

湿热外环境在岭南湿热证炎症反应中的作用机理 及茵陈蒿的干预机制研究

欧阳欣玥¹, 黄欣慧², 陆希婧¹, 赵江宁³

1. 广州中医药大学第四临床医学院, 广东 深圳 518001

2. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006

3. 深圳市中医院, 广东 深圳 518001

[摘要] 目的: 研究湿热外环境在岭南湿热证炎症反应中的作用机理及茵陈蒿的干预机制。方法: 实验一, 将 48 只 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为 4 组: 对照组[T (25±2) °C, HR 55%]、岭南湿热外环境模型组[T (33±2) °C, HR 85%]、高热组[T (33±2) °C, HR 55%]、湿阻组[T (25±2) °C, HR 85%], 12 h 暴露, 造模 28 d, 每天记录小鼠进食量, 每周记录小鼠体质量。分别于造模后第 14 天与第 28 天, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测各组小鼠白细胞介素-6 (IL-6)、IL-18、IL-1β、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、核转录因子 κB (NF-κB) 及 Toll 样受体 4 (TLR4) 等炎症因子血清水平。实验二, 将 50 只 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为: 正常组、岭南湿热外环境模型组、茵陈蒿低、中、高剂量组, 将模型组与茵陈蒿 3 个剂量组放入人工气候箱[T (33±2) °C, HR 85%], 12 h 暴露, 制造湿热外环境。造模后 14 d, 茵陈蒿 3 组小鼠连续 7 d 用 3 种不同浓度的茵陈蒿水煎剂灌胃。检测方法同实验一。结果: 实验一, 造模后 14 d、造模后 14~28 d、造模后 28 d, 与对照组、高热组、湿阻组相比, 模型组小鼠血清 TNF-α 含量增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。各组 IL-18、IL-6、NF-κB、TLR4 比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。14~28 d, 高热组 IL-1β 与岭南湿热外环境模型组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。实验二, 与模型组相比, 茵陈蒿低、中、高剂量组血清 TNF-α 含量均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。各组 IL-18、IL-1β、IL-6、NF-κB、TLR4 比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论: 湿热外环境通过上调血清 TNF-α 水平触发岭南湿热证炎症反应的机制是由“外湿之邪”与“外热之邪”共同作用所致, 而茵陈蒿可通过干预这一机制改善此病理过程。

[关键词] 岭南湿热证; 湿热环境; 肿瘤坏死因子-α; 茵陈蒿; 小鼠

[中图分类号] R241.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2023) 13-0007-09

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2023.13.002

Exploration of the Mechanism of the Damp-Heat External Environment in the Inflammatory Response of Lingnan Damp-Heat Syndrome and the Interventional Mechanism of Artemisiae Scopariae Herba

OUYANG Xinyue¹, HUANG Xinhui², LU Xijing¹, ZHAO Jiangning³

1. The Fourth Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong 518001, China;

2. School of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510006, China;

3. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen Guangdong 518001, China

Abstract: **Objective:** To explore the mechanism of the damp-heat external environment in the

[收稿日期] 2023-02-18

[修回日期] 2023-04-18

[基金项目] 广州中医药大学大学生创新创业训练计划项目 (202110572024)

[作者简介] 欧阳欣玥 (2000-), 女, 在读本科生, E-mail: oyxy17682022@163.com。

[通信作者] 赵江宁 (1971-), 女, 副主任医师, E-mail: 57039938@qq.com。

inflammatory response of Lingnan damp-heat syndrome and the intervention mechanism of *Artemisiae Scopariae Herba*. **Methods:** In experiment 1, 48 SPF grade male BALB/c mice were randomly divided into four groups: the control group [$T (25 \pm 2) ^\circ\text{C}$, HR 55%], the Lingnan damp-heat external environment model group [$T (33 \pm 2) ^\circ\text{C}$, HR 85%], the high fever group [$T (33 \pm 2) ^\circ\text{C}$, HR 55%], and the dampness obstruction group [$T (25 \pm 2) ^\circ\text{C}$, HR 85%]. After 12 hours of exposure, the model was established for 28 days. The food intake of the mice was recorded daily, and the body mass of the mice was recorded weekly. On the day 14 and 28 of modeling, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum levels of inflammatory factors such as interleukin-6 (IL-6), IL-18, and IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) and Toll-like receptor 4 (TLR4) in each group of mice. In experiment 2, 50 SPF grade male BALB/c mice were randomly divided into three groups: normal group: Lingnan damp-heat external environment model group, low-, medium-, and high-dose groups of *Artemisiae Scopariae Herba*. The model group and three groups of *Artemisiae Scopariae Herba* were placed in an artificial climate box [$T (33 \pm 2) ^\circ\text{C}$, HR 85%], and exposed for 12 hours to create a damp-heat external environment. After 14 days of modeling, three groups of mice with *Artemisiae Scopariae Herba* were given intragastric administration of three different concentrations of *Artemisiae Scopariae Herba* decoction for 7 consecutive days. The detection method and indicators are the same as above. **Results:** In experiment 1, after 14 days, 14-28 days and 28 days of modeling, compared with the control group, high fever group, and dampness obstruction group, the serum TNF- α of the model group mice was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no statistically significant difference in the comparison of IL-18, IL-6, NF- κ B and TLR4 in each group ($P > 0.05$). At days 14-28, IL-1 β in high fever group compared with the Lingnan damp-heat external environment model group, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Experiment 2, compared with the model group, the serum TNF- α levels in the low-, medium-, and high-dose groups of *Artemisiae Scopariae Herba* were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no statistically significant difference in comparison of IL-18, IL-1 β , IL-6, NF- κ B and TLR4 in each group ($P > 0.05$). **Conclusion:** The damp-heat external environment up-regulates serum TNF- α levels to trigger the inflammatory response of Lingnan damp heat syndrome is caused by the joint action of "pathogenic factors of external dampness" and "pathogenic factors of external heat", and *Artemisiae Scopariae Herba* can improve this pathological process through this mechanism.

