

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.24.012

感染后咳嗽肺热阴虚证幼年大鼠模型的构建及验证

罗菁^{1,2}, 丁伊¹, 詹国平², 邓羿骅¹, 张凡³, 罗银河³, 王孟清^{1✉}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南省长沙市雨花区韶山中路95号, 410007;

2. 深圳市前海蛇口自贸区医院; 3. 湖南中医药大学



[摘要] **目的** 探讨感染后咳嗽肺热阴虚证幼年大鼠模型的建立与验证。**方法** 40只幼年SD大鼠随机分为空白组、模型组、泻白增液汤组、橘红痰咳液组, 每组10只。除空白组外, 其余各组大鼠采用烟熏+脂多糖滴鼻+辣椒素雾化制备感染后咳嗽幼年大鼠模型。实验第1~18天为造模阶段, 实验第19~26天为以方测证阶段。实验第19天开始泻白增液汤组给予浓度为1.48 g/ml的泻白增液汤水煎液10 ml/kg灌胃, 橘红痰咳液组给予橘红痰咳液5 ml/kg灌胃, 空白组、模型组大鼠给予生理盐水10 ml/kg灌胃。各组均每日灌胃1次, 持续7天。分别于实验第1、10、19天, 比较空白组和模型组大鼠肛温、四肢爪心温度、心前区温度、体质量、粪便含水量、饮水量变化。实验第26天, 比较四组大鼠肛温、四肢爪心温度、心前区温度、体质量、粪便含水量、饮水量变化。实验第27天进行咳嗽敏感性测定, 记录大鼠咳嗽潜伏期和5 min内咳嗽次数; 测定肺功能指标 [包括呼气时间 (TE)、增强呼气间歇 (PENH)、呼气末暂停时间 (EEP)、松弛时间 (RT)]; 检测肺泡灌洗液中细胞分类计数及炎症因子 [包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)] 水平; 检测血清环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP) 含量, 并计算cAMP/cGMP值; HE染色观察肺组织病理。**结果** 实验第19天, 与空白组比较, 模型组大鼠体质量降低, 粪便含水量减少, 饮水量增加, 大鼠肛温、四肢爪心温度、心前区温度升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。实验第26天, 与空白组比较, 模型组大鼠体质量、粪便含水量下降, 肛温和四肢爪心温度升高, 饮水量增加, 大鼠咳嗽潜伏期、TE、EEP明显缩短, 5 min内咳嗽次数、RT、PENH明显增加, 肺泡灌洗液中中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞计数及IL-1 β 、TNF- α 水平升高, 血清cAMP、cAMP/cGMP亦升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 泻白增液汤组大鼠体质量和粪便含水量增加, 肛温和四肢爪心温度降低, 饮水量减少, 咳嗽潜伏期、TE、EEP均明显延长, RT、PENH降低, 5 min内咳嗽次数均减少, 肺泡灌洗液中中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞计数及IL-1 β 、TNF- α 水平降低, 血清cAMP、cAMP/cGMP均降低 ($P<0.05$); 橘红痰咳液组仅咳嗽潜伏期、TE、EEP均延长, 5 min内咳嗽次数减少, 中性粒细胞、淋巴细胞计数及TNF- α 水平降低 ($P<0.05$)。HE染色结果显示, 空白组大鼠肺及支气管组织基本正常; 模型组肺组织多见血管充血、淤血, 支气管及支气管周围炎症改变, 较大面积的肺泡壁中度增厚, 肺泡间距增宽; 泻白增液汤组、橘红痰咳液组较模型组肺组织病理损伤均有不同程度减轻, 两组之间对比无明显差异。**结论** 采用联合烟熏+脂多糖滴鼻+辣椒素雾化制备的感染后咳嗽幼年大鼠模型, 具备肺热阴虚证候特征。

[关键词] 感染后咳嗽; 肺热阴虚证; 动物模型; 以方测证; 病证结合

感染后咳嗽 (post-infection cough, PIC) 是小儿常见的慢性咳嗽, 主要症状为迁延不愈的刺激性干咳或咳吐少许白黏痰^[1], 属于中医学“久咳”“顽咳”范畴。既往研究^[2-3]显示, PIC患儿肺热阴

虚证出现频次最高, 且以0~3岁组和4~7岁组肺热阴虚证占比较高。“证”是对疾病所处阶段的病位、病因、病性以及病势等作出的概括, 是对致病因素与机体反应两方面的综合, 在疾病不同的发展阶段其中证候特征也是相对稳定均一的^[4]。因此, 现代医学所建立的疾病动物模型应该具有相应的中医证候特征, 且与人体临床证型相符。2013年李飞侠等^[5]提出采用联合烟熏、脂多糖 (Lipopolysac-

基金项目: 国家自然科学基金(81774368); 深圳市南山区教育(卫生)科技项目(2020046); 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科(4901-020000200207)

