达原饮对RSV寒湿郁肺证小鼠肺部损伤和肠道菌群的影响Δ

张　茹[1*]，杜海涛[2]，王晓雪[1]，王　仪[2]，周　倩[2]，刘善新[2]，王　平[2#]（1.山东中医药大学药学院，济南　250355；2.山东省中医药研究院，济南　250014）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）24-3000-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.24.08

摘　要　目的　探讨达原饮对RSV寒湿郁肺证小鼠肺部损伤和肠道菌群的影响。**方法**　将36只BALB/c小鼠分为正常组（NC组）、模型组（MC组）、阳性对照组（LBM组，利巴韦林57.59 mg/kg）和达原饮低、中、高剂量组（LDYY、MDYY、HDYY组，达原饮按生药量计1.67、3.34、6.68 g/kg），每组6只。除NC组外，其余各组小鼠采用“寒湿造模+RSV感染”的方式建立RSV寒湿郁肺证小鼠模型；于第2次寒湿刺激结束后，鼻腔滴注50倍半数细胞培养物感染量的RSV液，每天1次，连续3 d；各药物组于每次滴鼻4 h后灌胃相应药液，每天1次，连续5 d。检测小鼠血清中胃动素（MTL）、胃泌素（GAS）水平，肺组织上清液中白细胞介素6（IL-6）、IL-1β水平，外周血淋巴细胞百分比；观察肺组织病理形态变化并分析肠道菌群变化。**结果**　与MC组比较，达原饮各组小鼠血清中MTL水平（HDYY组除外）和肺组织上清液中IL-6、IL-1β水平均显著降低，血清中GAS水平（HDYY组除外）均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），肺组织病理状态均改善；LDYY组外周血中T淋巴细胞的百分比和MDYY组外周血中T、B淋巴细胞的百分比均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。与NC组比较，MC组中拟杆菌门、放线菌门、拟杆菌属、另枝菌属、拟杆菌纲、产酸拟杆菌、拟普雷沃氏菌属等呈高丰度表达，厚壁菌门、变形菌门、毛螺菌属NK4A136组、丝状菌属、未分类的*Clostridiales*等呈低丰度表达；经中剂量达原饮干预后，各菌群相对丰度均有回调趋势，其差异物种包括*Lachnospiraceae_UCG-006*、瘤胃球菌属*Ruminococcus*等。**结论**　达原饮能够减轻RSV寒湿郁肺证小鼠的肺部损伤，其机制可能与减轻炎症、调节胃肠激素水平和淋巴细胞百分比以及肠道有益菌和有害菌的相对丰度有关。

关键词　达原饮；呼吸道合胞病毒；寒湿郁肺证；肠道菌群

Effects of Dayuanyin decoction on lung injury and gut microbiota in mice with RSV-Hanshi yufei syndrome

ZHANG Ru[1], DU Haitao[2], WANG Xiaoxue[1], WANG Yi[2], ZHOU Qian[2], LIU Shanxin[2], WANG Ping[2]（1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of Dayuanyin decoction (DYY) on lung injury and gut microbiota in mice with RSV-Hanshi yufei syndrome. **METHODS** Thirty-six BALB/c mice were divided into the normal group (NC group), model group (MC group), positive control group (LBM group, 57.59 mg/kg ribavirin), DYY low-dose, medium-dose and high-dose groups (LDYY, MDYY, HDYY groups, 1.67, 3.34, 6.68 g/kg, calculated by crude drug), with 6 mice in each group. Except for NC group, RSV-Hanshi yufei syndrome model was induced by "Hanshi modeling+RSV infection"; after the second cold and wet stimulation, RSV solution was dripped into the nasal cavity at 50% tissue culture infectious dose, once a day, for 3 consecutive days; each administration group was given corresponding solution intragastrically 4 hours after each nasal drip, once a day, for 5 consecutive days. The levels of motilin (MTL) and gastrin (GAS) in serum, the levels of IL-6 and IL-1β in supernatant of lung tissue, and the percentage of peripheral blood lymphocytes were all determined. The pathological changes of lungs were observed, and the changes of gut microbiota were analyzed. **RESULTS** Compared with MC group, the levels of MTL in serum (except for HDYY group), and the levels of IL-6 and IL-1β in supernatant of lung tissue were all decreased significantly in DYY groups, while the level of GAS (except for HDYY group) in serum was increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The pathology of lung tissue was improved, the percentage of T lymphocytes in LDYY group and the percentages of T lymphocyte and B lymphocyte in MDYY group were all increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the NC group, Bacteroidetes, Actinobacteria, *Bacteroides*, *Alistipes*, Bacteroidota, *Bacteroides acidfaciens* and *Alloprevotella* were expressed in high abundance, while Firmicutes, Proteobacteria, *Lachnospiraceae* NK4A136 group, *Kineothrix* and *Clostridiales* unclassified were expressed in low abundance. After the intervention of medium-dose DYY, the relative abundance of each microbiota tended to be adjusted back, with different species including *Lachnospiraceae_UCG-006*, *Ruminococcus*, etc. **CONCLUSIONS** Dayuanyin decoction

