

A型流感病毒对小鼠肺部菌群及趋化因子CCL5和CXCL10的影响及麻杏石甘汤干预作用研究

王平^{1,2}, 赵澄¹, 卢芳国^{1*}, 吴涛¹, 张香港¹, 魏科¹, 李玲¹, 田维毅²

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 探索麻杏石甘汤(Maxing Shigan Decoction, MSD)通过影响小鼠肺部菌群及趋化因子CCL5和CXCL10表达而防治流感病毒感染的潜在机制。方法 通过鼻腔接种法建立A型流感病毒感染小鼠模型,经ig给药或生理盐水3、7 d后,计算肺指数和肺指数抑制率,HE染色检测肺组织病理变化,应用免疫组化、酶联免疫吸附试验(ELISA)、实时荧光定量PCR(RT-PCR)法检测肺组织中CCL5和CXCL10蛋白和mRNA表达变化,并取小鼠肺组织进行16S rRNA基因V3~V4可变区测序、物种注释及聚类,分析Alpha多样性和Beta多样性及组间差异物种,分析CCL5、CXCL10表达与肺部菌群变化的关系。结果 给药3 d后,模型组肺指数明显高于对照组($P<0.01$)和药物组($P<0.05$ 、 0.01),肺部炎症细胞浸润明显。麻杏石甘汤组肺部炎症细胞浸润明显减轻,肺指数抑制率与奥司他韦组相似,肺损伤的组织学定量评价指标(IQA)值较模型组明显降低($P<0.01$)。模型组CCL5和CXCL10表达明显高于对照组($P<0.01$),奥司他韦组和麻杏石甘汤组CCL5和CXCL10表达明显低于模型组($P<0.05$ 、 0.01)。16S rRNA基因测序结果显示,模型组拟杆菌属、埃希菌属、变形杆菌属相对丰度增加,粪球菌属相对丰度降低。奥司他韦和麻杏石甘汤能显著降低拟杆菌属、埃希菌属、变形杆菌属相对丰度,增加粪球菌属相对丰度;Alpha多样性分析结果显示各组ACE指数、Chao1指数、Shannon指数比较 $P>0.05$,组间丰富度和多样性无差异。Beta多样性分析结果显示,给药3 d后,组间样品点无交集,组间肺菌群构成有差异。各组间有显著性差异物种。Spearman相关性分析显示,CCL5和CXCL10表达与埃希菌属、变形杆菌属、拟杆菌属丰度呈正相关,与粪球菌属丰度呈负相关。给药7 d后,各组间肺部菌群结构组成及CCL5、CXCL10表达无显著差异。结论 麻杏石甘汤可能通过促进肺部有益菌生长改善肺部微生态环境及免疫微环境,对流感病毒引起的肺损伤有一定的保护作用。

关键词: A型流感病毒;麻杏石甘汤;肺部菌群;趋化因子;CCL5;CXCL10;鼻腔接种法;Alpha多样性;Beta多样性;拟杆菌属;埃希菌属;变形杆菌属;粪球菌属;ACE指数;Chao1指数;Shannon指数;Spearman相关性分析

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5523-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.017

Effect of influenza A virus infection on pulmonary flora and chemokines CCL5 and CXCL10 in mice and intervention of Maxing Shigan Decoction

WANG Ping^{1,2}, ZHAO Chen¹, LU Fang-guo¹, WU Tao¹, ZHANG Xiang-gang¹, WEI Ke¹, LI Ling¹, TIAN Wei-yi²

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To investigate the potential mechanism of Maxing Shigan Decoction (MSD) in the prevention and treatment of influenza virus infection by influencing pulmonary flora and expression of chemokines CCL5 and CXCL10 of mice. **Method** The infected mice model of influenza A virus was tested by intranasal inoculation. After 3 and 7 d of gavage or saline, the lung index and lung index inhibition rate were calculated. Pathological changes of lung tissue were detected by HE staining. The expression of CCL5 and CXCL10 in the lung tissue of mice was detected by immunohistochemistry and ELISA. The expression of

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81774126);国家自然科学基金资助项目(82074250);湖南省自然科学基金项目(2020JJ4063);湖南中医药大学校级研究生培养质量工程项目(2019CX05);湖南中医药大学校级研究生培养质量工程项目(2019CX22);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2018ZXYJH11);湖南省高校科技创新团队《感染性疾病中医药防治研究》资助项目(NO: 15);湖南中医药大学一流学科《基础医学》资助项目(NO: 1);贵州省科技创新人才团队(黔科合平台人才[2020]5010)

作者简介: 王平(1977—),女,汉族,贵州毕节人,副教授,湖南中医药大学在读博士,研究方向为感染性疾病的中医药防治研究。

***通信作者** 卢芳国,女,教授,博士研究生导师,研究方向为感染性疾病的中医药防治研究。E-mail: lufanguo0731@163.com

CCL5 mRNA and CXCL10 mRNA in lung tissue of mice was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). The bacteria in lung tissue was sequenced by using the V3-V4 variable region of 16S rRNA, annotated and clustered. The alpha diversity, beta diversity and the species difference among groups were analyzed. The correlation of the expression of CCL5 and CXCL10 with the change of intestinal flora was also analyzed. **Results** After 3 d of administration, the lung index of model group was significantly higher than normal group ($P < 0.01$) and drug group ($P < 0.05, 0.01$). Pulmonary inflammatory cell infiltration was obvious. The infiltration of pulmonary inflammatory cells in MSD group was significantly reduced, and the inhibition rate of lung index was similar to that in oseltamivir group. The value of IQA in lung injury was decreased significantly ($P < 0.01$). The expressions of CCL5 and CXCL10 in the lung tissue of the model control group were significantly higher than those of the normal control group ($P < 0.01$), and the expressions of CCL5 and CXCL10 in the oseltamivir group and the MSD were significantly lower than those in the model control group ($P < 0.05, 0.01$). The results of 16S rRNA gene sequencing showed the relative abundances of *Bacteroides*, *Escherichia*, and *Proteus* were increased, while that of *Coprococcus* was decreased in the model control group. In oseltamivir group and MSD group, the relative abundances of *Bacteroides*, *Escherichia*, and *Proteus* were significantly decreased, while the relative abundance of *Coprococcus* was increased. The results of alpha diversity showed that the ace index, Chao1 index, and Shannon index of each group were all higher than 0.05, and there was no difference in richness and diversity among groups. The results of beta diversity showed that there was no intersection of sample points among groups and difference in the composition of pulmonary flora among groups. Species among groups were significant differences. Spearman correlation analysis showed that the expression of CCL5 and CXCL10 was positively correlated with the abundance of *Escherichia*, *Proteus*, and *Bacteroides*, and negatively correlated with the abundance of *Coprococcus*. After 7 d of administration, there was no significant difference in the composition of pulmonary flora and the expression of CCL5 and CXCL10. **Conclusion** MSD may improve the micro-ecological environment and immune microenvironment of the lung by promoting the growth of beneficial bacteria, and has a certain protective effect on the lung injury caused by influenza virus.

Key words: influenza A virus; Moxing Shigan Decoction; pulmonary flora; Chemokines; CCL5; CXCL10; intranasal inoculation; Alpha diversity; Beta diversity; *Bacteroides*; *Escherichia*; *Proteus*; *Coprococcus*; ACE index; Chao1 index; Shannon index; Spearman correlation analysis

流行性感冒（简称流感）是由流感病毒（influenza viruses）引起的急性呼吸道传染病。根据其核蛋白和基质蛋白不同，流感病毒分为甲（A）、乙（B）、丙（C）、丁（D）4 型，其中 A 型流感病毒（influenza A virus, IAV）是引起人和动物感染的主要病原体^[1]。尽管流感常有自限性，但部分患者会发展成急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征，出现呼吸衰竭和多器官损伤，并最终死亡^[2]。目前，病毒感染所致的“细胞因子风暴”与肺损伤的相关性被普遍认同^[3]。所谓“细胞因子风暴”是指机体免疫系统过度激活引起趋化因子（CC、CXC、C 及 CX3C 家族）和促炎细胞因子（TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、MCP-1 和 IL-8 等）过度释放，初衷是为了清除病毒，但这种自杀式的攻击，也可能诱导全身性炎症反应，引起多器官功能衰竭，甚至死亡^[4]。

研究发现，流感病毒可诱导人和动物体内 CCL5（CC chemokine ligand 5）和 CXCL10（C-X-C motif chemokine-10）等趋化因子的产生，CCL5 和 CXCL10 在甲型流感病毒感染诱导的小鼠急性肺损伤中发挥重要作用^[5-6]。近年来，随着新一代测序技

术的应用，肺部微生物群在呼吸系统疾病发生发展中的作用受到关注^[7]。谷李铭等^[8]研究发现，流感病毒感染可致肺部微生物群结构和物种多样性发生变化；Lloyd 等^[9]研究发现肺部菌群结构与局部炎症反应发生相关；阚亮等^[10]研究发现，肺炎链球菌感染可促进趋化因子 CXCL1 和 CCL5 表达，募集免疫细胞至感染部位，促进肺部炎症发生发展。因此，对肺部微生物群的调控可能成为治疗流感病毒性肺炎的新靶点。

源自汉代张仲景《伤寒论》的麻杏石甘汤（Moxing Shigan Decoction, MSD）具有辛凉宣肺、清热平喘之功效，主治肺热火盛的肺炎和热邪犯肺的哮喘，广泛用于流感、病毒性肺炎、上呼吸道感染、支气管肺炎等的治疗^[11]。2019 年 12 月以来，新型冠状病毒 SARS-CoV-2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2）感染肺炎（corona virus disease 2019, COVID-19）疫情在全球爆发，10 个月时间，感染人数已超过 3 千万，波及全球 200 多个国家和地区^[12]。在国家卫生管理部门发布的系列《新型冠状病毒的肺炎诊疗方案》及各地方结合区域和人群特点发布的本地区《新型冠状病毒的肺炎防

