

基于“肺与大肠相表里”理论探讨射干止咳胶囊 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染肺炎大鼠肠道菌群的影响

时艳杰¹, 张颖², 甘雨², 赵玥², 尹江涛², 梁丽喆², 曲妮妮¹, 李国信²

(1. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学附属第二医院, 辽宁 沈阳 110034)

摘要:目的 基于“肺与大肠相表里”的中医理论,应用 16SrDNA 分析射干止咳胶囊对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染肺炎大鼠肠道菌群的影响,探讨射干止咳胶囊对大鼠 MRSA 肺炎的作用及机制。方法 取 60 只 SD 大鼠随机分为 6 组,10 只/组,分别为阴性对照组、模型对照组、射干止咳胶囊低、中、高剂量组和苏黄止咳胶囊组,除阴性对照组外,其余各组滴鼻感染 MRSA 连续 5 d,造模期间同时灌胃给药,1 次/d,连续 14 d,阴性对照组、模型对照组给予等体积的纯水。末次给药前 1 d 进行粪便采集,放入 -80 ℃ 保存,准备进行 16SrDNA 高通量测序。末次给药后 1 h,对所有存活动物麻醉后进行血常规检测、肺组织病理切片。根据 6 组大鼠的病理报告和血常规结果,取阴性对照组、模型对照组、射干止咳胶囊低、中剂量组、苏黄止咳胶囊组各组 6 只大鼠粪便进行 16SrDNA 测序。结果 通过 16SrDNA 测序,菌群多样性和丰富度方面,与阴性对照组比,虽然模型组有上调的趋势,但差异未有统计学意义;与模型组相比,射干止咳胶囊菌群的多样性和相对丰度有下调的趋势,并向阴性对照组接近,但是差异未有统计学意义。厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门为大鼠的优势菌门,与模型组相比,射干止咳胶囊分别上调了拟杆菌门、下调了变形菌门。通过菌群基因功能预测,与模型组相比,其中烟酸和烟酰胺代谢是射干止咳胶囊中、低剂量组共同作用的代谢通路。结论 射干止咳胶囊可能通过上调了拟杆菌门、下调了变形菌门改善了 MRSA 肺炎大鼠的肠道内稳态,从烟酸和烟酰胺代谢通路发挥对 MRSA 肺炎大鼠的作用。

关键词:射干止咳胶囊;肠道菌群;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;16SrDNA

中图分类号:R259.631

文献标志码:A

文章编号:1673-7717(2024)11-0055-12

Effect of Shegan Zhike Capsule(射干止咳胶囊) on Intestinal Flora of Pneumonia Rats Infected with Methicillin – resistant Staphylococcus Aureus Based on Theory of “Lung and Large Intestine”

SHI Yanjie¹, ZHANG Ying², GAN Yu², ZHAO Yue², YIN Jiangtao², LIANG Lizhe², QU Nini¹, LI Guoxin²

(1. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China;

2. Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, Liaoning, China)

Abstract: *Objective* Based on the theory of “lung and large intestine” in traditional Chinese medicine, 16SrDNA was used to analyze the effect of Shegan Zhike Capsule(射干止咳胶囊) on intestinal flora in rats with pneumonia caused by methicillin – resistant staphylococcus aureus, and to explore the effect and mechanism of Shegan Zhike Capsule on methicillin – resistant staphylococcus aureus(MRSA) pneumonia in rats. *Methods* Sixty SD rats were randomly divided into 6 groups, 10 rats in each group, which were negative control group, model control group, low, medium and high dose groups of Shegan Zhike Capsule and Suhuang Zhike Capsule(苏黄止咳胶囊) group. Except the negative control group, the other groups were infected with MRSA by nasal drip for 5 consecutive days. During the modeling period, intragastric administration was given once a day for 14 consecutive days. The negative control group and the model control group were given the equal volume of pure water. The feces were collected the day before the last administration and stored at -80 ℃ for 16SrDNA high – channel sequencing. One hour after the last administration, blood routine test and lung tissue pathological section were performed on all surviving animals after anesthesia. According

基金项目:国家科技部项目(2017ZX09301019);辽宁省科技厅重点研发计划项目(2020JH2/10300090);辽宁省科技厅博士启动基金项目(2022 – BS – 068)

