

·基础研究·

基于16S rDNA基因测序探讨咳嗽变异性哮喘与肠道菌群的关系

沈 灵¹, 曾琳琳¹, 骆巧媚¹, 范依霖¹, 贺 倩¹, 段小云²

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031; 2. 四川省骨科医院, 四川 成都 610041)

摘 要:【目的】基于“肺与大肠相表里”中医理论和16S核糖体DNA(16S rDNA)基因测序技术,探讨卵清蛋白(OVA)诱导的咳嗽变异性哮喘(CVA)对小鼠肠道菌群的影响。【方法】20只BALB/c雌性小鼠随机分为模型组和对照组,以OVA致敏并激发制备CVA小鼠模型。记录小鼠体质量、咳嗽次数及咳嗽潜伏期,肺组织进行病理学检查,16S rDNA高通量测序分析粪便菌群。【结果】与对照组相比,模型组小鼠一般状态较差,躁动不安,抓耳挠腮,体质量下降($P < 0.01$),咳嗽次数增多($P < 0.01$),咳嗽潜伏期缩短($P < 0.01$);病理结果显示模型组小鼠肺部炎性浸润明显,气道平滑肌增厚,上皮细胞坏死等;16S rDNA测序显示模型组小鼠肠道菌群物种丰富度及多样性增加,菌群结构发生显著变化。在门水平上,模型组小鼠厚壁菌门相对丰度下降,拟杆菌门和广古菌门相对丰度增加;在属水平上,模型组乳酸杆菌属下降,甲烷短杆菌属和普雷沃氏菌科UCG-003属相对丰度增加。【结论】OVA诱导的CVA小鼠存在肠道菌群紊乱现象,为治疗CVA提供新的思路,进一步表征“肺与大肠相表里”的中医理论。

关键词:咳嗽变异性哮喘;肠道菌群;高通量测序;肺与大肠相表里

中图分类号:R96 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2022)04-0582-09

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0408

Relationship between Cough Variant Asthma and Intestinal Flora Based on 16S rDNA Gene Sequencing

SHEN Ling¹, ZENG Lin-lin¹, LUO Qiao-mei¹, FAN Yi-lin¹, HE Qian¹, DUAN Xiao-yun²

(1. Life Science & Engineering College of South-west Jiao-tong University, Chengdu 610031, China; 2. Sichuan Provincial Orthopedic Hospital, Chengdu 610041, China)

Correspondence to: DUAN Xiao-yun; E-mail:408175482@qq.com

Abstract:【Objective】To explore the effect of ovalbumin(OVA)-induced cough variant asthma (CVA) on the intestinal flora of mice, based on the traditional Chinese medicine theory of "exterior-interior relationship between the lung and the large intestine" and 16S ribosomal DNA gene sequencing technology.【Methods】Twenty BALB/c female mice were randomly divided into model group and control group, and were sensitized and stimulated with OVA to establish a CVA mouse model. After modeling, the body weight and the cough response of mice were recorded by ammonia water-induced cough method. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes in the lungs of mice. The feces of mice were collected for 16S rDNA high-throughput sequencing analysis.【Results】Compared with the control group, the mice in the model group were in a poorer general state, being restless, scratching their ears, and losing weight ($P < 0.01$). The model group mice had increased cough times ($P < 0.01$) and shortened cough latency ($P < 0.01$) in comparison to the control group. Pathological results showed that the model group mice had obvious inflammatory infiltration, thickened airway smooth muscle, and epithelial cell necrosis. 16S ribosomal DNA sequencing showed that the species richness and diversity

收稿日期:2022-04-14

作者简介:沈灵,硕士生,研究方向:中药制剂与炮制研究,E-mail:1663131080@qq.com;段小云,通信作者,副主任药师,研究方向:临床药学及医院药学管理,E-mail:408175482@qq.com

of the intestinal flora of mice in the model group increased, and the structure of the intestinal flora changed significantly. At the phylum level, the relative abundance of *Firmicutes* in the model group was decreased, and the relative abundance of *Bacteroidetes* and *Euryarchaeota* was increased. At the genus level, the relative abundance of *Lactobacillus* was decreased in the model group, and the relative abundance of *Methanobrevibacter* and *Prevotellaceae UCG-003* was increased.【Conclusion】OVA-induced CVA mice had intestinal flora disorder, which provides new idea for the treatment of CVA, and further enriches the traditional Chinese medicine theory of “exterior-interior relationship between the lung and the large intestine”.

