

引用:张庭瑞,杨上松,向纯,温伟波,李钦.病毒性肺炎湿热证小鼠模型的建立及评价[J].中医药导报,2025,31(3):51-59.

# 病毒性肺炎湿热证小鼠模型的建立及评价<sup>\*</sup>

张庭瑞<sup>1,2,3</sup>,杨上松<sup>1,2</sup>,向纯<sup>1,3</sup>,温伟波<sup>1,2</sup>,李钦<sup>1,2</sup>

(1.云南中医药大学,云南 昆明 650000;  
2.云南省中西医结合慢病防治重点实验室,云南 昆明 650000;  
3.仙桃市中医医院,湖北 仙桃 433099)

**[摘要]** 目的:构建并评价病毒性肺炎湿热证小鼠模型。方法:将32只SPF级雄性C57/BL6小鼠随机分为正常组、湿热组、病毒模拟物组、湿热+病毒模拟物组,每组8只。湿热组采用高脂饮食和气候箱湿热暴露14 d的方法构建小鼠湿热证模型,病毒模拟物组采用气管内滴注Poly(I:C)的方法构建小鼠病毒性肺炎肺损伤模型,湿热+病毒模拟物组采用高脂饮食和气候箱湿热暴露14 d叠加气管内滴注Poly(I:C)复合造模法,建立病毒性肺炎湿热证小鼠模型。观测小鼠体质量、食量、饮水量及证候评分变化,分别用酶联免疫法、酶联免疫组织化学染色法、血气分析仪、透射电镜观察血脂代谢(血清HDL-C及LDL-C水平)、胃肠功能(血清MTL、SP水平)、能量代谢(肝组织Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性)、水液转运(肺组织AQP1、AQP5、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP水平,肺组织细胞线粒体结构)、肺泡-毛细血管屏障(肺组织W/D,BALF中总细胞、总蛋白水平),炎症反应(BALF中TNF-α、IL-1β、IL-6水平)和肺生理功能(动脉血PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、FiO<sub>2</sub>水平),HE染色观察肺组织病理学变化,16SrRNA测序技术观察小鼠肠道菌群。结果:与正常组比较,湿热+病毒模拟物组小鼠的食量、饮水量、体质量下降,湿热证候积分,血清LDL-C、MTL、SP水平,肺组织AQP1、AQP5表达,肺组织W/D、BALF中总细胞数、总蛋白浓度,BALF中TNF-α、IL-1β、IL-6水平,动脉血PaCO<sub>2</sub>升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );肝、肺组织Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性,动脉血PaO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>水平下降( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );肺组织结构,细胞线粒体结构破坏,肺组织病理损伤评分升高。肠道菌群发生了改变,在属水平主要是拟杆菌、副拟杆菌、屎豆属菌、毛螺菌、NK4A136菌、罗氏菌、NK4A214菌、埃希氏菌相对丰度存在差异,肠道菌群的功能则在需氧化能异养,硝酸盐还原,动物寄生生物或共生体,人类病原体,发酵等方面表现出差异。结论:高脂饮食和气候箱湿热暴露14 d叠加气管滴注Poly(I:C)复合造模法可构建病毒性肺炎湿热证模型,造模方法安全可行,模型稳定可靠。

**[关键词]** 病毒性肺炎;湿热证;病证结合;模型评价;Poly(I:C)

**[中图分类号]** R2-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)03-0051-09

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.03.009

## Establishment and Evaluation of a Mouse Model Simulating Viral Pneumonia with Damp Heat Syndrome

ZHANG Tingrui<sup>1,2,3</sup>, YANG Shangsong<sup>1,2</sup>, XIANG Chun<sup>1,3</sup>, WEN Weibo<sup>1,2</sup>, LI Qin<sup>1,2</sup>

(1.Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650000, China;

2.Yunnan Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Chronic Disease in Prevention and Treatment, Kunming Yunnan 650000, China; 3.Xiantao Traditional Chinese Medicine Hospital, Xiantao Hubei 433099, China)

**[Abstract]** Objective: To construct and evaluate a mouse model of simulated viral pneumonia with damp heat syndrome. Method: Totally 32 SPF grade male C57/BL6 mice were randomly divided into normal group, damp heat group, virus mimic group and damp heat virus mimic group, with 8 mice in each group. The damp heat group constructed a mouse model of damp heat syndrome using a combination of rich and sweet diet and 14 days exposure to humid heat in a climate box. The virus mimetic group constructed a mouse

\*基金项目:国家重点研发计划课题(2023YFF0724803);国家自然科学基金项目(8226151028)

通信作者:李钦,女,副教授,研究方向为新发突发传染病中医理论及临床

model of simulated viral pneumonia using tracheal instillation of Poly (I:C). The damp heat virus mimetic group established a mouse model of simulated viral pneumonia damp heat syndrome using a combination of rich and sweet diet and 14 days exposure to humid heat in a climate box through a superimposed gas tube instillation of Poly (I:C). The changes in body weight, food intake, dietary intake and syndrome scores were observed. Enzyme-linked immunosorbent assay, enzyme-linked immunohistochemistry staining, blood gas analyzer, and transmission electron microscopy were applied to observe lipid metabolism (serum HDL-C and LDL-C levels), gastrointestinal function (serum MTL and SP level), energy metabolism ( $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase activity in liver tissue), water liquid transport (AQP1, AQP5 and  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase levels in lung tissue, mitochondrial structure of lung tissue cells), alveolar capillary barrier (lung tissue W/D, total cell and protein levels in BALF), inflammatory response (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in BALF), and pulmonary physiological function (arterial blood  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$  and  $\text{FiO}_2$  levels). HE staining was used to observe pathological changes in lung tissue, and 16s RNA sequencing technology was used to observe the gut microbiota of mice. Results: Compared with the normal group, the food intake, water intake and weight decreased in damp heat virus mimic group. Damp heat syndrome score, serum LDL-C, MTL and SP levels, lung tissue AQP1 and AQP5 expression, lung tissue W/D, total cell count and total protein concentration in BALF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 levels in BALF, and elevated arterial  $\text{PaCO}_2$  levels increased in damp heat virus mimic group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ );  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase activity in liver and lung tissues, arterial blood  $\text{PaO}_2$ , and  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  levels decrease in damp heat virus mimic group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); The structure of lung tissue and mitochondrial structure of cells are disrupted, and the pathological damage score of lung tissue was increased in damp heat virus mimic group. The gut microbiota has undergone changed in damp heat virus mimic group, mainly at the genus level including Bacteroides, Parabacteroides, Faecalitalea, Lachnospiraceae, NK4A136 group, Roseburia, NK4A214 group, and Escherichia-Shigella, while the functions of gut microbiota was varied in areas such as aerobic chemoheterotrophy, nitrate reduction, animal parasites or symbionts, human pathogens, and fermentation. Conclusion: The compound modeling method of adding Poly (I:C) through a stacked gas tube drip after 14 days of exposure to humid heat in a fat and sweet diet and climate box can construct a viral pneumonia damp heat syndrome model. The modeling method is safe and easy to implement, and the model is stable and reliable.

