

袁欣,王安琪,王思宇,等. 痰瘀互结证哮喘大鼠模型的建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(10): 1243–1251.
YUAN X, WANG A Q, WANG S Y, et al. Establishing and evaluating of asthma rat model with phlegm and blood stasis syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(10): 1243–1251.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.10.002

痰瘀互结证哮喘大鼠模型的建立及评价

袁欣¹, 王安琪¹, 王思宇¹, 潘乐芯¹, 汪佳颖¹, 邹璐^{1*}, 杨爱东^{1,2*}

(1. 上海中医药大学中医学院, 上海 201203;
2. 上海市重大传染病和生物安全研究院中医药疫病研究中心, 上海 200032)

【摘要】 目的 探索痰瘀互结证哮喘大鼠模型的建立及评价方法。**方法** 60 只 SD 雄性大鼠随机分为 5 组 (正常组、哮喘模型组、病证结合组、地塞米松组、咳喘六味合剂组), 每组 12 只。通过卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导建立哮喘疾病模型; 通过高脂饮食联合冰水浴法建立痰瘀互结证动物模型。通过动物行为学观察、病理切片观察、炎症指标检测、气道反应性测定评估哮喘疾病模型; 通过体重测定、证候观察、血糖、血脂、凝血功能、血液流变学指标检测, 以及咳喘六味合剂干预后效果观察评估痰瘀互结证模型。**结果** (1) OVA 诱导后哮喘模型组、病证结合组大鼠均出现呼吸急促, 张口喘息, 腹部翕动, 烦躁不安, 易激惹等现象; 苏木素-伊红 (HE) 染色见肺组织支气管黏膜上皮排列紊乱, 局部脱落, 基底膜增厚, 支气管管壁增厚, 管腔狭窄, 大量炎性细胞浸润, 毛细血管充血; 血清中血清中白细胞介素 4 (interleukin 4, IL-4)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)、转化生长因子- β 1 (transforming growth factor betal, TGF- β 1) 较正常组均上升 ($P < 0.05$); 各浓度乙酰甲胆碱 (methacholine, Mch) 激发后较正常组均表现出气道阻力 (enhance pause, Penh) 值增高 ($P < 0.05$)。 (2) 造模结束后, 病证结合组大鼠出现寒颤、蜷缩少动、爪甲紫暗, 尾部可见紫黑瘀斑、便溏, 肛周不洁等证候表现; 与哮喘模型组比较, 病证结合组大鼠体重上升 ($P < 0.05$); 血糖、甘油三酯、总胆固醇含量升高 ($P < 0.05$), 凝血酶时间缩短 ($P < 0.05$), 纤维蛋白原含量增多 ($P < 0.05$), 低、中、高切变率下全血黏度均升高 ($P < 0.05$); 咳喘六味合剂组以上各项指标较病证结合组有改善。**结论** 通过 OVA 诱导及高脂饮食联合冰水浴法建立痰瘀互结证哮喘大鼠模型, 通过行为学观察、指标检测、以方测证综合评价该病证结合模型具有可行性。

【关键词】 支气管哮喘; 痰瘀互结证; 病证结合; 动物模型; 以方测证

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 10-1243-09

Establishing and evaluating of asthma rat model with phlegm and blood stasis syndrome

YUAN Xin¹, WANG Anqi¹, WANG Siyu¹, PAN Lexin¹, WANG Jiaying¹, ZOU Lu^{1*}, YANG Aidong^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Center for Traditional Chinese Medicine and Epidemic Disease, Shanghai Institute of Infectious Disease and Biosecurity, Shanghai 200032, China)

Corresponding author: ZOU Lu. E-mail: zldyxok@163.com; YANG Aidong. E-mail: aidongy@126.com

【基金项目】 国家自然科学基金 (82104708), 上海市市级科技重大专项 (ZD2021CY001, ZXS004R4-1)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82104708), Shanghai Municipal Science and Technology Key Project (ZD2021CY001, ZXS004R4-1)。

【作者简介】 袁欣, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病基础。Email: 370398248@qq.com

【通信作者】 邹璐, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病的临床及基础。Email: zldyxok@163.com;

杨爱东, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病机制。Email: aidongy@126.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To explore method of establishing and evaluating an asthma rat model with phlegm and blood stasis syndrome. **Methods** 60 SD male rats were randomly divided into 5 groups, a normal group, asthma group, combination of disease and syndrome (combination) group, DM group, and KCLW group, with 12 rats in each group. Asthma models were established using ovalbumin (OVA). A syndrome model of phlegm and blood stasis was established using a high-fat diet combined with the ice water bath method. We evaluated the asthma model through animal behavior observation, pathological section observation, inflammation index detection, and airway reactivity measurements. The phlegm and blood stasis syndrome model was evaluated via measurements of rat body mass, blood glucose, blood lipids, coagulation function, and hemorheological indexes and by observing symptoms and syndrome determination by Kechuan Liuwei mixture. **Results** (1) After OVA induction, the rats in the asthma model group and combination group showed symptoms such as shortness of breath, open mouth breathing, abdominal movement, restlessness, and irritability. HE staining showed the disordered arrangement of the bronchial mucosa in lung tissue, local detachment, thickening of the basement membrane and the bronchial tube wall, narrowing of the lumen, extensive infiltration of inflammatory cells, and congestion of capillaries. Compared with the normal group, the asthma model group and combination group ($P < 0.05$) had increased serum IL-4, IL-6, and TGF- β 1. Penh values were increased after stimulation with various concentrations of Mch ($P < 0.05$). (2) Rats in the combination group showed symptoms such as chills, curling up with minimal movement, purple and dark claws, purple and black bruises on the tail, loose stools, and unclean perianal area. Compared with the rats in the asthma model group, rats in the combination group had increased body mass ($P < 0.05$) and blood glucose, triglyceride, and total cholesterol levels ($P < 0.05$), a shortened thrombin time ($P < 0.05$), increased fibrinogen content ($P < 0.05$), and significantly increased whole-blood viscosity at low, medium, and high shear rates ($P < 0.05$). The indexes were significantly improved after Kechuan Liuwei mixture administration. **Conclusions** The asthma rat model with phlegm and blood stasis syndrome can be established through OVA induction and high-fat diet combined with ice water bath. The model can be evaluated through behavioral observation, index measurements, and syndrome determination via formulas.

