

本文引用: 彭果然, 程贝贝, 丁蓉珍, 戴爱国. 哮喘肝郁证病证结合小鼠模型的建立与评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(2): 204–211.

哮喘肝郁证病证结合小鼠模型的建立与评价

彭果然^{1,2}, 程贝贝^{2,3}, 丁蓉珍^{2,3}, 戴爱国^{2,3,4*}

1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208; 2. 血管生物学与转化医学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208;
3. 湖南中医药大学医学院呼吸疾病研究室, 湖南 长沙 410208; 4. 湖南中医药大学第一附属医院呼吸内科, 湖南 长沙 410007

〔摘要〕 目的 建立 C57BL/6 小鼠哮喘肝郁证病证结合模型并进行评价。方法 50 只 C57BL/6 小鼠随机分为空白组、哮喘组、哮喘肝郁组、布地奈德组、柴朴汤组。除空白组外, 其余 4 组小鼠均采用屋尘螨(HDM)25 μg 滴鼻, 1 次/d, 5 d/周, 持续 4 周进行哮喘造模, 其中哮喘肝郁组、布地奈德组和柴朴汤组同期联合予以慢性不可预知性温和刺激(CUMS), 1 次/d, 持续 28 d 制备哮喘肝郁证模型。布地奈德组(吸入用布地奈德混悬液 0.5 g/L 雾化吸入)和柴朴汤组(柴朴汤 12.48 g/kg 灌胃)于造模第 15–28 天接受治疗。观察各组小鼠一般状况、体质量, 并进行糖水偏好实验、强迫游泳实验, 检测肺功能及血清促肾上腺皮质激素(ACTH)、白细胞介素-6(IL-6)水平, HE 染色及 Masson 染色观察肺组织病理情况。结果 第 28 天实验结束后, 与空白组比较, 哮喘组与哮喘肝郁组一般状况评分、肺阻力(RL)、ACTH 及 IL-6 均显著升高($P<0.01$), 用力肺活量(FVC)及呼气峰流量(PEF)均明显减少($P<0.01$), HE 染色及 Masson 染色示气道周围炎症细胞浸润及胶原纤维沉积明显; 哮喘肝郁组体质量、糖水偏好指数明显下降($P<0.01$), 游泳不动时间明显增加($P<0.01$)。与哮喘组比较, 哮喘肝郁组体质量、糖水偏好指数、FVC 及 PEF 均明显下降($P<0.01$), 游泳不动时间、ACTH 及 IL-6 均显著升高($P<0.01$), HE 染色及 Masson 染色示气道周围炎症细胞浸润及胶原纤维沉积更严重。与哮喘肝郁组比较, 布地奈德组及柴朴汤组一般状况评分、游泳不动时间、RL 及 IL-6 均明显下降($P<0.01$), 体质量、FVC 及 PEF 均明显升高($P<0.01$), HE 染色及 Masson 染色示气道周围炎症细胞浸润及胶原纤维沉积减轻; 柴朴汤组糖水偏好指数明显升高($P<0.01$), ACTH 明显下降($P<0.01$)。与布地奈德组比较, 柴朴汤组体质量及糖水偏好指数均升高($P<0.05$), 游泳不动时间减少($P<0.05$), HE 染色及 Masson 染色示气道周围炎症细胞浸润及胶原纤维沉积程度更轻。结论 采用 HDM 25 μg 滴鼻, 1 次/d, 5 d/周, 持续 4 周, 同时联用 28 d CUMS 能够成功构建小鼠哮喘肝郁证病证结合模型。

〔关键词〕 哮喘; 肝郁证; 动物模型; 病证结合; 柴朴汤

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.02.003

Establishment and evaluation of a mouse model combining asthma with liver qi stagnation pattern

PENG Guoran^{1,2}, CHENG Beibei^{2,3}, DING Rongzhen^{2,3}, DAI Aiguo^{2,3,4*}

1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;
2. Key Laboratory of Vascular Biology and Translational Medicine, Education Department of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Research Laboratory of Respiratory Diseases, School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Respiratory Medicine Department, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔收稿日期〕 2024–10–29

〔基金项目〕 湖南省教育厅科学研究项目(22B0383); 湖南省研究生科研创新项目(CX20230819); 湖南中医药大学校级研究生创新课题(2023CX117); 湖南中医药大学–湖南明康中锦医疗科技发展有限公司联合基金项目(2022MKZJ08); 长沙市自然科学基金项目(kq2208184)。

〔通信作者〕 *戴爱国, 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, E-mail: daiaiguo@hnucm.edu.cn。

