

蛤蚧定喘胶囊通过重塑肠道菌群-修复肠道屏障-抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路改善 COPD 小鼠气道炎症

韦水林¹, 吴梦静¹, 黄俊力¹, 谢熹翔¹, 陆浩², 邹洵^{2*}, 陈春霞^{1*}

1. 广西医学科学院·广西壮族自治区人民医院 药学部, 广西 南宁 530021

2. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541199

摘要: 目的 探讨蛤蚧定喘胶囊(GJDC)通过调节“肠-肺”轴改善慢性阻塞性肺疾病(COPD)小鼠气道炎症的作用机制,验证其通过重塑肠道菌群-修复肠道屏障-抑制 Toll 样受体 4 (TLR4)/核因子(NF)- κ B 信号通路的跨器官调控机制。方法 72 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组:对照组、模型组、地塞米松(Dex, 阳性药, 0.2 mg·kg⁻¹)组和 GJDC 高、中、低剂量(0.625、0.313、0.156 g·kg⁻¹)组,除对照组外,采用脂多糖(LPS)气管内滴注联合被动吸烟法建立 COPD 小鼠模型,造模结束后连续 ig 给药 30 d。通过 16S rRNA 测序分析肠道菌群,肺组织苏木精-伊红(HE)染色、结肠阿利新蓝(AB)-H5IO6 雪夫(PAS)染色观察组织病理学变化,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清炎症因子 LPS、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 水平, qRT-PCR 检测肠道屏障基因黏蛋白 2 (*Muc2*)、闭合小带(*ZO*)-1、紧密连接蛋白 4 (*Claudin4*)、肺组织炎症因子(*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-8*)及 TLR4/NF- κ B 信号通路基因(*TLR4*、*MyD88*、*TRAF6*)的 mRNA 表达。结果 与对照组比较,模型组小鼠表现出显著肺组织炎症损伤(肺泡间隔增宽、炎细胞浸润)、肠道菌群多样性下降($P<0.05$)及肠屏障破坏(结肠杯状细胞减少, *Muc2*、*ZO*-1 和 *Claudin4* 的 mRNA 表达显著性下调, $P<0.05$ 、0.01),伴随血清 LPS 和促炎因子 TNF- α 水平升高($P<0.05$ 、0.01),肺组织中促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 以及 TLR4/NF- κ B 信号通路关键基因 *TLR4*、*TRAF6* 的 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$);厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度显著升高,而拟杆菌门(Bacteroidota)的相对丰度显著降低($P<0.05$);毛螺菌科未分类属(*norank f. Lachnospiraceae*)和阿克曼菌属(*Akkermansia*)的相对丰度显著降低($P<0.05$),而拟杆菌属(*Bacteroides*)的相对丰度显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,GJDC 干预后,中剂量组(0.313 g·kg⁻¹)效果最优,可显著恢复肠道菌群多样性及结构($P<0.05$),增加拟杆菌门、产短链脂肪酸的毛螺菌科未分类属和黏液屏障调控阿克曼菌属的相对丰度($P<0.05$ 、0.01);修复肠道屏障功能(杯状细胞数量回升、*Muc2*、*ZO*-1、*Claudin4* 表达上调),进而降低血清 LPS 及炎症因子水平($P<0.05$ 、0.01、0.001),并显著抑制肺组织炎症、TLR4/NF- κ B 信号通路基因表达($P<0.05$ 、0.01、0.001)。结论 GJDC 通过重塑肠道菌群→修复肠道屏障→降低血清 LPS→抑制肺 TLR4/NF- κ B 信号通路的跨器官机制改善 COPD 炎症。

关键词: 蛤蚧定喘胶囊;慢性阻塞性肺疾病;肠-肺轴;肠道菌群;TLR4/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)12-3494-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.008

Gejie Dingchuan Capsules ameliorate airway inflammation in COPD mice by reshaping gut microbiota, repairing intestinal barrier, and inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway

WEI Shuilin¹, WU Mengjing¹, HUANG Junli¹, XIE Xixiang¹, LU Hao², ZOU Xun², CHEN Chunxia¹

1. Department of Pharmacy, Guangxi Academy of Medical Sciences and the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

2. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541199, China

Abstract: Objective To explore the mechanism by which Gejie Dingchuan Capsule (GJDC) alleviates airway inflammation in mice

收稿日期: 2025-07-25

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA23023035-4);桂林市重点研发计划资助项目(市科 2023010302-1)

作者简介: 韦水林, 主管药师, 研究方向为环境毒理学。E-mail: 602999370@qq.com

*通信作者: 邹洵, 硕士, 研究方向为中药新药研发。E-mail: xunzou@hotmail.com

陈春霞, 博士, 研究员, 研究方向为神经退行性病变等慢性心脑血管疾病的药物研发。E-mail: chunxia251401@126.com

with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) through the regulation of the 'gut-lung axis.' The focus is on validating its cross-organ regulatory mechanism, which involves reshaping the gut microbiota, repairing the intestinal barrier, and inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway. **Methods** 72 SPF male C57BL/6 mice were randomly divided into 6 groups: control group, model group, dexamethasone (Dex, 0.2 mg·kg⁻¹) group, and GJDC high, medium and low dose (0.625, 0.313, 0.156 g·kg⁻¹) groups. Except for the control group, COPD mouse models were established by intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) combined with passive smoking. After modeling, the mice were continuously administered ig for 30 d. The intestinal flora was analyzed by 16S rRNA sequencing. The histopathological changes of lung tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and colon Alcian blue (AB)-periodic acid-Schiff (PAS) staining. The levels of serum inflammatory factors LPS, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of intestinal barrier genes mucin 2 (*Muc2*), zonula occludens (*ZO-1*), tight junction protein 4 (*Claudin4*), inflammatory factors in lung tissue (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-8*), and TLR4/NF- κ B signaling pathway genes (*TLR4*, *MyD88*, *TRAF6*) was detected by qRT-PCR. **Results** Compared with the control group, the model group showed significant lung tissue inflammatory injury (alveolar septal widening, inflammatory cell infiltration), decreased intestinal flora diversity ($P < 0.05$), and intestinal barrier damage (reduced colonic goblet cells, significant down-regulation of *Muc2*, *ZO-1* and *Claudin4* mRNA expression, $P < 0.05$, 0.01), accompanied by increased serum LPS and pro-inflammatory factor TNF- α levels ($P < 0.05$, 0.01), and significantly increased mRNA expression levels of pro-inflammatory factors *TNF- α* , *IL-1 β* and TLR4/NF- κ B signaling pathway key genes *TLR4* and *TRAF6* in lung tissue ($P < 0.05$); The relative abundance of Firmicutes significantly increased, while the relative abundance of *Bacteroidota* significantly decreased ($P < 0.05$); The relative abundance of unclassified genus *norank_f_Lachnospiraceae* and *Akkermansia* significantly decreased ($P < 0.05$), while the relative abundance of *Bacteroides* significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the medium-dose group (0.313 g·kg⁻¹) of GJDC intervention had the best effect, which could significantly restore intestinal flora diversity and structure ($P < 0.05$), increase the relative abundance of *Bacteroidota*, unclassified genus *norank_f_Lachnospiraceae* producing short-chain fatty acids, and *Akkermansia* regulating the mucus barrier ($P < 0.05$, 0.01); Repair intestinal barrier function (increase in goblet cell number, up-regulation of *Muc2*, *ZO-1*, and *Claudin4* expression), thereby reducing serum LPS and inflammatory factor levels ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), and significantly inhibit lung tissue inflammation and TLR4/NF- κ B signaling pathway gene expression ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). **Conclusion** GJDC improves COPD inflammation through a cross-organ mechanism of reshaping intestinal flora $\rightarrow$ repairing intestinal barrier $\rightarrow$ reducing serum LPS $\rightarrow$ inhibiting the lung TLR4/NF- κ B signaling pathway.