[Keywords] viral pneumonia; damp heat syndrome; combination of disease and syndrome; model evaluation; Poly(I:C)

病毒性肺炎是呼吸道病毒感染引起的肺实质炎症，属于中医“温病”“时疫”范畴，具有传染性强、发病急骤、致死率高等特点，给人类的生命及生产生活秩序带来巨大影响<sup>[1]</sup>。“疫气”侵袭肺部是共性，但又因时、因人、因地不同，发生从化。以COVID-19为例，云南边境地区大部分属于热带、亚热带季风气候，地理环境炎热潮湿，当地居民喜食辛辣肥甘之品，感受疫戾之邪后容易化湿化热。前期我们对云南省瑞丽市63例新型冠状病毒感染患者进行分析，发现热和湿为核心病机，湿热证为该地区疫病的主要证型<sup>[2]</sup>。建立符合中医三因制宜及辨证论治思想的病证结合动物模型对中医药治疗疫病的科学探索及实验研究意义重大。因此本研究依据病因学说，采用“高脂饮食+高温高湿环境+气管内滴注病毒模拟物”的方法，构建病毒性肺炎湿热证小鼠模型，并从病证结合角度对模型进行评价，旨在为病毒性肺炎湿热证小鼠模型的建立与评价提供实验依据。同时本实验还基于16SrRNA技术对病毒性肺炎湿热证小鼠肠道菌群的变化进行了探索，以期为深入研究该病证结合模型提供实验基础。

## 1 材 料

### 1.1 动物与饲料 32只SPF级雄性C57/BL6小鼠，6~8周龄，

体质量( $20\pm5$ )g，购自斯贝福(北京)生物科技有限公司，生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。普通饲料(碳水化合物45%、蛋白质22%、脂肪13%、其他19%)、高脂饲料(碳水化合物45%、蛋白质24%、脂肪24%、其他7%)均购自江苏美迪森生物医药有限公司。实验经云南中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批准号:R-062023031)。

1.2 试剂与药物 聚肌胞苷酸[Polyinosinic-Polycytidylic acid, Poly(I:C), Invivogen公司,批号:5934-44-04]; $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATP酶活性试剂盒(Solarbio公司,批号:2303001);低密度脂蛋白胆固醇(low density lipid-cholesterol, LDL-C)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:20230530)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipid-cholesterol, HDL-C)ELISA试剂盒批号:20230529)、胃动素(montreal, MTL)ELISA试剂盒(批号:20230728)、P物质(substance P, SP)ELISA试剂盒(批号:20230728)均购自南京建成生物工程研究所；水通道蛋白1(aquaporin1, AQP1)免疫组化试剂盒(批号:CA000041)、AQP5兔单克隆抗体(批号:20334-1-AP)、HRP-Rabbit-anti-goat抗体(批号:SA00001-2)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:20031416)、Mouse TNF- $\alpha$  EISA试剂盒(批号:40003411)、Mouse IL-1 $\beta$

EISA试剂盒(批号:40002541)、Mouse IL-6 EISA试剂盒(批号:40001501)均购自Proteintech公司;苏木素-伊红染液套装(Servicebio公司,批号:CR2301055)。

**1.3 主要仪器** 人工气候箱(上海一恒科学仪器有限公司,型号:MGC-350HP);多功能酶标仪(上海帝肯实验器材有限公司,型号:SPARK10M);玻片扫描影像分析系统(深圳市生强科技有限公司,型号:SQS100-S);细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司,型号:Countstar Mira FL);血气电解质免疫分析仪(成都斯玛特科技有限公司,型号:920001108);光学显微镜(日本尼康,型号:NIKON ECLIPSE E100);化学发光成像仪(天能科技公司,型号:Tanon 4600sf);透射电子显微镜(日本电子株式会社,型号:JEM 1400Plus)。

## 2 方 法

**2.1 造模方法** 湿热证造模方法:参照买鹏宇等<sup>[3]</sup>的方法,小鼠自由进食高脂饲料,并在每天07:00:00—19:00:00,将小鼠暴露于人工气候仓创造的“湿热环境”[温度( $32\pm0.5$ )℃、湿度( $90\pm5$ %)],连续14 d。

病毒性肺炎造模方法:Poly(I:C)是人工合成的dsRNA病毒类似物,能激活宿主固有免疫,诱导趋化、炎症因子表达,引起炎症反应,常常被用来模拟病毒感染,建立病毒性肺炎模型<sup>[4-5]</sup>。腹腔注射麻醉小鼠(戊巴比妥钠45 mg/kg),将小鼠用胶布固定在无菌泡沫手术台上。用碘伏充分消毒颈部皮毛。沿颈部中线在皮肤上做1个2~3 mm的切口,用镊子钝性分离皮下肌肉组织直至暴露气管。使用29号注射器进行气管内滴注,注射器针头与气管成30°夹角,朝向心端方向插入气管。回抽注射器活塞,有气体进入注射器内,表明针头在气管中。将Poly(I:C)(5 mg/kg)溶解于50 μL磷酸缓冲液(phosphate balanced solution, PBS)中,缓慢滴入气管内。滴注后,外科手术线缝合皮肤切口,预防性给予青霉素软膏外涂。悬吊并缓慢旋转小鼠2~3 min,使Poly(I:C)均匀布散于肺部。待小鼠苏醒后,放回笼中。

**2.2 分组及干预** 适应性喂养5 d后,将小鼠随机分为4组:正常组、湿热组、病毒模拟物组、湿热+病毒模拟物组,每组8只。正常组在常温下[温度( $23\pm0.5$ )℃、湿度( $60\pm10$ %)]用普通饲料饲喂14 d。湿热组连续14 d高脂饲料喂养联合“湿热环境”暴露。病毒模拟物组在常温下用普通饲料饲喂14 d,并在第15

天气管内滴注Poly(I:C)。湿热+病毒模拟物组,连续14 d高脂饲料喂养联合“湿热环境”暴露,并在第15天气管内滴注Poly(I:C)。

**2.3 标本采集** 造模结束后3 d,小鼠禁食不禁水8 h,使用戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后,收集小鼠腹主动脉全血,迅速取100 μL的新鲜血液,进行动脉血血气分析。余血液室温静置,收集血清。收集肝脏组织后,打开小鼠胸腔,充分暴露双肺,肉眼观察肺组织外形、充血、水肿情况并记录。结扎右肺,收集左肺PBS灌洗液,分别保存离心后的上清液和沉淀。取下结扎的右肺,右肺下叶用于计算肺组织湿质量/干质量(W/D)比值及电镜检测;右肺中叶固定于10%福尔马林溶液中;右肺上叶在-80 ℃冰箱中保存。从肛门附近的直肠中收集粪便样本,在-80 ℃下储存。

## 2.4 观察指标

**2.4.1 食量、饮水量、体质量及证候评分** 分别在第2、5、8、

11、14、17天观察并记录小鼠食量、饮水量、体质量。并在第7、14、17天对小鼠进行证候评分,湿热证模型观测指标以《实用中医证候动物模型学》为基础,参照陈弋等<sup>[6]</sup>及常丽萍<sup>[7]</sup>验证湿热证模型的方法,按湿热证模型证候积分表对小鼠精神、毛发、眼睛、大小便及肛门的情况进行评定,小鼠湿热证候得分为各项体征相应得分之和(最低为0分,最高为18分)。(见表1)