Δ**基金项目**　山东省重点研发计划（重大科技创新工程）项目（No. 2020CXGC010505-04）；国家重点研发计划政府间国际科技创新合作项目（No.2019YFE0117800）；山东省重点研发计划（科技示范工程）项目（No.2021SFGC1205）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药药理学。电话：0531-82949847。E-mail：zhangru793@163.com

＃**通信作者**　研究员，硕士生导师。研究方向：中药药理学。电话：0531-82949825。E-mail：wangpingjinan@126.com

can reduce the lung injury caused by RSV, the mechanism of which may be associated with relieving inflammation, regulating gastrointestinal hormone levels, the percentage of lymphocytes and the abundance of beneficial and harmful bacteria in the intestinal tract.

KEYWORDS Dayuanyin decoction; respiratory syncytial virus; Hanshi yufei syndrome; gut microbiota

呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus，RSV）属副黏病毒科，是引起婴幼儿下呼吸道感染的常见病原体之一[1]。对于RSV的防治，目前世界范围内尚无特异性药物和疫苗。中医药治疗病毒感染具有多成分、多途径、多靶点的独特优势，其不仅针对某一特定病毒，而且可就病因病机进行辨证论治。RSV感染属中医“疫病”范畴，有证据表明在寒湿环境下，机体对RSV的易感性有所增加[2]。达原饮源自《温疫论》，由槟榔、厚朴、草果、知母、芍药、黄芩、甘草7味药组成，可开达膜原、辟秽化浊，治疗疟疾、瘟疫邪伏膜原等病证。现代药理学研究表明，达原饮具有抗病毒、解热、抗炎等多种药理作用，可用于治疗呼吸道病毒感染导致的肺部损伤[3-5]。

“肺与大肠相表里”是中医藏象学的经典理论之一。临床调查发现，呼吸道病毒在引发肺部损伤的同时，还会导致患者肠道菌群失衡，出现恶心、呕吐、腹痛、腹泻等胃肠道症状[6]。益生菌混合物能通过调节肠道菌群的组成来调控肺泡巨噬细胞分泌干扰素β，从而有效防治RSV引起的肺部病变[7]。可见，肠道菌群的改变对呼吸道病毒感染的发生、发展和治疗起重要作用。

为了更好地贴合RSV流行时的气候条件，符合“寒湿疫”的中医证候表现，本研究拟采用“寒湿造模+RSV感染”的方式建立RSV寒湿郁肺证小鼠模型，同时在前期药效学实验的基础上，通过16S rDNA技术探索达原饮对模型小鼠肠道菌群的影响，从而阐明其潜在作用机制，为中医药治疗RSV感染提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括TC20TM型细胞计数仪、XJ-023型酶标仪（美国Bio-Rad公司），FACSAria Ⅲ型流式细胞仪（美国BD公司），X-30R型全能高速冷冻离心机（美国Allegra公司），A200型基因扩增仪（杭州朗基科学仪器有限公司），EPS300型电泳仪、Tanon-2500型凝胶成像仪（上海天能生命科学有限公司），NovaSeq 6000系统测序仪（美国Illumina公司），2100型生物分析仪（美国Agilent公司）等。

1.2 主要药品与试剂

槟榔、厚朴、草果、知母、白芍、黄芩、甘草饮片均购自山东建联盛嘉中药有限公司，经山东省中医药研究院周倩研究员鉴定，分别为棕榈科植物槟榔*Areca catechu* L.的干燥成熟种子，木兰科植物厚朴*Magnolia officinalis* Rehd. et Eils.的干燥干皮、根皮及枝皮，姜科植物草果*Amomum tsaoko* Crevost et Lemaire的干燥成熟果实，百合科植物知母*Anemarrhena asphodeloides* Bge.的干燥根茎，毛茛科植物芍药*Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根，唇形科植物黄芩*Scutellaria baicalensis* Georgi的干燥根，豆科植物甘草*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根和根茎。

