

实验研究

小鼠流感病毒性肺炎模型中肠道的病变及在
中医理论研究中的应用

张淑静 吴莹 齐晓宇 葛东宇 李根茂 玄子男 王谦 王旭丹 李姝玉

(北京中医药大学基础医学院,北京,100029)

摘要 目的:建立小鼠流感性肺炎模型,明确呼吸道流感病毒感染过程中是否存在特异性的肠道病理损伤,并探讨了其在“肺与大肠相表里”研究中的应用。方法:BALB/c 小鼠 48 只随机分为正常组、病毒组。病毒组给予 50 μ L、50LD₅₀ 病毒液滴鼻建立流感病毒感染的小鼠肺炎模型,感染后第 3、5、6 天分别取材,HE 染色检测肺脏、大肠、小肠、心脏、肝脏、肾脏组织病理结果,血生化检测血清谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)和尿素氮(BUN)水平。结果:流感病毒感染后,病毒组小鼠肺组织出现明显的炎性病变外,随时间延长肺组织充血水肿出血加重;小肠黏膜腺体排列紊乱,绒毛粗大、部分脱落,黏膜固有层炎性细胞浸润;大肠黏膜固有层、肌层大量炎性细胞浸润,腺体结构消失、脱落;而心脏、肝脏、肾脏无明显病理改变;病毒组小鼠血清 AST、ALT、BUN 较正常组相比,差异无统计学意义。结论:小鼠流感病毒性肺炎模型中存在小肠、大肠特异性免疫病理损伤,是研究中医“肺与大肠相表里”理论及相关临床治法的理想模型。

关键词 流感病毒;肺炎;肠道免疫病理;肺与大肠相表里

**Pathological Damage of Intestine in the Viral Pneumonia Mouse Model and its Application
in the Theoretical Research of Traditional Chinese Medicine**

Zhang Shujing, Wu Ying, Qi Xiaoyu, Ge Dongyu, Li Genmao, Xuan Zinan, Wang Qian, Wang Xudan, Li Shuyi

(Basic Medical Science College of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To establish viral pneumonia mouse models infected by influenza virus, and observe whether there is a specific intestinal pathological damage in the process of respiratory influenza virus infection, then discuss its application on the research of the theory “the lung and the large intestine being interior-exteriorly related” in Traditional Chinese Medicine. **Methods:** A total of 48 BALB/c mice were randomly divided into the normal group and the virus group. Influenza virus 50 μ L 50 LD₅₀ and mouse lung-adapted strain, was intranasally inoculated to the virus group. On the 3, 5 and 6 day of infection, HE staining was used to detect the pathologic changes /in lungs, large intestines, small intestines, hearts, livers and kidneys. In addition, blood biochemistry was used to detect the levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea nitrogen (BUN) in serum. **Results:** After infection, the lungs of the mice in the virus group showed obvious inflammatory pathological changes, and hyperemia edema, hemorrhage in the lung tissues aggravated with time; the arrangement of mucosal glands in the small intestines was disordered with the villus swelling and partial detachment, and the mucosa lamina propria was infiltrated with lots of inflammatory cells; the large intestine lamina propria and the muscular layer has been infiltrated with large number of inflammatory cells and the muscle layer glandular structures disappeared. However, the heart, liver and kidney had no obvious pathological changes, and the AST, ALT, BUN levels in the virus group showed no significant difference. **Conclusion:** The viral pneumonia mouse model infected with influenza virus exists specific immunologically pathological damage in the small intestine and the large intestine. It serves as an ideal model to study the Traditional Chinese Medicine theory “the Lung and the Large Intestine being interior-exteriorly related” and the related clinic treatment.