Keywords: Lingnan damp-heat syndrome; Damp-heat environment; Tumor necrosis factor- α ; *Artemisiae Scopariae Herba*; Mice

岭南湿热证指发生于广东、广西、海南、港澳等地，有鲜明地方特点的湿热证，具有地域特色^[1-2]。岭南地处中国东南沿海地区，属亚热带季风海洋性气候，降水丰富，空气湿度大，炎热；其地形以山川丘陵为主，故湿邪不散，易与热邪相合。宋代《太平圣惠方》指出：“岭南土地卑湿，气候不同，夏则炎毒郁蒸，冬则温暖无寒，风湿之气易于

伤人。”岭南地区颇具特色的地理因素与气候特点共同导致了该地区高温高湿的湿热外环境，故相比于我国其他地区，岭南地区的居民更容易罹患外感湿热证。据文献考究，岭南外感湿热证可被归类为“瘴病”的一种，所谓瘴病，即由岭南长期湿热气候蕴积而成的外邪侵袭人体所致的疾病，此外邪有别于六淫之邪，被称为“瘴气”。不同于其他地区的湿

热证,岭南因其常年潮湿炎热的气候和湿热之气难以流通外散的地形特点导致了岭南外感湿热证有以下独特之处:①湿热外环境单一因素即可中伤机体致病;②湿热之气常年郁蒸,此为长期性和持续性的环境因素。

已有研究表明湿热外环境作为物理性气候环境因素,本身即可引发病理损伤^[3-4],其与炎症反应的关系十分密切,并以肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子的大量分泌为特征^[3-5]。外感湿热引发的疾病在岭南屡见不鲜,轻则可致普通感冒、发热,重则可致急性病、传染病,而这些疾病均与炎症反应有很大关系,如非典型肺炎、登革热、流行性出血热等均伴有 TNF- α 的升高^[6-8]。由此可见,以 TNF- α 升高为主要标志的炎症反应是湿热外环境下岭南湿热证重要的病理损伤机制。然而,目前尚未有学者研究岭南湿热外环境单一病机所引发的炎症反应机制,也尚未有实验表明在“外热之邪”与“外湿之邪”的协同作用下是否与其单一作用下所引发的病理损伤程度有所不同,以量化岭南湿热外环境的湿热二气的交蒸作用。综上,相比于温病湿热模型^[9-10]的“高脂饲料+湿热环境(3 h/d,共3 d)+生物致病因子灌胃”的复合因素模型复制方法,本实验的造模重心是通过模拟岭南湿热外环境的气候条件以创造由“外感湿热”的单一环境因素诱发的岭南湿热证模型。参考荣光莉等^[11]运用人工气候箱模拟湿热环境的造模方法,结合岭南地区“湿热郁蒸”的持续性高温高湿的气候特点,以“温度(33 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度85%,每天12 h,连续28 d”营造岭南湿热外环境,小鼠以普通饲料而非高脂或高蛋白饲料喂养,以凸显“外感湿热”的单一病机作用。通过观察小鼠体征与 TNF- α 等血清炎症指标水平的变化对模型进行评价,同时将其与湿阻组、高热组、正常对照组进行对比。

由于外感湿热病机下的岭南湿热证是由“外湿之邪”与“外热之邪”两种病邪共同作用所致,故针对湿热外环境下的岭南湿热证的治疗应以清热祛湿的中药为主。茵陈苦、辛、微寒,有良好的清热利湿之效^[12],且根据近年来关于茵陈蒿药理作用的研究进展^[13-16]可知,茵陈蒿能够发挥较好的抗炎作用。故本实验用不同剂量的茵陈蒿水煎剂对模型小鼠进行灌胃,观察小鼠整体功能及炎症因子水平的变化

探究茵陈蒿对湿热外环境下岭南湿热证的干预机制是否以减轻 TNF- α 等炎症因子大量分泌为特征的炎症反应,以及是否有剂量梯度的差别。

1 材料与方法

1.1 动物 选择5~6周龄,体质量18~22 g SPF级雄性 BALB/c 小鼠78只,采购自珠海百试通生物科技有限公司,广东省实验动物质量合格编号为 No.44822700002385。本实验于中山市中医院中药药理实验室 SPF 级动物房进行,许可证号:SYXK(粤)2020-0109,本实验已通过中山市中医院动物实验伦理委员会的伦理审核(AEWC-2021035)。

