

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.23.014

实验研究

两种肾阳虚证支气管哮喘病证结合动物模型的建立与评价

嵇冰¹, 寿旗扬², 崔凯恒², 张利棕², 蔡月琴², 张忠民¹, 姚丽娟^{*}

(1. 浙江中医药大学附属湖州中医院, 浙江省湖州市南街 315 号, 313000; 2. 浙江中医药大学动物实验研究中心)

摘要 目的 评价两种肾阳虚证支气管哮喘病证结合动物模型造模方法。方法 将 54 只 Wistar 大鼠分为空白组、哮喘组、激素组、激素 + 哮喘组、手术组、手术 + 哮喘组, 每组 9 只。激素组、激素 + 哮喘组大鼠采用氢化可的松注射液 15 mg/(kg·d) 皮下注射, 手术组、手术 + 哮喘组采用切除双侧全部肾上腺复制为肾阳虚证候模型。哮喘组、激素 + 哮喘组、手术 + 哮喘组采用卵清白蛋白 (OVA) 致敏诱发哮喘。观察各组大鼠一般状态、行为学、肺功能及肺泡灌洗液中白细胞分类, 同时检测血清下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴功能指标 [包括促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)、肾上腺皮质激素释放激素 (ACTH)、皮质醇 (CORT)、干扰素- γ (INF- γ)、免疫球蛋白 E (IgE)] 及肺组织各项炎症因子水平; 观察肺组织病理改变。结果 激素 + 哮喘组、手术 + 哮喘组肺泡灌洗液中白细胞、嗜酸性细胞总数升高, CRH、ACTH、CORT 分泌减少; 血清总 IgE、OVA 特异性 IgE 含量升高; 肺组织内 INF- γ 表达分泌减少, 白细胞介素 4 (IL-4) 表达分泌增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 肺组织病理显示支气管出现大量炎症浸润、气道黏膜水肿。激素 + 哮喘组与手术 + 哮喘组比较, 在肺泡灌洗液炎症细胞检测上无明显差异, 后者 HPA 轴功能指标下降更加明显, 前者大鼠肺组织的病理改变更加明显。结论 两种肾阳虚证支气管哮喘动物模型均能够反映肾阳虚证支气管哮喘的发病特点, 但采用切除双侧全部肾上腺方法的动物模型对 HPA 轴功能影响更明显。

关键词 支气管哮喘; 肾阳虚证; 病证结合动物模型

支气管哮喘 (简称“哮喘”) 是一种由多细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病^[1], 属于中医学“喘证”“哮证”范畴。中医学认为, 哮喘是由于脏腑亏虚、痰瘀伏留、外邪引发所致的本虚标实之证, 与肾的关系密切。哮喘患者无论是在缓解期, 还是在发作期均存在肾虚, 尤其是肾阳虚, 从肾阳虚论治是中医药治疗和控制哮喘的重要方法之一^[2]。目前文献报道的肾阳虚支气管哮喘病证结合的动物模型采用氢化可的松 + 卵清白蛋白 (OVA) 诱导的造模方法^[3], 但是氢化可的松对支气管哮喘具有治疗作用, 采用该药物造模对实验结果可能会产生影响。因此, 本课题组分别采用手术切除双侧全部肾上腺 + OVA 诱导造模方法^[4]和氢化可的松 + OVA 诱导造模方法分别构建肾阳虚支

气管哮喘动物模型, 并对上述这两种动物模型进行评价。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 54 只, 雄性, 10 ~ 12 周龄, 体重 237 ~ 286 g, 中国科学院上海实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2007-0005。

1.2 主要试剂与仪器

促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)、肾上腺皮质激素释放激素 (ACTH)、皮质醇 (CORT)、干扰素- γ (INF- γ)、免疫球蛋白 E (IgE) 试剂盒均购于上海百沃生物科技有限公司, 批号: 20140601A; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 10 (IL-10) 试剂盒 (上海百沃生物科技有限公司, 批号: 20140529B); 氢化可的松注射液 (天津金

