

补气通窍方对免疫球蛋白A肾病大鼠肠道菌群及免疫平衡的调节作用研究^Δ

徐锦江^{1*}, 张 曼², 吴秋烨¹, 桂雄斌^{3#} (1. 广西中医药大学研究生院, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学第一附属医院科研部, 南宁 530023; 3. 广西中医药大学第一附属医院耳鼻喉科, 南宁 530023)

中图分类号 R965; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)20-2512-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.20.05



摘要 目的 基于“异病同治”理论探讨补气通窍方对免疫球蛋白A肾病(IgAN)大鼠肠道菌群及免疫平衡的调节作用。方法 将雄性SD大鼠随机分为空白组(Normal组)和造模组。造模组大鼠以灌胃牛血清白蛋白+皮下注射四氯化碳和蓖麻油混合液+尾静脉注射脂多糖的方式构建IgAN大鼠模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组(Model组)、补气通窍方低剂量组(BQTQ-L组)、补气通窍方高剂量组(BQTQ-H组)、阳性对照组(BZP组), 每组15只。BZP组灌胃盐酸贝那普利10 mg/kg, BQTQ-L组、BQTQ-H组大鼠分别灌胃补气通窍方9.81、19.62 g/kg(以生药量计), Normal组和Model组大鼠灌胃等体积生理盐水, 每天1次, 连续8周。分别于实验第8、10、12、14、16周检测各组大鼠的24 h尿蛋白(24 h UTP)含量; 于末次给药后检测其血清肌酐(Scr)和血尿素氮(BUN)含量, 观察其肾组织病理改变和肾小球IgA免疫复合物沉积情况; 分析各组小鼠的肠道菌群变化情况和外周血辅助性T细胞17(Th17)、调节性T细胞(Treg)比例和二者比值(Th17/Treg)。结果 与Model组相比, BQTQ-L组、BQTQ-H组大鼠肾小球系膜细胞增生和基质增生均有所减轻, 炎症细胞浸润减少; 其24 h UTP含量(BQTQ-L组第14、16周, BQTQ-H组第12、14、16周), Scr、BUN含量, IgA阳性区域荧光强度, 厚壁菌门的相对丰度, Th17比例, Th17/Treg均显著降低($P < 0.05$); Chao1指数、Observed species指数、Shannon指数、Simpson指数(BQTQ-H组除外), 拟杆菌门的相对丰度和Treg比例均显著升高($P < 0.05$); 差异微生物包括c_Clostridia(BQTQ-L组vs. Model组)、g_Ruminococcus(BQTQ-H组vs. Model组)等。结论 补气通窍方可能通过调控肠道菌群稳态和Th17/Treg免疫平衡来缓解IgAN大鼠肾损伤, 发挥肾脏保护作用。

关键词 补气通窍方; 免疫球蛋白A肾病; 肠道菌群; 免疫平衡; 异病同治

Study on the regulatory effects of Buqi tongqiao formula on intestinal flora and immune balance in IgA nephropathy rats

XU Jinjiang¹, ZHANG Man², WU Qiuye¹, GUI Xiongbin³ (1. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Dept. of Scientific Research, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 3. Dept. of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the regulatory effects of Buqi tongqiao formula on intestinal flora and immune balance in immunoglobulin A nephropathy (IgAN) rats based on the theory of “treating different diseases with the same therapy”. **METHODS** Male SD rats were randomly assigned to the Normal group and the modeling group. IgAN rat models were established in the modeling group by intragastric administration of bovine serum albumin, subcutaneous injection of carbon tetrachloride and castor oil mixture, and tail vein injection of lipopolysaccharide. Successfully modeled rats were then randomly divided into the model group (Model group), Buqi tongqiao formula low-dose group (BQTQ-L group), Buqi tongqiao formula high-dose group (BQTQ-H group), and positive control group (BZP group), with 15 rats in each group. BZP group received intragastric administration of benazepril hydrochloride (10 mg/kg), while BQTQ-L and BQTQ-H groups were given Buqi tongqiao formula at doses of 9.81 and 19.62 g/kg (calculated as raw herb weight), respectively. The Normal group and the Model group received an equal volume of normal saline intragastrically, once a day, for 8 consecutive weeks. The 24-hour urinary total protein (24 h UTP) contents were measured at weeks 8, 10, 12, 14 and 16 of the experiment.

Δ 基金项目 国家自然科学基金地区科学基金项目(No. 82460955); 广西中医药大学第一附属医院高水平中医药重点学科-中医康复学(No.2025013)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 内科病证的中医药防治。
E-mail: 2470155344@qq.com

通信作者 主任医师, 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 肾脏疾病的中西医结合防治。E-mail: GuiXB2008@163.com

