

◆方药研究◆

玉屏风散加味方对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道部分细菌定植量的影响

彭静, 羊忠山, 李玉卿, 袁嘉丽

云南中医学院, 云南 昆明 650500

[摘要] **目的:** 应用玉屏风散加味方干预慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 大鼠, 观察其对 COPD 大鼠气道链球菌、奈瑟菌、葡萄球菌、黄杆菌属、柠檬酸细菌属、弯曲菌属定植量的影响, 探讨该方可能的作用机制。**方法:** 选用 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 50 只, 随机分为正常组、模型组、玉屏风散加味方低、中、高剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组用脂多糖 (LPS) 加烟熏的方法建立 COPD 大鼠模型。玉屏风散加味方低、中、高剂量的浓度分别为 4.644 g/(kg·d)、9.288 g/(kg·d)、27.864 g/(kg·d)。采用高通量测序检测分析每组大鼠肺泡灌洗液链球菌、奈瑟菌、葡萄球菌、黄杆菌属、柠檬酸细菌属、弯曲菌属 6 类细菌的相对含量, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察右肺组织病理学变化。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠气道链球菌、奈瑟菌、葡萄球菌、黄杆菌属、柠檬酸细菌属、弯曲菌属相对含量均明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 玉屏风散加味方低剂量组大鼠气道链球菌、奈瑟菌、弯曲菌属、黄杆菌属、葡萄球菌相对含量明显降低 ($P < 0.05$); 玉屏风散加味方中剂量组大鼠气道柠檬酸细菌属、黄杆菌属、葡萄球菌相对含量明显降低 ($P < 0.05$); 而玉屏风散加味方高剂量组大鼠气道 6 类细菌相对含量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** 玉屏风散加味方低、中剂量能降低 COPD 大鼠气道部分细菌的定植, 但高剂量时则无明显降低作用。

[关键词] 玉屏风散加味方; 慢性阻塞性肺疾病 (COPD); 细菌定植; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R563 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 07-0001-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.07.001

Modified Yupingfeng Powder Prescription Has Effect on Partial Bacterial Colonization in the Airway of Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

PENG Jing, YANG Zhongshan, LI Yuqing, YUAN Jiali

Abstract: **Objective:** To apply modified Yupingfeng powder prescription to intervene rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), observe its effect on the bacterial colonization of streptococcus, Neisseria, staphylococcus, flavobacterium, Citrobacter and campylobacter in the airway of COPD rats, and discuss the probable functional mechanism of the prescription. **Methods:** Selected 50 male Wistar rats in SPF grade, and divided them into the normal group, the model group, the low-dose modified Yupingfeng powder prescription group, the middle-dose modified Yupingfeng powder prescription group and the high-dose modified Yupingfeng powder prescription group, 10 rats in each group. Except the normal group, the other groups were given the method of lipopolysaccharide and smoking to establish the model of COPD rats. The concentration of modified Yupingfeng powder prescription in the low-dose, middle-dose and high-dose group was 4.644 g/(kg·d), 9.288 g/(kg·d) and 27.864 g/(kg·d) respectively. By adopting high-throughput sequencing, detected and analyzed the relative content of 6 types of bacteria including streptococcus, Neisseria, staphylococcus, flavobacterium, Citrobacter and campylobacter in bronchoalveolar lavage fluid of rats in each group. By means of hematoxylin-eosin (HE) staining, observed the histopathologic changes of right lung tissue. **Results:** Comparing with the normal group, the relative content of streptococcus, Neisseria, staphylococcus, flavobacterium, Citrobacter and campylobacter in the airway of rats in the model group was all significantly increased, difference being significant ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the

[收稿日期] 2017-10-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81460684); 云南省科技计划青年项目 (2015FD035)

[作者简介] 彭静 (1981-), 女, 硕士, 研究方向: 微生物学。

[通信作者] 袁嘉丽, E-mail: yjl6688767@sina.com。

relative content of streptococcus, Neisseria, campylobacter, flavobacterium and staphylococcus in the airway of rats in the low-dose modified Yupingfeng powder prescription group was all significantly decreased ($P < 0.05$); the relative content of staphylococcus, flavobacterium and Citrobacter in the airway of rats in the middle-dose modified Yupingfeng powder prescription group was all significantly decreased ($P < 0.05$); but there was no significant difference being found in the relative content of 6 types of bacteria in the airway of rats in the high-dose modified Yupingfeng powder prescription group ($P > 0.05$).

