

肾气虚型哮喘大鼠气道炎症指标的研究

张 晶*, 吴晓晨, 张家旺, 谢雨捷

福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州

收稿日期: 2023年8月24日; 录用日期: 2023年9月17日; 发布日期: 2023年9月26日

摘 要

目的: 观察肾气虚型哮喘大鼠的一般状态情况、哮喘症状评分与炎症因子IL-6、IL-17、IL-10、IL-35之间的关系, 并予全真一气汤干预, 探讨评估肾气虚型哮喘大鼠气道炎症的指标。方法: 将24只SD雄性大鼠随机分为空白组、模型组、低剂量治疗组(8.33 g/kg)和高剂量治疗组(33.32 g/kg), 每组6只。模型组与低、高剂量治疗组予卵蛋白1 mg、氢氧化铝凝胶10 mg的混悬液1 mL致敏, 1%的卵清蛋白超声雾化吸入以激发哮喘, 进行惊恐刺激, 负重游泳直至力竭等进行肾气虚型哮喘大鼠造模, 造模成功后开始药物干预。空白组和模型组予生理盐水3 mL灌服, 治疗组按低、高剂量予全真一气汤3 mL灌服, 每日1次, 连服30天。观察并记录大鼠雾化刺激时的一般状态及行为表现, 酶联免疫吸附实验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测血清IL-6、IL-17、IL-10、IL-35细胞因子含量。结果: 与空白组相比, 模型组 and 全真一气汤低、高剂量组大鼠均出现腹式呼吸、呼吸急促、搔鼻、口唇发绀等症状, 并伴有毛色暗沉无光泽, 蜷缩嗜卧, 腹肌痉挛, 饮食减少, 排便增多等行为状态改变, 哮喘症状评分显著升高($P < 0.05$); 模型组血清IL-6、IL-17含量明显增加($P < 0.05$), 血清IL-10、IL-35的含量明显减少($P < 0.05$); 与模型组相比, 全真一气汤低、高剂量组的哮喘症状评分显著降低($P < 0.05$), 全真一气汤低剂量组、高剂量组血清IL-6、IL-17的含量明显减少($P < 0.05$), IL-35的含量明显增加($P < 0.05$); 与全真一气汤低剂量组相比, 血清IL-6的含量减少($P < 0.05$), IL-35的含量明显增加($P < 0.05$)。结论: 肾气虚型哮喘大鼠一般状态情况越差, 哮喘症状评分越高, 促炎因子IL-6、IL-17的含量越高, 抗炎因子IL-35、IL-10的含量越低。

关键词

肾气虚型, 支气管哮喘, 气道炎症, 炎症因子

Study on Airway Inflammation Index in Asthmatic Rats with Kidney-Qi Deficiency

Jing Zhang*, Xiaochen Wu, Jiawang Zhang, Yujie Xie

Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

Received: Aug. 24th, 2023; accepted: Sep. 17th, 2023; published: Sep. 26th, 2023

*通讯作者。

文章引用: 张晶, 吴晓晨, 张家旺, 谢雨捷. 肾气虚型哮喘大鼠气道炎症指标的研究[J]. 临床医学进展, 2023, 13(10): 15215-15220. DOI: 10.12677/acm.2023.13102128