基金项目: 国家自然科学基金 (81403374, 81573677); 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (2013C37008)

* 通讯作者: jlb127@sohu.com, 13967262569

耀药业有限公司生产,批号:1404151);OVA 注射液(美国 Sigma Aldrich 公司,批号:10273045231)。MC347 肛温计,德国欧龙姆公司;Smart-MASS 小动物行为记录分析系统,西班牙 Panlab 公司;YLS-1B 多功能大鼠自主活动记录仪,山东省医学科学院设备站;垂直电泳系统、Frans-Blod SD 半干转印仪、CFX96 荧光定量 PCR 仪,均购于美国 Bio-Rad 公司;远红外激光成像系统,美国 LI-COR 公司;VarioScan Flash 多功能酶标仪,美国 Thermo 公司;eclipse 80i 显微镜,日本 Nikon 公司;图像分析系统,德国 Carl Zeiss 公司。

1.3 动物分组与造模

54 只大鼠适应性喂养 1 周后,按随机数字表法分为空白组、哮喘组、激素组、激素+哮喘组、手术组、手术+哮喘组共 6 组,每组 9 只。激素组、激素+哮喘组大鼠参照文献 [6] 给予氢化可的松注射液 15 mg/(kg·d) 皮下注射 20 天建立肾阳虚证候模型;手术组、手术+哮喘组大鼠采用腹腔注射 3.0% 戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉后手术切除双侧全部肾上腺法建立肾阳虚证候模型 [7]。各组造模后 7 天,哮喘组、激素+哮喘组、手术+哮喘组参照文献 [8] 方法采用 OVA 致敏诱发哮喘:将 2 mg 的 OVA 与氢氧化铝 200 mg、生理盐水 1 ml 混悬液乳化后,共 6 点作皮下注射,在大鼠两侧腹股沟、背部皮下、后足跖皮下,每点 0.1 ml,腹腔注射 0.4 ml,7 天后重注射 1 次加强免疫。首次致敏 14 天后,大鼠雾化吸入 10 g/L OVA 溶液,每日攻击 30 min,连续攻击 7 天。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 一般情况 观察并记录大鼠体重、肛温、饮食量、饮水量、24 h 尿量及尿色、大便干湿程度、脱毛、拱背、蜷缩和激惹反应、每日自主活动次数;在对大鼠实施致敏哮喘时,增加对呼吸情况(节律、频率)的观察。

1.4.2 血清下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能指标检测 各组大鼠使用 3% 戊巴比妥钠溶液(45 mg/kg)进行腹腔麻醉,心脏取血置离心管中,3000 r/min 离心 10 min 分离血清,采用竞争法测定各组大鼠 CRH、ACTH、CORT、总 IgE 和 OVA 特异性 IgE 水平,具体操作按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.4.3 肺支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞分类总数检测 取血后打开大鼠胸腔,结扎右侧支气管(右肺用于病理和细胞因子检测),对左肺进行支气管肺泡灌洗,将灌洗液收集于试管。在显微镜下用计数板计算白细胞总数;取灌洗液涂于玻片,干后使用瑞氏-吉姆萨染色液染色,在高倍显微镜下进行分类计数。

1.4.4 肺组织细胞因子检测 将右肺组织匀浆,3000 r/min 离心 10 min,取上清液,使用双抗体夹心法测定 INF- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-10 细胞因子水平,操作严格按照 ELISA 试剂盒说明进行。

1.4.5 肺组织病理 取各组动物模型右肺组织块,10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,逐级脱水,HE 染色,常规脱水后,光镜下观察病理改变。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件分析数据。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用方差分析。

2 结果

实验过程中手术组中大鼠死亡 1 只。

2.1 各组大鼠一般情况比较

空白组大鼠肛温、体重、自主活动次数、饮食量、饮水量、尿量及尿色、大便干湿程度、脱毛、拱背、蜷缩和激惹反应未出现明显变化;激素组、激素+哮喘组、手术组、手术+哮喘组大鼠较空白组易于抓取,出现了脱毛、拱背、蜷缩、爪甲颜色变浅、饮食饮水量下降、大便清稀、多尿等症状。在对哮喘组、激素+哮喘组、手术+哮喘组大鼠进

