



中国实验方剂学杂志

Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae

ISSN 1005-9903, CN 11-3495/R

## 《中国实验方剂学杂志》网络首发论文

题目：咳嗽变异性哮喘风伏阴伤证大鼠模型建立与评价  
作者：于明霞，兰瑞恒，余思洋，沈佳锋，张志杰，张诗瑜，姜博涵，崔红生  
DOI：10.13422/j.cnki.syfjx.20241125  
收稿日期：2024-02-18  
网络首发日期：2024-04-09  
引用格式：于明霞，兰瑞恒，余思洋，沈佳锋，张志杰，张诗瑜，姜博涵，崔红生. 咳嗽变异性哮喘风伏阴伤证大鼠模型建立与评价[J/OL]. 中国实验方剂学杂志. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20241125>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

[收稿日期]2024-02-18

[基金项目]国家自然科学基金项目（82274497）

[第一作者]于明霞，博士，住院医师，从事中医药防治肺系疾病研究，E-mail: ymx18363081009@163.com

[通讯作者]\*崔红生，博士，主任医师，从事中医药防治肺系疾病研究，E-mail: hshcui@sina.com

## 咳嗽变异性哮喘风伏阴伤证大鼠模型建立与评价

于明霞<sup>1,2</sup>，兰瑞恒<sup>1,2</sup>，余思洋<sup>1,2</sup>，沈佳锋<sup>1,2</sup>，张志杰<sup>1,2</sup>，张诗瑜<sup>1,2</sup>，姜博涵<sup>1,2</sup>，崔红生<sup>1\*</sup>

(1.北京中医药大学 第三附属医院，北京 100029；2.北京中医药大学，北京 100029)

**[摘要] 目的：**探讨咳嗽变异性哮喘（cough variant asthma, CVA）风伏阴伤证大鼠模型的建立与评价。

**方法：**60只大鼠随机分为空白组，CVA风伏阴伤组，CVA组，布地奈德组，桑梅止咳组，每组12只。除空白组外，各组大鼠采用卵蛋白氢氧化铝腹腔注射致敏+卵蛋白氢氧化铝雾化激发致敏，其中CVA风伏阴伤组，布地奈德组和桑梅止咳组在此基础上给予“吹风”和“甲状腺素片”灌胃（给药浓度 $0.15\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ）制备咳嗽变异性哮喘风伏阴伤证模型。实验第1-15天为模型制备阶段，实验第16-29天为以方测证阶段。实验第16天，布地奈德组给予雾化吸入治疗（吸入浓度 $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ），桑梅止咳组给予颗粒剂灌胃（给药浓度为 $4.19\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ），各组每次治疗1次，持续14天。于实验第1、8、15天，比较空白组、CVA风伏阴伤组、CVA组大鼠的体质量、饮水量、肛温、心前区及四肢爪心的温度的变化，实验第28天，比较五组大鼠体质量、饮水量、肛温、心前区及四肢爪心的温度的变化，实验第29天，进行咳嗽敏感性测定，辣椒素（ $10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）引咳，记录大鼠2min内咳嗽次数，实验第30天，测定肺功能指标，检测血中炎症因子白细胞介素-4（interleukin-4, IL-4），白细胞介素-5（interleukin-5, IL-5），白介素-13（interleukin-13, IL-13），血清干扰素- $\gamma$ （serum interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ ）及血清总免疫球蛋白E（immunoglobulin E, IgE）指标，检测血清中环磷酸腺苷（Adenosine Cyclophosphate, cAMP）、环磷酸鸟苷（cyclic guanosine monophosphate, cGMP）含量；HE染色观察肺组织病理，RT-qPCR检测大鼠肺组织cAMP、IL-4、IL-5、IL-13相对表达量。**结果：**实验第15天，与空白组和CVA组相比，CVA风伏阴伤组体质量降低，饮水量明显增加，肛温明显增高，心前区及四肢爪心温度均升高差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ）；实验第28天，与CVA风伏阴伤组相比，布地奈德组、桑梅止咳组两组大鼠饮水量减少、肛温降低，心前区及四肢爪心温度降低（ $P<0.05$ ），与布地奈德组相比，桑梅止咳组大鼠心前区及左下、右下肢爪心温度降低（ $P<0.05$ ）。在咳嗽敏感性方面，与空白组相比，CVA风伏阴伤组和CVA组两组大鼠2min内咳嗽次数明显增多（ $P<0.05$ ），与CVA风伏阴伤组相比，桑梅止咳颗粒组大鼠咳嗽次数减少（ $P<0.05$ ）。在肺功能方面，与空白组相比，CVA风伏阴伤组、CVA组两组大鼠的FVC降低（ $P<0.05$ ），与CVA风伏阴伤组相比，桑梅止咳组FVC升高（ $P<0.05$ ）。在其他检验方面，与空白组相比，CVA风伏阴伤组和CVA组两组的血清总IgE、IL-4、IL-13明显升高（ $P<0.05$ ），CVA风伏阴伤组cAMP明显升高，cGMP、INF- $\gamma$ 降低（ $P<0.05$ ）；与CVA风伏阴伤组相比，桑梅止咳组IgE、IL-4、IL-13、cAMP均降低，cGMP、INF- $\gamma$ 升高（ $P<0.05$ ）；与布地奈德组相比，桑梅止咳组IL-13降低（ $P<0.05$ ）；在HE病理染色中，CVA风伏阴伤组和CVA组大鼠肺组织损伤较重，而布地奈德组和桑梅止咳组支气管粘膜损伤较轻，气道上皮细胞坏死、脱落，炎细胞浸润，腺体增生，等较CVA组、CVA风伏阴伤组轻。在mRNA表达上，与空白组相比，CVA风伏阴伤组IL-4相对表达量降低（ $P<0.05$ ），与CVA风伏阴伤组相比，布地奈德组和桑梅止咳组两组大鼠IL-4相对表达量明显升高（ $P<0.05$ ）；**结论：**采用卵蛋白氢氧化铝腹腔注射致敏+卵蛋白氢氧化铝雾化激发致敏+吹风+甲状腺素片灌胃制备的咳嗽变异性哮喘动物模型，具备风伏阴伤证候特征。

**[关键词]** 咳嗽变异性哮喘；风伏阴伤；动物模型；以方测证；病证结合

[中图分类号] R2-0；R22；R242；R285.5；R563 [文献标识码] A

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20241125

**Establishment and Evaluation of Rat model of Cough Variant Asthma with Wind-hide Yin injury syndrome**

YU Mingxia<sup>1,2</sup>, LAN Ruiheng<sup>1,2</sup>, YU Siyang<sup>1,2</sup>, SHEN Jiafeng<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhijie<sup>1,2</sup>, ZHANG Shiyu<sup>1,2</sup>, JIANG Bohan<sup>1,2</sup>, CUI Hongsheng<sup>1\*</sup>

