

· 针灸经络 ·

电针“肺俞”和“足三里”穴对 COPD 大鼠肠道菌群的影响[※]

LIM JIE YING¹ 杨宗保¹ 伊 雪^{2,3} 钟月丽^{2,3} 彭雯雯^{2,3} 郑 慧^{2,3▲}

摘 要 目的:通过电针“肺俞”和“足三里”穴治疗慢性阻塞性肺病(COPD)模型大鼠,观察其肺部炎症和肠道菌群的变化,进一步探讨电针干预对 COPD 模型大鼠肠道菌群的调节作用。**方法:**将 27 只 SD 大鼠随机分成空白组(9 只)、模型组(9 只)、电针组(9 只),除了空白组,其余两组采用 LPS 气管滴注(实验第 1 d 和第 14 d)及烟熏联合制备 COPD 模型,造模时间长达 8 w(共 56 d);电针组于实验的最后 2 w 于单侧“肺俞”和“足三里”穴进行电针干预,频率为疏波 2 Hz,密波 10 Hz,20 min/次/d,每日轮换对侧进行电针,连续 14 d。实验结束后对各组大鼠采用 HE 染色法观察肺组织病理形态改变,采用 ELISA 检测肺泡灌洗液中 IL-6、IL-8、TNF- α 的水平,并采用 16S rDNA 测序分析大鼠粪便内菌群丰度及多样性。**结果:**与空白组相比,模型组大鼠肺组织炎性浸润明显,支气管管壁增厚,上皮杯状细胞增多,肺泡破损严重;与模型组相比,电针组大鼠肺组织支气管管壁较薄,炎性浸润较少,肺泡破损程度较轻。与空白组相比,模型组肺泡灌洗液中 IL-8 和 TNF- α 含量显著升高($P<0.01$),IL-6 含量升高($P<0.05$)。电针干预后,与模型组相比,电针组肺泡灌洗液中 IL-8 和 TNF- α 含量显著下降($P<0.01$)。菌群 Alpha 多样性结果显示,各组间大鼠肠道菌群的 Sob、Chao1、ACE 指数差异均无统计学意义($P>0.05$)。Beta 多样性结果显示,模型组与空白组明显分离,电针组与模型组则分离不明显。与空白组相比,模型组在乳酸菌属、毛螺菌属、拟杆菌属、梭菌属的相对丰度上升;而电针干预后其相对丰度均下降。LefSE 分析结果显示,电针组的富集菌为棒状杆菌属、拟杆菌属、普雷沃氏菌属、普雷沃氏菌科、螺杆菌属、脱硫弧菌属、异杆菌、葡萄球菌属、奎因氏菌属等。**结论:**电针干预 COPD 模型大鼠可能通过调节肠道内菌群结构及丰度减轻 COPD 大鼠的肺部炎症,这为治疗 COPD 的作用机制研究提供了新的方向。

关键词 慢性阻塞性肺病;COPD;电针;肠道菌群;16S rDNA

慢性阻塞性肺病(Chronic Pulmonary Obstructive Disease, COPD)的主要特征为持续的呼吸道症状和气流限制,并伴有长期的呼吸系统症状^[1]。2019 年,全球报告了 2.123 亿例慢性阻塞性肺病的病例,其中该病导致了 330 万人死亡,成为全球第三大常见死因^[2]。近年来,不少研究者试图通过 COPD 与肠道菌群的关系来分析 COPD 的发病机制,其中“肺-肠轴”理论成

为研究的热点。“肺-肠轴”理论指的是肺道微生物和胃肠道的微生物之间存在相互作用,肠道微生物群的紊乱会导致包括肺在内的多个远端器官受到影响^[3]。研究表明,与健康个体相比,COPD 患者的肠道微生物群更容易出现失调^[4]。因此,肠道菌群对 COPD 的发病机制可能有着调节免疫功能及维持整体健康的双向作用。

针灸作为中国传统医学的常用治疗手段,被广泛用于 COPD 的治疗,并展现出良好的临床疗效。对于 COPD 患者,针灸能够有效缓解临床症状,提升运动耐力,减轻焦虑情绪,改善营养状况^[5-7];同时,针灸也能够优化血液流变学指标,减轻炎症反应,并缩短病情发作的持续时间和频率^[8]。常用于治疗 COPD 的穴位

※基金项目 福建省自然科学基金(No.2023J011662);厦门市科技计划项目(No.3502Z20244ZD1131;No.3502Z20244ZD1132);厦门医学院校级科研项目(No.K2020-06)

▲通信作者 郑慧,女,医学博士,讲师。研究方向:中西医结合康复治疗方向。E-mail:201600010402@xmmc.edu.cn

• 作者单位 1.厦门大学(福建 厦门 361105);2.厦门医学院(福建 厦门 361023);3.厦门医学院呼吸疾病研究所(福建 厦门 361023)

包括了肺俞、足三里、大椎穴、肾俞穴、曲池穴、中脘穴、膻中穴、气海穴等,其中“肺俞”及“足三里”穴的联合使用可调节不同类型的炎症细胞因子,有助于抗炎,可作为治疗 COPD 的基本配穴^[9]。然而,针刺治疗 COPD 在肠道菌群方面的机制研究仍处于空白。因此,本研究通过建立 COPD 大鼠模型,观察电针“肺俞”和“足三里”对大鼠肺组织病理形态变化以及肺泡灌洗液中白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平,并评估其对 COPD 大鼠肠道菌群的影响,探究电针治疗是否能够改善 COPD 大鼠肠道菌群失调的情况,希望为 COPD 的综合治疗提供新的思路 and 依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 27 只体质量为(320±30) g 的 6 w 龄 SPF 级 SD 大鼠,由厦门大学实验动物中心提供(伦理号为 XMULAC20230203),并于厦门大学医学院动物中心进行常规饲养,环境温度为(27±3) °C,湿度为(60±10)%。所有大鼠适应性喂养 7 d 后,按随机数字表法而被随机分为空白组(CT 组)、模型组(MD 组)、电针组(EA 组),每组 9 只。实验过程中严格遵照实验动物福利及伦理的各项规定进行,确保动物得到应有的福利及伦理保护。