作者简介:时艳杰(1988 –),女,辽宁朝阳人,副主任医师,博士,研究方向:中药临床药理。

通讯作者:李国信(1963 –),男,辽宁沈阳人,研究员,博士研究生导师,博士,研究方向:中药新药开发。E-mail: syyljldx024@126.com。

曲妮妮(1966 –),女,辽宁沈阳人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中医内科呼吸系统疾病。E-mail: qvnni@sina.com。

to the pathological reports and blood routine results of 6 groups, the feces of 6 rats in negative control group, model control group, low-dose and middle-dose groups of Shegan Zhike Capsule and Suhuang Zhike Capsule group were taken for 16SrDNA sequencing. *Results* By 16SrDNA sequencing, compared with those of the negative control group, the flora diversity and richness of the model group had an upward trend, but there was no statistically significant difference. Compared with those of the model group, the flora diversity and relative abundance of Shegan Zhike Capsule groups had a downward trend, and were close to those of the negative control group, but there was no statistically significant difference. Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria were the dominant bacteria in rats. Compared with the model group, Shegan Zhike Capsule up-regulated Bacteroidetes and down-regulated Proteobacteria respectively. According to the prediction of bacterial gene function, compared with that of the model group, the metabolism of niacin and nicotinamide was the metabolic pathway of the middle and low dose groups of Shegan Zhike Capsule. *Conclusion* Shegan Zhike Capsule may improve intestinal homeostasis in rats with MRSA pneumonia by up-regulating Bacteroidetes and down-regulating Proteobacteria, and plays a role in MRSA pneumonia rats from niacin and nicotinamide metabolic pathways.

Keywords: Shegan Zhike Capsule (射干止咳胶囊); intestinal flora; methicillin-resistant staphylococcus aureus; 16SrDNA

人类对抗生素的广泛使用甚至滥用导致细菌多重耐药和广泛耐药已经成为最严重的世界性公共卫生问题之一,新靶点与新结构的抗生素研发已进入瓶颈期,人类即将进入“后抗生素时代”。中医没有“多重耐药菌肺炎”病名,属于“风温肺热”“温病”范畴。薛生白早在明清时期治疗温病中指出“肺胃大肠,一气相通,温热究三焦,以此一脏二腑为最要,肺开窍于鼻,吸入之邪,先犯于肺,肺经不解,则传于胃,谓之顺传,不但脏病传腑为顺,而自上及中,顺流而下,其顺也有不待言者,故温热以大便不闭者易治,为邪有出路也”(《温热经纬·薛生白湿热病》)。这不仅说明了温病中肺与大肠的关系,还阐述大便不闭者因邪有出路而预后良好,同时为以“肺与大肠相表里”为理论依据治疗多重耐药菌肺炎提供了依据。而中药射干在《景岳全书》早有记载:味苦,微寒,有毒。阴也,降也。治咳逆上气,喉痹咽疼,散结气不得息,除胸腹邪热胀满,清肝明目,消痰结核,痲癖热疔,降实火,利大肠,消瘀血。基于“肺与大肠相表里”的中医理论,以中药射干“降实火、利大肠”的传统功效为着眼点,借助现代肠道菌群技术,探讨射干止咳胶囊对大鼠多重耐药菌肺炎的作用及机制,为解决临床多重耐药菌感染问题奠定基础。

射干止咳胶囊是科技部“十三五”重大新药创制项目资助的组分中药制剂,其主要药效学实验结果表明,射干止咳胶囊通过抑制快适应肺牵拉受体和C纤维释放神经肽发挥外周镇咳作用、通过抑制气道杯状细胞增生等发挥祛痰作用、并有抗炎^[1]、免疫增强作用。课题组前期研究已证实,射干止咳胶囊体外实验对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)有明显的抑制作用,并能增强抗生素的敏感性,通过分子对接的 glide 虚拟筛选方法,初步推断射干有效成分发挥抗耐药菌作用与 MRSA 青霉素结合蛋白 2a 相关^[2]。基于前期体外抑菌实验的基础,采用 MRSA 感染大鼠肺炎模型观察射干止咳胶囊体内抑制多重耐药菌的作用。

1 实验材料

1.1 实验动物

SD 大鼠, SPF 级,雌雄各半,体质量 160~180 g,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004,由湖南斯莱克景达实验动物

有限公司提供。饲养于广东莱恩医药研究院有限公司屏障环境动物房,动物使用许可证号:SYXK(粤)2020-0146,温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%。SPF 级大、小鼠维持饲料(Co60 辐照)购自江苏美迪森生物医药有限公司,批号为 210425。

1.2 实验药品及制备

射干止咳胶囊由辽宁省中医药研究院药学室提供,每粒胶囊含内容物 0.30 g,1 g 内容物相当于 0.33 g 提取物,批号:20200601;苏黄止咳胶囊,国药准字 Z20103075,扬子江药业集团北京海燕药业有限公司,批号:20053011。

MRSA 菌株由辽宁中医药大学附属第二医院检验科微生物室提供(临床分离号 200972),菌株的分离培养按照《全国临床检验操作规程第四版》进行,所用菌株经标准菌株 ATCC29213 采用法国梅里埃 VITEK2 compact 微生物分析系统鉴定。

1.3 仪器

BSC1600-II-B2 型生物安全柜(山东新华医疗器械股份有限公司);4111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);YXQG04B 型手提式压力蒸汽灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);BSA2202S 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];B-203 型生物显微镜(重庆奥特光仪器有限公司);Vortex Genius 3 漩涡混匀器[艾卡(广州)仪器设备有限公司];L535R 低速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);SW-CJ-2F(D)型净化工作台(苏州市苏杭科技器材有限公司)。