✉ 通讯作者: wmqwmq2009@sina.com, (0731)85369185

charide, LPS)滴鼻及辣椒素雾化制备 PIC 大鼠模型,现广泛运用于 PIC 动物实验研究。其中烟熏为目前构建肺阴虚证动物模型重要的干预因素^[6],LPS 又为诱导气道炎症构建肺热咳嗽动物模型的关键因素^[7]。基于此可推测,联合烟熏+LPS 滴鼻+辣椒素雾化构建的 PIC 幼年大鼠模型可能具备肺热阴虚证候特征。本研究拟从造模因素、症状评价、客观指标评价、以方测证 4 个方面^[8]对该模型的中医证候属性进行判定。本实验方案经湖南省中医药研究院实验动物伦理委员会批准(伦理审批号 2021-0110)。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康雄性幼年 SD 大鼠 40 只,体质量 60~80 g,鼠龄 3~4 周,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物合格证号:SCXK(湘)2019-0004,实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2020-0008。在湖南省中医药研究院屏障环境饲养,温度 20.0~26.0℃,相对湿度 40.0%~70.0%,12 h 明暗交替环境,自由饮水,鼠饲料由湖南嘉泰实验动物有限公司提供,批号:SCXK(湘)2020-0006。

1.2 主要试剂及仪器

LPS(默克 Sigma 公司,批号:0000081276);辣椒素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:V10723721);软白沙烟(湖南中烟工业有限责任公司,焦油量 10 mg、烟气烟碱量 1.0 mg、烟气一氧化碳量 13 mg,批号:9601028191012);肿瘤坏死因子 α (TNF- α ,批号:20220215-AF3056)、白细胞介素 1 β (IL-1 β ,批号:20220215-RA20035)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,湖南艾方生物科技有限公司;血清环磷酸腺苷(cAMP,批号:RD8F8F8U4X)、环磷酸鸟苷(cGMP,批号:6MB73TCP7N)ELISA 试剂盒,武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号:20210101);水合氯醛(货号:C23247)、多聚甲醛(货号:C16965),阿法埃莎中国化学有限公司;Diff-Quik 染色液(北京普博斯生物科技有限公司,货号:B1022);伊红-苏木素(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0105S)。

自制烟箱(130 cm×130 cm×50 cm,由湖南省中医药研究院提供);YLS-8B 型小动物雾化给药仪(济南益延科技发展有限公司);RC system 型小动

物肺功能仪(美国 BUXCO 公司);PL3002 型电子天平、AB204 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);MACH1.6/R 型台式高速冷冻离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];En Vision 2105 型多功能酶标仪(珀金埃尔默股份有限公司);TP1020 型脱水仪、EG1150 H 型石蜡包埋机、EMUC7 型切片机(德国徕卡仪器有限公司);Image-Pro Plus7 彩色图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司);Pannoramic MIDI 型全景切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司);DT-8838 型红外测温仪(深圳市精海量电子科技有限公司);FV3000 型超分辨组织成像显微镜(日本 OLYMPUS 公司);RE-2000B 型旋转蒸发仪(上海亚荣仪器有限公司)。

1.3 药物

泻白增液汤由泻白散合增液汤组成,依据《小儿药证直诀》^[9]和《温病条辨》^[10]组方:桑白皮 30 g,地骨皮 30 g,玄参 30 g,麦冬 24 g、生地黄 24 g,甘草 3 g。依据《药理实验方法学》^[11]中人和大鼠的等效剂量换算得出大鼠每日给药剂量为 14.8 g/kg。中药饮片均为广州至信中药饮片有限公司产品,由深圳市前海蛇口自贸区医院中药房制备,药物使用冷水浸泡 30 min,煎煮 2 次,每次 30 min,滤过,合并药液,用旋转蒸发仪浓缩成含生药 1.48 g/ml 的药液,将药液按 100 ml 密封分装,储存于 4℃冰箱,临用前水浴加热。橘红痰咳液(广东化州中药厂制药有限公司,规格:10 ml/支,国药准字:Z44022180),按照人和大鼠的等效剂量换算得出大鼠每日给药剂量为 5 ml/kg。

2 方法

2.1 动物分组及造模

本实验于 2021 年 9 月上旬开始实施,历经白露、秋分两个节气。40 只幼年 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,采用随机数字表法选取 10 只作为空白组,剩余大鼠采用烟熏+LPS 滴鼻+辣椒素雾化制备 PIC 模型^[5]:实验第 1 天采用烟熏建立气道高反应性,将大鼠放入自制烟箱,用 50 g 锯屑+5 支香烟点燃烟熏,每次 30 min,每日 2 次,连续 10 天,期间自由进食、饮水。实验第 11、14、17 天用 LPS 滴鼻诱导气道炎症:使大鼠吸入浓度为 3% 的异氟烷浅麻醉后,鼻腔滴入浓度为 0.4 mg/ml 的 LPS 溶液,滴入量按体质量 1 μ l/g 计算,每日 1 次。实验第 12、13、15、16、18 天用辣椒素雾化诱咳:将大