1.2 药物及试剂 绵茵陈生药为康美药业股份有限公司产品,货号:KMZH0522943。根据《中华人民共和国药典》2020年版,茵陈蒿的临床用量为6~15 g。若以10 g计算,依据《药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算》计算小鼠的给药剂量为1.3 g/(kg $\cdot$ d)。用超纯水将绵茵陈生药分别煎成0.65 g/(kg $\cdot$ d)、1.3 g/(kg $\cdot$ d)、2.6 g/(kg $\cdot$ d)的药物溶液。小鼠每天中药溶液的灌胃量为0.2 mL;小鼠 TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(货号:MM-0132M1)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(货号:MM-0163M1)、小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(货号:MM-0040M1)、小鼠 NF- κ B ELISA 试剂盒(货号:MM-44802M1)、小鼠 TLR4 ELISA 试剂盒(货号:MM-43950M1),广州晶欣生物科技有限公司;小鼠 IL-18 ELISA 试剂盒(货号:MM-0169M1),南通经纬生物科技有限公司。

1.3 仪器 RXZ-158A-LED 型人工气候箱,宁波江南仪器厂;亚都 YC-D205 型超声波加湿器,北京亚都环保科技有限公司;Multiskan FC 型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司。

1.4 分组与模型复制方法

1.4.1 实验一:湿热外环境在岭南湿热证炎症反应中的作用机理 参考荣光莉等^[11]的岭南外感湿热证小鼠模型复制方法,将本实验岭南湿热外环境模型组的环境条件设定为:温度(33 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度85%,每天12 h,以人工气候箱模拟岭南地区的湿热外环境。将小鼠在 SPF 级实验室里适应性喂养7 d,用随机数字表法将小鼠分为以下4组:岭南湿热外环境模型组、湿阻组、高热组、对照组,每组12只,以普通饲料喂养,造模后14 d,每组随机选

取6只小鼠处死后取材；造模后28 d，每组将剩下6只小鼠处死后取材。①岭南湿热外环境模型组：正常喂养且进入人工气候箱 $[T(33\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ，HR 85%]，每天12 h；②湿阻组：正常喂养且进入人工气候箱 $[T(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ，HR 85%]，每天12 h；③高热组：正常喂养且进入人工气候箱 $[T(33\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ，HR 55%]，每天12 h；④对照组：SPF级环境下 $[T(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ，HR 55%]正常喂养。根据每天鼠粮减少量/小鼠数量求得每组单只小鼠平均进食量，每周记录体质量。模型复制结束后，根据对小鼠体征的观察判断是否在小鼠身上成功诱导出了人的湿热证典型症状，再结合小鼠血清TNF- α 等指标水平变化判断模型复制是否成功，且根据各组血清TNF- α 等指标水平差异探讨在“外热之邪”与“外湿之邪”的协同作用下是否与其单一作用下所引发的炎症反应程度有所不同，以量化岭南湿热外环境湿热二气的交蒸作用。

1.4.2 实验二：茵陈蒿干预机制研究 根据实验一的模型复制方法构建茵陈低、中、高剂量组。将小鼠在SPF级实验室里适应性喂养7 d，用随机数字表法将小鼠分为以下5组：正常组、岭南湿热外环境模型组及茵陈蒿低、中、高剂量组，每组10只，普通饲料喂养14 d。①对照组：SPF级环境下 $[T(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ，HR 55%]正常喂养；②岭南湿热外环境模型组：正常喂养且进入人工气候箱 $[T(33\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ，HR 85%]，每天12 h；③茵陈蒿低、中、高剂量组：造模同岭南湿热外环境模型组。14 d后茵陈蒿水煎剂[低剂量组：0.65 g/(kg·d)；中剂量组：1.3 g/(kg·d)；高剂量组：2.6 g/(kg·d)]连续灌胃7 d后，处死并取材。每天记录进食量，每周记录体质量。模型评价标准同实验一。探究茵陈蒿对湿热外环境下岭南湿热证的干预机制是否以减轻TNF- α 等炎症因子大量分泌为特征的炎症反应，并横向比较茵陈蒿低、中、高剂量3组的血清TNF- α 水平以观察炎症反应的减轻程度是否与剂量梯度相关。

1.5 样本收集及指标检测 血清收集及ELISA检测TNF- α 含量，所有小鼠禁食不禁水24 h后，采用摘眼球取血，4℃离心10 min(3 000 r/min，离心半径10 cm)后取血清，-80℃低温保存。血清样品中TNF- α 、白细胞介素-6(IL-6)、IL-18、IL-1 β 、核转录因子- κ B(NF- κ B)及Toll样受体4(TLR4)按照ELISA试剂盒说明书进行检测。

1.6 统计学方法 利用IBM SPSS25.0软件进行统计学分析。作Shapiro-Wilk检验检测正态分布性，作Levene检验检测方差齐性，若数据组间分布满足正态分布且组间方差齐，采用One-Way ANOVA进行方差分析，组间比较使用Dunnett检验或LSD检验，数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示；若数据不满足方差齐性，采用Welch检验。

2 结果

2.1 实验一：湿热外环境在岭南湿热证炎症反应中的作用机理

2.1.1 小鼠一般情况观察 对照组小鼠在饲养期间，精神状态良好，活动度好，纳佳，皮毛光滑，色泽亮；岭南湿热外环境模型组小鼠出现活动度下降、消瘦、纳差、大便溏及阴囊下垂等湿热证症状；而湿阻组和高热组因分别受到“外湿之邪”与“外热之邪”的影响，也出现了类似症状，但其程度比岭南湿热外环境模型组小鼠轻。