表1 湿热证模型证候积分表

得分	精神反应	毛发	眼睛	大便	小便	肛门
0分	敏捷迅速	光泽亮丽	眼裂正常	褐色/麦粒状	正常淡黄	洁净
1分	运动变慢	干燥分叉	眼裂变窄	黄色/偏软	短少黄色	红肿
2分	运动迟缓	毛湿耸毛	眯眼	淡黄色/不成形	短少黄赤	污秽
3分	嗜睡懒动	毛发污秽	闭目眼疾	黏液便	小便混浊	脱垂

**2.4.2 血清中血脂水平及肝组织、肺组织Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性** 按照试剂盒说明书,采用直接法检测血清中HDL-C、LDL-C水平。分别取0.1 g小鼠肝、肺组织,冰浴匀浆,离心取上清液,按照试剂盒方法,检测各组小鼠肝组织及肺组织中Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性。

**2.4.3 肺组织细胞线粒体超微结构** 将肺组织制成约1 mm×1 mm×1 mm的组织小块,经电镜固定液固定30 min,使用醋酸铀和枸橼酸铅双染色法染色,应用透射电镜观察肺组织细胞线粒体超微结构的变化。

**2.4.4 血清中MTL、SP水平及BALF中炎症因子水平** 按照ELISA试剂盒中的方法,检测小鼠血清中MTL、SP水平及BALF中TNF-α、IL-1β、IL-6水平。

**2.4.5 AQP1、AQP5免疫组化检测** 取固定于10%福尔马林溶液中的肺组织,脱水、浸蜡、包埋,切片,依次经过抗原修复,灭活内源性过氧化物酶,滴加山羊血清封闭液,加入一抗AQP1(1:4 000)、AQP5(1:1 200),4 ℃过夜后滴加生物素标记的羊抗兔二抗(1:2 000),孵育2 h,再次PBS洗涤,放入亲和素-生物素-过氧化物酶复合物溶液中,37 ℃下进行DAB显色20 min,脱水封片,用电子显微镜拍照,阳性信号为胞浆、核内呈棕色或棕褐色颗粒。图像分析系统采集显微镜下图像,镜下对每张切片随机选择5个视野,应用Image-Pro Plus 5.1软件进行分析。对阳性信号进行光密度值(IOD)扫描,计算5个视野的平均值作为该切片的IOD值。

**2.4.6 肺组织W/D值、BALF沉淀中总细胞数及总蛋白水平** 取右肺下叶组织,置于干燥称量纸上称得湿质量后(W),置80 ℃恒温箱内烘干(不低于24 h)至肺质量不再减少后称质量,记为干质量(D),计算W/D值。取BALF沉淀物,加入1 mL PBS,取10 μL混匀的细胞悬浮液加入自动细胞计数仪计数。采用BCA蛋白测定法检测BALF上清液总蛋白浓度。

**2.4.7 小鼠动脉血血气分析** 取100 μL新鲜腹主动脉血,采用血气-电解质免疫分析仪检测小鼠腹主动脉血血气指标,记录血氧分压(partial pressure of O<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>)、血二氧化碳分压(partial pressure of CO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>)及吸入气氧浓度分数(fraction of inspiration O<sub>2</sub>, FiO<sub>2</sub>)。

**2.4.8 肺组织病理学检测及评分** 取固定于10%福尔马林溶液中的肺组织,经过脱水、浸蜡、包埋与切片后,进行HE染色。显微镜下拍片观察肺组织结构变化。每只小鼠随机选取3张

切片在显微镜下进行观察,参照HONG W Q等<sup>[8]</sup>的方法,根据肺组织损伤评分表对每张切片进行评分。取3张切片中评分最高的结果,作为该样本肺组织损伤评分的得分。(见表2)

表2 肺组织损伤评分表

特征性病理改变	得分
正常肺组织	0分
肺泡间隔轻微变宽(<25 μm)伴有炎症细胞浸润,	1分
无肺实变	
肺泡间隔加宽(>25 μm)伴有炎症细胞浸润,肺实变(面积<30%)	2分
肺泡间隔加宽(>25 μm)伴有炎症细胞浸润,肺实变(面积<30%),并出现出血或透明膜	3分
肺泡间隔增宽(>25 μm)伴有炎症细胞浸润,肺实变(面积在30%~60%)	3分
肺泡间隔加宽(>25 μm)伴有炎症细胞浸润,肺实变(面积>60%)	4分

2.4.9 16SrRNA测序分析 16SrRNA测序在北京百迈科生物技术有限公司(中国北京)完成。使用BMK云分析平台对数据进行分析(<https://international.biocloud.net/>)。

DNA提取和测序:使用PowerSoil® DNA分离试剂盒从粪便样本中提取总DNA。使用酶标仪对提取的核酸进行浓度检测,质量合格的样本用于PCR扩增。根据保守区27F-1492R设计16S全长引物,用于靶区域聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增。合成的特异性引物(27F-1492R)设计如下。Forward primer 27F: AGRGTTGATYNTGGCTCAG; Reverse primer 1492R: TASGGHTACCTTGTASGACTT。对PCR扩增产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库,使用Qsep-400方法对测序文库进行质量检测,对检测合格的测序文库使用illumina novaseq6000(novaseq6000, illumina)进行上机测序。

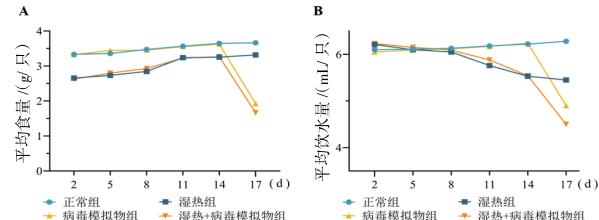
测序数据分析:对原始下机的subreads进行校正得到循环一致性序列(circular consensus sequencing, CCS)(SMRT Link, version8.0),通过barcode序列识别不同样品的CCS序列,并去除嵌合体,得到高质量的CCS序列[lima (v1.7.0)]。基于97%的相似性阈值(USEARCH, v10.0),将生成的高质量CCS序列聚类为操作分类单元(OTUs)。以SILVA(Release138, <http://www.arb-silva.de>)为参考数据库使用朴素贝叶斯分类器(v2.11, <http://rdp.cme.msu.edu/>)对OTUs进行分类学注释、分析。多样性分析包括α和β多样性。使用QIME2(<https://qiime2.org/>)进行α多样性分析以检查单个样本内的物种丰富度和多样性,并计算每个样本的ACE、Chao、Shannon、Simpson指数。β多样性分析,使用非度量多维标定法(non-metric multi-dimensional scaling, NMDS)比较不同样本之间物种多样性的相似性,并进行组间比较。使用LEfSe[即Line Discriminant Analysis (LDA) Effect Size]分析,筛选各组之间表达显著差异基因作为Biomarker。Biomarker筛选标准为LDA值>4。依据筛选的Biomarker,利用QIIME软件分析物种丰度,参照FAPROTAX数据库,对微生物群落功能进行预测注释。

2.5 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行统计分析,计量资料采用“均数±标准差”( $\bar{x} \pm s$ )描述,满足正态分布者多组比较采用单因素方差分析,两组比较方差齐者采用LSD-t法,方

差不齐者Tamhane's T2检验。不满足正态分布的计量资料用中位数和四分位间距 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] 表示,多组比较采用Kruskal-Wallis H检验。计数资料用频数描述,多组比较采用 $\chi^2$ 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结 果