鼠放入密闭容器中,用0.1 mmol/L的辣椒素溶液雾化吸入,每次3 min,每日1次,此为造模阶段。造模第18天对造模大鼠行辣椒素咳嗽激发试验,若大鼠出现咳嗽、呼吸加快,脚前伸、颈前伸、腹肌收缩等特征性体征,且3 min内咳嗽多于10次,提示造模成功^[5]。将造模成功大鼠采用随机数字表法分成模型组、泻白增液汤组、橘红痰咳液组,每组10只。

2.2 给药方法

从实验第19天开始为以方测证阶段,泻白增液汤方证对应组给予浓度为1.48 g/ml的泻白增液汤水煎液10 ml/kg灌胃,橘红痰咳液方证非对应组给予橘红痰咳液5 ml/kg灌胃,空白组、模型组大鼠给予生理盐水10 ml/kg灌胃。各组灌胃均每日1次,持续7天。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 体质量测定 分别于实验第1、10、19天测量空白组、模型组大鼠体质量,实验第26天,按上述方法测量4组大鼠体质量,评价“形体消瘦”程度。

2.3.2 粪便含水量测定 分别于实验第1、10、19天测量空白组、模型组大鼠粪便含水量,提起大鼠尾部,轻轻按摩其肛门部,促使其排便,取刚排出的新鲜粪便30 mg烘干(70℃,4 h)后再次称重,计算烘干前后大便重量差与烘干前大便重量比值。实验第26天,按上述方法测量4组大鼠粪便含水量,评价“便干”程度。

2.3.3 体温测定 分别于实验第1、10、19天20:00使用红外测温仪检测空白组、模型组大鼠肛温、四肢爪心及心前区温度,将测温探头对准检测部位正中,距离1~2 cm。实验第26天,按上述方法测量4组大鼠体温,评价大鼠“阴虚内热”的程度。

2.3.4 饮水量计算方法 分别于实验第1、10、19天,将空白组、模型组共20只大鼠于5个鼠笼分装。将鼠笼用十字形隔板隔成4个相对独立空间,分别装入1只大鼠,每只大鼠给予一个饮水瓶。统计每只大鼠的饮水量,饮水量=给予每只大鼠的水量-24 h后剩余水量。实验第26天,按照上述方法统计4组大鼠饮水量,评价大鼠“口干多饮”的程度。

2.3.5 行为学观察 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。

2.3.6 咳嗽敏感性检测 于实验第27天取 1×10^{-4} mol/L

的辣椒素溶液作为诱咳液加入多功能雾化给药仪中,对大鼠进行雾化并开始计时,雾化3 min,结束后继续观察2 min,记录各组大鼠咳嗽潜伏期、雾化期间及雾化结束后共5 min的咳嗽次数。

2.3.7 肺功能测定 于实验第27天咳嗽敏感性检测后采用10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠,沿颈部正中做一纵行切口,找到气管,在气管上做一长约1 mm的切口,插入导管,将大鼠卧位于小动物呼吸机的密闭体积描记箱中,检测呼气时间(TE)、增强呼气间歇(PENH)、呼气末暂停时间(EEP)、松弛时间(RT)4个指标。

2.3.8 肺泡灌洗液(BALF)中细胞分类计数及炎症因子测定 上述步骤完成后,结扎右主支气管,经气管插管取生理盐水1 ml灌洗左肺,共3次,回收BALF离心,4℃、3000 r/min(离心半径5 cm)离心10 min,取上清液,采用ELISA检测试剂盒测定TNF- α 和IL-1 β 水平。BALF离心后沉渣经生理盐水重悬,吸取细胞悬液采用Diff-Quik染色液染色细胞涂片,作细胞分类计数。

2.3.9 血清cAMP、cGMP含量测定 大鼠腹主动脉采血,4℃、5000 r/min(离心半径5 cm)离心25 min,取上清液,-20℃冻存,采用ELISA法测定血清cAMP、cGMP含量,操作及方法按试剂盒说明书进行。

2.3.10 肺组织病理 取出大鼠右肺组织放入4%多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片,HE染色,在显微镜下观察各组大鼠支气管及肺组织病变和炎症细胞浸润情况。

2.4 统计学方法

采用SPSS 19.0进行统计分析,计量数据均符合正态分布用均数 $\pm$ 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 造模期空白组和模型组大鼠体质量、粪便含水量、肛温、饮水量比较

表1示,实验第1、10天,模型组与空白组大鼠体质量、粪便含水量、肛温、饮水量差异均无统计学意义($P>0.05$)。实验第19天,与空白组比较,模型组大鼠体质量降低,粪便含水量减少,肛温升高,饮水量明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.2 造模期空白组和模型组大鼠不同时间四肢爪心及心前区温度比较

表2示,实验第1、10天,模型组与空白组大

表 1 造模期空白组和模型组大鼠不同时间体重、粪便含水量、肛温、饮水量比较 (x̄±s)