[Keywords] bronchial asthma; phlegm and blood stasis syndrome; combination of disease and syndrome; animal models; syndrome determination by formulas

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

支气管哮喘属中医学“哮病”范畴,“痰瘀”病机与哮喘发病密切相关^[1]。痰瘀既是哮喘的致病因子,又是其发展过程中的病理产物,贯穿整个病程^[2]。中医学基于实践经验,强调“痰”在哮病中的作用。中医学认为痰的产生与肺布散津液、脾运输精微、肾气化水湿功能失常密切相关,最终导致津液代谢失常,凝聚成痰,伏藏于肺^[3-6],成为哮喘发病的重要病因。同时由于“久病入络,久病必瘀”;或因情志抑郁,肝气不舒,气滞而成瘀;或由外感寒邪,损伤阳气,血行迟涩而成瘀。痰瘀具有依存互根、相互转化、共通消长的相关性。痰阻气机,血行不畅可致淤血;血脉壅塞,饮水积聚而不消散,亦可成痰。在病变过程中痰瘀互为因果发病,二者胶结为患。痰瘀互生互结,滞络损脉,胶结不解,渐成哮喘发病宿根^[7]。辨证论治是中医诊疗特色,且病证结合的动物模型能够更加真实地反应哮喘状态痰瘀互结的体内环境,在此基础上进行病机研究及药物作用观察更具客观性^[8-9]。

本研究以经典的卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱

导方法建立哮喘疾病模型,并以高脂饮食联合冰水浴的方法建立痰瘀互结证大鼠模型,结合微量量化指标、以方测证等方法,综合建立评价痰瘀互结证哮喘动物模型,以期为中医药防治哮喘作用机理等相关研究提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 6 周龄 SD 大鼠 60 只,体重 160 ~ 180 g,购于上海必凯科翼生物科技有限公司【SCXK(沪)2018-0006】,饲养于上海中医药大学动物实验中心【SYXK(沪)2020-0009】,室温 22 ~ 25 ℃,湿度 40% ~ 70%,12 h 明暗交替,自由饮水,并按实验需要自由取食普通饲料及高脂饲料。本研究实施过程中符合动物伦理要求,获上海中医药大学伦理委员会审批(PZSHUTCM2308220001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

OVA, Sigma 公司(批号:102435202);氢氧化

铝, Thermo 公司(批号: VG304133); 大鼠白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)酶联免疫试剂盒, 上海联科生物科技有限公司(批号: A30480435、A206H10155、A201B01241); 二甲苯、乙醇, 国药集团化学试剂有限公司(批号: 10023418、10009128); 苏木素-伊红(HE)染液, 北京鼎国生物技术有限责任公司(批号: 20220803); 地塞米松, 上海上药信谊药厂有限公司(批号: H31020793), 使用时用蒸馏水溶解, 配成 0.32 g/L 混悬液备用; 哮喘六味合剂(组成成分为麻黄、附子、细辛、桃仁、黄芩和虎耳草), 上海中医药大学附属龙华医院(批号: Z04170941)。

倒置光学显微镜, 日本 Olympus; 402AI 超声雾化器, 江苏鱼跃医疗设备有限公司; RM2145 切片机, 德国 Leica; HI1210 展片机, 德国 Leica; HI1220 烤片机, 德国 Leica; 医学图象分析软件 IMS 细胞图象分析系统, 上海申腾信息技术有限公司; KUBOTA5200 离心机, 日本久保田株式会社; 电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; Sysmex CS5100 全自动凝血分析仪, 希森美康医用电子(上海)有限公司; MEN-C100 全自动血流变仪, 山东医

美林电子仪器有限公司; 小动物呼吸肺功能检测系统, 美国 Buxco。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模

60 只 SD 雄性大鼠完全随机分为 5 组: 正常组(normal group)、哮喘模型组(asthma group)、病证结合组(combination group)、地塞米松组(DM group)、哮喘六味合剂组(KCLW group), 每组 12 只。除正常组外各组进行哮喘疾病造模: 分别于第 1 和 8 天对大鼠进行致敏, 操作方法为腹腔注射由 100 mg OVA、100 mg 氢氧化铝与 1 mL 生理盐水混合而成的悬浊液; 2 周后进行引喘: 配置 2% OVA, 对每组大鼠进行雾化, 每次 30 min, 隔天 1 次, 引喘两周(正常组以生理盐水雾化进行对照)^[10]。病证结合组、地塞米松组、哮喘六味合剂在进行哮喘疾病造模同时进行痰瘀互结证造模^[11-12]: 以高脂饮食联合冰水浴法建立痰瘀互结动物模型。予高脂饲料喂饲 4 周, 高脂饲料配方: 6% 蔗糖, 1% 谷氨酸钠, 5% 蛋黄粉, 8% 花生油, 1.5% 胆固醇, 0.4% 甲基硫氧嘧啶, 78.1% 基础饲料。第 15 天开始大鼠分别放置在 0 ~ 1 ℃ 冰水中每天 20 min, 连续进行 2 周冰水浴。造模方法见图 1。