利巴韦林原料药（批号J1202A，纯度≥99%）购自大连美仑生物技术有限公司；异氟烷（批号20092202）购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司；小鼠白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、IL-1β酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（批号分别为A21020726、A201B20634）均购自杭州联科生物技术股份有限公司；小鼠胃动素（motilin，MTL）、胃泌素（gastrin，GAS）ELISA试剂盒（批号分别为20220620、20220612）均购自上海酶联生物技术有限公司；苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色套装（批号G1003）购自武汉赛维尔生物科技有限公司；4%多聚甲醛通用性组织固定液、红细胞裂解液（批号分别为22105339、22118166）均购自北京兰杰柯科技有限公司；藻红蛋白标记的抗小鼠CD45R/B220抗体、别藻青蛋白标记的抗小鼠CD8a抗体、Alexa Fluor® 700标记的抗小鼠CD3抗体、异硫氰酸荧光素标记的抗小鼠CD4抗体、7-氨基放线菌素D活性检测染料（批号分别为B357370、B348049、B357069、B356714、B321733）均购自美国Bio-Legend公司。

1.3 病毒毒株与细胞

RSV病毒液由山东省医学科学院基础医学研究所提供，于山东中医药大学BSL-2实验室传代，置于－80 ℃冰箱保存，备用。人喉癌细胞HEP-2由山东省医学科学院基础医学研究所提供。

1.4 实验动物

SPF级雌性BALB/c小鼠36只，体重13～15 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号为SCXK（京）2021-0006。所有小鼠均饲养于山东中医药大学动物实验中心ABSL-2实验室。本实验遵循3R原则动物福利，实验方案按山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会相关规定执行并获批准（批件号SDUTCM20230510001）。

2 方法

2.1 达原饮制备

取达原饮经方组成中槟榔、厚朴、草果、知母、白芍、黄芩、甘草7味中药饮片，加10倍量水浸泡30 min后，煎煮1 h，过滤；再加8倍量水煎煮45 min，过滤；合并2次滤液，浓缩至1 g/mL（按生药总量计），于4 ℃保存，备用。

2.2 RSV扩增

待HEP-2细胞长成单层后，加入RSV病毒液200 μL，吸附1 h后，加入2%DMEM维持液培养。当90%以上细胞出现致细胞病变效应后，于－20 ℃与室温之间反复冻融3次，以4 000 r/min离心5 min，取上清液于离心管中，于－80 ℃冻存，备用。

2.3 RSV半数细胞培养物感染量的测定

将HEP-2细胞按1×10^8个/L接种至96孔板中，培养24 h；加入以10倍比稀释12个滴度梯度的RSV病毒液，每孔100 μL，纵向重复3孔；同时，设置正常细胞（加入等体积10%DMEM维持液）作为对照。培养48 h，采用MTT法以酶标仪于490 nm波长处测定各孔的光密度（optical density，OD）值，重复测定4次。根据Reed-Muench公式[8]计算RSV半数细胞培养物感染量（median tissue culture infective dose，$TCID_{50}$）。

2.4 小鼠分组、给药与造模

小鼠适应性饲养3 d后，按体重分为正常组（NC组，生理盐水）、模型组（MC组，生理盐水）、阳性对照组（LBM组，57.59 mg/kg利巴韦林，相当于临床等效剂量）和达原饮低、中、高剂量组（LDYY、MDYY、HDYY组，剂量按生药量计分别为1.67、3.34、6.68 g/kg，相当于临床等效剂量的0.5、1、2倍），每组6只。根据课题组前期研究方法[9]复制RSV寒湿郁肺证小鼠模型：除NC组外，其余各组小鼠均置于温度（4±1）℃、相对湿度（90±5）%的人工气候箱中，每天4 h，连续5 d，寒湿造模期间禁食、不禁水，刺激4 h后取出。第2次寒湿刺激结束后，除NC组外的其余各组小鼠均吸入异氟烷麻醉，并鼻腔滴注50倍$TCID_{50}$的RSV病毒液60 μL，每天1次，连续3 d；NC组小鼠同法滴鼻等体积生理盐水。各药物组小鼠每次滴鼻4 h后灌胃相应药液，NC组和MC组小鼠同法灌胃等体积的生理盐水，每天1次，持续5 d。

2.5 标本采集与处理

末次给药后，所有小鼠禁食、不禁水12 h，摘眼球取血并置于乙二胺四乙酸抗凝采血管和普通采血管中。抗凝采血管中的血样用于流式检测；普通采血管中的血样于室温下静置2 h后，以3 000 r/min离心15 min，收集上层血清，于－80 ℃保存，备用。取血后，收集小鼠结肠内容物于无菌冻存管中，于－80 ℃保存，备用。然后，处死小鼠，开胸剖取肺组织，将其左小叶用4%多聚甲醛浸润、固定；取其右肺最大叶称重后加入适量磷酸盐缓冲液，匀浆后以3 000 r/min离心10 min，收集上清液，于－80 ℃保存，备用；其余肺组织于－80 ℃下保存，备用。