组别	时间	鼠数	体质量/g	粪便含水量/%	肛温/℃	饮水量/ml
空白组	第 1 天	10	217.05±6.41	11.05±0.90	36.41±0.21	3.42±0.23
	第 10 天	10	272.97±13.87	10.88±1.03	36.82±0.63	3.50±0.27
	第 19 天	10	336.97±12.83	11.43±1.11	36.64±0.37	3.45±0.23
模型组	第 1 天	10	216.53±5.73	10.58±1.03	36.32±0.35	3.43±0.33
	第 10 天	10	265.85±12.90	9.55±1.96	37.31±0.34	3.67±0.27
	第 19 天	10	298.77±10.85 ^{a)}	8.93±1.79 ^{b)}	37.90±0.44 ^{a)}	3.97±0.29 ^{a)}

注: a) 与空白组同时间比较, $P<0.01$; b) 与空白组同时间比较, $P<0.05$ 。

表 2 造模期空白组和模型组大鼠不同时间四肢爪心及心前区温度比较 (℃, x̄±s)

组别	时间	鼠数	左上肢爪心	右上肢爪心	左下肢爪心	右下肢爪心	心前区
空白组	第 1 天	10	32.42±0.23	32.45±0.23	32.53±0.22	32.47±0.23	36.46±0.20
	第 10 天	10	32.50±0.27	32.47±0.23	32.63±0.34	32.58±0.33	36.42±0.17
	第 19 天	10	32.62±0.28	32.60±0.30	32.70±0.52	32.53±0.19	36.47±0.19
模型组	第 1 天	10	32.27±0.29	32.23±0.35	32.32±0.34	32.32±0.34	36.43±0.25
	第 10 天	10	32.83±0.36	32.78±0.37	32.85±0.44	32.85±0.44	36.67±0.42
	第 19 天	10	33.27±0.16 ^{a)}	33.22±0.37 ^{a)}	33.42±0.19 ^{a)}	32.98±0.29 ^{a)}	36.68±0.15 ^{b)}

注: a) 与空白组同时间比较, $P<0.05$; b) 与空白组同时间比较, $P<0.01$ 。

鼠四肢爪心温度、心前区温度比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。实验第 19 天, 模型组大鼠四肢爪心温度、心前区温度较空白组均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.3 各组大鼠实验期间行为学变化比较

空白组大鼠营养良好、肌肉丰满, 毛发有光泽, 性格温顺, 反应灵敏, 呼吸平稳, 鼻部湿润, 无异常表现。模型组大鼠形体消瘦, 毛发无光泽、脱落严重, 逐渐呈现烦躁不安, 反应过激, 呼吸浅快, 鼻干发红, 口渴喜饮。与模型组比较, 泻白增液汤组大鼠毛发干枯掉落、烦躁不安、鼻干、口干等情况均有改善, 呼吸趋于平稳; 橘红痰咳液组大鼠各表现改善不明显。各组大鼠进食量无明显差异。

3.4 实验第 26 天各组大鼠体质量、粪便含水量、肛温、饮水量比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组大鼠体质量降低、粪便含水量减少、肛温升高, 饮水量增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 泻白增液汤组大鼠体质量升高、粪便含水量增加, 肛温降低、饮水量减少 ($P<0.05$), 橘红痰咳液组大鼠各指标

差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。泻白增液汤组与橘红痰咳液组各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3.5 实验第 26 天各组大鼠四肢爪心及心前区温度比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组四肢爪心温度均升高 ($P<0.05$), 心前区温度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组比较, 泻白增液汤组大鼠四肢爪心温度均明显降低 ($P<0.05$), 心前区温度差异无统计学意义 ($P>0.05$), 橘红痰咳液组各温度差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与橘红痰咳液组比较, 泻白增液汤组左上肢爪心温度降低 ($P<0.05$), 其余部位温度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3.6 各组大鼠咳嗽敏感性和肺功能指标比较

表 5 示, 与空白组比较, 模型组大鼠咳嗽潜伏期、TE、EEP 明显缩短, 5 min 内咳嗽次数、RT、PENH 明显增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 泻白增液汤组、橘红痰咳液组大鼠咳嗽潜伏期、TE、EEP 均明显延长, 5 min 内咳嗽次数均明显减少 ($P<0.05$); 泻白增液汤组 RT、PENH 明

表 3 实验第 26 天各组大鼠体质量、粪便含水量、肛温、饮水量比较 (x̄±s)

组别	鼠数	体质量/g	粪便含水量/%	肛温/℃	饮水量/ml
空白组	10	395.38±16.92	11.35±1.15	36.73±0.42	3.53±0.19
模型组	10	341.80±15.68 ^{a)}	8.42±1.37 ^{a)}	37.83±0.45 ^{a)}	3.83±0.17 ^{b)}
泻白增液汤组	10	359.73±9.97 ^{c)}	10.32±1.22 ^{c)}	37.27±0.33 ^{c)}	3.47±0.33 ^{c)}
橘红痰咳液组	10	356.95±10.36	9.68±0.78	37.37±0.29	3.65±0.39