治方案》中,具有宣肺平喘、祛除寒湿、通腑泻热兼燥湿健脾之效的 MSD 及其加减方是 COVID-19 临床治疗期(中期)被推荐使用频次最高的中药方剂之一^[13]。本课题组前期研究发现,该方具有干预病毒吸附、抑制病毒增殖、抑制宿主细胞凋亡等作用^[14-16]。本研究以流感病毒感染 BALB/c 小鼠为模型,观察 MSD 对不同感染时期(急性期和恢复期)小鼠肺部菌群及趋化因子 CCL5 和 CXCL10 表达的影响,以期进一步阐明其防治流感的可能机制,为拓展其临床应用提供新的实验依据。

1 材料

1.1 动物

6~8 周 BALB/c 小鼠 50 只,体质量(18±2) g,雄性,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号 SCXK(湘)2016-0002],动物批号 43004700062561;于湖南中医药大学实验动物中心[许可证号 SCXK(湘)2015-0003]饲养。所有实验符合湖南中医药大学动物实验伦理学规定。

1.2 病毒株

流感病毒小鼠肺适应株(A型,IAV, A/PR/8/34),由湖南师范大学病毒研究室惠赠。10 日龄鸡胚尿囊腔接种培养传代,血凝效价 1:640 以上者用于实验。正式试验前根据文献方法^[17],测定小鼠病毒半数致死量(LD₅₀),病毒 LD₅₀为 1×10^{-3.77},用灭菌生理盐水稀释成每 0.1 毫升病毒液含 50 LD₅₀,置于冰袋中备用。

1.3 药物与试剂

MSD(麻黄 9 g,杏仁 9 g,石膏 18 g,甘草 6 g)组方药材麻黄(批号 1901029)、杏仁(批号 2019032702)、石膏(碎,棉裹,批号 1905250032)、甘草(批号 1806004),购自湖南中医药大学附属第一医院门诊药房,由湖南中医药大学第一附属医院药理学部戴冰教授鉴定均为《中国药典》2015 年版收录正品,麻黄为麻黄科植物木贼麻黄 *Ephedra equisetina* Bge.的干燥草质茎;杏仁为蔷薇科落叶乔木植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansamxim* 的干燥成熟种子;石膏为硫酸盐类矿物硬石膏族石膏,主要化学成分为含水硫酸钙(CaSO₄·2H₂O);甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根及根茎。磷酸奥司他韦胶囊[规格:75 mg(以奥司他韦计)×10 粒,批号 M1050,意大利 Roche S.p.A.生产上海罗氏制药有限公司分装]购自中南大学湘雅二附院门诊药房,用蒸馏水充分溶解,制

成实验用质量浓度为 2.165 mg/mL 的混悬液;抗病毒颗粒(规格:9 g×10 袋,批号 1906311,四川光大制药有限公司)购自湖南中医药大学附属第一医院门诊药房,用蒸馏水充分溶解,制成实验用质量浓度为 0.39 g/mL 的溶液。以上实验用药 4 ℃避光保存备用。兔抗小鼠 RANTES 抗体(Abcam 公司,批号 ab189841)、CXCL10 多克隆抗体(Abcam 公司,批号 ab9938)、驴抗兔 IgG 荧光二抗(Abcam 公司,批号 ab175772)、通用二步法试剂盒(中杉金桥生物技术有限公司,批号 PV-9000)、小鼠 CXCL10/ IP-10 ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号 F10933)、CCL5/Rantes ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号 F11450)、TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,批号 CW0580S)、HiFiScript cDNA 合成试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,批号 CW2569M)、Ultra SYBR Mixture(康为世纪生物科技有限公司,批号 2601M)、PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 主要仪器

BSC-1300 IIA2 生物安全柜、SW-CJ-1FD 超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;TP-200D 电子分析天平,湘仪天平仪器设备有限公司;RMZ135 精密轮转切片机,德国 LEICA 公司;光学扫描显微镜(Axioscope 5)+AxioCam 503 color 显微镜摄像头,蔡司科技(苏州)有限公司;TGL 20M 高速冷冻离心机,长沙湘智离心机仪器有限公司;IlluminaMiseq 测序仪,美国 Illumina 公司;ELX-800 多功能酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;LightCycler96 荧光定量 PCR 仪,瑞士罗氏公司。

2 方法

2.1 MSD 水煎液的制备

参照文献方法^[18-19],采用麻黄先煎方法制备 MSD 水煎液。按其组成比例分别称量 5 剂药的药材量。先取麻黄 45 g,加入药材总量 10 倍体积的蒸馏水,武火煎煮,待沸腾后,调整为文火煎煮 25 min,去沫,再加入石膏 90 g、杏仁 45 g、甘草 30 g,继续文火煎煮 30 min,煎煮完毕后滤过;二煎加入 7 倍体积蒸馏水武火煮沸后再文火煎煮 20 min,煎煮完毕后滤过,合并 2 次滤液,水浴浓缩至含生药 0.605 g/mL,4 ℃避光保存备用。

2.2 分组与给药

实验设对照组、模型组、奥司他韦组(化学药

对照组)、抗病毒颗粒组(中药对照组)和 MSD 组, 每组 10 只小鼠。按临床等效剂量(临床等效剂量按动物每千克体质量占人体体面积的比值计算^[21])于感染后 24 h 开始 ig 给药, 每天 1 次, 每次 0.2 mL, 连续给药 3、7 d。奥司他韦、抗病毒颗粒、MSD 组的给药剂量分别为以奥司他韦计 21.63 mg/(kg·d)、3.9 g/(kg·d), 6.05 g/(kg·d)。对照组和模型组均给予 ig 等量生理盐水。

2.3 制备模型

实验动物适应性饲养 3 d 后称定质量。除对照组动物外, 其余动物按照本课题前期研究方法建立 A 型流感病毒肺部感染模型^[20]。用乙醚轻度麻醉小鼠后, 每只小鼠鼻孔内均匀滴入 50 LD₅₀ 流感病毒液 0.05 mL, 建立模型。对照组动物隔离饲养在同等条件下的房间, 并按同样方法鼻腔接种 0.9%氯化钠溶液 0.05 mL。

2.4 标本采集

分别于给药治疗第 3、7 天, 禁水禁食 8 h 后, 每组随机选取 5 只小鼠, 称动物体质量后, 摘眼球放血法处死小鼠, 转移至超净工作台内解剖, 称取小鼠肺脏质量, 收集部分肺组织置于 4%多聚甲醛中固定, 用无菌镊子将部分肺组织取下, 置于 EP 管中, 冻存于-80 °C 冰箱。

2.5 检测指标

2.5.1 肺指数和肺指数抑制率 称小鼠体质量后, 取肺脏称定质量, 计算肺指数和肺指数抑制率。

肺指数=肺脏质量/体质量

肺指数抑制率=(模型对照组平均肺指数-给药组平均肺指数)/模型对照组平均肺指数

2.5.2 肺组织病理变化 苏木素-伊红(HE)染色检测肺组织病理变化。用 4%的多聚甲醛固定肺组织、石蜡包埋、切片(4~5 μm)、HE 染色后, 在光学显微镜下(×400)观察组织病理变化。对肺组织进行病理学评分, 每组选 6 张切片, 每张选 4 个视野(×400), 计数损伤肺泡[肺泡内含有红细胞(RBC)或白细胞(WBC)>2 个]占计数肺泡总数百分比, 作为肺损伤的组织学定量评价指标(index of quantitative assessment, IQA)。

2.5.3 免疫组织化学检测肺组织 CCL5、CXCL10 表达 PV-9000 通用二步法检测各组小鼠肺组织中 CCL5、CXCL10 蛋白表达水平。石蜡切片常规脱蜡, 水化, 抗原修复, 内源性过氧化物酶阻断, 室温孵育 10~15 min, PBS 溶液冲洗, 滴加适量 CCL5、

CXCL10 一抗 37 °C 孵育 60 min, 阴性对照组用 PBS 缓冲液代替一抗; PBS 溶液冲洗 3 次后滴加反应增强剂, 室温孵育 20 min; 滴加辣根酶标山羊抗兔 IgG 聚合物, 室温孵育 20 min; 加 DAB 显色剂处理 5 min, 自来水冲洗, 苏木素复染 20 s, 1%盐酸分化, 自来水冲洗返蓝; 脱水、透明、封片, 镜下观察结果。细胞膜和细胞质棕褐色或者棕黄色着色为阳性细胞, 以细胞不着色为阴性。用 Axiocam 503 color 采集图像, 选取结构完整的 1 张切片, 在高倍镜下(×400), 每张切片任选 5 个视野, 应用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件计算每个视野阳性表达的吸光度(A)值, 然后求其均值, 作为该样本的相对表达量。

2.5.4 ELISA 法检测肺组织匀浆中 CCL5、CXCL10 含量 从液氮中取出冻存肺组织标本, 标本融化后, 剪碎, 用标本稀释液将标本充分匀浆(制备成 10%匀浆), 离心 20 min (4 °C, 2 000 r/min), 取上清; 严格按 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 运用酶标仪进行检测。

2.5.5 RT-PCR 检测肺组织匀浆中 CCL5、CXCL10 mRNA 表达情况 取出液氮中保存的肺组织, 按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取各组样品的总 RNA。利用多功能酶标仪检测样品在波长 260 nm 与 280 nm 处的吸光度值 A₂₆₀ 与 A₂₈₀。选择 A₂₆₀/A₂₈₀ 值在 1.8~2.0 的样品, 用 RNase Freed H₂O 将样品质量浓度调整至 500~600 ng/μL, 逆转录成 cDNA, 以 cDNA 做模板, 按 UltraSYBR Mixture 试剂说明, 分别加入 GAPDH、CCL5、CXCL10 引物进行扩增, 见表 1。PCR 反应为 50 μL 体系, 反应体系含 cDNA 2 μL, Ultra SYBR Mixture (Low ROX) 25 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1 μL, 以 dd H₂O 补足至 50 μL。反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 10 s, 60 °C 1 min, 40 个循环, 60~95 °C 绘制熔解曲线。采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算目的基因相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time RT-PCR