2.6 血清中胃肠激素水平和肺组织上清液中炎症因子水平测定

取“2.5”项下各组小鼠血清和肺组织上清液，严格按照ELISA试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测其血清胃肠激素（MTL、GAS）水平和肺组织上清液中炎症因子（IL-6、IL-1β）水平。

2.7 外周血淋巴细胞百分比检测

取“2.5”项下各组小鼠外周血100 μL，加入CD8a、CD3、CD4抗体各1.25 μL，涡旋混匀，于4 ℃下避光染色20 min；加入7-氨基放线菌素D活性检测染料适量，孵育10 min；加入红细胞裂解液1 mL，涡旋混匀，于室温下静置15 min，以2 000 r/min离心5 min，弃去上清液；细胞加入磷酸盐缓冲液2 mL，以2 000 r/min离心5 min，弃取上清液；细胞以磷酸盐缓冲液200 μL重悬后转移至流式管中，使用流式细胞仪进行检测其外周血淋巴细胞百分比。

2.8 肺组织病理形态观察

取“2.5”项下各组小鼠经固定的肺组织，进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片，经HE染色后，以中性树胶封片。使用显微镜观察其肺组织病理形态变化并拍照。

2.9 小鼠肠道菌群基因测序

以NC组、MC组、MDYY组（前述药效学实验结果显示中剂量达原饮药效最佳）小鼠的结肠内容物为检测样本，采用十六烷基三甲基溴化铵法提取样本的DNA，通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计分别确定所提取DNA的质量和数量。以该DNA为模板，对16S rDNA V3～V4区进行扩增，引物序列为806R：GACTACHVGGGTATCTAATCC；341F：CCTACGGGNGGCWGCAG；序列方向长度为806R-341F，产物长度为465 bp[10]。PCR扩增产物通过2%琼脂糖凝胶电泳进行检测，并回收目标片段；对纯化后的PCR产物进行评估，将合格的测序文库梯度稀释，根据所需测序量按相应比例混合，并经NaOH变性为单链后上机测序。得到原始下机数据后，利用Overlap软件将双端数据进行拼接，并进行质控、嵌合体过滤。测序数据经过DADA2去噪后，利用扩增序列变体（amplicon sequence variants，ASVs）概念构建操作分类单元（operational taxonomic units，OTU）表，获得最终的ASVs特征表及特征序列并进行菌群α多样性分析（Shannon、Simpson、Chao1、Goods_coverage指数）、肠道结构分析和线性判别分析（linear discriminant analysis effect size，LEfSe）。

2.10 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0.2软件进行统计分析和作图。数据以$\bar{x}\pm s$表示，对于符合正态分布且方差齐的数据，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD-t检验；对于非正态分布或者方差不齐的数据，组间比较采用非参数秩和检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 达原饮对小鼠血清胃肠激素水平和肺组织上清液中炎症因子水平的影响

与NC组比较，MC组小鼠血清中MTL水平和肺组织上清液中IL-6、IL-1β水平均显著升高，血清中GAS水平显著降低（$P<0.01$）。与MC组比较，各药物组小鼠血

清中MTL水平（HDYY组除外）和肺组织上清液中IL-6、IL-1β水平均显著降低，血清中GAS水平（HDYY组除外）均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表1。

表1　各组小鼠血清中胃肠激素水平和肺组织上清液中炎症因子水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，pg/mL）

组别	MTL	GAS	IL-6	IL-1β
NC组	176.61±6.65	67.79±2.06	44.63±3.36	102.02±9.30
MC组	290.32±2.99[a]	51.44±2.01[a]	97.37±3.72[a]	297.80±12.06[a]
LBM组	248.81±9.99[b]	60.57±1.99[b]	75.28±5.80[b]	172.73±9.95[b]
LDYY组	253.48±5.48[c]	57.39±4.14[c]	89.30±2.81[c]	214.12±7.42[b]
MDYY组	250.91±5.90[b]	59.14±4.67[b]	75.55±7.40[b]	190.34±4.41[b]
HDYY组	279.71±2.96	56.11±2.71	88.95±4.62[c]	262.40±9.73[c]

a：与NC组比较，$P<0.01$；b：与MC组比较$P<0.01$；c：与MC组比较，$P<0.05$。

3.2　达原饮对小鼠外周血淋巴细胞百分比的影响

与NC组比较，MC组小鼠外周血中T、B淋巴细胞百分比均显著降低（$P<0.01$）；与MC组比较，LBM组小鼠外周血中T、B淋巴细胞百分比均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），LDYY组小鼠外周血中T淋巴细胞百分比和MDYY组小鼠外周血中T、B淋巴细胞百分比均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表2。