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与空白组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

表 4 实验第 26 天各组大鼠四肢爪心及心前区温度比较

(°C, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	左上肢爪心	右上肢爪心	左下肢爪心	右下肢爪心	心前区
空白组	10	32.70±0.43	32.65±0.44	32.77±0.45	32.60±0.28	36.43±0.21
模型组	10	33.37±0.39 ^{a)}	33.12±0.26 ^{a)}	33.46±0.33 ^{a)}	33.10±0.46 ^{a)}	36.65±0.24
泻白增液汤组	10	32.92±0.25 ^{b) c)}	32.71±0.23 ^{b)}	32.88±0.37 ^{b)}	32.53±0.38 ^{b)}	36.53±0.38
橘红痰咳液组	10	33.22±0.10	32.97±0.32	33.08±0.35	32.75±0.42	36.42±0.21

注: a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与橘红痰咳液组比较, $P < 0.05$ 。

表 5 各组大鼠咳嗽敏感性和肺功能指标比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	咳嗽潜伏期/s	5 min 内咳嗽次数/次	TE/s	EEP/s	RT/s	PENH
空白组	10	59.2±13.0	11.5±3.3	0.411±0.038	0.011±0.003	0.201±0.015	0.594±0.222
模型组	10	39.3±14.5 ^{a)}	22.8±7.4 ^{b)}	0.376±0.003 ^{a)}	0.007±0.002 ^{a)}	0.298±0.093 ^{a)}	0.942±0.281 ^{a)}
泻白增液汤组	10	54.3±11.8 ^{c)}	13.8±5.0 ^{c)}	0.415±0.410 ^{c)}	0.009±0.001 ^{c)}	0.196±0.010 ^{c)}	0.673±0.079 ^{c)}
橘红痰咳液组	10	54.7±11.9 ^{c)}	14.0±2.8 ^{c)}	0.385±0.003 ^{c)}	0.009±0.001 ^{c)}	0.214±0.025	0.742±0.124

注: TE, 呼气时间; EEP, 呼气末暂停时间; RT, 松弛时间; PENH, 增强呼气间歇。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与空白组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

显减少 ($P < 0.05$); 橘红痰咳液组 RT、PENH 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。橘红痰咳液组和泻白增液汤组咳嗽敏感性、肺功能各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.7 各组大鼠 BALF 分类细胞计数及 IL-1 β 、TNF- α 水平比较

表 6 示, 与空白组比较, 模型组大鼠 BALF 中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞计数及 IL-1 β 、TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 泻白增液汤组大鼠 BALF 中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞计数及 IL-1 β 、TNF- α 水平均降低 ($P < 0.05$), 橘红痰咳液组仅中性粒细胞、淋巴细胞、TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$)。泻白增液汤组与橘红痰咳液组 BALF 各分类细胞计数及 IL-1 β 、TNF- α 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.8 各组大鼠血清 cAMP、cGMP 含量比较

表 7 示, 与空白组比较, 模型组大鼠血清 cAMP、cAMP/cGMP 均显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 泻白增液汤组血清 cAMP、cAMP/cGMP 均明显降低 ($P < 0.05$)。泻白增液汤组大鼠 cGMP、

和橘红痰咳液组 cAMP、cGMP 含量和 cAMP/cGMP 与各组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 7 各组大鼠血清 cAMP、cAMP/cGMP 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	cAMP/ pmol·ml ⁻¹	cGMP/ pmol·ml ⁻¹	cAMP/cGMP
空白组	10	38.15±5.63	5.62±1.08	7.08±2.02
模型组	10	47.53±5.62 ^{a)}	4.81±0.36	9.87±0.89 ^{a)}
泻白增液汤组	10	37.05±4.92 ^{b)}	4.43±0.52	8.37±0.73 ^{b)}
橘红痰咳液组	10	39.53±3.10	3.59±0.68	11.56±3.41