表 1 各组大鼠一般情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	肛温(°C)	自主活动次数(次/天)	饮食量(g)	饮水量(ml)	24 h 尿量(ml)
空白组	9	348.31 ± 21.82	38.16 ± 0.28	108.56 ± 13.71	15.37 ± 1.45	29.56 ± 2.47	17.77 ± 3.44
哮喘组	9	332.78 ± 15.52	38.11 ± 0.11	98.89 ± 22.12	12.40 ± 2.40*	25.96 ± 1.94*	18.55 ± 2.84
激素组	9	312.42 ± 6.82**	37.61 ± 0.23*	92.22 ± 12.09**	11.51 ± 1.85**	23.95 ± 1.84**	20.60 ± 2.71**
激素+哮喘组	9	291.83 ± 9.89 $\Delta\Delta$	37.32 ± 0.27	67.67 ± 29.94 Δ	10.76 ± 2.11 Δ	19.12 ± 1.61 $\Delta\Delta$	19.15 ± 3.13 Δ
手术组	8	342.75 ± 14.34 Δ	37.89 ± 0.29	67.00 ± 12.26** Δ	12.14 ± 1.79**	23.15 ± 1.46**	21.21 ± 2.51**
手术+哮喘组	9	322.78 ± 6.50 $\Delta\Delta$	37.68 ± 0.16	61.11 ± 16.97 $\Delta\Delta$	10.57 ± 2.24#	22.41 ± 2.09 $\Delta\Delta$	20.16 ± 1.95

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与激素组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与激素+哮喘组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与手术组比较,# $P < 0.05$

行诱发哮喘时,大鼠逐渐出现喷嚏增多、呼吸急促、呼吸节律不规则、喘息、烦躁,且随 OVA 攻击次数的增加而加重。表 1 示,与空白组比较,哮喘组大鼠饮食量和饮水量降低 ($P < 0.05$); 激素组大鼠体重减轻、肛温下降、自主活动次数减少、饮食量和饮水量减少、24 h 尿量增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 手术组大鼠出现自主活动次数、饮食量和饮水量减少,24 h 尿量增加 ($P < 0.01$)。与激素组比较,激素 + 哮喘组体重减轻,自主活动次数、饮食量和饮水量及 24 h 尿量减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与手术组比较,手术 + 哮喘组体重减轻,自主活动次数和饮食量减少 ($P < 0.05$); 激素组体重减轻、自主活动次数增加 ($P < 0.05$)。与激素 + 哮喘组比较,手术 + 哮喘组体重较大,自主活动次数减少,饮水量增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠 BALF 中炎症细胞分类总数比较

表 2 示,与空白组比较,哮喘组白细胞、淋巴细胞、嗜酸性细胞、中性细胞总数均明显上升 ($P < 0.01$), 激素组嗜酸性细胞总数明显上升 ($P < 0.05$), 手术组白细胞、淋巴细胞、嗜酸性细胞的总数均明显上升,中性细胞的总数明显下降 ($P < 0.05$)。与激素组比较,激素 + 哮喘组白细胞、淋巴细胞、嗜酸性细胞、中性细胞的总数均明显上升 ($P < 0.01$)。与手术组比较,手术 + 哮喘组白细胞、嗜酸性细胞、中性细胞总数均明显上升 ($P < 0.01$), 淋巴细胞总数明显下降 ($P < 0.05$)。与激

素组比较,手术组白细胞、淋巴细胞总数均明显上升 ($P < 0.01$)。手术 + 哮喘组与激素 + 哮喘组白细胞、淋巴细胞、嗜酸性细胞、中性细胞总数差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠血清 HPA 轴功能指标比较