Key words: Gejie Dingchuan Capsule; chronic obstructive pulmonary disease; gut-lung axis; gut microbiota; TLR4/NF- κ B signaling pathway

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一种以持续性气道炎症、肺组织损伤和气道结构重塑为主要特征的异质性呼吸系统疾病, 其进行性气道阻塞特征导致 3.84 亿患者遭受呼吸功能不可逆损害^[1-4]。尽管 GOLD 指南推荐长效 β_2 受体激动剂/糖皮质激素作为一线治疗方案, 但临床研究显示约 40% 患者存在糖皮质激素抵抗, 且长期用药可诱发肺炎、骨质疏松等严重并发症^[5-8]。这一现状凸显了从系统生物学角度探索 COPD 新型干预策略的紧迫性^[9]。

近年来, “肠-肺轴” 理论的兴起为 COPD 的防治提供了全新视角。该理论揭示了肠道微生物群与肺部之间通过代谢产物、免疫细胞和神经内分泌途径构成的复杂双向通讯网络^[10-11]。具体而言, 肠道共生菌代谢产生的短链脂肪酸 (SCFAs) 等有益代谢物可进入循环系统, 通过作用于肺部免疫细胞 (巨噬细胞、调节性 T 细胞等) 表面的受体 (如 GPR41/43), 抑制过度炎症反应 [下调核因子 κ B

(NF- κ B) 通路活性等], 从而减轻气道炎症和组织损伤^[12-14]。反之, 肺部持续的炎症状态 [高水平的促炎因子肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-1 β 等] 和全身性应激反应也会破坏肠道屏障完整性, 改变肠道菌群组成 (降低多样性、减少有益菌等), 形成 “肺部炎症 $\rightarrow$ 肠道屏障损伤与菌群失调 $\rightarrow$ 内毒素易位及 SCFAs 减少 $\rightarrow$ 全身炎症加剧 $\rightarrow$ 肺部炎症恶化” 的恶性循环^[15-16]。动物研究已证实, 通过益生菌干预或粪便微生物群移植 (FMT) 改善肠道菌群可显著减轻 COPD 模型动物的肺部炎症和病理改变, 凸显了靶向肠-肺轴治疗 COPD 的潜力^[17-19]。然而, 目前针对肠-肺轴的药物干预研究多集中于单一菌株或成分, 而多组分、多靶点的中药复方如何通过该轴调控 COPD 机制尚未明确。

蛤蚧定喘胶囊 (GJDC) 是临床广泛应用的经典中药复方, 由蛤蚧、麻黄、石膏、苦杏仁等 14 味中药组成。该药物具有滋阴清肺、止咳平喘的功效。

前期研究表明, GJDC 中的主要成分可通过抑制炎症因子 (TNF- α 、IL-6 等) 的释放以及调节氧化应激平衡等直接途径缓解气道炎症^[20-22]。基于日益受到重视的“肠-肺轴”理论, 推测 GJDC 作为复方中药, 其多组分、多靶点的系统性治疗作用, 可能部分源于对肠道微生态稳态及肠-肺双向通讯网络的整体调节。然而, 该复方如何通过调节肠道菌群结构与功能、修复肠道屏障完整性, 进而调控肺部炎症信号通路以改善 COPD 尚未被深入阐明。揭示该复方通过“肠-肺轴”调控 COPD 的机制, 是衔接其传统功效与现代药理学机制的关键环节。

本研究以气管内滴注脂多糖 (LPS) 联合被动烟雾暴露诱导的 COPD 小鼠模型为研究对象, 综合运用多种技术手段, 包括 16S rRNA 基因测序 (用于分析肠道菌群)、组织病理学 (用于评估肺和结肠损伤)、酶联免疫吸附试验 (ELISA, 用于检测血清炎症因子及 LPS) 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR, 用于检测炎症及屏障相关基因表达), 旨在系统阐明 GJDC 通过调控“肠道菌群结构-肠道屏障功能-Toll 样受体 4 (TLR4)/NF- κ B 信号通路”改善 COPD 模型小鼠肺部炎症的跨器官机制, 为深入理解该复方药的科学内涵及中医药防治 COPD 提供新的理论参考和潜在干预靶点。

1 材料

1.1 实验动物

72 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 (6~8 周龄, 体重 18~22 g) 购自广西医科大学实验动物中心, 生产许可证号 SCXK (桂) 2020-0003。正式实验前, 小鼠在 SPF 级屏障环境中适应性饲养 1 周, 饲养环境温度保持在 18~24 °C, 相对湿度维持在 50%~70%, 光照为 12 h 明暗周期, 自由饮水, 摄食标准啮齿类动物饲料。本研究经广西医科大学实验动物伦理委员会审查批准 (批准号 202410005), 所有操作遵循实验动物福利伦理审查指南 (GB/T 35892-2018)。

1.2 主要试剂

GJDC (桂林三金药业股份有限公司, 批号 240402, 规格: 每粒 0.5 g); 脂多糖 (LPS, Sigma-Aldrich, USA; 批号 0000367387; 规格 1 mg); 地塞米松片 (Dex, 天津力生制药有限公司, 批号 16444813, 规格: 每片 0.75 mg); LPS、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 ELISA 试剂盒 (上海科兴商贸有限公司); qRT-PCR 检测相关基因 (包括内参基因 β -actin、炎症因子、紧密连接蛋白及 TLR4/NF- κ B 信号通路基

因) 引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计合成; RNAiso Plus 试剂、PrimeScript RT 试剂盒 (TaKaRa 公司); SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems 公司); E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)。

1.3 主要仪器

Synergy H1 多功能微孔板监测仪 (美国 BioTek Instruments); Thermo Nano Drop 2000 超微量核酸测定仪 (Thermo Scientific); Veriti™ Dx 96 well PCR 扩增仪 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.); QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.)。

2 方法

2.1 动物分组、造模和给药

选用 72 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 适应性饲养 1 周后随机分为 6 组 (每组 12 只): 对照组、模型组、Dex (0.2 mg·kg⁻¹) 组及 GJDC 高、中、低剂量 (0.625、0.313、0.156 g·kg⁻¹) 组。根据 GJDC 成人日剂量 (3 g/60 kg $\approx$ 0.05 g·kg⁻¹), 按《中药药理研究方法学》换算得小鼠等效剂量为 0.616 g·kg⁻¹。本研究选择 0.156~0.625 g·kg⁻¹ 的剂量范围, 覆盖等效剂量并探索量效关系。

除对照组外, 其余各组均构建 COPD 模型。COPD 造模采用 LPS 气管滴注联合烟熏法: 第 1 天及第 14 天经气管滴注 200 μ g LPS, 第 2~30 天 (第 14 天除外) 每天置于烟熏箱中, 混合点燃硫磺 0.1 g+烟叶 1 g, 每天 2 次 (上、下午各 1 次), 每次持续 1 h, 每周休息 1 d。造模结束后, 各给药组 ig 相应剂量药物, 对照组与模型组 ig 等体积 0.9%氯化钠溶液, 每天 1 次, 持续 30 d。末次给药后禁食 8 h, 摘眼球取血, 血液样本 4 °C、4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后分离血清。收集盲肠内容物、肺组织及近端结肠, 部分固定于 4% 多聚甲醛用于病理检查 [肺组织苏木精-伊红 (HE) 染色、结肠阿利新蓝 (AB)-H5IO6 雪夫 (PAS) 染色], 其余组织于-80 °C 保存。