[Abstract] Objective To establish and evaluate a model combining asthma with liver qi stagnation pattern in C57BL/6 mice. **Methods** Fifty C57BL/6 mice were randomized into blank group, asthma group, asthma with liver qi stagnation group, budesonide group, and Chaipo Decoction (CPD) group. Except for the blank group, the other four groups of mice were intranasally administered with 25 μ g of house dust mite (HDM) once a day, five days a week, for four weeks to induce the asthma model. Among them, the asthma with liver qi stagnation group, budesonide group, and CPD group were simultaneously subjected to chronic unpredictable mild stress (CUMS) once a day for 28 days to establish the asthma with liver qi stagnation pattern model. The budesonide group (receiving nebulized inhalation of budesonide suspension at 0.5 g/L) and the CPD group (receiving gastric gavage of CPD at 12.48 g/kg) were treated from day 15 to day 28 of modeling. The general condition and body weight of mice in each group were observed, sucrose preference test and forced swimming test were conducted, and lung function and serum levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and interleukin-6 (IL-6) were measured. Additionally, pathological conditions of lung tissue were observed via HE staining and Masson staining. **Results** At the end of the 28-day experiment, compared with the blank group, the asthma group and the asthma with liver qi stagnation group showed significant increases in general condition scores, pulmonary resistance (RL), and levels of ACTH and IL-6 ($P<0.01$), as well as significant decreases in forced vital capacity (FVC) and peak expiratory flow (PEF) ($P<0.01$). HE staining and Masson staining revealed marked infiltration of inflammatory cells and deposition of collagen fibers around the airways. Additionally, the asthma with liver qi stagnation group exhibited significant decreases in body weight and sucrose preference index ($P<0.01$), along with a significant increase in immobility time during swimming ($P<0.01$). Compared with the asthma group, the asthma with liver qi stagnation group showed significant decreases in body weight, sucrose preference index, FVC, and PEF ($P<0.01$). Furthermore, there were significant increases in immobility time during swimming, ACTH, and IL-6 levels ($P<0.01$). HE staining and Masson staining revealed more severe inflammatory cell infiltration and collagen fiber deposition around the airways. Compared with the asthma with liver qi stagnation group, the budesonide group and the CPD group showed significant decreases in general condition score, immobility time during swimming, RL, and IL-6 levels ($P<0.01$), and significant increases in body weight, FVC, and PEF ($P<0.01$). HE staining and Masson staining revealed reduced inflammatory cell infiltration and collagen fiber deposition around the airways. Furthermore, the CPD group showed a significant increase in sucrose preference index ($P<0.01$) and a significant decrease in ACTH level ($P<0.01$). Compared with the budesonide group, the CPD group showed significant increases in body weight and sucrose preference index ($P<0.05$), as well as a decrease in immobility time during swimming ($P<0.05$). HE staining and Masson staining revealed milder inflammatory cell infiltration and collagen fiber deposition around the airways. **Conclusion** A mouse model combining asthma with liver qi stagnation pattern can be successfully established by intranasal administration of HDM 25 μ g, once daily, five days a week for four weeks, combined with 28 days of CUMS.

[Keywords] asthma; liver qi stagnation pattern; animal model; combination of disease and pattern; Chaipo Decoction

哮喘是一种由慢性气道炎症引起的影响全球3亿多人的呼吸系统疾病,其临床症状包括喘鸣、气促、胸闷、咳嗽等反复发作,严重影响患者的生活质量^[1]。随着现代社会工作和生活节奏的加快,因压力过大、情志不遂而表现为肝郁证的人日益增多,在哮喘患者群体中经中医辨证为肝郁证者颇为常见。此类患者往往因哮喘难以根治、症状反复发作、需要长期用药治疗而深感困扰,情志不遂日久成肝郁。哮喘肝郁证患者较多,但其发病机制尚不清楚,且哮喘肝郁证的病证结合动物模型的制备尚未形成公认的标准。各课题组根据自身对哮喘肝郁证的理解,选用相应的动物模型制备方法及评价指标,实验结论的可靠性受到质疑,也不利于科研成果的评价。因此,亟须建立规范的哮喘肝郁证病证结合动物模型。

本课题组在前期研究^[2-3]的基础上进行优化,建立哮喘肝郁证病证结合小鼠模型,并对其一般状况、体质量、糖水偏好指数、游泳不动时间、肺功能、肺组织病理学等指标进行综合评价。同时,应用具有疏肝行气解郁、理肺化痰平喘功效的中药复方柴朴汤“以方测证”确认模型构建成功,以期为中医药防治哮喘肝郁证的动物实验提供较为理想的模型,从而推动哮喘肝郁证的发病机制研究及相关药物开发。

1 材料

1.1 动物

50只6周龄SPF级C57BL/6雌性小鼠均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[动物许可证号:SC-XK(湘)2021-0002,合格证号:430727241102164147],

在湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心饲养,实验单位许可证编号为 SYXK(湘)2019-0009,饲养条件包括 12 h 光暗周期(日光灯照射),室温(25 ± 1.5) $^{\circ}\text{C}$,湿度 $45\%\pm 10\%$ 。在无特殊实验要求的情况下,小鼠可以自由饮水和进食。本实验已获得湖南中医药大学动物伦理委员会的批准,批准编号为 HNUCM21-2407-17。