1.2 主要试剂与仪器 香烟[红梅牌,产自红塔烟草(集团)有限责任公司];脂多糖(Biosharp 牌,产自兰杰柯科技有限公司);无菌针灸针(方祖张仲景牌,平柄针,规格:0.18 mm×13 mm);HiPure Stool DNA 提取试剂盒(产自广州美基生物科技有限公司)。小动物麻醉系统(瑞沃德);SDZ-Ⅱ型电子针疗仪(华佗牌);全自动数字玻片扫描仪(Zeiss AxioScan 7,产自蔡司集团);烟雾发生器(DSI BUXCO);Illumina Miseq 测序仪(产自美国 Illumina 公司)。

1.3 动物模型制备 空白组进行常规饲养,不做任何处理;模型组及电针组复制 COPD 大鼠^[10],采用气管滴入加烟熏法进行造模。气管滴注于实验第 1 d 和第 14 d 进行:将大鼠麻醉并手术暴露气管后,滴注 0.2 mL 浓度为 1 mg/mL 的脂多糖(LPS)溶液进入大鼠气道内,滴注当天不进行烟熏造模。烟熏法是将模型组及电针组的大鼠放入烟雾发生器中,同时点燃 20 支红梅牌香烟,点燃后保持烟雾 30 min,每日 2 次,2 次中间间隔 10 min。造模过程持续 8 w(共 56 d)。模型制备过程中,部分大鼠由于对麻醉剂量的耐受性

较差而在麻醉后出现死亡。

1.4 干预方法 电针组从实验第 43 d 开始进行电针“肺俞”及“足三里”治疗,具体操作方法为:参照全国中医药行业高等教育“十三五”规划教材《实验针灸学》中的动物穴位图谱对大鼠“肺俞”及“足三里”进行定位,用无菌针灸针(方祖张仲景牌,平柄针,规格:0.18 mm×13 mm)进行针刺,“肺俞”向内斜刺 0.5 cm,“足三里”直刺 1 cm,针刺后连接 SDZ-Ⅱ型电针治疗仪。电针治疗仪的输出参数为:电流强度 1.5 mA,采用疏密波(疏波 2 Hz,密波 10 Hz),电针刺激强度以毫针针体出现轻颤为度,电针时间为 20 min/次/d,连续 14 d,每天电针时间为 14:00。电针干预过程中,初期因术者操作不够熟练而导致少数大鼠死亡,但随着术者逐步熟练掌握操作方法,大鼠的死亡情况得到了有效控制

1.5 样本采集及指标检测

1.5.1 组织取材 各组大鼠于实验第 56 d 开始禁食 24 h。之后,术者将大鼠进行异氟烷气管麻醉后,在无菌操作台上对其进行剖腹,暴露其肺部及结肠,并取出左肺,采用 4% 多聚甲醛固定,包埋,将其切成 5 μ m 厚度的切片;截取结肠内同一部位粪便 2~3 粒,将大鼠肠内粪便采集至 5 mL 冻存管,置于-80 °C 液氮泡沫箱中,后转存于-80 °C 冰箱。

1.5.2 HE 染色法观察大鼠肺组织形态变化 将制备好的病理切片脱蜡至水,浸入苏木精染色液中,持续 5 min,小流量自来水冲洗后浸入伊红染色剂中,亦持续 5 min,采集光学显微镜(400×)下各组大鼠肺组织的病理形态图片。

1.5.3 ELISA 检测大鼠肺泡灌洗液 IL-6、IL-8、TNF- α 的含量 各组大鼠取右肺的肺泡灌洗液,根据 ELISA 试剂盒检测说明书进行操作,检测大鼠肺泡灌洗液中的 IL-6、IL-8、TNF- α 水平。

1.5.4 16S rDNA 测序肠道菌群 DNA 提取:采用 HiPure Stool DNA 提取试剂盒以提取粪便样本中的总 DNA。PCR 扩增:对 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域进行 PCR 扩增,PCR 试剂厂家为 New England Biolabs。PCR 产物鉴定、定量:使用 2% 琼脂糖凝胶评定扩增产物的质量,接着纯化 PCR 产物,并用 Qubit 3.0 进行定量。文库测序:采用 Illumina DNA Prep Kit 构建测序文库;采用 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 检测文库的质量,质量合格的文库采用 Novaseq 6000 上机测序,模式为 PE250。

1.5.5 生物信息分析 对测序数据进行优化,通过质控、聚类、去嵌合体以获取操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU);对OTU进行注释,根据注释结果获取各层级(门、纲、目、科、属、种)的物种丰度信息,生成 Alpha 多样性、Beta 多样性分析、物种组成分析、LefSE 分析(LDA Effect Size)等。