(1.The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;2.Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract] Objective:** This study aimed to investigate the establishment and evaluation of a rat model for fengfuyinshang in cough variant asthma(CVA). **Methods:** Sixty rats were randomly divided into five groups: blank group, CVA fengfuyinshang group, CVA group, budesonide group, and Sangmeizhike group, with 12 rats in each group. Except for the blank group, rats in each group were sensitized by intraperitoneal injection of ovalbumin aluminum hydroxide + atomized activation of ovalbumin aluminum hydroxide. The CVA fengfuyinshang group, budesonide group, and Sangmeizhike group were then administered "be in a draught" and "thyroxine tablets" ( $0.15\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) to induce fengfuyinshang in cough variant asthma. Days 1-15 of the experiment constituted the model preparation stage while days 16-29 served as the verification stage. On the 16th day of the experiment, the budesonide group received atomization inhalation treatment( $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) while the Sangmeizhike group was administered via granule intragastric administration( $4.19\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) once per time for 14 days. On days 1st, 8th, and 15th of the experiment, comparisons were made between body mass, water intake, anal temperature, precordial area and paw heart temperature among rats in blank groups, CVA fengfuyinshang groups, and CVA groups. On the 28th day of the experiment, the body mass, water intake, anal temperature, precordial area and paw heart temperature of rats in the five groups were compared. On the 29th day of the experiment, cough sensitivity and capsaicin( $10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) induced cough were measured. The number of coughs within 2 minutes of the rats were recorded. On the 30th day of the experiment, the pulmonary function indexes, the inflammatory factors interleukin4, interleukin5, interleukin13, serum interferon- $\gamma$  and serum total IgE indexes were measured. The serum levels of Adenosine Cyclophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) were detected. HE staining was used to observe the lung pathology, and RT-qPCR was used to detect the relative expression levels of cAMP, IL-4, IL-5 and IL-13. **Results:** On the 15th day of the experiment, compared with the blank group and the CVA group, the body weight of the CVA fengfuyinshang group decreased, the water intake increased significantly, the rectal temperature increased significantly, and the temperature of the precordial area and the heart of the limbs and paw increased significantly ( $P < 0.05$ ). On the 28th day of the experiment, compared with the CVA fengfuyinshang group, the rats in the budesonide group and the Sangmeizhike group had a significant reduction in water intake, rectal temperature, and the temperature of the precordial area and the paw heart of the limbs ( $P < 0.05$ ). Compared with the budesonide group, the Sangmeizhike group had a significant reduction in the temperature of the precordial area and the paw heart of the left and right lower limbs. There was statistical significance ( $P < 0.05$ ). In terms of cough sensitivity, compared with the blank group, the cough times in 2min in the CVA fengfuyinshang group and the CVA group were significantly increased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the CVA Fengfu Yin injury group, the cough times in the Sangmeizhike granule group were decreased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). In terms of lung function, compared with the blank group, the FVC of the rats in the CVA fengfuyinshang group and the CVA group decreased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the CVA fengfuyinshang group, the FVC of the Sangmeizhike group increased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank group, the levels of serum total IgE, IL-4, and IL-13 in the CVA fengfu Yin injury group and the CVA group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The levels of cAMP in the CVA fengfuyinshang group were significantly increased, while the levels of cGMP and INF- $\gamma$  were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the CVA fengfuyinshang group, IgE, IL-4, IL-13 and cAMP in the Sangmeizhike group were decreased, cGMP and INF- $\gamma$  were increased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the budesonide group, the Sangmeizhike group had a significant reduction in IL-13 ( $P < 0.05$ ). In HE pathological staining, the lung tissue of rats in CVA fengfuyinshang group and CVA group was severely damaged, while the bronchial mucosa of rats in budesonide group and Sangmeizhike group was slightly damaged, airway epithelial cell necrosis and exfoliation, inflammatory cell infiltration, gland hyperplasia, etc., were lighter than those in CVA group and CVA Fengfu Yin injury group. In terms

of mRNA expression, compared with the blank group, the relative expression of IL-4 in the CVA fengfuyinshang group was decreased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the CVA fengfuyinshang group, the relative expression of IL-4 in the budesonide group and the Sangmeizhike group were significantly increased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The cough-variant asthma animal model prepared by intraperitoneal injection sensitization with ooprotein aluminum hydroxide + atomization sensitization with ooprotein aluminum hydroxide + wind blowing + thyroxine tablets by stomach administration has the characteristics of wind-hide Yin injury .

[ **Keyword** ] cough variant asthma; Fengfuyinshang syndrome; animal model; measure symptoms by prescriptions; combination of disease and syndrome

咳嗽变异性哮喘 (cough variant asthma, CVA) 是一种特殊类型的哮喘<sup>[1]</sup>, 以咳嗽 ( $\geq 8$  周) 为唯一或主要临床表现, 无明显喘息、气促或呼吸困难, 气道高反应 (airway hyperresponsiveness, AHR) 是其临床特征<sup>[2-3]</sup>。CVA 是我国慢性咳嗽的最常见病因, 占慢性咳嗽病例的 24%~33%<sup>[4]</sup>, 如患者不积极治疗发展为典型哮喘的进展率为 30%~40%, 儿童则更高, 可达 54%<sup>[5-7]</sup>。基于长期的临床实践, 课题组总结出风邪内伏是咳嗽变异性哮喘发病的主要宿根, 郁热伤阴是必然转归, CVA 发病以风邪为主, 外邪引动宿根“伏风”, 肺失宣降, 上逆为咳<sup>[8]</sup>, 随着生活节奏加快, 阴虚体质人群越来越多, CVA 表现为风伏阴伤证患者日益增加, 成为亟需解决的临床问题。而临床研究证实桑梅止咳颗粒治疗咳嗽变异性哮喘风伏阴伤证疗效显著<sup>[9]</sup>, 然而在进一步探索机制中发现目前基础研究所用的动物模型侧重其咳嗽变异性哮喘的“病”, 而忽略了中医“证”的存在, 不能体现中医辨“病”与辨“证”结合的治疗思路, 无法为进一步研究咳嗽变异性哮喘风伏阴伤证提供实验载体, 因此亟需体现风伏阴伤证型的动物模型支持基础实验研究。基于上述原因, 本研究通过模拟 CVA 中西医病因、模拟临床症状、模拟微量量化指标、以方测证等方法, 综合建立评价 CVA 大鼠风伏阴伤病证结合动物模型, 以期为中医药防治 CVA 作用机理等基础研究提供较为理想的实验载体。

## 1. 材料

### 1.1 动物及饲料

SPF 级 SD (Sprague-Dawley) 雄性大鼠 60 只, 8 周龄, 体重 220~240g, 购买于北京维通利华有限公司 (合格证号 SCXK(京)2021-0006)。饲养于北京中医药大学 SPF 级动物实验室, 温度 ( $23 \pm 2$ ) °C, 湿度 ( $55 \pm 10$ ) %, 自由饮水进食, 所有大鼠喂养普通全价营养颗粒鼠饲料。本实验通过了伦理委员会审查批准 (No.BUCM-4-2023-081502-3073), 并符合《实验动物管理和使用指南》相关要求。

### 1.2 药物

桑梅止咳颗粒: 蜜桑白皮 10g, 桑叶 10g, 贡菊 10g, 桔梗 10g, 炒苦杏仁 10g, 乌梅 10g, 醋五味子 6g, 炒僵蚕 10g, 蝉蜕 6g, 白芍 10g, 蜜枇杷叶 15g, 炙甘草 6g (北京康仁堂药业有限公司; 批号分别为 21010767, 21010672, 21010323, 21007321, 21013923, 210014001, 21011072, 21003471, 21011067, 21011023, 21012197, 21020765) 每剂浓缩配方颗粒剂配方为 21 g/袋(颗粒剂每 1g 相当于生药 10g)、甲状腺素片 (40mg/片, 山东省惠诺药业有限公司, 批号: 220801)、吸入用布地奈德混悬液 (2mL: 0.5mg, 阿斯利康药业有限公司, 批号 LOT329173), 卵清蛋白 (OVA) (10g, Sigma 公司, 货号 SLC1458)、氢氧化铝佐剂 (50ml, 博奥龙公司, 货号: KX0210054), 辣椒素 (20mg, aladdin 公司, 货号 V107238)。

### 1.3 试剂

酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (白介素 4 (interleukin4,IL-4), 白介素-5 (interleukin5,IL-5), 白介素 13 (interleukin13,IL-13), 血清干扰素- $\gamma$  (serum interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ ), 环磷酸腺苷 (Adenosine Cyclophosphate, cAMP), 环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP), 血清总免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)) (江苏晶美公司, 批号分别是: JM-01598R1、JM-01501R1、JM-01492R1、JM-01605R1、JM-01955R1、JM-01434R1、JM-01470R1)、多聚甲醛、二甲苯 (国药, 货号 10023418)、无水酒精 (国药)、伊红 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 20200926)、苏木素染液 (中杉金桥公司, 货号 ZLI-9609)、中性树胶 (中杉金