Key words: cough variant asthma; intestinal flora; high-throughput sequencing; exterior-interior relationship between the lung and the large intestine

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2022, 43(4): 582-590]

咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma, CVA)是一种以气道炎症、气道高反应性、气道重塑为主要特征的呼吸系统疾病^[1]。其临床主要症状为慢性咳嗽,而无明显气促,喘息等症状,发病前期易被忽略,最终部分患者发展为典型哮喘,严重影响生活质量^[2]。根据CVA的发病特点,将其归于中医“风咳”,“顽咳”等范畴,病位主肺^[3]。中医理论记载有“肺与大肠相表里”,认为肺和大肠在气机、经络、微生态三个层面相互作用,相辅相成,渐发展为现代医学的“肺-肠轴”。研究显示,肠道菌群紊乱与哮喘、气道炎症、慢性阻塞性肺炎、肺功能损伤等肺部疾病密切相关^[4-5]。故本研究基于“肺与大肠相表里”中医理论,探讨肠道菌群与CVA的相关性,以期从肠道微生物角度深入了解CVA发病机制,为CVA临床治疗提供实验依据,进一步表征中医内涵。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

SPF级BALB/c小鼠20只,体质量18~22 g,6~8周龄,雌性。由成都达硕实验动物有限公司供应,动物许可证号:SCXK(川)2020-030。饲养于温度(20~25)℃,相对湿度30%~70%,光照时间12 h的西南交通大学实验动物中心,饮食饮水自由。所有程序均按照卫生部颁布的《医学实验动物管理实施细则》(1988年)进行。所有动物实验均经西南交通大学动物实验伦理委员会批准。

1.2 实验仪器与试剂

十二水硫酸铝钾(明矾,批号:2018010101,成都市科隆化学品有限公司),卵清蛋白(OVA,货号:

A5503, Sigma公司), DNA Microprep Kit(批号:D4301, ZYMO RESEARCH公司), HiSeq Rapid SBS Kit v2(批号:FC-402-4023, Illumina公司),高通量测序仪(型号:HiSeq 2500型, Illumina公司), PCR扩增仪(型号:9700型, Applied Biosystems公司),超声雾化器(型号:402AI, 江苏鱼跃医疗设备股份有限公司)。

1.3 CVA小鼠模型的复制

20只BALB/c雌性小鼠按随机原则分为对照组和模型组,每组10只,适应性喂养1周后,开始造模。对照组0、7、14 d腹腔注射0.2 mL明矾溶液(1 mg明矾溶于PBS),模型组给予等量OVA混悬液(50 μg OVA+1 mg明矾溶于PBS);21 d起将小鼠放入密闭透明雾化箱,对照组每天用生理盐水,模型组用1% OVA,雾化30 min,持续3周。在此期间观察小鼠一般体征并定时记录体质量。

1.4 咳嗽反应测试

造模最后1天,将对照组和模型组小鼠依次放入透明密封箱内,雾化吸入氨水1 min,关闭雾化器后,让小鼠于密封箱内停留1 min后开始记录小鼠在4 min内的咳嗽次数及咳嗽潜伏期。

1.5 小鼠粪便收集

末次造模24 h后,收集小鼠粪便3~4颗于灭菌冻存管内,后转置于液氮中保存,全部收集完成后迅速转移至-80℃存储。

1.6 16S rDNA高通量测序分析

采用琼脂糖电泳法提取总DNA,用PicoGreen染料法进行样本DNA浓度检测,使用特异引物515F和806R对样本的16S核糖体DNA(16S ribosomal DNA, 16S rDNA)V4区域进行聚合酶链反应(PCR)扩增,2%琼脂糖凝胶进行目的片段电泳检

测,将合格的片段回收后纯化、定量,使用 NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina 建库,在 HiSeq 2500 平台上进行高通量测序。基于 Usearch 软件,在 97% 的一致性水平上对代表性序列进行分类操作单元(OUT)聚类,进行 Alpha 多样性、Beta 多样性、菌群组成及菌群差异分析。

1.7 小鼠肺组织病理染色

收集完粪便后,立即处死小鼠,取出其肺组织固定于 40 g/L 多聚甲醛中、脱水、包埋、切片、HE 染色、显微镜观察肺组织病理情况。

1.8 相关性分析与统计学处理

使用 Spearman 系数分析 CVA 小鼠的咳嗽次数、咳嗽潜伏期、体质量与肠道菌群的相关性。应用 SPSS 23.0 软件进行分析,均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)或中位数 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示实验结果。如果各组数据之间都呈正态分布且方差齐性用 t 检验,如果不满足方差齐性,采用校正 t 检验或秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CVA 小鼠一般体征及体质量变化

造模前,对照组与模型组小鼠精神状态佳,毛

发光亮顺滑,饮食及排便正常,活动度高,反应敏捷,体质量无明显差异;在 OVA 致敏阶段,两组小鼠表现正常,体质量无明显差异;在 OVA 雾化激发阶段,CVA 模型小鼠出现腹式呼吸,搔抓面部,咳嗽,烦躁不安,排便次数明显增加、毛发枯黄,掉毛,活动减少,喜扎堆等现象,整体状态较对照组差,体质量增长减慢,随着造模时间延长体质量明显下降 ($P < 0.01$;表1)。

2.2 CVA 小鼠咳嗽反应测试

与对照组相比,CVA 模型组小鼠 4 min 内咳嗽次数显著增加,咳嗽潜伏期显著缩短,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$;表2)。