Conclusion: Modified Yupingfeng powder prescription in low and middle dose can decrease the partial bacterial colonization in the airway of COPD rats, but the high-dose one has no significant clinical effect in reduction.

Keywords: Modified Yupingfeng powder prescription; Chronic obstructive pulmonary disease(COPD); Bacterial colonization; Animal experiment; Rats

下呼吸道细菌定植常见于慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)稳定期患者,定植的细菌作为刺激物有可能导致气道炎症及肺功能降低,并且当细菌负荷超过阈值时就会产生严重的炎症反应,导致 COPD 加重。玉屏风散加味方具有益气、涤痰、逐瘀的功效,临床用于治疗 COPD 疗效显著。本实验从细菌定植的角度观察玉屏风散加味方治疗 COPD 的作用机制,为该方的进一步推广应用提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 50 只,体质量(250 ± 20)g,购于成都达硕生物科技有限公司,动物合格证号 SCXK(川)2013-0024,饲养于云南中医学院实验动物中心。

1.2 实验药物 玉屏风散加味方由黄芪、白术、防风、桑白皮、浙贝母、白芥子、三七、莪术 8 味中药组成,由云南中医学院附属中医医院药房提供,均为《中国药典》所载品种,由云南中医学院中药鉴定教研室鉴定其品种和质量。全方生药总量 129 g,以成人每天治疗剂量根据大鼠体表面积换算为其等效剂量,此剂量作为中剂量组,低、中、高剂量的浓度分别为 4.644 g/(kg·d)、9.288 g/(kg·d)、27.864 g/(kg·d)。

1.3 试剂及仪器 红河牌香烟(红河卷烟厂,烟碱含量 10 mg/支),脂多糖(LPS, Sigma 公司,批号 L2880),细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Sangon Biotech 公司,批号 SK8256),荧光定量 PCR 试剂盒(Applied Biosystems 公司,批号 4472908),ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司),Fluorochem 9900-50 数字凝胶成像系统(Alpha Innotech corporation 公司)。

1.4 动物分组及模型制备 SPF 级雄性 Wistar 大鼠适应性饲养 1 周后随机分为正常组、模型组、玉屏风散加味方低剂量组(低剂量组)、玉屏风散加味方中剂量组(中剂量组)、玉屏风散加味方高剂量组(高剂量组)5 组,每组 10 只。除正常组外,其余 4 组大鼠分别于第 1、8、15、22 天给予 10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,气管内注入 LPS 200 μ L,第 2~28 天(注射 LPS 当天除外)上午将大鼠置于自制密闭的有机玻璃箱内,注入 5% (烟雾的容积/烟熏箱的容积)红河牌香烟烟雾,30 min/d,共 28 天;第 29 天开始,隔天烟熏雾化 1 次,30 min/d,直至第

112 天。正常组不予烟熏,但采用相同的方法气管内滴入等量的生理盐水。由于实验过程中操作不当导致部分大鼠死亡,因此结果中各组大鼠数量不等于 10。

1.5 干预方法 第 84 天起,每天灌胃给药 1 次,中剂量组为 9.288 g/(kg·d),低、中、高剂量的比例为 0.5 : 1 : 3,连续给药 28 天。正常组和模型组以无菌蒸馏水灌胃。

1.6 指标检测 给药结束后的第 2 天将大鼠处死后取材,无菌条件收集大鼠左肺支气管肺泡灌洗液(BALF),采用 Miseq 测序平台进行链球菌、奈瑟菌、葡萄球菌、黄杆菌属、柠檬酸细菌属、弯曲菌属 6 类细菌相对含量的高通量检测。取大鼠右肺组织制作病理切片,在固定液中固定,用乙醇进行梯度脱水,用二甲苯透明后进行浸蜡和包埋,切片后完成 HE 染色。