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
GAPDH-F	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	183
GAPDH-R	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	
CCL5-F	GTATTTCTACACCAGCAGCAAG	102
CCL5-R	TCTTGAACCCACTTCTTCTCTG	
CXCL10-F	CAACTGCATCCATATCGATGAC	147
CXCL10-R	GATTCCGGATTGACATCTCT	

2.5.6 16S rRNA 基因 V3-V4 区测序 每组 2 个时间点各选取 3 个肺组织样本, 采用 Macherey-Nagel Kit 试剂盒抽提肺组织中的 DNA, 通过 Qubit Fluorometer 对 DNA 质量浓度进行定量, 并通过琼脂糖凝胶电泳对 DNA 完整性进行评价, DNA 质量符合的样本进行文库构建。取 30 ng DNA 样品及融合引物配置 PCR 反应体系, 设置反应参数, 对 16S rRNA 基因 V3-V4 区进行 PCR 扩增。引物: 341F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'; 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。使用 Agencourt AMPure XP 磁珠进行纯化并溶于 Elution Buffer, 贴上标签, 文库构建完成。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测文库的片段范围及质量浓度, 采用 Illumina Miseq PE 300 高通量测序平台对检测合格的文库进行双末端 (Paired-end, PE) 测序, 获得 PE reads。16S rRNA 基因测序分析由武汉华大医学检验有限公司高通量实验室完成。

2.5.7 生物信息学分析 下机数据经过数据过滤, 滤除低质量的 reads, 使用 FLASH (Fast Length Adjustment of Short reads, v1.2.11) 软件, 利用重叠关系将双末端测序得到的成对 reads 拼接成 raw tags; raw tags 经进一步去除嵌合体、短序列后得到优质序列 clean tags。利用 UPARSE 软件在 97% 相似度下将 clean tags 进行聚类, 获得操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs), 通过 RDP classifier 软件将 OTU 代表序列与数据库 Greengene 比对, 得到每个样本的物种分类信息, 并在各个水平 (phylum、class、order、family、genus、species) 进行物种注释。基于聚类结果, 进行 Alpha 多样性分析 (Chao1、Ace、Shannon、Simpson) 和 Beta 多样性分析 (non-metric multi-dimensional scaling, NMDS 法)。采用 LEfSe [linear discriminant analysis (LDA) effect size, 线性判别式分析] 分析找到组间在丰度

上有差异的物种, 结果用 LDA 值分布柱状图及进化分支图表示, LDA score ($\log_{10}$) > 2 的物种被认为具有显著性差异, LDA > 4 可以作为标志物^[22]。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组样本间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 方差齐时, 用 LSD 进行多重比较, 方差不齐采用非参数因子 Kruskal-Wallis 秩和检验。两组间比较, 对于满足正态性和方差齐性时, 采用 t 检验, 方差不齐时用 Wilcoxon 秩和检验, 采用 Spearman 相关分析进行肺部菌群与肺组织趋化因子 CCL5、CXCL10 关联性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肺指数和肺指数抑制率

如表 2 所示, 给药 3、7 d 后, 各组小鼠肺指数和肺指数抑制率。给药 3 d 后, 模型组小鼠肺指数较正常对照组显著升高 ($P < 0.01$); 奥司他韦组、抗病毒颗粒组、MSD 组肺指数较模型组显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 给药 7 d 后, 模型组小鼠肺指数值较 3 d 时降低, 与同期其他各组肺指数比较差异无统计学意义。

3.2 小鼠肺组织病理变化

光学显微镜下观察各组小鼠肺组织病理切片, 结果见图 1。对照组小鼠肺泡、肺泡囊、肺泡管、肺泡隔形态完整, 肺泡腔轮廓清晰, 腔内无分泌物, 未见明显炎性细胞浸润。A 型流感病毒感染后第 4 天 (给药 3 d 后), 模型组小鼠肺泡结构明显破坏, 肺泡塌陷甚至消失, 肺泡腔内和肺间质中可见大量淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞等炎性细胞浸润, 组织间可见红细胞渗出, 与对照组比较 IQA 值明显增高 ($P < 0.01$, 表 3)。A 型流感病毒感染后第 8 天 (给药 7 d 后), 模型组肺组织中仍可见炎性细胞

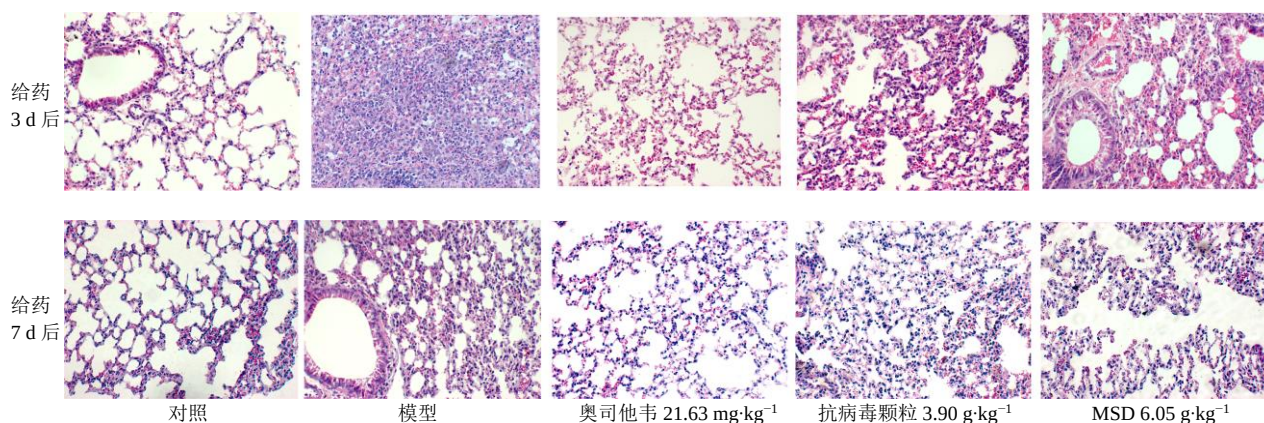
表 2 各组小鼠肺指数及肺指数抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Comparison on lung index and lung index inhibition rate of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	给药 3 d 后		给药 7 d 后	
		肺指数	肺指数抑制率/%	肺指数	肺指数抑制率/%
对照	—	0.67 ± 0.045	—	0.68 ± 0.03	—
模型	—	1.28 ± 0.24**	—	0.78 ± 0.08	—
奥司他韦	0.021 63	0.68 ± 0.11##	47.40	0.68 ± 0.08	13.02
抗病毒颗粒	3.900	0.78 ± 0.10#	39.33	0.76 ± 0.10	2.81
MSD	6.050	0.69 ± 0.08#	46.54	0.75 ± 0.12	3.19

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 1 各组小鼠肺组织病理变化 (HE 染色, $\times 200$)Fig. 1 Pathological changes of lung tissue in each group (HE staining, $\times 200$)

浸润, 肺泡壁增厚明显, 但与感染后第 4 天比较, 视野中可看到正常肺泡结构, 肺泡内炎性细胞浸润减轻, IQA 值明显降低, 与同期对照组差异无统计学意义 (表 3)。与模型组比较, 给药 3 d 后, 奥司他韦组、抗病毒颗粒组和 MSD 组肺部炎症和损伤程度均有所减轻, 以奥司他韦组改善更明显, 抗病毒颗粒组和 MSD 组肺泡壁增厚, 肺间质中可见少量炎性细胞浸润, 但肺泡腔轮廓较清晰, 腔内炎性细胞浸润较轻, 各药物组 IQA 值较模型组明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 , 表 3)。给药 7 d 后, 各药物组肺组织结构基本正常, 肺泡腔轮廓清晰, 肺泡壁较薄, 腔内未见明显炎性细胞浸润, 与模型组比较, IQA 值降低, 差异无统计学意义 (表 3)。上述结果提示, 经 IAV 滴鼻后, 能成功建立小鼠流感病毒感染模型, 感染第 4 天时, 肺部病变明显, 炎症反应较重, 感染第 8 天时炎症反应有所缓解, 符合临床急性期和恢复期特征。给予奥司他韦、抗病毒颗粒和 MSD 治疗 3 d 后, 各药物组肺组织病变程度明显减轻。治疗 7 d 后, 各组 IQA 值接近对照组水平。

表 3 各组小鼠肺组织病理学评分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Table 3 Comparison of histopathological scores of lung tissue in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IQA/%	
		给药 3 d 后	给药 7 d 后
对照	—	14.04 ± 2.41	10.22 ± 2.31
模型	—	43.06 ± 8.47**	12.65 ± 2.97
奥司他韦	0.021 63	18.52 ± 4.22##	11.70 ± 2.43
抗病毒颗粒	3.900	21.35 ± 6.03#	11.43 ± 1.43
MSD	6.050	17.19 ± 2.49##	10.72 ± 2.03

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

3.3 各组小鼠肺组织 CCL5、CXCL10 表达

由图 2、3 可知, CCL5 和 CXCL10 主要表达于炎性细胞和肺泡上皮细胞胞浆和胞膜上。模型组肺组织中可见大量阳性表达细胞, 对照组和各药物组小鼠肺组织中也可见少量阳性表达细胞。由表 4 可知, 给药 3 d 后, 模型组 CCL5 和 CXCL10 表达较对照组明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01), 奥司他韦组、MSD 组 CCL5 和 CXCL10 表达较模型组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 抗病毒颗粒组 CXCL10 表达较模型对照组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。给药 7 d 后, 模型对照组 CCL5 和 CXCL10 表达仍高于其它各组, 但差异无统计学意义。