2.3 CVA 小鼠肺组织病理检查

小鼠肺组织 HE 染色结果如图 1 所示。对照组:支气管结构完整,上皮细胞形态正常,无脱落、坏死,未见明显炎性细胞浸润;模型组:肺组织结构紊乱,以中性粒细胞和淋巴细胞为主的炎性浸润明显,气道平滑肌增厚,肺泡壁破坏,偶见上皮细胞坏死。

2.4 CVA 小鼠肠道菌群的变化

2.4.1 OUT 分析 末次造模 24 h 后,每组随机选取 6 只小鼠进行 16S rDNA 测序分析。12 个样本通过高通量测序共得 254 856 条 Raw tags,过滤低质量、

表1 造模期间各组小鼠体质量变化

Table 1 Changes of body weight during modeling in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Groups	Sensitization stage (g)			Atomization stage (g)			
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
Control	17.96 \pm 0.68	19.58 \pm 0.76	20.19 \pm 0.99	20.49 \pm 1.18	20.95 \pm 1.12	21.82 \pm 1.11	21.97 \pm 1.02
Model	18.26 \pm 0.36	19.60 \pm 0.43	20.12 \pm 0.40	19.79 \pm 0.86	18.07 \pm 1.41 ¹⁾	17.68 \pm 1.30 ¹⁾	16.18 \pm 0.52 ¹⁾
t/z	-1.213	-0.072	-0.341	1.510	4.907	7.445	15.819
P	0.241	0.944	0.733	0.148	<0.01	<0.01	<0.01

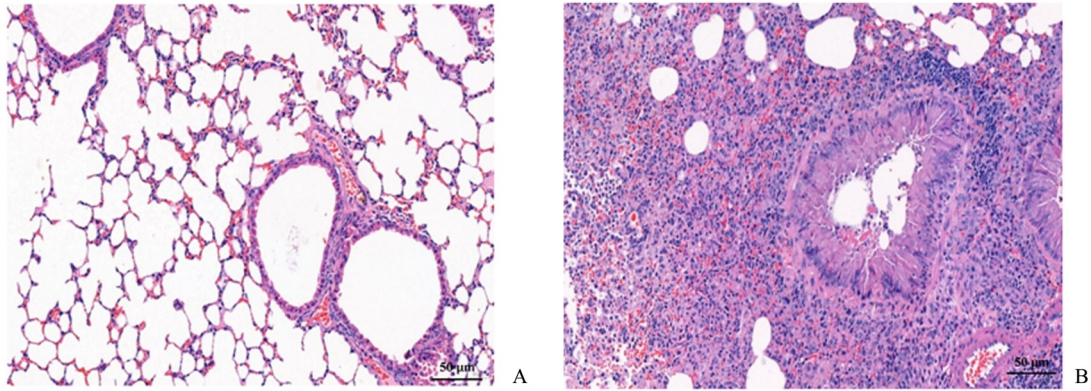
P values were compared by T test or Mann - Whitney U test (14 d) as appropriate. ¹⁾ compared with control, $P < 0.01$.

表2 各组小鼠咳嗽次数及咳嗽潜伏期

Table 2 Number of cough and cough latency of mice in each group [$M(P_{25} \sim P_{75}), n=10$]

Groups	Number of cough (4 min)	Cough latency/s
Control	6.00 (4.00~7.75)	75.50 (62.50~84.50)
Model	21.50 (15.75~27.00) ¹⁾	39.50 (34.75~43.75) ¹⁾
z	-3.749	-3.784
P	<0.01	<0.01

P values were compared by Mann - Whitney U test as appropriate. ¹⁾ compared with control, $P < 0.01$.



HE-stained slices of lung tissue sections revealing pathological changes of lung tissues, ×200. A showed that control group; B showed that model group.

图1 小鼠肺组织病理检查

Fig. 1 Pathological examination of lung tissue in mice

短长度、嵌合体后,得到 242 833 条有效序列。在 97% 的相似性水平下对有效序列进行 OTU (Operational Taxonomic Units) 聚类,结果显示,模型组和对照组共有 OTU 数目为 1 371 个,特有 OTU 是 1 909 个和 1 870 个,CVA 模型小鼠菌群 OUT 相较于对照组发生显著变化(图 2)。

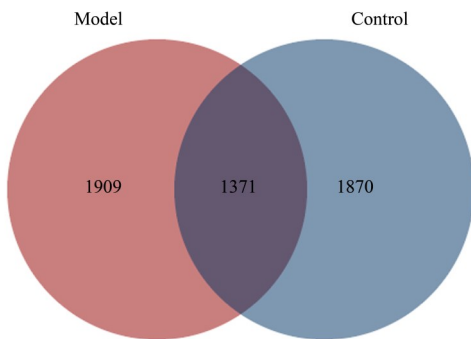


图2 基于 OUT 分布的 Veen 图

Fig. 2 Veen graph based on OUT distribution (n=6)

2.4.2 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性指数是反映样本微生物群落复杂程度的重要依据,包括群落的丰富度及多样性。群落丰富度可以用 Chao 1 指数表示,其值越高,表明 OTU 数目越多,群落物种总数越多;群落多样性可以用 Simpson 指数表示,其值越大,群落多样性越大。与对照组相比,模型组小鼠的 Chao1 指数增高,差异不具有统计学意义;Simpson 指数显著升高 ($P < 0.01$),表明 CVA 模型小鼠肠道菌群丰富度有增加趋势且物种多样性高于对照组(表 3)。

表3 Alpha 多样性分析结果

Table 3 Alpha diversity analysis results

($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Chao1	Simpson
Control	1 757.94±321.50	0.926 2±0.015 7
Model	1 920.89±289.92	0.979 7±0.009 5 ¹⁾
t	0.922	7.131
P	0.378	<0.01

P values were compared by T test as appropriate.¹⁾ compared with control, $P < 0.01$.