表2　各组小鼠外周血淋巴细胞百分比测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，%）

组别	$CD4^+$T淋巴细胞	$CD8^+$T淋巴细胞	B淋巴细胞
NC组	46.86±5.05	22.70±6.25	17.34±2.63
MC组	22.54±8.72[a]	9.88±4.46[a]	10.76±3.30[a]
LBM组	38.68±4.66[b]	21.27±5.73[b]	16.13±2.51[c]
LDYY组	32.99±9.29[c]	19.35±7.17[c]	14.01±3.25
MDYY组	37.28±5.67[b]	21.02±7.41[c]	16.01±2.62[c]
HDYY组	27.35±5.39	15.94±4.74	13.62±2.16

a：与NC组比较，$P<0.01$；b：与MC组比较$P<0.01$；c：与MC组比较，$P<0.05$。

3.3　达原饮对小鼠肺组织病理形态的影响

NC组小鼠肺部组织结构完整，间质未见明显的炎症细胞渗出和淤血等病理变化；MC组小鼠肺组织有大面积出血片状红染，支气管周围有炎症细胞浸润，肺泡壁明显增厚。与MC组比较，各给药组小鼠肺组织病理状态均改善，尤以LBM组和MDYY组的改善效果更明显。结果见图1（LDYY组和HDYY组的图片略）。

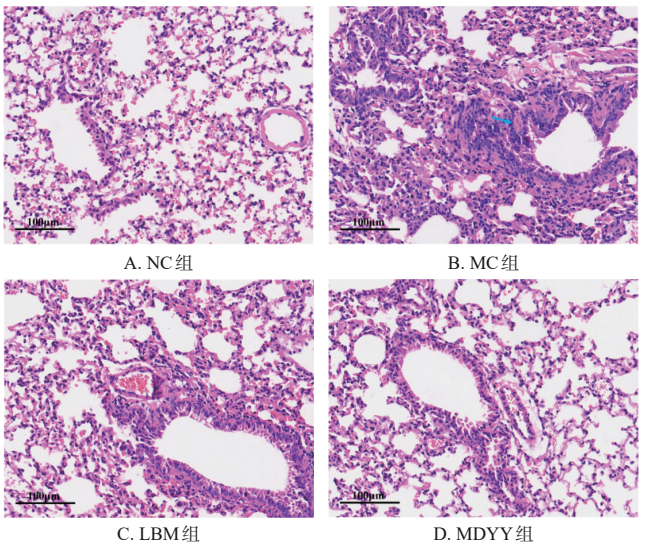
3.4　达原饮对小鼠肠道菌群结构和组成的影响

3.4.1　α多样性

3组样本的Goods_coverage指数均接近1，表明检测深度已经基本涵盖了样品中的所有物种，能够反映各样本的微生物群落情况[10]。与NC组比较，MC组的Simpson、Shannon、Chao1指数均有所增加；与MC组比较，MDYY组上述指数均有所降低，提示达原饮干预后肠道菌群多样性有回调趋势。结果见表3。

3.4.2　门水平下肠道菌群差异及相对丰度

在门水平上，BALB/c小鼠的优势菌群主要有厚壁菌门Firmicutes、拟杆菌门Bacteroidetes、变形菌门Proteobacteria、放线菌门Actinobacteria等，其中厚壁菌门和



A. NC组　B. MC组　C. LBM组　D. MDYY组

蓝色箭头：炎症细胞。

图1　小鼠肺组织病理形态观察的显微图（HE染色）

表3　各组小鼠肠道菌群α多样性分析结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	Shannon指数	Simpson指数	Chao1指数	Goods_coverage指数
NC组	6.26±0.36	0.95±0.02	542.05±64.27	0.99
MC组	6.92±0.19	0.98±0.01	595.88±123.09	0.99
MDYY组	6.53±0.39	0.95±0.02	529.84±75.75	0.99

拟杆菌门占比较大。与NC组比较，MC组厚壁菌门（$P<0.01$）和变形菌门（$P>0.05$）的相对丰度均有所减少，拟杆菌门（$P<0.01$）和放线菌门（$P>0.05$）的相对丰度均有所增加，MC组小鼠拟杆菌门/厚壁菌门比值增大。与MC组比较，MDYY组拟杆菌门的相对丰度有所降低，厚壁菌门的相对丰度显著增加（$P<0.01$）；此外，放线菌门和变形菌门水平也有回调趋势，但差异均无统计学意义（$P>0.05$），提示达原饮可以改善模型小鼠的肠道菌群失调。结果见图2。