1.7 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 见图 1。正常组大鼠支气管上皮完整,管腔内无明显渗出与炎性细胞浸润;模型组大鼠气道及各级支气管黏膜下可见不同程度的慢性炎症细胞(包括淋巴细胞、浆细胞及单核细胞)和少量中性粒细胞浸润,支气管平滑肌厚度明显增加、支气管纤毛柱状上皮部分脱落、纤毛粘连倒伏、变形坏死,气道上皮复层化,杯状上皮细胞增生,肺小动脉管壁增厚,部分肺泡扩张融合。与模型组比较,中、高剂量组大鼠支气管病理改变明显减轻,而低剂量组大鼠支气管病理改善不明显。

2.2 各组大鼠气道 6 类细菌相对含量比较 见表 1。与正常组比较,模型组大鼠气道链球菌、奈瑟菌、葡萄球菌、黄杆菌属、柠檬酸细菌属、弯曲菌属相对含量均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,低剂量组大鼠气道链球菌、奈瑟菌、弯曲菌属、黄杆菌属、葡萄球菌相对含量明显降低($P < 0.05$),中剂量组大鼠气道柠檬酸细菌属、黄杆菌属、葡萄球菌相对含量明显降低($P < 0.05$),而高剂量组 6 类细菌相对含量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

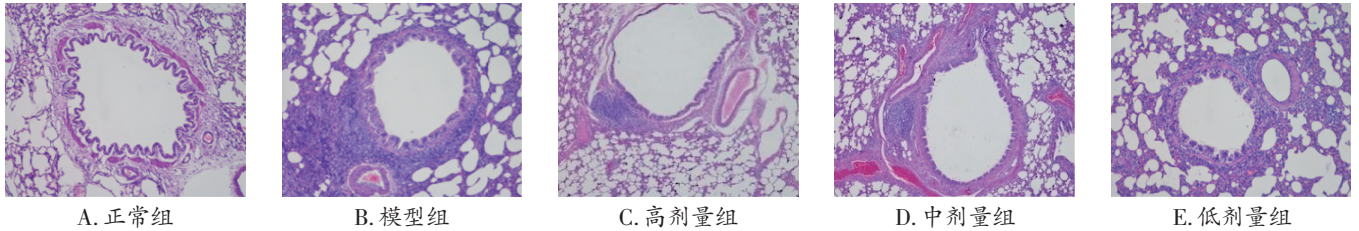


图1 HE染色切片比较图(x100)

表1 各组大鼠6类细菌相对含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	链球菌	奈瑟菌	葡萄球菌	黄杆菌属	柠檬酸细菌属	弯曲菌属	%
正常组	8	0.417 ± 0.062	0.039 ± 0.009	0.189 ± 0.034	0.041 ± 0.010	0.306 ± 0.078	0.063 ± 0.011	
模型组	7	0.777 ± 0.128 ^①	0.088 ± 0.017 ^①	0.321 ± 0.048 ^①	0.403 ± 0.172 ^①	3.629 ± 1.432 ^①	0.128 ± 0.025 ^①	
低剂量组	9	0.429 ± 0.075 ^②	0.042 ± 0.010 ^②	0.162 ± 0.030 ^②	0.027 ± 0.003 ^②	2.151 ± 1.072	0.071 ± 0.013 ^②	
中剂量组	7	0.443 ± 0.115	0.063 ± 0.010	0.146 ± 0.028 ^②	0.032 ± 0.014 ^②	0.257 ± 0.081 ^②	0.120 ± 0.039	
高剂量组	7	0.512 ± 0.068	0.063 ± 0.009	0.239 ± 0.056	0.173 ± 0.031	1.129 ± 0.755	0.093 ± 0.013	