After the last administration, serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) contents were detected. Renal histopathological changes and glomerular IgA immune complex deposition were examined. Additionally, alterations in gut microbiota composition, the proportions of peripheral T helper cell 17 (Th17) and regulatory T cell (Treg), as well as the

ratio of Th17 and Treg (Th17/Treg), were analyzed across all groups. **RESULTS** Compared with the Model group, rats in both BQTQ-L and BQTQ-H groups showed alleviated mesangial cell hyperplasia, reduced matrix expansion, and decreased IgA immune complex deposition in the glomeruli. The 24 h UTP contents (at weeks 14 and 16 in the BQTQ-L group; at weeks 12, 14 and 16 in the BQTQ-H group), Scr and BUN contents, IgA-positive area fluorescence intensities, relative abundances of Firmicutes, Th17 cell proportions, and Th17/Treg were significantly decreased in both BQTQ-L and BQTQ-H groups ($P<0.05$); while the Chao1, Observed species, Shannon, and Simpson (except for BQTQ-H group) indexes, the relative abundances of Bacteroidota, and the proportions of Treg were significantly increased ($P<0.05$). Differential microbiota included *c_Clostridia* (BQTQ-L group vs. Model group) and *g_Ruminococcus* (BQTQ-H group vs. Model group), etc. **CONCLUSIONS** Buqi tongqiao formula may alleviate renal injury and exert a renal protective effect in IgAN rats by modulating intestinal flora homeostasis and Th17/Treg immune balance.

KEYWORDS Buqi tongqiao formula; immunoglobulin A nephropathy; intestinal flora; immune balance; treating different diseases with the same therapy

免疫球蛋白A肾病(immunoglobulin A nephropathy, IgAN)是以肾小球系膜细胞增生、基质增多,伴IgA或以IgA为主的免疫复合物在系膜区沉积为特征的一类肾小球疾病,以反复发作性血尿、不同程度蛋白尿为主要临床表现,是全球范围内常见的原发性肾小球疾病^[1]。IgAN是导致患者终末期肾病的重要原因之一,给其家庭及社会带来沉重的经济负担^[2]。目前,血管紧张素转化酶抑制剂、皮质类固醇和免疫抑制剂等药物常被临床用于缓解IgAN患者的疾病进展,但这类药物长期使用可能增加患者感染、代谢紊乱的发生风险,且部分患者接受治疗后仍会进展为终末期肾病^[3]。可见,探寻一种有效、安全的IgAN治疗手段十分必要。

由肠道微生物群改变引起的黏膜免疫障碍已被证实是IgAN发病的关键诱导因素^[4]。研究指出,失调的肠道菌群可通过T细胞依赖性途径(细胞因子介导)和T细胞非依赖性途径[Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)连接]来促进初始B细胞向IgA抗体分泌细胞转换,从而介导IgAN的发生发展^[5],故靶向调节肠道菌群可能是缓解IgAN的潜在策略。

补气通窍方是广西中医药大学第一附属医院耳鼻喉科桂雄斌教授治疗变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)的经验方,由黄芪、党参、甘草、苍耳子、辛夷、细辛、荆芥、桔梗、鱼脑石、升麻、柴胡组方而成。本课题组在前期研究中发现,补气通窍方可通过调控辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)与调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)比值(Th17/Treg)来平衡免疫、改善肠道菌群,从而缓解同为免疫性疾病的AR^[6]。“异病同治”是中医理论辨证施治的重要体现,其核心在于针对不同疾病的相同病机进行治疗。研究指出,AR与IgAN均以正虚邪实、脏腑功能失调为基本病机,涉及肺、脾、肾三脏,治以益气固表、扶正祛邪,与补气通窍方益气固表、扶正祛邪的功效相契合^[7-8]。可见,该方具有改善IgAN的潜力。基于此,本研究以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和四氯化碳(CCl_4)联合诱导构建IgAN大鼠模型,基于“异病同治”

理论评估补气通窍方对IgAN大鼠的改善作用,并通过观察肠道菌群及T淋巴细胞亚群的变化来探讨该方的潜在作用机制,以期对补气通窍方“异病同治”科学内涵的阐释及其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括YJX20/1型循环煎药包装组合机(北京东华原医疗设备有限责任公司),BS-240VET型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),CytoFLEX S型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),BX63型正置荧光显微镜(日本Olympus公司),ASP300S型全自动组织脱水机(德国Leica公司),Histostar型组织包埋机、HM355S型病理切片机(美国Thermo Fisher Scientific公司),DP360型全自动封染一体机(深圳市达科为生物技术股份有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

黄芪、党参、荆芥、柴胡、桔梗、升麻、辛夷饮片均购自广西仙荣中药有限公司(批号分别为20240103、20240103、20240601、20240201、20240201、20231101、20240304),苍耳子、甘草饮片均购自广西万宝堂药业有限公司(批号分别为240304601、240300805),细辛饮片购自四川新荷花中药饮片股份有限公司(批号为2403101),鱼脑石饮片购自四川宏康源药业有限公司(批号为240301);上述饮片均由广西中医药大学第一附属医院药房采购,经该院药学部马家宝副主任药师鉴定,均为真品。

盐酸贝那普利片(阳性对照,批号0000077708,规格10 mg)购自浙江华海药业股份有限公司;BSA、LPS(批号分别为V900933、L2880)均购自美国Sigma-Aldrich公司; CCl_4 、蓖麻油(批号分别为C805332、69006811)均购自国药集团化学试剂有限公司;血清肌酐(serum creatinine, Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)检测试剂盒(批号分别为10500045700、10500045200)均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、尿蛋白检测试剂盒(批号分别为G1120、

