

朱合心,陈基江,杨桦,等. 基于多组学的压力超负荷心力衰竭湿证小鼠模型的构建与评价[J]. 中国实验动物学报, 2026, 34(3): 326-338.

ZHU H X, CHEN J J, YANG H, et al. Construction and evaluation of mouse model with pressure overload-induced heart failure and dampness syndrome based on multi-omics [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2026, 34(3): 326-338.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2026.03.002

基于多组学的压力超负荷心力衰竭湿证小鼠模型的构建与评价

朱合心^{1,2}, 陈基江^{1,2}, 杨桦³, 江巍^{1,2,3,4}, 吕渭辉^{1,2,3,4}, 蓝涛华^{1,2,3,4*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006; 2. 省部共建中医湿证国家重点实验室, 广州中医药大学第二附属医院, 广州 510020; 3. 广东省中医院, 广州 510020; 4. 广东省中医药防治难治性慢病重点实验室, 广州 510020)

【摘要】 目的 构建压力超负荷心力衰竭湿证小鼠模型及评价体系。**方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组(Sham group)、心衰组(TAC group)和心衰湿证组(TAC-D group), 每组 7 只。假手术组只开胸不缩窄主动脉弓, 心衰组采用主动脉弓缩窄术构建心衰模型, 两组小鼠均饲养于正常环境; 心衰湿证组除缩窄主动脉弓外, 每日放置于人工恒温恒湿箱 8 h 进行湿证造模, 其余时间饲养于正常环境, 持续 8 周。根据《中医湿证动物模型评价量表》评估小鼠宏观表征, 结合现代医学手段检测小鼠心脏功能、心肌组织病理学、免疫稳态、血清 NT-proBNP 及血脂水平, 同时进行粪便 16S rDNA 测序和血清非靶向代谢组学, 构建心衰湿证小鼠模型新型评价指标。**结果** 心衰湿证组出现明显倦怠、乏力、对外界刺激反应降低以及肛周污秽等表征; 心衰组与心衰湿证组均出现明显的心脏功能障碍、心肌损伤、免疫稳态失衡、血清 NT-ProBNP 水平升高和血脂水平降低, 同时上述改变在心衰湿证组更加明显。小鼠粪便 16S rDNA 测序和血清非靶向代谢组学结果显示, 心衰湿证造模后小鼠体内微生物和代谢物出现明显变化, 基于 LEfSe 分析 ($LDA > 2$) 发现, *Enterorhabdus*、*Eubacterium*、*Corynebacterium*、*Christensenellaceae*、*Erysipelatoclostridium* 等 5 个菌属在心衰湿证组显著富集; 代谢组 KEGG 富集分析显示心衰湿证组差异代谢物主要富集在甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、胆汁分泌等代谢通路; 皮尔森相关性分析结果显示, 菌属 *Eubacterium*、*Erysipelatoclostridium* 与主要富集在花生四烯酸代谢上的代谢物 16R-HETE、6-keto PGE1、PE-NMe2 (16:1(9Z)/20:3(8Z, 11Z, 14Z))、Prostaglandin F2a、TXB2、Oxoglutaric acid、12(R)-HETE 存在显著的负相关。**结论** 主动脉弓缩窄术联合高温高湿环境饲养模拟外湿侵袭成功构建压力超负荷心衰湿证小鼠模型。根据《中医湿证动物模型评价量表》评估心脏功能、血清 NT-proBNP、心肌组织病理学、免疫稳态等可作为本模型常规评价指标; 在此基础上, 引入肠道菌属 *Eubacterium*、*Erysipelatoclostridium* 和花生四烯酸代谢紊乱, 构建压力超负荷心衰湿证小鼠模型创新评价体系。

【关键词】 心力衰竭; 中医湿证; 病证结合动物模型; 16S rDNA; 非靶向代谢组学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2026) 03-0326-13

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (82074369), 省部共建中医湿证国家重点实验室专项 (SZ2021ZZ1002, SZ2021ZZ12, SZ2021ZZ26, SZ2021ZZ46), 广州市科技局市校(院)企联合资助基础与应用基础研究项目 (2024A03J0739)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82074369), the Specific Fund of State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine (SZ2021ZZ1002, SZ2021ZZ12, SZ2021ZZ26, SZ2021ZZ46), Basic and Applied Basic Research Projects of Guangzhou Science and Technology Bureau Jointly Funded by Municipal Government, Universities (Institutes) and Enterprises (2024A03J0739).

【作者简介】 朱合心, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。Email: 2984189528@qq.com

【通信作者】 蓝涛华, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。Email: luckyblue1982@126.com

Construction and evaluation of mouse model with pressure overload-induced heart failure and dampness syndrome based on multi-omics

ZHU Hexin^{1,2}, CHEN Jijiang^{1,2}, YANG Hua³, JIANG Wei^{1,2,3,4},
LYU Weihui^{1,2,3,4}, LAN Taohua^{1,2,3,4*}

(1. the Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510020, China; 3. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510020, China; 4. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Refractory Chronic Diseases, Guangzhou 510020, China)

Corresponding author: LAN Taohua. E-mail: luckyblue1982@126.com

[Abstract] Objective To construct and evaluate a mouse model of pressure overload-induced heart failure with dampness syndrome. **Methods** C57BL/6 mice were divided randomly into sham, thoracotomy and aortic restriction (TAC), and TAC-dampness (TAC-D) groups ($n = 7$ mice per group). Mice in the sham group underwent thoracotomy without aortic constriction, while mice in the TAC group underwent aortic arch constriction to induce pressure overload-induced heart failure. All mice were housed in a normal environment. In addition to TAC surgery, TAC-D mice were placed in a controlled temperature and humidity chamber for 8 h/d to induce dampness syndrome, with the remaining time spent in a normal environment. This protocol was maintained for 8 weeks. The macroscopic manifestations were assessed using the “Evaluation Scale for Dampness Syndrome Animal Models in Traditional Chinese Medicine”. Modern medical techniques were employed to measure cardiac function, myocardial histopathology, immune homeostasis, serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), and lipid levels. Fecal 16S rDNA sequencing and serum non-targeted metabolomics were conducted to develop novel evaluation indicators for the heart failure with dampness syndrome mouse model. **Results** Mice in the TAC-D group exhibited fatigue, lethargy, reduced responsiveness to external stimuli, and anal soiling. Mice in both heart failure groups demonstrated marked cardiac dysfunction, myocardial injury, immune homeostasis imbalance, elevated serum NT-proBNP levels, and reduced lipid levels, especially in the TAC-D group. Fecal 16S rDNA sequencing and serum non-targeted metabolomics revealed significant alterations in the gut microbiota and metabolites following dampness syndrome induction. Linear discriminant analysis effect size analysis (> 2) showed that the bacterial genera *Enterorhabdus*, *Eubacterium*, *Corynebacterium*, *Christensenellaceae* and *Erysipelatoclostridium* were significantly enriched in the TAC-D group. Metabolomics kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis indicated that differential metabolites in the TAC-D group were primarily enriched in glycerophospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, and bile secretion pathways. Pearson’s correlation analysis revealed significant negative correlations between the bacterial genera *Eubacterium* and *Erysipelatoclostridium* and metabolites involved in arachidonic acid metabolism, including 16R-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid (HETE), 6-keto PGE1, PE-NMe2(16 : 1 (9Z)/20 : 3 (8Z, 11Z, 14Z)), Prostaglandin F2a, TXB2, Oxoglutaric acid, and 12(R)-HETE. **Conclusions** The combination of aortic arch constriction and a controlled temperature and humidity environment successfully established a mouse model of pressure overload-induced heart failure with dampness syndrome. The “Evaluation Scale for Dampness Syndrome Animal Models in Traditional Chinese Medicine”, cardiac function, serum NT-proBNP, myocardial histopathology, and immune homeostasis can serve as conventional evaluation indicators for this model. Additionally, the incorporation of disturbances in the gut bacterial genera *Eubacterium* and *Erysipelatoclostridium* and arachidonic acid metabolism further develops an innovative evaluation system for the heart failure with dampness syndrome mouse model.