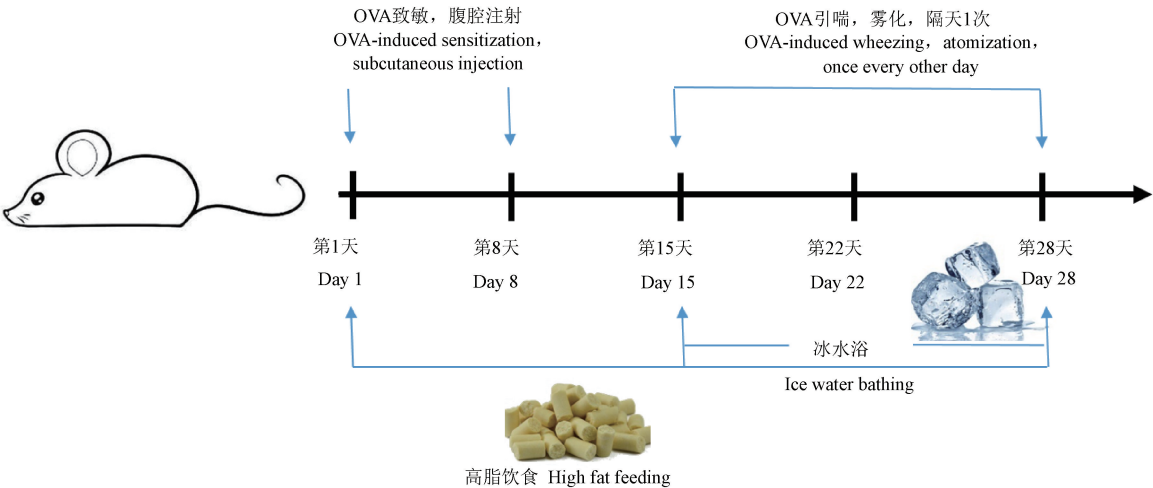


图 1 痰瘀互结证哮喘大鼠造模方法示意图

Figure 1 Model building diagram of asthma rat model with phlegm and blood stasis syndrome

1.2.2 给药方法

引喘开始后, 正常组及哮喘模型组灌服生理盐水(10 mL/kg), 地塞米松组及哮喘六味合剂组分别经口灌胃给予地塞米松混悬液(0.32 mg/kg)和哮喘六味合剂(10 mL/kg)。各组给药从引喘开始后进行, 每天给药 1 次, 共给药两周。地塞米松组及咳

喘六味合剂组大鼠给药量参考徐叔云主编的《药理实验方法学》^[13], 其中人和大鼠的体表面积折算等效剂量比值为 0.018, 大鼠体重按 170 g 计, 人体重按 60 kg 计, 则大鼠较人单位体重等效剂量折算系数为 6.3。大鼠给药量分别为 0.32 mg/kg 及 10 mL/kg。

1.2.3 样本处理

禁食 12 h 后经腹腔注射 3% 的戊巴比妥钠 50 mg/kg 进行麻醉。经大鼠腹主动脉取血,供炎症因子、血糖、血脂、凝血功能、全血粘度检测。动物安乐死后取右肺上叶组织置于 4% 多聚甲醛中固定,备病理组织学检测。

1.2.4 血清炎症因子检测

采用酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒检测血清 IL-4、IL-6、TGF- β 1 的含量。

1.2.5 肺部病理形态观察

肺组织脱水,石蜡包埋,切成 5 μ m 石蜡切片。HE 染色后在显微镜下找到完整肺内支气管横断面,进行肺组织病理学观察。

1.2.6 气道反应性测定

大鼠气道反应性通过 Buxco 公司 WBP 系统进行测定。末次激发后,将大鼠依次放在密封的体积描记器内,适应稳定 5 min,随后用乙酰甲胆碱(methacholine, Mch)激发,浓度依次为 0、3.125、6.25、12.5、25 和 50 mg/mL,记录各浓度下的气道阻力(enhance pause, Penh)值。

1.2.7 血液生化及凝血功能、全血粘度指标检测

腹主动脉取血 4 mL, 3500 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下低温离心 20 min,移取上清入离心管,进行血糖、血脂检测。另取 2 mL 血于枸橼酸钠抗凝采血管中,供凝血功能指标检测。取血 3 mL 于肝素钠抗凝采血管中,供全血黏度(whole blood viscosity, WBV)测定。以上指标由上海中医药大学药物安全评价研究中心进行检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件作单因素方差分析,各组数据先进行方差齐性检验,不满足方差齐性的多组比较选择 Tamhane's T^2 检验。以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

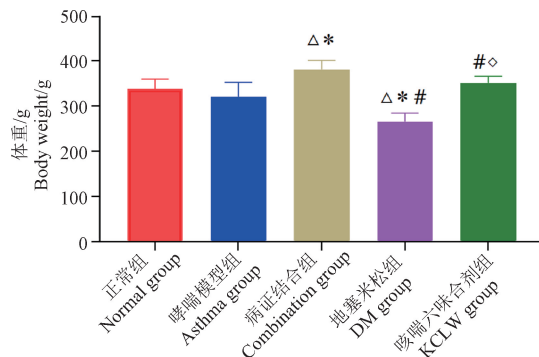
2 结果

2.1 动物一般情况及行为学观察

与正常组大鼠相比,哮喘模型组大鼠造模后体重无明显差异;病证结合组大鼠体重较正常组、哮喘模型组升高($P < 0.05$);地塞米松组大鼠体重较其余各组均下降($P < 0.05$);咳喘六味合剂组大鼠体重较病证结合组下降($P < 0.05$)。见图 2。

哮喘模型组、病证结合组大鼠经 OVA 雾化激发后,出现呼吸急促、张口喘息、腹部翕动、烦躁不安、

易激惹等现象;病证结合组大鼠在造模后出现畏寒肢颤、蜷缩、活动减少、大便溏薄,肛周不洁的表现,同时尾部出现紫色瘀斑、爪甲颜色紫暗;咳喘六味合剂组与病证结合组大鼠相比,上述行为学改变及痰瘀表现均有减轻。