桥公司, 货号 ZLI-9555)、VG 染色液(LEAGENE 公司, 货号 DC0047)、辣椒素(aladdin 公司, 货号 V107238)、TRIZOL(Invitrogen, 货号 10296028)、异丙醇(国药, 货号 40064360)、DEPC(MDL 公司, 货号 MD911875)、UltraPure Agarose (ABI-invitrogen 公司, 货号 16500100)、SuperScript III RT 逆转录 kit (ABI-invitrogen 公司, 货号 11752050)、Sybr qpcr mix (ABI-invitrogen 公司, 货号 4472920)。

#### 1.4 仪器

XL-50 型电风扇(圣丰凌公司)、FT-DLY-1063A 型德力西高精度风速测量仪(德力西)、DT-8838 型红外测温仪、通用动物雾化箱、402AI 型超声波雾化器、动物肺功能仪, 精准电子天平, 352 型多功能酶标仪(Labsystems Multiskan MS), AC8 型洗板机(Thermo Labsystems), TG16W 型微量高速离心机(国产); GNP-9080 型隔水式恒温培养箱(国产), ASP200S 全自动脱水机(Leica), RM2235 型石蜡切片机(Leica), HI1220 型烤片台(Leica), HI1220 型水浴缸(Leica), G1150 H 型加热石蜡包埋系统(Leica 公司), DM3000 型显微镜(Leica), LEGEND MICRO 21R 型台式高速冷冻离心机(THERMO 公司), Nanodrop lite 分光光度计(THERMO), 移液器(Eppendorf), StepOne Software 型荧光定量 PCR 仪(Applied biosystems(USA)), EPS 300 型电泳仪(biorad), 2500 型凝胶成像仪(biorad)。

## 2 方法

### 2.1 实验动物及分组

SPF 级 SD 大鼠 60 只, 适应性喂养 1 周, 采用随机数字表法分为 5 组, 即正常组、卵蛋白氢氧化铝腹腔注射致敏+卵蛋白氢氧化铝雾化激发致敏致 CVA 组(CVA 组)、CVA 大鼠风伏阴伤病证结合动物模型组(CVA 风伏阴伤组)、布地奈德组、桑梅止咳方组, 每组 12 只。

### 2.2 模型制备及评价标准

参照文献制备①CVA 组<sup>[10-11]</sup>: 卵蛋白氢氧化铝腹腔注射致敏+卵蛋白氢氧化铝雾化激发致敏, 具体方法如下: 实验第 1、8 日给予大鼠腹腔注射卵蛋白氢氧化铝溶液 1 mL (内含卵蛋白 100 mg 及氢氧化铝 0.25ml, 生理盐水 0.75ml), 致敏大鼠。从第 15 天开始, 每天雾化吸入 1%OVA 溶液, 激发 20min (流量  $2\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 连续 14 天, 激发大鼠, 记录大鼠引咳情况。具体操作: 在大鼠清醒状态下, 每次将大鼠放入与超声波雾化器相连的自制透明雾化箱通过雾化管向箱中喷入卵蛋白生理盐水溶液, 激发浓度为 1%OVA 溶液, 每次激发时间为 20 min; ②CVA 风伏阴伤组: 在 CVA 组的基础上给予风伏阴伤的干预, 风伏干预: 根据伏风是由感受风邪后留恋体内的形成原理, 并查阅相关文献确定合适的风速(3 级风)及干预时间(1~2 小时)<sup>[12]</sup>, 分别于实验第 1、3、5、7、9、11、13、15 天, 将大鼠置于透风笼中, 用电风扇施加风力, 测风仪测定风速, 即平均风速  $5\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ 、温度  $(23\pm 2)^\circ\text{C}$ 、湿度 50%~55%的环境中刺激 1h, 从第 15 天开始, 每隔 2 天吹风一次, 以保证大鼠伏风的状态, 持续 4 次。阴伤干预: 查阅既往文献<sup>[13-14]</sup>, 结合据阴虚、肺阴虚大鼠的模型制作, 采用目前较为公认且易于操作的灌服甲状腺素片 ( $0.15\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 方法, 从第 2 天开始, 隔天下午以浓度为  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的甲状腺素混悬液灌胃 3ml/只, 隔日 1 次, 从第 16 天开始, 每隔 2 天给一次药, 给药 5 次, 以保证阴伤状态; ③布地奈德组: 在 CVA 风伏阴伤组基础上给予激素干预, 即从实验第 16 天激发之日起开始予布地奈德雾化吸入治疗, 每天 1 次, 每次 30min, 连续 14 天。④桑梅止咳方组: 从实验第 16 天起, 在 CVA 风伏阴伤组基础上给予桑梅止咳方灌胃干预, 每天 1 次, 连续 14 天。⑤空白组: 致敏激发均以生理盐水。

目前没有大鼠风伏阴伤证统一的模型评价标准, 根据参考文献<sup>[13-16]</sup>, 本研究从一般状态包括皮毛、行动(烦躁易怒)、体重减轻、肛温显著升高、四肢爪心及胸前区温度显著升高、咳嗽敏感性、及客观指标 cGMP、cAMP 等含量来判定模型是否成功。

### 2.3 动物给药

参考文献<sup>[17]</sup>并根据公式计算大鼠桑梅止咳颗粒及布地奈德、甲状腺素片每日用药剂量, 大鼠用药剂量约为成人用药剂量的 6.25 倍。根据大鼠 6.25 倍折算系数换算, 桑梅止咳颗粒给药浓度为  $4.19\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 甲状腺素片给药浓度  $0.15\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 布地奈德组吸入浓度为  $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 持续 30 分钟雾化吸入。

## 2.4 观测指标

### 2.4.1 大鼠一般状态

一般状态变化：实验期间观察各组大鼠神态、体型、毛发、反应、呼吸、食欲等表现。

### 2.4.2 体质量、饮水量、肛温、心前区及四肢爪心温度测定

造模第 1、8、15 天测定空白组、CVA 风伏阴伤组、CVA 组的大鼠体质量、饮水量、肛温、心前区及四肢爪心温度，在实验第 28 天，测定所有大鼠的体质量、饮水量、肛温、心前区及四肢爪心温度。

### 2.4.3 咳嗽反应测定

咳嗽反应测定：第 29 天时将每组大鼠，置于玻璃罩内的密闭空间雾化吸入  $10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  辣椒素溶液 60s，然后关掉雾化器，在玻璃罩内停留 60s 后掀开盖子取出大鼠。当大鼠出现“洗脸样”抓鼻、点头、发声、腹肌抽搐及呼吸加速等表现时即为咳嗽，记录此时开始 2min 内各大鼠的咳嗽次数。

### 2.4.4 大鼠肺功能测定

采用动物肺功能检测系统，观察大鼠肺功能的变化。每组取 6 只大鼠，气管插管后将大鼠仰卧平放体描箱内，将气管插管与呼吸机连接。待呼吸稳定后，测定大鼠基值，记录 FVC、FEV0.1，FEV0.1/FVC% 等肺功能指标数据。

### 2.4.5 血清 IL-4、IL-5、IL-13、血清总 IgE、INF- $\gamma$ 、cGMP、cAMP

肺功能结束后，立即采用大鼠腹主动脉取血法取血， $4^{\circ}\text{C}$ ， $3000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，有效离心半径 10cm，15min 后提取血清，置  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱，对血清进行 ELISA 检测。

### 2.4.6 大鼠肺、支气管病理组织形态学观察

上述步骤结束后，处死动物，取出大鼠右肺组织，放入 4% 多聚甲醛固定，随后将固定的肺组织进行冠状面取材、修块、脱水、石蜡包埋。每只大鼠肺组织蜡块进行连续冠状切片，片厚  $4\mu\text{m}$ ，HE 染色，进行病理形态观察各组大鼠肺组织病理变化，观察支气管、肺泡形态结构变化，肺组织炎症细胞浸润情况。