2.1.2 进食量观察 见表1。整体来看，对照组小鼠的进食量随着时间推移呈相对稳定而缓慢上升的趋势，而岭南湿热外环境模型组和湿阻组小鼠由于受到外湿作用出现不同程度的进食量减少。造模第14天，对照组和高热组小鼠进食量相比第0天显著增加，而湿阻组和岭南湿热外环境模型组则没有明显改变，且除了对照组，其他3组在0~14 d期间进食量都有不同程度下降。造模第28天，湿阻组和岭南湿热外环境模型组进食量相比第14天和第0天均显著下降，其中湿阻组小鼠进食量的定基增长速度(增长后进食量/最初进食量 $\times 100\%-1$)比模型组低(湿阻组-17.16%，模型组-12.92%)；高热组虽然相比于第14天进食量有所减少，但与第0天相比区别不大。由此可见外湿之邪对进食量减少的作用更为显著，外热之邪在建模早期则可提高进食量，这与中医学理论中湿邪致脾胃运化受阻而纳差，热邪致消谷善饥有关。

2.1.3 体质量动态变化 见表2。由于建模开始时的对照组小鼠体质量即与其他3组有明显差异($P<0.01$ ， $P<0.05$)，故对于对照组的数据描述以该组横向比较增减趋势为主，而将其他3组进行纵向比较以对比差异性。造模期间，对照组、湿阻组、高热组小鼠体质量均随时间推移呈上升趋势，而岭南湿热外环境模型组置于人工气候箱后，由于外湿与

外热的协同影响在第 28 天时出现明显的体质量下降,与湿阻组、高热组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。与其他 3 组比较,模型组小鼠体质量定基增长速度(增长后体质量/最初体质量 $\times 100\%-1$)在 28 d 中处于最低水平,各组小鼠体质量增长速度为:对照组 21.27% > 高热组 18.55% > 湿阻组 16.16% > 岭南湿热外环境模型组-1.05%。

表 1 实验一不同时间段各组单只小鼠平均进食量比较 $\bar{x} \pm s$ g

组 别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
岭南湿热外环境模型组	3.56	2.93	3.64	3.00	3.10
对照组	3.15	3.18	3.83	3.50	3.63
湿阻组	4.37	3.88	4.26	3.90	3.62
高热组	3.44	2.76	3.99	3.02	3.30

注:0~14 d 鼠数为 12,21 d、28 d 鼠数为 6

表 2 实验一不同时间段各组小鼠体质量比较($\bar{x} \pm s$) g

组 别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
岭南湿热外环境模型组	24.69 ± 1.04 ^①	26.33 ± 1.35 ^②	27.53 ± 1.67 ^①	28.23 ± 2.02 ^②	24.43 ± 1.27
对照组	22.76 ± 1.39	23.97 ± 1.26	25.34 ± 1.41	26.38 ± 1.61	27.60 ± 1.57 ^③
湿阻组	24.13 ± 1.00 ^①	26.28 ± 1.33 ^②	26.82 ± 1.79	27.30 ± 1.59	28.03 ± 1.75 ^③
高热组	24.17 ± 0.80 ^②	26.12 ± 1.05 ^②	27.23 ± 1.23 ^①	27.98 ± 1.48	28.65 ± 1.46 ^③
F 值	6.788	9.923	4.746	1.446	9.178
P 值	0.001	0.000	0.006	0.259	0.001

注:0~14 d 鼠数为 12,21 d、28 d 鼠数为 6。①与对照组比较, $P<0.05$;②与对照组比较, $P<0.01$;③与岭南湿热外环境模型组比较, $P<0.01$

2.1.4 实验一各组小鼠血清 TNF- α 水平比较 见表 3。造模 0~14 d 内,与对照组、湿阻组、高热组相比,岭南湿热外环境模型组小鼠血清 TNF- α 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。造模 14~28 d 内,与对照组、湿阻组、高热组相比,模型组小鼠血清 TNF- α 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.1.5 实验一各组小鼠血清炎症指标水平比较 见表 4~8。各组 IL-18、IL-6、NF- κ B、TLR4 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。14~28 d,高热组 IL-1 β 与岭南湿热外环境模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 实验二:茵陈蒿干预机制研究

2.2.1 小鼠一般情况观察 茵陈蒿 3 组小鼠在使用与岭南湿热外环境模型组相同的模型复制方法后,

表 3 实验一各组小鼠血清 TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$)

时 间	组 别	鼠数	TNF- α (pg/mL)	F 值	P 值
0~14 d	岭南湿热外环境模型组	6	162.42 ± 22.73	3.768	0.027
	对照组	6	121.85 ± 34.80 ^①		
	湿阻组	6	122.75 ± 21.51 ^①		
	高热组	6	118.10 ± 24.10 ^①		
14~28 d	岭南湿热外环境模型组	6	177.16 ± 23.63	9.657	0.005
	对照组	6	124.17 ± 21.93 ^②		
	湿阻组	6	117.35 ± 11.08 ^②		
	高热组	6	121.02 ± 19.53 ^②		

注:①与岭南湿热外环境模型组比较(造模 0~14 d), $P<0.05$;②与岭南湿热外环境模型组比较(造模 14~28 d), $P<0.01$

表 4 实验一各组小鼠血清 IL-18 水平比较($\bar{x} \pm s$)

时 间	组 别	鼠数	IL-18(pg/mL)	F 值	P 值
0~14 d	岭南湿热外环境模型组	6	29.71 ± 2.30	2.711	0.072
	对照组	6	32.72 ± 2.41		
	湿阻组	6	33.79 ± 2.38		
	高热组	6	31.64 ± 3.18		
14~28 d	岭南湿热外环境模型组	6	30.72 ± 1.63	1.460	0.257
	对照组	6	34.11 ± 2.74		
	湿阻组	6	31.76 ± 4.57		
	高热组	6	30.14 ± 4.07		