表 3 示,与空白组比较,哮喘组血清 CRH、CORT、ACTH 出现明显下降,总 IgE、OVA 特异性 IgE 均明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 激素组、手术组、激素 + 哮喘组、手术 + 哮喘组各项指标均明显下降 ($P < 0.05$)。与激素组比较,激素 + 哮喘组 CORT、ACTH 均明显下降 ($P < 0.05$), 总 IgE、OVA 特异性 IgE 均明显升高 ($P < 0.01$)。与手术组比较,手术 + 哮喘组 CRH、CORT、ACTH 均明显下降,总 IgE、OVA 特异性 IgE 均明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 激素组 CORT、ACTH、OVA 特异性 IgE 明显偏高,总 IgE 明显偏低 ($P < 0.05$)。与手术 + 哮喘组比较,激素 + 哮喘组 CRH、CORT、ACTH 明显偏高 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠肺组织免疫细胞因子水平比较

表 4 示,与空白组比较,哮喘组、激素 + 哮喘组、手术 + 哮喘组 $\text{INF-}\gamma$ 含量降低、IL-4 含量增多 ($P < 0.01$)。与激素组比较,激素 + 哮喘组 $\text{INF-}\gamma$ 含量下降,IL-2、IL-4 表达升高 ($P < 0.01$)。与手术组比较,手术 + 哮喘组 $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 含量下降,IL-4、IL-10 表达增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 激素组 IL-2 表达减少,IL-10 表达增多 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠 BALF 炎症细胞分类总数比较 ($\times 10^5/\text{ml}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	白细胞	淋巴细胞	嗜酸性细胞	中性细胞
空白组	9	3.65 ± 1.12	3.46 ± 1.06	0.07 ± 0.03	0.12 ± 0.06
哮喘组	9	14.82 ± 4.85 ^{**}	6.66 ± 1.97 ^{**}	5.77 ± 2.94 ^{**}	2.39 ± 0.92 ^{**}
激素组	9	3.51 ± 1.46	3.29 ± 1.40	0.13 ± 0.05 [*]	0.10 ± 0.05
激素 + 哮喘组	9	17.06 ± 3.83 [△]	4.18 ± 1.28 [△]	10.48 ± 2.95 [△]	2.50 ± 0.46 [△]
手术组	8	5.80 ± 2.65 ^{*△}	5.58 ± 2.60 ^{*△}	0.13 ± 0.05 [*]	0.09 ± 0.05 [*]
手术 + 哮喘组	9	17.90 ± 3.80 ^{##}	3.90 ± 0.94 [#]	11.42 ± 2.58 ^{##}	2.58 ± 0.81 ^{##}

注:与空白组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与激素组比较,△ $P < 0.01$;与手术组比较,## $P < 0.01$

表 3 各组大鼠血清 HPA 轴功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CRH (pg/ml)	CORT (ng/ml)	ACTH (pg/ml)	总 IgE (μg/ml)	OVA 特异性 IgE (ng/ml)
空白组	9	68.08 ± 4.57	463.68 ± 28.27	75.55 ± 3.96	7.34 ± 1.33	7.14 ± 1.49
哮喘组	9	62.72 ± 8.50 [*]	438.71 ± 42.48 [*]	71.00 ± 4.95 [*]	16.49 ± 0.83 ^{**}	20.72 ± 1.43 ^{**}
激素组	9	56.33 ± 4.75 [*]	362.86 ± 19.99 [*]	62.33 ± 7.19 [*]	6.91 ± 1.27 [*]	6.02 ± 2.26 [*]
激素 + 哮喘组	9	57.96 ± 6.37 [*]	340.94 ± 11.80 ^{*△}	54.32 ± 5.18 ^{*△}	17.98 ± 1.17 ^{*△△}	21.78 ± 1.21 ^{*△△}
手术组	8	57.77 ± 3.91 [*]	349.81 ± 22.75 ^{*△}	58.89 ± 6.06 ^{*△}	7.61 ± 1.30 ^{*△}	5.35 ± 2.03 ^{*△}
手术 + 哮喘组	9	54.44 ± 3.33 ^{*▲}	319.54 ± 17.50 ^{*▲}	51.76 ± 3.58 ^{*▲}	17.61 ± 1.52 ^{*##}	21.25 ± 1.45 ^{*##}