### 2.4.7 大鼠肺组织 RT-PCR 测定肺组织内 cAMP、IL-4、IL-5、IL-13 的 mRNA 表达

试剂盒提取大鼠肺组织总 RNA (Trizol 法)，用琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 质量检测；使用 invitrogen 的逆转录试剂盒 superscript III 逆转录合成 cDNA，逆转录条件： $42^{\circ}\text{C}$ ，水浴 60min； $85^{\circ}\text{C}$ ，反应 10min；Realtime PCR 反应条件  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min， $95^{\circ}\text{C}$  变性 10 s， $58^{\circ}\text{C}$  退火 20s，进行 40 个循环， $72^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s。获得各基因荧光定量 Ct 值后取三副孔均值，以内参基因及正常组样本均值为基准，参照  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  公式计算各基因相对表达量，详见下述公式： $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{样本基因}) - \text{Ct}(\text{该样本对应内参基因})$ ， $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{各实验样本}) - \Delta\text{Ct}(\text{正常组样本总体均值})$ ，目的基因相对表达量  $= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。各引物由北京百奥思科生物医药技术有限公司设计合成，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	引物序列	碱基长度
cAMP	正向引物 TGAGGACCCAGATACTCCCA	20
	反向引物 CAGGTAAC TGTGTGATGCC	20
IL-4	正向引物 TCGGTGAACTGAGGAACTCT	21
	反向引物 GTATTTCCCTCGTAGGATGCTTT	23
IL-5	正向引物 ATAAAGAAATACATTGACGGACA	23
	反向引物 CTCTGTACTCATCACGCCAAG	21
IL-13	正向引物 CCAGAAGACTTCCCTGTGCAAC	22
	反向引物 ATTCAATATCCTCTGGGTCCTGT	23

## 2.5 统计学分析

采用 SPSS 25.0 进行统计分析，计量数据均符合正态分布用均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示，多组之间比较采用单因素方差分析，方差齐的采用 t 检验，方差不齐的采用 Dunnett-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 对大鼠一般状态的影响

正常组可见体重增长正常，神态正常，形体正常，皮毛亮泽，反应灵敏，呼吸正常，未见精神亢奋；CVA 风伏阴伤组大鼠体重增长缓慢，神态正常，形体消瘦，皮毛少泽，颜色枯槁，反应灵敏，呼吸急促，精神亢奋；CVA 组体重增长慢，神态正常，形体消瘦不明显，皮毛少泽，反应灵敏，呼吸急促，未见精神亢奋；桑梅止咳组见形体消瘦，体重增长缓慢，皮毛少泽，未见枯槁，反应灵敏，精神未见亢奋；布地奈德组见形体消瘦不明显，皮毛少泽，未见枯槁，反应灵敏，精神亢奋。

#### 3.2 造模期间对大鼠不同时间体质量、饮水量、肛温的影响

实验第 1 天，与空白组相比，CVA 风伏阴伤组与 CVA 组体重无明显变化，无统计学意义 ( $P>0.05$ )；实验第 8 天，与空白组相比，CVA 风伏阴伤组体质量降低 ( $P<0.05$ )，与 CVA 组相比，CVA 风伏阴伤组体质量降低 ( $P<0.05$ )；实验第 15 天，与空白组相比，CVA 风伏阴伤组体质量降低，饮水量明显增加，肛温明显增高，差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )；与 CVA 组相比，CVA 风伏阴伤组体质量降低，饮水量明显增加，肛温明显增高，差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。表 2。

表 2 造模期间对大鼠不同时间体质量、饮水量、肛温的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

Table 2 Effects on weight, water intake and anal temperature of rats during modeling ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

组别	给药浓度/ $g\cdot kg^{-1} d^{-1}$	时间 /天	体质量 /g	饮水量 /ml	肛温 /°C
空白组		1	245.83±1.96	42.06±3.33	38.12±0.10
		8	295.50±7.18	46.90±2.04	38.02±0.23
		15	392.08±6.70	37.16±1.35	37.51±0.18
CVA 风伏阴伤组	0.15	1	242.36±3.08	35.77±2.48	37.76±0.11
		8	312.00±3.05 <sup>1)2)</sup>	48.59±5.33	37.58±0.08
		15	350.55±13.11 <sup>1)2)</sup>	46.18±2.39 <sup>1)2)</sup>	38.59±0.10 <sup>1)2)</sup>
CVA 组		1	244.36±3.23	38.94±1.97	38.17±0.13
		8	322.55±5.43	39.05±3.50	38.19±0.13
		15	386.27±8.08	38.55±1.99	37.64±0.13

注：与空白组同时间相比，<sup>1)</sup> $P<0.05$ ；与 CVA 组同时间相比，<sup>2)</sup> $P<0.05$ (表 3 同)。

#### 3.3 造模期间对大鼠不同时间心前区及四肢爪心温度的影响

实验第 1 天，各组均无差异；实验第 8 天，与空白组相比，CVA 风伏阴伤组左下、右上、右下爪心温度升高 ( $P<0.05$ )，与 CVA 组大鼠相比，CVA 风伏阴伤组右上、右下爪心温度升高 ( $P<0.05$ )；实验第 15 天，与空白组相比，CVA 风伏阴伤组大鼠的心前区及四肢爪心温度均升高 ( $P<0.05$ )，与 CVA 组相比，CVA 风伏阴伤组大鼠的心前区及四肢爪心温度均升高 ( $P<0.05$ )。见表 3。

表 3 造模期间对大鼠心前区及四肢爪心温度的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

Table 3 Effect on temperature of precardiac area and paw heart of limbs of rats during modeling ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

组别	给药浓度 / $g\cdot kg^{-1} d^{-1}$	时间 /天	心前区 /°C	左上 /°C	左下 /°C	右上 /°C	右下 /°C
空白组		1	31.98±0.13	27.01±0.33	26.85±0.30	26.73±0.28	27.22±0.19

		8	31.83±0.29	28.18±0.66	25.54±0.49	27.18±0.26	27.23±0.25
		15	30.96±0.30	27.36±0.39	26.23±0.24	37.31±0.32	27.14±0.23
CVA 风伏							
阴伤组	0.15	1	31.29±0.24	26.96±0.39	26.95±0.26	26.91±0.28	26.97±0.16
		8	31.69±0.40	28.36±0.33	28.2±0.65 <sup>1)</sup>	29.37±0.43 <sup>1)2)</sup>	28.49±0.19 <sup>1)2)</sup>
		15	32.25±0.26 <sup>1)2)</sup>	30.65±0.19 <sup>1)2)</sup>	28.7±0.33 <sup>1)2)</sup>	30.67±0.39 <sup>1)2)</sup>	29.62±0.14 <sup>1)2)</sup>
CVA 组							
		1	31.70±0.18	26.78±0.35	26.65±0.22	27.38±0.21	27.48±0.24
		8	31.69±0.40	29.64±0.41	27.48±0.68	27.74±0.32	27.35±0.34
		15	30.59±0.56	27.28±0.46	26.1±0.34	27.79±0.23	27.13±0.30

### 3.4 第 28 天造模后对大鼠体质量、肛温、饮水量的影响

实验第 28 天，与空白组相比，CVA 风伏阴伤组的体质量明显降低、饮水量增加、肛温升高 ( $P<0.05$ )，与 CVA 组相比，CVA 风伏阴伤组的体质量明显降低、饮水量增加、肛温升高 ( $P<0.05$ )；与 CVA 风伏阴伤组相比，布地奈德组、桑梅止咳组两组大鼠饮水量减少、肛温降低 ( $P<0.05$ )，体质量差异无明显统计学意义；与布地奈德组相比，桑梅止咳组大鼠体质量、饮水量、肛温差异无明显统计学意义。见表 4。

表 4 造模后对大鼠体质量、肛温、饮水量的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

Table 4 Effects on weight, water intake and anal temperature in rats after modeling ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