Abstract

Objective: To observe the general state of asthma rats with kidney-qi deficiency, the relationship between asthma symptom score and inflammatory factors IL-6, IL-17, IL-10 and IL-35, and to intervene with Quanzhen Yiqi Decoction to explore the indexes for evaluating airway inflammation in asthma rats with kidney-qi deficiency. **Methods:** Twenty-four SD male rats were randomly divided into blank group, model group, low-dose treatment group (8.33 g/kg) and high-dose treatment group (33.32 g/kg), with 6 rats in each group. The model group and the low-dose and high-dose treatment groups were sensitized with 1 mL of suspension of ovalbumin 1 mg and aluminum hydroxide gel 10 mg, and 1% ovalbumin was inhaled by ultrasonic atomization to stimulate asthma, and the rats were stimulated by panic, swimming with load until exhaustion, etc., and drug intervention was started after the model was successfully established. The blank group and model group were given 3 mL of normal saline, while the treatment group was given 3 mL of Quanzhen Yiqi Decoction at low and high doses, once a day for 30 days. Observe and record the general state and behavior of rats when they are stimulated by atomization, and detect the contents of IL-6, IL-17, IL-10 and IL-35 cytokines in serum by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with the blank group, the rats in the model group and the low and high dose groups of Quanzhen Yiqi Decoction all showed symptoms such as abdominal breathing, shortness of breath, scratching nose, cyanosis of mouth and lips, accompanied by behavioral changes such as dull fur, crouching, abdominal muscle spasm, decreased diet and increased defecation, and the asthma symptom score increased significantly ($P < 0.05$). The contents of serum IL-6 and IL-17 in model group increased significantly ($P < 0.05$), while the contents of serum IL-10 and IL-35 decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the scores of asthma symptoms in low and high doses of Quanzhen Yiqi Decoction were significantly decreased ($P < 0.05$), and the contents of serum IL-6 and IL-17 in low and high doses of Quanzhen Yiqi Decoction were significantly decreased ($P < 0.05$), while the content of IL-35 was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the low-dose group of Quanzhen Yiqi Decoction, the content of serum IL-6 decreased ($P < 0.05$) and the content of IL-35 increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** The worse the general state of asthma rats with kidney-qi deficiency, the higher the asthma symptom score, the higher the contents of pro-inflammatory factors IL-6 and IL-17, and the lower the contents of anti-inflammatory factors IL-35 and IL-10.

Keywords

Kidney-Qi Deficiency, Bronchial Asthma, Airway Inflammation, Inflammatory Factor

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

支气管哮喘是一种嗜酸性粒细胞、肥大细胞、中性粒细胞及 T 淋巴细胞等炎性细胞活化过度介导的慢性气道炎症性疾病。最新研究表明 Th17 细胞及其表达的相关炎性细胞因子如 IL-6、IL-17 在哮喘患者的外周血及痰培养中较健康对照组均有所增加,且随着气道阻力升高而上调[1] [2] [3]。而 IL-10、IL-35 等由 Treg 细胞表达相关细胞因子与哮喘严重程度呈负相关性[4]。本实验通过观察肾气虚型哮喘大鼠的一般状态情况、哮喘症状评分与炎症因子 IL-6、IL-17、IL-10、IL-35 之间的关系,探讨评估肾气虚型哮喘大鼠气道炎症的指标。

2. 材料

2.1. 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量为 (200 ± 5) g, 购自杭州医学院动物实验中心, 许可证号码: SCXK(浙)2019-0002。

2.2. 干预药物

全真一气汤(熟地黄 15 g, 麦冬 15 g, 淡附子 6 g, 生晒参 15 g, 白术 6 g, 牛膝 15 g, 五味子 6 g)按体重换算为大鼠剂量, 于福建中医药大学附属第二人民医院中药房加工成生药含量 0.5 g/mL 的溶液, 封储备用。

2.3. 主要试剂

卵清蛋白(美仑生物技术有限公司, 批号: M0228A)、氢氧化铝凝胶(美仑生物技术有限公司, 批号: O1004A)、大鼠 IL-6、IL-17、IL-35、IL-10 ELISA 试剂盒(酶免生物, 批号: MM0190R2、MM-0088R2、MM-0856R2、MM-0195R2)。

2.4. 实验仪器

医用压缩空气式雾化器(上海海尔医疗科技有限公司, 型号: YS-06), 微量冷冻离心机(贝克曼, 型号: Microfuge-22R), 移液器(德国 eppendorf 公司), 酶标仪(美国伯乐公司)。

