

从溃疡性结肠炎大鼠呼吸道与肠道微生态同步动态变化探讨“肺与大肠相表里”

郑秀丽 杨 宇 王宝家 唐洪屈 周新颖

(成都中医药大学基础医学院四川,成都,610075)

摘要 目的:观察溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)大鼠在“肠病及肺”过程中呼吸道和肠道微生态的同步动态变化情况,探讨中医“肺与大肠相表里”理论的微生态机制。方法:以三硝基苯磺酸(TNBS)-乙醇相结合的方法诱导实验性大鼠 UC 模型,分别在造模后第 8 天、第 29 天和第 50 天三个时间点对呼吸道和肠道的需氧菌总数、厌氧菌总数、肠杆菌、肠球菌、葡萄球菌、产气荚膜梭菌、双歧杆菌、乳酸杆菌进行同步检测。结果:UC 大鼠出现肠道菌群失调,益生菌数量减少,条件致病菌数量增多。其呼吸道部分菌群同步出现相关变化。造模后第 8 天,需氧菌总数和葡萄球菌在呼吸道和肠道同步增多,厌氧菌总数和肠杆菌在肠道增多而在呼吸道减少。造模后第 29 天,需氧菌总数和葡萄球菌在呼吸道和肠道同步减少,厌氧菌总数和肠杆菌在肠道减少而在呼吸道增多;造模后第 50 天,呼吸道和肠道的需氧菌总数、厌氧菌总数和葡萄球菌在呼吸道和肠道同步增多。结论:肠病大鼠可出现呼吸道菌群的改变,在“肠病及肺”病理传变过程中,肠病大鼠呼吸道和肠道的部分菌群出现同步增多或减少的相关性变化,提示微生态菌群的变化可能是“肠病及肺”的机制和表现形式之一。

关键词 UC;肺与大肠相表里;肠病及肺;肠道微生态;呼吸道微生态

Exploration on the Interior-Exterior Relation Between Lung and Large Intestine from the Perspective of Synchronous Dynamic Change of Microecology of Respiratory and Intestinal Passage of Rats with Ulcerative Colitis

Zheng Xiuli, Yang Yu, Wang Baojia, Tang Hongqu, Zhou Xinying

(College of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Abstract Objective: To explore the micro ecological mechanism of the TCM theory “lung and large intestine are exteriorly and interiorly related” via observing the synchronous dynamic change of microecology of respiratory and intestinal passage of rats with ulcerative colitis. **Methods:** The ulcerative colitis rat models were created by TNBS (trinitro-benzene-sulfonic acid). We synchronously detected total aerobic bacteria, anaerobic bacteria, enterobacterium, enterococcus, staphylococcus, clostridium perfringens, bifidobacterium and lactobacillus in respiratory and intestinal passage on the 8th day, the 29th day and the 50th day after molding. **Results:** Dysbacteriosis appeared among the rat models including probiotics decreased and conditional pathogenic bacteria increased. Meanwhile, part of the respiratory floras of the model rats also appeared certain relative changes. Aerobe total and staphylococcus synchronously increased both in lung and large intestine on the 8th day while anaerobe total and enterobacterium increased in intestine but decreased in lung. Aerobe total and staphylococcus synchronously decreased both in lung and large intestine at the 29th day while anaerobe total and enterobacterium decreased in intestine but increased in lung. Aerobe total, anaerobe total and staphylococcus synchronously increased both in lung and large intestine at the 50th day. **Conclusion:** Rats with enteropathy also can suffer from changes of respiratory floras. Parts of the respiratory and intestinal floras of rats with enteropathy appear synchronous changes during the process of enteropathy affected lung. It may increase or decreased synchronously. Changes in microbial floras can be one of the mechanisms and forms of “enteropathy affected lung”.