1.2 药物

柴朴汤颗粒由柴胡、法半夏、厚朴、黄芩、人参、茯苓、大枣、紫苏叶、炙甘草、生姜按照配伍比例 7:5:3:3:3:3:3:2:2:1 组成,为全成分中药配方颗粒。中药均购于广东一方制药有限公司,批号分别为:A2070263、A2101473、A2073144、A2033693、A2090353、A208A163、A2081403、A2121543、A2111503、A2121483。吸入用布地奈德混悬液(商品名:天晴速畅;批准文号:国药准字 H20203063;规格:2 mL:1 mg;正大天晴药业集团股份有限公司,批号:240510497)。

1.3 主要试剂

屋尘螨(house dust mite, HDM)提取物(GREER 公司,货号:XPB91D3A25);促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、白细胞介素(interleukin, IL)-6 ELISA 检测试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,批号:2409M12、2409M09);HE 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒(中国碧云天有限公司,批号:C0105S、C0189S)。

1.4 主要仪器

小动物肺功能检测仪(北京普升科技有限公司,型号:DSI Buxco-PFT);压缩式雾化器(北京欧姆龙医疗器械有限公司,型号:NE-C28);透明动物雾化箱(自制);高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1750R);BioTek 吸收光酶标仪(北京质研科技有限公司,型号:800 TS)。

2 方法

2.1 动物模型制备及处理

50 只 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠,按体质量分层随机分为 5 组,即空白组、哮喘组、哮喘肝郁组、布地奈德组、柴朴汤组,每组 10 只。适应性喂养 1 周后开始实验。哮喘组参照文献[4]制备模型,采用 HDM 25 μg (溶于 35 μL 生理盐水中)滴鼻,1 次/d,5 d/周,

持续 4 周。小鼠出现呼吸急促、点头样呼吸、腹肌明显收缩、背部弓起、频繁搔鼻和抓耳等症状,表明哮喘模型构建成功。哮喘肝郁组、布地奈德组、柴朴汤组在此基础上同时予以 28 d 慢性不可预知性温和刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)进行干预。刺激方式参照前期研究^[2-3]及文献报道^[5]并进行优化:4 $^{\circ}\text{C}$ 冷水游泳 5 min;悬尾刺激 5 min;夹尾刺激 5 min;束缚 2 h;去除垫料 6 h;45 $^{\circ}$ 倾斜鼠笼 6 h;潮湿垫料 24 h。上述刺激方式每日 1 种,1 次/d,每种刺激方式均使用 4 次,且每周每种刺激方式只使用 1 次,随机安排,使动物不能预知次日的刺激方式,并且确保连续 2 d 不出现同样的刺激方式。柴朴汤组根据《药理实验方法学》^[6]中人体和动物的药物量效剂量表,以临床等效剂量作为小鼠的给药剂量,从实验第 15 天起给予柴朴汤 0.2 mL(12.48 g/kg)灌胃,1 次/d,连续 14 d。布地奈德组从实验第 15 天起参照文献[7]予吸入用布地奈德混悬液 0.5 g/L 雾化吸入,1 次/d,30 min/次,连续 14 d。

2.2 评价指标与检测方法

2.2.1 小鼠一般状况评估 观察各组小鼠造模前后的精神、皮毛、行为及呼吸等表现。参照文献[8]进行一般状况评分:精神状况(正常为 1 分;稍差为 2 分;较差为 3 分;明显变差为 4 分;精神萎靡为 5 分);皮毛状态(柔顺有光泽为 1 分;稍微杂乱,略微失去光泽为 2 分;杂乱少光泽为 3 分;皮毛干燥明显、较为枯槁,基本无光泽为 4 分;严重枯槁,无光泽为 5 分);活动度(活动灵巧为 1 分;活动略显迟缓为 2 分;反应明显缓慢为 3 分;活动减少,行动迟钝,仅在受到较强刺激时才有轻微移动为 4 分;扎堆不动,几乎无活动,完全缺乏对外界刺激的反应为 5 分);抓取反抗程度(反抗明显为 1 分;反抗一般为 2 分;轻微反抗为 3 分;反抗极少为 4 分;基本无反抗为 5 分);呼吸情况(呼吸平稳为 1 分;呼吸稍急促为 2 分;呼吸较急促为 3 分;呼吸明显急促为 4 分;呼吸极度急促,点头样浅表呼吸为 5 分)。评分越高代表小鼠的一般状况越差。

2.2.2 小鼠体质量监测 于第 1 天造模开始前及第 28 天实验结束后测定各组小鼠当日的体质量。

2.2.3 糖水偏好实验 参照前期研究^[2],各组小鼠在正式实验前禁水 24 h 以提高其对糖水的渴望度。

测试于第 1 天造模开始前和第 28 天实验结束后, 分别在同一时间(12:00)进行。每只小鼠被放入独立笼中, 同时提供 50 mL 纯水和 50 mL 的 1% 蔗糖水, 并记录 2 h 内糖水和纯水消耗量。糖水偏好指数计算公式: 糖水偏好指数=(糖水消耗量/总液体消耗量)×100%, 该指数用于评估小鼠的抑郁状态^[2]。