[Keywords] heart failure; dampness syndrome in traditional Chinese medicine; disease-syndrome combined animal model; 16S rDNA; non-targeted metabolomics

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

心力衰竭(心衰)是心脏结构或功能性疾病导致心室充盈或射血能力受损,使得心脏结构、功能、节律或传导异常而引起的一种复杂的综合征^[1]。过去 15 年来,中国心衰患病率增长了 44%,约有 900 多万人被诊断为心衰患者^[2]。由此可见,心衰的防治形势十分严峻,已成为医疗卫生保健系统面临的极大挑战和亟待解决事项。

在 2025 年报道的中医专家共识中,将心衰归为“心水病”和“肺饮病”范畴^[3],属本虚标实之证^[4]。气虚、痰湿、血瘀是心衰常见的证素,其中“湿”贯穿心衰发生发展的全过程,是最关键的证候要素。湿邪粘滞,易于阻碍气血运行,影响阳气布化,亦是心衰迁延不愈之根。中医药已被证实是一种预防、治疗及减少心衰复发的有效手段。耿艳等^[5]用真武汤合葶苈大枣泻肺汤评估对心力衰竭急性失代偿期的临床疗效,结果显示其在改善心脏功能和缓解症状方面具有显著效果,特别适用于湿证患者。巩倩惠等^[6]发现加味苓桂术甘汤通过改善心脏功能和降低炎症因子,显著改善慢性心力衰竭湿证患者的临床症状。总体来看,中医药治疗心衰湿证现阶段多为临床经验用药,其中医药理论科学内涵尚未诠释清晰。因此,从现代生物学角度探索中医湿证在心衰病情发生、发展中的作用及其科学机制尤为重要。

病证结合的生物模型是研究疾病发展、转归及评价药物作用疗效必不可少的工具。然而,目前尚未有公认的心衰湿证动物模型。此外,湿邪致病在心衰中的现代生物学机制也尚未明确。因此,迫切需要构建公认的心衰湿证动物模型及评价体系。本研究采用主动脉弓缩窄术^[7]联合高温高湿环境^[8]饲养模拟外湿侵袭,从而构建压力超负荷心衰湿证动物模型。参照黎创等^[9]制定的《中医湿证动物模型评价量表》对动物的宏观、微观表征进行评估,同时运用现代医学评价手段以及粪便 16S rDNA 测序和血清非靶向代谢组学关联分析,以期于心衰湿证发病机制研究及治疗药物的研发提供可靠的生物学模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,6 ~ 8 周龄,体质

量 18 ~ 20 g,共 21 只,购自广东省斯嘉景达生物科技有限公司【SCXK(粤)2020-0052】。所有动物均饲养于广东省中医院(大学城医院)实验动物中心屏障二区【SYXK(粤)2023-0094】。饲养环境为光照/黑暗循环 12 h,室温(22 ± 2)℃,湿度 $60\% \pm 5\%$ 。本研究已通过广东省中医院实验动物伦理委员会审查批准(2021082)。

1.1.2 主要试剂与仪器

小鼠 N 端脑钠肽前体(N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(美国 Novus 公司,货号:NBP2-76775),总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TG)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C,)测定试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为 A111-1-1、A110-1-1、A112-1-1、A113-1-1);改良马松(Masson)三色染色液、苏木素-伊红(HE)染色液(雷根生物,货号分别为 DH0006、DC0033),流式细胞术 CD4、CD25、Foxp3 抗体(美国 eBioscience 公司,货号分别为 FITC 11-0041-82、PE-Cyanine25-0251-82、APC 17-5773-82),小鼠炎症因子试剂盒(上海优宁维生物科技有限公司,货号:LXLBM10-1)。

高分辨率小动物超声影像系统 Vevo 2100(加拿大 Visualsonics Inc 公司),LRH-600A-HSE 型人工恒温恒湿箱(广东泰宏君科学仪器有限公司),流式细胞分析仪 Novo Quanteon(安捷伦科技有限公司),多功能酶标仪 SYNERGY H1(美国 BioTek 公司),LD5-10B 型台式低速离心机(北京京立离心机有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模

将 21 只 C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后,按随机数字法分为 3 组,分别为假手术组(Sham group)、心衰组(TAC group)和心衰湿证组(TAC-D group),每组 7 只。以小鼠横主动脉弓缩窄构建心衰模型^[10],出现心衰(左室射血分数 $< 45\%$)时,即为模型构建成功。假手术组只开胸不缩窄,心衰组正常行主动脉弓缩窄术,均饲养

于正常环境(室温 22 ± 2) °C,湿度 $60\% \pm 5\%$);心衰湿证组行 TAC 手术后第 2 天开始每日放置于人工恒温恒湿箱 8 h(每日 9:00 ~ 17:00,室温 35 °C,湿度 95%)模拟外湿侵袭进行湿证造模,其余时间饲养于正常环境。所有小鼠均给予普通饲料喂养,自由饮水摄食,实验周期为 8 周。

1.2.2 取材

实验周期结束后,腹腔过量注射 0.5% 戊巴比妥钠(0.3 mL/10 g)处死小鼠。眼眶取血,离心后收集血清,用于后续相关检测;摘取小鼠心脏,乳头肌水平横切面置于 4% 多聚甲醛溶液(24 h)固定,用于后续组织病理学检测,其余心脏组织置于 -80 °C 冰箱冻存;摘取小鼠脾和淋巴用于流式细胞术检测调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg);无菌条件下留取小鼠直肠粪便用于肠道菌群测序。

1.2.3 检测指标

(1)湿证症状评分:使用中医湿证国家重点实验室黎创等^[9]制定的《中医湿证动物模型评价量表》评价小鼠湿证的宏观表征。

(2)超声心动图评估小鼠心脏功能:超声心动图采用 Visualsonics Vevo 2100 系统,于主动脉弓结扎术后 8 周(取材前 1 d)进行超声心动图检查。测量左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic dimension, LVESD)和左室收缩末期容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV),在乳头肌水平胸骨旁短轴视野下,采用 M 型示迹法计算左室射血分数(left ventricular ejection fractions, LVEF)和左室缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS)。

(3)NT-proBNP 含量检测:小鼠眼眶取血后,室温静置 1 h,3500 r/min,4 °C 离心 15 min,收集血清,根据 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 NT-proBNP 含量。

(4)病理染色评估心脏组织形态变化:取 4% 多聚甲醛溶液固定的心脏组织,脱水,包埋,切片后,制成约 4 μ m 厚度的石蜡切片,通过 HE 染色观察小鼠心脏组织结构变化,Masson 染色评估小鼠心脏组织纤维化。

(5)小鼠血清血脂水平测定:血清处理同上,按照制造商提供的说明书,使用相关试剂盒检测血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 的水平。

(6)流式细胞术检测 Treg 表达:研磨小鼠脾、淋巴收集细胞,用 CD4-FITC 和 CD25-PE 抗体避光染色 30 min,随后在室温下用 Foxp3/转录因子固定渗透处理 30 min 后,加入 Foxp3-APC 抗体对细胞进行 30 min 的避光染色,将染色后的细胞清洗,最后用流式细胞仪进行分析。