表 5 实验一各组小鼠血清 IL-1 β 水平比较($\bar{x} \pm s$)

时 间	组 别	鼠数	IL-1 β (pg/mL)	F 值	P 值
0~14 d	岭南湿热外环境模型组	6	17.57 ± 1.84	2.222	0.117
	对照组	6	15.00 ± 2.15		
	湿阻组	6	15.58 ± 1.51		
	高热组	6	16.91 ± 2.18		
14~28 d	岭南湿热外环境模型组	6	19.07 ± 2.53	5.042	0.010
	对照组	6	18.29 ± 1.35		
	湿阻组	6	15.93 ± 2.76		
	高热组	6	14.94 ± 1.21 ^①		

注:①与岭南湿热外环境模型组比较, $P<0.01$

表 6 实验一各组小鼠血清 IL-6 水平比较($\bar{x} \pm s$)

时 间	组 别	鼠数	IL-6(pg/mL)	F 值	P 值
0~14 d	岭南湿热外环境模型组	6	29.52 ± 3.17	0.326	0.807
	对照组	6	27.37 ± 2.05		
	湿阻组	6	29.12 ± 6.26		
	高热组	6	27.40 ± 6.36		
14~28 d	岭南湿热外环境模型组	6	31.66 ± 2.78	1.046	0.395
	对照组	6	29.15 ± 4.30		
	湿阻组	6	26.81 ± 7.24		
	高热组	6	30.04 ± 2.47		

表7 实验一各组小鼠血清 NF-κB 水平比较($\bar{x} \pm s$)

时 间	组 别	鼠数	NF-κB(pg/mL)	F 值	P 值
0~14d	岭南湿热外环境模型组	6	129.34±59.68	0.268	0.848
	对照组	6	117.68±19.35		
	湿阻组	6	108.38±27.90		
	高热组	6	123.29±48.85		
14~28d	岭南湿热外环境模型组	6	130.65±38.69	1.352	0.286
	对照组	6	104.35±24.83		
	湿阻组	6	134.42±54.71		
	高热组	6	152.23±42.69		

表8 实验一各组小鼠血清 TLR4 水平比较($\bar{x} \pm s$)

时 间	组 别	鼠数	TLR4(pg/mL)	F 值	P 值
0~14d	岭南湿热外环境模型组	6	4.34±1.18	3.741	0.028
	对照组	6	2.89±0.72		
	湿阻组	6	4.01±0.86		
	高热组	6	3.33±0.62		
14~28d	岭南湿热外环境模型组	6	4.86±1.89	0.830	0.493
	对照组	6	3.70±0.69		
	湿阻组	6	4.05±1.33		
	高热组	6	4.20±0.98		

该3组小鼠在建模14d内均出现与实验一岭南湿热外环境模型组相同的症状和体征。茵陈蒿3组小鼠在灌胃7d后湿热证症状与体征均有好转,如活动度恢复,进食量渐增,大便逐渐成形等。

2.2.2 进食量观察 见表9。对照组小鼠进食量随着时间推移整体呈稳定增长的趋势,建模后14d,岭南湿热外环境模型组与茵陈蒿3组的进食量都有不同程度的下降,且均低于对照组。14d后茵陈蒿3组小鼠开始灌胃,茵陈蒿低、中剂量组小鼠进食量均回升,而高剂量组与岭南湿热外环境模型组小鼠进食量仍在下降,且灌胃结束后模型组与各组相比进食量最低。

表9 实验二不同时间段各组单只小鼠平均进食量比较 g

组 别	鼠数	0 d	7 d	14 d	21 d
岭南湿热外环境模型组	10	3.56	2.93	3.64	3.00
对照组	10	3.15	3.18	3.83	3.50
茵陈低剂量组	10	3.42	3.56	3.27	3.58
茵陈中剂量组	10	3.31	3.59	3.13	3.18
茵陈高剂量组	10	3.62	3.58	3.52	3.20

2.2.3 体质量动态变化 见表10。各组小鼠体质量整体上呈稳定增长趋势。造模14d时,与第0天相

比,对照组小鼠体质量的定基增长速度(增长后体质量/最初体质量×100%-1)大于茵陈蒿3组,与模型组没有明显差异(对照组11.33%,模型组11.50%,茵陈蒿低剂量组10.16%,茵陈蒿中剂量组10.25%,茵陈蒿高剂量组9.34%),造模第21天,与第0天相比,模型组定基增长速度小于对照组(模型组14.33%,对照组15.90%)。14d开始灌胃后,期间茵陈蒿3组小鼠的体质量并没有发生明显改变。

表10 实验二不同时间段各组小鼠体质量动态变化($\bar{x} \pm s$) g

组 别	鼠数	0d	7d	14d	21d
岭南湿热外环境模型组	10	24.69±1.04	26.33±1.35	27.53±1.67	28.23±2.02
对照组	10	22.76±1.39	23.97±1.26	25.34±1.41	26.38±1.61
茵陈低剂量组	10	24.88±1.09	26.45±1.26	27.41±1.46	27.35±1.56
茵陈中剂量组	10	25.83±1.18	27.73±1.39	28.48±1.45	27.99±2.33
茵陈高剂量组	10	25.90±1.20	27.54±1.10	28.32±1.04	28.22±1.39