2.5. 伦理审查

实验中对实验大鼠的处理通过福建中医药大学附属第二人民医院动物伦理委员会批准, 批件编号: FJPSPH-IAEC2020111。

3. 方法

3.1. 动物模型制备与分组

将大鼠安置于福州市仓山区瑞科医药健康产业园 2 座动物实验中心, 随机分为空白组、肾气虚型哮喘模型组和全真一气汤低剂量治疗组、高剂量治疗组, 每组 6 只大鼠, 以专用饲料和饮用水喂养 7 天。依据孟鹏飞等[5] [6] [7]的报道进行哮喘模型的制备: 除空白组外, 各组大鼠实验第一天腹腔注射含有卵蛋白 1 mg、氢氧化铝凝胶 10 mg 的混悬液 1 mL 致敏, 第 8 天同法再次致敏。第 15 日起将致敏后大鼠安置于适宜大小的玻璃罩中, 每日给予 1%的卵清蛋白超声雾化吸入 1 次以激发哮喘, 连续激发直至处死。同时参照郑小伟等[8]的方法进行肾气虚型模型的制备: 实验第一天开始, 在安静环境中对模型组及高低剂量组大鼠进行惊恐刺激, 即播放猫叫声磁带(10 min/次)、梅花针叩刺模拟猫抓鼠情景(20 次/min), 再将其置于水槽中(水深 50 cm、水温 20℃)负重游泳直至力竭, 以大鼠鼻尖没入水面 10 s 为度, 日 1 次, 共 14 天。大鼠呼吸急促, 口唇发绀, 纳食减少, 体重增幅不显或反降, 毛枯色黯, 或伴烦躁不安, 搔抓耳鼻, 嗜睡蜷卧, 活动迟缓等, 听诊肺部可闻及哮鸣音, 提示造模成功, 可纳入研究。

3.2. 药物干预

取出生药含量 0.5 g/mL 的全真一气汤(生晒参 15 g, 麦冬 15 g, 熟地黄 15 g, 淡附子 6 g, 白术 6 g, 牛膝 15 g, 五味子 6 g)备用。中药组每次给药前用电子秤称重, 记录每只大鼠体重, 并按体重和剂量标准(低剂量治疗组: 8.33 g/kg、高剂量治疗组: 33.32 g/kg, 相当于临床剂量的 0.5 倍、2 倍)换算成相应服

药浓度，然后进行生理盐水稀释。高低剂量组每日予全真一气汤 3 mL 灌胃，正常组与模型组每日予生理盐水 3 mL 灌服，共 30 天。

3.3. 血标本采集

第 34 天开始取材，用乌拉坦腹腔注射麻醉，将大鼠仰卧置于托盘中进行解剖，暴露胸腹，找到腹主动脉采血 10 mL。

3.4. 一般状态情况观察及症状评分

雾化过程中观察大鼠的呼吸、毛发、体位、饮食、排泄等一般情况，并根据大鼠的症状进行评分：活动自如，呼吸平稳为 0 分；呼吸急促，未出现鼻翼煽动、腹肌紧张抽搐为 0.5 分；呼吸困难为 1 分；呼吸困难伴喷嚏、咳嗽为 2 分；张口呼吸，呼吸深长，口鼻尾紫绀为 3 分；休克、死亡为 4 分[9]。

3.5. ELISA 法检测 IL-6、IL-17、IL-10、IL-35 细胞因子含量

血标本室温下静置 30 min，设置 3000 r/min 离心 20 min，取上清液，严格参照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、IL-17、IL-10、IL-35 细胞因子含量。

3.6. 统计学方法

应用 SPSS26.0 统计软件进行分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示，满足正态分布的多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较若方差齐采用 LSD 法，方差不齐则采用 Dunnett's t3 法；偏态分布则用多样本秩和检验；相关性分析采用 Pearson 检验； $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

4. 结果

4.1. 一般状态观察及哮喘症状评分

空白组大鼠呼吸平稳，皮毛光滑有色泽，进食排便正常；与空白组相比，模型组和高剂量组大鼠均出现腹式呼吸、呼吸急促、搔鼻、口唇发绀等症状，并伴有毛色暗沉无光泽，蜷缩嗜卧，腹肌痉挛，饮食减少，排便增多等行为状态改变，哮喘症状评分显著升高($P < 0.05$)；与模型组相比，全真一气汤低、高剂量组的哮喘症状评分显著降低($P < 0.05$)。(如表 1)

Table 1. Comparison of asthma symptom scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)

表 1. 各组大鼠哮喘症状评分比较($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)

组别	哮喘症状评分
空白组	0.00 ± 0.00
模型组	2.33 ± 0.82 [*]
低剂量组	1.17 ± 0.68 [△]
高剂量组	1.00 ± 0.55 ^{△▲}

与空白组比较，^{*} $P < 0.05$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ；与全真一气汤低剂量治疗组比较，[▲] $P > 0.05$ 。

4.2. 血清 IL-6、IL-17、IL-10、IL-35 细胞因子含量

如图 1，与空白组相比，模型组血清 IL-6、IL-17 含量明显增加($P < 0.05$)，血清 IL-10、IL-35 的含量明显减少($P < 0.05$)；与模型组相比，全真一气汤低剂量组、高剂量组血清 IL-6、IL-17 的含量明显减