BC5655)购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗鼠IgA多克隆抗体(批号bs-10491R)购自北京博奥森生物技术有限公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔IgG二抗(批号33107ES60)购自翌圣生物科技股份有限公司;FITC标记的抗大鼠CD3单克隆抗体(批号561801)购自美国BD公司;别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)/cyanine7标记的抗大鼠CD4抗体、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗大鼠CD25抗体、Alexa Fluor® 647标记的抗大鼠叉头框蛋白(forkhead box protein 3, FOXP3)抗体(批号分别为201518、202105、320014)均购自美国Bio-Legend公司;PerCP-eFluor 710标记的抗大鼠CD8a抗体、PE-cyanine7标记的抗大鼠白细胞介素17A(interleukin-17A, IL-17A)抗体、细胞刺激试剂盒(批号分别为46-0084-82、25-7177-80、00-4975-93)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠80只,体重180~200 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号SCXK(湘)2019-0001。所有大鼠均饲养于SPF级屏障环境(温度25℃,相对湿度50%~60%,每12 h光照/黑暗循环)内,自由摄食、饮水。本研究方案经过广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审核批准(批准编号DW20240319-060)。

2 方法

2.1 药液的制备

取黄芪、党参、甘草、苍耳子、辛夷、细辛、荆芥、桔梗、鱼脑石、升麻、柴胡(质量比20:12:12:6:10:2:15:10:10:3:9),混匀,加12倍量水浸泡30 min,武火煮沸后转文火煎煮60 min,过滤;药渣再次加12倍量水,同法煎煮,过滤;合并两次滤液,于50℃左右减压旋转蒸发,得质量浓度为3 g/mL(以生药量计)的浓缩液,于-20℃下保存,备用。

2.2 分组、造模与给药

取SD大鼠80只,适应性喂养1周后,随机分为空白组(Normal组,17只)和造模组(63只)。取造模组大鼠,按照相关文献^[9]方法并改进,构建IgAN大鼠模型:灌胃BSA溶液(以水为溶剂)400 mg/kg,隔天1次,持续8周+皮下注射CCl₄和蓖麻油混合液(体积比1:3)0.4 mL,每周1次,持续8周+尾静脉注射LPS[以磷酸盐缓冲液(PBS)为溶剂]0.05 mg,于第6、8周各注射1次。于第8周末,随机选取5只大鼠(Normal组2只,造模组3只)以免疫荧光法验证,若Normal组大鼠肾小球内未见或少见IgA免疫复合物沉积,而造模组大鼠肾小球内存在大量弥散性IgA免疫复合物沉积,则表明IgAN模型复制成功(具体操作见“2.7”项)。

将造模成功的大鼠随机分为模型组(Model组)、补气通窍方低剂量组(BQTQ-L组)、补气通窍方高剂量组

(BQTQ-H组)、阳性对照组(BZP组),每组15只。BQTQ-L组、BQTQ-H组大鼠分别灌胃补气通窍方9.81、19.62 g/kg(以生药量计,以生理盐水为溶剂;基于“异病同治”理论,分别以临床等效剂量及其2倍作为BQTQ-L组、BQTQ-H组的剂量);BZP组大鼠灌胃盐酸贝那普利10 mg/kg(以生理盐水为溶剂,剂量参考预实验及相关文献^[10]设置);Normal组和Model组大鼠灌胃等体积生理盐水;每天1次,连续8周。

2.3 样本收集

分别于实验第8、10、12、14、16周末,收集各组大鼠(禁食不禁水)的24 h尿液,备用。末次给药后,收集各组大鼠新鲜粪便,于-80℃下保存,备用。上述样品采集完成后,以腹腔注射2%戊巴比妥钠3 mg/kg麻醉各组大鼠,经腹主动脉采集血样,备用;取血后,将大鼠处死,摘取其双肾,取左侧肾脏对半切开后,置于4%多聚甲醛溶液中固定,备用。

2.4 24 h尿蛋白含量测定

取“2.3”项下各组6只大鼠各时间点的24 h尿液,采用尿蛋白试剂盒(比色法)检测24 h尿蛋白(24-hour urine total protein, 24 h UTP)含量。

2.5 血清Scr、BUN含量测定

取“2.3”项下各组6只大鼠的血样,于室温下静置2 h后,再于4℃下以3 500 r/min离心15 min,分离上层血清,采用全自动生化分析仪测定各组大鼠血清Scr及BUN含量。

2.6 肾组织病理观察

取“2.3”项下各组6只大鼠经4%多聚甲醛溶液固定48 h的肾组织,修剪至合适大小后置入组织包埋盒中,依次进行脱水、透明、浸蜡、包埋,以5 μm厚度进行连续切片,于45℃温水中摊片1~2 min,待切片完全展开后用防脱载玻片捞出,于98℃下烤片20 min后保存,备用。取切片,经常规脱蜡、脱水后,依次用苏木精、1%伊红溶液染色,再以中性树胶封片,使用显微镜观察大鼠肾组织形态学改变,并拍照保存。

2.7 肾小球IgA免疫复合物沉积情况检测

采用免疫荧光法检测。取“2.3”项下各组6只大鼠的肾组织适量,按“2.6”项下方法制备石蜡切片。取切片,经常规脱蜡至水后,加乙二胺四乙酸进行抗原修复,再以3%BSA于37℃下封闭1 h;滴加IgA一抗(稀释度为1:1 000),于4℃下避光孵育过夜(>8 h);以PBS洗涤3次,滴加相应IgG二抗(稀释度为1:100),于37℃下避光孵育2 h;以PBS洗涤3次,再以抗荧光淬灭封片液100 μL封片,使用荧光显微镜观察并采集图像,使用Image J软件分析各组大鼠肾小球内IgA阳性区域(呈绿色荧光)的荧光强度,用以反映IgA免疫复合物的沉积情况。