2.2.4 实验二各组小鼠血清 TNF-α 水平比较 见表11。与岭南湿热外环境模型组比较,茵陈蒿干预后低、中、高剂量组小鼠 TNF-α 含量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中中、高剂量组减少更为明显。

表11 实验二各组小鼠血清 TNF-α 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	TNF-α(pg/mL)
岭南湿热外环境模型组	10	162.42±22.73
茵陈蒿低剂量组	10	133.70±22.26 ^①
茵陈蒿中剂量组	10	125.28±20.17 ^②
茵陈蒿高剂量组	10	126.90±17.43 ^②
F 值		4.847
P 值		0.007

注:①与岭南湿热外环境模型组比较, $P < 0.05$; ②与岭南湿热外环境模型组比较, $P < 0.01$

2.2.5 实验二各组小鼠血清炎症指标水平比较 见表12~16。各组 IL-18、IL-1β、IL-6、NF-κB、TLR4 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表12 实验二各组小鼠血清 IL-18 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	IL-8(pg/mL)
岭南湿热外环境模型组	10	29.71±2.30
茵陈蒿低剂量组	10	29.35±2.39
茵陈蒿中剂量组	10	30.76±3.99
茵陈蒿高剂量组	10	29.25±4.63
F 值		0.367
P 值		0.778

表 13 实验二各组小鼠血清 IL-1 β 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	IL-1 β (pg/mL)
岭南湿热外环境模型组	10	17.57 $\pm$ 1.84
茵陈蒿低剂量组	10	17.54 $\pm$ 1.45
茵陈蒿中剂量组	10	18.60 $\pm$ 2.81
茵陈蒿高剂量组	10	17.08 $\pm$ 2.16
F 值		0.881
P 值		0.461

表 14 实验二各组小鼠血清 IL-6 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	IL-6(pg/mL)
岭南湿热外环境模型组	10	29.52 $\pm$ 3.17
茵陈蒿低剂量组	10	27.62 $\pm$ 3.41
茵陈蒿中剂量组	10	29.71 $\pm$ 4.27
茵陈蒿高剂量组	10	30.36 $\pm$ 3.97
F 值		0.960
P 值		0.423

表 15 实验二各组小鼠血清 NF- κ B 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	NF- κ B(pg/mL)
岭南湿热外环境模型组	10	129.34 $\pm$ 59.68
茵陈蒿低剂量组	10	152.26 $\pm$ 53.44
茵陈蒿中剂量组	10	146.68 $\pm$ 43.32
茵陈蒿高剂量组	10	160.53 $\pm$ 80.62
F 值		0.338
P 值		0.789

表 16 实验二各组小鼠血清 TLR4 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	TLR4(pg/mL)
岭南湿热外环境模型组	10	4.39 $\pm$ 1.18
茵陈蒿低剂量组	10	4.03 $\pm$ 1.11
茵陈蒿中剂量组	10	4.07 $\pm$ 0.85
茵陈蒿高剂量组	10	3.60 $\pm$ 0.82
F 值		0.897
P 值		0.454

3 讨论

岭南地区属亚热带季风气候, 常年潮湿炎热, 降水丰富, 又因其山峦叠嶂, 地形闭塞, 湿热之气郁积不流通, 持续蕴蒸不散, 故该地区居民长此以往暴露于岭南高温高湿的环境中, 极易罹患外感湿热证。正如岭南温病学家陈任枚等编撰的《温病学讲义》中所言: “东南濒海之区, 土地低洼, 雨露时降, 一至春夏二令, 赤帝司权, 热力蒸动水湿, 其潮气上腾, 则空气中常含有多量之水蒸气, 人在其

中, 吸入为病, 即成湿热、湿温。”^[17]由此可见, 不同于常规湿热证“太阴内伤, 湿饮停聚, 客邪再至, 内外相引”的特点, 岭南外感湿热证可由“岭南湿热外环境”这单一因素引发湿热证, 然而, 近年来对于岭南湿热证的研究普遍认为是“内湿”与“外湿”的复合因素为主, 并没有凸显岭南独特的湿热外环境所致外感湿热证此单一病机作用, 而本实验将着重于此进行研究。

外感湿热证在岭南医学体系自有文献记载以来便一直占据着举足轻重的地位。在古代, 因岭南特殊的地理气候因素所蕴积的外感湿热之气侵袭人体所致的疾病被称为“瘴病”, 《中国医学大词典》^[18]言: “山川湿热郁蒸之气, 人中之辄病, 我国南部最盛。”瘴病的病因为“瘴气”, 同“疫疠之气”一般, 瘴气是一种有别于“六淫之邪”且“六气”范畴不足以涵括的病邪, 因此瘴气虽由湿热郁蒸而致, 但却与六淫之邪中的“湿”“热”及其相兼的“湿热”并不尽相同, 这也是为何岭南湿热证与常规湿热证相比有其独特的研究价值。论及瘴气与普通湿热外邪的不同之处, 可聚焦于“郁蒸”二字, 瘴气是具有长期性、持续性的外感病邪, 而岭南之所以高发瘴病, 与其常年高温高湿的气候因素以及湿热之气难以流通外散的地理因素有直接关系。也正因湿热之气不只是直接作用于人体, 而是长期郁蒸以形成了岭南人民的持续性环境因素, 继而导致该地区以“湿热质”为主的人群体质, 因此岭南外感湿热证病情尤为复杂, 病程漫长, 缠绵难愈, 且外感热病多夹湿, 外感湿病亦多夹热。现代医家对岭南温病的系统研究后也表明地区气候与地区温病间存在一定关联^[2], 与同属南方但四季分明的江浙地区不同, 其外湿大部分是由阳化热而传变^[9]。岭南外感湿热证虽与普通湿热证在病因、病机、临床症状等方面有些许重合之处, 但仍然有其独立的特质, 而这也是笔者构建岭南外感湿热证模型的理论基础: 不同于外感湿热证普遍沿用的王新华等^[10]以“肥甘饮食+湿热环境+致病生物因子”的复合因素模型复制方法, 本实验根据岭南湿热外环境的单一因素致病性, 仅保留“湿热环境”这一造模条件。且为了凸显“郁蒸”这一长期性、持续性的环境特点, 本实验不同于李华锋等^[9]“湿热环境 3 h/d, 共 3 d”, 参考荣光莉等^[11]运用人工气候箱和加湿器模拟湿热环境