2 MRSA 感染肺炎大鼠模型建立

2.1 MRSA 菌液制备

将 MRSA 菌株划线接种至主平板,37℃,CO₂ 培养约 16~24 h,挑取菌落,配制成细菌混悬液,用麦氏比浊管测定 OD 值,用氯化钠注射液稀释至浓度为约 1.0×10⁹ CFU/mL 备用。

2.2 实验动物分组

取 60 只适应性观察合格的 SD 大鼠,随机分为 6 组,10 只/组,分别为阴性对照组、模型对照组、射干止咳胶囊低剂量(0.216 g/kg)组、射干止咳胶囊中剂量(0.432 g/kg)组、射干

表 1 各组白细胞计数及分类检测结果

组别	<i>n</i>	WBC	NEUT	NEUT%
阴性对照组	10	4.19 ± 1.32	0.58 ± 0.24	13.49 ± 3.13
模型对照组	10	5.22 ± 1.91	1.10 ± 0.63 *	20.75 ± 8.54 *
射干止咳胶囊低剂量组	10	6.08 ± 1.10 **	0.66 ± 0.30	10.58 ± 3.58 ##
射干止咳胶囊中剂量组	10	5.74 ± 1.74 *	0.788 ± 0.31	13.48 ± 2.68 #
射干止咳胶囊高剂量组	10	6.46 ± 1.28 **	0.84 ± 0.40	12.89 ± 4.34 #
苏黄止咳胶囊组	10	3.75 ± 0.66 #	0.42 ± 0.15 ##	11.17 ± 3.20 ##

注：* 与阴性对照组相比, $P < 0.05$; ** 与阴性对照组相比, $P < 0.01$; #与模型对照相比, $P < 0.05$; ##与模型对照相比, $P < 0.01$ 。

止咳胶囊高剂量(0.864 g/kg)组和苏黄止咳胶囊(1.44 g/kg)组。

2.3 模型建立及给药

除阴性对照组外,其余各组腹腔注射戊巴比妥钠(30 ~ 60 mg/kg,2 mL/kg)进行麻醉后,滴鼻感染 MRSA (1×10^9 CFU/mL,0.5 mL/只),连续 5 d,造模期间同时灌胃给药,1 次/d,连续 14 d,阴性对照组、模型对照组给予等体积的纯水。

2.4 生物样本的采集

末次给药前 1 天进行尿液和粪便采集,放入 -80 ℃ 保存。末次给药后 1 h,对所有存活动物麻醉后进行腹主动脉采血,血液进行离心后 -80 ℃ 保存。解剖并取右肺组织用 10% 甲醛固定,HE 染色做病理切片;取左肺组织置于 -80 ℃ 保存。

2.5 动物模型的验证

2.5.1 血液学检测 取 6 组大鼠腹主动脉血 0.5 mL 进行血常规检测,记录白细胞(WBC)、中性粒细胞(NEUT)、中性粒细胞百分比(NEUT%)(表 1)。通过血常规检测发现,与阴性对照组相比,模型组显著提高了中性粒细胞和中性粒细胞百分比($P < 0.05$),说明 MRSA 感染大鼠模型引起了炎症反应;与模型组相比,射干止咳胶囊低剂量组、苏黄止咳胶囊组均极显著降低了中性粒细胞百分比($P < 0.01$),射干止咳胶囊中剂量组、高剂量组也显著降低($P < 0.05$),说明射干止咳胶囊、苏黄止咳胶囊均有抗炎效果,抑制了中性粒细胞的生长。

2.5.2 肺组织病理切片 将 6 组大鼠经 HE 染色的右肺组织行病理学检查,镜下观察肺组织受损和炎症浸润情况。病理诊断病变程度判读如(表 2),根据病变评分如下:病变程度(-)为 0 分;轻微(±)为 1 分;轻度(+)为 2 分;中度(++)为 3 分;重度(+++)为 4 分。具体各组大鼠肺组织 HE 染色病理图见插页 XIII 图 1。通过病理学检查结果,各组动物在实验过程中未出现死亡情况,剖检未见明显异常。为了防止在造模过程大鼠死亡过多,本次最终实验经过反复预实验后 MASA 感染大鼠模型造模肺部感染较轻(插页 XIII 图 1)。

根据病理学检查结果,从血管周围炎细胞浸润程度、肺泡隔粉染蛋白液渗出程度两个方面进行组间比较:除阴性对照外,各组出现不同程度的血管周围炎细胞聚集、肺泡隔粉染蛋白液渗出,证明 MASA 感染肺炎模型成功。在抗血管周围炎细胞浸润作用(插页 XIV 图 2):与模型组相比,苏黄止咳胶囊组、射干止咳胶囊中、高剂量组差异均有显著统计学意义($P < 0.01$),射干止咳胶囊低剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$);在抗肺泡隔粉染蛋白液渗出作用(插页 XIV 图 3):与模型组相