注:CRH,促肾上腺皮质激素释放激素;ACTH,肾上腺皮质激素释放激素;CORT,皮质醇;OVA,卵白蛋白;与空白组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与激素组比较,△ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$;与激素 + 哮喘组比较,▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$;与手术组比较,## $P < 0.05$, # $P < 0.01$

表 4 各组大鼠肺组织免疫细胞因子水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	INF- γ	IL-2	IL-4	IL-10	TNF- α
空白组	9	137.22 $\pm$ 17.13	1123.59 $\pm$ 91.40	69.45 $\pm$ 7.22	54.56 $\pm$ 5.61	325.99 $\pm$ 30.83
哮喘组	9	111.92 $\pm$ 11.60**	1151.42 $\pm$ 174.30	91.54 $\pm$ 7.09**	55.05 $\pm$ 4.10	317.61 $\pm$ 30.60
激素组	9	121.53 $\pm$ 11.89	1059.58 $\pm$ 94.58	67.81 $\pm$ 7.52	53.39 $\pm$ 5.66	290.24 $\pm$ 37.14
激素+哮喘组	9	96.90 $\pm$ 7.47** $\Delta\Delta$	1202.45 $\pm$ 277.95 $\Delta\Delta$	101.14 $\pm$ 12.89** $\Delta\Delta$	53.57 $\pm$ 3.90	293.28 $\pm$ 31.28
手术组	8	121.55 $\pm$ 7.80	1084.49 $\pm$ 111.73 Δ	68.26 $\pm$ 10.91	50.32 $\pm$ 4.92 Δ	289.23 $\pm$ 23.39
手术+哮喘组	9	99.17 $\pm$ 7.88** $\Delta\Delta$	1096.05 $\pm$ 82.51 Δ	97.23 $\pm$ 11.68** $\Delta\Delta$	54.27 $\pm$ 2.74 Δ	284.53 $\pm$ 21.62 Δ

注: INF- γ , 干扰素- γ ; IL-2, 白细胞介素 2; IL-4, 白细胞介素 4; IL-10, 白细胞介素 10; TNF- α , 肿瘤坏死因子- α ; 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与激素组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与激素+哮喘组比较, $\Delta P < 0.05$; 与手术组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

与手术+哮喘组比较, 激素+哮喘组 INF- γ 含量降低, TNF- α 、IL-2、IL-4 表达增多 ($P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠肺组织病理改变

图 1 示, 与空白组比较, 哮喘组、激素+哮喘组、手术+哮喘组大鼠模型中, 肺支气管平滑肌厚度明显增加, 支气管黏膜下层、肌层可见大量炎症细胞浸润, 主要包括中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞及少量浆细胞; 支气管纤毛上皮部分脱落, 纤毛粘连、变性、坏死。与哮喘组相比, 激素+哮喘组与手术+哮喘组存在更严重的炎症细胞浸润; 激素组与手术组比较无差异, 激素+哮喘组与手术+哮喘组比较存在较严重的炎症细胞浸润。