组别	给药浓度	体质量/g	饮水量/ml	肛温/°C
空白组		439.28±12.04	44.13±2.44	37.43±0.14
CVA 风伏阴伤组	0.15g·kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	368.87±8.77 <sup>1)2)</sup>	60.45±1.96 <sup>1)2)</sup>	39.07±0.12 <sup>1)2)</sup>
CVA 组		416.07±14.78	37.05±3.52	38.11±0.14
布地奈德组	0.5g·L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	388.30±6.35	49.55±2.18 <sup>3)</sup>	38.34±0.12 <sup>3)</sup>
桑梅止咳组	4.19g·kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	371.24±10.17	43.50±2.45 <sup>3)</sup>	37.81±0.12 <sup>3)</sup>

注：与空白组同时间相比，<sup>1)</sup> $P<0.05$ ；与 CVA 组同时间相比，<sup>2)</sup> $P<0.05$ ；与 CVA 风伏阴伤组同时间相比，<sup>3)</sup> $P<0.05$ ，与布地奈德组同时间相比，<sup>4)</sup> $P<0.05$ 。（下同）

### 3.5 第 28 天造模后对各组大鼠心前区及四肢爪心温度的影响

与空白组相比，CVA 风伏阴伤组的心前区及四肢爪心温度明显升高 ( $P<0.05$ )，与空白组相比，CVA 风伏阴伤组的心前区及四肢爪心温度明显升高 ( $P<0.05$ )；与 CVA 风伏阴伤组相比，布地奈德组、桑梅止咳组两组大鼠心前区及四肢爪心温度降低 ( $P<0.05$ )；与布地奈德组相比，桑梅止咳组大鼠心前区及左下、右下肢爪心温度降低 ( $P<0.05$ )，左上、右上肢爪心温度差异无明显统计学意义。见表 5。

表 5 造模后对各组大鼠心前区及四肢爪心温度的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

Table 5 Effects on temperature in precardiac area and paw heart of limbs in rats after modeling ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

组别	给药浓度	心前区/°C	左上/°C	左下/°C	右上/°C	右下/°C
空白组		30.88±0.34	27.32±0.23	26.13±0.82	27.27±0.31	27.28±0.26
CVA 风伏阴伤组	0.15g·kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	32.77±0.26 <sup>1)2)</sup>	31.80±0.25 <sup>1)2)</sup>	29.40±0.54 <sup>1)2)</sup>	31.57±0.29 <sup>1)2)</sup>	31.71±0.24 <sup>1)2)</sup>
CVA 组		28.25±0.56	26.27±0.45	26.73±0.55	27.85±0.22	27.49±0.52
布地奈德组	0.5g·L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	30.37±0.43 <sup>3)</sup>	29.45±0.49 <sup>3)</sup>	27.08±0.83 <sup>3)</sup>	29.30±0.88 <sup>3)</sup>	27.41±0.55 <sup>3)</sup>



桑梅止咳组 4.19g·kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> 26.96±0.52<sup>3)4)</sup> 28.37±0.45<sup>3)</sup> 24.27±0.39<sup>3)4)</sup> 27.02±0.65<sup>3)</sup> 25.59±0.50<sup>3)4)</sup>

### 3.6 造模后对大鼠 2min 内咳嗽次数及肺功能影响

与空白组相比, CVA 风伏阴伤组和 CVA 组两组大鼠 2min 内咳嗽次数明显增多 ( $P<0.05$ ), 与 CVA 组相比, 桑梅止咳组咳嗽次数明显减少 ( $P<0.05$ ), 与 CVA 风伏阴伤组相比, 桑梅止咳组咳嗽次数明显减少 ( $P<0.05$ ), 与 CVA 组相比, 布地奈德组和桑梅止咳颗粒组大鼠咳嗽次数明显减少 ( $P<0.05$ ), 与 CVA 风伏阴伤组相比, 桑梅止咳颗粒组大鼠咳嗽次数减少 ( $P<0.05$ )。与空白组相比, CVA 风伏阴伤组、CVA 组两组大鼠的 FVC 降低 ( $P<0.05$ ), 与 CVA 组大鼠相比, 布地奈德组和桑梅止咳颗粒组两组大鼠 FVC 升高 ( $P<0.05$ ), 与 CVA 风伏阴伤组相比, 桑梅止咳组 FVC 升高 ( $P<0.05$ ); 与布地奈德组相比, 桑梅止咳组 FEV0.1/FVC 降低, FEV0.1 各组之间差异无统计学意义。见表 6。

表 6 造模后对大鼠 2 min 内咳嗽次数及肺功能的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

Table 6 Effect on coughing times of rats within 2 minutes and lung function after modeling ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

组别	给药浓度		咳嗽次数/次	FVC/mL	FEV0.1/mL	FEV0.1/FVC%
	度					
空白组			6.67±0.41	15.00±0.87	6.10±0.54	0.416±0.052
	0.15					0.584±0.066
CVA 风伏阴伤组	g·kg <sup>-1</sup>		11.09±0.59 <sup>1)</sup>	11.25±0.44 <sup>1)</sup>	6.46±0.59	
CVA 组			11.83±0.66 <sup>1)</sup>	9.91±0.73 <sup>1)</sup>	5.99±0.42	0.614±0.045
布地奈德组	0.5g·L <sup>-1</sup>		10.00±0.43 <sup>2)</sup>	13.28±1.16 <sup>2)</sup>	7.80±0.41	0.597±0.026
	4.19g·kg <sup>-1</sup>				6.33±0.82	0.432±0.037 <sup>4)</sup>
桑梅止咳组	1		9.00±0.39 <sup>2)3)</sup>	14.40±0.94 <sup>2)3)</sup>		

### 3.7 对大鼠血清总 IgE、IL-4、IL-5、IL-13 的影响

与空白组相比, CVA 风伏阴伤组和 CVA 组两组的血清总 IgE、IL-4、IL-13 明显升高 ( $P<0.05$ ), 与 CVA 组相比, CVA 风伏阴伤组 IL-4 升高 ( $P<0.05$ ); 与 CVA 组相比, 布地奈德组和桑梅止咳组血清总 IgE、IL-4 降低 ( $P<0.05$ ), 与 CVA 风伏阴伤组相比, 布地奈德组血清总 IgE、IL-4 降低 ( $P<0.05$ ); 与 CVA 风伏阴伤组相比, 桑梅止咳组 IgE、IL-4、IL-13 均降低 ( $P<0.05$ ); 与布地奈德组相比, 桑梅止咳组 IL-13 降低 ( $P<0.05$ )。见表 7。

表 7 造模后对大鼠血清总 IgE、IL-4、IL-5、IL-13 的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

Table 7 Effect on serum total IgE, IL-4, IL-5 and IL-13 in rats after modeling ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

组别	给药浓度		血清总 IgE/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-4/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-5/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-13/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
	度					
空白组			4.075±0.056	115.92±1.09	30.61±0.31	50.30±0.70
	0.15g·kg <sup>-1</sup>				31.02±0.54	
CVA 风伏阴伤组	1		4.497±0.052 <sup>1)</sup>	126.02±1.18 <sup>1)2)</sup>		57.68±0.57 <sup>1)</sup>
CVA 组			4.410±0.056 <sup>1)</sup>	121.44±1.73 <sup>1)</sup>	31.81±0.34	56.09±0.77 <sup>1)</sup>
布地奈德组	0.5g·L <sup>-1</sup>		4.015±0.048 <sup>2)3)</sup>	116.78±1.57 <sup>2)3)</sup>	31.46±0.23	56.77±0.29
	4.19g·kg <sup>-1</sup>				30.68±0.51	
桑梅止咳组	1		4.221±0.072 <sup>2)3)</sup>	110.17±0.70 <sup>2)3)</sup>		54.23±0.33 <sup>3)4)</sup>

### 3.8 大鼠血 cAMP、cGMP、INF- $\gamma$ 的影响

与空白组相比, CVA 风伏阴伤组 cAMP 明显升高, cGMP、INF- $\gamma$  降低 ( $P<0.05$ ); 与 CVA 组相比, CVA 风伏阴伤组 cGMP、INF- $\gamma$  降低 ( $P<0.05$ ); 与 CVA 风伏阴伤组相比, 布地奈德组和桑梅止咳组两组大