比,射干止咳胶囊高剂量组与苏黄止咳胶囊组差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。综上,各给药组对动物滴鼻感染 MRSA 引起的肺脏病变起一定减轻作用。

表 2 肺组织病理诊断病变程度分级

病变程度	组织学改变
正常(-)	未观察到组织学改变或组织结构基本正常
轻微(±)	可观察到个别细胞或极少数细胞发生病理学改变,但不影响组织的正常形态结构。小灶性或散在个别细胞分布异常或损伤,在本级别中,这些损伤范围零星可见,不构成区域性。增生、发育不全、萎缩性病变影响的组织结构仅个别或数个细胞可见,不影响组织的体积改变
轻度(+)	可注意到的组织学改变到可观察到的病变,但不是组织内占主导的特征。灶性、多灶性或散在分布的损伤,在本级别中,这些损伤范围在 100 倍镜下可见 1/3 ~ 1 个视野。增生、发育不全、萎缩性病变影响的组织结构在体积增加或缩小 <20% 时可归入此级
中度(++)	损伤在组织中占主导性地位。灶性、多灶性或散在分布的损伤,在本级别中,这些损伤范围在 100 倍镜下可见 1 ~ 3 个视野。增生、发育不全、萎缩性病变影响的组织结构在体积增加或缩小 21% ~ 40% 之间时可归入此级
重度(+++)	损伤在组织中占绝对优势。灶性、多灶性或散在分布的损伤,在本级别中,这些损伤范围在 100 倍镜下可见 3 个视野以上。增生、发育不全、萎缩性病变影响的组织结构在体积增加或缩小 41% ~ 100% 之间时可归入此级

3 实验方法

根据 6 组大鼠的病理报告和血常规结果,本次研究发现射干止咳胶囊中、低剂量组对 MRSA 感染大鼠肺炎的作用优于高剂量组,为了进一步探讨射干止咳胶囊对 MRSA 感染大鼠肺炎的机制研究,取阴性对照组、模型对照组、射干止咳胶囊低、中剂量组、苏黄止咳胶囊组各组 6 只大鼠粪便进行 16SrDNA 测序。表 3 为实验分组对应 16SrDNA 测序分组情况说明。

表 3 动物实验分组与 16SrDNA 测序分组对应情况说明

组别	对应 16SrDNA 测序分组
阴性对照组	Group1
模型对照组	Group2
射干止咳胶囊低剂量组	Group3
射干止咳胶囊中剂量组	Group4
苏黄止咳胶囊组	Group5

4 结果

4.1 菌群鉴定及物种分布

为研究各样本的物种组成,对所有样本的 EffectiveTags,

表 4 门分类下水平下最大相对丰度前 10 的菌群种类

菌群种类	阴性对照组	模型对照组	射干止咳胶囊低剂量组	射干止咳胶囊中剂量组	苏黄止咳胶囊组
Firmicutes (厚壁菌门)	0.718 5 ±0.088 5	0.721 0 ±0.074 9	0.659 6 ±0.074 1	0.634 4 ±0.093 0	0.608 6 ±0.063 4 [#]
Bacteroidota (拟杆菌门)	0.199 3 ±0.061 7	0.189 9 ±0.057 7	0.280 1 ±0.080 1	0.285 8 ±0.073 0 [#]	0.322 8 ±0.072 5 [#]
Proteobacteria (变形杆菌门)	0.029 5 ±0.056 8	0.019 7 ±0.012 5	0.005 0 ±0.005 1 [#]	0.012 4 ±0.005 7 [*]	0.011 4 ±0.007 5
unidentified_Bacteria	0.016 0 ±0.004 3	0.024 3 ±0.008 8	0.016 2 ±0.007 7	0.027 5 ±0.026 7	0.015 8 ±0.004 2
Verrucomicrobiota (疣微菌门)	0.008 8 ±0.014 8	0.003 2 ±0.004 1	0.010 4 ±0.017 9	0.003 4 ±0.006 7	0.008 2 ±0.009 1

注: #与模型对照组比, $P < 0.05$; *与射干止咳胶囊低剂量组比, $P < 0.05$; Δ与射干止咳胶囊低剂量组比, $P < 0.05$ 。

以 97% 的一致性进行 OTUs 聚类, 然后对 OTUs 的序列进行物种注释。根据聚类得到 OTUs 结果(插页 XIV 图 4): 阴性对照组共有 707 个 OTU, 模型对照组共有 805 个 OTU, 射干止咳胶囊低剂量组共有 724 个 OTU, 射干止咳胶囊中剂量组共有 808 个 OTU、苏黄止咳胶囊组共有 754 个 OTU。