2.2 血清炎症因子检测

按照 ELISA 试剂盒操作指南, 对血清中 LPS、TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的含量进行定量检测分析。

2.3 组织病理学检测

固定的肺组织经石蜡包埋后, 切片厚度为 3~4 μ m, 随后进行 HE 染色。对于近端结肠样本, 制备 6 μ m 切片, 并运用 AB-PAS 染色以特异性标记

杯状细胞并对杯状细胞定量计数。组织病理学切片制备与染色由武汉赛维尔生物科技有限公司完成。

2.4 qRT-PCR 检测

使用 RNAiso Plus 试剂分别从肺组织和结肠组织中提取总 RNA。经过纯化后,采用 Nanodrop 分光光度计对 RNA 样品进行定量分析。随后,取 1 μg

RNA 样本,利用 PrimeScript RT 试剂盒进行反转录反应,合成 cDNA。最后,使用 SYBR Green Master Mix 进行 qRT-PCR 分析。本研究选用 β -actin 作为内参基因,qPCR 程序设置为 40 个循环,具体参数如下:95 ℃变性 20 s,95 ℃退火 30 s,60 ℃延伸 30 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因 mRNA 的相对表达量。实验所用特异性引物信息详见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequences

基因名称	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
β -actin	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC
黏蛋白 2 (Muc2)	GAAGCCAGATCCCGAAACCA	GAATCGGTAGACATCGCCGT
闭合小带 (ZO)-1	CTGGGCAAGGGATAGGAGTG	CCATCTCTTGCTGCCAAACTATC
紧密连接蛋白-4 (Claudin-4)	AAAGCACCGGGCAGATACAG	GGGGGTCAAGGGGTCATAGA
TNF- α	CCCTCACACTCACAACCACC	CTTTGAGATCCATGCCGTTG
IL-8	TAGGCATCTTCGTCCGTCC	GCCAACAGTAGCCTTCACCC
IL-1 β	AGGCTCCGAGATGAACAACAAA	GTGCCGTCTTTCATTACACAGGA
TLR4	AGTCCCTGATGACATTCCTTCTTC	TGTCAGTATCAAGTTTGAGAGGTGG
髓分化因子 88 (MyD88)	TGACCCCACTCGCAGTTTGT	TTTGTTTGTGGGACACTGCTTTC
TNF 受体关联因子 6 (TRAF6)	GCTTTGCGTCCGTGCGAT	GTCCGAATGGTCCGTTTGAG

2.5 肠道菌群 16S rRNA 测序

按照 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 说明书提取微生物群落总 DNA,采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,并利用 NanoDrop 2000 测定 DNA 浓度和纯度。使用引物对 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAG CAG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),借助 ABI GeneAmp® 9700 PCR 热循环仪对细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 高变区进行扩增。PCR 反应体系为:4 μL 5×Fast Pfu 缓冲液、2 μL 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs、0.8 μL 引物、0.4 μL Fast Pfu 聚合酶、10 ng 模板 DNA,ddH₂O 补足至 20 μL。扩增条件:95 ℃预变性 3 min,接着 27 个循环(95 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 45 s),最后 72 ℃延伸 10 min。肠道微生物群生物信息学(菌群多样性、组成)分析通过美吉云平台(<https://cloud.majorbio.com>)完成。

2.6 统计学分析

数据采用多因素方差分析,组间比较使用 Graph-Pad Prism 8.0 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 GJDC 对 COPD 小鼠肺组织大体形态的影响

如图 1 所示,对照组小鼠的肺组织形态正常,边缘清晰,表面光滑,双肺体呈均匀细腻的淡粉色,无肉眼可见病变。模型组肺组织体积显著增大,边缘模糊,表面粗糙不平整,双肺可见弥漫分布的半透明斑点状病灶,提示肺气肿样改变。各给药组肺组织大体病变均有不同程度减轻。Dex 组和 GJDC 高剂量组肺组织体积仍略有增大,表面较平整,可见少量半透明斑点状病灶。GJDC 中、低剂量组肺组织体积与轮廓接近对照组,表面较光滑,仅见极