(7)小鼠血清炎症因子检测:血清处理同上,根据厂家提供的说明书,采用小鼠经典炎症因子组合试剂盒检测小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的表达水平。

(8)小鼠粪便肠道菌群及血清代谢组学测序:血清处理同上,过滤除菌后,将无菌条件下收集的小鼠粪便一同使用干冰转运至上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rDNA 以及非靶向代谢组学测序。

1.3 统计学分析

本研究使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,对于符合正态分布、方差齐的计量数据采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其余数据多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验;若组间方差不齐,则采用 Welch's ANOVA 分析法,进一步两两比较采用 Dunnett's T3 检验。组内差异采用配对 t 检验。以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义,16S rDNA 测序与非靶向代谢组学的数据分析均在美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com>)上进行。

2 结果

2.1 小鼠一般状态评估结果

根据《中医湿证动物模型评价量表》评估小鼠一般状态^[9],假手术组与心衰组小鼠毛发顺滑、洁净、有光泽,未出现明显脱落,大便呈椭圆球状,质硬,肛周清洁度良好。心衰组反应性和活动度稍弱于假手术组。心衰湿证组小鼠出现毛发枯槁、脱落,对外界刺激反应性及整体活动度差,大便稀溏,肛周污秽等表征。与假手术组相比,心衰组与心衰湿证组出现明显的术后进食量下降导致的体质量降低,从第 4 周开始,心衰湿证组小鼠体质量增长出现明显降低(见图 1)。

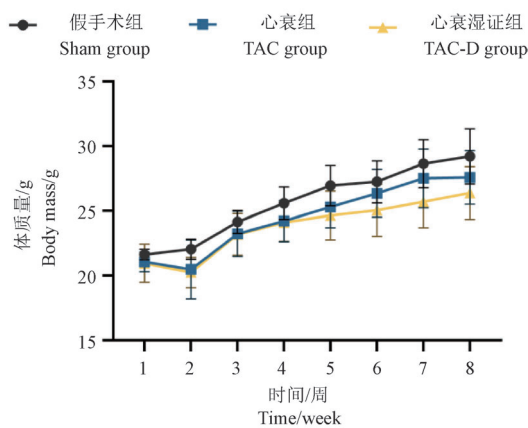
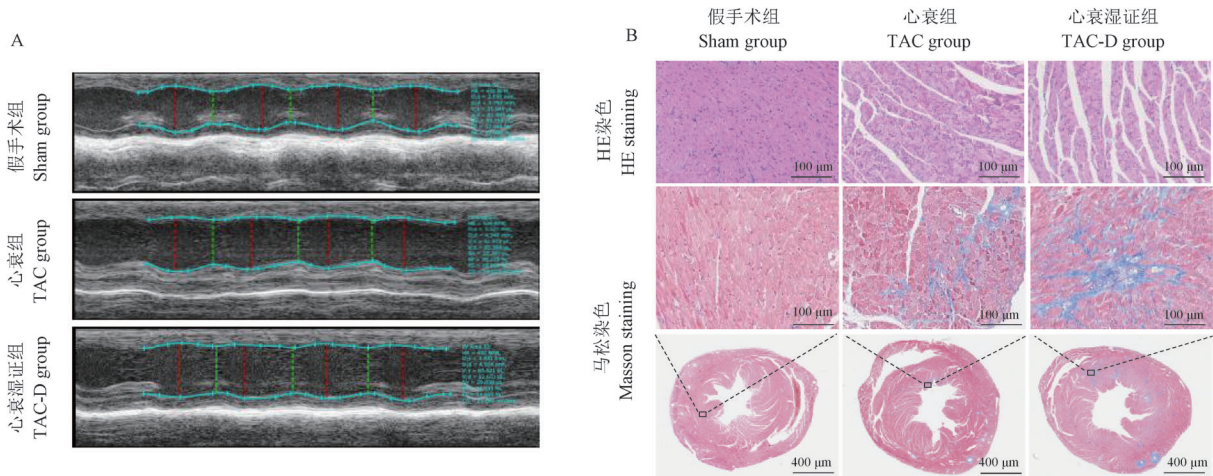


图 1 小鼠 8 周体重变化 ($n = 7$)
Figure 1 Body mass changes in mice over 8 weeks ($n = 7$)

表 1 小鼠心脏功能相关指标检测 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)
Table 1 Cardiac function indices in mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别 Groups	LVEF/%	LVFS/%	LVESD/mm	LVESV/ μ L
假手术组 Sham group	53.63 $\pm$ 5.26	27.18 $\pm$ 3.29	2.68 $\pm$ 0.32	27.15 $\pm$ 7.45
心衰组 TAC group	41.11 $\pm$ 3.73 ***	19.92 $\pm$ 2.16 ***	3.36 $\pm$ 0.19 ***	50.78 $\pm$ 10.59 ***
心衰湿证组 TAC-D group	35.21 $\pm$ 2.40 #	16.75 $\pm$ 1.32 #	3.71 $\pm$ 0.19	58.79 $\pm$ 7.18 #

注:与假手术组相比,*** $P < 0.001$;与心衰组相比,# $P < 0.05$ 。(下图/表同)
Note. Compared with the sham group, *** $P < 0.001$. Compared with TAC group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)



注:A:超声心动图;B:HE 和 Masson 染色。
图 2 小鼠心脏功能与心肌损伤评估结果 ($n = 7$)
Note. A. Echocardiography. B. HE and Masson staining.

Figure 2 Assessment results of cardiac function and myocardial injury in mice ($n = 7$)

2.3 小鼠血清血脂的变化

小鼠血清血脂四项检测结果显示,与假手术

2.2 小鼠心脏功能及心肌损伤评估结果

造模 8 周后,超声心动图结果显示,与假手术组相比,心衰组与心衰湿证组小鼠 LVEF、LVFS 值显著降低 ($P < 0.001$),LVESD、LVESV 值显著升高 ($P < 0.001$);与心衰组相比,心衰湿证组小鼠 LVEF、LVFS 值显著降低 ($P < 0.05$),同时 LVESV 值显著升高 ($P < 0.05$),见表 1。小鼠心脏组织 HE 和 Masson 染色结果提示,相比于假手术组,心衰组和心衰湿证组均出现明显的心肌细胞萎缩、断裂、细胞间隙扩大、空泡化以及心肌细胞纤维化等病理改变(图 2,表 2)。此外,小鼠血清中 NT-proBNP 含量检测显示,与假手术组相比,心衰组显著升高 ($P < 0.05$);与心衰组相比,心衰湿证组同样显著升高 ($P < 0.05$),见表 2。

组相比,心衰组 TC、TG 和 LDL-C 显著降低 ($P < 0.05, P < 0.001, P < 0.001$),HDL-C 显著升高

表 2 小鼠血清 NT-proBNP 水平检测和心肌纤维化统计($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Detection of serum NT-proBNP levels and statistics of myocardial fibrosis in mice($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别 Groups	NT-ProBNP/(mmol/L)	心肌纤维化/% Myocardial fibrosis/%
假手术组 Sham group	23.46 ± 2.56	3.54 ± 0.96
心衰组 TAC group	49.56 ± 12.41 [*]	29.48 ± 4.08 ^{***}
心衰湿证组 TAC-D group	79.45 ± 15.03 [#]	43.57 ± 5.40 ^{##}

注:与假手术组相比,^{*} $P < 0.05$;与心衰组相比,^{##} $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with the sham group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with TAC group, ^{##} $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

($P < 0.01$);与心衰组相比,心衰湿证组的 LDL-C 显著降低($P < 0.01$),TC、TG 呈降低趋势, HDL-C 则呈上升趋势,均不具备统计学意义(见表 3)。