根据物种注释结果, 选取 5 组样本中在门 (Phylum) 水平上最大丰度排名前 5 的物种, 他们是厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、unidentified_Bacteria、疣微菌门(表 4)。阴性对照组与模型对照组之间没有显著性差异; 与模型对照组相比, 射干止咳胶囊低剂量组中变形菌门存在显著性差异, 射干止咳胶囊中剂量组拟杆菌门存在显著性差异, 苏黄止咳胶囊组厚壁菌门、拟杆菌门存在显著差异。通过组间对比, 厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门可能为关键菌群物种。

4.2 α 多样性分析

4.2.1 Alpha Diversity 指数 对不同样本在 97% 一致性阈值下的 Alpha Diversity 分析指数 (shannon、simpson、chao1、ACE、goods_coverage) 进行统计(表 5)。每一组样本 Alpha 多样性指数采用 Tukey 检验进行统计学分析(插页 XV 图 5)。从样本物种数量分析, Alpha 多样性指数 observed_species、chao1、ACE 中比较, 模型对照组与阴性对照组相比, 菌群物种数量均有上升, 提示 MRSA 感染肺炎后菌群数目增多; 经过给药以后, 与模型对照组相比, 射干止咳胶囊低剂量组、苏黄止咳胶囊组菌群物种数量明显有下调的趋势, 向阴性对照组靠近, 提示射干止咳胶囊与苏黄止咳胶囊可能通过调节肠道菌群的数量发挥治疗 MRSA 感染肺炎的大鼠; 从物种多样性的丰富度和均匀度分析, Alpha 多样性指数 shannon、simpson 中比较, 模型对照组与阴性对照组相比, 菌群物种丰富度和均匀度均有上升, 提示 MRSA 感染肺炎后菌群丰度增多; 经过给予药物干预后, 与模型对照组相比, 射干止咳胶囊中剂量组、苏黄止咳胶囊组菌群物种相对丰度有上调的趋势, 而射干止咳胶囊低剂量组有下降

表 5 每组内 Alpha 多样性主要分析指数测定结果

组别	n	observed_ species (物种丰富 度指数)	shannon (香农 指数)	simpson (辛普森 指数)	chao1 (多样性 指数)	ACE 指数	goods_ coverage (微生物 覆盖率)
阴性对照组	10	707	5.566	0.919	750.662	756.475	0.998
模型对照组	10	805	6.025	0.944	857.553	865.377	0.998
射干止咳胶囊低剂量组	10	724	5.826	0.944	773.926	781.095	0.998
射干止咳胶囊中剂量组	10	808	6.139	0.950	864.997	870.342	0.998
苏黄止咳胶囊组	10	754	6.175	0.953	799.854	810.725	0.998

的趋势, 向阴性对照组靠近。

4.2.2 物种多样性曲线 稀释曲线可以直观地反映出测序数据量上的合理性。从插页 XVI 图 6 稀释曲线可以看出, 5 组样本在测序量达到 60 000 时, 曲线趋向平坦, 说明测序数据量渐近合理, 更多的数据量只会产生少量新的 OTUs, 证明本次测序数量合理。根据物种丰度由低到高分别为阴性对照组、射干止咳胶囊低剂量组、苏黄止咳胶囊组、射干止咳胶囊中剂量组、模型对照组。

4.3 β 多样性分析 (Beta Diversity)

4.3.1 PCoA 分析 我们基于 Weighted Unifrac 距离和 Unweighted Unifrac 距离来进行 PCoA 分析, 结果采用二维 PCoA 形式, 从 PC1、PC2 两个方向进行数据分析(插页 XVII 图 7、插页 XVII 图 8)。射干止咳胶囊低剂量组、苏黄止咳胶囊组更靠向阴性对照组, 菌群结构相似度更高。

4.3.2 NMDS 分析 NMDS 分析可以根据样本中包含的物种信息, 以点的形式反映在多维空间上, 而对不同样本间的差异程度, 则是通过点与点间的距离体现, 能够反映样本的组间和组内差异等。插页 XVII 图 9 所示, 通过 NMDS 分析阴性对照组与模型对照组样本明显分开; 射干止咳胶囊低剂量组与阴性对照组距离更靠近。

4.4 LEfSe 分析

LEfSe 用于组与组之间寻找具有统计学差异的 Biomarker, 强调统计意义和生物相关性, 设定 LAD Score 值大于 3, 即组间差异具有统计学意义。

通过模型对照组与阴性对照组对比(插页 XVII 图 10), 在阴性对照组中起主要作用的菌群是乳酸菌门乳酸菌目; 模型对照组主要是变形菌纲、鞘氨醇菌属。因模型组与射干止咳胶囊低剂量组在 LAD Score 大于 3 时, 差异没有统计学意义, 故无此图。通过射干止咳胶囊中剂量组与模型组对比(插页 XVII 图 11), 射干止咳胶囊中剂量组起主要作用的菌群是拟杆菌纲、拟杆菌目、RF39 目、Muribaculaceae 科、产碱菌科; 模型对照组起主要作用的菌群是肠杆菌科、肠杆菌目、Anaerovoracaceae 科、葡萄球菌科、葡萄球菌目、气球菌科、Atopobiaceae 科。