Key Words Ulcerative colitis; Exterior and interior relation of lung and large intestine; Enteropathy affected lung; Intestinal microecology; Respiratory microecology

中图分类号:R221;R256.1;R332 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.04.006

1 引言

“肺与大肠相表里”是颇具中医特色的脏腑相关理论之一。肺与大肠经脉络属,生理上相互协调,病理上相互影响(肺病及肠,肠病及肺),治疗上相互为用(肺病治肠、肠病治肺、肺肠同治)。鉴于该理论在生

理、病理、临床治疗等方面的重要意义,开展关于“肺与大肠相表里”这一脏腑相关理论的应用基础研究十分必要。

有关溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)的前期研究发现,该病可以特异性引起肺支气管病损,肺损伤

基金项目:国家重大基础研究发展计划(973 计划)项目(编号:2009CB522706)

第一作者:郑秀丽(1981—),女,博士,讲师, E-mail:zhengxiuli023@163.com

通信作者:杨宇(1953—),男,教授,博士生导师, E-mail:yang6666yu@163.com

是该病的肠外表现之一^[1-2]。本课题组前期研究亦发现^[3-5], UC 模型大鼠可出现肺功能减弱和肺组织形态改变, 如肺和支气管出现上皮细胞变性、坏死、脱落、管腔内炎性渗出等; 从三个时间节点对该模型进行的动态观察发现, “肠病及肺” 是否发生, 主要取决于肠病的病理损伤程度, 肺脏的病理损伤程度, 与肠病的病变时间成正比。本研究拟从观察 UC 大鼠在“肠病及肺”过程中肠道和呼吸道微生态的同步动态变化切入, 探讨中医“肺与大肠相表里”理论的微生态机制。

2 材料和方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 65 只, 体重(180±20)g, 购自成都达硕生物科技有限公司(动物合格证号: scxk(川)2008-24)。

2.1.2 主要药物与试剂 TNBS(SIGMA 公司, 批号: 109k5008); 肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸杆菌、葡萄球菌、产气荚膜梭菌、需氧菌、厌氧菌培养基均购自北京陆桥生物科技有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 动物分组 65 只大鼠适应性喂养 3 d 后, 随机分为空白对照组(30 只)和肠病模型组(35 只), 分别在造模第 8 天、第 29 天、第 50 天随机抽取模型动物 10 只处死观察, 构成模型 1 组(肠病第 8 天组), 模型 2 组(肠病第 29 天组)和模型 3 组(肠病第 50 天组)三组模型。空白对照组亦分别于上述各相应时间点随机抽取 10 只处死与模型组进行对比观察。

2.2.2 造模 以三硝基苯磺酸(TNBS)-乙醇相结合的方法诱导实验性大鼠 UC 模型。大鼠以 2.4% 水合氯醛 0.8~1.0 mL/100 g 腹腔注射麻醉后, 在石蜡油润滑下, 经肠道轻缓插入输液管至距肛门 8 cm 处将 100 mg/kg TNBS 加入等体积 50% 乙醇, 注入大鼠结肠, 然后注入约 0.5 mL 空气, 将大鼠头部向下倾斜 45 度放置 1 min, 然后保持平躺自然清醒。空白对照组大鼠按上述方法给予等量生理盐水灌肠。造模 3 d 后从模型组随机抽取 2 只大鼠, 取结肠组织, 做普通光镜下病理形态学观察, 确定模型是否复制成功, 模型成功标准参照文献^[3]。于首次造模后每 7 d 按上述方法和剂量对模型组大鼠重复造模, 直至实验结束。空白对照组大鼠按上述方法给予等量生理盐水灌肠。

2.2.3 标本采集与制备 分别在造模第 8 天、第 29 天、第 50 天随机抽取模型组和同时时间点的空白组大鼠各 10 只进行标本采集。同步收集结肠内容物和支气管肺泡灌洗液, 用于肠道菌群和呼吸道菌群的同步检测。结肠内容物的收集方法: 2.4% 水合氯醛 1.0~1.2

mL/100 g 腹腔注射麻醉, 打开腹腔, 剖开结肠, 取结肠内容物(粪便)0.1 g, 加入稀释液进行 10 倍稀释备用。支气管肺泡灌洗液的收集方法: 暴露气管和肺, 结扎左肺, 将无菌生理盐水 8 mL 注入右肺, 反复冲洗, 回抽支气管肺泡灌洗液 4~5 mL, 放入无菌离心管备用。

