串扰机制对 BALF 代谢物及肠道菌群进行调节, 从而发挥治疗 COPD 的作用, 并且 BALF 代谢物及肠道菌群之间的关联性亦证实了“肺-肠轴”的理论基础。本实验的不足之处在于, 未将血液标本纳入实验中, 未对血液代谢物及细胞因子等在肺肠串扰中的作用进行研究; 目前多种代谢物和肠道菌群的作用尚不明确, 本研究主要对玉屏风颗粒调节“肺-肠轴”机制进行初步探讨, 未对其具体信号通路进行深层次分析, 可在后续实验中进一步完善。

参考文献

- [1] WANG C, XU J, YANG L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2018, 391 (10131): 1706-1707.
- [2] 周甜, 周洵. 慢性阻塞性肺疾病合并肠道功能障碍研究进展[J]. *贵州中医药大学学报*, 2022, 44(3): 85-90.
- [3] KIRSCHNER SK, DEUTZ NEP, JONKER R, et al. Intestinal function is impaired in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Clin Nutr*, 2020, 40 (4): 2270-2277.
- [4] QU L, CHENG Q, WANG Y, et al. COPD and gut-lung axis: how microbiota and host inflammasome influence COPD and related therapeutics [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 868086. doi: 10.3389/fmicb.2022.868086.
- [5] HE Y, WEN Q, YAO F, et al. Gut-lung axis: the microbial contributions and clinical implications [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2017, 43(1): 81-95.
- [6] 张文杰, 戴岳. “肺-肠轴”的研究进展[J]. *药学研究*, 2022, 41(1): 53-56.
- [7] WYPYCH TP, WICKRAMASINGHE LC, MARSLAND BJ. The influence of the microbiome on respiratory health [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(10): 1279-1290.
- [8] 尹学风, 梁海东, 张华. 玉屏风散治疗慢性阻塞性肺疾病及对辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞平衡的影响[J]. *西北药学杂志*, 2022, 37(5): 135-138.
- [9] DU CY, CHOI RC, DONG TT, et al. Yu Ping Feng San, an ancient Chinese herbal decoction, regulates the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 and the activity of intestinal alkaline phosphatase in cultures [J]. *PLoS One*, 2017, 9(6): e100382.
- [10] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. *中华内科杂志*, 2000, 39(8): 556-557.
- [11] 范英兰, 朱竟赫, 甘雨, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与评价[J]. *实用中医内科杂志*, 2022, 36 (10): 27-29.
- [12] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-204.
- [13] 李杨. COPD 中医证候演变分析及稳定期中医规范化管理效果观察[D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.
- [14] NI JX, GAO SH. Understanding the viscera-related theory that the lung and large intestine are exterior-interiorly related [J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(2): 293-298.
- [15] 赵琳儒, 李杰, 张雅筠, 等. 基于体内过程的中草药药效物质基础研究方法进展[J]. *中国医药科学*, 2022, 12 (23): 39-42.
- [16] DE BATLLE J, SAULEDA J, BALCELLS E, et al. Association between Ω3 and Ω6 fatty acid intakes and serum inflammatory markers in COPD [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(7): 817-821.
- [17] CHEN Y, CHANG Y, HUANG K, et al. Unraveling the pathogenesis of asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap: focusing on epigenetic mechanisms [J]. *Cells*, 2022, 11 (11): 1728. doi: 10.3390/cells11111728.
- [18] FANG W, LI C, WU Q, et al. Metabolic profiling of chronic obstructive pulmonary disease model rats and the interventional effects of HuaTanJiangQi decoction using UHPLC-Q-TOF/MS E [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 180: 113078. doi: 10.1016/j.jpba.2019.113078.
- [19] ZÚÑIGA-HERNÁNDEZ J, SAMBRA V, ECHEVERRÍA F, et al. N-3 PUFAs and their specialized pro-resolving lipid mediators on airway inflammatory response: benefi-