2.8 肠道菌群检测

取“2.3”项下各组6只大鼠的粪便样本,按照试剂盒说明书,通过吸附柱法纯化提取DNA,并扩增其16S rRNA V3+V4 可变区(341F、805R 的引物序列分别为5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'、5'-GACTACHVGG-GTATCTAATCC-3')。取所得PCR产物,构建微生物多样性测序文库,采用Illumina平台进行高通量测序,读取测序结果,并进行Alpha多样性分析、Beta多样性分析、物种组成分析和差异微生物分析。上述测序分析由杭州联川生物医药科技有限公司完成。

其中,Alpha多样性包括Chao1指数、Observed species指数、Shannon指数、Simpson指数,可反映样本肠道菌群的物种丰富度信息;Beta多样性分析包括主成分分析(principal component analysis,PCA)、主坐标分析(principal coordinate analysis,PCoA),可反映群落间物种组成的差异;物种组成以相对丰度为检测指标,以相对丰度排前3位的为优势菌群;通过组间群落差异(linear discriminant analysis effect size,LEfSe)分析,以线性判别分析(linear discriminant analysis,LDA)效应值(LDA阈值为3, $P<0.05$)筛选各组大鼠的肠道差异微生物^[11]。

2.9 外周血免疫平衡指标检测

取“2.3”项下各组3只大鼠的血样,进行抗凝处理。取抗凝全血样本200 μL,裂解红细胞;收集细胞,于37℃、5%CO₂下培养刺激4h;收集细胞,加入含CD4、CD25抗体的混合液(三者体积分别为2.5、0.5、2.0 μL),于4℃下避光孵育20 min,进行细胞表面标记;待破膜后,加入含FOXP3、IL-17A抗体的混合液(体积均为2.5 μL)进行胞内染色;采用流式细胞仪检测,FlowJo V10软件分析各组大鼠全血Th17、Treg比例(Th17以CD4、IL-17A标记,Treg以CD4、CD25、FOXP3标记),并计算Th17/Treg。

2.10 统计学方法

采用SPSS 26.0和GraphPad Prism 9.5软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25},P_{75})$ 表示,多组间比较采用Kruskal-Wallis检验,进一步两两比较采用Dunn检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 补气通窍方对IgAN大鼠24 h UTP含量的影响

与Normal组相比,Model组大鼠第8、10、12、14、16周的24 h UTP含量均显著升高($P<0.05$)。与Model组相比,各药物组大鼠24 h UTP含量均有所降低,其中BZP组和BQTQ-H组大鼠第12、14、16周以及BQTQ-L

组大鼠第14、16周的24 h UTP含量均显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

表1 补气通窍方对IgAN大鼠24 h UTP含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6, \text{mg}$)

组别	第8周	第10周	第12周	第14周	第16周
Normal组	101.59±9.69	116.76±26.50	115.44±25.60	112.77±20.84	109.57±18.33
Model组	357.65±78.35 ^a	456.73±125.02 ^a	472.42±149.30 ^a	500.64±59.77 ^a	533.73±49.19 ^a
BZP组	340.99±92.88	387.01±67.07	329.35±47.62 ^b	336.11±48.32 ^b	344.10±38.02 ^b
BQTQ-L组	356.02±58.57	410.07±66.67	379.54±48.74	368.63±47.95 ^b	354.35±71.86 ^b
BQTQ-H组	346.55±77.57	390.95±97.21	311.78±54.80 ^b	326.37±70.74 ^b	313.54±36.17 ^b

a:与Normal组相比, $P<0.05$;b:与Model组相比, $P<0.05$ 。

3.2 补气通窍方对IgAN大鼠血清Scr、BUN含量的影响

与Normal组相比,Model组大鼠血清Scr、BUN含量均显著升高($P<0.05$);与Model组相比,各药物组大鼠血清Scr、BUN含量均显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

表2 补气通窍方对IgAN大鼠血清Scr、BUN含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Scr/(μmol/L)	BUN/(mmol/L)
Normal组	62.50±13.14	8.15±1.88
Model组	89.83±10.91 ^a	12.70±2.15 ^a
BZP组	73.83±8.23 ^b	8.33±1.53 ^b
BQTQ-L组	72.33±9.65 ^b	9.65±1.49 ^b
BQTQ-H组	76.67±10.60 ^b	9.41±1.68 ^b