1.5.6 统计学分析 ELISA 数据结果通过 Graph Pad Prism 10 软件进行作图分析,统计方法为多组 One-way ANOVA 法, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的病理形态变化 HE 染色结果显示,空白组大鼠的支气管管壁组织正常,肺泡壁薄且结构完整,未见明显的炎性细胞浸润。与空白组相比,模型组大鼠的支气管管壁增厚变形,上皮杯状细胞增多及大量炎性细胞浸润,出现肺泡壁断裂融合成肺大泡。相比于模型组,电针组大鼠的支气管管壁增厚程度减轻,未发生变形,炎性细胞数量较少,肺泡破裂和融合程度较轻。由此说明,电针能减轻 COPD 模型大鼠的支气管壁和肺泡壁结构组织的破坏,且可减少炎性细胞数量。见图 1。

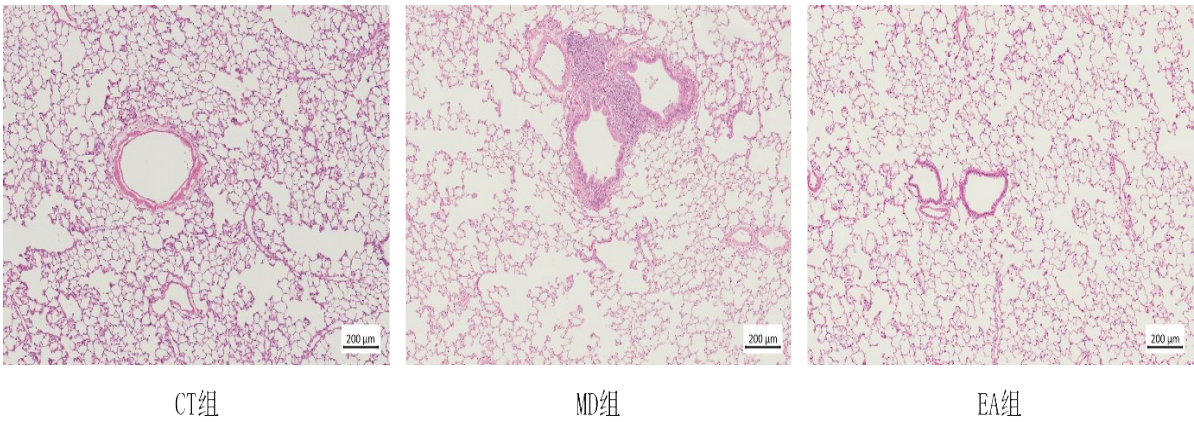
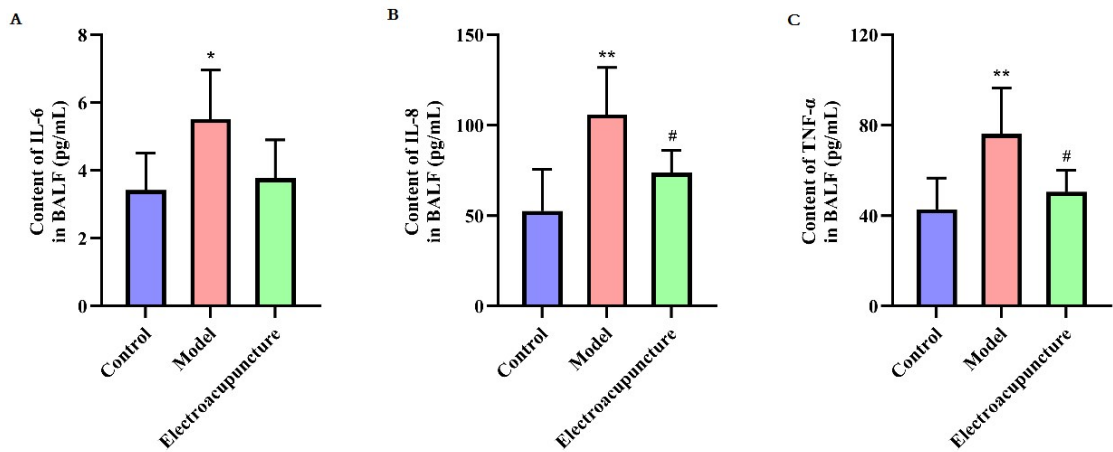


图1 HE 染色下各组大鼠肺组织的病理形态(400×)

2.2 大鼠肺泡灌洗液中 IL-6、IL-8、TNF- α 的含量变化 与空白组相比,模型组大鼠肺泡灌洗液中 IL-8 和 TNF- α 含量显著升高($P<0.01$), IL-6 含量升高($P<0.05$)。与模型组相比,电针组肺泡灌洗液中 IL-8 和

TNF- α 含量下降($P<0.01$),但 IL-6 无显著差异($P>0.05$)。由此说明,电针可减少 COPD 大鼠肺泡灌洗液中 IL-8 和 TNF- α 炎症因子的含量,从而减轻 COPD 大鼠肺组织炎症。见图 2。



A: 各组 IL-6 含量; B: 各组 IL-8 含量; C: 各组 TNF- α 含量; Control: 空白组; Model: 模型组; Electroacupuncture: 电针组; 与空白组对比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组对比, # $P<0.05$

图2 各组大鼠肺泡灌洗液中 IL-6、IL-8、TNF- α 的含量

2.3 大鼠肠道菌群物种多样性及丰度的变化

2.3.1 大鼠肠道菌群 Alpha 多样性的变化 Alpha 多样性分析是用于分析单样品中的物种多样性,常用的指数包括 observed species (Sob)、Chao1、ACE 等。Sob 为检测到的 OTU 个数,而 Chao1 和 ACE 是基于检测到的 OTU 进行预测。Sob、Chao1、ACE 指数与物种多样性成正比,能够用于反映物种的丰富度。结果显示,各组间大鼠肠道菌群的 Sob、Chao1、ACE 指数差异均无统计学意义($P>0.05$),说明各组大鼠肠道菌群在 alpha 多样性上没有明显差异。见图 3。