少($P < 0.05$), IL-35 的含量明显增加($P < 0.05$); 与全真一气汤低剂量组相比, 全真一气汤高剂量组血清 IL-6 的含量减少($P < 0.05$), IL-35 的含量明显增加($P < 0.05$)。

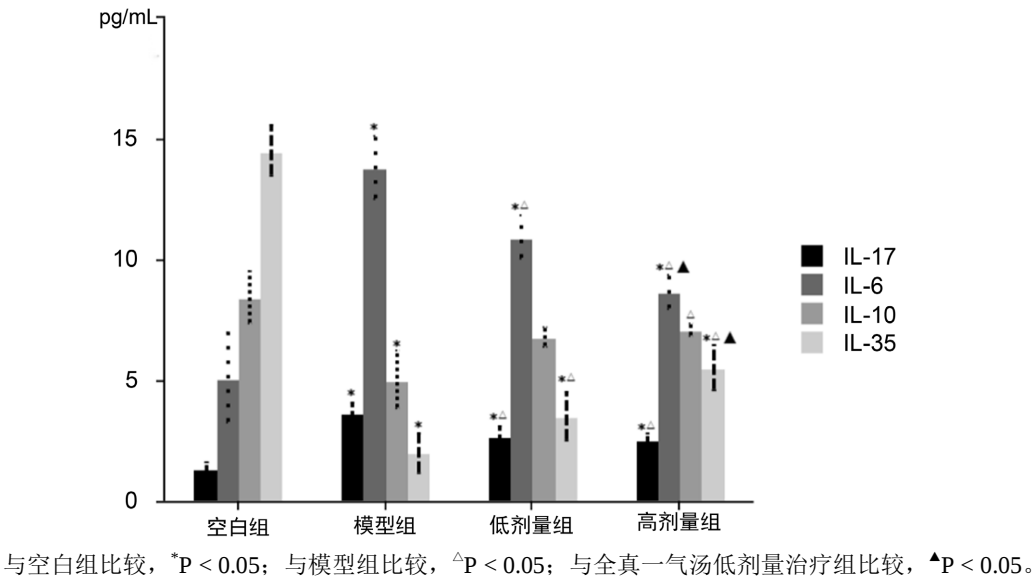


Figure 1. Comparison of serum IL-6, IL-17, IL-10, and IL-35 cytokine contents in rats in each group
图 1. 各组大鼠血清 IL-6、IL-17、IL-10、IL-35 细胞因子含量比较

4.3. 哮喘症状评分与血清细胞因子含量的相关性研究

如表 2, 双变量 Pearson 检验结果显示, 血清 IL-17、IL-6 与哮喘症状评分呈正相关($P < 0.05$), 血清 IL-10、IL-35 与哮喘症状评分呈负相关($P < 0.05$)。

Table 2. Correlation between asthma symptom scores and serum cytokines in rats in each group
表 2. 各组大鼠哮喘症状评分与血清细胞因子相关性

		IL-6	IL-17	IL-35	IL-10
哮喘症状评分	r	0.79	0.74	-0.73	-0.70
	P	0.00	0.00	0.00	0.00

5. 讨论

支气管哮喘, 是由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症及高反应的呼吸系统疾病[10], 最新的研究进展也表明, 辅助性 T 细胞(Th17)和调节性 T 细胞(Treg)产生的炎症因子 IL-6、IL-17、IL-35、IL-10 能够控制或者诱导气道炎症[11]。徐玉等[12]的实验研究发现肾气虚型哮喘大鼠肺泡灌洗液中 IL-6、IL-17 水平增高。Treg 分泌的多种细胞因子如 IL-10、IL-35 等间接发挥作用, 从而减轻哮喘气道炎症、气道高反应性及气道重塑的发生[12] [13] [14]。

哮喘属于“伏饮”范畴, 以“痰”为夙根, 而伏痰壅滞气道, 气塞不通, 血壅不流, 痰瘀胶着于脉络, 导致哮喘难以根治, 痰饮伏藏多因脏气虚弱、功能失调, 主要为肺脾肾三脏统领运化津液的能力减弱, 尤以肾阳衰微蒸腾气化无权为重, 正如陈士铎所说“气虚自然痰多”。水气不能转输盘踞一所, 日久根深蒂固则为伏痰, 若遇感受外邪等诱因, 则可引动伏痰, 伏痰上激于肺则喘促、痰涌鼻煽; 伏痰横