注: cAMP, 环磷酸腺苷; cGMP, 环磷酸鸟苷。

a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

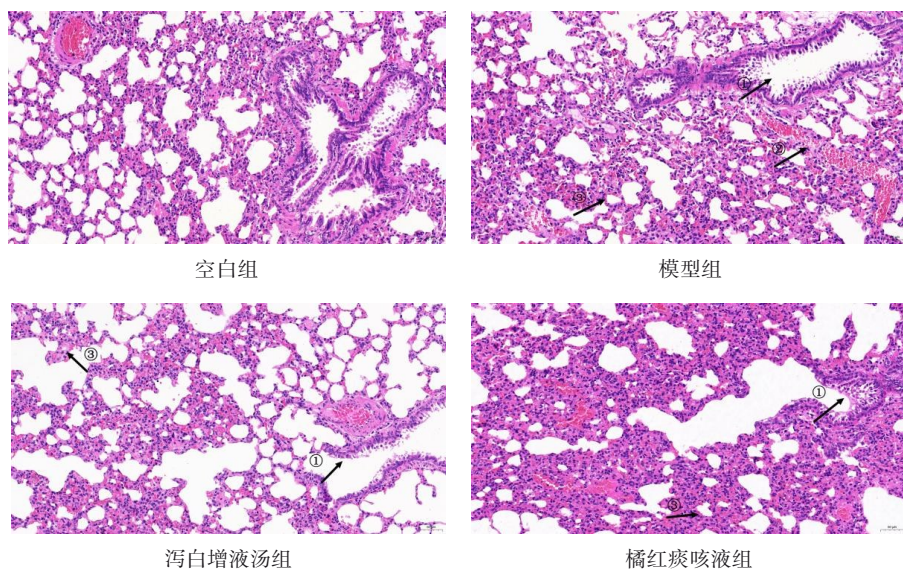
3.9 各组大鼠肺组织病理变化

图 1 (扫描本文二维码获取彩图) 示, 空白组大鼠肺及支气管组织基本正常。模型组支气管及支气管周围炎性改变, 管壁明显增厚, 大量的支气管上皮细胞坏死、脱落, 细胞核固缩深染、碎裂或溶解消失; 肺组织多见血管充血、淤血; 较大面积的肺泡壁中度增厚, 肺泡间距增宽, 并伴有较多的粒细胞。泻白增液汤组、橘红痰咳液组均可见支气管上皮细胞坏死、脱落, 胞核固缩深染、碎裂或溶解消失, 较模型组病变范围缩小; 两组均可见肺泡壁中度增厚, 肺泡间距增宽, 较模型组损伤面积减

表 6 各组大鼠 BALF 分类细胞计数及 IL-1 β 、TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	中性粒细胞/ $\times 10^6$ 个 $\cdot$ L ⁻¹	巨噬细胞/ $\times 10^6$ 个 $\cdot$ L ⁻¹	淋巴细胞/ $\times 10^6$ 个 $\cdot$ L ⁻¹	嗜酸性粒细胞/ $\times 10^6$ 个 $\cdot$ L ⁻¹	TNF- α / pg·ml ⁻¹	IL-1 β / pg·ml ⁻¹
空白组	10	1.098±0.169	9.867±1.174	1.267±0.166	0.313±0.222	34.11±4.73	64.83±6.49
模型组	10	7.455±0.879 ^{a)}	22.333±1.253 ^{a)}	7.750±0.867 ^{a)}	3.583±0.627 ^{a)}	41.80±4.88 ^{b)}	75.41±5.69 ^{b)}
泻白增液汤组	10	6.193±0.636 ^{c)}	20.100±1.275 ^{c)}	6.347±0.799 ^{c)}	2.576±0.471 ^{c)}	36.04±3.41 ^{c)}	69.94±1.49 ^{c)}
橘红痰咳液组	10	6.450±0.535 ^{c)}	21.278±0.771	6.166±1.206 ^{c)}	3.00±0.264	36.58±2.62 ^{c)}	70.13±1.71

注: BALF, 肺泡灌洗液; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α 。a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与空白组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。



注：箭头①指示为细胞核固缩深染、碎裂；箭头②指示为血管充血、淤血；箭头③指示为粒细胞。

图1 各组大鼠肺组织病理改变（HE染色，×20）

少，仅伴有少量的粒细胞；泻白增液汤组、橘红痰咳液组之间病理对比无明显差异。

4 讨论

中医诊疗强调“辨病”与“辨证”相结合，为了更好地模拟中医临床过程，构建稳定可靠、可重复性高、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动物模型，成为开展中医学动物实验研究的关键环节^[4]。目前病证结合动物模型主要分为两种，一种是病证异源的病证结合模型^[12-13]，在现代医学理论的疾病模型基础上，再根据中医理论叠加能导致“证”形成的单重或多重因素。例如现有报道的肺热阴虚证PIC大鼠模型^[7]，即是在PIC疾病模型基础上，再叠加甲状腺素片灌胃，以共同诱导出肺热阴虚证候。然而此种造模思路是将“病”和“证”当作了相对独立的两个方面，甲状腺素片灌胃实则与PIC的形成无直接因果关系。为了复制中医证型而有目的地人为叠加干扰因素，不太符合病证间的内在必然联系，且过多的干扰因素也会影响模型的稳定性与可靠性，同时由西药不良反应构建的中医“证”的动物模型是否与真实的中医证候相同，还有待进一步商榷。

中医的“证”与“病”不是独立存在的，而是相互依存的，在疾病不同阶段自然会出现相应的证候表现。据此，有学者提出另外一种病证结合模型，即病证同源模型^[12-13]。在现有成熟的西医疾病模型上进行中医辨证，判断模型是否具备某些中医“证”的特点，确定某一特定的病证结合模型，无