Key Words Influenza virus; Viral pneumonia mouse model; Intestinal immunological pathology; the lung and the large intestine being interior-exteriorly related

中图分类号:R228 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.02.028

流感是由流感病毒感染引起的急性呼吸道传染病。临床上,流感最常见的症状包括发热、咳嗽、头痛、乏力,并常伴有胃肠炎样症状,如腹泻、上腹疼痛、恶心、呕吐^[14]。2014 年,Wang 等在小鼠流感病

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81473520)

作者简介:张淑静(1984.09—),女,硕士,实验师,研究方向:中西医结合基础,E-mail:jingshuzhang@126.com

通信作者:吴莹(1980.01—),女,博士,副教授,研究方向:中医药防治病毒性疾病的作用及机制,E-mail:aqiwuying@hotmail.com

毒性肺炎模型中发现:呼吸道流感病毒感染会引起小肠免疫损伤,对肝脏和肾脏却没有影响;并揭示了流感病毒感染诱发胃肠炎的机制,流感病毒感染诱导的小肠免疫损伤并非流感病毒的直接感染导致的,而是由肺源性 $CCR9^+$, $CD4^+$ T 细胞向肠道组织迁移,引起肠道菌群失调所致^[5]。然而,Wang 等的研究中小鼠的肠道病变主要在小肠,对于大肠仅描述了感染小鼠结肠长度较正常小鼠明显缩短^[5]。既然肠道菌群失调是呼吸道流感病毒感染后诱发肠道炎性损伤的关键,而肠道菌群主要寄生在大肠,那么,呼吸道流感病毒感染是否会引起大肠的炎性病变,需要进一步明确。

“肺与大肠相表里”是中医脏腑理论体系中的重要内容,其源于《黄帝内经》,《灵枢·本输》篇曰“肺合大肠,大肠者,传导之府”。目前常用的研究“肺与大肠相表里”的实验动物模型为以便秘为主要肠道表现的哮喘小鼠或溃疡性结肠炎小鼠模型^[6-9],然而,这些模型的肺肠病变是否具有特异性,仍不清楚,并无相关报道。因此,本研究通过观察小鼠流感病毒性肺炎模型中肺脏、小肠、大肠、心脏、肝脏、肾脏的病变情况,进一步验证该模型中肠道的病变是否具有特异性,为该模型在肺与大肠相表里理论及相关临床治法研究中的应用奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 动物与病毒株 雄性 BALB/c 小鼠 48 只,体重 16 ~ 18 g,购自北京维通利华实验动物中心,动物合格证号 SCXK(京)2007-0001;病毒株:流感病毒甲型鼠肺适应株 A/FM/1/47 (H1N1),由中国预防医学科学院病毒学研究所提供,常规鸡胚复苏传代,SPF 种蛋购自北京维通利华实验动物中心。

1.1.2 药物与试剂 HE 染色试剂盒购自北京益利精细化学品有限公司,乙醇、二甲苯购自北京化工厂(分析纯),石蜡(54 ~ 56 ℃)购自国药集团化学试剂有限公司, Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 $NaCl$ (1XPBS 溶液),甲醛等购自国药集团化学试剂有限公司,鼠血清 ALT、AST 和 BUN 水平检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(货号分别为 C009-2、C0010-2 和 C013-2)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组与造模 将 BALB/c 小鼠随机分为正常组、病毒组,每组 24 只,腹腔注射 50 $\mu\text{g/g}$ 体重的戊巴比妥钠麻醉小鼠,约 10 ~ 15 min,待小鼠深度麻醉后,抓取小鼠使其鼻孔朝上,并对病毒组小鼠以

50 μL 、50LD₅₀病毒液滴鼻感染,正常组小鼠用等量无菌磷酸盐缓冲液(PBS)滴鼻对照。滴鼻感染结束后,让小鼠侧卧至自然苏醒。

1.2.2 流感病毒的扩增 将购买来的 SPF 种蛋气室朝上,室温静置至少 24 h,在 37.9 ℃,湿度 40% ~ 60%,通风的孵化箱中孵化,每隔 3 ~ 4 h 保持气室向上水平翻转一次,使其均匀受热孵化,每天检查鸡胚的生长情况,及时发现并剔除死胚。使用前将病毒接种于 9 日龄鸡胚,尿囊腔传代,常规培养,48h 收集新鲜无菌尿囊液,传代两次。做微量血凝试验(HA)测病毒血凝效价,血凝滴度为 1:512,体内感染小鼠,采用 Reed Muench 法^[10]测定计算其对小鼠的半数致死量(LD₅₀)为 $10^{-3.877}$ 。