2.4.3 Beta 多样性分析 Beta 多样性分析能反映多个样本间是否有显著微生物群落差异,为了将样本间的差异整体反映在二维坐标上,选用最常用的 Weighted Unifrac 距离计算方式进行非度量多维尺度分析 (Non-metric Multi-Dimensional Scaling, NMDS)。如图 3 所示,结果的应力值 (Stress) 小于 0.2,表明 NMDS 分析结果可靠。图中不同的点代表不同样本,点之间距离越大,样本组成差异越大。模型组与对照组组内样本距离接近,菌群组成无显著差异,组间样本点完全分开,表明 CVA 模型小鼠相较于对照组小鼠肠道菌群组成发生明显变化。

2.4.4 物种组成分析 为了进一步研究 CVA 小鼠中肠道菌群组成的变化,对门和属水平微生物相对丰度分析。门水平上,各组小鼠肠道菌群分属 26 个菌门,对相对丰度前十的主要菌门分析发现,模型组和对照组小鼠中的优势菌门为 Firmicutes、Bacteroidetes、Euryarchaeota、Proteobacteria、Spirochaetes

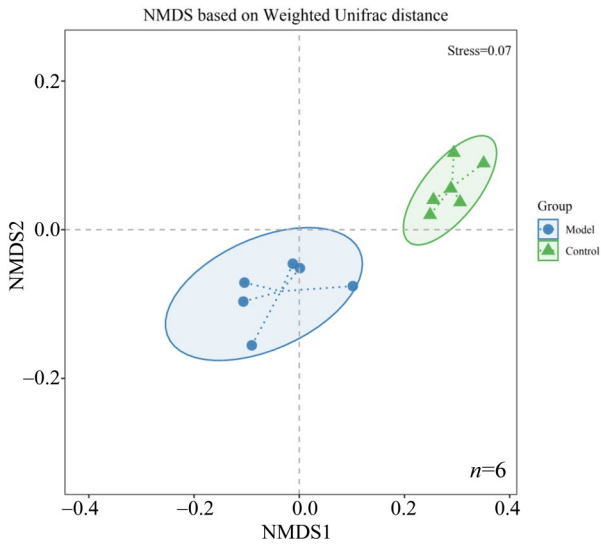


图3 NMDS分析结果

Fig. 3 NMDS analysis results

和 *Actinobacteria*, 总占比分别为 98.96% 和 99.07%。与对照组相比, 模型组 *Firmicutes* 相对丰度下降, *Bacteroidetes*、*Euryarchaeota*、*Proteobacteria* 相对丰度增加。其余优势菌和非优势菌在模型组和对照组间组成差异结果(图4)。

在属水平上共检测到 376 个菌属, 对相对丰度前十的菌属进行分析。其中 *Lactobacillus*、*Lachnospiraceae NK4A136 group*、*Ruminococcaceae UCG-014* 为模型组和对照组共有优势菌属。与对照组相比, CVA 模型小鼠 *Lactobacillus*、*Ruminococcaceae UCG-014*、*Treponema 2* 相对丰度下降; *Lachnospiraceae NK4A136 group*、*Methanobrevibacter* 的相对丰度增加。剩余五种菌属的相对丰度在模型组样本中增加(图5)。

2.4.5 差异物种分析 为确定模型组与对照组间重要差异菌群, 利用线性判别分析(Linear discriminant analysis Effect Size, LEfSe)进行比较。由图6可知, 对照组在 *Bacteria*、*Firmicutes*、*Bacilli*、*Lactobacillus*、*Lactobacillaceae*、*Lactobacillales* 丰度较高, 模型组在 *Archaea*、*Bacteroidetes*、*Euryarchaeota*、*Clostridia*、*Bacteroidia*、*Methanobacteria*、*Bacteroidales*、*Clostridiales*、*Methanobacteriales*、*Ruminococcaceae*、*Methanobacteriaceae*、*Prevotellaceae*、*Rikenellaceae*、*Methanobrevibacter*、*Prevotellaceae UCG-003* 丰度较高。