表 3 小鼠血清血脂四项检测($\bar{x} \pm s, n = 7, \text{mmol/L}$)

Table 3 Detection of four items of blood lipid in mice serum($\bar{x} \pm s, n = 7, \text{mmol/L}$)

组别 Groups	TG	TC	HDL-C	LDL-C
假手术组 Sham group	1.10 ± 0.13	6.30 ± 0.29	1.39 ± 0.10	0.85 ± 0.17
心衰组 TAC group	0.83 ± 0.07 ^{***}	5.81 ± 0.26 [*]	1.63 ± 0.07 ^{**}	0.49 ± 0.13 ^{***}
心衰湿证组 TAC-D group	0.71 ± 0.09	5.53 ± 0.41	1.76 ± 0.19	0.28 ± 0.08 ^{##}

注:与假手术组相比,^{**} $P < 0.01$ 。(下图同)
Note. Compared with the sham group, ^{**} $P < 0.01$. (The same in the following figures)

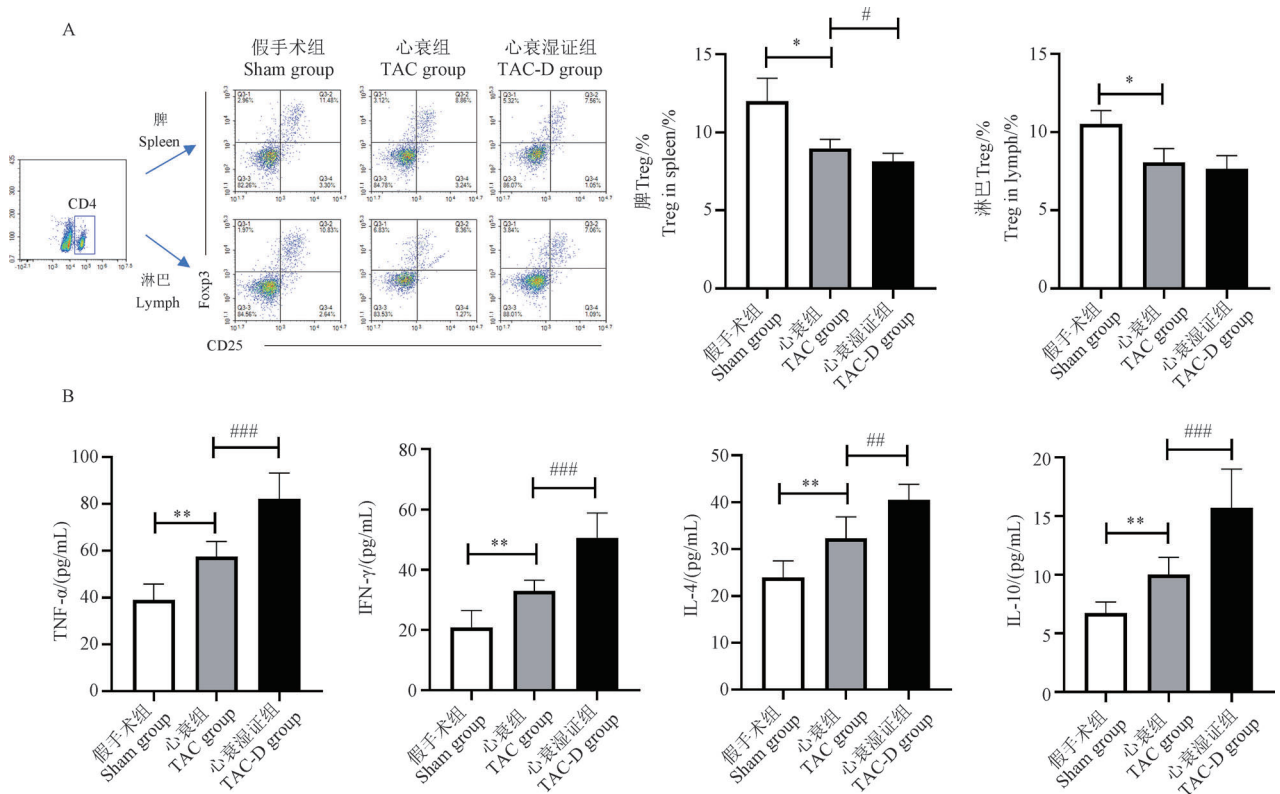
2.4 小鼠脾、淋巴结中 Treg 及血清炎症因子的变化

通过 Treg 细胞的经典标记方式:CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺,采用流式细胞术检测小鼠体内 Treg 的表达情况。与假手术组相比,心衰组小鼠脾、淋巴中 Treg 水平显著降低($P < 0.05$),与心衰组相比,心衰湿证组小鼠脾中 Treg 水平显著降低($P < 0.05$),但在淋巴中呈下降趋势,无统计学意义(见图 3A)。小鼠血清炎症因子检测结果显示,与假手术组相比,心衰组与心衰湿证组中 TNF- α 、IFN- γ 显著升高($P < 0.01$),代偿性的导致 IL-4、IL-10 同样显著升高($P < 0.01$),并且与心衰组相比, TNF- α ($P < 0.001$)、IFN- γ ($P < 0.001$)、IL-4 ($P < 0.01$)、IL-10 ($P < 0.001$)在心衰湿证组中升高得更加明显(见图 3B)。

2.5 小鼠粪便微生物 16S rDNA 测序结果

小鼠肠道微生物 α 多样性分析显示,与假手术组相比,心衰组小鼠的 Simpson 指数升高, Shannon 指数降低;与心衰组相比,心衰湿证组 Simpson 指数降低, Shannon 指数降低,均无统计

学意义(见图 4A)。 β 多样性分析中:主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)显示,假手术组、心衰组与心衰湿证组之间的微生物群落可以被明显区分(见图 4B)。同时,小鼠肠道微生物群落组成分析显示,在门水平上,与假手术组相比,心衰组变形菌门(*Patescibacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度下调、拟杆菌门(*Bacteroidota*)和疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)丰度上调;在属水平上,与假手术组相比,心衰组阿克曼菌(*Akkermansia*)、*Muribaculaceae* 丰度明显增加,杜波氏菌(*Dubosiella*)、*Saccharimonas* 丰度明显下调,心衰湿证组虽然同样出现了一定的逆转,但在 *Enterorhabdus*、*Lactobacillus*、*Ileibacterium*、*Bacillus* 等菌属丰度水平出现了明显增加,在 *Bacteroides*、*Atopobiaceae*、*Parabacteroides* 等菌属丰度水平出现明显降低(见图 4C),这些结果共同表明 3 组小鼠在肠道微生物的组成上存在明显差异。LEfSe 分析筛选心衰湿证组显著富集的标志性物种,结果显示,假手术组、心衰组、心衰湿证组分别有 8、10、5 个属水平微生物的丰度值存在



注:A:流式细胞术展图与统计;B:TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10 检测结果;与心衰组相比,### $P < 0.001$ 。

图3 小鼠脾、淋巴中 Treg 和血清炎症因子表达情况($n = 7$)

Note. A. Flow cytometry plots and statistical graphs. B. Detection results of TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10. Compared with the TAC group, ### $P < 0.001$.