2.3.2 大鼠肠道菌群 Beta 多样性的变化 Beta 多样性是用于衡量多样品之间物种多样性差异的标准,其中基于 Bray curtis 的主坐标分析 PCoA (principal coordinates analysis) 能够展示样品之间物种的相似性,越来越远则相似度越高。主坐标分析 PCOA 结果显示,空白组与模型组样本存在明显分离,表明 COPD 模型组大鼠的肠道菌群组成与空白组相比差异较大;模型组与电针组样本的坐标范围重叠,肠道菌群结构上的差异较小,提示电针组肠道菌群结构的变化在 Beta 多样性分析中体现的不明显。见图 4。

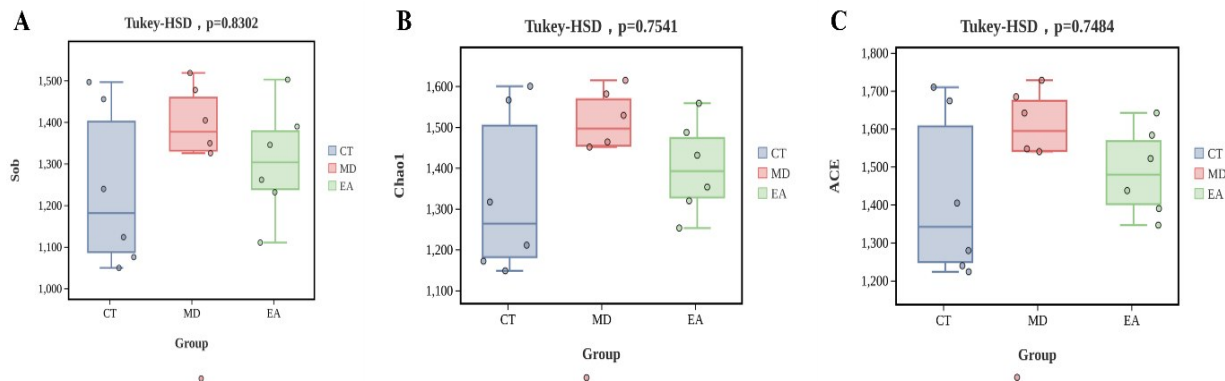
2.3.3 大鼠肠道菌群门水平相对丰度的变化 大鼠肠道菌群门水平的主要组成如下:*Bacteroidota* (拟杆菌门)、*Firmicutes* (厚壁菌门)、*Verrucomicrobiota* (疣状微生物群)、*Proteobacteria* (变形菌门)、*Desulfobacterota* (脱硫杆菌门)、*Actinobacteriota* (放线菌门)、*Cyanobacteria* (蓝细菌)等。

相较于空白组,模型组在 *Firmicutes* (厚壁菌门)、*Verrucomicrobiota* (疣状微生物群)、*Desulfobacterota* (脱硫杆菌门)、*Actinobacteriota* (放线菌门)、*Cyanobacteria* (蓝细菌)中的相对丰度上升,而在 *Bacteroidota* (拟杆菌门)、*Proteobacteria* (变形菌门)中的相对丰度下降。

相较于模型组,电针组在 *Bacteroidota* (拟杆菌门)、*Proteobacteria* (变形菌门)、*Desulfobacterota* (脱硫杆菌门)、*Cyanobacteria* (蓝细菌)中的相对丰度上升,而在 *Firmicutes* (厚壁菌门)、*Verrucomicrobiota* (疣状微生物群)、*Actinobacteriota* (放线菌门)中的相对丰度下降。其中,电针干预后对于 *Bacteroidota* (拟杆菌门)、*Firmicutes* (厚壁菌门)、*Verrucomicrobiota* (疣状微生物群)、*Proteobacteria* (变形菌门)、*Actinobacteriota* (放线菌门)有着回调作用。见表 1 及图 5。

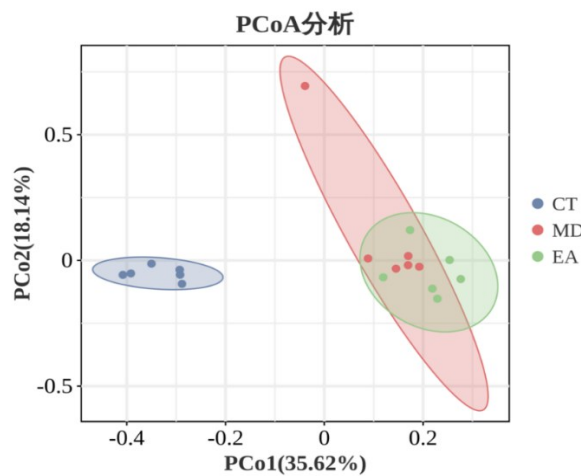
2.3.4 大鼠肠道菌群属水平相对丰度的变化 大鼠肠道菌群属水平的主要组成如下:*Alloprevotella* (异普氏菌属)、*Romboutsia* (罗姆布茨菌)、*Akkermansia* (阿克曼氏菌)、*Lactobacillus* (乳酸菌属)、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* (毛螺菌科 NK4A136 组)、*Bacteroides* (拟杆菌属)、*Prevotellaceae_Ga6A1_group* (普雷沃氏菌科 Ga6A1 组)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (梭菌_sensu_stricto_1)、*Ruminococcus* (瘤胃球菌属)、*Parasutterella* (副萨特氏菌属)等。