a:与Normal组相比, $P<0.05$;b:与Model组相比, $P<0.05$ 。

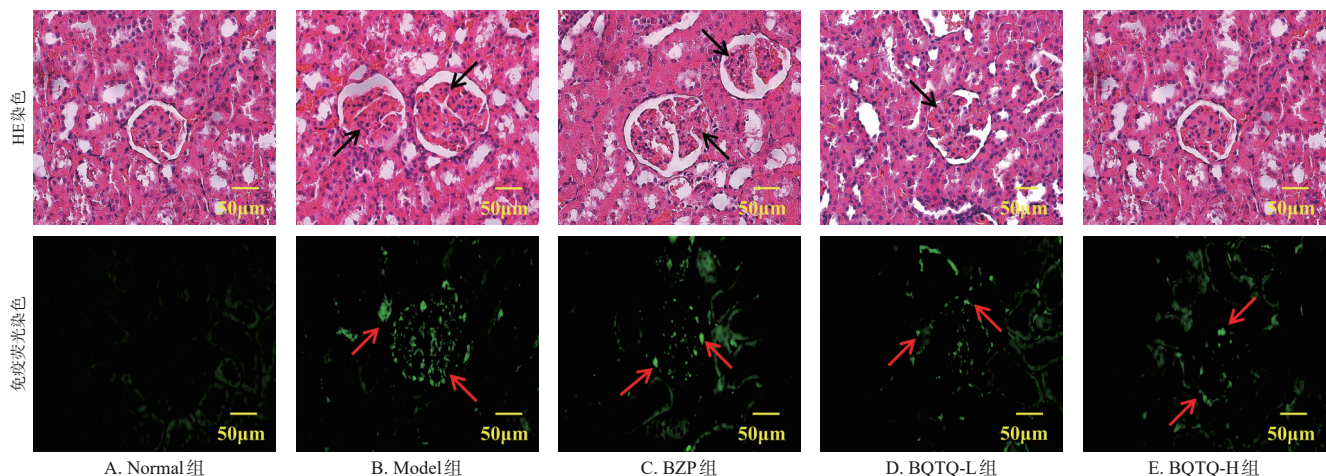
3.3 补气通窍方对IgAN大鼠肾组织病理损伤及IgA免疫复合物沉积的影响

HE染色结果显示,Normal组大鼠肾小球结构正常,细胞及基质均匀分布,未见明显异常;肾小管上皮细胞圆润、饱满,结构完整,未见萎缩或扩张;肾间质未见明显增生或炎症细胞浸润。与Normal组相比,Model组大鼠的肾小球系膜区出现明显的系膜细胞增生和基质增多;肾间质中可见大量炎症细胞浸润,伴肾小管萎缩、管腔狭窄闭缩。与Model组相比,各药物组大鼠肾小球系膜细胞增生和基质增生均有所减轻,肾小球形态基本正常;肾小管扩张程度减轻,炎症细胞浸润有不同程度减少,未见明显肾小管萎缩或坏死。免疫荧光染色结果显示,与Normal组(13.84±2.34)组相比,Model组大鼠肾小球系膜区、毛细血管壁IgA阳性区域的荧光强度(55.31±6.68)显著升高($P<0.05$)。与Model组相比,BZP组、BQTQ-L组、BQTQ-H组大鼠肾小球内IgA阳性区域有所缩小,其荧光强度(30.73±3.70、44.30±3.55、36.94±4.83)均显著降低($P<0.05$)。结果见图1。

3.4 补气通窍方对IgAN大鼠肠道菌群的影响

3.4.1 补气通窍方对肠道菌群Alpha多样性的影响

与Normal组相比,Model组大鼠的Chao1指数显著降低($P<0.05$)。与Model组相比,各药物组大鼠的Chao1指数、Observed species指数、Shannon指数(BZP组除外)、Simpson指数(BZP组、BQTQ-H组除外)均显著升高($P<0.05$)。结果见表3。



黑色箭头:肾小球系膜细胞增生;红色箭头:IgA免疫复合物沉积。

图1 补气通窍方对IgAN大鼠肾组织病理损伤及IgA免疫复合物沉积影响的显微图

表3 补气通窍方对IgAN大鼠肠道菌群Alpha多样性的影响[$M(P_{25}, P_{75}), n=6$]

组别	Chao1指数	Observed species指数	Shannon指数	Simpson指数
Normal组	818.79(666.58, 963.40)	630(557, 824)	5.57(4.80, 6.08)	0.95(0.89, 0.96)
Model组	537.40(508.33, 579.83) ^a	536(526, 558)	5.57(5.07, 6.31)	0.90(0.88, 0.93)
BZP组	732.40(672.50, 756.51) ^b	743(685, 831) ^b	6.48(6.37, 6.86)	0.92(0.91, 0.93)
BQTQ-L组	988.54(910.98, 1 016.98) ^b	881(788, 985) ^b	7.22(6.81, 7.55) ^b	0.97(0.96, 0.97) ^b
BQTQ-H组	729.50(633.99, 791.13) ^b	796(699, 1 017) ^b	6.72(6.22, 7.80) ^b	0.94(0.91, 0.95)

a: 与Normal组相比, $P<0.05$; b: 与Model组相比, $P<0.05$ 。

3.4.2 补气通窍方对肠道菌群Beta多样性的影响

Model组与Normal组、BZP组、BQTQ-L组、BQTQ-H组有所偏离,表明组间微生物组成结构有所差异;此外,BZP组、BQTQ-L组、BQTQ-H组与Normal组有所重叠,提示各药物组大鼠的肠道微生物组成结构与Normal组较为相似。结果见图2。

3.4.3 补气通窍方对肠道菌群物种组成的影响

在门水平(图3A)上,3种优势菌群分别为厚壁菌门Firmicutes、拟杆菌门Bacteroidota、放线菌门Actinobacteriota。与Normal组相比,Model组大鼠厚壁菌门的相对丰度有所升高($P>0.05$),而拟杆菌门的相对丰度显著降低($P<0.05$);与Model组相比,各药物组厚壁菌门的相对丰度均显著降低,而拟杆菌门的相对丰度均显著升高($P<0.05$);各组大鼠放线菌门的相对丰度相比,差异均无统计学意义($P>0.05$)。在属水平(图3B)上,3种优势菌群分别为乳杆菌属*Lactobacillus*、嗜黏液乳杆菌属*Ligilactobacillus*、单球菌属*Monoglobus*;各组大鼠上述菌群相对丰度相比,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3.4.4 补气通窍方对肠道差异微生物的影响