3.4 各组小鼠肺组织中 CCL5、CXCL10 含量

ELISA 检测结果见表 5。给药 3 d 后, 模型组小鼠肺组织中 CCL5 和 CXCL10 含量显著高于对照组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01); 奥司他韦组、MSD 组肺组织中 CCL5 和 CXCL10 含量明显低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01); 抗病毒颗粒组肺组织 CXCL10 含量低于模型组 ($P < 0.01$)。给药 7 d 后, 各组小鼠肺组织中 CCL5 含量无显著差异; 模型组肺组织中 CXCL10 含量高于对照组 ($P < 0.05$), 奥司他韦组、MSD 组 CXCL10 含量低于模型组 ($P < 0.05$)。

3.5 各组小鼠肺组织中 CCL5、CXCL10 mRNA 转录水平比较

结果见表 6。给药 3 d 后, 与对照组比较, 模型组 CCL5、CXCL10 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 奥司他韦组、抗病毒颗粒组、MSD 组 CCL5、CXCL10 mRNA 表达均明显降低, 以奥司他韦组和 MSD 组下降显著 ($P < 0.01$)。给

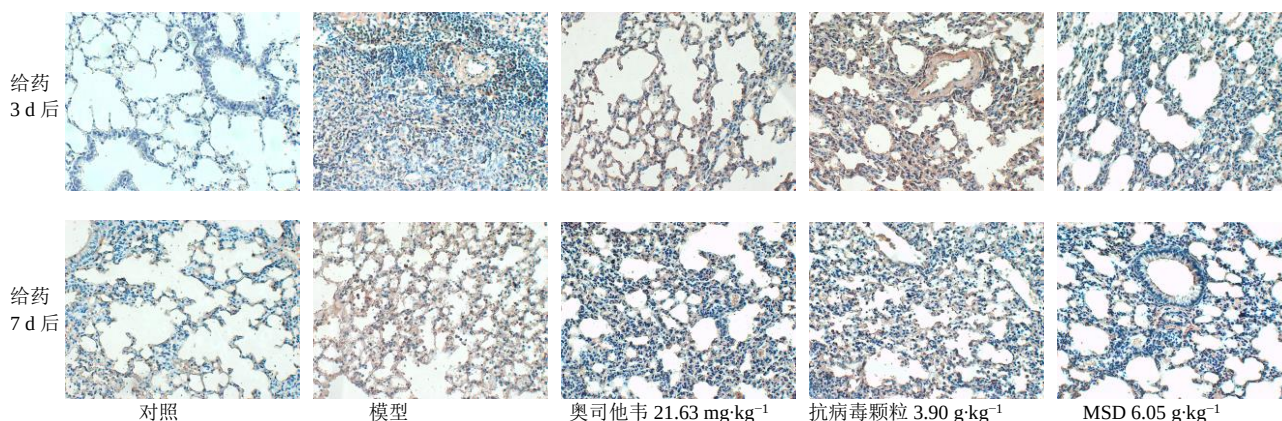


图 2 CCL5 在各组小鼠肺组织中表达 (PV-9000 通用二步法, ×200)

Fig. 2 Expression of CCL5 in lung tissue of mice in each group (immunohistochemistry PV-9000 two-step method, × 200)

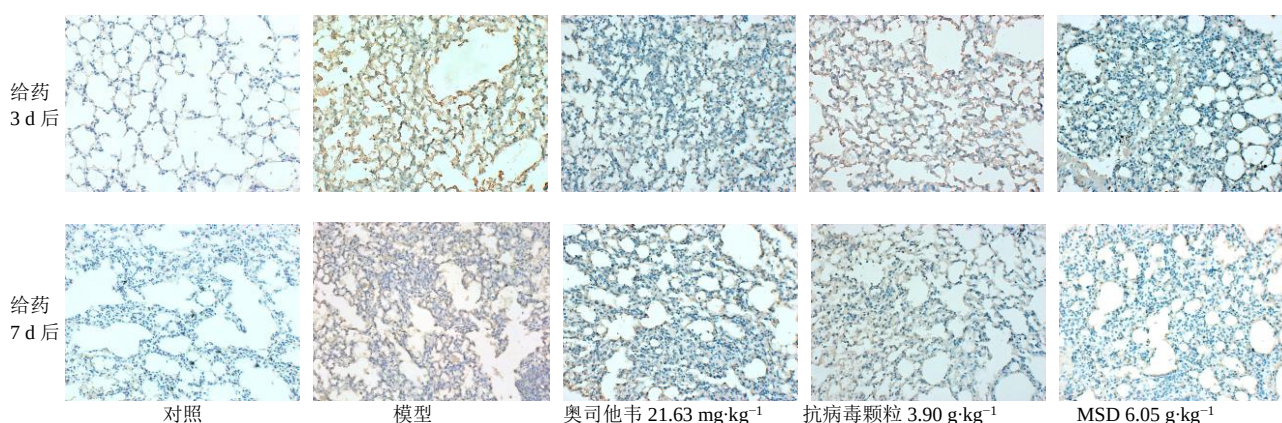


图 3 CXCL10 在各组小鼠肺组织中表达 (PV-9000 通用二步法, ×200)

Fig. 3 Expression of CCL5 in lung tissue of mice in each group (immunohistochemistry PV-9000 two-step method, × 200)

表 4 各组小鼠肺组织中 CCL5、CXCL10 的 A 值 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 4 Average A values of lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	A _{CCL5}		A _{CXCL10}	
		给药 3 d 后	给药 7 d 后	给药 3 d 后	给药 7 d 后
对照	—	0.11 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.13 ± 0.02
模型	—	0.32 ± 0.03*	0.19 ± 0.05	0.41 ± 0.03**	0.22 ± 0.11
奥司他韦	0.021 63	0.14 ± 0.02 [#]	0.13 ± 0.01	0.29 ± 0.05 [#]	0.14 ± 0.01
抗病毒颗粒	3.900	0.23 ± 0.05	0.12 ± 0.03	0.32 ± 0.09 [#]	0.15 ± 0.01
MSD	6.050	0.12 ± 0.01 [#]	0.12 ± 0.01	0.30 ± 0.05 [#]	0.15 ± 0.02

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与模型组比较: [#]P<0.05*P < 0.05 **P < 0.01 vs control group; [#]P < 0.05 vs model group

药 7 d 后, 模型组 CCL5、CXCL10 mRNA 表达仍高于其他各组, 但差异无统计学意义。

3.6 OUT 聚类分析

5 组 2 个时间点 (给药 3、7 d) 共收集 30 个肺组织样品 (每组每个时间点 3 个样品), 全部建库合格, 共获得 1 696 921 条原始数据, 经过滤严格处理得到 1 211 627 条高质量的 Tags, 平均长度为 431 bp, 以 97% 相似度聚类, 共获得 1 581 个 OUT, 平

均每个样品 336 个 OUT, 归属于 20 个门 248 个属。

3.7 物种分布 (微生物群落结构分析)

3.7.1 门 (Phylum) 水平分布 结果如图 4 和表 7 所示, 肺菌群优势菌门以厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和变形菌门 (Proteobacteria) 3 大菌门为主。给药 3 d 后, 对照组、奥司他韦组、抗病毒颗粒组和 MSD 组厚壁菌门相对丰度较高、其次为拟杆菌门和变形菌门; 模

表 5 各组小鼠肺组织匀浆 CCL5 和 CXCL10 含量测定 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 5 Levels of CCL5 and CXCL10 in lung homogenate of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CCL5		CXCL10	
		给药 3 d 后	给药 7 d 后	给药 3 d 后	给药 7 d 后
对照	—	552.32±147.39	468.07±77.32	225.44±78.69	219.91±73.48
模型	—	828.89±151.55**	591.15±63.73	1 058.72±372.14**	325.16±90.97*
奥司他韦	0.021 63	589.19±83.53##	533.92±49.17	402.46±217.91##	231.67±38.07#
抗病毒颗粒	3.900	671.02±118.75	527.56±49.84	511.22±263.59##	264.39±61.04
MSD	6.050	612.07±98.04#	512.94±23.12	364.46±111.05##	236.59±36.64#

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group表 6 各组小鼠肺组织 CCL5 和 CXCL10 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 6 Comparison of relative expression of CCL5 and CXCL10 mRNA in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CCL5		CXCL10	
		给药 3 d 后	给药 7 d 后	给药 3 d 后	给药 7 d 后
对照	—	1.00±0.23	1.00±0.02	1.00±0.05	1.00±0.04
模型	—	9.72±3.92*	4.22±2.47	16.93±4.70**	7.41±4.92
奥司他韦	0.021 63	4.35±2.22##	2.36±1.33	3.55±1.55##	2.91±1.54
抗病毒颗粒	3.900	5.29±3.69**	3.48±1.54	4.64±3.17#	4.03±2.25
MSD	6.050	3.93±2.33##	2.16±0.74	2.57±1.52##	2.95±1.47

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

型组变形菌门相对丰度较高、其次为厚壁菌门和拟杆菌门。与对照组比较,模型组厚壁菌门相对丰度显著降低($P < 0.01$),变形菌门相对丰度增加($P < 0.05$);与模型组比较,奥司他韦组、抗病毒颗粒组、MSD 组厚壁菌门相对丰度明显增加($P < 0.05$ 、 0.01),MSD 组变形菌门相对丰度降低($P < 0.05$)。给药 7 d 后,5 组小鼠肺部菌群优势菌门仍以厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门为主,组间各优势菌门相对丰度无显著差异。与给药 3 d 后比较,厚壁菌门相对丰度进一步增加(MSD 组略有下降),成为各组占绝对优势的菌门;变形菌门相对丰度增加(模型组略有下降),成为各组第 2 优势菌门。