1.2.3 小鼠一般情况观察、体重检测 将随机分配的正常组、病毒组小鼠,作标记,连续 6 d 记录小鼠的体重,并记录小鼠的一般情况观察进行打分,打分的具体方法为:0 分,健康;1 分,几乎不翘毛;2 分,翘毛,但仍然活泼;3 分,翘毛并且不活泼;4 分,翘毛或不活泼;5 分,死亡。

1.2.4 HE 染色进行组织病理学分析 正常组和病毒组小鼠于感染后 3 d、5 d、6 d,小心快速摘取肺脏、大肠、小肠、肝脏、心脏、肾脏等组织于 10% 的福尔马林中固定,流水中冲水过夜,梯度酒精中脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后,将组织切片厚为 5 ~ 7 μm ,HE 染色后脱水透明,中性树胶封片后,显微镜下观察结果并拍照。

1.2.5 生化检测 正常组和病毒组小鼠于感染后 3 d、5 d、6 d,摘眼球取血,室温静止 30 min,3 000 r/min 离心,收集血清,于 -80 ℃冰箱保存。鼠血清中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)和血清尿素氮(BUN)水平检测按南京建成试剂盒说明书检测。通过检测血清 AST、ALT、和 BUN 的水平来反映小鼠心脏、肝脏、肾脏的功能。

1.3 统计学方法 各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 16.0 软件处理数据,2 组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 有统计学意义

2 结果

2.1 小鼠流感病毒感染后一般情况及体重的观察

正常组小鼠健康,精神良好,行为敏捷,皮毛顺滑光亮,呼吸正常;病毒组小鼠在感染后第 2 d 出现食欲明显下降,呼吸加快、短促,以腹式呼吸为主,行动迟缓无力、毛发杂乱、翘毛、体温下降,第 3 ~ 4 天病情加重,喘促明显,蜷缩、怕冷、寒颤、皮毛无光泽,

第 6 天开始出现死亡(图 1)。正常组小鼠体重无明显变化,病毒组小鼠体重逐渐下降(图 2)。

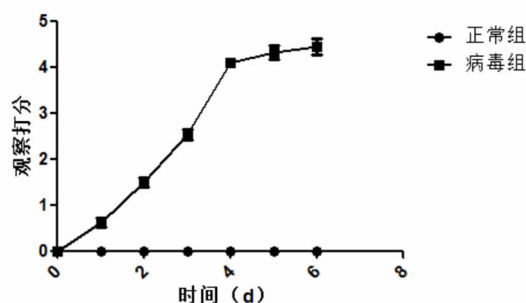


图 1 小鼠流感病毒滴鼻感染后一般情况的观察

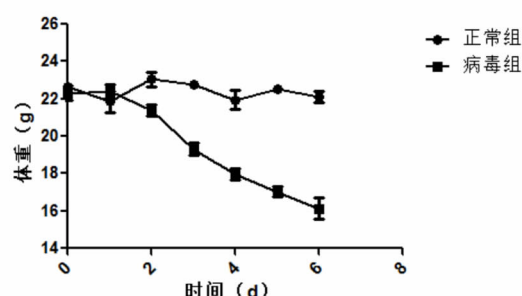


图 2 小鼠流感病毒滴鼻感染后体重的变化

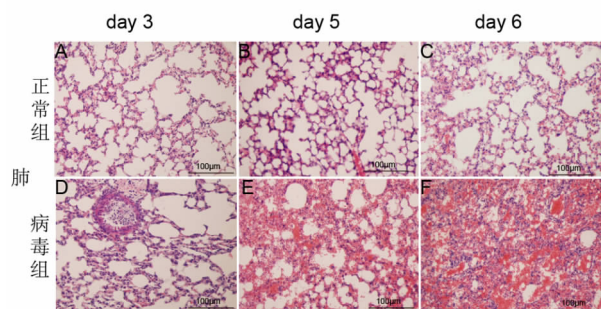


图 3 小鼠流感病毒感染后肺脏的病理变化
(HE 染色 10×20)