2.2.4 标本培养与检测方法 实验标本经 10 倍系列稀释后, 选择适当稀释度接种平板, 每稀释度接种 2 个平行样, 每个样每样点种 20 μ L, 培养后经鉴定和计数平板上的目标菌落数 N1, 计算原始样品中的菌落数 V。对结肠内容物标本: $V(\text{cfu/g 粪便}) = 50N1 \times \text{稀释倍数}$; 对支气管肺泡灌洗液标本: $V(\text{cfu/mL 灌洗液}) = 50N1 \times \text{稀释倍数}$ 。再将得到的菌落形成单位(CFU)数据转换成对数值(lg), 完成统计运算。肠杆菌、肠球菌、乳杆菌、双歧杆菌和产气荚膜梭菌的检测方法参照卫生部《保健食品检验与评价技术规范》2003 版第 148-153 页调节肠道菌群功能检验方法; 需氧细菌计数以及厌氧细菌计数原理参照 GB 4789.2 食品微生物学检验之菌落总数测定。

2.2.5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠肠道菌群检测结果 见表 1。与空白组比较, 肠病模型大鼠第 8 天肠道需氧总数、肠杆菌和产气荚膜梭菌显著增多($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而葡萄球菌显著减少($P < 0.05$)。肠病模型大鼠第 29 天肠道葡萄球菌、肠球菌、乳酸杆菌、厌氧总数和产气荚膜梭菌均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。肠病模型大鼠第 50 天肠道双歧杆菌、乳酸杆菌和产气荚膜梭菌均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与肠病模型大鼠第 8 天比较, 肠病模型大鼠第 29 天肠道需氧总数、肠杆菌、肠球菌、乳酸杆菌、厌氧总数和产气荚膜梭菌均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 肠病模型大鼠第 50 天肠道需氧总数、肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌和产气荚膜梭菌均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与肠病模型大鼠第 29 天比较, 肠病模型大鼠第 50 天肠道葡萄球菌和肠球菌均显著增多($P < 0.01$)。

3.2 各组大鼠呼吸道菌群检测结果 见表 2。与空白组比较, 肠病模型大鼠第 8 天呼吸道厌氧总数显著减少($P < 0.01$), 葡萄球菌显著增多($P < 0.05$)。肠病模型大鼠第 29 天呼吸道菌群无显著变化($P > 0.05$)。肠病模型大鼠第 50 天呼吸道厌氧总数显著增多($P < 0.05$)。与肠病模型大鼠第 8 天比较, 肠病模型大鼠第 29 天呼吸道需氧总数和葡萄球菌显著增多($P <$

0.01),厌氧总数显著减少($P < 0.01$);肠病模型大鼠第50天呼吸道厌氧总数显著增多($P < 0.01$)。与肠病模型大鼠第29天比较,肠病模型大鼠第50天呼吸道需氧总数和葡萄球菌显著增多($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠肠道菌群检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	需氧总数	厌氧总数	葡萄球菌	产气荚膜梭菌	肠杆菌	肠球菌	乳酸杆菌	双歧杆菌
空白组	10	7.76 ± 0.81	9.33 ± 0.35	3.89 ± 0.76	6.38 ± 0.63	5.71 ± 0.57	5.25 ± 0.44	8.69 ± 0.81	9.04 ± 0.74
模型第8天	10	8.47 ± 0.47 *	9.45 ± 0.58	3.15 ± 0.37 *	8.00 ± 0.60 **	7.67 ± 0.40 **	5.76 ± 0.56	8.72 ± 0.45	9.19 ± 0.29
模型第29天	10	7.31 ± 0.58 △△	8.59 ± 1.01 *△	2.65 ± 0.90 **	4.77 ± 1.22 *△△	5.63 ± 0.63 △△	4.46 ± 0.80 *△△	7.52 ± 1.11 *△△	8.67 ± 1.13
模型第50天	10	7.28 ± 0.74 △△	8.88 ± 0.93	3.81 ± 0.69 ▲▲	5.40 ± 0.87 *△△	5.98 ± 0.67 △△	5.26 ± 0.61 ▲▲	7.64 ± 0.76 *△△	8.14 ± 1.03 *△