4.5 菌群基因功能预测

PICRUSt 被设计用来估计由 16SrRNA 测序确定的细菌组成宏基因组的基因家族, 可以根据 16S 测序数据进行基于 KEGG 数据库的功能预测。将阴性对照组与模型对照组、模型对照组与射干止咳胶囊低剂量组、模型对照组与射干止咳胶囊中剂量组做 T-test 分析。插页 XVII 图 12 可以看出与阴性对照

组对比,模型对照组有显著差异的两条代谢通路是 Replication, recombination and repair proteins (复制、重组和修复蛋白) 和 Glycosyltransferases (糖基转移酶)。可能因为模型对照组 MRSA 肺炎导致肠道菌群发生了改变从而影响了两条代谢通路。与模型对照组对比,射干止咳胶囊低剂量组有显著差异的代谢通路 38 条(插页Ⅷ图 13),射干止咳胶囊中剂量组有显著差异的代谢通路 4 条(插页Ⅶ图 14),其中烟酸和烟酰胺代谢是与射干止咳胶囊低剂量组共同作用的代谢通路。

5 讨论

肺炎(pneumonia)是临床上最常见的感染性疾病之一,也是最常见的呼吸系统疾病,根据 WHO 研究资料每年因肺炎死去的人数占全球总死亡人数的约 5%,老年人作为肺炎的易感人群,在因肺炎导致死亡的人群中 60 岁以上的老年人占到 50%^[3]。抗生素的出现曾经给细菌性肺炎的治疗带来了新的转机,但由于近年来大量抗生素临床上的广泛使用,细菌耐药带来的严峻挑战,即使高级别的抗生素应用于肺炎的治疗,因肺炎导致的病死率反而有所提高^[4]。有数据显示可能到 2030 年,肺炎将排到占有所有死亡原因的第 5 位,占疾病治疗经济费用的第 8 位。临床上常见的引起肺炎的耐药菌有鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌,导致细菌耐药的原因:首先是大量抗菌药物应用医源性对细菌的筛选,物种进化优胜劣汰,导致耐药细菌的生存和繁衍;其次抗生素的大肆使用带来的不良反应就是肠道菌群的紊乱,降低正常菌群对肠道黏膜的保护作用,导致肠道菌群移位,从而导致肠道细菌感染侵入机体,发生感染^[4]。面对如此严峻的细菌耐药形势,临床上积极地预防,控制抗生素的应用指征和使用,以减少耐药的发生。新型抗生素的研发和投入使用可能需要更长的时间,人们开始把更多的视角投向中医药。

肠道菌群被现在人们所共识称为“人体内第二大器官”,在正常生理状态下保持着结构和数量的动态平衡,对新陈代谢起着重要的作用,同时大量的菌群也被证实参与体内多个器官疾病的发生^[5]。目前已被认知的肠道内的优势细菌有:厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放射线门,肠道菌群主要的生理作用:①肠道黏膜作为天然的生物屏障保护作用,肠道菌群通过数量和种类调节肠道内黏膜系统;②对营养的吸收和代谢起到协助控制作用;③能够影响机体免疫功能,维持内环境的稳定。有证据表明肠道内细菌可能通过改变短链脂肪酸的代谢,抑制肠道和呼吸道的炎症反应^[6];同时肠道内细菌可能通过某种途径直接播散到气道,直接作用于呼吸系统^[7]。相关证据显示,在慢性病中肠道的微生态通过有害细菌增多、正常共生细菌减少而受到影响^[8]。

“肺与大肠相表里”的中医基础理论最早始于《黄帝内经》,经过历代中医不断探索及应用,被广泛地应用于临床治疗中。不仅限于肺经与大肠经的经脉络属关系,从肺与大肠的生理功能与病理改变相互影响,从而有了后代医家“肺病治肺”“肠病治肺”“肺肠同治”的治法治则。随着现代生物学信息技术的发展,16s 宏基因组和高通量测序对肠道微生态的研