注:A,B,C 为正常组肺脏 3 d,5 d,6 d,D,E,F 为病毒组肺脏 3 d,5 d,6 d。

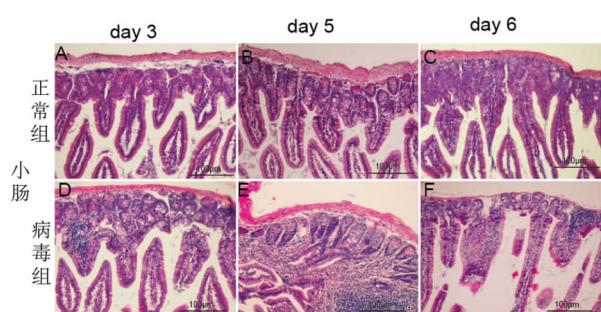


图 4 小鼠流感病毒感染后小肠的病理变化
(HE 染色 10×20)

注:A,B,C 为正常组小肠 3 d,5 d,6 d,D,E,F 为病毒组小肠 3 d,5 d,6 d。

2.2 小鼠流感病毒感染后肺脏、小肠、大肠的病理变化 正常组小鼠肺泡大小较一致,肺泡壁菲薄,支气管上皮完整,管腔内无分泌物。感染第 3 天,病毒组小鼠肺组织出现小支气管炎,中性粒细胞浸润。第 5 天病灶范围进一步扩大,肺泡壁大量炎症细胞浸润,肺泡壁增宽,结构不清,出现水肿。第 6 天肺组织病变进一步加重,几乎累及全肺,肺泡腔中炎症渗出明显,出血水肿进一步加重,大量上皮脱落,肺泡壁结构不清(图 3)。病毒组小肠黏膜腺体排列紊乱,绒毛粗大、部分脱落,黏膜固有层淋巴细胞大量浸润(图 4);大肠黏膜固有层、肌层大量淋巴细胞浸润,腺体结构消失、脱落(图 5)。

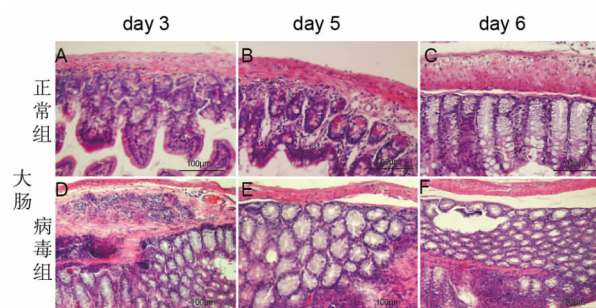


图 5 小鼠流感病毒感染后大肠的病理变化
(HE 染色 10×20)

注:A,B,C 为正常组大肠 3 d,5 d,6 d,D,E,F 为病毒组大肠 3 d,5 d,6 d。

2.3 小鼠流感病毒感染后心脏、肝脏和肾脏组织病变的观察 HE 染色结果显示,与正常组相比,病毒组小鼠心脏、肝脏和肾脏组织正常,无明显病理改变(图 6、图 7、图 8)。

2.4 小鼠流感病毒感染后心脏、肝脏和肾脏组织功能检测 病毒组小鼠血清 AST、血清 ALT 和血清 BUN 检测结果与正常组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明流感病毒感染小鼠心脏、肝脏和肾脏功能无明显异常(图 9、图 10、图 11)。