3.1 食量、饮水量、体质量变化情况 第2~14天,各组小鼠食量均逐渐增加,湿热组、湿热+病毒模拟物组小鼠食量较正常组、病毒模拟物组明显减少。(见图1A)第5天前,湿热组、湿热+病毒模拟物组小鼠饮水量较正常组、病毒模拟物组高,随着造模时间的延长,正常组、病毒模拟物组小鼠饮水量逐渐增加,湿热组、湿热+病毒模拟物组小鼠饮水量逐渐减少;第5~14天,湿热组、湿热+病毒模拟物组小鼠饮水量较正常组、病毒模拟物组明显减少。(见图1B)



注:本实验采用记录每笼小鼠总食量及总饮水量除以小鼠数量的方法测量小鼠的平均食量及平均饮水量。

图1 小鼠食量、饮水量折线图

第14天,正常组体质量与病毒模拟物组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。湿热组体质量与湿热+病毒模拟物组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组、病毒模拟物组比较,湿热组、湿热+病毒模拟物组小鼠体质量明显下降( $P<0.05$ )。(见表3)

组别	n	表3 体质量变化情况 ( $\bar{x} \pm s$ , g)					
		第2天	第5天	第8天	第10天	第14天	第17天
正常组	8	21.12±1.22	21.22±1.56	22.78±1.88	23.45±1.32	23.98±2.07	24.42±1.92
湿热组	8	19.95±1.45 <sup>a</sup>	19.86±1.05 <sup>a</sup>	20.20±1.32 <sup>b</sup>	21.22±1.42 <sup>a</sup>	22.08±1.56 <sup>a</sup>	22.21±1.48 <sup>a</sup>
病毒模拟物组	8	21.05±1.67 <sup>a</sup>	21.68±0.82 <sup>a</sup>	22.87±2.01 <sup>d</sup>	23.35±1.56 <sup>c</sup>	24.01±1.38 <sup>c</sup>	21.68±2.34
湿热+病毒模拟物组	8	20.08±1.32 <sup>ab</sup>	20.12±1.35 <sup>a</sup>	20.89±1.22 <sup>ab</sup>	21.56±1.77 <sup>ab</sup>	22.00±1.67 <sup>ab</sup>	19.89±1.82 <sup>bc</sup>
F		1.315	3.487	4.578	3.880	3.009	9.925
P		0.289	0.029	0.010	0.019	0.047	0.000

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与湿热组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ ;与病毒模拟物组比较,<sup>e</sup> $P<0.05$ 。

3.2 证候评分 第14天,正常组、病毒模拟物组小鼠反应迅捷,灵敏;毛发光泽亮丽;眼睛有神,眼眶周围无分泌物;肛门干燥洁净,大便呈黑色颗粒状,质地软硬适中;小便淡黄。湿热组、湿热+病毒模拟物组小鼠反应变迟缓,甚则倦怠,眯眼懒动;毛发耸立;肛门污秽,大便稀软;小便深黄。(见图2)

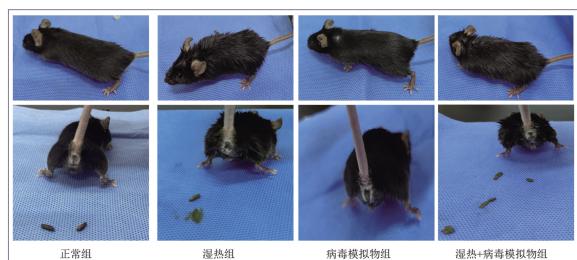


图2 小鼠湿热体征图

第7、14、17天,与正常组、病毒模拟物组比较(积分为0),湿热组、湿热+病毒模拟物组小鼠的证候积分升高( $P<0.05$ )。(见表4)

表4 小鼠证候积分比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,分)

组别	n	第7天	第14天	第17天
正常组	8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
湿热组	8	8.75±0.71 <sup>a,b</sup>	11.13±0.10 <sup>a,b</sup>	10.75±0.89 <sup>a,b</sup>
病毒模拟物组	8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.13±0.35
湿热+病毒模拟物组	8	8.88±0.64 <sup>a,b</sup>	11.25±1.16 <sup>a,b</sup>	11.25±1.04 <sup>a,b</sup>
F		27.436	26.938	26.595
P		0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与病毒模拟物组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

3.3 小鼠血脂水平 正常组LDL-C、HDL-C与病毒模拟物组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。湿热组LDL-C、HDL-C与湿热+病毒模拟物组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组、病毒模拟物组比较,湿热组、湿热+病毒模拟物组小鼠LDL-C升高( $P<0.01$ ),HDL-C降低( $P<0.01$ )。(见表5)

表5 小鼠血脂水平 ( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)

组别	n	LDL-C	HDL-C
正常组	8	1.11±0.08	2.64±0.14
湿热组	8	1.62±0.11 <sup>a</sup>	1.78±0.17 <sup>a</sup>
病毒模拟物组	8	1.13±0.05 <sup>b</sup>	2.86±0.20 <sup>b</sup>
湿热+病毒模拟物组	8	1.55±0.10 <sup>a,c</sup>	1.83±0.11 <sup>a,c</sup>
F		63.477	83.043
P		0.000	0.000

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与湿热组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与病毒模拟物组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

3.4 小鼠血清胃肠激素及肝组织Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力水平 正常组MTL、SP、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性与病毒模拟物组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。湿热组MTL、SP、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性与湿热+病毒模拟物组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组、病毒模拟物组比较,湿热组、湿热+病毒模拟物组小鼠血清的MTL、SP水平升高( $P<0.01$ ),肝组织Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性水平降低( $P<0.01$ )。(见表6)

表6 小鼠胃肠激素及肝组织Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力水平 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	MTL/(ng/mL)	SP/(ng/mL)	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP酶活力/(U/g)
正常组	8	109.59±8.59	637.57±44.09	58.07±4.62
湿热组	8	172.86±6.08 <sup>a</sup>	812.91±46.97 <sup>a</sup>	42.40±2.36 <sup>a</sup>
病毒模拟物组	8	112.02±6.99 <sup>b</sup>	648.08±47.19 <sup>b</sup>	55.17±3.27 <sup>b</sup>
湿热+病毒模拟物组	8	183.24±11.21 <sup>a,c</sup>	816.21±41.52 <sup>a,c</sup>	40.64±2.65 <sup>a,c</sup>
F		150.702	34.054	48.965
P		0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与湿热组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与病毒模拟物组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

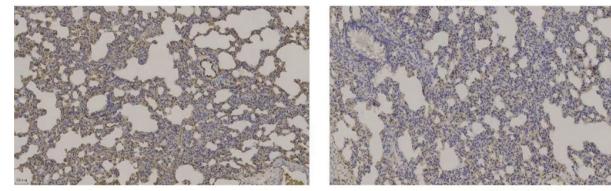
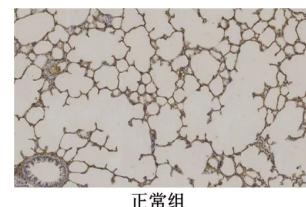
3.5 肺组织AQP1、AQP5、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力水平 AQP1和AQP5在肺组织细胞的质膜中表达,阳性信号表现为胞浆、核内特异性染色为棕色或棕褐色,阳性信号光密度值扫描结果为其表达水平。(见图3~4)与正常组比较,湿热组、湿热+病毒模拟物组小鼠肺组织AQP1、AQP5水平均升高( $P<0.01$ )、肺组织