3.7.2 属水平分布 各组小鼠肺菌群优势菌属构成及相对丰度如图 5 和表 8 所示。给药 3 d 后,对照组优势菌属包括副拟杆菌属 *Parabacteroides* sp. (9.80%)、颤螺旋菌属 *Oscillospira* sp. (5.35%)、拟杆菌属 *Bacteroides* Castellani and Chalmers (4.58%)、粪球菌属 *Coprococcus* Holdeman and Moore (2.21%)、乳杆菌属 *Lactobacillus* Beijerinck (1.28%) 等;与对照组比较,模型组拟杆菌属、埃希菌属 *Escherichia* sp.、变形杆菌属 *Proteus* sp. 相对丰度明显增高($P < 0.05$ 、 0.01),粪球菌属相对丰度下降

($P < 0.05$);与模型组比较,奥司他韦组、抗病毒颗粒组、MSD 组拟杆菌属和埃希菌属相对丰度显著下降($P < 0.01$),变形杆菌属相对丰度下降,但不具有统计学意义;与模型组比较,奥司他韦组和 MSD 组乳杆菌属相对丰度增加($P < 0.05$)。给药 7 d 后,对照组、模型组、奥司他韦组、抗病毒颗粒组、MSD 组小鼠肺部主要优势菌属比较相似,包括厌氧芽孢杆菌属 *Anoxybacillus* sp.、芽孢杆菌属 *Geobacillus* sp. 等,组间优势菌属无显著差异。与给药 3 d 后比较,模型组埃希菌属和变形杆菌属相对丰度下降,但差异不具有显著性水平。

3.8 Alpha 多样性指数分析

常用的 Alpha 多样性指数包括 ACE 指数、Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数。ACE 指数和 Chao1 指数用来评价菌群的丰富度,数值越大,说明样品丰富度越高。Shannon 指数和 Simpson 指数主要用来评价菌群多样性,Shannon 指数值越大, Simpson 指数值越小,说明样品的物种多样性越高。表 9 为给药 3、7 d 后,各组小鼠肺菌群 Alpha 多样性指数。由表 9 可知,给药 3、7 d 后,模型组小鼠肺部菌群多样性较对照组降低,各药物组菌群多样性较模型组增加,但无显著性差异,各组小鼠

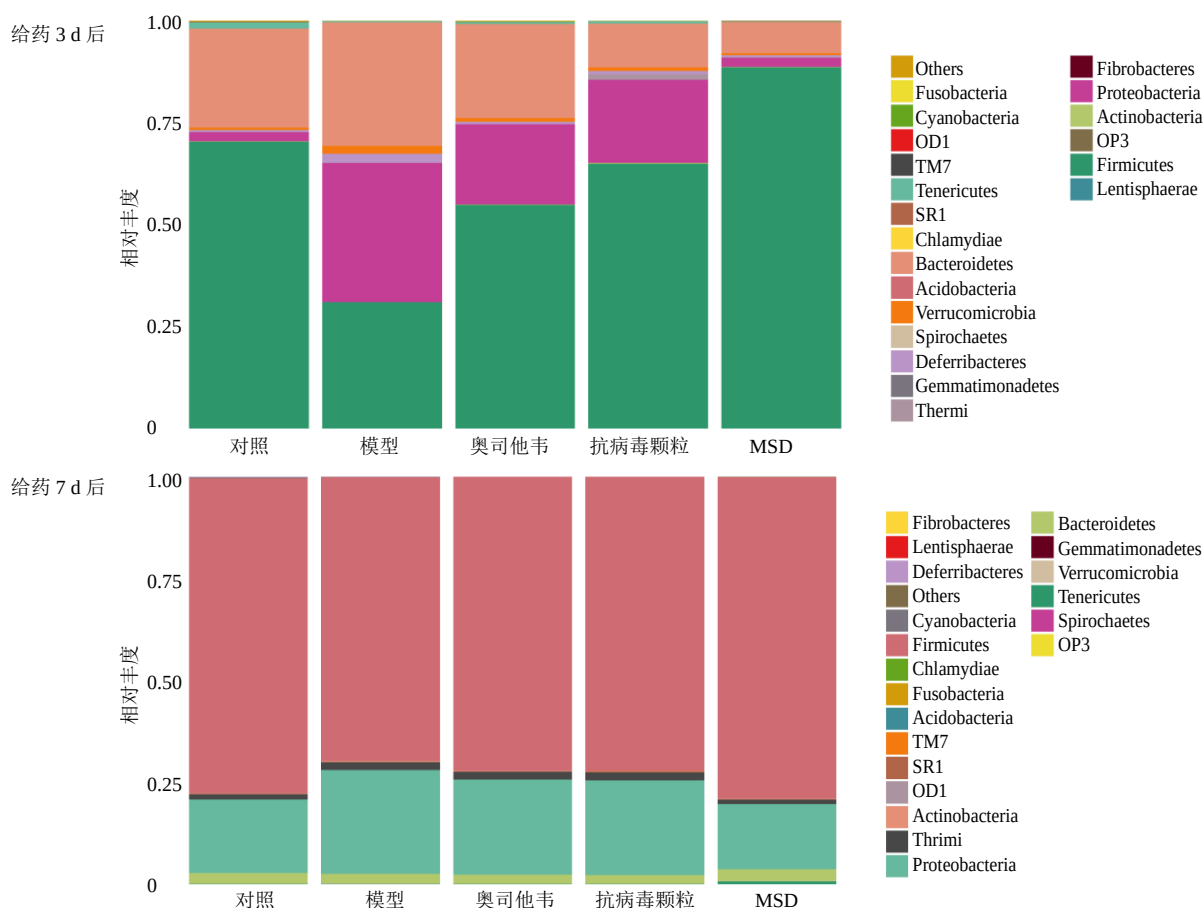


图 4 给药 3、7 d 后各组样本肺部菌群在门 (Phylum) 水平上分布

Fig. 4 Distribution of pulmonary flora at Phylum level in each group on 3rd and 7th day of administration

表 7 各组小鼠肺部菌群门水平相对丰度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Relative abundance of pulmonary flora at phylum level in various groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	给药 3 d 后相对丰度			给药 7 d 后相对丰度		
	厚壁菌门	拟杆菌门	变形菌门	厚壁菌门	拟杆菌门	变形菌门
对照	70.48±16.91	24.18±4.29	2.16±1.11	78.12±13.16	2.60±0.32	17.22±12.53
模型	29.88±16.55**	28.38±9.56	37.28±21.38*	69.67±1.55	2.35±0.54	25.43±1.23
奥司他韦	54.31±16.99#	22.32±7.23	20.25±10.80	72.00±0.65	2.18±0.18	23.47±0.52
抗病毒颗粒	63.28±13.11##	12.40±17.41	19.66±8.55#	72.57±2.24	2.12±0.37	22.95±1.77
MSD	88.81±8.77##	7.31±8.58	2.32±1.02#	78.87±10.43	2.97±1.33	15.89±11.76

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

肺部菌群丰富度无显著差异。

3.9 Beta 多样性分析

Beta 多样性分析主要用来比较样本与样本间微生物群落组成的相似程度。非度量多维尺度分析 (non-metric multi-dimensional scaling, NMDS) 是评估 Beta 多样性的方式之一, 它以点的形式将样本包含的物种信息反映在多维空间上, 通过点与点之间的距离体现样本间的差异程度, 如果两样品间距离

越近, 说明 2 个群落构成越相似。图 6-A 为给药 3 d 后, 各组内样品点分布情况。由图 6-A 可以看出, 给药 3 d 后, 各组内样品点分别集中于不同区域, 组间无交集, 说明组间肺部菌群构成有明显差异。图 6-B 为给药 7 d 后, 各组内样品点分布情况。由图 6-B 可以看出, 除对照组和 MSD 组各有 1 个样本比较离散外, 其余样品点均高度集中, 说明流感恢复期, 组间肺部菌群构成具有一定的相似性。

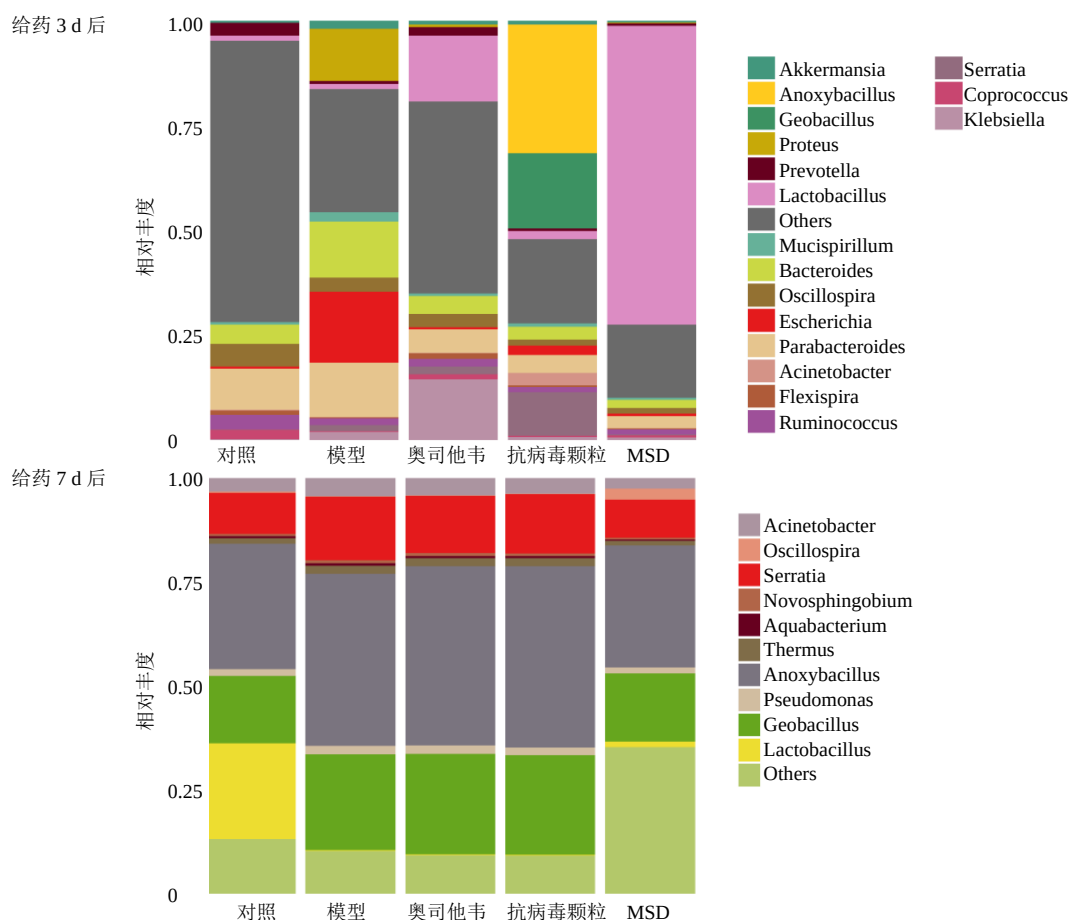


图 5 给药 3、7 d 后各组样本肺部菌群在属 (Genus) 上分布

Fig. 5 Distribution of pulmonary flora at Genus level in each group on 3rd and 7th day of administration