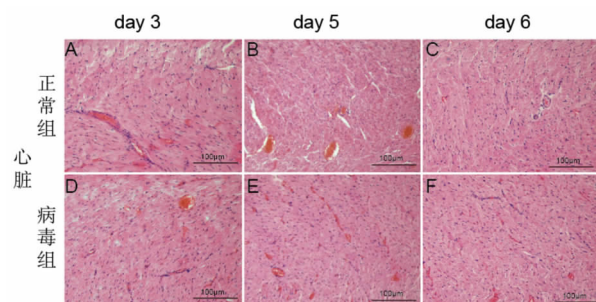


图 6 小鼠流感病毒感染后心脏的病理变化
(HE 染色 10×20)

注:A,B,C 为正常组心脏 3 d,5 d,6 d,D,E,F 为病毒组心脏 3 d,5 d,6 d。

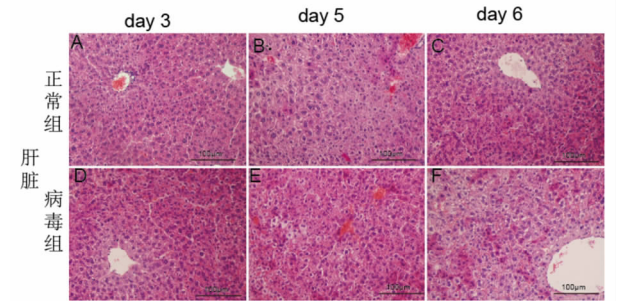


图7 小鼠流感病毒感染后肝脏的病理变化
(HE 染色 10×20)

注:A,B,C 为正常组肝脏 3 d,5 d,6 d,D,E,F 为病毒组肝脏 3 d,5 d,6 d。

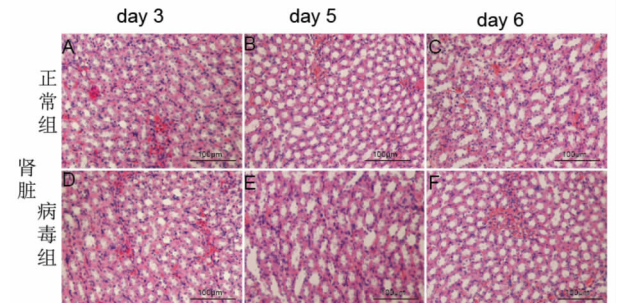


图8 小鼠流感病毒感染后肾脏的病理变化
(HE 染色 10×20)

注:A,B,C 为正常组肾脏 3 d,5 d,6 d,D,E,F 为病毒组肾脏 3 d,5 d,6 d。

3 讨论

腹泻、恶心是流感最常见的呼吸道外临床表现。2014 年,Wang 等在 J Exp Med 杂志上首次报道了呼吸道感染病毒感染引起肠道免疫损伤的现象及机制,从而引起学术界广泛的关注与兴趣。利用流感性肺炎小鼠模型,Wang 等发现,流感病毒感染后,肺源性 CCR9⁺CD4⁺T 淋巴细胞在趋化因子 CCL25 作用下特异性地向肠道组织迁移。进入肠道的 CCR9⁺CD4⁺T 细胞产生 IFN- γ ,改变了肠道微生物的组成(肠道菌群失调)。肠道微生物的改变明显刺激了肠道上皮细胞中 IL-15 的产生,促使了 Th17 细胞在小肠原位的极化,导致了肠道的免疫病理损伤。Wang 等的研究解释了临床上流感感染后,除了呼吸道症状外,出现最常见的肠外症状——胃肠炎样症状(尤其是在儿童中),如上腹疼痛,恶心、呕吐,腹泻等的机制。Wang 等提出,肠道菌群构成的变化(菌群失调)介导了呼吸道流感病毒感染诱导的特异性肠道免疫损伤。刘骏等的实验也证实了流感病毒感染后存在肠道菌群的数量及组成的变化^[11]。目前,尽管不同实验室报道流感病毒感染后肠道菌群的构成及数量变化不完全一致,但流感病