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力水平降低( $P<0.01$ )。与湿热组比较,病毒模拟物组小鼠肺组织AQP1、AQP5水平均降低( $P<0.01$ )、肺组织Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力水平升高( $P<0.01$ );湿热+病毒模拟物组小鼠肺组织AQP1、AQP5水平均升高( $P<0.01$ )、肺组织Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力水平降低( $P<0.01$ )。与病毒模拟物组比较,湿热+病毒模拟物组小鼠肺组织AQP1、AQP5水平均升高( $P<0.01$ )、肺组织Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力水平降低( $P<0.01$ )。(见表7)

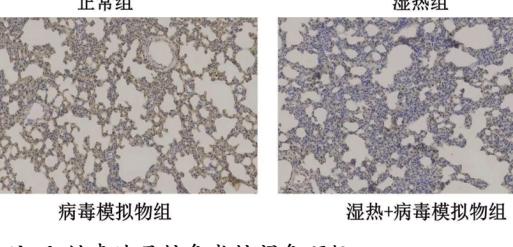
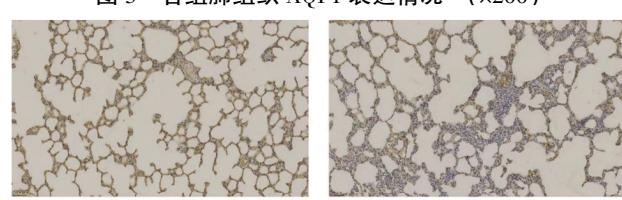
表7 肺组织AQP1、AQP5、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力水平 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	AQP1/(IOD)	AQP5/(IOD)	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP酶活力/(U/g)
正常组	8	0.14±0.01	0.09±0.01	1.45±0.11
湿热组	8	0.20±0.03 <sup>a</sup>	0.16±0.02 <sup>a</sup>	1.09±0.10 <sup>a</sup>
病毒模拟物组	8	0.16±0.02 <sup>b</sup>	0.11±0.01 <sup>b</sup>	1.39±0.08 <sup>b</sup>
湿热+病毒模拟物组	8	0.23±0.02 <sup>a,b,c</sup>	0.25±0.03 <sup>a,b,c</sup>	0.94±0.11 <sup>a,b,c</sup>
F		36.036	113.965	39.312
P		0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与湿热组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与病毒模拟物组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。



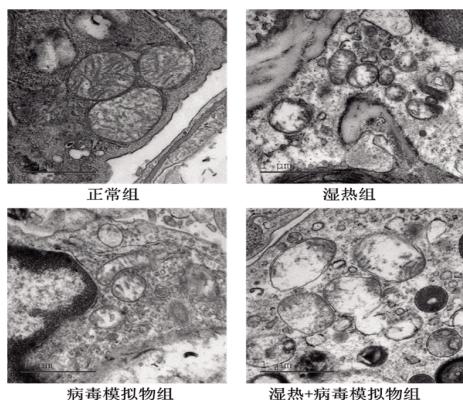
注:阳性表达呈棕色或棕褐色颗粒。

图3 各组肺组织AQP1表达情况 ( $\times 200$ )

注:阳性表达呈棕色或棕褐色颗粒。

图4 各组肺组织AQP5表达情况 ( $\times 200$ )

3.6 肺组织细胞线粒体结构变化 正常组小鼠肺组织细胞线粒体结构正常。湿热组、病毒模拟物组、湿热+病毒模拟物组小鼠肺组织细胞线粒体出现了不同程度的结构变化,以线粒体肿胀、变形、嵴模糊、断裂,呈空泡状改变为主。其中湿热+病毒模拟物组破坏程度最为严重。(见图5)

图5 肺组织细胞透射电镜图 ( $\times 30\,000$ )

3.7 肺泡-毛细血管屏障损伤 正常组小鼠肺组织W/D值、BALF中总细胞数及总蛋白浓度与湿热组比较,病毒模拟物组小鼠肺组织W/D值、BALF中总细胞数及总蛋白浓度与湿热+病毒模拟物组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组、湿热组比较,病毒模拟物组、湿热+病毒模拟物组小鼠肺组织W/D值、BALF中总细胞数及总蛋白浓度均升高( $P<0.01$ )。(见表8)

表8 小鼠肺组织W/D值、BALF中总细胞数及总蛋白浓度水平 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	W/D值	BALF中总细胞数/ ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	BALF中总蛋白浓度/ ( $\mu\text{g/mL}$ )
正常组	8	2.06±0.11	1.33±0.13	156.32±10.82
湿热组	8	2.24±0.18	1.45±0.15	162.75±16.12
病毒模拟物组	8	4.46±0.21 <sup>a,b</sup>	5.33±0.25 <sup>a,b</sup>	236.23±20.80 <sup>a,b</sup>
湿热+病毒模拟物组	8	4.55±0.24 <sup>a,b</sup>	5.56±0.26 <sup>a,b</sup>	242.77±22.60 <sup>a,b</sup>
F		341.229	903.358	45.486
P		0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与湿热组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

3.8 BALF中炎症因子水平 正常组小鼠BALF中的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平与湿热组比较,病毒模拟物组小鼠BALF中的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平与湿热+病毒模拟物组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组、湿热组比较,病毒模拟物组、湿热+病毒模拟物组小鼠BALF中的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平平均升高( $P<0.01$ )。(见表9)

组别	n	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
正常组	8	207.82±12.89	52.11±3.57	86.27±7.23
湿热组	8	210.86±16.51	54.77±3.60	88.67±8.14
病毒模拟物组	8	314.20±23.07 <sup>a,b</sup>	78.25±4.39 <sup>a,b</sup>	196.25±15.71 <sup>a,b</sup>
湿热+病毒模拟物组	8	319.07±24.10 <sup>a,b</sup>	81.40±5.01 <sup>a,b</sup>	199.45±20.01 <sup>a,b</sup>
F		69.345	93.898	148.498
P		0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与湿热组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

3.9 动脉血气分析 正常组小鼠动脉血PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>水平与湿热组组间比较,病毒模拟物组小鼠动脉血PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>水平与湿热+病毒模拟物组组间比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组、湿热组比较,病毒模拟物

组、湿热+病毒模拟物组小鼠动脉血动脉血PaO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>下降( $P<0.01$ )。(见表10)

表10 小鼠腹主动脉动脉血气分析 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	PaO <sub>2</sub> /mmHg	PaCO <sub>2</sub> /mmHg	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>
正常组	8	74.92±5.46	36.78±2.87	478.05±34.86
湿热组	8	72.05±5.81	37.02±3.01	469.19±37.85
病毒模拟物组	8	47.41±4.12 <sup>a,b</sup>	39.23±2.85	311.21±27.04 <sup>a,b</sup>
湿热+病毒模拟物组	8	37.80±2.72 <sup>a,b</sup>	39.60±3.01	248.09±17.88 <sup>a,b</sup>
F		115.779	1.756	109.080
P		0.000	0.178	0.000

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与湿热组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

3.10 组织病理学损伤 显微镜下可见,正常小鼠的肺组织结构清晰,未见炎症细胞浸润或其他病理学变化(图6A,  $\times 200$ )。Poly(I:C)滴注后,肺泡壁增厚伴随炎症细胞浸润,主要为中性粒细胞及巨噬细胞(图6B,  $\times 200$ )。在一些损伤严重的样本中,肺组织发生实变(图6D,  $\times 40$ ),表现为肺泡壁破裂、塌陷,结构完全损坏,塌陷的肺泡被肺组织细胞、炎症细胞及纤维蛋白填塞,部分肺泡代偿性增大(图6C,  $\times 400$ )。在实变的组织中,偶见出血,以红细胞充满间质和肺泡间隙为特征(图6E,  $\times 400$ )。偶尔可在血管中观察到血栓的形成(图6F,  $\times 200$ )。