究进一步深入,越来越多的学者支持“肺-肠”轴理论,肺与肠之间的关系也越来越得到大家的关注,而这些现代医学的观点跟中医“肺与大肠相表里”的理论相契合。

基于以上观点,本次实验采用 16S rDNA 测序技术,从 MRSA 感染肺炎大鼠的肠道菌群变化角度,探讨分析射干止咳胶囊抑菌的潜在作用机理。本次课题研究为中药新药研发下延展子课题,基于前期射干止咳胶囊的研究基础,均以苏黄止咳胶囊为中药阳性对照药,因此本次实验依旧选择苏黄止咳胶囊为中药阳性对照组。基于前期射干止咳胶囊药效学基础,设置射干止咳胶囊给药低、中、高剂量组。通过对阴性对照组、模型对照组、射干止咳胶囊中、低剂量组、苏黄止咳胶囊对照组 5 个分组进行肠道菌群物种注释及丰度分析,分别进行 α 多样性和 β 多样性分析,揭示出 5 组样本中物种组成和样本间群落结构的差异,通过 T-test 检验和 LEfSe 分析寻找射干止咳胶囊作用于 MRSA 肺炎大鼠的优势菌群,通过 PICRUSt 菌群基因预测功能推测出射干止咳胶囊治疗 MRSA 感染肺炎可能的菌群和代谢通路。

(1)肠道菌群多样性的改变:现代研究表明,肠道菌群作为定植于肠道内数量和种类繁多的微生物,参与呼吸系统众多疾病的发生与发展。肠道菌群可影响肺的微生物定植^[9],而呼吸系统微生物的失衡也可影响肠道微生物的改变,当肺部微生物菌群发生改变可以通过血引起肠道微生物菌群的改变^[10]。有实验发现,急性肺损伤的小鼠回盲部的复合明显增加^[11]。本实验中把阴性对照组与模型组在菌群多样性和丰富度方面进行了比较,虽然模型组有上调的趋势,但统计学上未发现显著性差异。同样在射干止咳胶囊低剂量组、苏黄止咳胶囊与模型对照组的比较中,本次实验发现在射干止咳胶囊低剂量组、苏黄止咳胶囊菌群的多样性和相对丰度有下调的趋势,并向阴性对照组接近,但是差异未有显著统计学意义。我们考虑可能有以下原因:首先本次实验肠道菌群检测样本量少(阴性对照组、模型对照组、射干组分低剂量组、射干组分中剂量组、苏黄止咳胶囊组,每组 6 个样本),可能存在偏倚;其次大鼠体内肠内容物菌群受到多种无法干预的因素的影响。最后本次研究做的非靶向菌群测序,可能缺乏针对性。

接下来本研究又对阴性对照组与模型对照组分别在门水平和属水平的相对丰度比较,结果显示大鼠在门水平以厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门为优势菌,这与之之前的研究结果相一致,但是两组之间差异未有显著统计学意义。门水平相对于模型组比较,发现射干止咳胶囊低剂量组下调了变形菌门,射干止咳胶囊中剂量组上调了拟杆菌门。在目前的研究中厚壁菌门、拟杆菌门被认为是两大优势有益菌,射干止咳胶囊可能因为上调了拟杆菌门、下调了变形菌门而作用于 MRSA 肺炎的大鼠。在属水平,相对丰度排在前三位的菌属是 Ligilactobacillus、Lactobacillus、Turicibacter。阴性对照组与模型组相对丰度比较,Turicibacter 相对丰度增高,Ligilactobacillus、Lactobacillus 均有下降趋势,但统计学上未发现明显差异。Turicibacter 据报道,在高脂饮食下,肠道微生物能通过 TLR 信号通路加重炎症

反应和代谢,小鼠体内 *Turicibacter* 的相对丰度增加,从而参与炎症反应^[12-13]。乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 是肠道内主要的有益菌之一,有数据表明双歧杆菌属、乳酸杆菌属所产生的细菌素对金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用^[14];同时可能通过调节细胞免疫,促进 IL-6、TNF- α 等细胞因子的产生,参与炎症反应,在调节机体免疫中发挥作用^[15]。

(2) 预测可能的代谢通路:通过射干止咳胶囊低剂量、射干止咳胶囊中剂量分别与模型对照组对比,我们通过两组代谢通路的交集,发现射干止咳胶囊可能通过 Nicotinate and nicotinamide metabolism (烟酸和烟酰胺代谢) 代谢通路作用于 MRSA 大鼠肺炎。

烟酸又称维生素 B₃, 可通过体内转胺作用转化为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 的主要前体物烟酰胺^[16-17], 在 NAD⁺ 合成过程中, 磷酸核糖转移酶 (phosphoribosyltransferase, NAMPT) 是该途径的限速酶。NAMPT 催化磷酸核糖基转移酶基因通过 5' 磷酸核糖基转移酶 - 1' 焦磷酸转移到烟酰胺上, 生成烟酰胺单核苷酸 (NMN) 和焦磷酸。NMN 在单核苷酸转移酶的烟酰胺腺苷作用下转化为 NAD⁺^[18-19], NAD⁺ 作为 SIRT1 激动剂可能通过调节 NAD⁺/NADH 的比值来激活 SIRT1, SIRT1 是 NF- κ B 的正调节因子, 被认为是参与促炎细胞因子产生的重要转录因子^[20-23]。有研究表明柴胡皂苷通过调节烟酸和烟酰胺代谢及花生四烯酸代谢发挥抗炎作用, 从而缓解对小鼠足皮下注射福尔马林导致急性炎症反应。柴胡皂苷可以显著提高烟酰胺的含量, 促进 NAD⁺ 生物合成。NAD⁺ 生成增多导致 SIRT1 活化, 从而抑制 NF- κ B 信号通路抑制炎症因子释放从而达到抗炎作用^[24]。