毒肺部感染造成肠道菌群失调,是被研究者公认的。

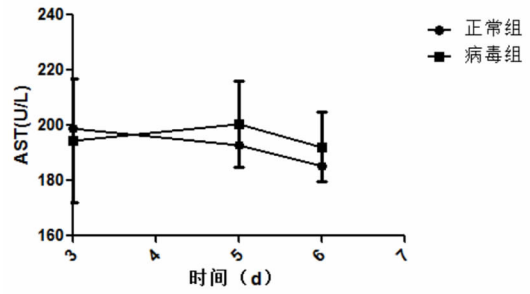


图9 小鼠流感病毒滴鼻感染后血清 AST 指标检测

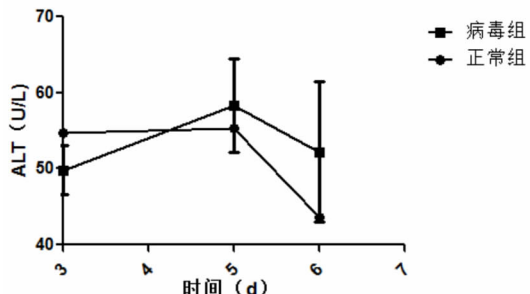


图10 小鼠流感病毒滴鼻感染后血清 ALT 指标检测

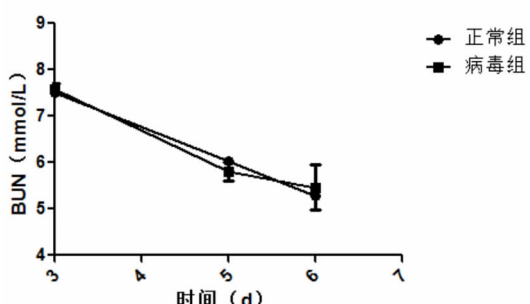


图11 小鼠流感病毒滴鼻感染后血清 BUN 指标检测

然而,Wang 等报道的流感病毒性肺炎小鼠的肠道损伤主要表现在小肠的炎性病变,对于肠道菌群主要寄生的大肠的病变,并没有详细的报道,仅观察到感染小鼠结肠长度的缩短。基于肠道菌群失调是流感诱发肠道损伤的关键环节,而肠道菌群主要寄生在大肠中,我们在本研究中观察了流感病毒感染小鼠模型中肺脏、小肠、大肠、心脏、肾脏、肝脏病变情况,以明确流感病毒感染后是否存在大肠的病变,并进一步验证了肠道病变的特异性。研究结果表明,小鼠流感病毒感染后,除了肺部明显的炎性病变外,小肠、大肠均有病变,表现为黏膜腺体排列紊乱,绒毛脱落,固有层炎性细胞浸润,并伴有腹泻的表现。通过进一步检测了其他脏器的情况,证实了心脏、肾脏、肝脏均无病变,说明流感病毒感染肺部所诱导的肠道免疫损伤具有特异性。我们的研究进一步证实小鼠流感病毒性肺炎模型中存在特异性肠道病变,病变累及小肠及大肠组织。

“肺与大肠相表里”是近年来中医脏腑理论研究的热点。张景岳《类经·十二经病》中云:“大肠与肺为表里,肺主气,而津液由于气化,故凡大肠之或泻或秘,皆津液所生之病,而主在大肠也”。中医所讲的大肠与西医有所不同,相当于西医解剖学中的回肠与结肠上段^[12]。肺与大肠不仅在生理上相互联系,而且在病理上相互影响,出现肺病及肠或肠病及肺,肺肠之病可以相互传变,甚至持续形成恶性循环^[13]。有研究发现,在小鼠气道性哮喘模型中,腹腔注射大黄素具有抵抗肺部炎性反应的作用^[14],经芒硝刺激大肠后,芒硝组小鼠血清中嗜酸性粒细胞、淋巴细胞总数均明显减少,血清 IgE 含量明显降低,芒硝“从肠论治”可以有效抑制哮喘小鼠气道炎性反应,改善气道免疫微环境。人感染流感病毒后,不论是轻症还是重症,常伴有腹泻、腹痛的症状;小鼠流感病毒性肺炎模型中,所有感染鼠均有明显腹泻,并持续整个感染过程。因此,人的流感感染与小鼠流感病毒性肺炎均具有“肺病及肠”的表现,并且具有特异性,不累及其他脏器。