注:与正常组相比, $\Delta P < 0.05$;与哮喘模型组相比, $* P < 0.05$;与病证结合组相比, $\# P < 0.05$;与地塞米松组相比, $\diamond P < 0.05$ 。(下同)

图 2 各组大鼠造模后体重变化图($n = 12$)

Note. Compared with normal group, $\Delta P < 0.05$. Compared with asthma group, $* P < 0.05$. Compared with combination group, $\# P < 0.05$. Compared with DM group, $\diamond P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 Body weight of rats in different groups($n = 12$)

2.2 病理形态观察

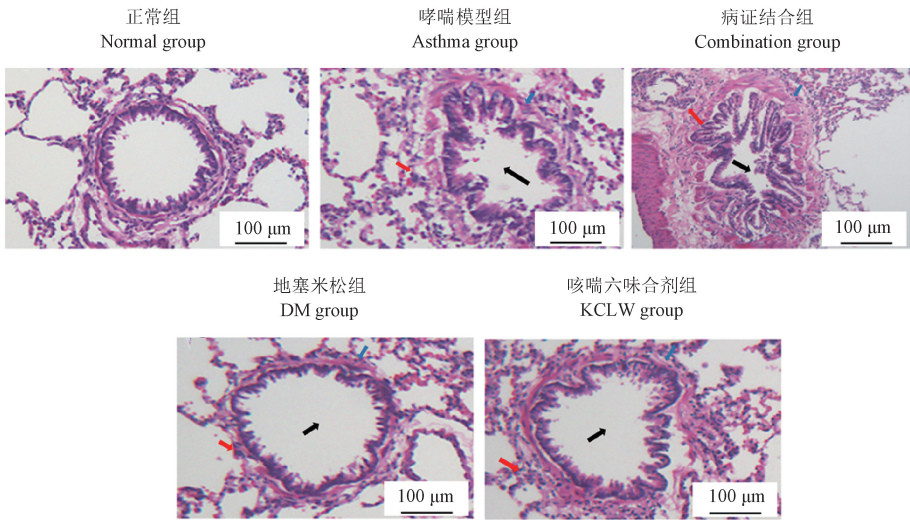
正常组支气管黏膜上皮排列整齐完整,管壁无明显增厚,管腔无收缩,未见明显炎性细胞浸润;哮喘模型组支气管黏膜上皮排列欠整齐,管壁增厚,气道挛缩明显,气道周围炎症细胞浸润增多;病证结合组支气管黏膜上皮排列紊乱,局部脱落,基底膜增厚,管腔狭窄,大量炎性细胞浸润,毛细血管充血;地塞米松组管腔挛缩和炎症细胞浸润较模型组明显减轻;咳喘六味合剂组管壁增厚、炎症细胞浸润较病证结合组减轻,腔内有少量上皮细胞和炎性细胞。见图 3。

2.3 炎症指标检测

哮喘模型组、病证结合组血清中 IL-4、IL-6、TGF- β 1 较正常组均上升($P < 0.05$);地塞米松组、咳喘六味合剂组 IL-4、IL-6、TGF- β 1 较哮喘模型组、病证结合组均有下降($P < 0.05$);咳喘六味合剂组各炎症因子水平与地塞米松组比较无明显差异($P > 0.05$)。见图 4。

2.4 气道高反应性测定

与正常组相比,哮喘模型组及病证结合组在不同浓度 Mch 激发后均表现出 Penh 值增高($P <$



注: 黑色箭头: 管腔狭窄情况; 蓝色箭头: 管壁增厚情况; 红色箭头: 炎症浸润情况。

图 3 各组大鼠肺组织病理形态观察

Note. Black arrow. Narrowing of the bronchial lumen. Blue arrow. Thickening of the bronchial wall. Red arrow. Infiltration of inflammation.

Figure 3 Observation of pathological morphology of rat lung tissue in different groups

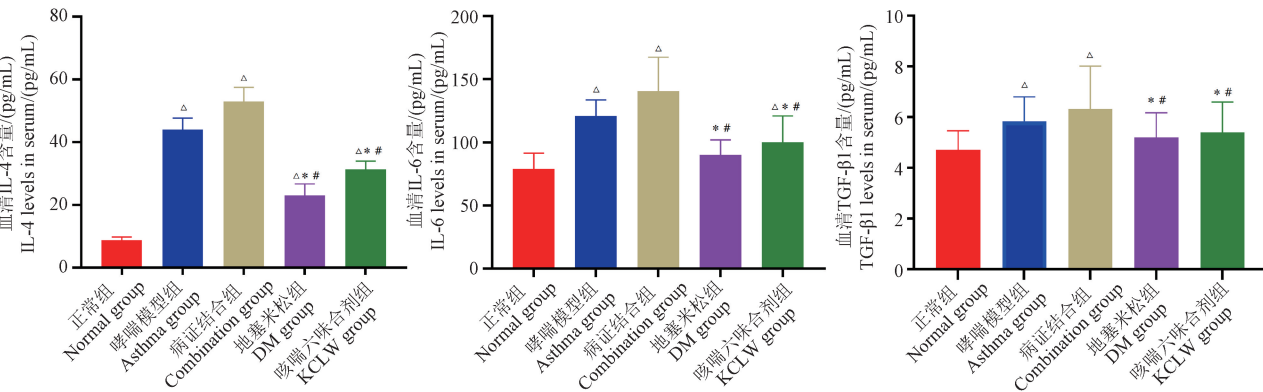


图 4 各组大鼠血清炎症因子含量比较($n = 12$)