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型第8天比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与模型第29天比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。

表2 各组大鼠呼吸道菌群检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	需氧总数	厌氧总数	葡萄球菌	产气荚膜梭菌	肠杆菌	肠球菌	乳酸杆菌	双歧杆菌
空白组	10	3.83 ± 0.57	2.39 ± 1.07	2.47 ± 0.82	0.16 ± 0.53	0.33 ± 0.73	0.22 ± 0.70	0.21 ± 0.68	0.00 ± 0.00
模型第8天	10	4.04 ± 0.36	0.93 ± 1.02 **	3.01 ± 0.36 *	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.33	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型第29天	10	2.94 ± 0.56 △△	2.84 ± 0.53 △△	1.93 ± 0.44 △△	0.30 ± 0.65	0.61 ± 0.80	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.83
模型第50天	10	4.24 ± 0.56 ▲▲	3.18 ± 0.52 *△△	2.80 ± 0.30 ▲▲	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.65	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型第8天比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与模型第29天比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。

3.3 肠道微生物定植抗力(B/E值)结果 见表3。与空白组比较,模型第8天组和模型第50天组肠道定植抗力显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型第8天比较,模型第29天组和模型第50天组肠道定植抗力显著增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型第29天比较,模型第50天组的肠道定植抗力显著降低($P < 0.05$)。

表3 各组大鼠的肠道微生物定植抗力(B/E值)比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	B/E值
空白组	10	1.58 ± 0.10
模型第8天	10	1.20 ± 0.07 **
模型第29天	10	1.55 ± 0.24 △△
模型第50天	10	1.37 ± 0.23 *△▲

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型第8天比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与模型第29天比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。

3.4 各时间点肠道菌群变化曲线 如图1所示。各菌种在各时间点皆出现了变化。除葡萄球菌外,其余各菌种都在模型第8天时增多,到第29天时减少,第50天时又逐步增多。说明肠道菌群在受到肠道疾病影响的作用下,可出现肠道菌群失调,并随着疾病时日的延长,出现肠道菌群的逐步调整变化。