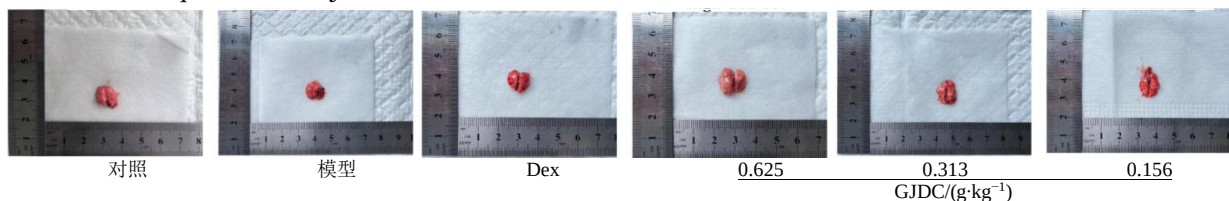


图 1 GJDC 对 COPD 模型小鼠肺组织大体形态的影响

Fig. 1 Effect of GJDC on gross morphology of lung tissue in COPD model mice

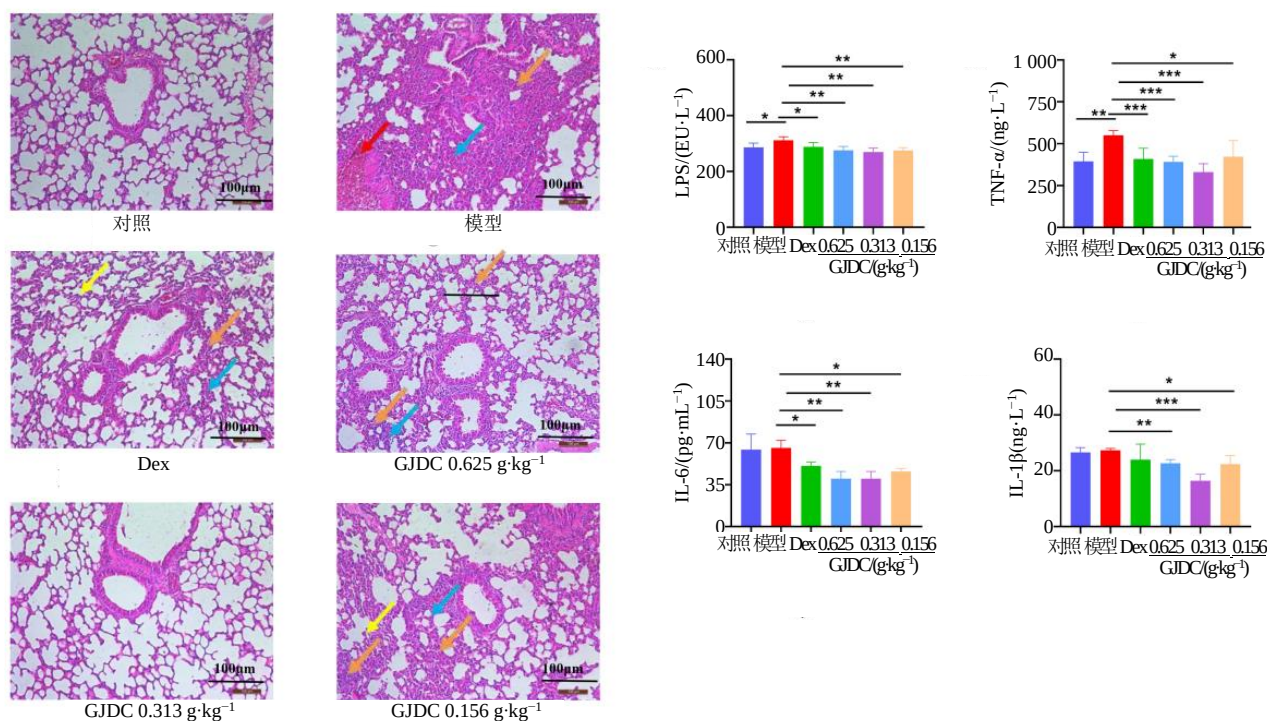
少量散在的半透明斑点状病灶。

3.2 GJDC 对 COPD 小鼠肺组织病理学和血清炎症因子水平的影响

HE 染色结果 (图 2) 显示, 对照组小鼠肺组织结构正常, 细支气管上皮完整, 肺泡形态规则, 间质未见明显炎症细胞浸润或结构异常。模型组呈现典型的 COPD 病理特征: 细支气管黏膜上皮细胞排列紊乱、不规则, 肺泡壁可见大量炎症细胞浸润, 部分大肺泡壁明显增厚、间隔增宽, 间质血管充血。与模型组相比, 各给药组肺组织病理损伤均得到不同程度改善。Dex 组肺泡壁仍可见炎症细胞浸润, 部分小肺泡壁轻度增厚、间隔增宽, 并存在小范围肺泡狭窄。GJDC 高剂量组细支气管结构基本正常,

肺泡壁仅见极少量炎症细胞浸润, 偶见局灶性肺泡壁轻度增厚、间隔增宽。GJDC 中剂量组肺组织病理改善最为显著, 细支气管及肺泡结构基本接近对照组, 未见明显炎症细胞浸润或肺泡结构破坏。GJDC 低剂量组细支气管结构正常, 肺泡壁可见少量炎症细胞浸润, 部分小肺泡壁中度增厚、间隔增宽, 伴有小范围肺泡狭窄。

ELISA 检测结果 (图 2) 显示, 模型组小鼠血清 LPS 和 TNF- α 水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$ 、 0.01)。经药物治疗后, 与模型组相比, 各给药组血清 LPS、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。其中, GJDC 中剂量组对上述炎症因子水平的降低幅度最为显著。



蓝色箭头表示粒细胞浸润, 橙色箭头表示肺泡间隔增宽, 红色箭头表示间质血管瘀血, 黄色箭头表示肺泡狭窄; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

The blue arrow indicates granulocyte infiltration, the orange arrow indicates widened alveolar septa, the red arrow indicates interstitial vascular congestion, and the yellow arrow indicates alveolar narrowing; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

图 2 GJDC 对 COPD 模型小鼠肺组织病理损伤 ($\times 100$) 及血清炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 2 Effect of GJDC on pathological damage in lung tissue ($\times 100$) and serum inflammatory factor levels in COPD model mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

3.3 GJDC 对 COPD 小鼠肠道菌群多样性的影响

如图 3 所示, 基于 16S rRNA 基因测序的肠道菌群分析结果显示: 与对照组相比, 模型组小鼠肠道菌群的 α 多样性显著降低, 表现为 Sobs 指数、Chao 指数和 Shannon 指数均显著下降 ($P < 0.05$); 与

模型组相比, 各给药组的 α 多样性指标均呈升高趋势。其中, GJDC 中剂量组显著高于模型组 ($P < 0.05$), 其 Sobs 指数、Chao 指数、Shannon 指数以及 ACE 指数均恢复至接近对照组水平, 表明该组对肠道菌群物种丰富度和多样性的恢复效果最佳。

Venn 图分析结果显示,对照组观测到 672 个操作分类单元 (OUT), 而模型组的 OUT 数量下降至 657 个。与模型组相比, 各给药组的 OTU 数量均有所增加: Dex 组为 664 个, GJDC 高剂量组为 703

个, GJDC 中剂量组 OTU 数量最多, 达到 794 个, GJDC 低剂量组为 677 个。值得注意的是, GJDC 中剂量组包含 103 个特有 OTU, 显著多于其他组别, 表明其可能诱导了独特的菌群结构变化。

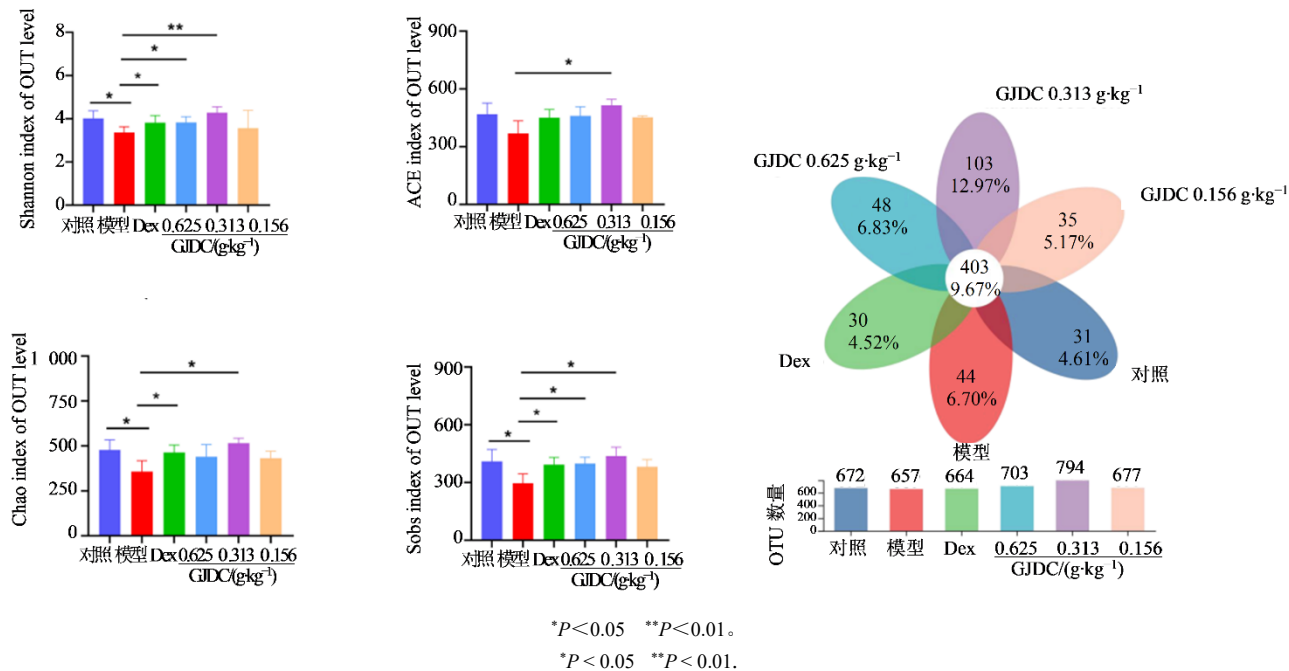


图 3 GJDC 对 COPD 模型小鼠肠道微生物群 α 多样性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 3 The effect of GJDC on the α -diversity of intestinal microbiota in COPD model mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

如图 4 所示, 基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析 (PCoA) 结果显示, 对照组与模型组样本在坐标空间中呈现显著分离 ($P<0.01$), 表明 COPD 模型成功诱导了肠道菌群群落结构 (β 多样性) 的显著紊乱。各给药组的 β 多样性与模型组相比均有显著性差异 ($P<0.01$), 表明各给药组干预可有效逆转菌群结构紊乱。

与对照组相比, 模型组的肠道菌群失调指数 (MDI) 显著高于对照组 ($P<0.01$); 与模型组相比, 各给药组的 MDI 均呈现下降趋势, 除 GJDC 低剂量组外其余各给药组 MDI 指数均显著性下降 ($P<0.05$ 、 0.01)。这一结果进一步证实了药物治疗能够有效改善 COPD 模型诱导的肠道菌群失调状态。