2.2.4 强迫游泳实验 实验前 24 h 进行 15 min 的游泳训练, 以帮助小鼠适应水环境。在第 1 天造模开始前和第 28 天实验结束后, 同一时间(15:00), 在直径为 18 cm、高度为 20 cm 的透明玻璃杯中加入水, 水深调整为 10 cm(即玻璃杯的半高度), 水温控制在 23~25 ℃。将小鼠放入水中游泳 6 min, 记录最后 4 min 内小鼠的游泳不动时间。游泳不动时间较长为抑郁样行为的标志, 表明动物的“绝望行为”增加^[9]。

2.2.5 肺功能检测 第 28 天实验结束后, 每组随机选取 5 只小鼠, 麻醉后行气管插管, 采用小动物肺功能仪测量各组小鼠用力肺活量(forced vital capacity, FVC)、呼气峰流量(peak expiratory flow, PEF)及肺阻力(lung resistance, RL), 以评估造模和不同处理对小鼠肺功能的影响。

2.2.6 ACTH 及 IL-6 测定 每组剩下的 5 只小鼠麻醉后摘眼球取血, 离心机 4 ℃、3 000 r·min⁻¹, 离心 15 min(离心半径 8 cm)后提取血清, 对血清进行 ELISA 检测。按照试剂盒说明书, 用标准品配制标准曲线, 以便后续定量分析。血清样品平衡至室温后按要求稀释, 分别加入酶标板中, 与标准品一起进行检测。加入特异性抗体后, 样品孵育并洗涤, 去除未结合物。加入酶标二抗和 TMB 显色剂, 通过酶促反应显色后, 用终止液停止反应, 并用酶标仪在 450 nm 波长下读取各孔的吸光度。通过标准曲线计算各组样品中 ACTH 及 IL-6 的浓度, 并进行统计分析。

2.2.7 肺组织病理学观察 在第 28 天实验结束后, 将小鼠肺组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中 24 h, 随后经梯度乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋。将包埋的组织切片(厚度约为 4 μm)进行常规 HE 和 Masson 染色处理。具体步骤为: 脱蜡、苏木素染色、分化、返蓝、伊红染色或磷钨酸-磷钼酸处理和苯胺

蓝染色、脱水、透明和封片。染色后在显微镜下观察各组小鼠肺组织的结构变化, 并拍照记录, 用于评估不同处理对肺组织病理结构的影响。

2.3 统计学分析

数据使用 SPSS 25.0 软件进行分析, 计量数据均符合正态分布用“ $\bar{x} \pm s$ ”描述。各组间的均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 如方差齐则进一步采用 LSD 法或 Dunnett T3 法进行多重比较, 如方差不齐则采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。所有统计检验均为双侧检验。

3 结果

3.1 各组小鼠一般状况评估

第 1 天造模开始前, 各组小鼠的一般状态无差异, 皮毛光亮顺滑, 活动灵巧, 抓取反抗明显, 呼吸平稳, 一般状况评分比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。第 28 天实验结束后, 空白组与第 1 天造模开始前的一般状态无差异。哮喘组小鼠皮毛缺少光泽, 活动反应缓慢, 抓取反抗一般, 呼吸明显急促伴有哮喘音, 与空白组比较一般状况评分显著升高($P < 0.01$)。哮喘肝郁组皮毛枯槁无光泽, 精神萎靡, 喜扎堆不动, 抓取无反抗, 点头样浅表呼吸, 与空白组比较一般状况评分显著升高($P < 0.01$); 与哮喘组比较一般状况评分有所升高, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与哮喘肝郁组比较, 布地奈德组及柴朴汤组小鼠一般状况均显著改善, 一般状况评分均降低($P < 0.01$)。与布地奈德组比较, 柴朴汤组一般状况评分有所下降, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组小鼠一般状况评分比较($\bar{x} \pm s$, 分)

Table 1 Comparison of general condition scores among different groups of mice ($\bar{x} \pm s$, points)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 28 天
空白组	10	5.50±0.71	5.60±0.70
哮喘组	10	5.60±0.84	16.20±1.48**
哮喘肝郁组	10	5.40±0.70	21.90±1.85**
布地奈德组	10	5.70±0.67	10.80±1.75 ^{##}
柴朴汤组	10	5.50±0.97	9.00±1.56 ^{##}

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与哮喘肝郁组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

3.2 各组小鼠体质量比较

第 1 天造模开始前,各组小鼠的体质量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。第 28 天实验结束后,与空白组比较,哮喘组体质量稍有下降,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白组及哮喘组比较,哮喘肝郁组体质量明显下降($P<0.01$)。与哮喘肝郁组比较,布地奈德组、柴朴汤组体质量显著增加($P<0.01$)。与布地奈德组比较,柴朴汤组体质量增加($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 各组小鼠体质量比较($\bar{x}\pm s, g$)

Table 2 Comparison of body weight among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, g$)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 28 天
空白组	10	17.14±0.25	21.53±0.80
哮喘组	10	17.11±0.21	20.91±0.60
哮喘肝郁组	10	17.17±0.25	18.25±0.75** ^{☆☆}
布地奈德组	10	17.23±0.17	19.50±0.54 ^{###}
柴朴汤组	10	17.18±0.23	20.48±0.59 ^{###△}