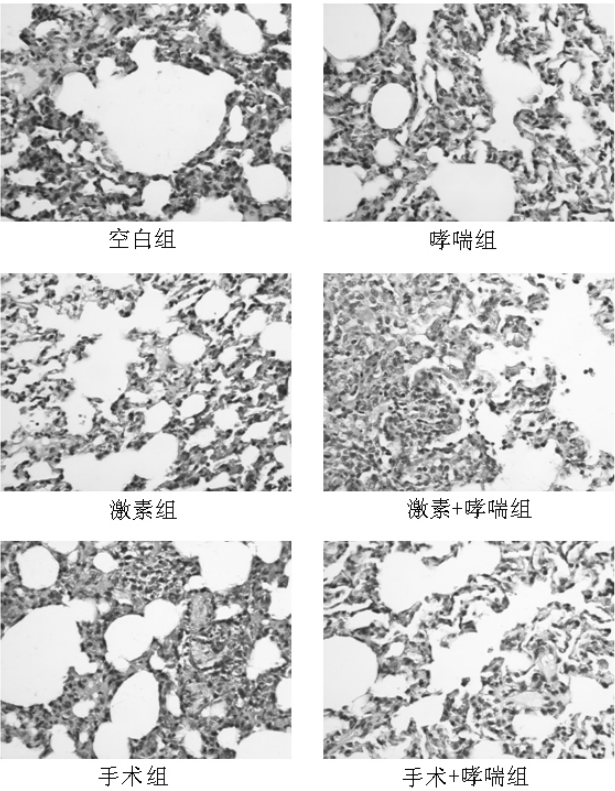


图 1 各组大鼠肺组织病理切片图 (HE 染色, $\times 200$)

3 讨论

中医学认为, 哮喘属于肾虚或潜隐性肾虚^[8]。

《类证治裁·喘证》云“肺为气之主, 肾为气之根, 肺主出气, 肾主纳气, 阴阳相交, 呼吸乃和。若出纳升降失常, 斯喘作焉。”^[9] 国内外学者们探索了大量复制肾阳虚证动物模型的方法, 其中使用外源性糖皮质激素——氢化可的松复制肾阳虚证动物模型是使用最早的, 也是最为广泛的、认可度最高的经典造模方法^[8-9]。切除肾上腺损伤 HPA 轴也是肾阳虚证造模方法的一种, 其切断了 HPA 轴的功能反馈, 可能作为肾阳虚证的一种造模方法。

本实验结果显示, 使用氢化可的松和切除肾上腺复制的肾阳虚证大鼠模型均出现了脱毛、拱背、蜷缩、爪甲颜色变浅、饮食饮水量下降、大便清稀、多尿等症状以及体重减轻、肛温降低、自主活动次数减少等一系列机能衰减的体征, 符合中医学中肾阳虚证的相关理论。Th1 细胞分泌的 INF- γ 含量在哮喘组、激素+哮喘组、手术+哮喘组出现下降, 由 Th2 细胞分泌的 IL-4 在哮喘组、激素+哮喘组、手术+哮喘组表达增多, 表明哮喘疾病出现 Th1/Th2 偏移失衡, 与学者的既往研究^[10]一致。激素+哮喘组和手术+哮喘组肾阳虚临床症状明显, 且 CRH、CORT、ACTH 水平显著降低, 说明本次实验复制的肾阳虚证模型载体是可靠的。同时, 使用氢化可的松皮下注射+OVA 诱发哮喘法建立的动物模型在 BALF 炎症细胞分类检测与手术切除双侧全部肾上腺+OVA 诱发哮喘法无明显差异, 在肾阳虚体征上各有侧重; 后者 HPA 轴功能指标下降更加明显, 可能与手术切除双侧全部肾上腺造成 HPA 轴永久性功能损失有关; 而前者在 Th1/Th2 偏移失衡程度、大鼠肺组织的炎症细胞浸润程度更加明显; 此外, 在造模方面, 前者具有操作简便、对动物创伤少、不会造成不可逆损害、造模成本低等优点; 而后者在造模全程中未使用氢化可的松, 可以排除氢化可的松药物对实验结果产生的影响, 获得的实验数据更可靠。

综上所述, 两种肾阳虚证支气管哮喘动物模

型,既有肾阳虚证的表现,也有支气管哮喘的特征,能够反映肾阳虚证支气管哮喘患者的发病特点,可以作为研究支气管哮喘病证结合的动物模型。但两种肾阳虚证支气管哮喘病证结合的动物模型在各项指标的影响方面仍各有不同,因此,建议依据实验研究的目的和侧重点选择相应的动物模型。

参考文献

- [1] 葛均波,徐永健.内科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013:28.
- [2] 曾宏,陈鲁.补肾培元法治小儿哮喘体会[J].陕西中医,2000,21(8):384-386.
- [3] 陈月圆,孙丽平.益气固本胶囊对肾阳虚哮喘模型小鼠脾淋巴细胞增殖功能及相关脏器指数影响的实验研究[J].中国中西医结合儿科学,2013,5(1):12-16.
- [4] 寿旗扬,丁科,周卫民,等.肾上腺切除肾阳虚大鼠佐剂性关节炎模型的建立[J].甘肃中医学院学报,2010,27(4):7-9.