表 8 各组小鼠肺部菌群属水平相对丰度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 8 Relative abundance of pulmonary flora at genus level in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	给药 3 d 后相对丰度					给药 7 d 后相对丰度				
	拟杆菌属	埃希菌属	变形杆菌属	粪球菌属	乳杆菌属	厌氧芽孢杆菌属	芽孢杆菌属	埃希菌属	粪球菌属	乳杆菌属
对照	4.55±0.55	0.49±0.33	0.02±0.03	2.21±0.89	1.28±0.79	28.56±24.74	15.34±13.29	0.28±0.40	0.11±0.09	25.97±44.29
模型	13.02±5.90**	18.81±10.52**	13.48±16.66*	0.23±0.17*	1.52±2.25	41.36±1.14	23.04±0.89	0.05±0.01	0.03±0.01	0.25±0.20
奥司他韦	4.19±0.69##	0.59±0.34##	0.61±0.70	1.18±0.24##	15.49±2.36#	43.09±0.29	24.17±0.14	0.03±0.01	0.06±0.02	0.19±0.12
抗病毒颗粒	3.64±4.19##	2.67±3.41##	0.06±0.09	0.36±0.36*	2.35±3.69	43.53±0.06	24.26±2.19	0.04±0.01	0.05±0.01	0.13±0.08
MSD	1.84±1.85##	0.54±0.50##	0.11±0.19	1.24±0.50#	71.91±18.79#	29.05±25.16	16.22±14.06	0.03±0.03	0.59±0.92	1.32±1.97

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group表 9 各组小鼠肺部菌群 Alpha 多样性指数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 9 Alpha diversity metrics of pulmonary flora in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	给药 3 d 后 Alpha 多样性指数				给药 7 d 后 Alpha 多样性指数			
	ACE 指数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	ACE 指数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
对照	227±19	233±24	4.28±1.11	0.02±0.01	371±244	359±243	1.97±0.33	0.35±0.15
模型	258±237	256±233	2.44±0.95	0.20±0.11	401±273	395±267	1.87±0.61	0.38±0.24
奥司他韦	143±28	145±29	2.93±1.51	0.25±0.35	511±21	512±27	2.12±0.00	0.26±0.00
抗病毒颗粒	277±244	272±244	3.03±0.74	0.14±0.09	537±45	533±57	2.09±0.06	0.27±0.01
MSD	283±215	280±209	2.87±0.88	0.18±0.11	435±204	436±190	2.87±1.30	0.18±0.14

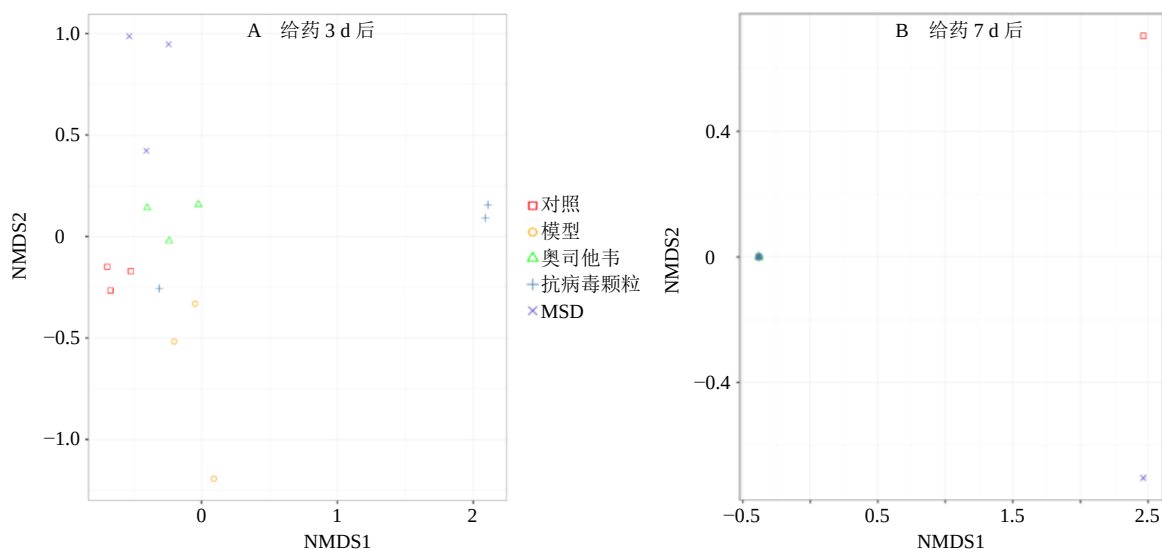


图 6 各组小鼠肺菌群 NMDS 分析图

Fig. 6 NMDS analysis of pulmonary flora in each group

3.10 组间差异物种的筛选

LEfSe 采用线性判别分析来估算每个组份丰度对差异效果影响的大小,找出对样品划分产生性差异影响的群落或物种。目前,常用 LEfSe 分析软件来筛选组间具有统计学差异的标记物 (biomarker)。LDA Score 大于设定值的物种 (less-strict 设为 2; more-strict 设为 4),即被认为是组间具有统计学差异的标记物。并根据差异物种绘制物种进化分支图。在进化分支图中,由内至外辐射的圆圈代表了由界 (单个圆圈) 至属 (或种) 的分类级别。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着色为黄色,差异物种 biomarker 跟随组进行着色,不同颜色节点表示在相应颜色组别中起到重要作用的微生物类群。图 7 主要展示了流感急性期和恢复期各组肺菌群丰度差异显著的物种。图 7-A 展示了给药 3 d 后,对照组、模型组、奥司他韦组、抗病毒颗粒组和 MSD 组肺菌群丰度差异显著的物种,柱状图的长度代表差异物种的显著性 (即为 LDA Score)。由图 7-A 可知,对照组肺菌群的优势物种为毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 粪球菌属和罗斯氏菌属 *Roseburia* Stanton and Savage; 模型组的优势物种为变形菌门 (Proteobacteria) γ -变形杆菌纲 (Gammaproteobacteria) 肠杆菌科 (Enterobacteriales); 奥司他韦组优势物种为克雷伯氏菌属 *Klebsiella* Trevisan; 抗病毒颗粒组主要优势物种为假单胞菌目 (Pseudomonadales) 假单胞菌科 (Pseudomonadaceae) 假单胞菌属 *Pseudomonas* sp.;

MSD 组主要优势物种为芽孢杆菌纲 (Bacilli) 乳杆菌目 (lactobacillus) 乳酸杆菌科 (Lactobacillaceae) 乳杆菌属; 图 7-B 为根据上述差异物种绘制的物种进化分支图。给药 7 d 后,各组 LDA 值分布柱状图及进化分支图见图 7-C、D,仅模型组和抗病毒颗粒组有差异物种,且组间差异不显著 (LDA 值 < 3.5)。