2.5 相关性分析

为进一步研究 CVA 与肠道菌群的关系, 利用 Spearman 系数对 CVA 特征(咳嗽次数、咳嗽潜伏

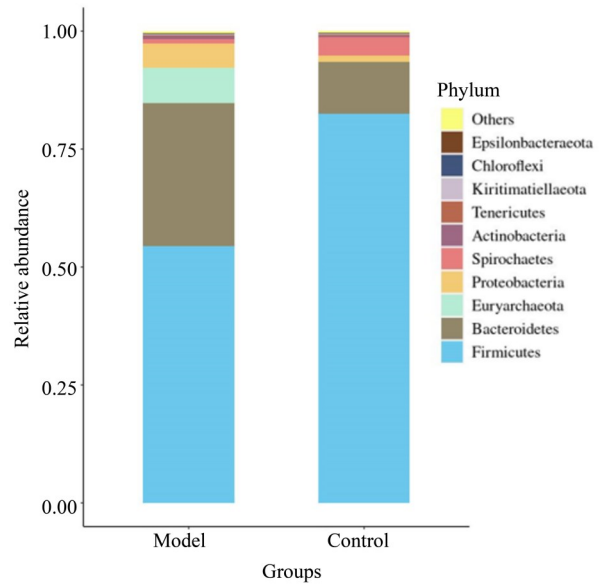


图4 门水平物种丰度累积柱状图

Fig. 4 Barplot of relative abundance at the phylum level

The relative abundance of microorganisms was expressed in ordinate; Different colors represent different flora; The relative abundance of all gates except top 10 and those without annotation information was shown by others. $n=6$.

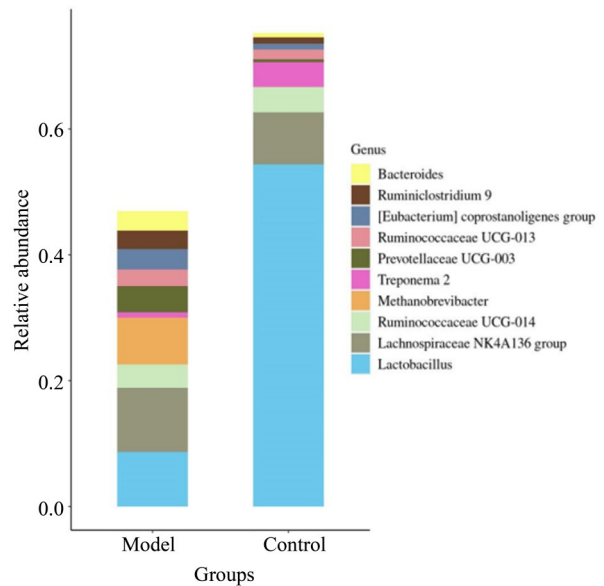


图5 属水平物种丰度累积柱状图

Fig. 5 Barplot of relative abundance at the genus level

The relative abundance of microorganisms was expressed in ordinate; Different colors represent different flora. $n=6$.

期、体质量)与肠道菌群进行相关性分析。如表4所示, *Methanobrevibacter*、*Ruminiclostridium 9*、*Bacte-*

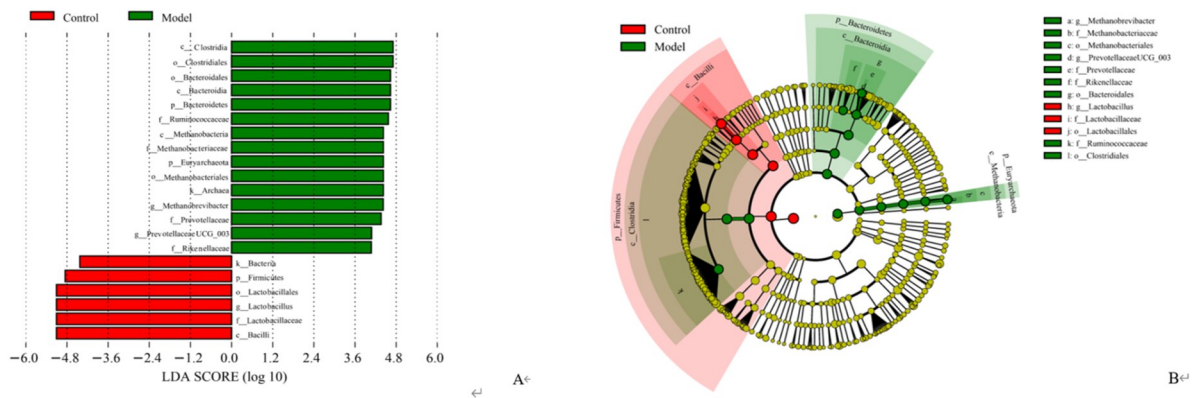


Fig. 6A shows the LDA scores for different taxa abundances (ILDAI > 4.0 means significant differences); Fig. 6B shows the LEfSe analysis of the cladogram diagram. n=6.