3.4 GJDC 对 COPD 小鼠肠道菌群物种组成的影响

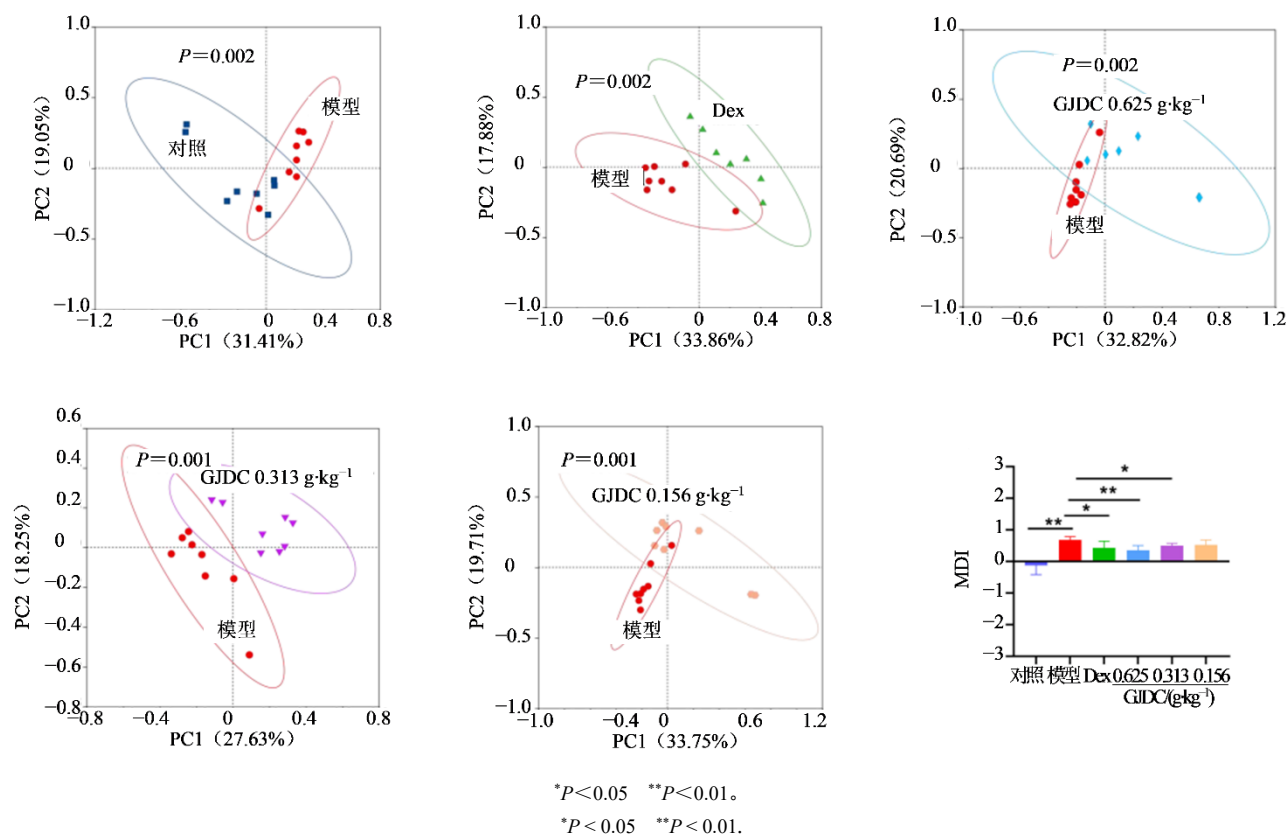
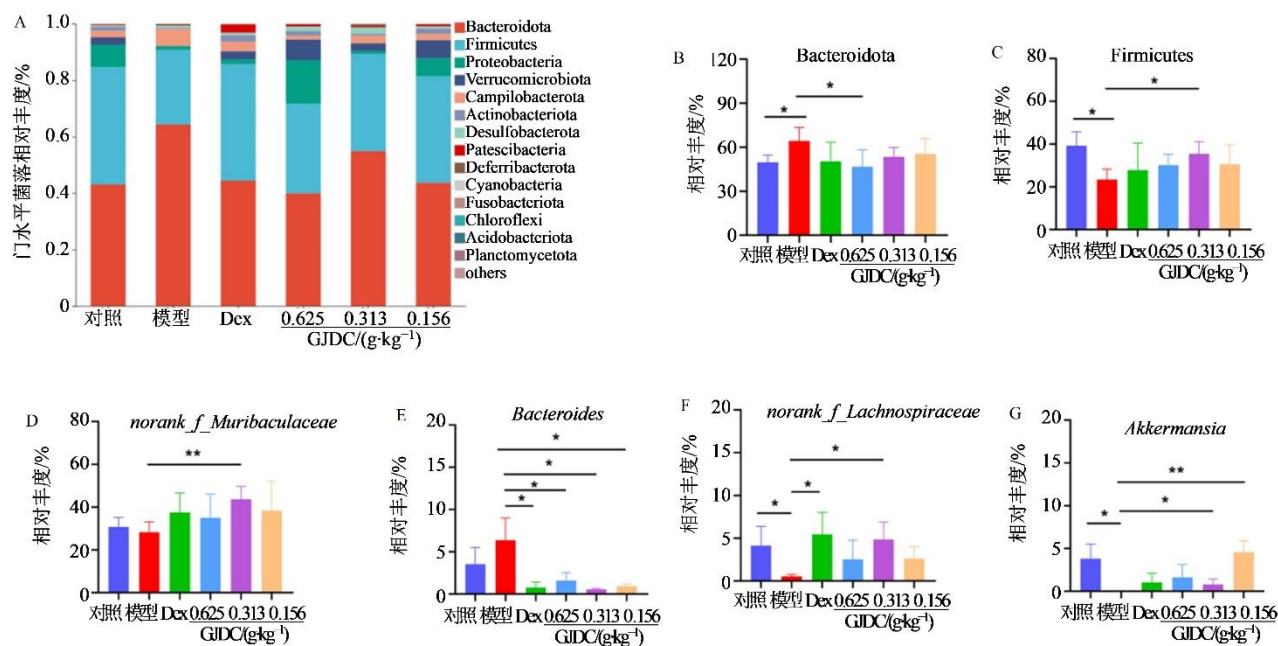
在门水平上 (图 5-A), 肠道微生物群主要由拟杆菌门 (Bacteroidota) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 组成。与对照组相比, 模型组中厚壁菌门的相对丰度显著升高, 而拟杆菌门的相对丰度显著降低 (图 5-B、C, $P<0.05$)。各给药组均显示出逆转这一趋势的作用: 厚壁菌门的丰度较模型组下降, 拟杆菌门