LEfSe分析结果显示,相较于Normal组,Model组的20种差异微生物包括*g_Clostridia_UCG-014_unclassified*、*o_Clostridia_UCG-014*、*f_Clostridia_UCG-014_unclassified*、*s_Clostridia_UCG-014_unclassified*等;与Model组相比,BZP组的18种差异微生物包括*f_Streptococcaceae*、*g_Streptococcus*、*s_Monoglobus_unclassified*等,BQTQ-L组的22种差异微生物包括*c_Clostridia*、*o_Os-*

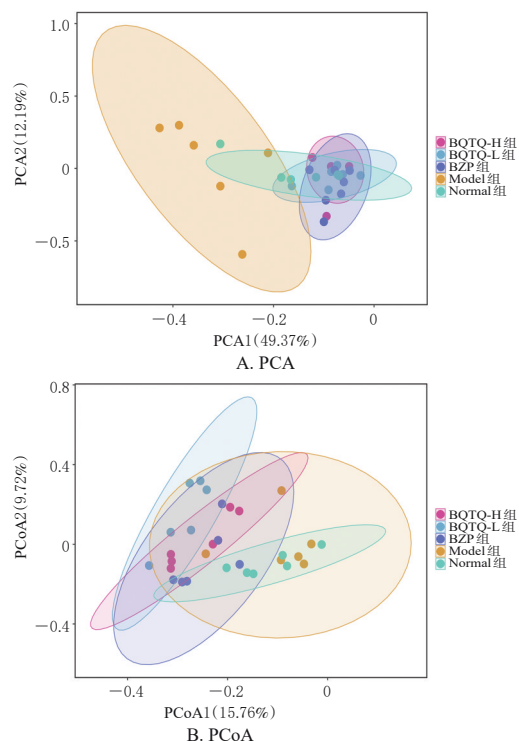
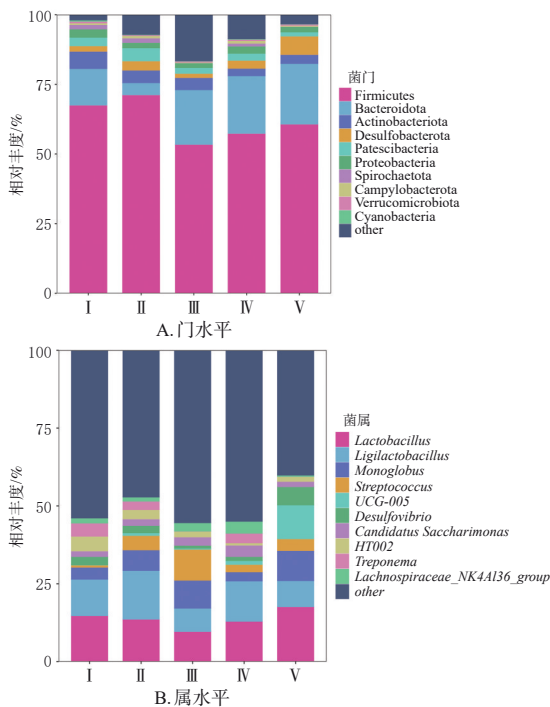


图2 补气通窍方对IgAN大鼠肠道菌群Beta多样性的影响

cillospirales、*o_Bacteroidales*等,BQTQ-H组的14种差异微生物包括*g_Ruminococcus*、*s_Ruminococcus_unclassified*、*f_Lachnospiraceae*等(限于篇幅,相关结果可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图1)。

3.5 补气通窍方对IgAN大鼠外周血免疫指标的影响

与Normal组相比,Model组大鼠外周血Th17比例、Th17/Treg均显著升高,Treg比例显著降低($P<0.05$)。与Model组相比,各药物组大鼠外周血Th17比例、Th17/Treg均显著降低,Treg比例均显著升高($P<0.05$)。结果见表4(限于篇幅,相关流式图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图2)。



I : Normal 组；II : Model 组；III : BZP 组；IV : BQTQ-L 组；V : BQTQ-H 组。

图3 补气通窍方对IgAN大鼠肠道菌群物种组成的影响

表4 补气通窍方对IgAN大鼠Th17/Treg免疫平衡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Th17比例/%	Treg比例/%	Th17/Treg
Normal组	0.32±0.03	16.56±0.72	0.019±0.003
Model组	1.32±0.18 ^a	7.04±0.24 ^a	0.188±0.032 ^a
BZP组	0.71±0.24 ^a	14.34±1.70 ^a	0.050±0.019 ^a
BQTQ-L组	0.89±0.14 ^a	11.51±1.77 ^a	0.078±0.009 ^a
BQTQ-H组	0.71±0.10 ^a	12.76±2.46 ^a	0.058±0.018 ^a

a: 与Normal组相比, $P<0.05$; b: 与Model组相比, $P<0.05$ 。

4 讨论

中医学并无“IgAN”这一病名,但可据其临床表现划为“水肿”“尿血”“尿浊”等范畴,若病情加重还可将其划入“癃闭”“关格”“虚劳”等范畴^[12]。该症病机责之于正虚邪盛,其中关键病因在于湿热浊邪,侵袭肺脾胃,继而损及肾脏,与肺、脾、肾功能失调相关^[13]。AR是一种由IgE介导的慢性鼻部炎症性疾病,属“鼻鼽”范畴,多由脏腑虚损、正气亏虚所致,其中脾肾虚弱、肺气不足、卫表不固为发病之关键^[14]。由此可见,二者的发病过程均与肺脾肾脏腑功能失调密切相关,有“异病同治”之基础。