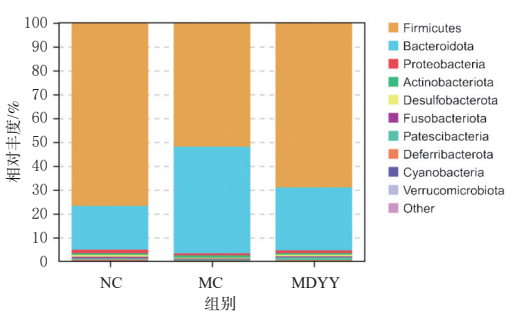


图2　各组小鼠门水平下肠道菌群结构分析

3.4.3　属水平下肠道菌群差异及相对丰度

在属水平上，各组小鼠肠道菌群主要以毛螺菌属NK4A136组*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、未分类的*Muribaculaceae*、另枝菌属*Alistipes*、未分类的*Clostridiales*、未分类梭菌属UCG-014、拟普雷沃氏菌属*Alloprevotella*、丝状菌属*Kineothrix*和拟杆菌属*Bacteroides*等为主。与NC组比较，MC组小鼠毛螺菌属NK4A136组、丝状菌属和未分类*Clostridiales*的相对丰度均显著减少（$P<0.01$），拟杆菌属、另枝菌属、未分类*Muribacu-*

laceae、拟普雷沃氏菌属的相对丰度虽有所增加，但差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与MC组比较，MDYY组小鼠毛螺菌属NK4A136组和丝状菌属相对丰度均显著增加（$P<0.05$或$P<0.01$），未分类*Muribaculaceae*的相对丰度显著降低（$P<0.01$），此外未分类的*Clostridiales*、拟杆菌属、另枝菌属、拟普雷沃氏菌属水平也呈现回调趋势，但差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图3。

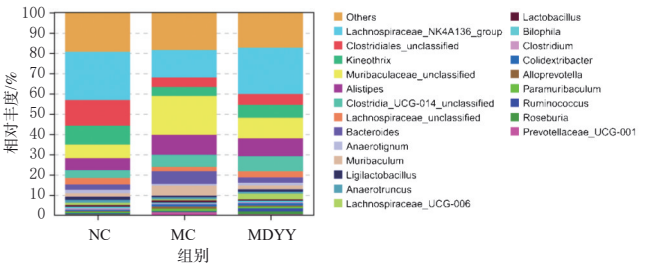


图3　各组小鼠属水平下肠道菌群结构分析

3.4.4　LEfSe多级物种差异

LEfSe结果显示，NC组对群落结构影响较大的差异物种有厚壁菌门、梭菌目、毛螺菌科等[线性判别分析（linear discriminant analysis，LDA）值>4[11]，下同]。MC组中对群落结构影响较大的差异物种有拟杆菌纲、*Muribaculaceae*、*Muribaculum*、产酸拟杆菌等。MDYY组中对群落结构影响较大的差异物种有*Lachnospiraceae_UCG-006*、瘤胃球菌属*Ruminococcus*等。结果见图4。

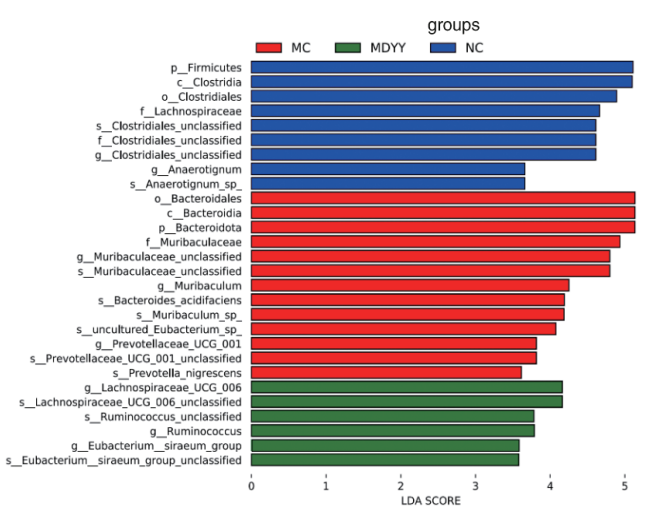


图4　LEfSe的LDA柱状图

4　讨论

为了更加贴合RSV流行时的气候条件，符合“寒湿疫”的中医证候表现，本研究采用了“寒湿造模+RSV感染”的方式建立RSV寒湿郁肺证小鼠模型。结果显示，与NC组比较，MC组小鼠肺组织有明显病变，血清中MTL水平和肺组织上清液中IL-1β、IL-6水平均显著升高，血清中GAS水平显著降低。此外，模型小鼠外周血中$CD4^+$、$CD8^+$T淋巴细胞百分比和B淋巴细胞百分比均显著降低，这些特征与文献报道的“寒湿疫”动物模型相吻合[12]。

本研究使用不同剂量的达原饮对模型小鼠进行干预，发现小鼠肺部病理、肺组织炎症因子水平、血清中胃肠激素水平和T、B淋巴细胞百分比均得到显著改善，有效缓解了RSV感染引起的肺部损伤。但达原饮并没有呈现明显的量效关系，这可能是由于高剂量达原饮苦味较大，灌胃时小鼠比较抗拒，导致给药量不达标所致。