的造模方法,将环境条件设置为“温度(33 ± 2)℃,相对湿度 85%”。将持续时间改为“12 h/d,持续 28 d”。通过观察小鼠的一般情况及血清 TNF- α 水平变化来对模型进行评价。

湿热外环境可作为单一的物理因素直接对机体产生损伤。吴智宾等^[3]通过比较新西兰白兔在湿热环境处理前后 TNF- α 及其他炎症指标的血清水平后提出湿热外环境可通过增加 TNF- α 等炎症因子的分泌引发湿热证的炎症反应,并认为这是外感湿热的主要致病机理。施京红等^[4]针对这一机理更进一步的研究则证实了湿热外环境是通过上调 TNF- α 的基因表达以产生更多的细胞因子来激发炎症连锁反应。TNF- α 是一种由单核-巨噬细胞分泌的炎症细胞因子,在炎症反应中起着重要作用,有学者指出,中医虽无微炎症状态的病名,但可考虑将炎症因子归属于“湿热”“湿毒”等范畴^[20]。除了常规湿热证以炎症反应作为主要研究机制外,瘴病与炎症反应的关系也颇为密切:外感湿热导致的感冒、发热等在岭南屡见不鲜,而这可归属于“瘴病外感”的范畴,亦被称为“寻常瘴”^[21],危害较轻但频发,同时现代医学认为“发热”是机体对感染(与)炎症的一种保护性反应,因此炎症反应机制的研究对于瘴病外感十分重要;除此之外,瘴病中病气酷烈,病变迅速的急性病、传染病被称为“岭南瘴症”和“岭南瘴疫”^[21],如非典型性肺炎、登革热、流行性出血热等,而这些疾病均可产生以 TNF- α 上调为主要特征的炎症反应^[6-8]。目前,学术界普遍认为湿热证的两种病邪“热”与“湿”的病理机制分别是炎症反应和水液代谢障碍,前者以 LPS 激活 TLR4 及 NF- κ B 信号通路促使 TNF- α 等炎症细胞因子基因的表达为相关性指标^[22],而后者则认为机体水液转运和代谢的一族特异孔道水通道蛋白(AQP)是形成湿病的基础之一^[23]。然而,本实验的实验一通过模拟岭南地区湿热外环境成功构建了岭南湿热外环境小鼠模型,并通过小鼠的一般情况及炎症指标证实了模型的可行性与科学性。由结果可知,岭南湿热外环境模型组的小鼠在建模 14 d 后 TNF- α 血清水平明显高于对照组、高热组与湿阻组($P<0.05$),在建模 28 d 后的差异则更为显著($P<0.01$),由此可知岭南湿热外环境下的岭南湿热证所引发的以 TNF- α 上调为特征的炎症反应是由“外感之热”和“外感之湿”共同作用

所致,尤其是以模型组与高热组、湿阻组分别对比的结果看来,笔者认为炎症反应虽然是“热”的病理机制,但应该存在与“湿”的相互作用,或递进,或叠加,或次第的关系,但具体机制不详,有赖于进一步的研究。

本实验选取茵陈蒿作为干预机制研究对象的原因可从中医和西医两方面来论述。①中医角度:茵陈蒿苦、辛、微寒,归脾、胃、肝胆经,具有清利湿热、利胆退黄等功效^[12],为治疗湿热证的常用中药。其药性平和,在《神农本草经》被列为上品,既可以药食两用,又可以“久服轻身益气耐老”,在岭南地区应用颇为常见。②西医角度:茵陈蒿的药理作用广泛,近年研究表明茵陈蒿有清热利湿的中医功效可能与其所含成分有抗炎、退热等作用密切相关^[24-25]。茵陈蒿等成分可通过降低 TNF- α 的血清水平来发挥抗炎作用^[25],茵陈色原酮可作用于 NF- κ B 通路,减少 TNF- α 的表达^[15-16]。本实验分剂量梯度设立茵陈蒿低、中、高剂量组,由结果可知,与岭南湿热外环境模型组相比,茵陈蒿低剂量组小鼠的 TNF- α 血清水平有所降低($P<0.05$),而茵陈蒿中、高剂量组降低则更为显著($P<0.01$)。此外,以低、中剂量的茵陈蒿灌胃对小鼠进食量的恢复比高剂量组的作用更为明显。