图 6 差异物种分析

Fig. 6 Difference of species analysis

roides、 *Escherichia-Shigella*、 *Rikenellaceae*RC9gut group、 *Catenibacterium*、 *Prevotellaceae*UCG-003 与 CVA 小鼠咳嗽次数呈负相关,与咳嗽潜伏期及体质量(42 d)呈正相关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。 *Ruminococcaceae*NK4A214 group、 *Alloprevotella*、 *Ruminococcaceae* UCG-013、 *Ruminococcus 1*、 *coprostanoligenes* group 与咳嗽潜伏期呈正相关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)； *Lactobacillus* 和 *Treponema 2* 与咳嗽潜伏期呈负相关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。 *Prevotellaceae* NK3B31 group 与小鼠体质量呈正相关($P < 0.01$)； *Lactobacillus* 与体质量呈负相关($P < 0.01$)。 *Lachnospiraceae* NK4A136 group 与咳嗽次数呈负相关($P < 0.05$)； *Lactobacillus* 与咳嗽次数呈正相关($P < 0.01$)。上述结果表明小鼠肠道菌群的组成与 CVA 特征显著相关。

3 讨论

3.1 CVA 小鼠模型的验证

CVA 是一种以顽固性慢性咳嗽为临床唯一或主要症状的慢性炎症性疾病,参考文献[6],选择常用的 OVA 致敏并雾化激发复制小鼠 CVA 模型。该研究可见模型组小鼠在雾化激发阶段体质量减轻,排便增加,腹式呼吸,烦躁、咳嗽等典型症状;咳嗽反应提示模型组小鼠咳嗽次数显著增加,咳嗽潜伏期缩短;肺组织 HE 染色显示 CVA 模型小鼠肺部炎症浸润明显,支气管结构紊乱,气道壁增厚等病理表现;上述症状与文献记载 CVA 小鼠症状相符[7-8],

提示 OVA 诱导的 CVA 小鼠模型复制成功。

3.2 结果分析及同类研究比较

临床上,呼吸道疾病往往伴随着胃肠道病变,如流感病人常常伴随有恶心、腹泻、腹痛等胃肠道相关疾病症状,此种现象在幼年患者身上尤为突出[9]。

“肺与大肠相表里”始载于《黄帝内经》,认为肺和大肠通过经络、气机构成表里关系,在生理和病理上相互调节。随着对微生物的深入研究,发现定植于两个器官中的呼吸道菌群和肠道菌群双向相关、互相影响,成为连接肺和大肠的枢纽[10]。既往研究证实支气管哮喘、慢性阻塞性肺炎等肺部疾病往往伴随肠道菌群紊乱,且肺与大肠胚胎早期具有同源性,即前肠经过发展变化而形成了肺和器官,并且从功能成像角度进行了证实,研究结果为从组织胚胎学方面解释肺肠相关提供了科学论据[11],也为“肺与大肠相表里”的菌群变化规律性提供了依据。吴佳佳实验研究结果表明,“从肠治肺”防治过敏性哮喘机制可能与调节肠道微生态平衡、促使肠道 Treg 细胞、抑制 Th17 细胞的分化,进而缓解肺部炎症有关[12]。

本实验发现,模型组小鼠肠道菌群 OTU 数目、Chao1 指数和 Simpson 指数高于对照组,该实验结果与王永安等[13]研究结果一致,其研究表明哮喘小鼠肠道大肠杆菌及肠球菌等致病菌增加,乳酸菌减少;崔芳等[14]实验结果同样发现哮喘模型小鼠物种丰富度高于对照组;Kho 等[15]研究表明,患病人群肠道益生菌数量和种类显著减少,而致病菌增多;

表4 CVA特征与小鼠肠道菌群 Spearman 相关性分析

Table 4 Spearman's rank correlation analysis between CVA characteristics and intestinal microflora of mice (n=6)

Correlation	Number of cough		Cough latency		Body weight 42 d	
	r_s	P	r_s	P	r_s	P
[<i>Eubacterium</i>]coprostanoligenesgroup	-0.242	0.449	0.642	0.024	0.252	0.430
<i>Alloprevotella</i>	-0.568	0.054	0.782	0.003	0.529	0.077
<i>Bacteroides</i>	-0.816	0.001	0.740	0.006	0.902	0.000
<i>Catenibacterium</i>	-0.644	0.024	0.740	0.006	0.741	0.006
<i>Desulfovibrio</i>	0.067	0.837	-0.084	0.795	-0.350	0.265
<i>Escherichia-Shigella</i>	-0.760	0.004	0.775	0.003	0.881	0.000
<i>LachnospiraceaeNK4A136group</i>	-0.592	0.043	0.060	0.854	0.399	0.199
<i>LachnospiraceaeUCG-008</i>	-0.467	0.126	0.401	0.197	0.336	0.285
<i>Lactobacillus</i>	0.711	0.010	-0.856	0.000	-0.839	0.001
<i>Methanobrevibacter</i>	-0.714	0.009	0.915	0.000	0.639	0.025
<i>PrevotellaceaeNK3B31group</i>	-0.564	0.056	0.298	0.346	0.762	0.004
<i>PrevotellaceaeUCG-003</i>	-0.686	0.014	0.765	0.004	0.781	0.003
<i>RikenellaceaeRC9gutgroup</i>	-0.767	0.004	0.632	0.028	0.783	0.003
<i>Ruminiclostridium9</i>	-0.835	0.001	0.849	0.000	0.718	0.009
<i>RuminococcaceaeNK4A214group</i>	-0.392	0.207	0.811	0.001	0.510	0.090
<i>RuminococcaceaeUCG-005</i>	-0.049	0.879	0.527	0.078	0.189	0.556
<i>RuminococcaceaeUCG-013</i>	-0.568	0.054	0.791	0.002	0.452	0.140
<i>RuminococcaceaeUCG-014</i>	0.515	0.087	-0.007	0.983	-0.182	0.572
<i>Ruminococcus1</i>	-0.242	0.448	0.738	0.006	0.371	0.235
<i>Treponema2</i>	0.518	0.084	-0.698	0.012	-0.531	0.075