肠道菌群可调节宿主的免疫反应，参与人体各系统重要的生理功能，影响多种疾病的发生发展，被称为“人类第二基因组”。在正常情况下，宿主与肠道微生物维持着相对动态平衡；当肠道菌群失衡，会引发宿主屏障、免疫等功能丧失，从而加重甚至诱发疾病[13]。本研究运用16S rDNA技术发现，与NC组比较，MC组小鼠的肠道菌群丰度与多样性均有所增加。经中剂量达原饮干预后，小鼠肠道菌群的多样性及丰度均明显回调，表明该方能改善RSV寒湿郁肺证小鼠的肠道菌群紊乱。BALB/c小鼠的肠道菌群主要由四大菌门组成，其中以拟杆菌门和厚壁菌门为主，还包括变形菌门和放线菌门[14]。本研究发现，MC组小鼠肠道菌群的结构及丰度发生了显著变化。首先在门水平上，MC组小鼠拟杆菌门/厚壁菌门比值增大，这与Groves等[15]报道的RSV感染小鼠体内拟杆菌门相对丰度增加、厚壁菌门丰度相对减少的结果一致。厚壁门菌属以抗性淀粉和膳食纤维为底物，产生短链脂肪酸（short-chain fatty acids，SCFAs），SCFAs不仅是维持肠道黏膜细胞功能的主要能量来源，对机体免疫系统也具有重要意义[16]。厚壁菌门产生的SCFAs以具有抗炎活性的丁酸盐为主，从而影响免疫细胞的迁移和黏附、细胞因子表达等信号通路的激活[17]。因此，厚壁菌门丰度降低会造成肠道菌群失衡，影响机体免疫力，造成病原清除障碍，使炎症持续存在，从而加重呼吸道病毒疾病的发展。

在属水平上，中剂量达原饮能显著回调有益菌毛螺菌属NK4A136组的相对丰度水平。既往研究发现，毛螺菌属NK4A136组能够保护颗粒物或病原微生物引起的肺损伤，其机制可能与调节免疫、减轻炎症及氧化反应有关[18]。毛螺菌科是丁酸盐的主要生成者，丁酸可抑制炎症反应，保护肠黏膜。毛螺菌属NK4A136组的增加与亚精胺介导的肠道屏障功能增强相关[18]，其在MC组小鼠体内呈低丰度表达，可能与模型小鼠的炎症状态有关。本研究认为，毛螺菌属NK4A136组可能在减轻RSV引起的肺损伤中发挥了关键作用。

本研究进一步分析了NC组、MC组和MDYY组肠道菌群的多级物种差异，结果发现，MDYY组的主要差异物种有*Lachnospiraceae_UCG-006*和瘤胃球菌属。有研究报道，*Lachnospiraceae_UCG-006*相对丰度与肺部疾病密切相关，肺癌患者和小鼠粪便中*Lachnospiraceae_UCG-006*、瘤胃球菌属的相对丰度和SCFAs的含量均明显减少[19-20]。

综上所述，达原饮可能通过改善小鼠肺组织损伤、减轻炎症、调节胃肠激素水平和淋巴细胞百分比来减轻

RSV感染引起的肺部损伤；同时，达原饮还可能通过优化肠道菌群结构、调节有益菌和有害菌的相对丰度来改善肺部损伤。

参考文献

[1] BONT L，CHECCHIA P A，FAUROUX B，et al. Defining the epidemiology and burden of severe respiratory syncytial virus infection among infants and children in Western countries[J]. Infect Dis Ther，2016，5(3)：271-298.

[2] 李艳彦，李俊莲，马彦平，等. 不同外邪对小鼠呼吸道合胞病毒含量影响的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志，2013，8(3)：279-282.
LI Y Y，LI J L，MA Y P，et al. Experimental research of the impacts of different exogenous pathogens on the content of respiratory syncytial virus in mice[J]. World J Integr Tradit West Med，2013，8(3)：279-282.

[3] 王静，吴倩，于丽秀，等. 达原饮抗新型冠状病毒肺炎的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志，2021，37(4)：466-468.
WANG J，WU Q，YU L X，et al. Research status of dayuanyin against corona virus disease 2019[J]. Chin J Clin Pharmacol，2021，37(4)：466-468.

[4] 任慧玲，严彪，梁之桃，等. 达原饮解热作用研究及UPLC-Q-TOF/MS分析[J]. 中成药，2015，37(1)：131-137.
REN H L，YAN B，LIANG Z T，et al. Antifebrile effect of Dayuanyin and its determination by UPLC/Q-TOF-MS[J]. Chin Tradit Pat Med，2015，37(1)：131-137.