溢肌腠则浮肿、肌肤晦暗；伏痰下窜胃肠则食少、洞泄不止。全真一气汤具有明显的补肾气作用，并能明显改善肾气虚型哮喘患者的临床症状，改善肾气虚型哮喘大鼠的气道炎症[15] [16]。

本研究结果显示，肾气虚型哮喘大鼠一般状态情况越差，呼吸困难、口唇紫绀、毛发晦暗、排便增多等症状表现越明显，哮喘症状评分越高，促炎因子 IL-6、IL-17 的含量越高，抗炎因子 IL-35、IL-10 的含量越低，即气道炎症程度越明显，因此细胞因子 IL-6、IL-17、IL-35、IL-10 可以作为评估肾气虚型哮喘大鼠炎症程度的指标。

基金项目

福建省自然科学基金面上项目(2020J01245)。

参考文献

- [1] 田祖慧, 左凤琼, 张魏. 哮喘患儿诱导痰中 T 细胞亚群和细胞因子的变化及意义[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(1): 72-74+78.
- [2] Zheng, R., Wang, F., Huang, Y., et al. (2021) Elevated Th17 Cell Frequencies and Th17/Treg Ratio Are Associated with Airway Hyperresponsiveness in Asthmatic Children. *Journal of Asthma*, **58**, 707-716. <https://doi.org/10.1080/02770903.2020.1737710>
- [3] 陈恂, 燕晓茹, 李敏, 等. 小儿健脾益肺方改善哮喘小鼠气道高反应的实验研究[J/OL]. 北京中医药大学学报, 2023: 1-15. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3574.R.20230727.1437.002.html>, 2023-09-21.
- [4] 陈娜, 韩洁, 高春燕. 扁蒴藤素对支气管哮喘患儿 Th17/Treg 失衡的影响及意义[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(1): 58-61.
- [5] 孟鹏飞, 吕岳. 简述用卵蛋白制作大鼠哮喘模型的要点[J]. 甘肃中医学院学报. 2011, 28(2): 27-29.
- [6] Sagit, M., Polat, H., et al. (2017) Effectiveness of Quercetin in an Experimental Rat Model of Allergic Rhinitis. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, **274**, 3087-3095. <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4602-z>
- [7] 乔明, 刘兰英, 王和生. 慢性过敏性哮喘大鼠模型的建立与评价[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(1): 79-82.
- [8] 郑小伟, 宋红, 王颖. 肾气虚哮喘模型及中西药联合干预的实验研究[J]. 浙江中医杂志, 2012, 2(47): 129-131.
- [9] Lee, Y., et al. (2003) The Nuclear RNase III Drosha Initiates microRNA Processing. *Nature*, **425**, 415-419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- [10] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2020 年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(12): 1023-1048.
- [11] Thomas, R., Qiao, S. and Yang, X. (2023) Th17/Treg Imbalance: Implications in Lung Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article No. 4865. <https://doi.org/10.3390/ijms24054865>
- [12] 徐玉, 石镇东, 刘晓谷, 等. 益肾喘宁汤对肾气虚哮喘大鼠的治疗作用[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 993-996.
- [13] Martins, P.F., Iedg, W.R., et al. (2017) Therapeutic Potential of Targeting the Th17/TRreg Axis in Autoimmune Disorders. *Molecules*, **22**, e134. <https://doi.org/10.3390/molecules22010134>
- [14] 蓝文坪, 张建秋, 王挺, 等. 老年支气管哮喘患者 Th17、IL-17 水平与气道重塑的关系研究[J]. 中华保健医学杂志, 2021, 23(4): 346-348.
- [15] 张晶, 严桂珍. 全真一气汤治疗肾气虚型支气管哮喘缓解期 32 例疗效观察[J]. 福建中医药, 2016, 47(3): 40-42.
- [16] 张晶, 陈志斌, 王春娥, 等. 基于气道炎症调控的全真一气汤干预肾气虚型哮喘大鼠的机制研究[J]. 中国中医急诊, 2019, 28(8): 1354-1357.