相较于空白组,模型组在 *Romboutsia* (罗姆布茨菌)、*Akkermansia* (阿克曼氏菌)、*Lactobacillus* (乳酸菌属)、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* (毛螺菌科 NK4A136 组)、*Bacteroides* (拟杆菌属)、*Prevotellaceae_Ga6A1_group* (普雷沃氏菌科 Ga6A1 组)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (梭菌_sensu_stricto_1)、*Ruminococcus* (瘤胃球菌属)中的相对丰度上升,而在 *Alloprevotella* (异普氏菌属)及 *Parasutterella* (副萨特氏菌属)中的相对丰度下降。相较于模型组,电针组在 *Bacteroides* (拟杆菌属)、*Prevotellaceae_Ga6A1_group* (普氏菌科 Ga6A1 组)、*Ruminococcus* (瘤胃球菌属)、*Parasutterella* (副萨特氏菌属)中的相对丰度上升,而在 *Alloprevotella* (异普氏菌属)、*Romboutsia* (罗姆布茨菌)、*Akkerman-*



A: 各组 Sob 指数; B: 各组 Chao1 指数; C: 各组 ACE 指数; CT: 空白组; MD: 模型组; EA: 电针组

图 3 各组大鼠肠道菌群的 Alpha 多样性分析

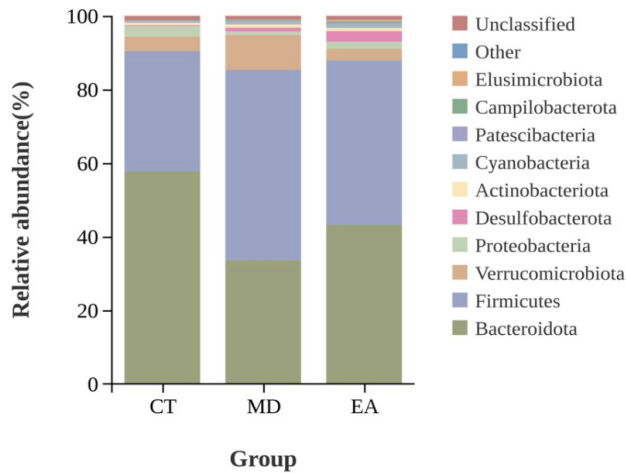


CT:空白组;MD:COPD模型组;EA:电针组

图4 各组大鼠肠道菌群的Beta多样性分析

表1 各组大鼠肠道菌群的门水平相对丰度(%)

门水平	CT组	MD组	EA组
<i>Bacteroidota</i>	57.6900	33.6104	43.2772
<i>Firmicutes</i>	32.7281	51.7418	44.6360
<i>Verrucomicrobiota</i>	3.9663	9.4217	3.1308
<i>Proteobacteria</i>	2.8275	0.9751	1.8965
<i>Desulfobacterota</i>	0.2656	1.0271	2.8862
<i>Actinobacteriota</i>	0.6131	0.9012	0.8925
<i>Cyanobacteria</i>	0.5004	0.7411	1.0206
<i>Patescibacteria</i>	0.0813	0.2368	0.4216
<i>Campilobacterota</i>	0.0514	0.2093	0.3185
<i>Elusimicrobiota</i>	0.0134	0.0433	0.3813



CT:空白组;MD:模型组;EA:电针组

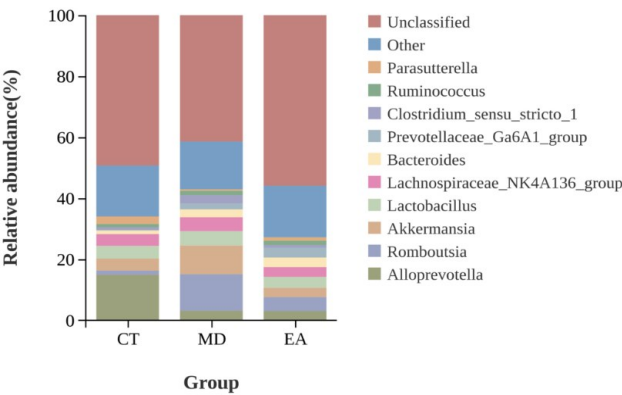
图5 各组大鼠肠道菌群的门水平相对丰度

sia (阿克曼氏菌)、*Lactobacillus* (乳酸菌属)、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* (毛螺菌科 NK4A136 组)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (梭菌_sensu_stricto_1) 中的相对丰度下降。其中,电针干预后对于 *Akkermansia* (阿克

曼氏菌)、*Lactobacillus* (乳酸菌属)、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* (毛螺菌科 NK4A136 组)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (梭菌_sensu_stricto_1) 中的相对丰度下降。见表2及图6。

表2 各组大鼠肠道菌群的属水平相对丰度(%)

属水平	CT组	MD组	EA组
<i>Alloprevotella</i>	14.9599	3.1256	3.0267
<i>Romboutsia</i>	1.3091	11.9781	4.5680
<i>Akkermansia</i>	3.9657	9.3885	3.0708
<i>Lactobacillus</i>	4.1588	4.7098	3.5934
<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	3.8491	4.5522	3.1596
<i>Bacteroides</i>	1.1819	2.5911	3.1739
<i>Prevotellaceae_Ga6A1_group</i>	0.1736	1.9251	3.1732
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	0.8734	2.7256	0.9031
<i>Ruminococcus</i>	1.0926	1.4556	1.4603
<i>Parasutterella</i>	2.4684	0.4397	1.0759