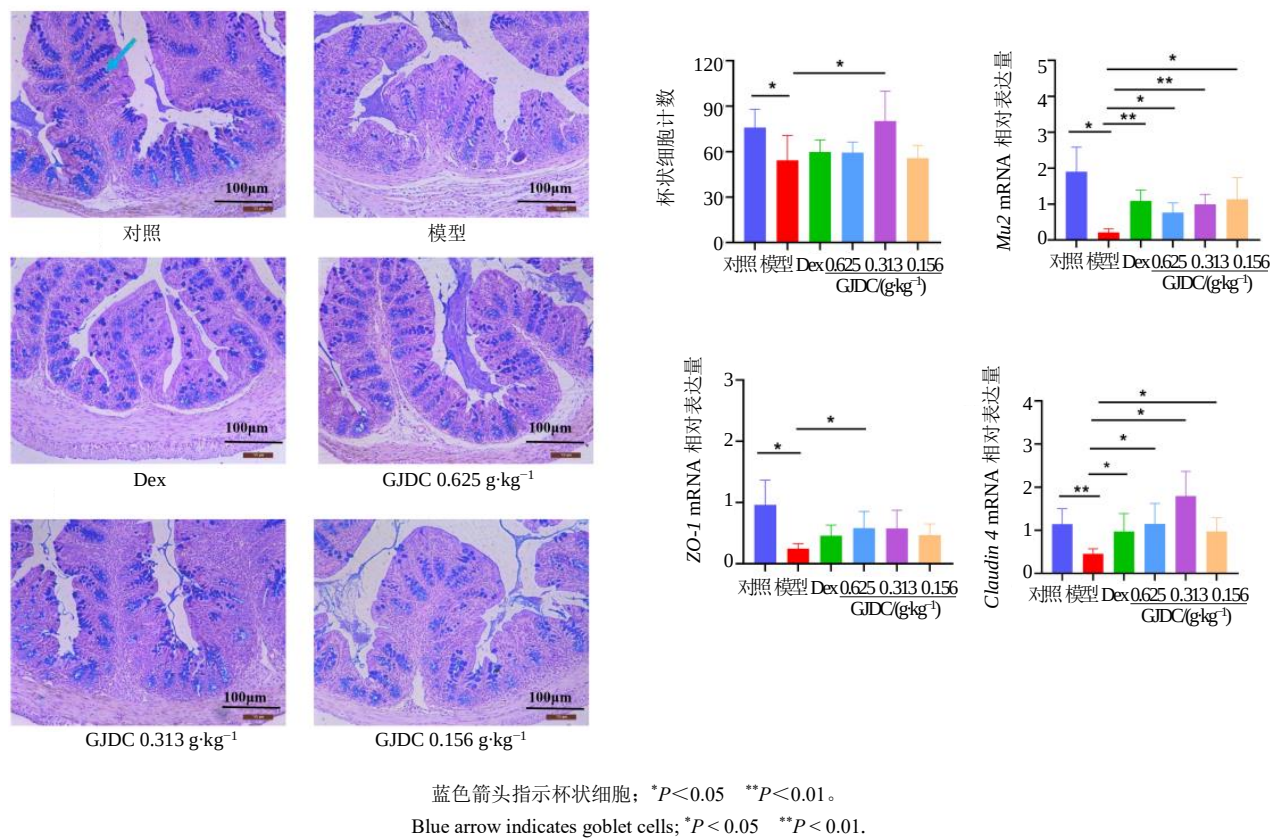
的丰度上升。其中, GJDC 高剂量组的厚壁菌门丰度显著低于模型组 ($P<0.05$), GJDC 中剂量组拟杆菌门丰度显著高于模型组 ($P<0.05$)。

在属水平上 (图 5-D-G), 与对照组相比, 模型组中毛螺菌科未分类属 (*norank_f_Lachnospiraceae*) 和阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 的相对丰度显著降低 ($P<0.05$), 而拟杆菌属 (*Bacteroides*) 的相对丰度显著升高 ($P<0.05$)。药物治疗后, 与模型组相比, 各给药组拟杆菌属的相对丰度均显著降低 ($P<0.05$)。其中, GJDC 中剂量组的菌群结构改善最为显著, 其毛螺菌科未分类属 (*norank_f_Lachnospiraceae*)、*Akkermansia* 以及 *norank_f_Muribaculaceae* 属的相对丰度均显著高于模型组 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.5 GJDC 对 COPD 小鼠结肠组织病理及肠道屏障相关基因表达的影响

AB-PAS 染色结果显示 (图 6), 对照组小鼠的结肠黏膜结构完整, 隐窝形态规则, 杯状细胞分布均匀且数量丰富; 相比之下, 模型组的结肠黏膜呈现损伤特征, 杯状细胞数量显著减少 ($P<0.05$),

图 4 GJDC 对 COPD 模型小鼠肠道微生物群 β 多样性及菌群失调的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Fig. 4 Effects of GJDC on β -diversity and dysbiosis of intestinal microbiota in COPD model mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)A-门水平群落结构; B、C-拟杆菌门 (Bacteroidota)、厚壁菌门 (Firmicutes) 相对丰度; D、G-关键菌属: *norank_f_Muribaculaceae*、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、毛螺菌科未分类属 (*norank_f_Lachnospiraceae*)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 相对丰度; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。A-Community structure at the phylum level; B and C-Relative abundance of *Bacteroidota* and *Firmicutes*; D and G-Relative abundance of key genera: *norank_f_Muribaculaceae*, *Bacteroides*, *norank_f_Lachnospiraceae*, and *Akkermansia*; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。图 5 GJDC 对 COPD 模型小鼠肠道微生物群物种组成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Fig. 5 Effect of GJDC on species composition of intestinal microbiota in COPD model mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

图 6 GJDC 对 COPD 模型小鼠结肠屏障功能的影响 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)Fig. 6 Effect of GJDC on colonic barrier function in COPD model mice ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

紧密连接蛋白相关基因 *Muc2*、*ZO-1* 和 *Claudin4* 的 mRNA 表达显著性下调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组相比, 各给药组的杯状细胞数量增加, 且不同程度地上调了紧密连接蛋白相关基因 *Muc2*、*ZO-1* 和 *Claudin4* 的 mRNA 表达, 其中, GJDC 中剂量组的改善效果最为显著: 其杯状细胞计数显著高于模型组 ($P < 0.05$), 并接近对照组水平; 同时, 对 *Muc2* 和 *Claudin4* 基因表达的上调作用亦具有统计学显著性 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.6 GJDC 对 COPD 小鼠肺组织 TLR4/NF- κ B 信号通路及促炎因子表达的影响

为探究 GJDC 对肺部炎症关键信号通路的影响, 采用 qRT-PCR 技术检测肺组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路关键分子及下游促炎因子的 mRNA 表达水平。结果显示 (图 7), 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织中促炎因子 *TNF- α* 、*IL-1 β* 以及 TLR4/NF- κ B 信号通路关键基因 *TLR4*、*TRAF6* 的 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), 表明 COPD 模型成功诱导了肺组织 TLR4/NF- κ B 信号通路的过度激活及其下游炎症反应。与模型组相比, 各给药组上述

基因的表达均呈降低趋势; 其中, GJDC 中剂量对所有这些基因表达的抑制效果最显著 ($P < 0.05$ 、 0.001)。结果提示 GJDC 能有效抑制 COPD 模型小鼠肺组织 TLR4/NF- κ B 信号通路的异常激活。

4 讨论

COPD 发病机制与“肠-肺轴”理论密切相关^[23-25]。本研究发现, LPS 联合烟雾诱导的 COPD 小鼠模型不仅表现出典型的肺部病理改变 (如肺泡间隔增宽、炎细胞浸润), 还伴随肠道菌群紊乱 (α 多样性下降、毛螺菌科未分类属 *norank_f_Lachnospiraceae* 与阿克曼菌属丰度减少) 及肠道屏障损伤 (杯状细胞减少、*Muc2* 与 *ZO-1* 基因表达下调)。这种双重破坏导致血清 LPS 水平显著升高, 进而通过激活肺部 TLR4/MyD88/ TRAF6 信号级联反应, 驱动 NF- κ B 通路过度活化, 促进 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-8* 等促炎因子表达, 形成“肺部炎症 $\rightarrow$ 肠道菌群失调 $\rightarrow$ 内毒素易位 $\rightarrow$ 全身炎症加剧 $\rightarrow$ 肺部损伤恶化”的恶性循环。该结果证实了“肠-肺轴”在 COPD 进展中的核心作用^[26-27]。