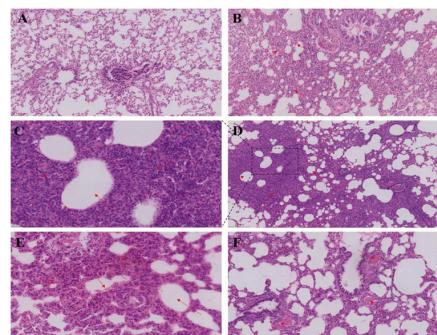


图6 小鼠肺组织病理结构改变

正常组、湿热组、病毒模拟物组、湿热+病毒模拟物组肺组织损伤的秩平均值分别为8.00、9.06、23.44和25.50。正常组小鼠肺组织病理结构损伤与湿热组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。病毒模拟物组小鼠肺组织病理结构损伤与湿热+病毒模拟物组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常组、湿热组比较,病毒模拟物组、湿热+病毒模拟物组小鼠肺组织病理结构损伤程度升高( $P<0.01$ )。(见表11)

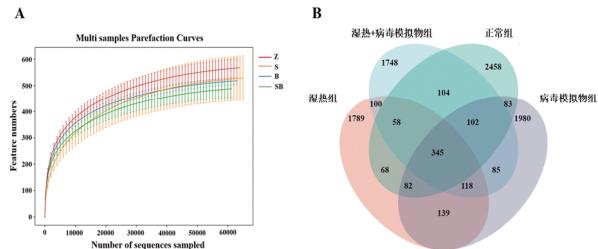
表11 不同组间小鼠肺组织损伤程度比较 (n=8)

项目	正常组	湿热组	病毒模拟物组	湿热+病毒模拟物组
0分	8	7	0	0
1分	0	1	1	0
2分	0	0	3	2
3分	0	0	3	5
4分	0	0	1	1
秩平均值	8.00	9.06	23.44	25.50
$\chi^2$				26.581
P				<0.000

注:多重比较:肺组织损伤病毒模拟物组>正常组( $P=0.003$ ),病毒模拟物组>湿热组( $P=0.000$ ),湿热+病毒模拟物组>湿热组( $P=0.001$ )。

### 3.11 肠道微生物群变化

3.11.1 扩增曲线分析及outs分析 如图7A所示,当循环序列数>30 000时,物种数上升缓慢,曲线开始趋于平缓,提示样品质量可靠,可以进行数据分析。图7B展示了outs(即物种数)在各组间的分布及包含关系,共检测到了9 259个outs,其中正常组3 300个,湿热组2 699个,病毒模拟物组2 934个,湿热组+病毒模拟物组2 660个。



注:扩增曲线用于验证测序数据量是否足以反映样品中的物种多样性,并间接反映样品中物种的丰富程度.outs表示真实存在的生物学序列,可以在单核苷酸的精度上区分序列之间的差异,从而实现样本中菌株水平物种的鉴定。Z.正常组;S.湿热组;B.病毒模拟物组;SB.湿热+病毒模拟物组。

图7 稀释性曲线及outs分析

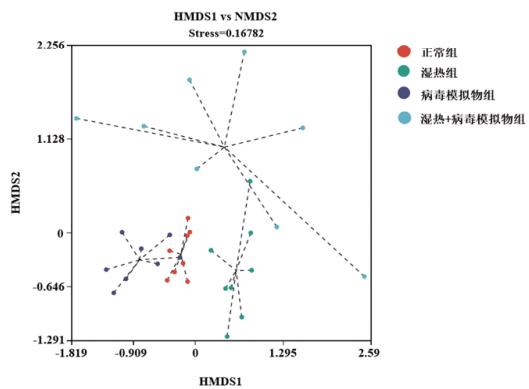
3.11.2 Alpha多样性 与正常组比较,湿热组小鼠Chao1、Ace、shannon指数水平降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),病毒模拟物组小鼠shannon指数水平降低( $P<0.01$ ),湿热+病毒模拟物组小鼠Chao1、Ace、shannon、Simpson指数水平降低( $P<0.01$ )。与湿热组比较,湿热+病毒模拟物组小鼠shannon、Simpson指数水平降低( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。与病毒模拟物组比较,湿热+病毒模拟物组Chao1、Ace、shannon、Simpson指数水平降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。(见表12)

表12 各组 Chao1、Ace、shannon、Simpson 指数比较

组别	n	(x±s)			
		Chao1	Ace	shannon	Simpson
正常组	8	247.84±53.75	250.06±45.47	5.11±0.60	0.92±0.04
湿热组	8	197.61±31.93 <sup>a</sup>	200.41±31.89 <sup>b</sup>	4.49±0.31 <sup>a</sup>	0.91±0.24
病毒模拟物组	8	218.91±44.79	234.76±40.34	4.31±0.46 <sup>b</sup>	0.91±0.35
湿热+病毒模拟物组	8	165.53±34.55 <sup>b,c</sup>	181.74±40.34 <sup>b,f</sup>	3.57±0.73 <sup>b,d,e</sup>	0.84±0.10 <sup>b,e</sup>
Z		5.428	6.216	10.698	3.790
P		0.005	0.002	0.000	0.021

注:Alpha多样性分析中,Chao1和Ace指数衡量物种丰度(richness),即物种数量的多少,数值越大,物种越多;shannon和Simpson指数用于衡量物种多样性(diversity),数值越大,物种的多样性越丰富<sup>[9]</sup>。与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与湿热组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ ;与病毒模拟物组比较,<sup>e</sup> $P<0.05$ ,<sup>f</sup> $P<0.01$ 。

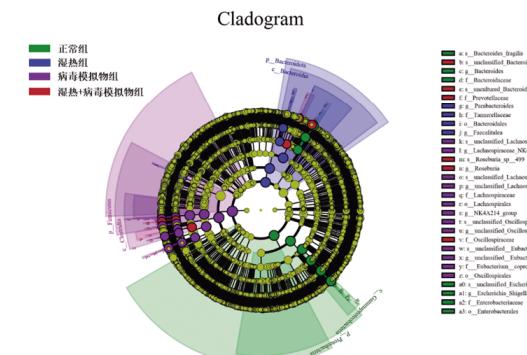
3.11.3 Beta多样性 在正常组、病毒模拟物组中,组内各样品距离较近,提示组内差异小。湿热组、湿热+病毒模拟物组中,组内各样品距离较大,组内差异大。正常组、病毒模拟物组与湿热组、湿热+病毒模拟物组明显分离。(见图8)



注:Beta多样性分析,是通过分析不同样品outs组成反映样品的差异,图中点分别表示各样品,不同颜色代表不同分组,点与点之间的距离表示差异程度,当Stress小于0.2时,表明NMDS分析具有一定的可靠性,在坐标图上距离越近的样品,相似性越高。