需额外施加干预因素。基于此，本研究从造模因素、症状、客观指标、以方测证4个方面对PIC幼年大鼠模型的中医证候属性进行评价。

4.1 造模因素

1) 本研究模型采用香烟、木屑烟熏+LPS滴鼻+辣椒素雾化构建。香烟、木屑烟、辣椒素均具有辛热之性，刺激机体后诱发热证，热久伤阴。烟熏常用于构建肺阴虚证模型^[6]，LPS常用于诱发机体炎症反应构建肺热证模型^[7]，此三种干预因素都使机体很大可能产生阴虚燥热变化。2) 动物因素。实验所用动物为幼年SD大鼠，类比小儿“阴常不足，阳常有余”的生理特点，以及感邪后外邪易化热、阴津易受损的病理特点，幼年大鼠在上述三种干预因素作用后，出现肺热阴虚证的可能性较大。3) 造模时机。中医学认为机体与自然界是密切关联的，并具一定规律，《素问·四气调神大论篇》云：“秋三月，此谓容平……此秋气之应，养收之道也，逆之则伤肺”，临床观察秋季亦是呼吸道疾病的高发季节，选择秋季构建肺病模型符合疾病发生规律^[8]。燥为秋季的主气，燥易伤肺，最易损伤肺津，故此时造模出现肺热阴虚的证候可能性更大。

4.2 症状

阴虚内热证主要表现为消瘦、口干多饮、五心烦热、潮热盗汗、小便短赤、大便干燥、舌红少津、少苔、脉细数等症状。本研究将五心烦热、消瘦、口干多饮、大便干燥作为评判阴虚内热证的主要症状依据。研究^[14]显示，在阴虚内热的病理状

态下,机体产热中枢兴奋性增强,下丘脑内神经递质浓度发生改变,体温调定点发生变化,外周血管内血管舒缩因子浓度发生改变,舒缩功能紊乱,故除自觉烦热外,还可出现机体局部温度升高。在阴虚证动物模型研究中,心前区及四肢爪心温度升高可作为反映“五心烦热”的客观指标,而阴虚证动物四肢爪心温度于下午渐升,晚间达到最高,符合阴虚证午后及夜间低热的特点^[15]。故本研究选择检测大鼠 20:00 心前区及四肢爪心温度,结果表明 PIC 模型大鼠四肢爪心温度、心前区温度及肛温均明显升高,具备阴虚证的发热特点。阴虚内热证因体内阴液耗损、机体失养,还表现为消瘦、口干多饮、大便干燥等阴津亏损症状,本研究将大鼠体重增长情况、24 h 饮水量、粪便含水量作为阴液亏损的评价指标。本研究结果表明, PIC 模型大鼠体重增长缓慢,24 h 饮水量明显增加,粪便含水量明显减少,符合消瘦、多饮、大便干燥的阴虚亏虚特点。同时 PIC 模型大鼠咳嗽敏感性显著升高,肺功能出现 TE、EEP 明显缩短,RT、PENH 明显升高,均符合 PIC 的病理特点,提示模型大鼠病位在肺。

4.3 客观指标

现代研究表明,当机体出现热证、阴虚证时,交感神经- β 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-cGMP 系统的功能亢进^[15]。本研究将 cAMP、cGMP 含量以及 cAMP/cGMP 作为评价机体存在热证、阴虚证的客观指标。结果表明, PIC 模型大鼠血清 cAMP 含量及 cAMP/cGMP 均明显升高, cGMP 含量无明显变化,符合阴虚内热的病理生理特点。有研究^[16-18]显示,气道炎症发生时, BALF 中多种炎性细胞,如中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞等均明显升高, TNF- α 和 IL-1 β 是常见的促炎因子,亦是气道刺激因子,可使气道产生炎性改变、气道反应性增高,在机体出现炎症反应时其水平均可显著升高。本研究结果表明, PIC 模型大鼠 BALF 中多种炎性细胞以及 TNF- α 、IL-1 β 水平均明显升高,提示存在气道炎症,机体出现炎症反应,而炎症反应也是机体存在热证的表现^[19]。

4.4 以方测证

泻白散由桑白皮、地骨皮、粳米、甘草组成,方中桑白皮甘寒性降,专入肺经,清泻肺热,止咳平喘,为君药;地骨皮甘寒,清降肺中伏火,为臣药;粳米,甘草养胃和中,为佐使药。增液汤由玄参、生地黄、麦冬组成,方中玄参性咸寒润下,善

滋阴降火、润燥生津,为君药;麦冬甘寒滋润,有滋阴润燥之功,生地黄滋阴壮水、清热润燥,二药共为臣药。上述诸药合用,清泻肺热、滋阴润燥,泻白散合增液汤的适应证应是肺热阴虚证,故设置泻白增液汤组为方证对应组。橘红痰咳液由化橘红、蜜百部、茯苓、制半夏、白前、苦杏仁、五味子、甘草组成,方中化橘红、半夏、茯苓、甘草理气燥湿化痰;百部润肺止咳;苦杏仁、白前宣肺降气,化痰止咳;五味子益气敛收。诸药合用,理气化痰、润肺止咳,其适应证为痰浊阻肺证,故设置橘红痰咳液组为方证非对应组。本研究结果表明,泻白增液汤组大鼠体质量、粪便含水量明显增加,肛温及“五心”温度、饮水量、血清 cAMP、cAMP/cGMP 均明显降低,肺热阴虚证候均得以明显改善,同时咳嗽敏感性降低,气道反应性、气道炎症、肺功能相关指标均明显改善。而橘红痰咳液组仅咳嗽敏感性降低,气道反应性、气道炎症部分客观指标有明显改善,但肺热阴虚证的相关指标无明显改善。通过对比方证对应与方证非对应药物的治疗效果,提示该 PIC 模型符合中医肺热阴虚证候。