补气通窍方是由黄芪、党参等11味中药组方而成的经验方,可用于AR的治疗。方中,黄芪可补脾益气、固表升阳,为君药;党参可健脾益肺,以助黄芪益气扶正;佐以细辛引药入肾,驱散肾中风寒;荆芥、桔梗、鱼脑石可清热解毒,散结排浊;升麻、柴胡可升阳举陷,助黄芪、党参固护中气;苍耳子、辛夷可祛风除湿通络;佐以甘草调和诸药;诸药合用,共奏益气固表、扶正祛邪之功^[6]。

本研究从“异病同治”理论出发,通过构建IgAN大鼠模型探析补气通窍方对IgAN的干预效果,结果显示,与模型组相比,补气通窍方降低了IgAN大鼠血清Scr、BUN含量。本研究还通过检测24 h UTP含量来评估了补气通窍方对IgAN大鼠疾病进展的影响,结果显示,自第12周起,高剂量的补气通窍方可有效减少大鼠尿蛋白的漏出;第14、16周,各剂量组大鼠24 h UTP含量均显著低于Model组,进一步证实了补气通窍方对IgAN的改善作用。病理损伤改善是评估IgAN治疗效果的另一项重要指标,本研究的HE染色结果显示,补气通窍方各剂量组大鼠的肾小球系膜细胞增生和基质增生均有所减轻,肾小管萎缩和扩张程度均有所降低,炎症细胞浸润明显改善,表明该方能显著缓解IgAN引起的肾脏病理损伤。研究指出,IgA免疫复合物可通过激活补体系统来引发炎症反应和细胞外基质沉积,进而导致肾小球硬化和肾功能衰竭^[1]。本研究的免疫荧光实验结果显示,补气通窍方可显著减少IgAN大鼠肾小球内的IgA免疫复合物沉积,从而减轻肾脏的免疫损伤、延缓疾病进展。

IgAN发病机制复杂,肠道菌群失调与Th17/Treg免疫失衡在IgAN的发生过程中具有协同作用,二者可通过复杂的免疫调节网络来共同促进疾病的进展^[11]。IgA免疫复合物在肾小球系膜中的沉积是IgAN的显著标志,当肠道菌群失调时,致病菌或其代谢产物可通过破坏肠道屏障而侵入循环系统,激活肠道黏膜的异常免疫反应,致使CD4⁺T细胞失调^[15]。Th17和Treg均来源于CD4⁺T细胞,肠道黏膜的异常免疫反应可进一步成为Th17/Treg免疫失衡的驱动因素:其中,Th17的过度分化可介导炎症反应,加重中性粒细胞和巨噬细胞的浸润,促进肾小球系膜细胞增生及纤维化;而Treg则通过分泌IL-10和表达细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4来抑制免疫反应,从而阻止CD4⁺T淋巴细胞向Th17分化^[16]。IgAN患者通常表现出Th17比例升高、Treg数量减少;此外,IgAN模型小鼠也同样表现出Th17/Treg比例失衡及Th17极化,表明Th17/Treg免疫失衡可能参与了IgAN的发生发展^[17-18]。

为深入探索补气通窍方干预IgAN的潜在机制,本研究进一步通过16S rRNA测序和流式细胞术探讨了该方对IgAN大鼠肠道菌群及外周血Th17/Treg免疫平衡的影响。结果显示,IgAN大鼠肠道菌群物种丰富度、均匀度均有所降低,且其物种组成与Normal组大鼠具有明显差异;经补气通窍方干预后,大鼠的肠道菌群物种丰富度、均匀度均明显改善,补气通窍方各剂量组大鼠肠道菌群物种组成与Normal组大鼠较为相似,提示该方对IgAN大鼠的肠道菌群稳态有一定的正向调控作用,进而影响IgAN的病理进程。在门水平上,补气通窍方各剂量组大鼠厚壁菌门的相对丰度均较Model组显著降低,拟杆菌门的相对丰度均较Model组显著升高。研究

指出,拟杆菌门是肠道微生物群中的关键生产者,能够将不可消化的碳水化合物分解成短链脂肪酸(Short-chain fatty acids, SCFAs),而IgAN大鼠体内拟杆菌门相对丰度的降低可能导致SCFAs等有益代谢产物减少,从而抑制Treg细胞的活化^[19]。进一步的流式细胞术检测结果证实了这一可能,即IgAN大鼠外周血中Th17比例、Th17/Treg均较Normal组显著升高,Treg比例则较Normal组显著降低;而补气通窍方可显著逆转上述免疫平衡指标的改变。