CT:空白组;MD:模型组;EA:电针组

图6 各组大鼠肠道菌群的属水平相对丰度

2.3.5 大鼠肠道菌群属水平显著差异物种 基于 LDA 评分>3 的 LEfSe (Linear discriminant analysis effect size) 分析结果显示,空白组的富集菌为 *Alloprevotella* (异普氏菌属)、*Prevotellaceae_UCG_001* (普雷沃氏菌科 UCG_001)、*Parabacteroides* (副拟杆菌)、*Dubosiella* (杜氏菌属)、*Phascolarctobacterium* (考拉杆菌属)、*Parasutterella* (副萨特氏菌属);模型组的富集菌为 *Romboutsia* (罗姆布茨菌);电针组的富集菌为 *Corynebacterium* (棒状杆菌属)、*Bacteroides* (拟杆菌属)、*Prevotella* (普雷沃氏菌属)、*Prevotellaceae_Ga6A1_group* (普雷沃氏菌科 Ga6A1 组)、*Helicobacter* (螺杆菌属)、*Desulfovibrio* (脱硫弧菌属)、*Elusimicrobium* 菌属、*Allobaculum* (异杆菌)、*Staphylococcus* (葡萄球菌属)、*Quinella* (奎因氏菌属)、*Candidatus_Saccharimonas* (念珠菌_糖单胞菌)。见图7、图8。

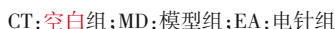


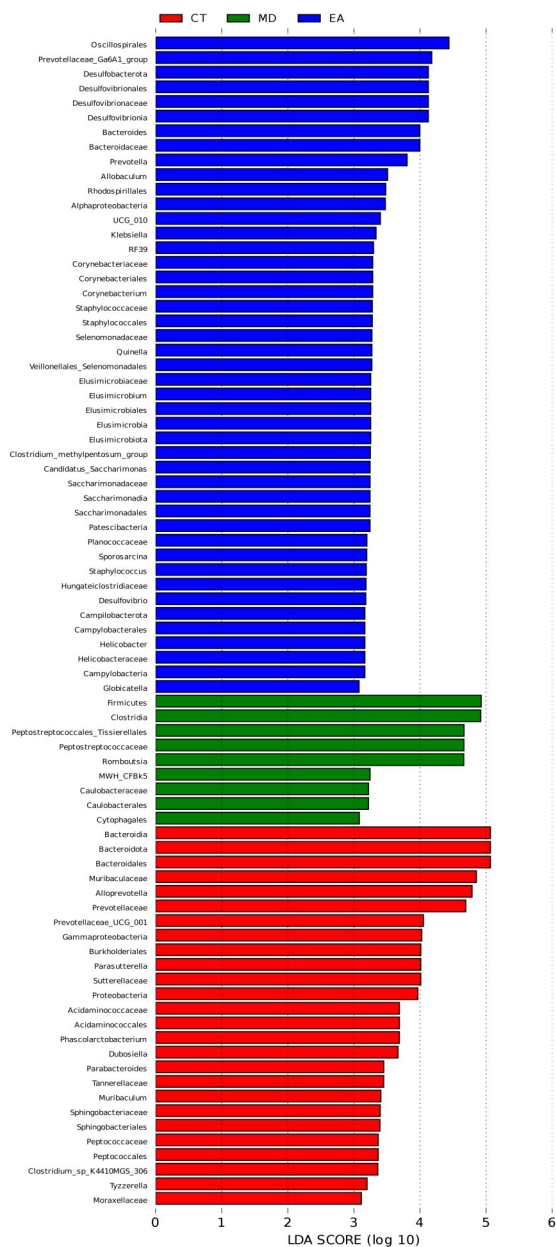
图7 各组大鼠肠道菌群内属水平显著差异物种LefSe分析的分支图

COPD 的特点为慢性呼吸道症状,结构性肺部异常及肺功能受损^[11]。COPD 在中医学属于“咳嗽”“肺胀”“喘病”等范畴,其病机以正气亏虚、痰瘀互结、感受外邪为主^[12],而针刺能扶正祛邪,通经活络,有助补益肺脾肾气、祛瘀化痰,从而改善肺功能^[13]。“足三里”属足阳明胃经,具有调理脾胃、补气调血、扶正祛邪的作用;“肺俞”属足太阳膀胱经,为肺气输注于背部之处,是治疗病邪在肺的要穴。相关研究^[14-15]发现,电针大鼠“足三里”及“肺俞”穴能够改善 COPD 模型大鼠的肺功能及气道炎症。基于这些研究成果,本研究继续选择“肺俞”和“足三里”两个穴位进行深入探讨。结果发现,COPD 模型大鼠肺组织出现炎症反应,炎性细胞浸润,支气管管壁及肺泡结构破损,而相比于模型组,电针组大鼠肺组织中支气管壁较薄、肺泡结构破损程度较轻,炎性细胞较少。这进一步表明电针小鼠“足三里”和“肺俞”能减轻肺组织炎性病理损伤,改善肺组织炎性反应,提示电针对 COPD 小鼠肺组织存在抗炎作用。