图8 Beta多样性分析进行组间比较

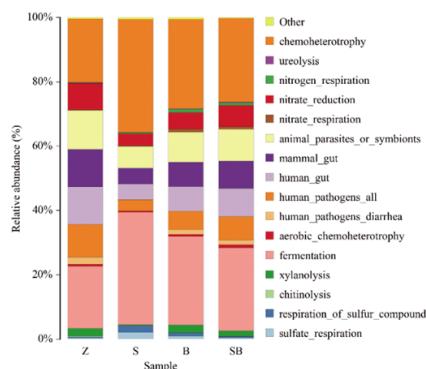
3.11.4 LEfSe分析 在目水平,Bacteroidales、Lachnospirales、Oscillospirales、Enterobacterales被认为是有差异的生物标志物;在科水平,Bacteroidaceae、Prevotellaceae、Tannerellaceae、Lachnospiraceae、Oscillospiraceae、Enterobacteriales被认为是有差异的生物标志物;在属水平,Bacteroides、Parabacteroides、Faecalitalea、Lachnospiraceae、NK4A136 group、Roseburia、NK4A214 group、Escherichia-Shigella被认为是有差异的生物标志物;在种水平,Bacteroides fragilis和Roseburia sp.499被认为是有差异的生物标志物(及菌群)。(见图9)



注:LEfSe分析能够在不同组间寻找差异有统计学意义的Biomarker,以及组间在丰度上有显著差异的物种。图中展示了LDA值大于4.0的物种,图中由内至外辐射的圆圈代表了由门至种的分类级别,界(kingdom,k)、门(phylum,p)、纲(class,c)、目(order,o)、科(family,f)、属(genus,g)、种(species,s);在不同分类级别上的每一个小圆圈代表该水平下的一个分类,小圆圈直径大小与相对丰度大小呈正比;无显著差异的物种统一为黄色,差异物种按该物种所在丰度最高的分组进行着色。

图9 LEfSe分析进化分枝图

3.11.5 FAPROTAX功能预测 存在的功能差异主要是需氧化学异养(aerobic chemoheterotrophy),硝酸盐还原(nitrate reduction),动物寄生虫或共生体(animal parasites or symbionts),所有人类病原体(human pathogens all),以及发酵(fermentation)等。(见图10)



注:Z.正常组;S.湿热组;B.病毒模拟物组;SB.湿热+病毒模拟物组。

图 10 FAPROTAX 功能预测

#### 4 讨 论

“病证结合”动物模型是利用人和动物生理、病理共性,在中医病因病机理论的指导下,模拟特定证候致病因素,联合传统“因素造模”的方法<sup>[3]</sup>,复制出特定证候的疾病模型。其是沟通中医临床辨证论治与基础实验研究的桥梁。本研究拟构建的病毒性肺炎湿热证模型,属于温病湿热证类<sup>[10]</sup>。《温热经纬》中“薛生白湿热病篇”记载了温病湿热证的病因病机:“太阴内伤,湿饮停聚”故生“内湿”;“内湿素盛”伴“暑邪入之”,“内外相引”“而成湿温病也”。此外,《医学入门》记载了“长夏郁热,山泽熏气,冒雨行湿,汗透沾衣”可生“外湿”。因此,本研究通过高脂饮食损伤脾胃引起“内湿”,人工气候仓高温、高湿环境模拟“外湿”,建立小鼠湿热证模型,并在此基础上气管内滴注病毒模拟物Poly(I:C)模拟病毒感染,从而建立模拟病毒性肺炎湿热证小鼠模型。

模型评价关系到动物模型的重复性、稳定性及实验结果的科学性、真实性,是病证结合模型研究的重中之重<sup>[11]</sup>。目前湿热证动物模型评价指标尚未统一。综合前期文献研究结果,本实验从小鼠的饮食、体征变化、微观因子检测3个方面,选取小鼠食量、饮水量、体质量动态变化情况,证候积分,以及血脂、胃肠激素、能量代谢作为湿热证模型评价的指标。《脾胃论》记载“时当长夏,湿热大胜,蒸蒸而炽,人感之……或渴或不渴,不思饮食,自汗体重”,“胃既伤,则饮食不化,口不知味”,强调了湿热困脾与饮水及食量的密切关系。“人感湿热,四肢困倦,精神短少,懒于动作;或……小便黄而数,大便溏而频,或痢出黄如糜,或如泔色”,指出了湿热证的证候表现。小鼠湿热模型中也观察到小鼠眯眼懒动、皮毛污秽脏乱、大便稀溏黏滞,饮水量、食量、体质量减少等系列表现<sup>[6-7]</sup>。

除宏观表现改变外,湿热证小鼠微观因子的变化也被学者广泛研究。炎症反应与“热”“火”密切相关<sup>[12]</sup>。实验研究发现,湿热证患者<sup>[13]</sup>、湿热证小鼠模型<sup>[14]</sup>炎症因子水平均明显升高,提示炎症因子可能是湿热证致病机制之一。侯笙总<sup>[15]</sup>研究发现,湿热环境对血清中的TC、TG、HDL-C、LDL-C具有一定影响。湿热为邪,易困脾土,津液失布散,聚而为痰湿,久则化浊,入血则如“污秽之血”,即现代医学中的高血脂。吕文亮<sup>[16]</sup>认为血脂代谢异常与“湿浊”的形成、输布有密切关系,可以作为湿邪生化物质基础之一。《湿热赘言》记载湿热之邪,易

损伤脾胃功能,导致水谷气化失常,清阳不升,浊阴不降,出现大便次数增多、便质稀溏或黏滞等胃肠功能紊乱的表象。文艳巧等<sup>[17]</sup>发现,湿热证动物模型存在胃肠功能紊乱的情况,动物模型血清、回肠及结肠组织中MTL、SP的含量显著升高,出现稀溏或黏滞等表现。MTL、SP作为胃肠激素,能刺激胃肠运动、促进胃排空,反映胃肠功能。肝脏是能量代谢的重要器官,肝组织中Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶的水平能反映机体能量代谢水平。程方平等<sup>[18]</sup>发现湿热证动物模型出现消瘦、精神食欲不振、肝组织中Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶水平降低等能量代谢减弱的变化,其认为Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶下降是湿热证模型的病理基础之一。水液在肺组织中的转运由肺组织Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶介导的主动转运及水通道蛋白的被动装运完成,线粒体作为能量工厂与水液的主动转运密切相关<sup>[19]</sup>。肺组织中主要表达的是其亚型AQP1、AQP5,不仅与肺组织水液转运、渗出液吸收、呼吸上皮体液稳态密切相关,还与湿热证形成的密切相关<sup>[20]</sup>。