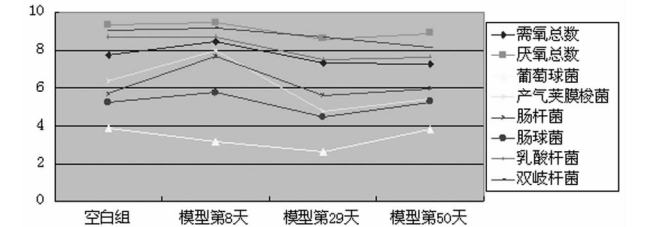


图1 肠道菌群变化曲线

3.5 各时间点呼吸道菌群的变化曲线 如图2所示。肠病时,呼吸道主要出现变化的菌种是需氧总数、厌氧总数、葡萄球菌和肠杆菌。其中变化曲线趋势一致的

是需氧总数和葡萄球菌。都是在模型第8天增多,第29天减少,到第50天又增多。此趋势与肠道的同一菌群变化趋势具有一致性。

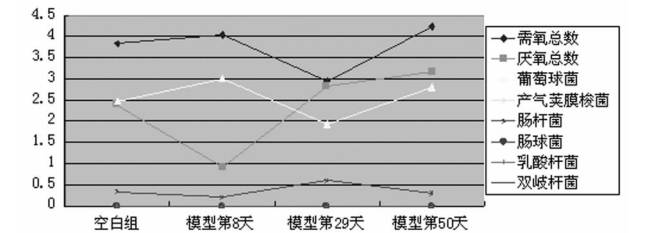


图2 呼吸道菌群变化曲线

4 讨论

UC是一种以累及结肠黏膜和黏膜下层的浅表性、非特异性炎症为主要表现的消化道疾病,其发病被认为是宿主遗传易感性、黏膜免疫与肠道菌群共同作用的结果,可能与肠道菌群失调、肠黏膜屏障功能缺陷、肠道通透性增高以及肠道内成分诱发的异常免疫反应等因素有关。国内外研究一致表明,与正常人相比,UC患者普遍存在不同程度的肠道菌群失调,肠道菌群的改变与UC起病、复发密切相关,已成为广泛共识^[6-8]。

本研究结果显示,UC大鼠出现肠道菌群失调,益生菌减少而条件致病菌增多,与国内外同类研究结论一致。同时,模型大鼠呼吸道部分菌群也出现一定程度的相关变化。造模第8天,需氧总数和葡萄球菌在呼吸道和肠道同步增多,厌氧总数和肠杆菌在肠道增多而在呼吸道减少。造模第29天,需氧总数和葡萄球菌在呼吸道和肠道同步减少,厌氧总数和肠杆菌在肠道减少而在呼吸道增多;造模第50天,呼吸道和肠道的需氧总数、厌氧总数和葡萄球菌在呼吸道和肠道同步增多。可见,当肠病(UC)时,部分肺、肠菌群可出现

同步增多或同步减少,或在肠减少而在肺增多,或在肠增多而在肺减少的相关变化,提示肺、肠微生物菌群的变化可能是“肠病及肺”的途径和表现形式之一。

肠道微生物定植抗力是指肠道内源性专性厌氧菌抑制消化道中主要属需氧菌的潜在致病菌群数量的能力,1971 年由荷兰微生物学家 Van der waaij 教授提出^[9]。吴仲文和李兰娟等^[10-11]研究认为,粪便中双歧杆菌与肠杆菌的数量比值(B/E 值)可作为肠道微生物定植抗力指标应用于临床。B/E 值大于 1 表示肠道定植抗力正常,B/E 值小于等于 1 表示肠道定植抗力降低。本研究结果显示,模型第 8 天大鼠肠道微生物定植抗力(B/E 值)显著下降,模型第 29 天 B/E 值逐渐恢复至正常状态,模型第 50 天 B/E 值略呈下降趋势。提示肠病(UC)发病可直接导致肠道微生物定植抗力(B/E 值)下降,引起严重的肠道菌群失调或紊乱,病程中肠道微生态可呈现自我恢复平衡的能力,肠道定植抗力趋于正常,由于病灶不除,随着疾病时间延长,肠道定植抗力亦无法维持趋于正常的状态,定植抗力下降。

本研究初步发现 UC 大鼠出现肠道微生态改变,可伴随出现呼吸道微生态的同步变化。今后研究尚可借助新一代 454 高通量测序技术等分子生物学方法,更准确地鉴定菌群,通过样品细菌总基因组 DNA 的提取及其 DNA 基因测序技术,更深入地探讨“肠病及肺”病理传变过程中呼吸道和肠道特异相关功能菌的