- cial effects in the prevention and treatment of respiratory diseases[J]. Food Funct, 2022, 13(8):4260-4272.
- [20] INÊS F, FILIPA F, NARCISA B, et al. Resolvins, protectins, and maresins: DHA-derived specialized pro-resolving mediators, biosynthetic pathways, synthetic approaches, and their role in inflammation[J]. Molecules, 2022, 27(5):1677.
- [21] 刘静宁. 慢性阻塞性肺疾病患者血清多不饱和脂肪酸水平与肺功能指标的相关性研究[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2022, 6(24):108-111.
- [22] HUANG Q, WU X, GU Y, et al. Detection of the disorders of glycerophospholipids and amino acids metabolism in lung tissue from male COPD patients[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 839259. doi: 10.3389/fmolb. 2022. 839259.
- [23] ZHU T, LI S, WANG J, et al. Induced sputum metabolomic profiles and oxidative stress are associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) severity: potential use for predictive, preventive, and personalized medicine[J]. EPMA J, 2020, 11(4):645-659.
- [24] 黄诒森. 生物化学[M]. 4 版, 北京: 人民卫生出版社, 2001:139.
- [25] SONG W, YUE Y, ZHANG Q. Imbalance of gut microbiota is involved in the development of chronic obstructive pulmonary disease: a review[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 165:115150. doi: 10.1016/j.biopha. 2023. 115150.
- [26] 包晟川, 闫曙光, 陈婷, 等. 肺肠合治法治疗肺系疾病的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 116-122.
- [27] 沈俊希, 朱星, 陈云志, 等. 基于肠道菌群探讨慢性阻塞性肺疾病肺肠同治的科学内涵[J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(8):1086-1091.
- [28] WANG L, PELGRIM CE, PERALTA MARZAL LN, et al. Changes in intestinal homeostasis and immunity in a cigarette smoke- and LPS-induced murine model for COPD: the lung-gut axis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2022, 323(3):266-280.
- [29] 张婧懿, 刘志平, 池阔, 等. 基于肠道菌群介导的肠-肺轴理论探讨中医辨证论治肺病新思路[J]. 中医药学报, 2021, 49(12):103-107.
- [30] VIRGINIE AM, YANN R. Short chain fatty acids: the messengers from down below [J]. Front Neurosci, 2023, 17:1197759. doi: 10.3389/fnins. 2023. 1197759.
- [31] DONOVAN C, LIU G, SHEN S, et al. The role of the microbiome and the NLRP3 inflammasome in the gut and lung[J]. J Leukoc Biol, 2020, 108(3):925-935.
- [32] WANG R, HUANG C, YANG W, et al. Respiratory microbiota and radiomics features in the stable COPD patients[J]. Respir Res, 2023, 24(1):131.
- [33] 刘畅, 刘雄伟, 李嘉欣, 等. 基于 16S rRNA 基因测序研究金银花和山银花对急性肺损伤大鼠肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(2):130-137.
- [34] 吴永红, 王雅敏, 高青. 不同分期的慢性阻塞性肺疾病患者肠道微生态的变化[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(7):774-780.
- [35] MAO J, LI Y, BIAN Q, et al. The Bufe Jianpi formula improves mucosal immune function by remodeling gut microbiota through the SCFAs/GPR43/NLRP3 pathway in chronic obstructive pulmonary disease rats [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2022, 17:1285-1298. doi: 10.2147/COPD.S359428.

Effect of *Yupingfeng Granules* (玉屏风颗粒) on Metabonomics of Alveolar Lavage Fluid and Gut Microflora in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model Rats

LIU Haiye, LUO shan, JIA Zhiling, DONG Wenjun, WANG Yuanyuan, WANG Jiepeng, YU Wentao
Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang, 050200

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yupingfeng Granules* (玉屏风散) in preventing and treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) from the perspective of “lung-gut axis”. **Methods** Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, roxithromycin group and *Yupingfeng Granules* group, with 8 rats in each group. Except for the normal group, the rat model of COPD was prepared by intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) combined with smoking for 12 weeks. Since the fifth week of modeling, the roxithromycin group and the *Yupingfeng Granules* group were given 31.5 mg/(kg·d) and 1.575 g/(kg·d) of corresponding drugs respectively by gavage, and normal group and model group were given 10 ml/(kg·d) physiological saline. Sample was collected 24 hours after the last administration. The pathological changes of lung tissue were observed using HE staining; Ultrahigh performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UHPLC-QTOFMS) was used to detect the differential metabolites in alveolar lavage fluid (BALF) in all groups but roxithromycin group; 16S rDNA sequencing technology was used to detect the changes of intestinal flora, and the association analysis was conducted between the differential metabolites and the differential flora. **Results** Compared with the normal group, the model group showed an increase in goblet cells in the small bronchial wall, disappearance