3.11 肺部菌群相对丰度与肺组织中 CCL5、CXCL10 含量相关性分析

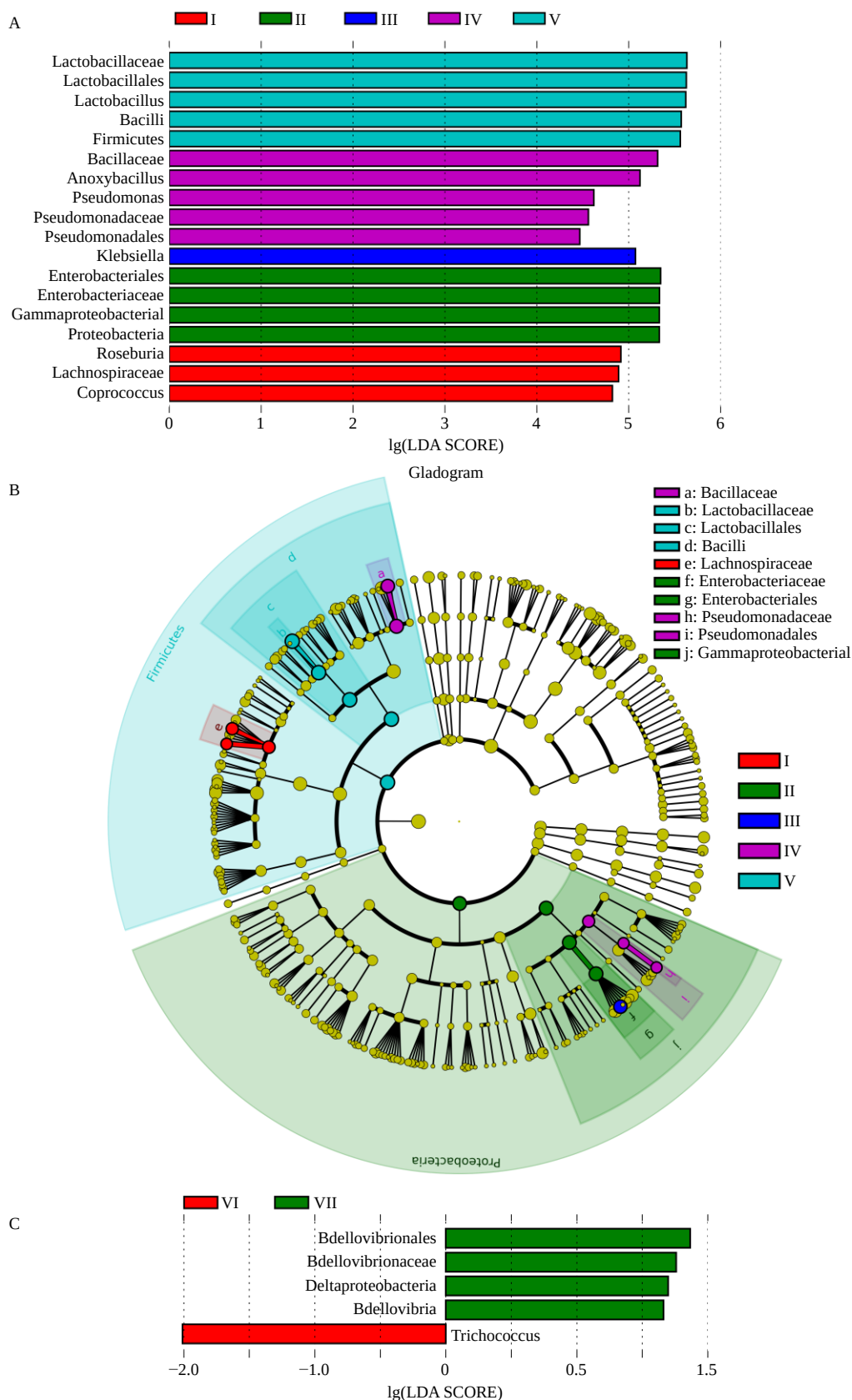
Spearman 相关性分析结果见表 10,由表 10 可知,肺部菌群中埃希菌属、变形杆菌属、拟杆菌属丰度与 CCL5、CXCL10 含量呈显著正相关 ($P < 0.01$),粪球菌属丰度与 CCL5、CXCL10 含量呈显著负相关 ($P < 0.01$),乳杆菌丰度属与 CCL5、CXCL10 含量相关性不显著。

4 讨论

长期以来,由于菌群检测技术水平有限,且合格标本很难获得,所以健康的肺一直被认为是一个无菌的器官。2010 年 Hilty 等^[23]利用 16S rRNA 基因测序发现了肺部菌群,随后肺部菌群与呼吸系统疾病的关系日益受到重视,但与肠道微生物群相比,对肺部微生物群的研究还处于起步阶段。目前,已有研究发现,健康人或动物的肺部含有多种低密度的共生微生物群,以细菌为主,主要包括厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门^[24-25]。肺部菌群的稳态由迁徙、清除和增殖的平衡决定。迁徙到肺部的微生物群有部分归因于下呼吸道支气管及微支气管“抽吸作用”或其他部位的移位;细菌清除有赖于粘液纤毛运动和适应性免疫防御;肺部细菌的增

殖受局部环境中氧张力、pH 值、血液灌注、肺泡通气、温度以及宿主炎症细胞的浓度和活化程度的影响^[26]。肺部菌群不是一成不变的，在健康和疾病状

态下，或疾病不同时期，肺部菌群也是动态变化的，这种动态变化与呼吸系统疾病的发生发展有着密切关系。健康条件下，气道腔主要含有空气，因此细



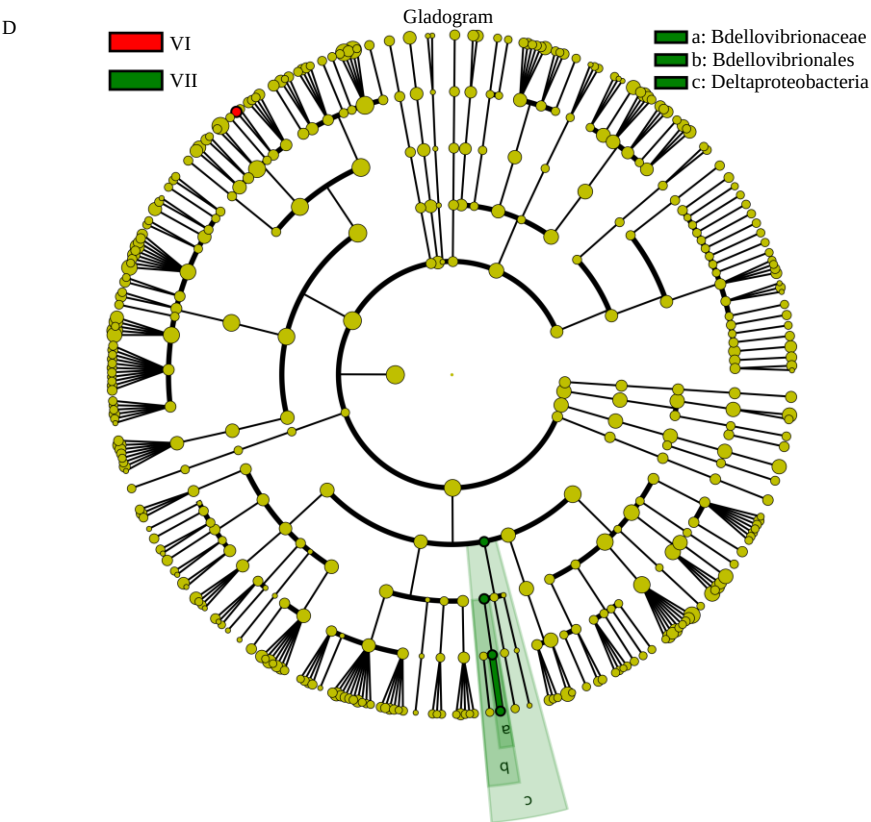


图 7 LEfSE 差异分析结果
A-LDA 值分布柱状图 B-进化分支图 (给药 3 d 后) C-LDA 值分布柱状图 D-进化分支图 (给药 7 d 后) I-对照组 II-模型组 III-奥司他韦组 IV-抗病毒颗粒组 V-MSD 组 (给药 3 d 后) VI-模型组 VII-抗病毒颗粒组 (给药 7 d 后)
A-histograms of LDA scores B-cladogram (after 3 days of administration) C-histograms of LDA scores D-cladogram (after 7 days of administration) I-control group II-model group III-Oseltamivir group IV-Antiviral Particle group V-MSD group (after 3 days of administration) VI-model group VII-Antiviral Particle group (after 7 days of administration)

图 7 LEfSE 差异分析结果
Fig. 7 LEfSE difference analysis

表 10 肺部菌群相对丰度与肺组织中 CCL5、CXCL10 含量相关性分析

Table 10 Correlation analysis between relative abundance of pulmonary flora and level of CCL5 and CXCL10 in lung tissue

指标	埃希菌属		变形杆菌属		拟杆菌属		粪球菌属		乳杆菌属	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
CCL5	0.911	<0.001	0.746	0.001	0.804	<0.001	-0.704	0.003	-0.432	0.108
CXCL10	0.790	<0.001	0.648	<0.001	0.576	0.003	-0.652	<0.001	-0.344	0.092

菌营养物质可利用相对有限。而在肺部炎症时，肺泡内充满了来自受损肺泡上皮细胞和血管内皮细胞释放的蛋白渗出液，细菌的营养供应激增，使得能够利用这些营养物质的细菌大量增殖，宿主肺部微生物稳态被破坏^[27]。目前，肺部菌群在维持肺内免疫稳态方面的作用被逐渐认识，研究提示，肺部内源性条件致病菌过度生长对疾病的影响可能比外源性病原菌侵袭还重要^[28]。

本研究发现，对照组、模型组和各药物组小鼠肺部均有菌群分布，但健康状态和疾病状态下，肺部菌群组成不同，疾病的不同时期（急性期和恢复

期）肺部菌群组成也不同。在门水平，对照组小鼠肺部菌群优势菌门主要以厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门为主，优势菌门占比在短期内可能因环境、应激等因素发生较大变化，表现为随着时间推移，厚壁菌门和变形菌门丰度增加，而拟杆菌门丰度下降。急性期时，模型组变形菌门相对丰度较对照组明显增加，恢复期时，变形菌门丰度迅速下降，接近对照组水平。在属水平，急性期时，对照组主要优势菌属包括副拟杆菌属、颤螺旋菌属、粪球菌属、乳杆菌属等；模型组拟杆菌属、埃希菌属、变形杆菌属相对丰度较对照组明显增加，而粪球菌属相对

丰度下降；各药物组拟杆菌属、埃希菌属相对丰度较模型组明显下降，粪球菌属相对丰度增加；奥司他韦组和 MSD 组乳杆菌属相对丰度较模型组增加，其中 MSD 组相对丰度更高。此外，MSD 组优势菌属还包括副拟杆菌属、颤螺旋菌属、瘤胃球菌属等。恢复期，各组小鼠主要优势菌属相似，主要以厌氧芽孢杆菌属、芽孢杆菌属为主。