Figure 4 Comparison of serum inflammatory factor levels in different groups($n = 12$)

0.05); 地塞米松组、哮喘六味合剂组在 Mch 激发浓度大于等于 6.25 mg/mL 时, Penh 值较哮喘模型组、病证结合组降低 ($P < 0.05$); 与地塞米松组比较, 哮喘六味合剂组在各浓度 Mch 激发后 Penh 值无明显差异 ($P > 0.05$)。见图 5。

2.5 血糖检测

造模后哮喘模型组与正常组比较, 血糖无明显差异 ($P > 0.05$); 病证结合组较正常组、哮喘模型组血糖升高 ($P < 0.05$), 说明该造模方法可提高哮喘大鼠血糖水平, 结合大鼠体重上升、便溏、肛周不洁等表现, 表明痰湿证模型建立成功; 地塞米松组血糖较病证结合组没有明显差异 ($P > 0.05$); 哮喘六味合剂组血糖较病证结合组下降 ($P < 0.05$)。见图 6。

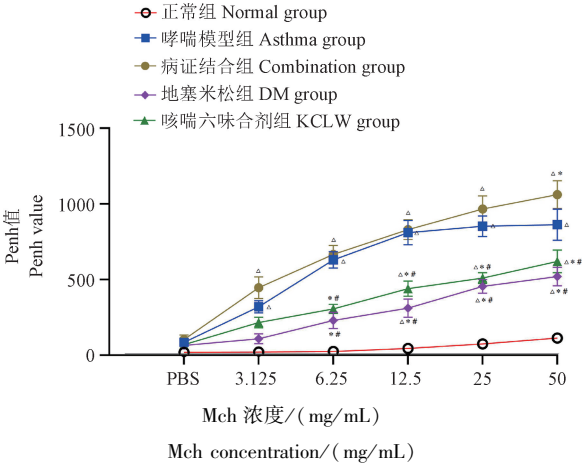


图 5 不同浓度 Mch 对各组大鼠 Penh 值的影响($n = 12$)

Figure 5 Effect of different concentrations of Mch on the Penh values in different groups($n = 12$)

2.6 血脂检测

造模后哮喘模型组大鼠与正常组大鼠比较,总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 无明显差异 ($P > 0.05$)。病证结合组 TC、TG 较正常组、哮喘模型组升高 ($P < 0.05$)。地塞米松组 TC、TG 与病证结合组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。咳喘六味合剂组 TC、TG 较病证结合组均下降 ($P < 0.05$)。提示该造模方法可提高哮喘大鼠 TC、TG 水平。见图 7。

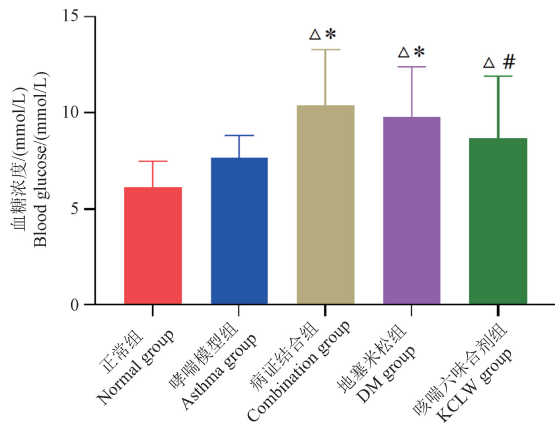


图 6 各组大鼠血糖比较 ($n = 12$)

Figure 6 Comparison of blood glucose in different groups ($n = 12$)

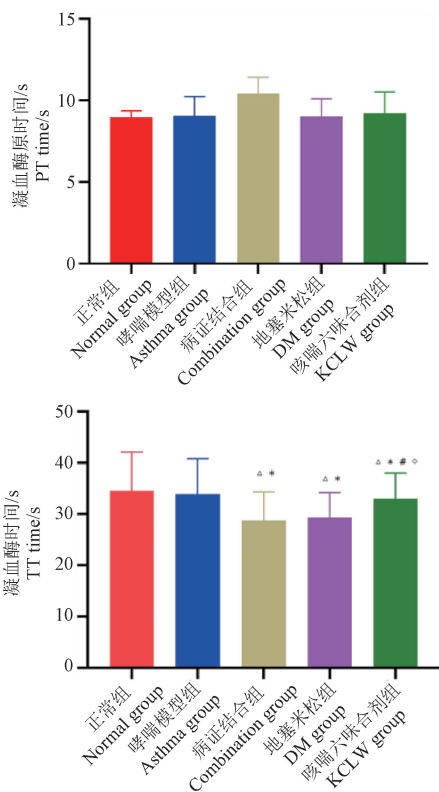


图 8 各组大鼠凝血功能指标比较 ($n = 12$)

Figure 8 Comparison indexes in different groups ($n = 12$)

2.7 凝血功能指标检测

各组大鼠在凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 指标上与正常组大鼠相比无明显差异。病证结合组凝血酶时间 (thrombin time, TT) 较正常组、哮喘模型组缩短 ($P < 0.05$), 地塞米松组 TT 与病证结合组比较未见明显差异 ($P > 0.05$), 咳喘六味合剂组 TT 较病证结合组下降 ($P < 0.05$)。病证结合组纤维蛋白原含量 (fibrinogen,