Figure 3 Expression of Treg in the spleen and lymph and serum inflammatory factors in mice($n = 7$)

显著性差异($LDA > 2, P < 0.05$),心衰湿证组显著富集的物种为 *Enterorhabdus*、*Eubacterium*、*Corynebacterium*、*Christensenellaceae*、*Erysipelatoclostridium*(见图 4D)。

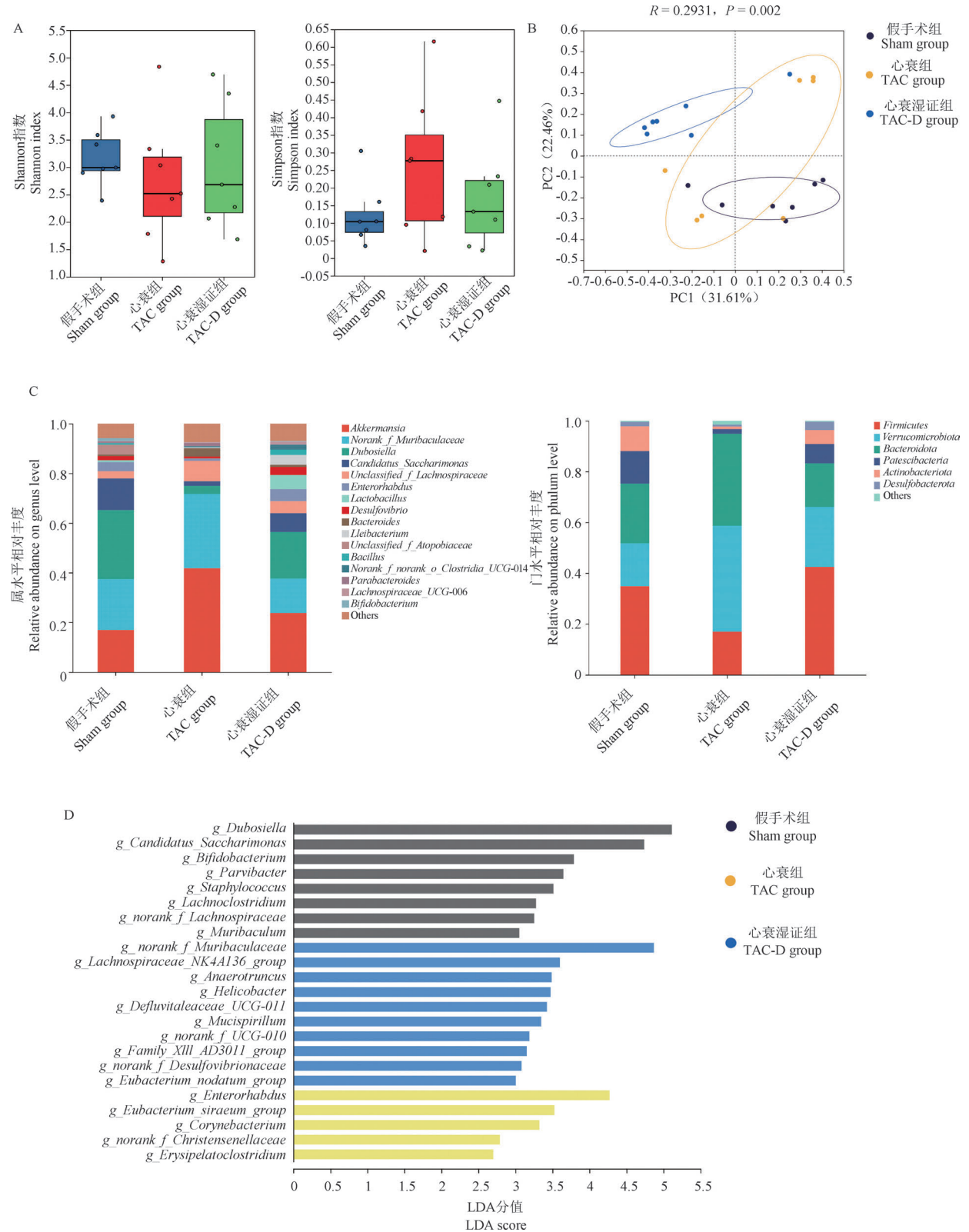
2.6 小鼠血清非靶向代谢组学分析结果

小鼠血清代谢物主成分分析(principal component analysis, PCA)如图 5A 所示,心衰组与心衰湿证组有较为明显的区分且均与假手术组显著分离,偏最小二乘法判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)如图 5B 所示,再次验证了本研究的结果。进一步以 VIP 值 $> 1, P < 0.05, FC > 1.2$ 绘制差异代谢物火山图,与假手术组相比,心衰湿证组存在 193 个显著上调、200 个显著下调的代谢物。与心衰组相比,心衰湿证组存在 110 个显著上调、284 个显著下调的代谢物(图 5C)。基于韦恩图以明确心衰湿证组所特有的差异性改变(见图 5D),共发现 155 个心衰湿证组特征性差异代谢物。KEGG 通路富集

分析显示,差异代谢物主要富集在甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、胆汁分泌等与心衰密切相关的代谢通路(见图 5E),富集的 13 个差异代谢物为 PA(8:0/i-15:0)、CL(i-13:0/i-22:0/-12:0/-15:0)、16R-HETE、Spermine、6-keto PGE1、PS(20:4(8Z, 11Z, 14Z, 17Z)/22:2(13Z, 16Z))、LysoPC(20:4(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)/0:0)、PE-NMe2(16:1(9Z)/20:3(8Z, 11Z, 14Z))、Prostaglandin F2a、TXB2、Oxoglutaric acid、12(R)-HETE、Glycerol 3-Phosphate。

2.7 皮尔森相关性分析结果

基于皮尔森相关性检验,分析关键肠道微生物与差异血清代谢物之间的相关性,菌属 *Eubacterium*、*Erysipelatoclostridium* 与代谢物 16R-HETE、6-keto PGE1、PE-NMe2(16:1(9Z)/20:3(8Z, 11Z, 14Z))、Prostaglandin F2a、TXB2、Oxoglutaric acid、12(R)-HETE 均存在显著负相关,且这些代谢物主要富集在花生四烯酸代谢(图 6)。