综上, 本次实验发现射干止咳胶囊可能上调了拟杆菌门、下调了变形菌门、改善了 MRSA 肺炎的大鼠肠道内稳态, 从烟酸和烟酰胺代谢通路发挥对 MRSA 肺炎大鼠的作用。但本次研究受经费和时间的制约, 样本量较少, 导致各组之间差异没有显著统计学意义, 后续应该加大样本量, 更加全面深入说明射干止咳胶囊与 MRSA 感染肺炎的作用和调节肠道菌群的相关性。

参考文献

[1] 包玉龙, 甘雨, 范英兰, 等. 射干止咳胶囊抗炎作用初探[J]. 实验动物科学, 2021, 38(6): 16-19.

[2] 尹江涛. 射干组分制剂抗耐药菌作用及机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2020.

[3] WHO. Global Health Estimates[EB/OL]. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/2016.

[4] 余伟鹏, 洗美兰, 黄奕荣. 医院获得性肺炎多重耐药菌感染的易感因素及耐药性分析[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(5): 125-129.

[5] 范克新, 孙腾飞, 乔华. 肠道菌群和呼吸道感染关系的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2020, 40(24): 1894-1897.

[6] DANG A T, MARSLAND B J. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis[J]. Mucosal Immunol, 2019, 12(4): 843-850.

[7] 陈益民, 沙建平, 刘社兰, 等. 肠道和呼吸道菌群与肺部疾病的研究新进展[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(10): 1234-1240, 封3.

[8] MARSLAND B J, TROMPETTE A, GOLLWITZER E S. The gut-lung axis in respiratory disease[J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12(Suppl 2): S150-S156.

[9] CHUNG K F. Airway microbial dysbiosis in asthmatic patients; Atarget for prevention and treatment? [J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 139(4): 1071-1081.

[10] HE Y, WEN Q, YAO F F, et al. Gut-lung axis: the microbial contributions and clinical implications[J]. Crit Rev Microbiol, 2017, 43(1): 81-95.

[11] SZE M A, TSURUTA M, YANG S W, et al. Changes in the bacterial microbiota in gut, blood, and lungs following acute LPS instillation into mice lungs[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e111228.

[12] LI J W, FANG B, PANG G F, et al. Age- and diet-specific effects of chronic exposure to chlorpyrifos on hormones, inflammation and gut microbiota in rats[J]. Pestic Biochem Physiol, 2019, 159: 68-79.

[13] CAESAR R, TREMAROLI V, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling[J]. Cell Metab, 2015, 22(4): 658-668.

[14] 王澜, 周燕, 吴碧婷, 等. 益生菌细菌素的抑菌活性研究[J]. 医学诊断, 2015, 5(1): 6-11.

[15] 张英春, 张兰威, 马微. 乳酸菌对免疫系统功能的调节作用[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(5): 80-82.

[16] PENBERTHY W T. Nicotinamide adenine dinucleotide biology and disease[J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(1): 1-2.

[17] ZHAI R G, RIZZI M, GARAVAGLIA S. Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenyltransferase, new insights into an ancient enzyme [J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(17): 2805-2818.

[18] SAMPATH D, ZABKA T S, MISNER D L, et al. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer[J]. Pharmacol Ther, 2015, 151: 16-31.

[19] LUK T, MALAM Z, MARSHALL J C. Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity[J]. J Leukoc Biol, 2008, 83(4): 804-816.

[20] MATSUSHITA T, SASAKI H, TAKAYAMA K, et al. The overexpression of SIRT1 inhibited osteoarthritic gene expression changes induced by interleukin-1 β in human chondrocytes[J]. J Orthop Res, 2013, 31(4): 531-537.

[21] IMAI S I. The NAD World: a new systemic regulatory network for metabolism and aging—Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance[J]. Cell Biochem Biophys, 2009, 53(2): 65-74.

[22] REVOLLO J R, GRIMM A A, IMAI S I. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2007, 23(2): 164-170.

[23] DAI J, ZHANG X M, LIN L, et al. Energy sensitive AMPK-SIRT1 pathway and inflammation regulation[J]. Life Sciences, 2014, 26: 362-365.

[24] MA Y, BAO Y R, WANG S, et al. Anti-inflammation effects and potential mechanism of saikosaponins by regulating nicotinate and nicotinamide metabolism and arachidonic acid metabolism[J]. Inflammation, 2016, 39(4): 1453-1461.