GJDC 通过“肠道菌群重塑-屏障修复-炎症抑

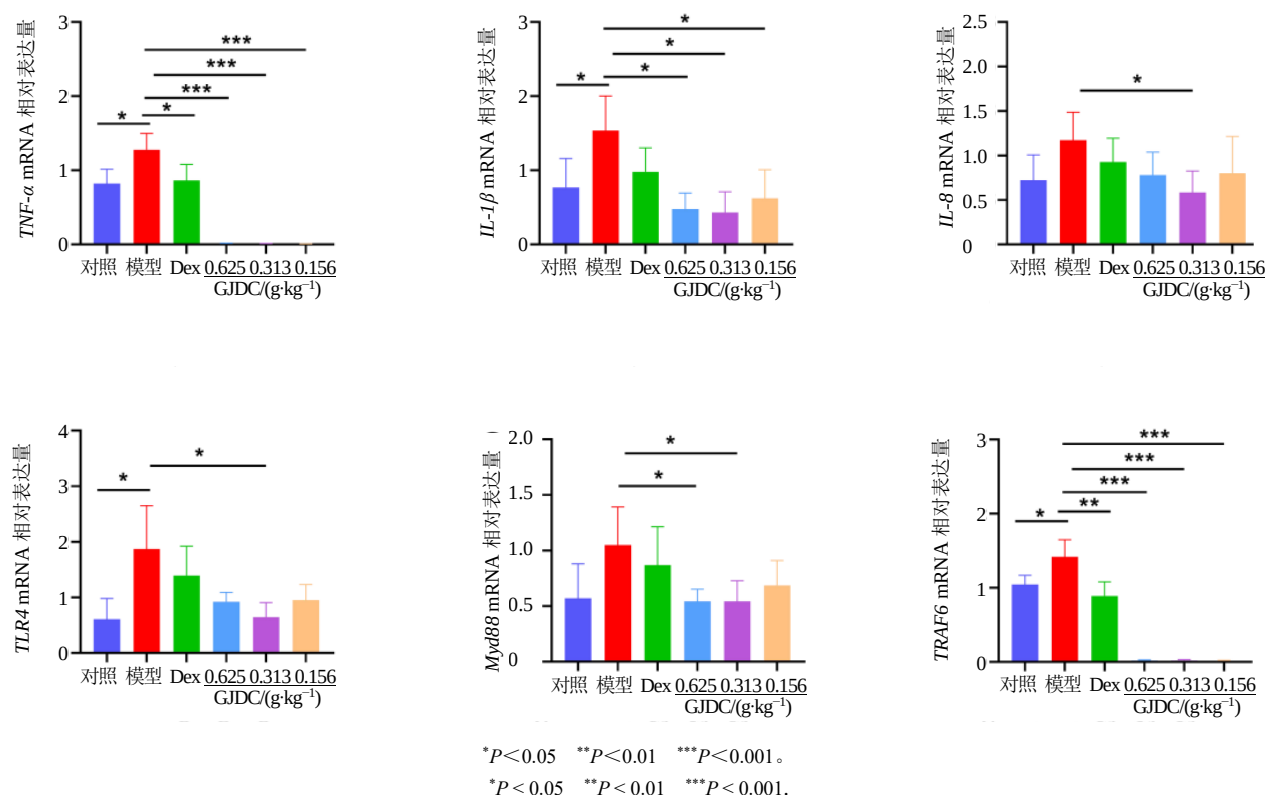


图 7 GJDC 对 COPD 模型小鼠肺组织 TLR4/NF- κ B 信号通路及相关炎症因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 7 Effect of GJDC on TLR4/NF- κ B signaling pathway and expression of related inflammatory factors in lung tissue of COPD model mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

制”三重协同机制打破上述恶性循环,具体表现为:(1)肠道菌群重塑:中剂量 GJDC 显著恢复菌群 α 多样性,并特异性富集 SCFAs 产生菌(毛螺菌科未分类属)及黏液屏障调控菌阿克曼属,为肠道屏障修复提供了生态基础;(2)肠道屏障修复:药物干预显著上调杯状细胞数量及 Muc2/ZO-1/Claudin4 等屏障蛋白基因表达,同时降低血清 LPS 水平;(3)肺部炎症通路抑制:血清 LPS 水平的降低可能通过减少 TLR4 受体激活,进而抑制下游 MyD88/TRAF6 基因表达,进而抑制 NF- κ B 通路活化,使促炎因子 *TNF- α* 、*IL-1 β* mRNA 显著下调。这 3 个环节形成正向调节回路,验证了中药复方多靶点调控的系统性优势^[28-29]。

本研究虽未直接检测 SCFAs 水平,但毛螺菌科未分类属(*norank_f_Lachnospiraceae*)的富集提示丁酸等 SCFAs 产量可能增加。已有研究表明,SCFAs 可通过激活 G 蛋白偶联受体(GPR41/43)或抑制组蛋白去乙酰化酶(HDAC)增强肠道屏障功能、抑制 NF- κ B 通路^[30-31]。此外,阿克曼菌属通过降解黏液层调控宿主免疫应答^[32-33]。GJDC 可能通过促进

这些菌群的生长,间接提升 SCFAs 水平,从而修复屏障、抑制炎症。后续研究将结合代谢组学(如 GC-MS 检测 SCFAs)及粪菌移植实验进一步验证。

本研究揭示了 GJDC 的疗效呈现典型的“倒 U 型”量效关系。中剂量组在菌群多样性恢复、屏障修复及炎症抑制方面均显著优于高、低剂量组。推测此现象源于中药复方多组分的协同作用:蛤蚧可能通过免疫调节促进有益菌定植^[34];麻黄中的生物碱被认为具有抑制 TLR4 信号转导的作用^[35];苦杏仁多糖可能作为益生元促进毛螺菌科未分类属等有益菌的生长^[36];石膏的清热成分可能有助于改善肠道氧化应激环境^[37]。这些多靶点的协同作用在中等剂量下可能达到最佳平衡状态;高剂量可能因药物代谢负担过重或成分间拮抗作用影响疗效,而低剂量则难以充分激活多靶点调控网络。这一发现为复方中药的临床剂量优化提供了重要依据。

本研究存在以下局限性:(1)模型差异:LPS 联合烟雾急性造模与人类 COPD 慢性病程存在差异,未来需结合弹性蛋白酶或长期烟雾暴露模型验证结果;(2)机制证据链:需补充 SCFAs 代谢组学

检测(如丁酸/丙酸含量)及 FMT,以直接验证菌群功能的介导作用;(3)临床转化缺口:需开展随机对照试验,验证 GJDC 在 COPD 患者肠道菌群调节及肺功能改善中的疗效。尽管如此,本研究首次系统揭示了传统复方靶向肠-肺轴治疗 COPD 的分子-微生态机制,从微生物群-屏障-免疫通路角度,为中医“肺与大肠相表里”理论提供了现代药理学阐释的实验依据,同时也为开发基于菌群-屏障调控的 COPD 联合疗法开辟了新方向。