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与哮喘组比较,** $P<0.01$;与哮喘肝郁组比较,^{###} $P<0.01$;与布地奈德组比较,[△] $P<0.05$ 。

3.3 各组小鼠糖水偏好指数比较

第 1 天造模开始前,各组小鼠的糖水偏好指数比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。第 28 天实验结束后,与空白组比较,哮喘组糖水偏好指数稍下降,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白组及哮喘组比较,哮喘肝郁组糖水偏好指数明显下降($P<0.01$)。与哮喘肝郁组比较,柴朴汤组糖水偏好指数明显增加($P<0.01$)。与布地奈德组比较,柴朴汤组糖水偏好指数增加($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 各组小鼠糖水偏好指数比较($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 3 Comparison of sucrose preference index among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 28 天
空白组	10	64.61±4.65	65.18±4.83
哮喘组	10	65.07±5.01	64.04±4.92
哮喘肝郁组	10	64.12±4.76	39.23±5.13** ^{☆☆}
布地奈德组	10	64.98±4.74	42.10±3.53
柴朴汤组	10	65.28±4.69	62.90±4.32 ^{###△}

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与哮喘组比较,** $P<0.01$;与哮喘肝郁组比较,^{###} $P<0.01$;与布地奈德组比较,[△] $P<0.05$ 。

3.4 各组小鼠游泳不动时间比较

第 1 天造模开始前,各组小鼠的游泳不动时间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。第 28 天实验结束后,与空白组比较,哮喘组游泳不动时间稍增加,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白组及哮喘组比较,哮喘肝郁组游泳不动时间明显增加($P<0.01$)。与哮喘肝郁组比较,布地奈德组及柴朴汤组游泳不动时间均明显降低($P<0.01$)。与布地奈德组比较,柴朴汤组游泳不动时间降低($P<0.05$)。详见表 4。

表 4 各组小鼠游泳不动时间比较($\bar{x}\pm s, s$)

Table 4 Comparison of swimming immobility time among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, s$)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 28 天
空白组	10	58.20±5.47	58.40±4.84
哮喘组	10	59.40±5.02	60.50±5.74
哮喘肝郁组	10	57.80±5.22	83.00±6.15** ^{☆☆}
布地奈德组	10	58.90±6.26	73.60±6.19 ^{###}
柴朴汤组	10	58.50±6.14	65.48±5.41 ^{###△}

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与哮喘组比较,** $P<0.01$;与哮喘肝郁组比较,^{###} $P<0.01$;与布地奈德组比较,[△] $P<0.05$ 。

3.5 各组小鼠肺功能指标比较

与空白组比较,哮喘组与哮喘肝郁组小鼠 FVC 及 PEF 显著下降($P<0.01$),RL 显著升高($P<0.01$);与哮喘组比较,哮喘肝郁组 FVC 及 PEF 显著下降($P<0.01$);与哮喘肝郁组比较,布地奈德组及柴朴汤组 FVC 及 PEF 明显增加($P<0.01$),RL 明显下降($P<0.01$)。详见表 5。

表 5 各组小鼠肺功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of pulmonary function indices among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	FVC/mL	PEF/(mL/s)	RL/(cmH ₂ O·s/mL)
空白组	5	0.75±0.04	14.87±1.74	1.36±0.24
哮喘组	5	0.59±0.06**	11.47±1.08**	2.43±0.31**
哮喘肝郁组	5	0.48±0.06** ^{☆☆}	8.79±0.86** ^{☆☆}	2.79±0.20**
布地奈德组	5	0.66±0.04 ^{###}	12.25±1.29 ^{###}	2.04±0.19 ^{###}
柴朴汤组	5	0.63±0.04 ^{###}	13.18±1.50 ^{###}	2.01±0.22 ^{###}

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与哮喘组比较,** $P<0.01$;与哮喘肝郁组比较,^{###} $P<0.01$ 。

3.6 各组小鼠血清 ACTH、IL-6 比较

与空白组比较,哮喘组和哮喘肝郁组 ACTH 及

IL-6 均显著升高($P<0.01$);与哮喘组比较,哮喘肝郁组 ACTH 及 IL-6 均显著升高($P<0.01$);与哮喘肝郁组比较,布地奈德组 IL-6 明显下降($P<0.01$),柴朴汤组 ACTH 及 IL-6 均明显下降($P<0.01$)。详见表6。

表 6 各组小鼠血清 ACTH、IL-6 比较($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Comparison of serum ACTH and IL-6 levels among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ACTH/(ng/L)	IL-6/(ng/L)
空白组	5	51.73±6.84	70.90±8.29
哮喘组	5	71.14±7.49**	93.17±4.67**
哮喘肝郁组	5	116.40±6.84***	119.06±5.45***
布地奈德组	5	105.43±4.67	87.03±6.99 [#]
柴朴汤组	5	88.84±7.19 [#]	78.56±5.59 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与哮喘组比较,*** $P<0.01$;与哮喘肝郁组比较,[#] $P<0.01$ 。