长因子- β (TGF- β) 协同诱导 Th17 细胞的分化, 同时抑制调节性 T 细胞 (Treg) 分化, 导致 Th17/Treg 平衡向促炎方向倾斜, 这一失衡被认为与慢性炎症的进展密切相关^[17]。IL-8 (亦称 CXCL8) 是一种强效的 CXC 趋化因子, 具有显著的中性粒细胞趋化作用, 能在炎症部位大量聚集中性粒细胞, 加剧局部炎症反应^[18]。TNF- α 则通过激活转录因子核因子- κ B (NF- κ B) 放大炎症信号通路, 进一步上调多种促炎基因的表达, 导致肺部炎症加剧并加速组织损伤^[19]。本研究的 ELISA 结果显示, COPD 模型大鼠 BALF 中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平均显著升高, 提示气道及肺部存在持续性炎症。电针干预后, COPD 模型大鼠 BALF 中 IL-8 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$), 表明电针可有效抑制炎症因子释放, 减轻 COPD 相关的炎症反应。

“肺与大肠相表里”为中医藏象学说的理论,源于《黄帝内经》。《灵枢·本输》中便提到“肺合大肠”,表述了肺与大肠之间的联系。在经络理论上,《灵枢·经脉》曰:“肺手太阴之脉,起于中焦,下络大肠……出大指之端”,“大肠手阳明之脉,起于大指次指之端……下入缺盆,络肺,下隔,属大肠。”肺经与大肠经于食指处相交,分别循行于上肢的内外侧,肺经为阴,大肠经为阳,互为表里,并相互络属^[20]。现代研究也证明了肠道菌群与COPD之间有着紧密联系,如Kate等^[21]发现,COPD患者的肠道菌群明显区别于健康对照人群。本实验通过电针COPD大鼠“足三里”及“肺俞”穴,探讨电针对COPD大鼠肠道菌群的影响。

本研究采用了 16S rDNA 基因测序来探讨各组大鼠肠道菌群在多样性、丰度、差异物种及功能分析的



CT:空白组;MD:模型组;EA:电针组
 图 8 各组大鼠肠道菌群内属水平显著差异物种 LEfSe 分析的 LAD>3 直方图

变化。Beta 多样性分析结果表明 COPD 模型大鼠粪便中的微生态较空白组出现了明显变化。烟熏造模后大鼠肠道菌群的多样性明显区别于空白组,提示吸烟将影响大鼠粪便微生态的平衡,但电针干预后大鼠肠道菌群与模型组比较,肠道菌群结构上无明显差异,提示电针治疗并未对 COPD 模型大鼠微生态结构造成影响。

本实验结果表明,COPD 模型大鼠在乳酸菌属、毛螺菌属、拟杆菌属、梭菌属出现了相对丰度的增加,这

与大部分研究报道中的结果一致。大鼠粪便中的拟杆菌门、乳杆菌门等丰度增加提示其可能作为潜在的致病因子,参与 COPD 的发病机制^[22]。研究发现,毛螺菌科的多个成员与 COPD 的严重性呈正相关。毛螺菌科在慢性炎症相关疾病中的丰度增加,可能是导致异常炎症和细胞生理活动减少的因素之一^[23]。研究表明梭状芽胞杆菌作为潜在的有益菌,丰度因积极吸烟而降低^[24]。临床研究发现瘤胃球菌在 COPD Ⅲ或Ⅳ患者的粪便中丰度最高,在健康个体中含量最低^[25]。电针干预后,COPD 模型大鼠粪便中的阿克曼氏菌、乳酸杆菌、毛螺菌科 NK4A123 组、梭菌_sensu_stricto_1 的相对丰度减少,副萨特氏菌属相对丰度增加,其中与 COPD 密切相关的包括了乳酸杆菌属、毛螺菌科 NK4A136 组和梭菌_sensu_stricto_1,这提示电针有助抑制与 COPD 相关的致病菌。

LEfSe 分析结果表明,Corynebacterium(棒状杆菌属)、Bacteroides(拟杆菌属)、Prevotella(普雷沃氏菌属)、Prevotellaceae_Ga6A1_group(普雷沃氏菌科 Ga6A1 组)、Helicobacter(螺杆菌属)、Desulfovibrio(脱硫弧菌属)、Elusimicrobium 菌属、Allobaculum(异杆菌)等在电针组中富集。研究表明谷氨酸棒状杆菌的增加导致代谢物发生变化和短链脂肪酸(SCFA)的大幅增加,其中,乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐的含量与促炎细胞因子的含量呈负相关^[26]。临床研究发现,拟杆菌和未分类的拟杆菌在健康者的肠道中丰度最高,而在 COPD Ⅲ或Ⅳ患者中丰度最低^[18]。普雷沃氏菌属通常被认为是共生细菌,普雷沃氏菌属的丰度与 COPD 症状的严重程度呈负相关,而与肺功能和运动能力则呈正相关。普雷沃氏菌可能通过调节紧密连接蛋白的表达来促进先天免疫并降低肺上皮细胞通透性^[27]。亦有研究表明,与对照组相比,COPD 小鼠中的异杆菌、螺杆菌、普雷沃氏菌科 Ga6A1 组、葡萄球菌等的丰度较低^[28]。本研究结果与上述研究一致,因此可以得出电针“肺俞”“足三里”穴可通过调节棒状杆菌属、拟杆菌属、普雷沃氏菌属、螺杆菌属等在肠道中的丰度,从而减轻 COPD 大鼠肺部炎症。

4 不足与展望

本次实验研究仍存在许多不足,首先本次实验造模及干预的周期较短,无法观察长期的效果,限制了对研究干预方式持久性的理解。此外,研究缺乏对临床 COPD 患者样本的结合分析。大鼠与人类肠道中

的菌群结构存在差异,故本研究可能无法确切反映人类的生理及病理特性,研究发现难以直接应用于临床。未来研究中需要注意以下几点:第一,未来研究应增加样本数量,以帮助提高结果统计学意义及可靠性;第二,可以进行更长期的实验观察,以便更全面地评估电针治疗 COPD 大鼠的效果,为临床提供更充分的依据。