作用机制。

参考文献

- [1] 朱立,王新月,杨雪,等.从溃疡性结肠炎大鼠肺损伤看“肺与大肠相表里”的特异性[J].中国中西医结合杂志,2013,33(3):346-350.
- [2] 盛益华,王新月,闫昕,等.从溃疡性结肠炎大鼠肺损伤细胞凋亡机制探讨“肺与大肠相表里”[J].世界华人消化杂志,2013,21(13):1171-1172.
- [3] 陈小兵,杨宇,唐宇娇,等.“肠病及肺”动物模型的建立研究思路探讨[J].云南中医中药杂志,2012,33(2):7-9.
- [4] 杨瞿嘉.基于肠病模型大鼠病理改变及相关炎症因子的变化探讨“肠病及肺”病理传变机制[D].成都:成都中医药大学,2012.
- [5] 陈小兵.从“肠病”大鼠模型肺与结肠组织的病理形态及其 VIP、SP、CGRP 的表达探讨“肠病及肺”的分子机制[D].成都:成都中医药大学,2012.
- [6] 刘力,张欢.肠道菌群失调与溃疡性结肠炎[J].现代中医药,2010,30(2):45-47.
- [7] 牛敏,杜艳,缪应雷.溃疡性结肠炎患者肠道菌群分布的研究现状[J].微生物学免疫学进展,2012,40(6):68-70.
- [8] 徐佰国,王英凯,王策,等.肠道菌群与溃疡性结肠炎[J].中国老年学杂志,2012,32(12):2665-2667.
- [9] Van der Waaij, D., J. M. Berghuis, J. E. C. Lekkerkerk - vander Wees. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic - treated mice[J]. J. Hyg, 1971, 69:405.
- [10] 吴仲文,李兰娟,马伟杭,等.肠道微生物定植抗力的新指标—B/E 值[J].浙江预防医学,2000,12(7):4-5.
- [11] 李兰娟.感染微生物生态学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2012:11-12,31-32,42-43,84.

(2014-03-11 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 417 页)

肺肠功能、炎症反应及黏膜免疫等多角度证实了肺通气功能障碍、肠黏膜屏障功能受损、全身及肺脏局部炎症反应水平明显升高、肺肠组织黏膜免疫的同步反应是 ARDS“肺肠同病”的主要病理特征。

研究数据显示,通腑泻肺中药具有多途径、多靶点的疗效机制,通过改善肺通气和肠屏障功能,减低全身及局部炎症反应水平,调节肺肠黏膜免疫应答等实现患病机体的整体调节,同时也为后续深入研究“肺与大肠相表里”理论提供了思路和线索。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的诊断标准(草案)[J].中华结核和呼吸杂志,2000,23(4):203.
- [2] 李文放,陈杰,杨兴易,等.大黄对急性呼吸窘迫综合征患者的临床疗效[J].中国急救医学,2003,23(2):102.
- [3] 耿耘,马超英.中西医结合治疗呼吸窘迫综合征临床观察[J].江西中医学院学报,1997,9(1):4-5.
- [4] 柯雪帆,赵章忠,张玉萍,等.《伤寒论》和《金匱要略》中的药物剂量

问题[J].中国中药杂志,1983,8(12):36-38.

- [5] 张青,毛宝龄.油酸和内毒素两次打击大鼠急性肺损伤动物模型研究[J].第三军医大学学报,2000,22(6):603-604.
- [6] 张登本.中医学基础[M].北京:中国中医药出版社,2003:6-9.
- [7] 刘恩顺,孙增涛,苏景深,等.浅析肺肠相关与 ALI/ARDS 证候演变—附 127 例调查资料分析[J].辽宁中医杂志,2013,40(4):638-639.
- [8] 孟苗苗,付敏,郑莉,刘恩顺,孙增涛. ALI/ARDS 脏腑证候分布及肺肠相关特征的初步调查[J].天津中医药大学学报,2011,04:215-217.
- [9] 郑莉,刘恩顺,赵燕红.127 例 ALI/ARDS 患者肺与大肠证候的 Logistic 回归分析[J].中国中医急症,2013,01:8-9,16.
- [10] 刘恩顺,孙增涛,苏景深,封继宏,王强.浅析肺肠相关与 ALI/ARDS 证候演变——附 127 例调查资料分析[J].辽宁中医杂志,2013,04:638-639.
- [11] 陈岩,白雪松,隋吉峰,张东伟,林萍.聚类分析研究急性呼吸窘迫综合征证候规律[J].辽宁中医药大学学报,2013,11:13-14.
- [12] 栗艳茹. ARDS 的中医证候要素与临床分期的相关性研究[D].济南:山东中医药大学,2012.

(2014-03-11 收稿 责任编辑:洪志强)