同时，实验还发现，流感急性期时模型组小鼠肺组织炎性细胞浸润明显，尤以淋巴细胞和巨噬细胞浸润为主，且炎性细胞及肺泡上皮细胞在急性期时高表达趋化因子 CCL5 和 CXCL10。CCL5 又称 RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)，由上皮细胞、CD8⁺T、CD4⁺T、单核巨噬细胞产生，对单核细胞、嗜碱性粒细胞和 T 细胞有强烈的趋化作用，能促进白细胞向炎症部位迁移和浸润。CXCL-10 又称 10 kDa 干扰素- γ 诱导蛋白 (10 kDa interferon- γ -induced protein, IP-10)，由干扰素- γ (IFN- γ)、TNF- α 、病毒 RNA 等诱导上皮细胞、内皮细胞、单核巨噬细胞、成纤维细胞和淋巴细胞产生，可趋化 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞和单核细胞聚集，促进 IFN- γ 、IL-6、IL-8 等多种促炎细胞因子分泌。CCL5 和 CXCL10 与流感病毒感染引起的肺部损伤的严重程度密切相关^[29]。

本研究发现，急性期时，模型组小鼠肺组织炎症反应严重程度达到高峰，同时肺菌群结构与对照组比较也发生了明显改变，恢复期肺菌群结构组成接近对照组水平，而肺部炎症反应也明显减轻。虽然，本研究尚不能明确两者的因果关系，但关联性分析结果显示，菌群结构和趋化因子 CCL5 和 CXCL10 之间存在一定的相关性。埃希菌属、变形杆菌属、拟杆菌属与 CCL5 和 CXCL10 含量呈正相关，粪球菌属与 CCL5 和 CXCL10 含量呈负相关。Jaleel 等^[30]发现大肠埃希菌与流感病毒有协同致病效应，两者共同感染后，肺组织损伤更严重，损伤持续时间更长，动物死亡率高达 40%；大肠埃希菌通过释放过氧化氢、一氧化二氮，或促进宿主细胞合成分泌蛋白水解酶等致病因子，引起宿主细胞坏死，促进细胞因子释放。Lang 等^[31]研究发现脂多糖可以促进 CXCL10 等趋化因子的产生，通过 CXCL10/CXCR3 轴诱导 CXCR3⁺淋巴细胞和中性粒细胞定向迁徙到肺组织中，促进急性呼吸窘迫征的发生。这可能成为埃希菌属加重肺部炎症损伤的原因。Chung 等^[32]研究发现，拟杆菌属中脆弱拟杆

菌可触发炎症级联反应的发生。肺部炎症使内皮和上皮损伤，富含蛋白质的水肿液渗入肺泡腔，为细菌增殖提供丰度的营养储备。同时，肺部病变致肺通气功能下降，氧气减少，肺泡内乳酸堆积，导致能够利用乳酸的细菌（如变形菌门细菌）大量增殖。这种生长反过来又会引发进一步的炎症，使得正反馈回路以逐渐增强的方式持续下去。而乳杆菌属、粪球菌属细菌可增加肠道内短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs) 含量，诱导小鼠肠道中 Treg 细胞的产生和分化，促进 IL-10 的产生，发挥炎症调节作用^[33]。因此，在流感病毒感染期间，肺部乳杆菌属、粪球菌属相对丰度增加，对于炎症缓解可能起到积极作用。

综上所述，本研究发现，流感病毒感染后小鼠肺组织正常结构消失，炎性细胞浸润明显，且高表达趋化因子 CCL5 和 CXCL10，同时肺部菌群结构组成也发生明显变化。奥司他韦、抗病毒颗粒、MSD 可不同程度缓解肺组织炎症病变，降低 CCL5、CXCL10 的表达，并调节肺部菌群结构组成。其中，奥司他韦和 MSD 能更好的促进炎症修复，抑制趋化因子过表达，增加肺部有益菌数量，抑制潜在致病菌的生长。与其他药物组比较，MSD 组乳杆菌属相对丰度更高，在本研究中，乳杆菌属与 CCL5、CXCL10 相关性不显著，考虑其可能通过其他的机制影响炎症进程。前期研究发现，MSD 对流感病毒感染小鼠肠道菌群结构和趋化因子的表达也会产生相似的影响，那么，其对肺部菌群结构和趋化因子表达的影响是否有赖于肠-肺轴的作用以及肺部菌群和免疫微环境如何在药物作用下达到平衡并影响流感的结局，尚需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Fukuyama S, Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: The contributions of virus and host factors [J]. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23(4): 481-486.
- [2] Louie J K, Acosta M, Winter K, et al. Factors associated with death or hospitalization due to Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) infection in California [J]. *JAMA*, 2009, 302(17): 1896-1902.
- [3] Liu Q, Zhou Y H, Yang Z Q. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy [J]. *Mol Immunol*, 2016, 13(1): 3-10.
- [4] Thomas M, Mani R S, Philip M, et al. Proinflammatory chemokines are major mediators of exuberant immune response associated with Influenza A (H1N1) pdm09 virus infection [J]. *J Med Virol*, 2009, 302(17):

- 1896-1902.
- [5] Tavares L P, Garcia C C, Gonçalves A, *et al.* ACKR2 contributes to pulmonary dysfunction by shaping CCL5: CCR5-dependent recruitment of lymphocytes during influenza A infection in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 318(4): L655-L670.
- [6] Ichikawa A, Kuba K, Morita M, *et al.* CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(1): 65-77.
- [7] Dumas A, Bernard L, Poquet Y, *et al.* The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases [J]. *Cell Microbiol*, 2018, 20(12): e12966.
- [8] 谷李铭, 邓辉雄, 王革非. 流感病毒感染下呼吸道微生物群和黏膜免疫微环境的动态变化 [A] // 新发与再发传染病研究论坛论文集 [C]. 广州: 广东省预防医学会医学病毒学专业委员会, 2019.
- [9] Lloyd C M, Marsland B J. Lung homeostasis: Influence of age, microbes, and the immune system [J]. *Immunity*, 2017, 46(4): 549-561.
- [10] 阚亮, 张萌, 何平. 肺炎链球菌肺炎模型小鼠肺组织趋化因子表达变化 [J]. 山西医药杂志, 2016, 45(12): 1379-1381.
- [11] 黄晓洁, 魏刚, 张龙, 等. 麻杏石甘汤的药理作用和临床应用研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2014, 30(1): 110-114.
- [12] 中新网. 新冠肺炎全球疫情实时动态 [EB/OL] (2020-10-18). <http://www.chinanews.com/m/34/2020/0318/1388/globalfeiyang.html>.
- [13] 郑文科, 张俊华, 杨丰文, 等. 中医药防治新型冠状病毒感染的肺炎各地诊疗方案综合分析 [J]. 中医杂志, 2020, 61(4): 277-280.
- [14] 李玲, 张波, 卢芳国, 等. A型流感病毒对肺巨噬细胞自噬的影响及麻杏石甘汤含药血清的干预作用 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(6): 878-884.
- [15] 张世鹰, 何谷良, 卢芳国, 等. 基于TLR7/8介导的IFN- α/β 蛋白表达水平探讨麻黄先煎之麻杏石甘汤抗流感病毒的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(3): 1188-1193.
- [16] 卢芳国, 何迎春, 肖子曾. 麻杏石甘汤对A型流感病毒感染的狗肾传代细胞凋亡的影响 [J]. 医学研究生学报, 2009, 2(3): 34-35.
- [17] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其试验技术 [M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997.
- [18] 葛资宇, 童骄, 那婧婧, 等. 不同煎煮方法的麻杏石甘汤及其含药血清对A型流感病毒神经氨酸酶活性的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(9): 1119-1123.
- [19] 饶毅, 张五萍, 魏惠珍, 等. 不同煎煮方法对麻杏石甘汤中成分变化研究 [J]. 中成药, 2014, 36(2): 337-341.
- [20] 李玲, 丁煌, 吴东升, 等. 三种有效中药对A型流感病毒感染小鼠肺部炎症的干预作用 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(5): 1038-1040.
- [21] 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2013.
- [22] Scher J, Ubeda C, Segal L, *et al.* THU0054 the lung microbiome in rheumatoid arthritis and local/systemic autoimmunity [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(Suppl 2): 211-212.
- [23] Hilty M, Burke C, Pedro H, *et al.* Disordered microbial communities in asthmatic airways [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8578.
- [24] Costa A N, Costa F, Campos S V, *et al.* The pulmonary microbiome: Challenges of a new paradigm [J]. *J Bras Pneumol*, 2018, 44(5): 424-432.
- [25] Man W H, de Steenhuijsen P, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(5): 259-270.
- [26] Fabbri A, Amedei A, Lavorini F, *et al.* The lung microbiome: Clinical and therapeutic implications [J]. *Intern Emerg Med*, 2019, 14(8): 1241-1250.
- [27] Dickson R P, Erb-Downward J R, Huffnagle G B. Homeostasis and its disruption in the lung microbiome [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(10): L1047-L1055.
- [28] Yang D, Xing Y, Song X, *et al.* The impact of lung microbiota dysbiosis on inflammation [J]. *Immunology*, 2020, 159(2): 156-166.
- [29] 何莎莎, 赵京霞, 徐霄龙, 等. 甲型流感病毒诱导急性呼吸窘迫综合征的研究进展 [J]. 世界中医药, 2017, 12(4): 18-21.
- [30] Jaleel S, Younus M, Idrees A, *et al.* Pathological alterations in respiratory system during co-infection with low pathogenic avian influenza virus (H9N2) and Escherichia coli in broiler chickens [J]. *J Vet Res*, 2017, 61(3): 253-258.
- [31] Lang S, Li L, Wang X, *et al.* CXCL10/IP-10 neutralization can ameliorate lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in rats [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169100.
- [32] Chung L, Thiele-Orberg E, Geis A L, *et al.* Bacteroides fragilis toxin coordinates a pro-carcinogenic inflammatory cascade via targeting of colonic epithelial cells [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(2): 203-214.
- [33] Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, *et al.* From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites [J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332-1345.