鼠 cAMP 降低, cGMP、INF- $\gamma$  升高 ( $P<0.05$ ) ; 与 CVA 组相比, 布地奈德组和桑梅止咳组两组大鼠 cAMP 降低 ( $P<0.05$ ) 。见表 8。

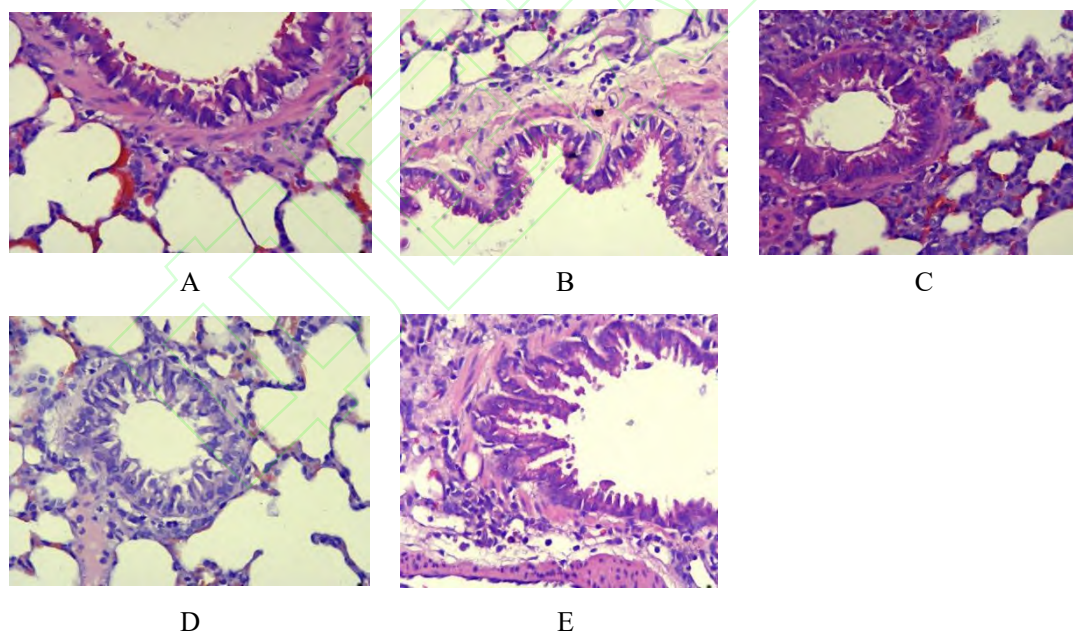
表 8 造模后对大鼠血清 cAMP、cGMP、INF- $\gamma$  的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

Table 8 Effects on serum cAMP, cGMP and INF- $\gamma$  in rats after modeling ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

组别	给药浓度		cAMP/nmol·L <sup>-1</sup>	cGMP/nmol·L <sup>-1</sup>	INF- $\gamma$ /pg·mL <sup>-1</sup>
	度				
空白组			45.18±0.74	2.810±0.040	2757.33±28.84
CVA 风伏阴伤组	0.15g·kg <sup>-1</sup>	<sup>1</sup>	50.86±0.47 <sup>1)</sup>	2.524±0.040 <sup>1)2)</sup>	2356.12±13.23 <sup>1)2)</sup>
			49.57±0.92	2.903±0.036	2878.18±25.09
CVA 组			49.57±0.92	2.903±0.036	2878.18±25.09
布地奈德组	0.5g·L <sup>-1</sup>		41.47±0.94 <sup>2)3)</sup>	2.989±0.045 <sup>3)</sup>	2862.98±37.09 <sup>3)</sup>
	4.19g·kg <sup>-1</sup>		42.79±0.72 <sup>2)3)</sup>	2.798±0.039 <sup>3)</sup>	2822.09±30.68 <sup>3)</sup>
桑梅止咳组		<sup>1</sup>			

### 3.9 大鼠肺组织病理学变化影响

空白组的大鼠肺及支气管组织基本正常。CVA 风伏阴伤组支气管组织周围炎性渗出, 管壁明显增厚, 组织结构层次不明显, 排列混乱, 支气管上皮细胞坏死, 脱落, 肺泡间隔增厚, 并伴有较多粒细胞, 大量炎细胞浸润, 黏液腺增生扩张; CVA 组与 CVA 风伏阴伤组相似, 结构层次不明显, 排列混乱, 气道上皮细胞脱落, 炎细胞浸润, 黏液腺增生扩张; 布地奈德组和桑梅止咳组支气管粘膜损伤较轻, 气道上皮细胞坏死、脱落, 炎细胞浸润, 腺体增生, 等较 CVA 组、CVA 风伏阴伤组轻。见图 1。



注: A.空白组; B.CVA 风伏阴伤组; C.CVA 组; D.布地奈德组; E.桑梅止咳组

图 1 大鼠肺组织形态学改变 (HE,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of lung histomorphology on rats (HE,  $\times 400$ )

### 3.10 造模后对大鼠肺组织 cAMP、IL-5、IL-13、IL-4mRNA 的影响

与空白组相比, CVA 风伏阴伤组 IL-4 相对表达量降低 ( $P<0.05$ ) , 与 CVA 风伏阴伤组相比, 布地奈德组和桑梅止咳组两组大鼠 IL-4 相对表达量明显升高 ( $P<0.05$ ) ; 与空白组相比, CVA 风伏阴伤组和 CVA 组 cAMP、IL-5、IL-13 相对表达量降低, 差异无统计学意义; 而与 CVA 风伏阴伤组相比, 布地奈德组和桑梅止咳组各组 cAMP、IL-5、IL-13 相对表达量有升高, 差异无统计学意义。见表 9。

表 9 造模后对大鼠肺组织 cAMP、IL-5、IL-13、IL-4mRNA 的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

Table 9 Effects on relative expression levels of cAMP, IL-4, IL-5 and IL-13 in rat lung tissue after modeling ( $\bar{x}\pm s$ , n=12)

组别	给药浓度	cAMP 相对 表达量	IL-4 相对 表达量	IL-5 相对 表达量	IL-13 相对 表达量
空白组		0.925±0.120	0.910±0.109	0.893±0.147	0.952±0.109
CVA 风伏阴伤 组	0.15g·kg <sup>-1</sup>	0.744±0.039	0.643±0.026 <sup>1)</sup>	0.696±0.038	0.718±0.363
CVA 组		0.739±0.101	0.753±0.034	0.791±0.092	0.813±0.621
布地奈德组	0.5g·L <sup>-1</sup>	0.866±0.024	0.883±0.055 <sup>3)</sup>	0.866±0.032	0.880±0.041
桑梅止咳组	4.19g·kg <sup>-1</sup>	0.825±0.049	0.879±0.033 <sup>3)</sup>	0.833±0.052	0.895±0.122

#### 4 讨论

咳嗽变异性哮喘是典型哮喘的一种表型，中医根据病因病机不同分为风伏阴伤证、湿热内蕴证、肝火犯肺证、痰湿蕴肺证等证型。崔红生教授认为风邪内伏是导致 CVA 发病的主要宿根，外风久稽不解、内外相引、风燥阴伤、气机升降失常是其主要病机特点，风伏阴伤是 CVA 的主要证候特征<sup>[8]</sup>。随着生活节奏的加快，阴虚体质增多，临床中 CVA 风伏阴伤证的患者日益增加，而进一步研究中医药治疗该病的机制成为迫切需求。然而目前基础研究所用的动物模型侧重其咳嗽变异性哮喘的“病”，而忽略了中医“证”的存在，这与中医诊疗强调“辨病”与“辨证”相结合的诊疗思路不相符合。为了体现中医诊疗“辨病”与“辨证”结合的思路，为基础研究提供较为理想的实验载体，结合目前临床需求，本研究从造模方法、症状表现、客观指标、以方测证 4 个方面对大鼠 CVA 风伏阴伤病证结合模型进行评价。