实验一中对照组、岭南湿热外环境模型组、高热组、湿阻组小鼠的 IL-18、IL-6、NF- κ B、TLR4 血清水平差异无统计学意义($P>0.05$),推测与本研究样本量较少且实验重复性低而致结果存在一定的偏倚有关;高热组 IL-1 β 水平显著低于岭南湿热外环境模型组,考虑为实验误差所致,后续应重复实验以进一步验证并阐明该结果;实验二中岭南湿热外环境模型组及茵陈蒿低、中、高剂量组小鼠的 IL-18、IL-1 β 、IL-6、NF- κ B、TLR4 血清水平差异无统计学意义($P>0.05$),可能由于炎症通路比较繁杂,而茵陈蒿具体成分的作用机制各异,故对于茵陈蒿在岭南外感湿热证下的炎症反应中的作用机理是否还有除了下调 TNF- α 血清水平之外的其他通路有待进一步实验研究。

综上,茵陈蒿对于外感湿热病机下岭南湿热证的干预作用可能通过下调 TNF- α 血清水平来减轻炎症反应,且茵陈蒿的作用效果与药物剂量相关,笔者从本实验结果推测中剂量茵陈蒿的干预效果可能

更好,但其具体机制仍有待进一步实验明确。

[参考文献]

- [1] 李威莹,吴威,孟岩,等. 湿热证动物模型造模方法及评价研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(12): 4441-4451.
- [2] 潘素滢,黄婉怡. 岭南流感温病湿热证“湿阻”病机的机制探讨[J]. 中医临床研究, 2020, 12(2): 21-23.
- [3] 吴智兵,彭胜权,舒彤. 湿热环境在湿温发病中的作用机理探讨[J]. 上海中医药杂志, 2003, 37(12): 45-46.
- [4] 施京红,丁辉. 湿热环境对内毒素诱导新西兰兔肝脏、结肠肿瘤坏死因子 mRNA 表达的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2014, 37(5): 62-65.
- [5] 张志明,刘叶,林培政. 甘露消毒丹干预小鼠病毒性肝炎湿热证 Toll 受体通路的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5): 1047-1049.
- [6] 郭广宏,田亚平,毛远丽,等. 传染性非典型肺炎患者血清细胞因子水平动态观察[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(5): 17-20.
- [7] 廖小明,沈菲,谭丽娟,等. 检测登革热患者外周血 T 淋巴细胞亚群、血清 TNF- α 及血小板的意义[J]. 广东医学, 2018, 39(8): 1182-1184.
- [8] 李方春,聂永鹏,吴南珍. 流行性出血热患者血清 IL-12, IL-6, TNF 浓度检测分析及临床意义[J]. 江西医药, 2008, 43(12): 1284-1286.
- [9] 李华锋,林培政. 小鼠肝炎病毒温病湿热证模型的探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(7): 1318-1321.
- [10] 王新华,刘仕昌,彭胜权,等. 温病湿热证病理造型及实验研究[J]. 广州中医学院学报, 1990, 7(3): 182-186.
- [11] 荣光莉,郑裕华,陈颂,等. 岭南湿热证中肠道组织自噬、线粒体 DNA 含量和 MAVS 通路介导炎症的研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(12): 2884-2887, 3092.
- [12] 唐德才,吴庆光. 中药学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2016: 164.
- [13] SALLAM H S, TUMURBAATAR B, ZHANG W R, et al. Peripheral adipose tissue insulin resistance alters lipid composition and function of hippocampal synapses[J]. J Neurochem, 2015, 12(7): 96-98.
- [14] LIN H C, TSAI S H, CHEN C S, et al. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75: 1416-1425.
- [15] KHAN S, SHEHZAD O, CHUN J, et al. Anti-hyperalgesic and anti-allodynic activities of capillarasin via suppression of inflammatory signaling in animal model[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152: 478-486.
- [16] KHAN S, CHOI R J, SHEHZAD O, et al. Molecular mechanism of capillarasin-mediated inhibition of MyD88/TIRAP inflammatory signaling in in vitro and in vivo experimental models[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145: 626-637.
- [17] 张如青,黄瑛. 近代国医名家珍藏传薪讲稿[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1982: 41.
- [18] 谢观. 中国医学大辞典[M]. 天津:天津科学技术出版社, 1998: 1563.
- [19] 胡顺金,王东,张芮,等. 蓉黄颗粒对非透析 CKD-MBD 肾虚湿热证患者血清 FGF23、FGFRs、Klotho 蛋白的影响[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(12): 1427-1432.
- [20] 李瑞,张国胜,段明亮,等. C-反应蛋白与慢性肾脏病患者微炎症状态及中医证候关系的探讨[J]. 中医学报, 2016, 31(10): 1592-1596.
- [21] 唐思诗,周登威,潘毅. 岭南瘴病证治概要[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(12): 1650-1652.
- [22] 程方平,李家庚,周洁,等. 湿热证大鼠模型 TLR4 mRNA、NF- κ B p65 表达的对比研究[J]. 中医药临床杂志, 2007, 19(6): 556-558.
- [23] 李威,孙维峰. 湿邪致痹与水通道蛋白相关性探讨[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(24): 2734-2736.
- [24] 周祎青. 岭南湿热模型小鼠肠道菌群特征分析及中药作用研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2019.
- [25] RYU K J, YOOU M S, SEO Y, et al. Therapeutic effects of Artemisia scoparia Waldst. et Kitaib in a murine model of atopic dermatitis[J]. Clin Exp Dermatol, 2018, 43(7): 798-805.

(责任编辑:吴凌,李海霞)