- [5] LI B, LUO QL, NURAHMAT M, et al. Establishment and comparison of combining disease and syndrome model of asthma with “kidney yang deficiency” and “abnormal savda” [J]. Evid Based Complement Altern Med, 2013; 658364. doi: 10.1155/2013/658364.
- [6] 董竞成,厉蓓,罗清莉,等.肾阳虚证、异常黑胆质证及与哮喘病证结合的科学内涵[J].世界中医药,2013(7):709-714.
- [7] 林珮琴.类证治裁[M].北京:人民卫生出版社,1988:97.
- [8] 陈英华,孙琪,欧阳轶强,等.肾阳虚证动物模型造模方法综述[J].中国医药学报,2003,18(6):370-372.
- [9] 谭勇,李健,陈果,等.白附子对正常和肾阳虚证大鼠毒性作用的差异[J].中医杂志,2011,52(14):1229-1232.
- [10] 李笋,王培源,钟萍,等.金匱肾气丸对肾阳虚变应性鼻炎缓解期小鼠 Th1/Th2 细胞因子的影响[J].中药新药与临床药理,2013,24(3):258-260.

Establishment and Evaluation of Two Animal Models of Bronchial Asthma with Disease-Syndrome Combination of Kidney-Yang Deficiency Syndromes

Ji Bing¹, SHOU Qiyang², CUI Kaiheng², ZHANG Lizong², CAI Yueqin², ZHANG Zhongmin¹, YAO Lijuan¹

(1. Huzhou Chinese Medical Hospital affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Huzhou 313000; 2. Laboratory Animal Center of Zhejiang Chinese Medical University)

ABSTRACT Objective To evaluate two modeling methods of animal model of bronchial asthma with disease-syndrome combination of kidney-yang deficiency syndrome. **Methods** Fifty-four Wistar rats were divided into a blank group, an asthma group, a hormone group, a hormone + asthma group, an operation group, and an operation + asthma group, with 9 rats in each. Rats in the hormone group and the hormone + asthma group were given 15 mg/(kg · d) of hydrocortisone by subcutaneous injection, while the operation group and the operation + asthma group received bilateral total adrenalectomy to establish the kidney-yang deficiency syndrome model. The asthma group, the hormone + asthma group, and the operation + asthma group were given ovalbumin (OVA) sensitization to induce asthma. General state, behavior, lung function and leukocyte classification in bronchoalveolar lavage fluid in each group were observed. At the same time, indexes of the function of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in serum [including corticotropin-releasing hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol (CORT), interferon- γ (INF- γ), immune globulin E (IgE)], and levels of each inflammatory factor in lung tissue were examined, and pathologic changes in the lung tissue were observed. **Results** In the hormone + asthma group and the operation + asthma group, total number of leukocyte and eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid increased, while the excretion of CRH, ACTH and CORT decreased; levels of total serum IgE and OVA-specific IgE increased; expression and excretion of INF- γ in lung tissues decreased while the expression and excretion of interleukin-4 (IL-4) increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); There were large amounts of inflammation infiltrations and mucosa edema of air passage in bronchus. There was no significant difference in inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid when comparing the hormone + asthma group and the operation + asthma group. Indexes of HPA axis function in the operation + asthma group decreased more remarkably while pathologic changes in lung tissue in the hormone + asthma group were more remarkable. **Conclusion** Both two animal models of bronchial asthma with kidney-yang deficiency syndrome could reflect clinical characters of bronchial asthma of kidney-yang deficiency syndrome. But animal model by bilateral total adrenalectomy seems to have more remarkable influence on HPA axis function.

Keywords bronchial asthma; syndrome of kidney-yang deficiency; animal model of combination of diseases and syndromes

(收稿日期: 2015-12-08; 修回日期: 2016-09-11)

编辑: 王利芬