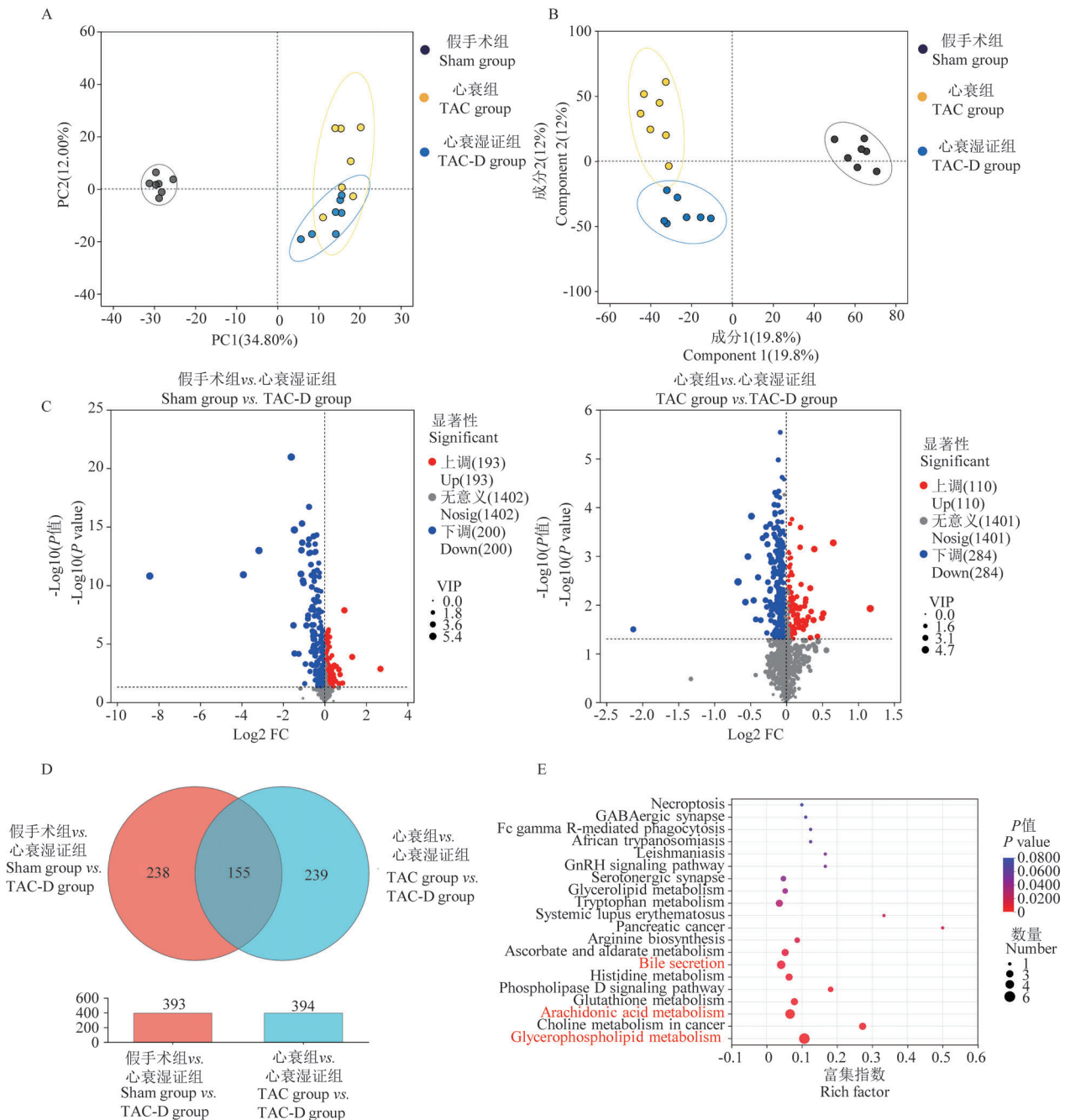


注:A:α-多样性分析;B:β-多样性分析;C:属水平与门水平物种相对丰度分析;D:LEfSe 分析。

图 4 小鼠粪便微生物 16S rDNA 测序结果($n = 7$)

Note. A. α-diversity analysis. B. β-diversity analysis. C. Relative abundance analysis of species at the genus and phylum levels. D. LEfSe analysis.

Figure 4 Results of 16S rDNA sequencing of fecal microbiota in mice($n = 7$)



注: A: PCA 分析; B: PLS-DA 分析; C: 差异代谢物火山图; D: 韦恩分析; E: KEGG 富集分析。

图 5 小鼠血清非靶向代谢组学分析结果($n = 7$)

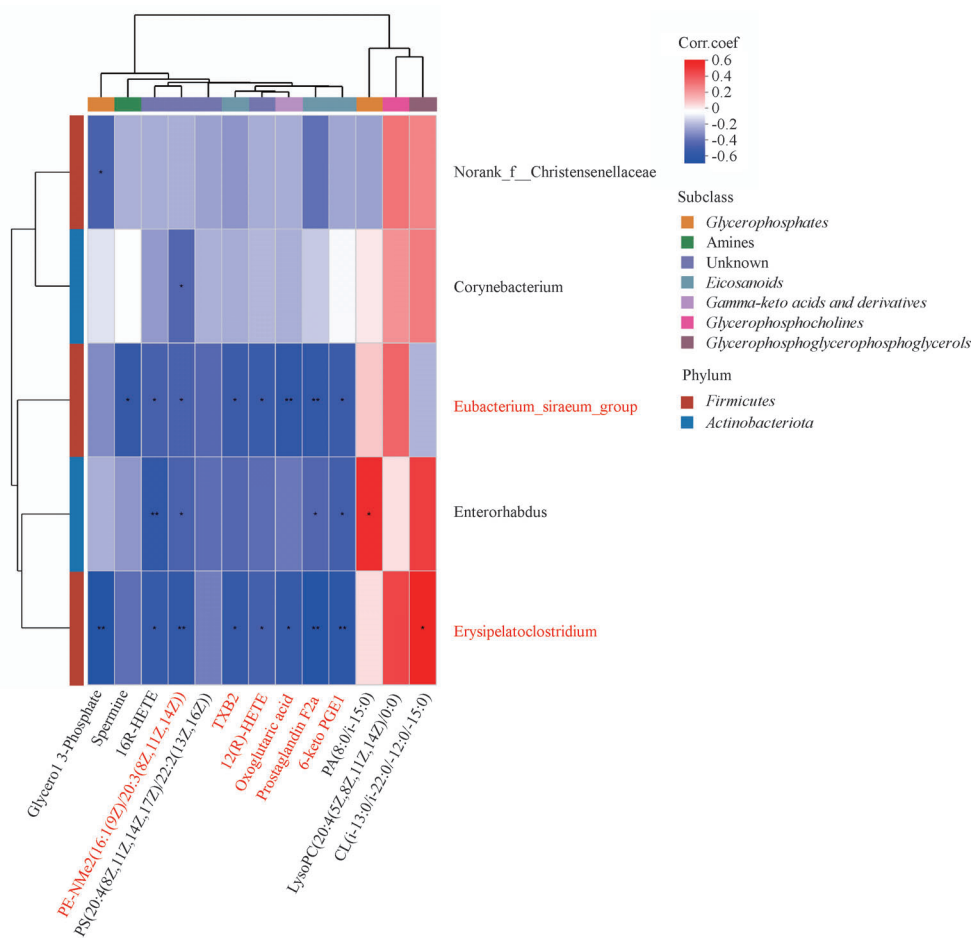
Note. A. PCA analysis. B. PLS-DA analysis. C. Volcano plot of differential metabolites. D. Venn analysis. E. KEGG enrichment analysis.

Figure 5 Analysis results of untargeted metabolomics in mice serum($n = 7$)

3 讨论

心力衰竭是各种心脏疾病的严重和终末阶段,病死率高,是当今最重要的心血管病之一。心衰病情复杂、临床表现不一,辨证则不外乎湿、痰、虚。其中“湿”贯穿于心衰发生、发展的全过

程,是为心衰辨治中的关键证候要素。“湿”“痰”“水”“饮”在心衰中相互并存、相互转化,湿聚为水,水停成饮,饮凝成痰。故有效、及时地清利水湿之邪,减轻心脏负荷,关系到本病的进退及预后。心衰湿证病证结合动物模型的构建不仅可以服务于心衰新药研发,还可以为深入剖析“湿



注:热图右侧:微生物分类;下方:代谢物;红色:正相关;蓝色:负相关;颜色越深表示相关性越强;*:代谢物和微生物之间显著性相关,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图6 皮尔森相关性分析热图

Note. Right side of the heatmap. Microbial taxa. Bottom. Metabolites. Red. Positive correlations. Blue. Negative correlations. Darker colors represent stronger correlations. *. Statistically significant correlations between metabolites and microorganisms, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Pearson correlation heatmap

邪致病”的科学内涵提供生物学模型,但目前尚未有心衰湿证动物模型构建及评价的报道。

本研究采用公认的主动脉弓缩窄术构建压力超负荷心衰小鼠,联合高温高湿环境饲养模拟外湿侵袭构建湿证模型。基于《中医湿证动物模型评价量表》评估^[9],心衰湿证小鼠出现明显倦怠、乏力、对外界刺激反应迟缓以及肛周污秽等宏观表征,符合湿邪的致病特点。病证结合的关键要素是以“病”评“证”,探索证候对疾病表型的影响。蒋峰等^[11]通过构建扩张型心肌病心力衰竭毒证病证结合动物模型中,发现心衰毒证大鼠心脏中免疫细胞浸润更多、纤维化程度更重、心肌细胞更为肥大。在本研究中,通过检测各组小