of the smooth muscle layer of the bronchial wall, and infiltration of inflammatory cells; compared with the model group, roxithromycin group showed slight alveolar interstitial edema, and obviously reduced inflammatory cell, while no obvious alveolar interstitial edema was observed in the *Yupingfeng Granules* group, showing a small amount of inflammatory cell infiltration. The results of the BALF differential metabolite screening showed that compared with the normal group, 12 substances were upregulated and 19 substances were downregulated in the model group; compared with the model group, 37 substances in the *Yupingfeng Granules* group were upregulated and 43 substances were downregulated. KEGG analysis yielded a total of 2 metabolic pathways, glycerophospholipid metabolism, and unsaturated fatty acid biosynthetic metabolism; compared with the model group, choline, acetylcholine, glycerol-3-phosphate, glycerophosphate choline, palmitic acid, and arachidonic acid showed an upward trend, while stearic acid and docosahexaenoic acid showed a downward trend in *Yupingfeng Granules* group ($P < 0.05$). The results of the intestinal flora showed that, there are 80 different species between the normal group and the model group, and 65 different species between the model group and *Yupingfeng Granules* group. Among the top 5 species with relative abundance levels, compared with the model group, the level of *Prevotella_9*, *Ruminococcaceae_UCG-005*, *Ruminiclostridium_6* increase, and *Lactobacillus*, *Bacteroides* decrease ($P < 0.05$). The results of the correlation analysis showed that, in the normal and model groups, arachidonic acid was negatively correlated with *Oribacterium* ($r = -0.753$, $P < 0.01$); in the *Yupingfeng Granules* group and model group, stearic acid and *Bacteroides* ($r = 0.788$), *Mycobacterium* ($r = 0.826$), [*Eubacterium*]_{Ruminantium_Group} ($r = 0.770$) was positively correlated ($P < 0.01$), Arachidic acid was negatively correlated with *Roseiarcus* ($r = -0.779$), glycerol-3-phosphate was negatively correlated with *Desulfovibrio* ($r = -0.758$), Arachidonic acid was negatively correlated with *Oribacterium* ($r = -0.753$), and Palmitic acid was negatively correlated with *Pseudolabs* ($r = -0.750$, $P < 0.01$). **Conclusion** *Yupingfeng Granules* can affect the metabolism of BALF and the flora structure of intestinal microorganisms, and regulating the balance of “lung-gut axis” may be one of the mechanisms of *Yupingfeng Granules* in treatment of COPD.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease; *Yupingfeng Granules*; lung-gut axis; metabonomics; gut microflora

(收稿日期: 2022-12-09; 修回日期: 2023-08-22)

[编辑: 王利芬]

(上接第 2089 页)

Discussion on the “Fire Failing to Warm Earth” Pathogenesis of Colitis-Carcinoma Transformation Based on “Metabolic-Immune Interaction”

LI Fang¹, WU Hao¹, YOU Fengming², LI Xueke³, XU Bo¹, ZHU Peiwen¹, XIAO Chong¹

1. Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075; 2. Institute of Oncology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; 3. Oncology Teaching and Research Section, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT During the carcinoma transformation of colitis, the imbalance of “metabolic-immune interaction” resulted from abnormal energy and metabolic substrates flow and direction was the key process, which caused by intercellular metabolic competition. Based on traditional Chinese medicine (TCM) theory and clinical research, we found that “fire failing to warm earth” is the key pathogenesis of colon-cancer transformation. “Fire” was a synonym for TCM to understand the energy metabolism, combined modern medical research findings, we thought energy metabolism disorders was a microcosmic manifestation of the “fire decline”, while abnormal immune function was the biological basis of “earth deficiency”. The imbalance between “metabolism-immune interaction” and the “fire failing to warm earth” pathogenesis of colitis-cancer transformation demonstrated the different understanding of the same pathological mechanism between western medicine and TCM. For treatment, it could be effective to delay the transformation of colitis-cancer by synergistically regulate the energy metabolism meaning “replenish fire” and enhanced the immune function meaning “nourish earth”, which was called the methods of replenishing fire to nourish earth.

Keywords colitis; colorectal cancer; metabolism; immune; fire failing to warm earth

(收稿日期: 2023-05-14; 修回日期: 2023-06-14)

[编辑: 王利芬]