中医认为伏风作为伏邪的一种类型，是由于风邪侵袭，久羁不解，留恋于内而形成，发生于疾病早期，是 CVA 发生的主要“宿根”，而阴伤则是 CVA 伏风发作后疾病的必然转归：伏风久潜于肺，煎熬津液使全身阴液亏乏，肺脏失润，肺燥偏盛，形成燥邪阴伤；另一方面伏风与体内原有火、痰、瘀胶结难解，邪深郁久，郁久热重，热甚耗阴，终陷入恶性循环，反复发作，缠绵难愈。若为阴虚体质，肺气虚损，正气不足则易卫外不固，更易受风邪侵袭，伏于体内而成“伏风”，一旦再感外邪或劳累或饮食或情志不畅，则肺气失宣，上逆为咳而发病，同时更能加重阴虚状态。基于以上风伏阴伤的形成原理，结合中医证候特征，制备 CVA 大鼠病证结合模型：采用卵蛋白氢氧化铝腹腔注射致敏+卵蛋白氢氧化铝雾化激发致敏形成 CVA 疾病状态，在实验前期模拟“伏风”感受风邪后留恋体内的特征，后期给予甲状腺素片诱导“阴伤”郁久热重，热甚耗阴状态，最大限度还原人体疾病症状、病理改变以及中医证候的病证结合状态，从而形成 CVA 风伏阴伤的大鼠动物模型。咳嗽变异性哮喘风伏阴伤证的临床表现咳嗽呈阵发性，伴有口干多饮、形体消瘦，五心烦热，舌红少苔等阴虚内热的表现，而无典型哮喘的喘息，胸闷症状。参考文献<sup>[18]</sup>，本研究将体质量、饮水量、肛温、心前区及四肢爪心温度作为风伏阴伤证的主要症状依据。本研究结果显示，CVA 风伏阴伤组大鼠的体质量增长缓慢、体温明显升高，饮水量增多，符合阴伤内热的表现。同时，CVA 风伏阴伤组的大鼠咳嗽敏感性增高，肺功能异常，既是 CVA 模型“病”的表现，又与“伏风”所致咳嗽相关。因此，从造模方法上，本研究 CVA 风伏阴伤组既有 CVA“病”的表现，又强调了“证”的特点。

咳嗽变异性哮喘作为一种特殊类型的哮喘，气道慢性炎症、气道高反应性及气道重塑是其主要发病机制<sup>[19]</sup>。气道炎症主要是受机体免疫 T 淋巴细胞调控。现代研究表明<sup>[20]</sup>，在相同环境下，不同个体患病风险不同，而这种易感性差异取决于 T 辅助 1 (T helper 1, Th1) 与 Th2 细胞之间的免疫平衡，这是机体发病及疾病状态持续存在的免疫学基础。Th1 细胞具有增强吞噬细胞介导的抗感染免疫功能，国内学者认为 Th1 细胞释放的干扰素  $\gamma$  (interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 因子作为一种抗炎指标，也是激活巨噬细胞不可缺少的介质，它有提高吞噬细胞吞噬和杀伤病原体的作用，同时可以通过阻止白介素因子 4 (interleukin 4, IL-4) 的介入，减少 IgE 的生成<sup>[21]</sup>。但也有国外学者认为，Th1 细胞及其细胞因子 IFN- $\gamma$  与重度哮喘有关，可能是激素依赖性哮喘气道高反应性的驱动因素<sup>[22-23]</sup>。因此有研究表明 IFN- $\gamma$  水平与哮喘患者的肺功能呈正相关，是哮喘的保护因素，但也有研究表明血清 IFN- $\gamma$  在哮喘急性发作期表达水平升高，是哮喘急性发作和激素抵抗的危险因素<sup>[21]</sup>，IFN-



$\gamma$  在哮喘中的作用机制尚不完全清楚。本研究中 CVA 风伏阴伤组 IFN- $\gamma$  低于正常组，而对照组 IFN- $\gamma$  则高于正常组，桑梅止咳组和布地奈德组低于对照组而高于空白组的趋势，笔者推测 CVA 风伏阴伤组甲状腺素可能对 IFN- $\gamma$  有一定影响，但具体关系仍值得进一步研究与探索。

Th2 型细胞因子直接参与调节哮喘气道炎症反应中的嗜酸性粒细胞的活化与浸润。咳嗽变异性哮喘的发生是通过抗原识别受体 (Protease-activated receptors, PAR) 和 Toll 样受体激活气道上皮细胞，刺激 Th2 和 2 型固有淋巴细胞 (Type 2 innate lymphoid cells, ILC2) 激活和介导 2 型免疫应答，从而产生更多以 IL-4, IL-5<sup>[19]</sup> 和 IL-13<sup>[24]</sup> 为代表的 Th2 细胞因子，促进 EOS 和肥大细胞的激活和募集、杯状细胞增生和黏液分泌，最终引起气道重塑和气道高反应<sup>[25-26]</sup>。临床研究<sup>[27]</sup>也发现，CVA 患者血清 IL-4, IL-5 正常人群升高，这与本研究 ELISA、RT-PCR 研究结果一致，尽管 IL-5 组间差异不明显，但 CVA 风伏阴伤组和 CVA 组仍有增高的趋势，这与前人研究一致，说明在疾病模型的建立上，符合 CVA 气道炎症的病理特点。

环磷酸腺苷 (cAMP) 参与神经节突触传递，当某些神经细胞兴奋时，突触前神经末梢释放递质作用于突触后膜上相应的受体并激活腺苷酸环化酶，在突触后膜合成环磷酸腺苷，进而激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)，通过膜蛋白的磷酸化改变膜对离子的通透性，从而影响神经细胞的兴奋性。现代研究表明<sup>[8]</sup>，当机体出现热证、阴虚证时，交感神经- $\beta$  受体-cAMP 系统的功能亢进，当机体出现寒证、阳虚证时，副交感神经-M 受体-环磷酸鸟苷 (cGMP) 系统的功能亢进。大多数实验都证实了阴虚发热患者 cAMP 的含量增高，cGMP 水平正常或降低<sup>[28]</sup>。本研究 ELISA 结果表明 CVA 风伏阴伤组大鼠 cAMP 水平增高，cGMP 水平降低，与前人研究结果基本一致，证明从客观指标证明本模型证型的可靠性，但 RT-PCR 结果显示无统计学意义，仍需进一步探索差异不显著的原因。