NMDS 分析结果也提示相较于对照组,模型组小鼠肠道菌群组成发生了一定变化。因此,我们初步推测模型组小鼠物种丰富度和多样性高可能是由于其处于应激状态,肠道环境变化,肠道屏障能力下降,无法给益生菌提供适合的生长环境,从而使有害菌有机会大量繁殖^[16-17]。

结合肠道菌群在门和属水平的物种组成及差异物种分析发现,在门水平上,模型组的厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度显著下降,拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和广古菌门(*Euryarchaeota*)数量明显增加。研究发现呼吸道病毒感染小鼠肠道拟杆菌门(*Bacteroidetes*)数量增加^[18];厚壁菌门(*Firmicutes*)能维持机体免疫系统稳定,其丰度下降与炎症反应相关^[15];Zhang等^[19]研究认为广古菌门(*Euryarchaeota*)可能与肺癌的发生发展相关。在属水平上,结合 LEfSe 分析及 Spearman 系数分析发现,乳酸杆菌

属(*Lactobacillus*)、甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*)和普雷沃氏菌科 UCG-003 属(*Prevotellaceae UCG-003*)与 CVA 关系最为密切。模型组乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)丰度下降,甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*)和普雷沃氏菌科 UCG-003 属(*Prevotellaceae UCG-003*)相对丰度显著增加,其中乳酸杆菌属为肠道有益菌,增强肠道屏障功能,维持肠道内环境稳定^[20],普雷沃氏菌属在宿主内比例上升易引起胃肠道不良反应,造成肠道环境紊乱;非小细胞肺癌患者粪便样本中富含甲烷短杆菌属^[21]。上述结果表明,CVA 小鼠存在肠道菌群紊乱,肠道菌群物种丰富度和多样性增加,可能与致病菌(如甲烷短杆菌属和普雷沃氏菌科 UCG-003 属)的增多和益生菌(如乳酸杆菌属)的显著减少密切相关,提示小鼠 CVA 的发病可能有肠道菌群的参与。这与临床上 CVA 患者肠杆菌、酵母菌的数量多于健康

人,而双歧杆菌、乳杆菌数量少于健康人结果一致^[22]。

鉴于此,我们在CVA小鼠模型复制成功的基础上,进一步对CVA小鼠的肠道菌群进行高通量测序分析。实验结果发现模型组小鼠肠道菌群OTU数目、Alpha多样性、Beta多样性、不同水平上的群落组成、差异物种组成等与对照组小鼠均有较大差异,表明CVA小鼠伴有肠道菌群紊乱现象,因此,肠道菌群的调节可能在CVA的治疗中发挥不可替代的作用。