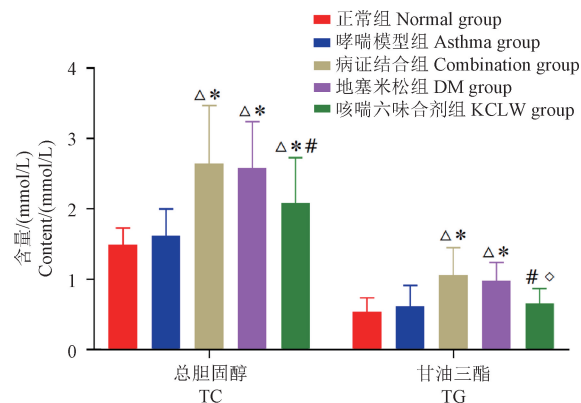
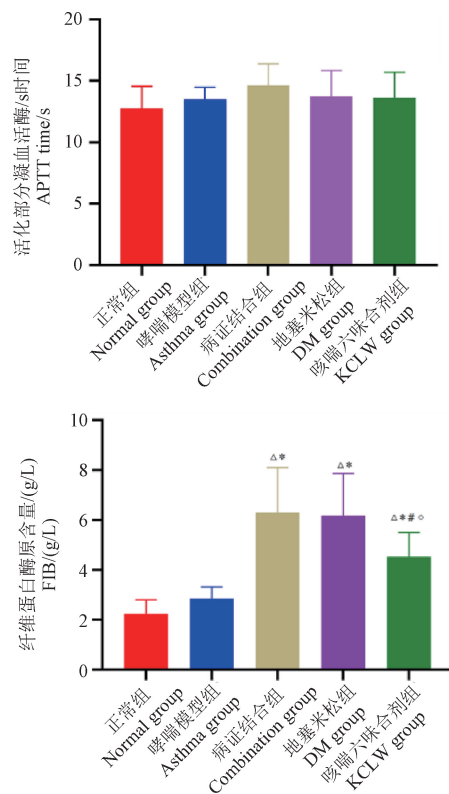


图 7 各组大鼠血脂比较 ($n = 12$)

Figure 7 Comparison of TC and TG in different groups ($n = 12$)



FIB)较正常组、哮喘模型组升高($P < 0.05$),地塞米松组 FIB 与病证结合组比较未见明显差异($P > 0.05$)。咳喘六味合剂组 FIB 较病证结合组下降($P < 0.05$)。表明痰瘀互结组哮喘大鼠凝血时间缩短,凝血功能异常增强,处于血凝血瘀状态。见图 8。

2.8 血液流变学指标检测

与正常组大鼠比较,哮喘模型组在低、中、高切变率下 WBV 无明显变化($P > 0.05$);病证结合组大鼠在低、中、高切变率下 WBV 均较正常组升高($P < 0.05$),表明病证结合组大鼠出现了血液黏滞,微循环功能障碍等表现,结合畏寒肢颤、蜷缩、活动减少、尾部出现紫色瘀斑、爪甲颜色紫暗等现象,表明血瘀模型复制成功。地塞米松组在低、中、高切变率下 WBV 较病证结合组无明显变化($P > 0.05$);咳喘六味合剂组在低、中、高切变率下 WBV 较病证结合组下降($P < 0.05$)。见图 9。

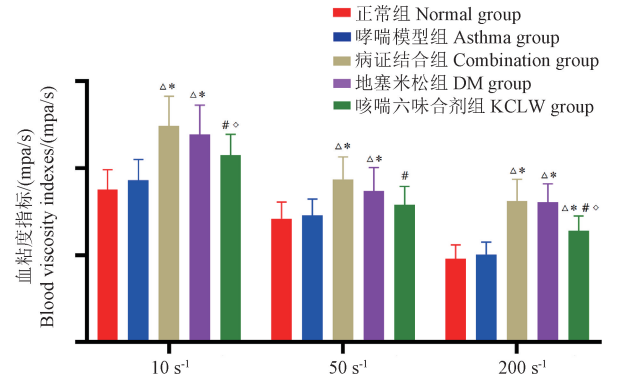


图 9 各组大鼠全血黏度比较($n = 12$)
Figure 9 Comparison of hemorheology indexes in different groups($n = 12$)

3 讨论

病证结合的动物模型能更好的反应不同证型下疾病的真实状态,更加符合中医药研究特点,因此成为中医实验动物模型发展的新方向^[14]。在中医学病因理论指导下复制证候模型,结合现代医学理论与实验动物知识复制疾病模型,因此得到的动物模型同时具备疾病和证候特征。

哮喘分为过敏性哮喘、感染性哮喘、职业性哮喘、肥胖哮喘、中性粒细胞性哮喘、难治性哮喘、激素抵抗性哮喘等不同类型的,模拟不同的病因所采用的哮喘造模常用试剂有 OVA、屋尘螨、血小板活性因子、呼吸道合胞病毒、脂多糖、直径小于 2.5 μm 的细颗粒物(PM_{2.5})等^[15-22]。目前对过敏性哮喘的研究最为广泛,在过敏性哮喘模型建立中应用 OVA

作为过敏原诱导哮喘的方法^[23-24]最为成熟,该模型的制备分为致敏和激发两个步骤,首先通过腹腔注射 OVA 和佐剂(氢氧化铝)使动物对 OVA 产生免疫应答,继而通过雾化或鼻腔滴注诱发过敏反应,模拟哮喘的病理特征。本次研究采用 OVA 对 SD 大鼠进行腹腔注射致敏并通过 OVA 雾化激发,来复制哮喘大鼠模型。造模后动物在行为学上出现哮喘样改变,另外通过血清炎症指标检测、气道高反应测定、肺部病理形态观察分别评价哮喘模型的气道炎症、气道高反应性、气道重塑等情况,结果提示哮喘疾病模型建立成功。

在痰瘀互结证的造模过程中,通过“过食肥甘”成痰的造模方法目前得到广泛采用^[25],本次造模过程中以高脂饲料喂养大鼠 2 周模拟饮食不节,通过过食肥甘厚味导致动物脾胃失健、聚湿成痰;本实验中采取对大鼠进行冰水浴的方法建立血瘀模型,因寒邪侵袭机体可引起体内血行不畅、血脉不通、血液瘀滞。同时,痰、瘀病理产物又可成为新的致病因素,彼此互为因果,加重痰瘀状态。造模后大鼠出现寒颤、蜷缩少动、爪甲紫暗,尾部可见紫黑瘀斑、体重上升、便溏,肛周不洁等表现,表明痰瘀互结证形成,结合检测指标中血糖、血脂升高,凝血功能及血黏度异常,从微观层面^[26-28]证实了痰瘀互结证形成的客观性。