在IgAN发生发展中,Th17的异常活化可促进炎症因子的分泌,加剧肾脏的免疫病理损伤,同时Treg的减少则无法有效遏制这种异常免疫反应^[20]。本课题组前期研究结果显示,补气通窍方可通过调控AR大鼠Th17/Treg平衡来缓解炎症损伤,从而减轻鼻黏膜的炎症反应,缓解鼻部症状^[6]。本研究结果显示,补气通窍方可显著降低IgAN大鼠外周血Th17比例和Treg/Th17,显著升高Treg比例,减少肾小球IgA免疫复合物的沉积,从而发挥肾脏保护作用。这种对Th17/Treg免疫平衡的调节机制使得补气通窍方能够同时治疗AR和IgAN,进而实现“异病同治”。

综上所述,补气通窍方能够有效改善IgAN大鼠肾功能,降低肾小球中IgA免疫复合物的沉积,减轻肾组织病理损伤,调节肠道菌群物种组成及丰富度,维持Th17/Treg免疫平衡,即该方可能通过调控肠道菌群稳态和Th17/Treg免疫平衡来发挥对IgAN大鼠的肾脏保护作用;其中该方对Th17/Treg免疫平衡的调节可能是补气通窍方“异病同治”的科学内涵。然而,本研究也存在一定的局限性,如尚未进一步评估补气通窍方对IgAN大鼠肠道屏障功能的影响,其具体分子机制仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] GLEESON P J, O' SHAUGHNESSY M M, BARRATT J. IgA nephropathy in adults: treatment standard[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2023, 38(11): 2464-2473.
- [2] SANI A, MOVALLED K, KAMANAJ A, et al. Interventions for decreasing the risk of recurrent IgA nephropathy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Transpl Immunol*, 2023, 80: 101878.
- [3] EL KAROUÏ K, FERVENZA F C, DE VRIESE A S. Treatment of IgA nephropathy: a rapidly evolving field[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2024, 35(1): 103-116.
- [4] HE J W, ZHOU X J, LV J C, et al. Perspectives on how mucosal immune responses, infections and gut microbiome shape IgA nephropathy and future therapies[J]. *Theranostics*, 2020, 10(25): 11462-11478.
- [5] ZHU Y F, HE H D, SUN W Q, et al. IgA nephropathy: gut microbiome regulates the production of hypoglycosylated IgA1 via the TLR4 signaling pathway[J]. *Nephrol Dial*

- Transplant*, 2024, 39(10): 1624-1641.
- [6] 彭林峰,冯家茹,王明刚,等. 补气通窍方调控Treg/Th17平衡缓解变应性鼻炎大鼠鼻黏膜炎性损伤的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(3): 1648-1651.
- [7] 刘莉莉,刘大新,刘锦峰,等. 中医药临床优势病种探讨: 变应性鼻炎[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(2): 203-211.
- [8] 何鸣宇,张守琳,邹迪. 基于黏膜免疫探讨中医三焦论治IgA肾病[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(7): 140-144.
- [9] 陆慧瑜,张巧玲,蒋小云,等. IgA肾病大鼠模型的建立[J]. *中国误诊学杂志*, 2011, 6(6): 1264-1267.
- [10] JIN H, PIAO S G, JIN J Z, et al. Synergistic effects of leflunomide and benazepril in streptozotocin-induced diabetic nephropathy[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2014, 126(3): 148-156.
- [11] WANG C C, CAI X Q, LIN S F, et al. Hydroxychloroquine ameliorates immune functionality and intestinal flora disorders of IgA nephropathy by inhibition of C1GALT1/Cosmc pathway[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2024, 46(2): 218-228.
- [12] 张艳玥,张栩铭,周嘉宝,等. 基于“肺与大肠相表里”探讨IgA肾病的机制与治疗[J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(1): 77-80, 273.
- [13] 赵洁,孟立锋,莫超,等. 基于“咽肾相关”理论防治IgA肾病的研究进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(4): 1148-1152.
- [14] 范逸品,曲嵩霖,张华敏,等. 曹洪欣分型辨治变应性鼻炎经验[J]. *中医杂志*, 2024, 65(23): 2404-2407, 2426.
- [15] BARRATT J. Mucosal targeting in IgA nephropathy targeting the gut associated lymphoid tissue[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2024, 29(Suppl. 2): 34-36.
- [16] YUAN X L, QING J B, ZHI W Q, et al. Gut and respiratory microbiota landscapes in IgA nephropathy: a cross-sectional study[J]. *Ren Fail*, 2024, 46(2): 2399749.
- [17] INAMO J, KANEKO Y, KIKUCHI J, et al. High serum IgA and activated Th17 and Treg predict the efficacy of abatacept in patients with early, seropositive rheumatoid arthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40(9): 3615-3626.
- [18] HU X Y, FENG J T, ZHOU Q L, et al. Respiratory syncytial virus exacerbates kidney damages in IgA nephropathy mice via the C5a-C5aR1 axis orchestrating Th17 cell responses[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 151.
- [19] YANG S Q, HUANG J T, TAN W J, et al. Xiaoyankang-jun tablet alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by regulating gut microbiota and JAK2/STAT3 pathway[J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2024, 14(1): 44.
- [20] BAVIKAR P, DIGHE T, WAKHARE P, et al. Role of T-lymphocytes in kidney disease[J]. *Cureus*, 2021, 13(10): e19153.

(收稿日期:2025-04-28 修回日期:2025-08-27)

(编辑:张元媛)