3.3 研究意义与不足

本文以“肺与大肠相表里”中医理论为切入点,

来探究肠道菌群与CVA的关系,研究表明肠道菌群与CVA的发病密切相关,为从肠道菌群治疗CVA提供实验基础。临床上治疗哮喘常选用氨茶碱、 β_1 受体阻断剂、糖皮质激素类药物,长期使用会对机体产生一定的副作用。补充乳酸杆菌、降低有害菌(肠杆菌、肠球菌)数量,调节肠道微生态平衡可为临床治疗CVA提供一条新的思路。但基于肠道菌群组成结构复杂及功能多样的特点,有关肠道菌群对CVA的具体作用机制仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Uryashev MO, Ponomareva IV, Bhar MF, et al. The cough variant asthma [J]. Therapeutic Archive, 2020, 92(3): 98-101.
- [2] Niimi A. Cough and asthma [J]. Curr Resp Med Rev, 2011, 7(1): 47-54.
- [3] 王春燕. 黄龙止咳口服液对咳嗽变异性哮喘模型小鼠肺组织TLR4/MyD88/NF- κ B通路的作用机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
Wang CY. Mechanism of Huanglong Zhike Oral Liquid on TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in the lung tissue of mice with cough variant asthma [D]. Nanjing: Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2020.
- [4] Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease [J]. Cell Res, 2020, 30(6): 492-506.
- [5] Sharma A, Laxman B, Naureckas ET, et al. Associations between fungal and bacterial microbiota of airways and asthma endotypes [J]. J Allergy Clin Immun, 2019, 144(5): 1214-1227.
- [6] 洪天一. 蝎黄解痉治哮颗粒影响NF- κ B和HIF-1 α 信号传导通路治疗哮喘的调控机制[D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
Hong TY. Granules XieHuang affect the regulatory mechanism of NF- κ B and HIF-1 α signaling pathway in the treatment of asthma [D]. Changchun: Changchun Univ Tradit Chin Med, 2020.
- [7] 张宁宁, 吴力群, 霍婧伟, 等. 加味六安煎对咳嗽变异性哮喘大鼠模型气道重塑的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(2): 288-291.
- [8] Zhang NN, Wu LQ, Huo JW, et al. Airway remodeling in cough variant asthma rats and the intervention effect of modified Liu'an Decoction [J]. World J Integr Tradit West Med, 2020, 15, (2): 288-291.
- [9] 郭鑫, 诸葛姝芮, 齐旭升. 抗支糖浆联合糖皮质激素对咳嗽变异性哮喘模型大鼠NF- κ B信号通路的影响 [J]. 河北医学, 2020, 26(10): 1613-1617.
Guo X, ZhuGe SR, Qi XS. Effects of anti-bronchial syrup combined with glucocorticoid on NF- κ B signaling pathway in model rats with cough variant asthma [J]. J Hebei Med, 2020, 26(10): 1613-1617.
- [10] Jin XS, Zeng JS. IL-4-C-590T locus polymorphism and susceptibility to asthma in children: a meta-analysis [J]. J Pediatr, 2021, 97(3): 264-272.
- [11] 时晨, 林丽丽, 谢彤, 等. 基于“肺-肠”轴探讨肺、肠微生态对肺部疾病的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(2): 168-173.
Shi C, Lin LL, Xie T, et al. The role of the lung-gut axis and gut microorganism in pulmonary disease [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2020, 36(2): 168-173.
- [12] Fu Y, Ni J, Marmorì F, et al. Infrared thermal imaging-based research on the intermediate structures of the lung and large intestine exterior-interior relationship in asthma patients [J]. Chin J Integr Med, 2016, 22(11): 855-860.
- [13] 吴佳佳. “从肠论治”对过敏性哮喘小鼠肺Th17/Treg及肠道菌群的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.

- Wu JJ. Effects on Th17/Treg in lung-gut and intestinal flora of allergic asthma mice with "Treating from intestine" [D]. Beijing: Beijing Univ Tradit Chin Med, 2017.
- [13] 王永安, 李亚兰, 吴佳佳, 等. 基于16S rDNA分析大承气汤对过敏性哮喘小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(2): 76-80.
Wang YA, Li YN, Wu JJ, et al. Effects of Dachengqi Decoction on intestinal flora in OVA-induced allergic asthmatic mice based on 16S rDNA sequencing [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2021, 28(2): 76-80.
- [14] 崔芳, 史春丽, 尹梅, 等. 枸杞多糖对过敏性哮喘小鼠肠道菌群的影响[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 67-73.
Cui F, Shi CL, Yin M, et al. Effect of Lyciumbarbarum polysaccharide on gut microbiota in allergic asthmatic mice [J]. Mod Food Sci Technol, 2019, 35(9): 67-73.
- [15] Kho ZY, Lal SK. The human gut microbiome - a potential controller of wellness and disease [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1835.
- [16] 黄煌, 郑鹏远, 张利利, 等. 食物过敏对小鼠肠道屏障功能及CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(17): 1932-1937.
Huang H, Zhen PY, Zhang LL, et al. Influence of food allergy on gut barrier function and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in food allergic mice [J]. World Chin J Digestol, 2008, 16(17): 1932-1937.
- [17] 宋伟, 孙丽莹, 朱志军, 等. 肝移植对胆道闭锁儿童肠道菌群的影响[J]. 器官移植, 2021, 12(6): 692-699.
Song W, Sun LY, Zhu ZJ, et al. Effect of liver transplantation on intestinal microflora in children with biliary atresia [J]. Organ Transplant, 2021, 12(6): 692-699.
- [18] Groves HT, Leah C, Phillip J, et al. Respiratory disease following viral lung infection alters the murine gut microbiota [J]. Front Immun, 2018, 9: 182.
- [19] Zhang M, Zhou H, Xu SS, et al. The gut microbiome can be used to predict the gastrointestinal response and efficacy of lung cancer patients undergoing chemotherapy [J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(6): 4211-4227.
- [20] 周联菲, 戴高中. 基于肠道菌群中药治疗胃肠道疾病的研究进展[J]. 智慧健康, 2020, 6(8): 39-42.
Zhou LF, Dai GZ. Research advances on traditional Chinese medicine treatments of gastrointestinal diseases based on gut microbiota [J]. Smart Health, 2020, 6(8): 39-42.
- [21] Song P, Yang DL, Wang HP, et al. Relationship between intestinal flora structure and metabolite analysis and immunotherapy efficacy in Chinese NSCLC patients [J]. Thorac Cancer, 2020, 11(6): 1621-1632.
- [22] 柳萍飞. 咳嗽变异性哮喘患儿肠道菌群及血清干扰素- γ 和白介素-4水平的变化[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(4): 444-446.
Liu PF. The changes of intestinal flora and levels of INF- γ and IL-4 in plasma of children with cough variant asthma [J]. Chin J Microecol, 2020, 32(4): 444-446.

(编辑 孙慧兰)