与正常组比较, ①P < 0.05; 与模型组比较, ②P < 0.05

3 讨论

玉屏风散加味方中8味中药均有不同程度的抑菌作用。黄芪对痢疾杆菌、肺炎双球菌、溶血性链球菌A、B、C及金黄色、柠檬色、白色葡萄球菌等均有抑制作用^[4]; 白术挥发油对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和草绿色链球菌的抑制作用较明显, 抑菌率达95%以上^[2]; 防风具有抗菌和抗炎作用, 其对金黄色葡萄球菌、二型溶血性链球菌、肺炎双球菌等均有抑制作用^[5]; 有文献指出, 桑白皮甾醇对细菌的抑制作用强弱顺序依次为: 大肠杆菌 > 枯草芽孢杆菌 > 志贺氏菌 > 金黄色葡萄球菌^[6]; 海南温莪术挥发油对白色念珠菌、白色葡萄球菌、四联球菌、金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌及枯草芽孢杆菌都有抑制作用^[5]。此外, 浙贝母、白芥子、三七也有较好的抗炎抗病毒作用。本方8味中药相辅相成, 共同发挥着抑菌作用。

本实验选取的链球菌和葡萄球菌是革兰氏阳性菌, 其余4类细菌都是革兰氏阴性菌。其中葡萄球菌多数为非致病菌, 少数可导致疾病, 是最常见的化脓性球菌, 也是医院交叉感染的重要来源, 代表菌种有金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌等。刘雪梅等^[6]对COPD稳定期及急性加重期(AECOPD)患者痰标本进行细菌学分析, 筛查常见致病菌的感染情况, 结果发现金黄色葡萄球菌在AECOPD检出率明显高于稳定期, 说明金黄色葡萄球菌感染是一部分AECOPD的发病原因之一。裴琦等^[7]分析了重度COPD患者下呼吸道细菌感染情况, 结果显示主要革兰阳性病原菌以金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌为主。链球菌广泛存在于自然界人及动物粪便、健康人鼻咽部中, 大多数不致病, 与COPD密切相关的主要是肺炎链球菌, 有文献报道COPD患者肺炎链球菌检出率明显增高^[8]。

淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌是引起人类疾病的常见病原性

奈瑟菌, 其他菌种则属于寄生在人体上呼吸道的正常菌群或条件致病菌。汪洋^[9]的实验表明COPD患者口咽部菌群的优势菌群以草绿色链球菌和奈瑟氏菌为主, 检出率为100%。黄杆菌属是一种非发酵革兰阴性杆菌, 是以产生黄色素为特征的一个菌属, 可引起肺炎, 也可招致脑膜炎、败血症等疾病。该病的致病力不强, 为条件致病菌, 一般情况下不引起感染, 但在机体免疫力下降时可能引起感染。孙健龙等^[10]研究发现黄杆菌属引起的下呼吸道感染多发生在老年、有基础疾病、应用广谱抗菌药、进行机械通气治疗的患者, 且耐药率较高。柠檬酸细菌属是肠细菌科中的革兰氏阴性、可运动的细菌, 此菌属多与医院感染有关, 在临床实验室中, 尿液、血液和脑脊液等标本都能分离到该细菌。标本来源方面以痰标本为主, 其次为外科伤口拭子和尿液, 该菌对大多数抗菌药物仍具有较高的敏感性。弯曲菌属是一类微需氧菌, 对人类致病的主要是空肠弯曲菌和胎儿弯曲菌胎儿亚种, 前者是人类腹泻最常见的病原菌之一, 后者在免疫功能低下时可引起败血症、脑膜炎等。

综上, 此6类细菌虽然不是COPD下呼吸道感染常见检出率较高的细菌, 与COPD的相关报道也较少见, 但本实验结果显示, 造模后这6类细菌相对含量确实显著升高, 提示它们与COPD的发病相关, 而用玉屏风散加味方干预后它们的相对含量均有不同程度的下降, 说明该方能减轻这些细菌的定植量, 缓解COPD炎症, 且以低、中剂量组效果更佳, 这对我们临床运用该方具有一定的指导意义。

[参考文献]

- [1] 孙政华, 邵晶, 郭玫. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医临床研究, 2015, 7(25): 22-25.
- [2] 张雪青, 邵邻相, 吴文才, 等. 白术挥发油抑菌及抗肿瘤作用研究[J]. 浙江师范大学学报, 2016, 39(4): 436-