[5] 王建美，王冉冉，袁天翊，等. 达原饮通过NF-κB信号通路预防低氧性肺动脉高压作用及机制研究[J]. 药学学报，2023，58(4)：928-937.
WANG J M，WANG R R，YUAN T Y，et al. The preventive effect and mechanism of Dayuanyin in hypoxic pulmonary hypertension through NF-κB signaling pathway [J]. Acta Pharm Sin，2023，58(4)：928-937.

[6] LIN L，JIANG X Y，ZHANG Z L，et al. Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection[J]. Gut，2020，69(6)：997-1001.

[7] JI J J，SUN Q M，NIE D Y，et al. Probiotics protect against RSV infection by modulating the microbiota-alveolar-macrophage axis[J]. Acta Pharmacol Sin，2021，42(10)：1630-1641.

[8] LIANG Y Y，LI K W，NIU F J，et al. *Salvia plebeia* R. Br. polysaccharides（SPP）against RSV（respiratory syncytial virus）infection：antiviral effect and mechanisms of action [J]. Biomedecine Pharmacother，2021，141：111843.

[9] 张茹，王晓雪，杜海涛，等. 基于代谢组学研究经典名方达原饮对RSV寒湿郁肺证小鼠模型的作用机制[J/OL]. 中华中医药学刊：1-13[2023-09-10]. https：//kns. cnki. net/kcms/detail/21.1546.R.20230726.0846.002.html.
ZHANG R，WANG X X，DU H T，et al. Mechanism of famous classical formula Dayuanyin decoction in treatment of mice model with RSV and Hanshi yufei syndrome based on metabonomics[J/OL]. Chin Arch Trad Chin Med：1-13[2023-09-10]. https：//kns. cnki. net/kcms/detail/21.1546.R.20230726.0846.002.html.

[10] 何文娇，胡甜，石晶晶，等. 基于16S rDNA技术研究黄连解毒汤对db/db糖尿病小鼠肠道菌群的影响[J]. 中华中医药杂志，2021，36(8)：5024-5028.
HE W J，HU T，SHI J J，et al. Effects of Huanglian Jiedu Decoction on gut microbiota in db/db mice based on 16S rDNA sequencing technology[J]. China J Tradit Chin Med Pharm，2021，36(8)：5024-5028.

[11] SEGATA N，IZARD J，WALDRON L，et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biol，2011，12(6)：R60.

[12] 耿子涵，包蕾，郭姗姗，等. 人冠状病毒229E寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠模型的建立及评价[J]. 中国比较医学杂志，2022，32(1)：3-12，67.
GENG Z H，BAO L，GUO S S，et al. Establishment and evaluation on a mouse model combing disease with syndrome of hCoV-229E pneumonia with “Hanshi Yidu Xifei” syndrome[J]. Chin J Comp Med，2022，32(1)：3-12，67.

[13] HOOPER L V，LITTMAN D R，MACPHERSON A J. Interactions between the microbiota and the immune system [J]. Science，2012，336(6086)：1268-1273.

[14] 黄树武，闵凡贵，王静，等. 常用小鼠、大鼠肠道菌群比较研究[J]. 中国实验动物学报，2021，29(6)：777-784.
HUANG S W，MIN F G，WANG J，et al. Comparative study of intestinal flora in common mice and rats[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin，2021，29(6)：777-784.

[15] GROVES H T，CUTHBERTSON L，JAMES P，et al. Respiratory disease following viral lung infection alters the murine gut microbiota[J]. Front Immunol，2018，9：182.

[16] DE VOS W M，TILG H，VAN HUL M，et al. Gut microbiome and health：mechanistic insights[J]. Gut，2022，71(5)：1020-1032.

[17] RODUIT C，FREI R，FERSTL R，et al. High levels of butyrate and propionate in early life are associated with protection against atopy[J]. Allergy，2019，74(4)：799-809.

[18] JIANG Q L，XU Q，KENÉZ Á，et al. Klebsiella pneumoniae infection is associated with alterations in the gut microbiome and lung metabolome[J]. Microbiol Res，2022，263：127139.

[19] YAO Y，FENG S Y，LI X J，et al. Litchi procyanidins inhibit colon cancer proliferation and metastasis by triggering gut-lung axis immunotherapy[J]. Cell Death Dis，2023，14(2)：109.

[20] CHEN S，GUI R，ZHOU X H，et al. Combined microbiome and metabolome analysis reveals a novel interplay between intestinal flora and serum metabolites in lung cancer[J]. Front Cell Infect Microbiol，2022，12：885093.

（收稿日期：2023-04-18　修回日期：2023-11-21）
（编辑：邹丽娟）