3.7 各组小鼠病理学观察结果

小鼠 HE 染色结果显示:空白组小鼠肺组织中肺泡结构完整,肺泡间隔较薄,肺组织形态正常,无明显炎症细胞浸润,组织结构清晰,未见明显病理性改变;哮喘组小鼠肺组织可见明显的气道壁增厚、平滑肌层增生,伴随大量炎症细胞浸润,肺泡腔缩小,部分区域出现炎性浸润和黏液堆积;与哮喘组相比,哮喘肝郁组的气道壁增厚更加明显,平滑肌层显著增生,炎症细胞浸润更加严重,伴有明显的黏液堆积,肺组织结构受损,表现出更为严重的病理改变;

布地奈德组小鼠气道壁增厚和平滑肌增生有所减轻,炎症细胞浸润减少,肺泡结构较为完整,病理性损伤较哮喘组和哮喘肝郁组有所改善;与布地奈德组比较,柴朴汤组气道壁和平滑肌层增生明显减轻,炎症细胞浸润减少。详见图 1。

小鼠 Masson 染色结果显示:空白组小鼠肺组织肺泡结构完整,气道壁薄,肺泡间隔无明显胶原纤维沉积,组织结构正常;哮喘组小鼠肺组织中气道壁增厚,周围有较明显的胶原纤维沉积,表现为蓝色染色加深,尤其是在气道周围和平滑肌层,肺组织出现纤维化特征,提示气道重塑和纤维化;与哮喘组相比,哮喘肝郁组的气道壁增厚更显著,平滑肌增生更加严重,气道周围的胶原纤维沉积显著增加,蓝色染色区域扩展,纤维化程度加重,显示出更明显的病理改变;与哮喘肝郁组相比,布地奈德组气道壁厚度有所降低,胶原纤维沉积减少,气道平滑肌增生有所缓解,蓝色染色区域缩小,纤维化程度得到一定改善;与布地奈德组相比,柴朴汤组的肺组织结构进一步改善,气道壁厚度显著降低,胶原纤维沉积显著减少,蓝色染色区域较少。详见图 2。

4 讨论

哮喘是一个全球范围内的公共卫生问题,其患病率逐年上升,严重影响患者的生活质量^[10]。随着现代社会生活节奏的加快和工作压力的增加,情志因

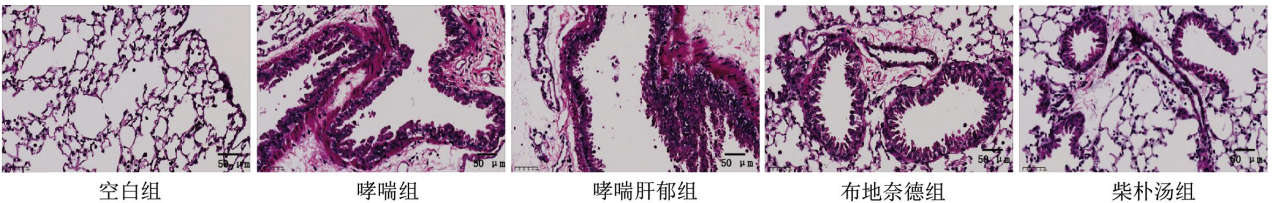


图 1 各组小鼠肺组织 HE 染色结果($\times 200$,标尺:50 μm)

Fig.1 HE staining results of lung tissue among different groups of mice ($\times 200$, scale: 50 μm)

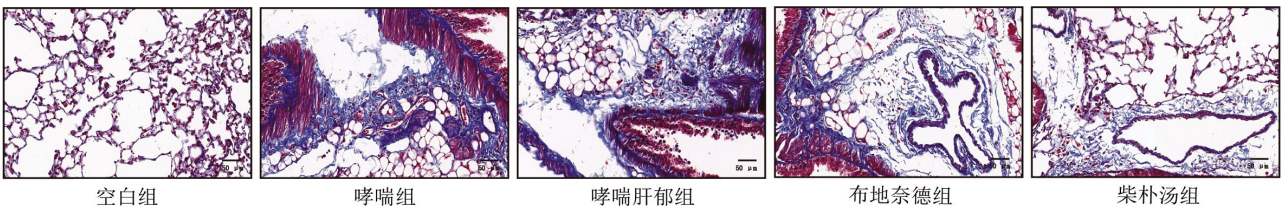


图 2 各组小鼠肺组织 Masson 染色结果($\times 200$,标尺:50 μm)

Fig.2 Masson staining results of lung tissue among different groups of mice ($\times 200$, scale: 50 μm)