“有是证,用是方”。以方测证就是依据方剂产生的实际功效来反证方药所对应治疗证候的属性^[29]。本研究中采用龙华医院院内制剂咳喘六味合剂作为以方测证关键药物。咳喘六味合剂遵循哮喘痰瘀病机,临床疗效显著^[30]。方中麻黄、附子、细辛均为温热性质药物,可以散太阳表寒,又可温少阴真阳,三药合用达到温肾补火、温化寒痰、宣肺平喘之功;方中取桃仁活血祛瘀,止咳平喘之功效,以解哮喘痰瘀之宿根;另用虎耳草、黄芩平衡药性,防止病机转化;诸药合用起到化痰祛瘀、解痉平喘的作用。因此本方能够有效针对实验中的痰瘀病因进行对症治疗。本次实验中观察到咳喘六味合剂可以有效改善大鼠哮喘及痰瘀互结症状,且在血糖、血脂、凝血功能、血液流变学的部分指标(TG、TC、TT、FIB、WBV)的改善方面优于地塞米松组,从中医证候治疗方面反证痰瘀互结证哮喘大鼠模型成立。

本实验通过 OVA 诱导及高脂饮食联合冰水浴法建立痰瘀互结证哮喘大鼠模型,通过行为学观

察、指标检测、以方测证的方法综合评价该病证结合模型,该模型建立及评价方法符合中医对证候的认识特点,为研究哮喘痰瘀互结证的本质及药物治疗干预机制提供了一种实用动物模型。但本次造模过程所模拟的极端病因条件下形成的病证结合模型与人体长期暴露在致病条件下所发生的中医疾病的证候表现仍有一定区别^[31]。只有贴近临床,不断挖掘完善模型的干预因素、指标评价体系,才能建立更加接近中医临床实际的病证结合动物模型^[32]。

参 考 文 献(References)

- [1] 王永炎,严世芸. 实用中医内科学 [M]. 上海:上海科学技术出版社; 2009.
- WANG Y Y, YAN S Y. Practical traditional chinese internal medicine [M]. Shanghai: Science and Technology Press; 2009.
- [2] 张雪琳,王培育. 探讨哮喘之宿根 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2024, 22(5): 35-37.
- ZHANG X L, WANG P Y. Discussion on the perennial roots of asthma [J]. Chin Med Mod Distance Educ Chin, 2024, 22(5): 35-37.
- [3] 高伟,苏惠萍. 从“宿根”理论辨治支气管哮喘缓解期的思路 [J]. 现代中医临床, 2016, 23(2): 58-60.
- GAO W, SU H P. Thoughts on differentiation and treatment of bronchial asthma in remission stage from the theory of “perennial root” [J]. Mod Chin Clin Med, 2016, 23(2): 58-60.
- [4] 裘生梁,徐俐颖,鲁建锋. 论脾虚为支气管哮喘之“宿根” [J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(3): 154-156.
- QIU S L, XU L Y, LU J F. Spleen deficiency as the “persistent root” of bronchial asthma [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med, 2009, 19(3): 154-156.
- [5] 曹丽芳,廖丽,金朝晖. 试从中医体质角度论哮喘“宿根” [J]. 中医药临床杂志, 2020, 32(8): 1427-1429.
- CAO L F, LIAO L, JIN Z H. Discussion on asthma’s “perennial root” from the perspective of TCM constitution [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2020, 32(8): 1427-1429.
- [6] 高广飞. 浅议哮喘宿痰伏肺说 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 219.
- GAO G F. On the theory of asthma with stagnation of phlegm and stagnation of lung [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2008, 19(1): 219.
- [7] 喻强强,薛汉荣,赵英杰,等. 支气管哮喘气道重塑与“痰瘀伏肺”的相关性研究 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7): 2148-2152.
- YU Q Q, XUE H R, ZHAO Y J, et al. Correlation research between bronchial asthma airway remodeling and “phlegm and blood stasis in lung” [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 29(7): 2148-2152.
- [8] 屈会化,赵琰,王庆国. 自发性疾病动物模型的中医证候特征辨析思路与方法 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(12): 2506-2508.
- QU H H, ZHAO Y, WANG Q G. Thinking train and method in differentiate and analyse research of spontaneously disease animal model with the characteristic of Chinese medical syndrome [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2007, 25(12): 2506-2508.
- [9] 孙艳珍,黄正团. 病证结合动物模型研究的现状及思考 [J]. 中医药导报, 2017, 23(23): 8-12.
- SUN Y Z, HUANG Z T. Current situation and thinking of animal model of disease and syndrome [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 23(23): 8-12.
- [10] PERRY M W D, BJÖRHALL K, BOLD P, et al. Discovery of AZD8154, a dual PI3Kγδ inhibitor for the treatment of asthma [J]. J Med Chem, 2021, 64(12): 8053-8075.
- [11] 王文丽,李冬梅,施雷. 咳嗽变异性哮喘病证结合动物模型的建立和评价 [J]. 中医药导报, 2016, 22(7): 24-27, 35.
- WANG W L, LI D M, SHI L. Establishment and evaluation on the animal model of phlegm accumulating and blood stasis in cough variant asthma [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 22(7): 24-27, 35.
- [12] 成秀梅,杜惠兰,李丹. 寒凝血瘀证动物模型的创建 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(8): 604-605.
- CHENG X M, DU H L, LI D. Establishment of syndrome model of blood stasis due to cold accumulation in rats [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2005, 11(8): 604-605.
- [13] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社; 2002.
- XU S Y. Methodology of pharmacological experiment [M]. Beijing: People’s education press; 2002.
- [14] 康洁,高碧珍. 病证结合动物模型研究概况 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(11): 2357-2359.
- KANG J, GAO B Z. The survey of combination of syndrome with disease animal model [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2009, 27(11): 2357-2359.
- [15] 李泳兴,钟鸣,王勇,等. 常用哮喘动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 97-101.
- LI Y X, ZHONG M, WANG Y, et al. Establishment of common animal models of asthma [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 97-101.
- [16] KHUMALO J, KIRSTEIN F, SCIBIOREK M, et al. Therapeutic and prophylactic deletion of IL-4Ra-signaling ameliorates established ovalbumin induced allergic asthma [J]. Allergy, 2020, 75(6): 1347-1360.
- [17] MACK S, SHIN J, AHN Y, et al. Age-dependent pulmonary reactivity to house dust mite allergen: a model of adult-onset asthma? [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2019, 316(5): L757-L763.
- [18] MUÑOZ-CANO R M, CASAS-SAUCEDO R, VALERO SANTIAGO A, et al. Platelet-activating factor (PAF) in allergic rhinitis: clinical and therapeutic implications [J]. J Clin Med, 2019, 8(9): 1338.
- [19] HAN M, RAJPUT C, ISHIKAWA T, et al. Small animal models of respiratory viral infection related to asthma [J]. Viruses,