有趣的是,耶鲁大学 Akiko Iwasaki 实验组报道,肺脏抗流感病毒的免疫应答也受到肠道菌群的调节。Takeshi Ichinohe 等的研究表明,呼吸道感染病毒机体时,肠道菌群的组成对调节病毒特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的产生及抗体反应起关键作用,肠道菌群可通过激活适当的炎性因子,在呼吸道黏膜的调节性免疫中发挥作用;肠道菌群失调的小鼠肺脏抗流感病毒的免疫应答障碍,使肺组织中流感病毒无法清除,小鼠死亡率增加^[15]。因此,正常的肠道菌群在维持肺脏抗病毒免疫中具有至关重要的作用,肠道菌群失调小鼠肺脏抗病毒免疫功能受损。由此可见,流感病毒性肺炎小鼠中存在肺肠病变的循环,是研究“肺与大肠相表里”理论及临床治法的理想模型。然而,目前此模型在中医脏腑理论研究中较少运用,我们的研究为此模型在相关研究中的运用以及探讨中药调节肠道菌群防治流感的机制奠定了基础。

参考文献

[1] Baden LR, Drazen JM, Kritek PA, et al. H1N1 influenza A disease——information for health professionals[J]. N Engl J Med, 2009,

360(25):2666-2667.

- [2] Chan MC, Lee N, Chan PK, et al. Fecal detection of influenza A virus in patients with concurrent respiratory and gastrointestinal symptoms [J]. J Clin Virol, 2009, 45(3):208-211.
- [3] Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, et al. Assortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009 [J]. N Engl J Med, 2009, 360(25):2616-2625.
- [4] Chenyue Zhang, Ying Wu, Zinan Xuan, et al. p38MAPK, Rho/ROCK and PKC pathways are involved in influenza-induced cytoskeletal rearrangement and hyperpermeability in PMVEC via phosphorylating ERM [J]. Virus Research, 2014, 192(11):6-15.
- [5] Wang J, Li F, Wei H, et al. Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation [J]. J Exp Med, 2014, 211(12):2397-2410.
- [6] 郑秀丽, 杨宇, 王宝家, 等. 从病理状态下肺功能与胃肠功能的变化探讨“肺与大肠相表里”[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1):120-123.
- [7] 郑秀丽, 杨宇, 王宝家, 等. 过敏性哮喘大鼠模型结肠和肺组织 CCK-8、CGRP、SP 及 VIP 变化观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12):1668-1671.
- [8] 闫昕, 王新月, 盛益华, 等. 从溃疡性结肠炎大鼠肺组织炎性细胞因子及氧自由基表达的变化看肺与大肠相表里 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(4):455-459.
- [9] 高誉珊, 刘妙, 张淑静, 等. 动物模型在经方研究中的应用 [J]. 世界中医药, 2015, 10(1):13-16.
- [10] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术 [M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997:111-112.
- [11] 刘骏, 王辉, 孙经梦, 等. 流感病毒感染对小鼠肠道菌群的影响及桑叶的调节作用 [J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(9):1001-1009.
- [12] 董丽, 张茂平, 王俊峰. “肺与大小肠相表里”的探讨 [J]. 中国医药指南, 2008, 6(24):219-222.
- [13] 陈丽斌, 纪立金, 高思华. 基于“同气相求”理论探索肺与大肠的表里构建 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12):3483-3486.
- [14] Wang Tan, Zhong Xianggen, Li Yuhang, et al. Protective effect of emodin against airway inflammation in the ovalbumin induced mouse model [J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(6):431-437.
- [15] Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(13):5354-5369.

(2015-08-20 收稿 责任编辑:王明)