参考文献

- [1] AGUSTÍ A, CELLI B R, CRINER G J, et al. Global initiative for chronic obstructive lung disease 2023 report: GOLD executive summary[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2023, 207(7): 819–837.
- [2] SAFIRI S, CARSON-CHAHHOUD K, NOORI M, et al. Burden of chronic obstructive pulmonary disease and its attributable risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *BMJ (Clinical research ed.)*, 2022, 378: e069679.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 谢芳, 吴永平, 刘磊, 等. 温针灸治疗慢性阻塞性肺病痰浊壅肺证: 随机对照研究[J]. *中国针灸*, 2019, 39(9): 918–922.
- [6] 童娟, 郭泳梅, 何颖, 等. 针刺对稳定期慢性阻塞性肺病患者运动耐量的调节作用: 随机对照研究[J]. *中国针灸*, 2014, 34(9): 846–850.
- [7] 黄寅, 尤寅骏. “冬病夏治”穴位敷贴联合针刺治疗 COPD 稳定期疗效[J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2019, 3(7): 1–3.
- [8] SHI F, CAO J, ZHOU D, et al. Revealing the clinical effect and biological mechanism of acupuncture in COPD: A review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 115926.
- [9] JIANG L H, LI P J, WANG Y Q, et al. Anti-inflammatory effects of acupuncture in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Integr Med*, 2023, 21(6): 518–527.
- [10] ZHANG X F, ZHU J, GENG W Y, et al. Electroacupuncture at Feishu (BL13) and Zusanli (ST36) down-regulates the expression of orexins and their receptors in rats with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Integr Med*, 2014, 12(5): 417–424.
- [11] CELLI B R, WEDZICHA J A. Update on Clinical aspects of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(13): 1257–1266.
- [12] 丁莉莉, 冯淬灵, 赵克明. 慢性阻塞性肺疾病中医研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(3): 164–168.
- [13] 金子怡, 张传名. 中医治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期的研究进展[J]. *中国民间疗法*, 2022, 30(3): 111–114.
- [14] 李玮, 刘自兵, 潘娅玲, 等. 电针对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺功能及 TGF- β 、TNF- α 、IL-8 的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(4): 541–545.
- [15] 王彩云, 苏景超, 张新芳, 等. 电针对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺神经内分泌细胞及神经活性物质分泌的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47(4): 305–313.
- [16] EL-SHIMY W S, EL-DIB A S, NAGY H M, et al. A study of IL-6, IL-8, and TNF- α as inflammatory markers in COPD patients[J]. *Egypt J Bronchol*, 2014, 8: 91–99.
- [17] HUANG H, HUANG X, ZENG K, et al. Interleukin-6 is a strong predictor of the frequency of COPD exacerbation within 1 year[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16: 2945–2951.
- [18] HLAČIĆ I, BELAMARIĆ D, BOSNAR M, et al. Combination of systemic inflammatory biomarkers in assessment of chronic obstructive pulmonary disease: diagnostic performance and identification of networks and clusters[J]. *Diagnostics*, 2020, 10(12): 1029.
- [19] SHYAM PRASAD SHETTY B, CHAYA S K, KUMAR V S, et al. Inflammatory biomarkers interleukin 1 beta (IL-1 β) and tumour necrosis factor alpha (TNF- α) are differentially elevated in tobacco smoke associated COPD and biomass smoke associated COPD[J]. *Toxics*, 2021, 9(4): 72.
- [20] 王晗笑, 栾哲宇, 封继宏. 基于“肺与大肠相表里”探讨中医药调控肠道菌群治疗慢性阻塞性肺疾病的内涵[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(3): 169–177.
- [21] BOWERMAN K L, REHMAN S F, VAUGHAN A, et al. Disease-associated gut microbiome and metabolome changes in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5886.
- [22] LI X, LI Y, MAO J, et al. Combination of Chinese and western medicine optimizes the intestinal microbiota of exacerbated chronic obstructive pulmonary disease in rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 9975407.
- [23] LAI H C, LIN T L, CHEN T W, et al. Gut microbiota modulates COPD pathogenesis: role of anti-inflammatory parabacteroides goldsteinii lipopolysaccharide[J]. *Gut*, 2022, 71(2): 309–321.
- [24] WANG X, YE P, FANG L, et al. Active smoking induces aberrations in digestive tract microbiota of rats [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 737204.
- [25] LI N, YI X, CHEN C, et al. The gut microbiome as a potential source of non-invasive biomarkers of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1173614.
- [26] YE J, LI Y, WANG X, et al. Positive interactions among *Corynebacterium glutamicum* and keystone bacteria producing SCFAs benefited T2D mice to rebuild gut eubiosis[J]. *Food Res Int*, 2023, 172: 113163.
- [27] RAMSHEH M Y, HALDAR K, ESTEVE-CODINA A, et al. Lung microbiome composition and bronchial epithelial gene expression in patients with COPD versus healthy individuals: a bacterial 16S rRNA gene sequencing and host transcriptomic analysis [J]. *Lancet Microbe*, 2021, 2(7): e300–e310.
- [28] WANG Y, LI N, LI Q, et al. Xuanbai chengqi decoction ameliorates pulmonary inflammation via reshaping gut microbiota and rectifying Th17/Treg imbalance in a murine model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16: 3317–3335.

(收稿日期: 2024-10-23)

(本文编辑: 黄明愉)