素在哮喘发病中的作用逐渐受到关注。研究表明,心理压力可通过神经内分泌和免疫系统的变化,影响哮喘的发展并加重哮喘症状^[11-12]。中医学认为,肝主疏泄,调畅情志,性喜条达而恶抑郁。肝失条达,疏泄失司,则气机郁滞,津液输布不利,凝聚成痰,使肺气宣降失司,肺气上逆,发为哮喘。临床上哮喘患者经中医辨证为肝郁证的比例较高,如一项对 305 例哮喘急性发作患者的研究中,辨证为肝郁证的患者占 68.2%^[13]。在另一项对 110 例哮喘患儿的研究中,肝郁证患儿的比例达 33.64%^[14]。然而,目前尚无公认的哮喘肝郁证动物模型制备方案,且缺乏标准化的造模评价指标,限制了对该病证结合机制的深入研究。

国内外研究中常使用小鼠、大鼠和豚鼠来建立哮喘模型,其中小鼠,尤其是 C57BL/6 小鼠,由于其免疫遗传背景清楚、品系单纯、对致敏因子敏感,被广泛应用于哮喘研究^[15]。此外,C57BL/6 小鼠对 CUMS 反应敏感^[16],是肝郁证模型研究的首选品系。肝郁证以情志抑郁为主要表现,临床上常以女性为主。既往研究显示,雌性小鼠更容易出现抑郁样的负面情绪,对慢性应激比雄性小鼠更敏感^[17]。因此,本实验选择 C57BL/6 雌性小鼠作为研究对象。在既往研究中,哮喘动物模型通常通过卵清蛋白与氢氧化铝联合使用进行致敏,但这种方法与临床哮喘发病的实际情况并不一致。HDM 是哮喘患者中最常见的过敏原之一,约 85% 的患者对其过敏^[18-19]。因此,在哮喘动物造模中使用 HDM 能够更好地模拟临床哮喘的过敏性反应。在哮喘模型基础上,为更好地模拟肝郁证状态,通常采用慢性束缚法^[20]或 CUMS 法^[2-3]进行肝郁证造模。肝郁证多因情志抑郁,所思不遂而引起,在制作肝郁证动物模型时,采用慢性束缚限制动物活动是有效的造模手段^[21]。但是,连续使用单一的慢性束缚方法会导致小鼠产生耐受性^[20]。相比之下,CUMS 方法更为合适,因为其应激因子强度较低,能够长期应用,更加符合肝郁证的发病机制^[22]。本研究通过联合使用 HDM 滴鼻和 CUMS 构建哮喘肝郁证病证结合的小鼠模型,成功模拟了哮喘肝郁证的病理状态。哮喘组表现出皮毛无光泽、活动减弱和呼吸急促等典型哮喘症状,而哮喘肝郁组小鼠表现出更为明显的情绪抑郁、活动减少等肝郁症状。

与空白组和哮喘组相比,哮喘肝郁组小鼠一般状况评分显著增加,说明本研究所采用的造模方法可以有效模拟哮喘肝郁证的病理特征,为后续干预措施的效果评价提供了可靠的动物模型。

柴朴汤是本课题组长期研究用于治疗哮喘的中药复方,由小柴胡汤(出自《伤寒论·辨太阳病脉证并治》)和半夏厚朴汤(出自《金匱要略·妇人杂病脉证并治第二十二》)组成,其功效为疏肝行气解郁、理肺化痰平喘,从中医“以方测证”的角度分析,柴朴汤适用于哮喘肝郁证。本研究结果表明,与哮喘组比较,哮喘肝郁组一般状态、肺功能及肺组织病理形态更差,体质量及糖水偏好指数均减少,游泳不动时间延长,血清 ACTH 及 IL-6 均增加。柴朴汤干预可有效改善构建的哮喘肝郁证模型小鼠的一般状况、体质量、糖水偏好指数、游泳不动时间、肺功能及肺组织病理损伤,血清 ACTH 及 IL-6 明显下降。且柴朴汤组在改善小鼠体质量、糖水偏好指数及游泳不动时间方面均优于布地奈德组。从中医证候治疗方面反证小鼠哮喘肝郁证动物模型构建成功。本研究采用 HE 和 Masson 染色对小鼠肺组织进行病理学观察,结果显示,哮喘和哮喘肝郁小鼠的气道壁增厚、平滑肌层增生,并伴随大量炎症细胞浸润及胶原纤维沉积,提示存在显著的哮喘样病变。而柴朴汤组小鼠的肺组织结构接近正常,气道壁和平滑肌层增生显著减轻,炎症细胞浸润及胶原纤维沉积减少,提示柴朴汤对哮喘肝郁证小鼠的气道炎症及气道重塑具有显著的改善作用。

综上所述,本研究构建的哮喘肝郁证模型具备“病”“证”特点,通过对小鼠一般状况的观察,同时结合体质量、糖水偏好指数、游泳不动时间、肺功能指标、血清 ACTH 及 IL-6、小鼠肺组织病理形态,以及以方测证多方面评价哮喘肝郁证模型构建成功。但是本研究也存在不足,对于哮喘肝郁证有代表性的检测指标仅考虑了文献报道相关的 ACTH^[23]与 IL-6^[24],这两个指标是否是哮喘肝郁证有别于哮喘其他证型的典型指标尚不清楚,仍需要进一步研究。基因组学、转录组学、蛋白质组学及代谢组学等技术,为研究哮喘肝郁证有别于其他证型的典型指标提供了更多手段和方法,希冀通过继续研究不断优化造模方案及评价指标,构建更加符合中西医临床病证特点的哮喘肝郁证动物模型。