桑梅止咳方组成为蜜桑白皮，桑叶，贡菊，桔梗，炒苦杏仁，乌梅，醋五味子，炒僵蚕，蝉蜕，白芍，蜜枇杷叶，炙甘草。方中乌梅、白芍、五味子、蝉蜕敛阴与祛风并举，收散相须，标本兼治，体证同调，既调阴虚之体，又治风伏之证；杏仁、桔梗、桑白皮、蜜枇杷叶，敛降同施、宣肃相辅；伍以桑叶、菊花、僵蚕，疏风清热与养阴息风同施，内外风兼治，上述诸药合用，疏风清热，养阴润燥，专治咳嗽变异性哮喘风伏阴伤证，其有效性和安全性已有临床研究和基础实验验证<sup>[9, 10]</sup>。本次研究结果表明，桑梅止咳组与布地奈德组相比在治疗结果上效果相似，与 CVA 风伏阴伤证相比，桑梅止咳组与布地奈德组治疗后大鼠咳嗽敏感性降低，肺功能 (FVC、FEV<sub>0.1</sub>/FVC) 改善，血清总 IgE 和炎症因子降低，血清 cAMP 明显升高，cGMP 明显降。但是与 CVA 风伏阴伤证组相比，在体质量、饮水量、肛温及“五心”温度等风伏阴伤症状改善上及 RT-PCR 结果上桑梅止咳组与布地奈德组两组的效果没有明显的差异性，未能体现出桑梅止咳方改善风伏阴伤的特异性，考虑以下原因①模型方面的原因：本研究采用的是病证结合的造模方法，此种风伏阴伤的证型造模作为一种探索，仍有不完善的地方，实验前期的“吹风”只能模拟风邪侵袭，但是对于是否有风邪内伏留恋鼠体内无从得知；用“灌服甲状腺素片”模拟阴伤的状态，而不能体现导致阴伤的原因（郁热伤阴或阴虚质），且不能具体到是肺阴伤还是肾阴伤，阴伤的程度不好把控，另外灌服甲状腺素片对卵蛋白氢氧化铝腹腔注射致敏+卵蛋白氢氧化铝雾化激发致敏的疾病状态是否有影响，文献中虽然没有相关此类研究，但是否有影响还需进一步探究。故从模型制作的角度分析，是由于本次病症结合模型制作只是体现疾病结果的状态而不能模拟病因病机，模型制作不够成熟，因此在以方测证上结果不够突出，还需进一步探索；②从方药上分析，桑梅止咳方尽管是针对 CVA 风伏阴伤证的中药复方，但是融入了中医整体观综合治疗的一个方剂，兼有疏风清热，养阴润燥的功效，就滋阴而言，相比于“沙参麦冬汤”这类滋阴的精专方药，滋阴的疗效上没有非常突出针对疾病的“阴虚状态”，这也是导致结果差强人意的一个原因。

综上所述，本研究所构建的 CVA 风伏阴伤证模型，具备 CVA 风伏阴伤证的证候特点，干预因素少且稳定，研究结果从客观指标和以方测证方面有说服力，为中医药防治咳嗽变异性哮喘动物实验病证结合模型的研究提供一定的依据。但是本研究造模也仍然存在不完善的地方：由于本研究是从造模方法、症状表现、客观指标、以方测证 4 个方面对大鼠 CVA 风伏阴伤病证结合模型进行评价，因此在整体设计方案上是按照常规考察药



物作用的形式去分组, 缺乏对CVA风伏阴伤动物模型的反复验证和检验; 缺乏对舌象、脉象的分析, 未对大鼠尿量及进食量进行明确统计, 由于实验条件原因未对大鼠气道进行激发试验是本研究的遗憾。在今后研究中, 应进一步完善证候评价方法, 完善评价指标, 明确炎症因子如IFN- $\gamma$ 等在CVA疾病中的作用, 建立更为全面客观的中医证候评价体系。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

## [参考文献]

- [1] REDDEL H K, BACHARIER L B, BATEMAN E D, et al. Global Initiative for Asthma Strategy 2021[J]. *Respirology*, 2022,27 (1):14-35.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南(2021)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2022,45(1):13-46.
- [3] IRWIN R S, FRENCH C L, CHANG A B, et al. Classification of Cough as a Symptom in Adults and Management Algorithms[J]. *Chest: The Journal of Circulation, Respiration and Related Systems*, 2018,153(1):196-209.
- [4] SONG W J, CHANG Y S, FARUQI S, et al. The global epidemiology of chronic cough in adults: a systematic review and meta-analysis.[J]. *Eur Respir J*, 2015,45(5):1479-1481.
- [5] FUJIMURA, M. Comparison of atopic cough with cough variant asthma: is atopic cough a precursor of asthma?[J]. *Thorax*, 2003,58(1):14-18.
- [6] NIIMI A. Narrative Review: how long should patients with cough variant asthma or non-asthmatic eosinophilic bronchitis be treated?[J]. *J Thorac Dis*, 2021 ,13(5):3197-3214
- [7] MATSUMOTO H, NIIMI A, TAKEMURA M, et al. Prognosis of Cough Variant Asthma: A Retrospective Analysis[J]. *J Asthma*. 2006,43(2):131-135.
- [8] 崔红生, 张诗瑜, 毕伟博, 等. 和调枢机法治疗咳嗽变异性哮喘[J]. *中医杂志*, 2022,63(9):894-896.
- [9] 于小佳. 桑梅止咳颗粒治疗咳嗽变异性哮喘(风伏阴伤证)的临床疗效观察[D]: 北京, 北京中医药大学, 2018.
- [10] 候丹, 黄帅阳, 吕明圣, 等. 桑梅止咳颗粒对咳嗽变异性哮喘大鼠气道炎症反应的作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022,28(2):62-66.
- [11] 楚慧伦, 孔德明, 丁子桐, 等. Brown-Norway 大鼠咳嗽变异性哮喘模型的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2018,28(3):63-66.
- [12] 李雯雯. 风邪及相关因素犯肺的定量模拟研究[D]: 济南, 山东中医药大学, 2014.
- [13] 周婷, 王孟清, 罗银河. 肺热阴虚型感染后慢性咳嗽大鼠模型的建立及评价[J]. *中医药导报*, 2016,22(5):16-20.
- [14] 王赛, 白明, 苗明三. 阴虚证动物模型诊断指标及分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2021,31(1):132-137.
- [15] 占阮娟, 陈素红, 吕圭源, 等. 三味甘凉归肺经中药对肺阴虚模型大鼠 cAMP、cGMP 的影响[J]. *中药药理与临床*, 2012,28(6):85-87.
- [16] 叶耀辉, 张博文, 郑红梅, 等. 大鼠虚热证模型的建立与评价[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017,23(14):134-139.
- [17] NAIR A, MORSY M A, JACOB S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development[J]. *Drug Dev Res*. 2018,79(8):373-382.
- [18] 罗菁, 丁伊, 詹国平, 等. 感染后咳嗽肺热阴虚证幼年大鼠模型的构建及验证[J]. *中医杂志*, 2022,63(24):2366-2374.
- [19] 袁阳, 袁芳, 郑权, 等. 咳嗽变异性哮喘发病机制及中西药疗效的研究进展[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2021,29(8):135-140.
- [20] 王志刚, 申改青, 黄玉焕. 咳嗽变异性哮喘患儿外周血 miR-138 及 RUNX3 对 Th1/Th2 平衡的调节作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2021,23(10):1044-1049.
- [21] 张惠群, 甘兵. 维生素 D、IFN- $\gamma$  与哮喘的相关性研究进展[J]. *广东医科大学学报*, 2023,41(5):584-588.
- [22] BRANCHETT W J, STLTING H, OLIVER R A, et al. A T cell-myeloid IL-10 axis regulates pathogenic IFN- $\gamma$ -

- dependent immunity in a mouse model of type 2-low asthma[J]. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2020,145(2):666-678.
- [23] TUMES D J, PAPADOPOULOS M, ENDO Y, et al. Epigenetic regulation of T-helper cell differentiation, memory, and plasticity in allergic asthma.[J]. *Immunol Rev*, 2017,278(1):8-19.
- [24] 黄柯婷, 王志旺, 梁可克, 等. IL-13 激活杯状细胞参与哮喘气道黏液高分泌的研究新进展[J]. *中国现代应用药学*, 2023,40(10):1416-1421.
- [25] BOONPIYATHAD T, SZENER Z C, SATITSUKSANO A P, et al. Immunologic mechanisms in asthma.[J]. *Semin Immunol*, 2019 Dec;46:101333. doi: 10.1016/j.smim.2019.101333.
- [26] LI Q, SHEN Y, GUO X, et al. Betanin Dose-Dependently Ameliorates Allergic Airway Inflammation by Attenuating Th2 Response and Upregulating cAMP-PKA-CREB Pathway in Asthmatic Mice[J]. *J Agr Food Chem*, 2022,70(12):3708-3718.
- [27] 刘威威, 苏玉峰, 王欢, 等. 不同疗程布地奈德福莫特罗对咳嗽变异性哮喘患者疗效及辅助性 T 细胞因子的影响研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2021,29(7):115-120.
- [28] 王淑美, 徐晓玉. 滋阴清热药对环核苷酸的影响[J]. *中国药业*, 2003(07):26-27.