- 2018, 10(12): 682.
- [20] KIM S R, KIM D I, KANG M R, et al. Endoplasmic reticulum stress influences bronchial asthma pathogenesis by modulating nuclear factor κ B activation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(6): 1397–1408.
- [21] LIU J, LIU L, SUN J, et al. Icariin protects hippocampal neurons from endoplasmic reticulum stress and NF- κ B mediated apoptosis in fetal rat hippocampal neurons and asthma rats [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1660.
- [22] ZHENG X Y, TONG L, SHEN D, et al. Airborne bacteria enriched PM_{2.5} enhances the inflammation in an allergic adolescent mouse model induced by ovalbumin [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 32–43.
- [23] GREGORCZYK I, MAŚLANKA T. Blockade of RANKL/RANK and NF- κ B signalling pathways as novel therapeutic strategies for allergic asthma: a comparative study in a mouse model of allergic airway inflammation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 879: 173129.
- [24] 袁丽粉, 乔建瓒, 王健. 建立小鼠哮喘模型两种不同方法的比较 [J]. *医学研究杂志*, 2017, 46(8): 132–134, 138.
YUAN L F, QIAO J O, WANG J. Comparison of two different methods of establishment of mouse asthma model [J]. *J Med Res*, 2017, 46(8): 132–134, 138.
- [25] 齐妹博, 张哲. 痰瘀证动物模型研究进展 [J]. *实用中医内科杂志*, 2022, 36(7): 36–38.
QI S B, ZHANG Z. Research progress on animal model of phlegm and blood stasis syndrome [J]. *J Pract Tradit Chin Intern Med*, 2022, 36(7): 36–38.
- [26] 叶泰玮, 田瑞, 丁志远, 等. 红花-桃仁配伍对寒凝血瘀模型大鼠血液流变学的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(10): 2392–2394.
YE T W, TIAN R, DING Z Y, et al. Effect of safflower-peach kernel compatibility on hemorheology in cold blood stasis model rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2023, 34(10): 2392–2394.
- [27] 李奇恒, 苏继源, 丁茹, 等. 痰瘀同治方药对高脂血症小鼠脂质代谢的调节作用及机制研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2017, 15(6): 663–666.
LI Q H, SU J Y, DING R, et al. Effects of tanyu tongzhi prescription on lipid metabolism in hyperlipidemic mice and its mechanisms [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2017, 15(6): 663–666.
- [28] 朱晓宁, 汪静, 郑丁, 等. 非酒精性脂肪性肝病痰瘀互结证大鼠模型的构建及评价 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(22): 1953–1956.
ZHU X N, WANG J, ZHENG D, et al. Construction and evaluation of rat model of nonalcoholic fatty liver disease with intermingled phlegm and blood stasis syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 58(22): 1953–1956.
- [29] 唐仕欢, 杨洪军, 黄璐琦. “以方测证”方法应用的反思 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2007, 27(3): 259–262.
TANG S H, YANG H J, HUANG L Q. Rethinking on application of “syndrome differentiation through formula effect assessment” [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2007, 27(3): 259–262.
- [30] 邹璐, 方泓, 吴银根. 咳喘六味合剂对寒哮型支气管哮喘患者外周血表达谱影响及相关基因实验验证 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(11): 143–147.
ZOU L, FANG H, WU Y G. Effects of kechuan Liuwei mixture on expression profile of peripheral blood in patients suffering asthma of cold type and experimental researches on the related genes [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2017, 19(11): 143–147.
- [31] 马聪玲, 王永刚, 郑刚. 痰瘀互结型冠心病动物模型建立方法研究概况 [J]. *实用中医内科杂志*, 2015, 29(11): 179–181.
MA C L, WANG Y G, ZHENG G. Phlegm and blood stasis mutual junction of coronary heart disease animal model establishment method [J]. *J Pract Tradit Chin Intern Med*, 2015, 29(11): 179–181.
- [32] 任志鑫, 王雨, 张冰, 等. 代谢性疾病病证结合动物模型的探讨与思考 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(7): 897–908.
REN Z X, WANG Y, ZHANG B, et al. Animal models combining disease and syndromes related to metabolic diseases [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(7): 897–908.

[收稿日期] 2024-05-13