- 442.
- [3] 刘双利, 姜程曦, 赵岩, 等. 防风化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(10): 2146-2152.
- [4] 徐艳阳, 蔡森森, 于静. 桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除效果及抑菌活性研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 53-57.
- [5] 莫峥嵘, 邢福佳, 杨平, 等. 海南温莪术挥发油的抑菌活性及提取工艺研究[J]. 海南师范大学学报, 2016, 29(3): 274-276.
- [6] 刘雪梅, 杨岚. 聚合酶链式反应方法筛查慢性阻塞性肺疾病常见致病菌[J]. 西安交通大学学报, 2013, 34(1): 68-72.
- [7] 裴琦, 刘霄, 刘敬禹, 等. 重度慢性阻塞性肺疾病患者下呼吸道多药耐药菌感染的临床特点及病原学分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(5): 1152-1154.
- [8] 徐雪梅, 吴思颖, 谢轶, 等. 慢性阻塞性肺疾病合并下呼吸道感染患者病原菌分布与耐药性分析[J]. 成都医学院学报, 2017, 12(2): 175-181.
- [9] 汪洋. 慢性阻塞性肺疾病缓解期患者联合吸入沙美特罗/氟替卡松后口咽部微生物群和唾液 SIgA 及溶菌酶水平变化的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2015.
- [10] 孙健龙, 张素梅, 管晓芸, 等. 机械通气致下呼吸道黄杆菌属感染的临床研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(11): 2420-2422.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

胃萎清对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜超微结构的影响

庄昆海¹, 李海文², 刘凤斌¹

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 深圳市中医院, 广东 深圳 518000

[摘要] 目的: 通过观察慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠胃黏膜腺上皮主细胞、壁细胞超微结构的变化, 探讨健脾清热活血中药胃萎清对CAG大鼠胃黏膜超微结构的影响, 初步揭示胃萎清对CAG的作用机制。方法: 将CAG大鼠随机分为6组: 对照组、模型组、胃萎清高、中、低剂量组及叶酸组。以N-甲基-N'-硝基-N'-亚硝基胍(MNNG)合饥饱失常法建立CAG大鼠模型, 观察各组大鼠胃黏膜超微结构的变化。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠胃黏膜主细胞核固缩, 胞浆中出现大量空泡样变; 壁细胞染色质浓缩, 线粒体嵴数量减少。与模型组比较, 胃萎清高、中剂量组大鼠胃黏膜主细胞核仁结构尚均一, 粗面内质网基本整齐; 壁细胞核质比较规则, 线粒体嵴增多。胃萎清低剂量组大鼠胃黏膜主细胞核仁形态较模型组规则; 壁细胞核形态改变, 线粒体数量减少。叶酸组大鼠胃黏膜主细胞核染色质较正常, 胞浆出现空泡样变; 壁细胞染色质固缩, 线粒体嵴数量较模型组多。结论: 胃萎清能在一定程度上改善胃黏膜腺上皮主细胞、壁细胞的超微结构, 推测胃萎清能改善CAG患者不适症状的机制之一可能是改善胃黏膜超微结构。

[关键词] 慢性萎缩性胃炎(CAG); 胃萎清; 超微结构; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R573.3*2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 07-0004-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.07.002

Weiweiqing Has Effect on Ultrastructure of Gastric Mucosa in Rats with Chronic Atrophic Gastritis

ZHUANG Kunhai, LI Haiwen, LIU Fengbin

Abstract: Objective: To investigate the effect of Weiweiqing in Chinese medicine for strengthening spleen, clearing heat and activating blood on ultrastructure of gastric mucosa in chronic atrophic gastritis(CAG) rats by observing the ultrastructural

[收稿日期] 2018-03-11

[基金项目] 广东省中医药局建设中医药强省专项资金项目(粤中医函[2015]19号); 广东省中医药强省建设专项资金项目(粤中医办函[2015]93号); 广东省中医药局科研项目(20161132)

[作者简介] 庄昆海(1984-), 男, 主治医师, 研究方向: 脾胃系疾病的中医临床疗效研究。

[通信作者] 刘凤斌, E-mail: liufb163@163.com.