本研究首次阐明 GJDC 通过“肠道菌群重构(增加毛螺菌科未分类属、阿克曼菌属丰度)-屏障功能增强(上调紧密连接蛋白 Muc2/ZO-1 表达)-LPS/TLR4/NF- κ B 信号通路抑制”的跨器官机制改善 COPD 气道炎症。中剂量($0.313\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) GJDC 在恢复菌群多样性、修复肠屏障及抑制肺部炎症信号通路方面效果最为显著。这些发现不仅为 GJDC 的临床应用提供了科学依据,也为开发靶向肠-肺轴的 COPD 治疗策略提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang Y, Han R Y, Ding X, et al. Chronic obstructive pulmonary disease across three decades: Trends, inequalities, and projections from the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2025, 12: 1564878.
- [2] Hogg J C, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(26): 2645-2653.
- [3] Adeloye D, Chua S, Lee C, et al. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis [J]. *J Glob Health*, 2015, 5(2): 020415.
- [4] Adeloye D, Song P G, Zhu Y J, et al. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: A systematic review and modelling analysis [J]. *Lancet Respir Med*, 2022, 10(5): 447-458.
- [5] Lugogo N, Chipps B E, Panettieri R A Jr, et al. Long-term use of maintenance systemic corticosteroids is associated with multiple adverse conditions in a large, real-world cohort of US adults with severe asthma [J]. *J Asthma Allergy*, 2022, 15: 1753-1761.
- [6] Singh S, Amin A V, Loke Y K. Long-term use of inhaled corticosteroids and the risk of pneumonia in chronic obstructive pulmonary disease: a Meta-analysis [J]. *Arch Intern Med*, 2009, 69(3): 219-229.
- [7] Janson C, Larsson K, Lisspers K H, et al. Pneumonia and pneumonia related mortality in patients with COPD treated with fixed combinations of inhaled corticosteroid and long acting β_2 agonist: Observational matched cohort study (PATHOS) [J]. *BMJ*, 2013, 346: f3306.
- [8] Tashkin D P, Miravittles M, Celli B R, et al. Concomitant inhaled corticosteroid use and the risk of pneumonia in COPD: a matched-subgroup post hoc analysis of the UPLIFT[®] trial [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 196.
- [9] Gomez-Cabrero D, Lluch-Ariet M, Tegnér J, et al. Synergy-COPD: A systems approach for understanding and managing chronic diseases [J]. *J Transl Med*, 2014, 12(Suppl 2): S2.
- [10] Du Y K, Wang S, Zhou T, et al. Causal effects of gut microbiota and metabolites on chronic obstructive pulmonary disease: A bidirectional two sample mendelian randomization study [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2024, 19: 2153-2167.
- [11] Song X, Dou X, Chang J, et al. The role and mechanism of gut-lung axis mediated bidirectional communication in the occurrence and development of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2414805.
- [12] Verma A, Bhagchandani T, Rai A, et al. Short-Chain Fatty Acid (SCFA) as a connecting link between microbiota and gut-lung axis-a potential therapeutic intervention to improve lung health [J]. *ACS Omega*, 2024, 9(13): 14648-14671.
- [13] Huang M T, Chiu C J, Tsai C Y, et al. Short-chain fatty acids ameliorate allergic airway inflammation via sequential induction of PMN-MDSCs and Treg cells [J]. *J Allergy Clin Immunol Glob*, 2023, 2(4): 100163.
- [14] Trompette A, Gollwitzer E, Pattaroni C, et al. Dietary fiber confers protection against flu by shaping Ly6c⁻ patrolling monocyte hematopoiesis and CD8⁺ T cell metabolism [J]. *Immunity*, 2022, 48: 992-1005.e8.
- [15] Lv S H, Zhao X D, Ma C, et al. Advancements in the study of acute lung injury resulting from intestinal ischemia/reperfusion [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2024, 11: 1399744.
- [16] Rastogi S, Mohanty S, Sharma S, et al. Possible role of gut microbes and host's immune response in gut-lung homeostasis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 954339.
- [17] Su Z Y, Ma C X, Ru X S, et al. Effects of probiotic treatment on patients and animals with chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and Meta-analysis of randomized control trials [J]. *Front Cell Infect*

- Microbiol, 2024, 14: 1411222.
- [18] Budden K, Shukla S, Bowerman K, et al. Faecal microbial transfer and complex carbohydrates mediate protection against COPD [J]. Gut, 2017, 73: 751-769.
- [19] Shen H T, Fang Y T, Tsai W H, et al. A Lactobacillus combination ameliorates lung inflammation in an elastase/LPS: Induced mouse model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2025, 17(5): 3416-3428.
- [20] Xue B B, Zhao Q Y, Chen D, et al. Network pharmacology combined with molecular docking and experimental verification reveals the bioactive components and potential targets of Danlong Dingchuan Decoction against asthma [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 7895271.
- [21] Liang S S, Meng X Q, Wang Z B, et al. Polysaccharide from *Ephedra sinica* Stapf inhibits inflammation expression by regulating Factor- β 1/Smad2 signaling [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 106: 947-954.
- [22] Shi Y Z, Ling L, Ning Z, et al. Systematic pharmacological strategies to explore the regulatory mechanism of Ma Xing Shi Gan Decoction on COVID-19 [J]. Dig Chin Med, 2020, 3(2): 96-115.
- [23] Wang L, Cai Y, Garssen J, et al. The bidirectional gut-lung axis in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2023, 207(9): 1145-1160.
- [24] Song W, Yue Y Y, Zhang Q. Imbalance of gut microbiota is involved in the development of chronic obstructive pulmonary disease: A review [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 165: 115150.
- [25] Li N, Dai Z, Wang Z, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 274.
- [26] Cheng Z X, Zhang J. Exploring the role of gut-lung interactions in COPD pathogenesis: A comprehensive review on microbiota characteristics and inflammation modulation [J]. Chronic Obstr Pulm Dis, 2024, 11(3): 311-325.
- [27] Patibandla S, Bhatt N, Lief S, et al. Gut microbiota modulation in the management of chronic obstructive pulmonary disease: A literature review [J]. Cureus, 2024, 16(8): e66875.
- [28] Chen H, Yao Y, Wang W B, et al. Ge-gen-Jiao-Tai-Wan affects type 2 diabetic rats by regulating gut microbiota and primary bile acids [J]. Evid Based Compl Alternat Med, 2021, 2021: 5585952.
- [29] Kim H, Jeon W, Hong J, et al. Gongjin-dan enhances neurite outgrowth of cortical neuron by ameliorating H₂O₂-induced oxidative damage via Sirtuin1 signaling pathway [J]. Nutrients, 2021, 13(12): 4290.
- [30] Ratajczak W, Ryl A, Mizerski A, et al. Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs) [J]. Acta Biochim Pol, 2019, 66(1): 1-12.
- [31] Scalise G, Ciancio A, Mauro D, et al. Intestinal microbial metabolites in ankylosing spondylitis [J]. J Clin Med, 2021, 10(15): 3354.
- [32] Dexrien M, Vaughan E E, Plugge C M, et al. *Akkermansia muciniphila* Gen. Nov., Sp. Nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54(5): 1469-1476.
- [33] Bae M, Cassilly C D, Liu X, et al. *Akkermansia muciniphila* phospholipid induces homeostatic immune responses [J]. Nature, 2022, 608(7921): 168-173.
- [34] Tang S Q, Li Y H, Huang C M, et al. Comparison of gut microbiota diversity between captive and wild Tokay gecko (*Gekko gecko*) [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 897923.
- [35] Wei W Y, Du H X, Shao C Y, et al. Screening of antiviral components of Ma Huang Tang and investigation on the *Ephedra alkaloids* efficacy on influenza virus type A [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 961.
- [36] Liu K, Xu Q, Wang L, et al. The impact of diet on the composition and relative abundance of rumen microbes in goat [J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2017, 30(4): 531-537.
- [37] 王陶陶, 杨德林, 韩娜, 等. 中药石膏药理作用研究进展与其清热物质基础探讨 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(4): 853-857.
- Wang T T, Yang D L, Han N, et al. Research progress in pharmacological effects of *Gypsum Fibrosum* and material basis for its heat-clearing effect [J]. China J Chin Mat Med, 2024, 49(4): 853-857.

[责任编辑 兰新新]