鼠心脏功能以及心肌损伤相关指标,发现心衰两组相较于假手术组均出现显著心脏功能降低以及明显的心肌损伤,同时心衰湿证组的疾病损伤更加明显。临床研究表明,辨证为湿证的患者多伴有体质量和血脂的异常升高。本研究中检测各组小鼠血清血脂水平,但结果表明心衰叠加湿证使小鼠血脂水平降低,与预期不符合,这是否是在湿证造模过程中小鼠进食量下降所致还需要进一步研究和深入探索。

有学者指出,中医湿证发病特点和临床表现与微炎症状态具有高度相似性^[12],Treg 可以通过多种分子机制抑制过度的免疫反应,防止炎症失控,从而维持免疫系统的稳态^[13]。相关报道表

明,高温高湿环境导致体内炎性细胞因子表达升高,造成 Treg 免疫失衡,抑制了 Treg 的成熟和分化^[14]。本研究中,心衰组和心衰湿证组小鼠在脾和淋巴中均出现 Treg 表达降低、促炎性细胞因子表达增加,心衰湿证组小鼠更甚。IL-4、IL-10 作为抑炎性细胞因子在心衰两组同样是高表达的,分析其可能的原因是作为一种代偿性升高。因此,可以将免疫稳态失衡作为心衰湿证动物模型构建的关键指标之一。

从中医角度来看,外感湿邪侵袭机体会影响体内多个脏腑,损害其正常的生理功能。脾喜燥而恶湿,湿邪侵入机体最易损伤脾,使其无法正常发挥运化水谷精微的生理功能,从而影响机体正常的代谢。从现代医学来看,肠道微生物系统同样与多个组织同样密切相关。肠道菌群参与饮食物的消化,菌群紊乱也会影响机体正常的代谢功能,使得代谢产物发生变化^[15-16]。

本研究中,16S rDNA 测序结果显示,相比于假手术组和心衰组,心衰湿证组出现了明显的肠道菌群紊乱。LEfSE 富集分析筛选出 *Enterorhabdus*、*Eubacterium*、*Corynebacterium*、*Christensenellaceae*、*Erysipelatoclostridium* 5 个菌属的心衰湿证生物标志物。*Enterorhabdus* 隶属于 *Actinobacteri* *Coriobacteria* 与肠道炎症密切相关^[17],同样 *Christensenellaceae* 也在炎症性肠病中被广泛发现,二者在维持肠道内稳态中发挥积极作用;*Eubacterium* 不仅能够将胆固醇转化为粪固醇,有助于降低胆固醇水平,保护心血管健康,还参与胆汁酸和胆固醇的转化,有助于维持其稳态^[18];目前对于 *Corynebacterium* 研究较少,临床研究表明其与呼吸道炎症存在较强的相关性^[19];研究表明,*Erysipelatoclostridium* 能够发酵多种碳水化合物,产生乙酸盐、丁酸盐和其他短链脂肪酸作为最终产品,作为结肠上皮细胞的能量来源并影响肠道上皮屏障的完整性^[20]。此外,在本研究中发现与心衰组相比,*Akkermansia*、*Muribaculaceae*、*Dubosiella* 与 *Saccharimonas* 菌属在心衰湿证组的丰度变化出现了逆转。研究报道在心衰的发展进程中,*Akkermansia*、*Muribaculaceae* 主要通过调节免疫稳态、改善代谢紊乱等发挥保护作用^[21];*Dubosiella* 和 *Saccharimonas* 与炎症反应密切相关^[22]。因此,研

究人员推测上述菌属变化同样是一种代偿与失代偿现象,其可能的机制还需要通过粪菌移植或菌群清除做进一步验证。综上,心衰湿证组显著富集的菌属多在炎症以及肠道功能稳态方面发挥关键作用,可与临床诊断心衰湿证患者肠道菌群测序结果进行比对分析,进一步完善和论证其作为生物标志物的准确性。

非靶向代谢组学分析显示,心衰湿证组的差异代谢物主要富集在甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、胆汁分泌等与心衰密切相关的代谢通路。根据相关报道,一项研究通过非靶向代谢组学检测,发现心力衰竭患者存在明显的甘油磷脂代谢紊乱^[23]。与心血管复合事件(如心源性死亡、急性心肌梗死、脑卒中)相比,心力衰竭患者的代谢模式具有特异性^[24],另有文献报道,心肌梗死后心肌组织中的甘油磷脂代谢显著改变,尤其是磷脂酰丝氨酸水平显著降低,这种变化与心肌损伤后的修复过程密切相关^[25];胆汁酸的异常积累可能导致心肌细胞胆固醇过载,进而触发线粒体损伤和炎症激活,从而促进心力衰竭的进展^[26]。在一项前瞻性研究发现,慢性心力衰竭患者的血浆中初级胆汁酸水平降低,次级胆汁酸水平升高,次级胆汁酸与初级胆汁酸的比值显著增加,这种代谢紊乱可能与心力衰竭的病理生理过程相关^[27];心力衰竭患者常伴有慢性炎症反应,花生四烯酸代谢产物(如 20-羟基-二十碳四烯酸(20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 20-HETE))可以通过激活烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶,增加活性氧生成,促进炎症反应以及增加细胞膜通透性、促进钙离子内流和诱导 DNA 损伤等方式加重心肌细胞损伤^[28]。研究发现,血清中某些花生四烯酸代谢物(如 14, 15-二羟基二十碳三烯酸/14, 15-环氧二十碳三烯酸比值)可作为心力衰竭患者的预后标志物,预测患者的死亡风险^[29]。然而,上述通路在心衰湿证小鼠发病机制中的具体作用仍需进一步明确,菌属变化与代谢物紊乱之间的因果关系尚未阐明,其是否直接与心脏功能损伤相关还是同为表观是本研究的局限性,这些都将作为本研究的下一步研究计划。

更重要的是,16S rDNA 和非靶向代谢组学联合分析发现 *Eubacterium*、*Erysipelatoclostridium* 两

个菌属与多个花生四烯酸代谢通路上的差异代谢物具有显著相关性。在本项目的前期研究发现,临床心衰湿证患者的血清差异代谢物同样显著富集于花生四烯酸代谢^[30],这表明病证结合动物模型可以很好的模拟人体“湿”的疾病状态,进一步论证花生四烯酸代谢作为本模型评价指标的可靠性。

综上所述,本研究采用主动脉缩窄术联合高温高湿环境饲养模拟外湿侵袭,成功构建心衰湿证小鼠模型。通过对小鼠宏观、微观指标检测、16S rDNA 测序与非靶向代谢组学关联分析筛选生物标志物,将《中医湿证动物模型评价量表》评估^[9]、心脏功能、血清 NT-ProBNP、心肌组织病理学、免疫稳态作为本模型构建的常规评价指标,引入 *Eubacterium*、*Erysipelatoclostridium* 两个菌属以及花生四烯酸代谢紊乱,构建压力超负荷心衰湿证小鼠模型创新评价体系。

参 考 文 献 (References)