参考文献

- [1] LIU T, WOODRUFF P G, ZHOU X B. Advances in non-type 2 severe asthma: From molecular insights to novel treatment strategies[J]. *European Respiratory Journal*, 2024, 64(2): 2300826.
- [2] 郑鑫莹, 刘巍, 吴晓玲, 等. 肝郁型哮喘小鼠模型 MAL、CADM1、IL-6、IL-8、IL-33、TSLP、STAT3 表达的实验研究[J]. *湖南中医杂志*, 2022, 38(2): 169-173.
- [3] 刘鑫, 刘姿琴, 杨苏琴, 等. 柴朴汤对肝郁型哮喘小鼠 CADM1、MAL、IL-33、TSLP 表达的影响[J]. *中南医学科学杂志*, 2021, 49(5): 502-505.
- [4] WOO L N, GUO W Y, WANG X, et al. A 4-week model of house dust mite (HDM) induced allergic airways inflammation with airway remodeling[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 6925.
- [5] LI H N, XIANG Y J, ZHU Z M, et al. Rifaximin-mediated gut microbiota regulation modulates the function of microglia and protects against CUMS-induced depression-like behaviors in adolescent rat[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 254.
- [6] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 70-71.
- [7] 武国宇. 布地奈德吸入给药对慢性支气管哮喘小鼠 HpAR1h/STAT 信号通路的影响[J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(12): 2307-2311.
- [8] 刘萌萌, 路静, 李唯嘉, 等. 3种抑郁症大鼠模型代谢组学的比较[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(16): 149-159.
- [9] 王孟迪, 姚勤伟, 薛涛, 等. 3种抗抑郁中药方作用比较研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(9): 1327-1333.
- [10] CLOUTIER M M, DIXON A E, KRISHNAN J A, et al. Managing asthma in adolescents and adults: 2020 asthma guideline update from the national asthma education and prevention program[J]. *JAMA*, 2020, 324(22): 2301-2317.
- [11] MIYASAKA T, DOBASHI-OKUYAMA K, TAKAHASHI T, et al. The interplay between neuroendocrine activity and psychological stress-induced exacerbation of allergic asthma[J]. *Allergology International*, 2018, 67(1): 32-42.
- [12] OHNO I. Neuropsychiatry phenotype in asthma: Psychological stress-induced alterations of the neuroendocrine-immune system in allergic airway inflammation[J]. *Allergology International*, 2017, 66: S2-S8.
- [13] 杨惠琴, 吕全胜, 王玲, 等. 新疆乌鲁木齐地区 305 例支气管哮喘患者的中医证型分布规律[J]. *新疆中医药*, 2013, 31(6): 111-112.
- [14] 叶进, 王忆勤, 李福凤, 等. 肝郁型哮喘儿童心理行为问题调查[J]. *上海中医药杂志*, 2002, 36(6): 22-24.
- [15] 吴瑞, 李秀敏, 苗明三. 基于中西医临床病证特点的哮喘动物模型分析[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(2): 253-257.
- [16] 杨一帆, 王豆, 李涛, 等. 慢性不可预知温和刺激抑郁模型及其评价指标的研究进展[J]. *山东医药*, 2021, 61(25): 96-99.
- [17] 张婷. 小胶质细胞在慢性应激诱发小鼠抑郁样行为性别差异中的作用及机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2023.
- [18] ALVAREZ-SIMON D, AIT YAHIA S, AUDOUSSET C, et al. Local receptor-interacting protein kinase 2 inhibition mitigates house dust mite-induced asthma[J]. *European Respiratory Journal*, 2024, 64(4): 2302288.
- [19] 解立旭, 冯肝珠. 重度哮喘小鼠模型的建立方法及实验应用[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2022, 45(5): 514-518.
- [20] 胡骏, 郑红, 沈慧, 等. 基于病证结合方证对应理论研究肝郁证哮喘模型的尿液代谢组学表征[J]. *华夏医学*, 2017, 30(6): 7-12.
- [21] 张晓龙. 肝郁证动物模型实验研究评述[J]. *中医学报*, 2016, 31(3): 398-401.
- [22] LI X J, QIU W Q, DA X L, et al. A combination of depression and liver Qi stagnation and spleen deficiency syndrome using a rat model[J]. *Anatomical Record*, 2020, 303(8): 2154-2167.
- [23] 金光亮, 南睿, 郭霞珍. 慢性应激肝郁证大鼠模型的建立[J]. *北京中医药大学学报*, 2003, 26(2): 18-21.
- [24] 钱梦, 谢鸣, 张媛凤, 等. 肝郁证雌雄大鼠神经-内分泌变化的比较[J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(7): 549-554.

(本文编辑 周旦)