本研究中,内、外湿热因素干预后,小鼠食量、饮水量、体质量下降、证候积分升高,出现明显的炎症反应,以及胃肠功能、血脂代谢、水液转运、能量代谢紊乱情况,是小鼠受湿热之邪胶结,热遏湿伏,蒸腾氤氲,气机阻滞,蕴阻三焦的表现。呼吸道病毒感染主要通过2个方面致病:一是病毒对靶细胞直接损伤;二是激发固有免疫,刺激机体产生炎症反应,产生肺损伤。美国胸科学会官方研讨会报告中指出了动物实验性肺损伤模型的特征和测量指标<sup>[21]</sup>:肺泡-毛细血管屏障的改变,炎症反应,肺生理功能障碍的证据及肺组织损伤的病理学证据。因此本研究从这4个方面出发对模型小鼠的肺损伤情况进行评价。本实验中,BALF炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平的升高提示模型小鼠肺组织中存在炎症反应。这种炎症反应能引起肺泡、毛细血管内膜损伤,导致肺泡-毛细血管渗透性增加,水、细胞、蛋白质渗出。本实验中模型小鼠肺组织W/D值、BALF中总细胞数、总蛋白浓度明显升高,提示肺泡-毛细血管屏障作用破坏。炎症反应能改变肺组织结构及功能。本研究中,病毒模拟物Poly(I:C)干预后。病毒模拟物Poly(I:C)造成了肺组织的病理学损伤,其组织损伤的病理学特征与SARS-CoV-2病毒感染小鼠后造成的损伤特征相似<sup>[8]</sup>。动脉血气分析中PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>作为肺损伤中检测肺生理功能的指标<sup>[22]</sup>,能反映机体缺氧情况。本研究中模型小鼠的PaO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>水平降低,PaCO<sub>2</sub>水平升高。提示模型小鼠肺生理功能出现障碍,发生了缺氧。综上所述,病毒性肺炎湿热证模型构建成功。

肠道菌群通过调节免疫、炎症反应、能量代谢与病毒性肺炎湿热证密切相关。夏淑洁等<sup>[23]</sup>从肠道菌群介导的脂代谢紊乱对痰、湿的病理机制进行了解释。纪丽纯等<sup>[14]</sup>基于肠道菌群变化探讨温病湿热证“湿”“热”的实质,指出拟杆菌可能是“湿”的优势菌属,而乳酸菌可能是“热”的优势菌属。于静波等<sup>[24]</sup>提出湿热证主要涉及能量代谢、炎症反应及肠道菌群等方面。本实验中,模型小鼠肠道菌群的数量及生物多样性均下降,不同组间的肠道菌群发生了明显差异。本研究对差异的优势菌属进行筛选,结果提示属水平,病毒性肺炎湿热证小鼠中拟杆菌、副拟杆菌、屎豆属菌、毛螺菌、NK4A136菌、罗

氏菌、NK4A214菌、埃希氏菌的相对丰度发生了明显变化。随后本研究对差异菌群的功能进行富集,结果提示有需氧化能异养、硝酸盐还原、动物寄生虫或共生体、人类病原体及发酵等功能可能与病毒性肺炎湿热证密切相关。

综上所述,本研究通过内外湿热因素联合气管内滴注病毒模拟物的方法构建病毒性肺炎湿热证“病证结合”模型,从证候学指标、血脂代谢、胃肠功能、能量代谢、水液转运、肺组织炎症及结构损伤、肺生理功能对模型进行评估,证实了该模型符合病毒性肺炎湿热证的病因病机和临床特点、造模方法安全易操作,模型稳定可靠,对“病证结合”理论及“辨证论治”方药研究具有积极意义。基于16SrRNA技术,对肠道菌群及其功能的初步探索,为深入研究病毒性肺炎湿热证提供了实验基础。

#### 参考文献

- [1] LIU X, LIU C, LIU G, et al. COVID-19: Progress in diagnostics, therapy and vaccination [J]. Theranostics, 2020, 10(17):7821–7835.
- [2] 李钦,叶勇,王怀体,等.63例新型冠状病毒肺炎轻型、普通型患者中医证候、病机特点分析[J].云南中医中药杂志,2021,42(8):53–56.
- [3] 买鹏宇,朱闽,叶斌,等.湿热证“病证结合”模型生物学基础研究进展[J].中华中医药杂志,2021,36(12):7248–7251.
- [4] CUI H T, LI Y T, GUO L Y, et al. Traditional Chinese medicine for treatment of coronavirus disease 2019: A review[J].Traditional Medicine Research,2020,5 (2):65–73.
- [5] CHEN F, QU F, JIA Y H, et al. Xiao-Chai-hu decoction ameliorates poly (I:C)-induced viral pneumonia through inhibiting inflammatory response and modulating serum metabolism[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022:1240242.
- [6] 陈弋,王琛,徐秋英,等.两种岭南湿热证小鼠模型肠道菌群动态变化的研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(7):2186–2197.
- [7] 常丽萍.温病湿热证大鼠模型复制及加味藿朴夏苓汤作用机制的探讨[D].南宁:广西医科大学,2011.
- [8] HONG W Q, YANG J Y, BI Z F, et al. A mouse model for SARS-CoV-2-induced acute respiratory distress syndrome[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1):1.
- [9] GRICE E A, KONG H H, CONLAN S, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome[J]. Science, 2009, 324(5931):1190–1192.
- [10] 朱闽,何清湖,苟建宁.中医“湿热证”病证结合动物模型研究进展[J].中华中医药杂志,2017,32(2):656–658.
- [11] 马程功,马跃荣.中医药证候动物模型的研究进展[J].成都中医药大学学报,2018,41(1):119–123.
- [12] 李思敏,包洁,汪琴静,等.氧化应激与实热“上火”的相关性研究[J].世界中医药,2017,12(12):2872–2875.
- [13] 王峰,谢桂权.原发性肾病综合征湿热证与抗炎因子水平相关性的研究[J].辽宁中医杂志,2012,39(1):58–59.
- [14] 纪丽纯,罗子清,马利娟,等.从肠道菌群动态变化及炎症因子探讨温病湿热证实质[J].中药新药与临床药理,2023,34(10):1409–1418.
- [15] 侯笙总.藿朴夏苓汤干预湿热环境下高脂血症大鼠体脂代谢的实验研究[D].广州:广州中医药大学,2014.
- [16] 吕文亮.湿邪与血脂代谢异常关系的探讨[J].河南中医学报,2004,19(3):5–6.
- [17] 文艳巧,姚万玲,杨朝雪,等.郁金散对大肠湿热证模型大鼠血清及肠道组织胃肠激素的影响[J].畜牧兽医学报,2017,48(6):1140–1149.
- [18] 程方平,刘松林,李云海,等.温病湿热证大鼠模型肝线粒体K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup>-ATP酶活力变化的对比研究[J].浙江中医药大学学报,2008,32(2):174–175.
- [19] 苏鑫,胡万利,张胜君.基于能量代谢探讨红景清肺方对PM2.5诱导小鼠肺损伤的保护作用[J].中华中医药学刊,2024,42(1):5–8
- [20] TAN J W, GAO C J, WANG C, et al. Expression of aquaporin-1 and aquaporin-5 in a rat model of high-altitude pulmonary edema and the effect of hyperbaric oxygen exposure[J]. Dose Response, 2020, 18(4):1559325 820970821.
- [21] MATUTE-BELLO G, DOWNEY G, MOORE B B, et al. An official American thoracic society workshop report: Features and measurements of experimental acute lung injury in animals[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(5):725–738.
- [22] CHARRON C, REPESSE X, BOUFERRACHE K, et al. PaCO<sub>2</sub> and alveolar dead space are more relevant than PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio in monitoring the respiratory response to prone position in ARDS patients: A physiological study[J]. Crit Care, 2011, 15(4):R175.
- [23] 夏淑洁,米丽芬,沈姗怡,等.基于肠道菌群-脂代谢探讨代谢综合征痰证的微观辨证[J].北京中医药大学学报,2023,46(11):1517–1522.
- [24] 于静波,韩越,谢新,等.脾胃湿热证大鼠模型的尿液代谢组学分析[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(10):166–173.

(收稿日期:2024-05-28 编辑:罗英姣)