- [1] BAMAN J R, AHMAD F S. Heart failure [J]. *Jama*, 2020, 324(10): 1015.
- [2] HAO G, WANG X, CHEN Z, et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China: the China hypertension survey, 2012-2015 [J]. *Eur J Heart Fail*, 2019, 21(11): 1329-1337.
- [3] 董国菊,魏玥. 心力衰竭的中医病名专家共识 [J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(7): 253-258.
DONG G J, WEI Y. Expert consensus on traditional Chinese medicine nomenclature of heart failure [J]. *Chin J Tradit Chin Med*, 2025, 43(7): 253-258.
- [4] 钱旻. 慢性心力衰竭临床辨治心得 [J]. *中医临床研究*, 2019, 11(6): 42-44.
QIAN M. Experience of clinical diagnosis and treatment of chronic heart failure [J]. *Clin J Chin Med*, 2019, 11(6): 42-44.
- [5] 耿艳,胡柏生,姜颢. 真武汤合葶苈大枣泻肺汤辅助治疗慢性心力衰竭急性失代偿期疗效观察 [J]. *中国中医急症*, 2022, 31(7): 1228-1231.
GENG Y, HU B S, JIANG H. Clinical observation on Zhenwu decoction combined with Keli Dazao Xiefei decoction in adjuvant treatment of acute decompensation of chronic heart failure [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2022, 31(7): 1228-1231.
- [6] 巩倩惠,都佩瑶,祁鹏,等. 加味苓桂术甘汤治疗慢性心力衰竭阳虚水停证的疗效观察及对炎症因子的影响 [J]. *中医药临床杂志*, 2021, 33(4): 746-750.
GONG Q H, DU P Y, QI P, et al. Observation of curative effect of Jiawei lingguizhugan decoction on chronic heart failure and its influence on inflammatory factors [J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2021, 33(4): 746-750.
- [7] 钟森杰,熊霞军,张倩,等. 主动脉弓缩窄术建立心力衰竭大鼠模型的病理过程观察与非靶向代谢组学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(9): 117-124.
ZHONG S J, XIONG X J, ZHANG Q, et al. Pathological process observation and non-targeted metabolomics analysis of heart failure rat model established by transverse aortic constriction [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(9): 117-124.
- [8] 王婷,郑锋玲,骆欢欢. 岭南温病湿热证小鼠模型的建立及肠道菌群的研究分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(6): 1361-1365.
WANG T, ZHENG F L, LUO H H. Establishment of febrile disease damp-heat syndrome mice models in south of the five ridges and analysis on intestinal flora [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2017, 35(6): 1361-1365.
- [9] 黎创,徐鹏,田瑞敏,等. 中医湿证动物模型宏观评价工具的研制 [J]. *中医杂志*, 2024, 65(14): 1449-1457.
LI C, XU P, TIAN R M, et al. Construction of a macro-evaluation tool for dampness syndrome animal model in traditional Chinese medicine [J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 65(14): 1449-1457.
- [10] MALLAREDY V, ROY R, CHENG Z, et al. Tipifarnib reduces extracellular vesicles and protects from heart failure [J]. *Circ Res*, 2024, 135(2): 280-297.
- [11] 蒋峰,唐家杨,钱向毅,等. 扩张型心肌病心力衰竭毒证病证结合动物模型构建及潜在生物标志物研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2025, 48(5): 613-624.
JIANG F, TANG J Y, QIAN X Y, et al. Construction of a combined disease-syndrome animal model of dilated cardiomyopathy with heart failure toxin syndrome and study on potential biomarkers [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2025, 48(5): 613-624.
- [12] 陈雪吟,康福琴,杨丽虹,等. 中医湿证与微炎症状态的相关性探讨 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(21): 1841-1845, 1854.
CHEN X Y, KANG F Q, YANG L H, et al. Correlation between micro-inflammatory state and dampness syndrome in traditional Chinese medicine [J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 62(21): 1841-1845, 1854.
- [13] ZONG Y, DENG K, CHONG W P. Regulation of Treg cells by cytokine signaling and co-stimulatory molecules [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1387975.
- [14] DENG L, XU H, LIU P, et al. Prolonged exposure to high humidity and high temperature environment can aggravate influenza virus infection through intestinal flora and Nod/RIP2/NF- κ B signaling pathway [J]. *Vet Microbiol*, 2020,

- 251; 108896.
- [15] 夏淑洁, 米丽芬, 沈姍怡, 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.
- XIA S J, MI L F, SHEN S Y, et al. Discussion on the microscopic syndrome differentiation of phlegm syndrome in metabolic syndrome based on gut microbiota associated with lipid metabolism [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2023, 46(11): 1517–1522.
- [16] 吴玉琦, 王琦, 姚海强, 等. 从后生元的角度探讨痰湿体质脾失健运易发代谢紊乱的内在机制 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(12): 7455–7458.
- WU Y Q, WANG Q, YAO H Q, et al. Discussion on the mechanism of spleen dysfunction easily leading to metabolic disorder in phlegm-dampness constitution from postbiotics [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(12): 7455–7458.
- [17] CLAVEL T, DUCK W, CHARRIER C, et al. *Enterorhabdus caecimuris* sp. nov., a member of the family *Coriobacteriaceae* isolated from a mouse model of spontaneous colitis, and emended description of the genus *Enterorhabdus* Clavel et al. 2009 [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(7): 1527–1531.
- [18] MUKHERJEE A, LORDAN C, ROSS R P, et al. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health [J]. Gut Microbes, 2020, 12(1): 1802866.
- [19] MANGUTOV E O, KHARSEEVA G G, ALUTINA E L. *Corynebacterium* spp. -problematic pathogens of the human respiratory tract (review of literature) [J]. Klin Lab Diagn, 2021, 66(8): 502–508.
- [20] RAEBER A J, BRANDNER S, KLEIN M A, et al. Transgenic and knockout mice in research on prion diseases [J]. Brain Pathol, 1998, 8(4): 715–733.
- [21] LIN H, MENG L, SUN Z, et al. Yellow wine polyphenolic compound protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by modulating the composition and metabolic function of the gut microbiota [J]. Circ Heart Fail, 2021, 14(10): e008220.
- [22] GONÇALVES-NOBRE J G, GASPAR I, ALPUIM COSTA D. Anthracyclines and trastuzumab associated cardiotoxicity: is the gut microbiota a friend or foe? [J]. Front Microbiomes, 2023, 2: 1217820.
- [23] JIE B, LI Q, HAN L, et al. Analysis of serum metabolomics in patients with different types of chronic heart failure [J]. Open Med (Wars), 2025, 20(1): 20251210.
- [24] LV J, PAN C, CAI Y, et al. Plasma metabolomics reveals the shared and distinct metabolic disturbances associated with cardiovascular events in coronary artery disease [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 5729.
- [25] WANG J, YU X, WANG T, et al. Metabolic changes of glycerophospholipids during the reparative phase after myocardial infarction injury [J]. Front Cardiovasc Med, 2023, 10: 1122571.
- [26] TONG D, HILL J A. Bile acid binds heart failure and inflammation [J]. Nat Metab, 2023, 5(8): 1260–1261.
- [27] ZHANG S, ZHOU J, WU W, et al. The role of bile acids in cardiovascular diseases: from mechanisms to clinical implications [J]. Aging Dis, 2023, 14(2): 261–282.
- [28] ZHANG Y, LIU Y, SUN J, et al. Arachidonic acid metabolism in health and disease [J]. MedComm, 2023, 4(5): e363.
- [29] LACASSE É, DUBUC I, GUDIMARD L, et al. Delayed viral clearance and altered inflammatory responses affect severity of SARS-CoV-2 infection in aged mice [J]. Immun Ageing, 2025, 22(1): 11.
- [30] 梁兆颖. 基于代谢组学与 16SrDNA 技术探索慢性心力衰竭湿证生物学标志物的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2023.
- LIANG Z Y. Study on biomarkers of chronic heart failure with dampness syndrome based on metabolomics and 16SrDNA techniques [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine; 2023.

[收稿日期] 2025-08-19