综上所述,联合烟熏、脂多糖滴鼻、辣椒素雾化诱咳所构建 PIC 幼年大鼠模型,基本具备 PIC 肺热阴虚证的证候特点,且未施加“证”因素的模型,因干预因素少而更稳定可靠,为中医药防治小儿 PIC 的动物实验研究提供病证结合模型的应用依据。本研究缺乏对舌象、脉象的分析,未使用代谢笼更为精确地统计观察指标。在今后研究中,我们会进一步将舌象分析、脉象分析^[20]引入动物模型中医证候评价方法中,不断完善中医证候的客观评价指标,建立更为全面、准确的动物模型中医证候评价体系。

参考文献

- [1]洪建国.《中国儿童咳嗽诊断与治疗临床实践指南(2021年版)》解读[J].中华医学信息导报,2021,36(22):21.
- [2]河智研.基于数据挖掘的肺炎支原体感染后儿童慢性咳嗽诊治规律分析[D].沈阳:辽宁中医药大学,2017.
- [3]朱梦婷.小儿感染后咳嗽中医证型的归类分析[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2016.
- [4]林传权.病证结合动物模型研究的进展及存在问题分析[J].中华中医药杂志,2019,34(8):3601-3604.
- [5]李飞侠,朱佳,王文,等.一种感染后咳嗽动物模型制作方法的建立及评价[J].中华中医药学刊,2013,31(10):2315-2317.

- [6]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.
- [7]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.
- [8]宋亚刚,李艳,崔琳琳,等. 中医药病证结合动物模型的现代应用研究及思考[J]. 中草药, 2019, 50(16):3971-3978.
- [9]钱乙. 小儿药证直诀[M]. 郭君双,整理. 北京:人民卫生出版社, 2006:76.
- [10]吴塘. 温病条辨[M]. 南京中医药大学温病学教研室,整理. 北京:人民卫生出版社, 2005:105.
- [11]徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982:305.
- [12]彭丹虹,王燕萍,刘晓琪,等. 中医病证结合动物模型评价体系的现状分析[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8):2027-2030.
- [13]任钧国,刘建勋,韦佳慧. 病证结合药理学:中药药理学研究的策略与方法[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19):4922-4929.
- [14]辛伟. 基于下丘脑-垂体-性腺轴季节性功能变化的绝经期大鼠“潮热”的生物学机制研究[D]. 晋中:山西中医药大学, 2020.
- [15]孙晓霞,任威铭,崔荣兴,等. 阴虚证动物模型的建立与评价[J]. 中医杂志, 2021, 62(13):1156-1163.
- [16]翟建宾,赵亮,于士昌,等. 桑苏饮调控TLR4通路抑制哮喘大鼠气道炎症[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14):21-28.
- [17]TAITANO SH, VAN DER VLUGT L, SHEA MM, et al. Differential influence on regulatory B cells by TH2 cytokines affects protection in allergic airway disease [J]. J Immunol, 2018, 201(7):1865-1874.
- [18]BARNIG C, LEVY BD. Innate immunity is a key factor for the resolution of inflammation in asthma [J]. Eur Respir Rev, 2015, 24(135):141-153.
- [19]王志旺,李荣科,刘雪枫,等. 当归对阴虚哮喘小鼠模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21):116-120.
- [20]陈进成,刘建勋,马博,等. 气虚血瘀证大鼠模型的建立与评价[J]. 中医杂志, 2020, 61(3):229-234.

Construction and Verification of Post-infectious Cough Model with Lung Heat and Yin Deficiency Syndrome in Juvenile Rats

LUO Jing^{1,2}, DING Yi¹, ZHAN Guoping², DENG Yijue¹, ZHANG Fan³, LUO Yinhe³, WANG Mengqing¹

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007; 2. Shenzhen Qianhai Shekou Free Trade Zone Hospital; 3. Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the establishment of post-infectious cough model with lung heat and yin deficiency syndrome in juvenile rats, and to verify the model. **Methods** Forty juvenile SD rats were randomly divided into blank group, model group, *Xiebai Zengye Decoction* (泻白增液汤) group and *Juhong Tanke Liquid* (橘红痰咳液) group, with 10 rats in each group. Except for the blank group, rats were exposed to smoke and given lipopolysaccharide nasal drops and capsaicin atomization to prepare post-infectious cough juvenile rat model. The 1st to 18th day was the modeling stage, and the 19th to 26th day of the experiment was the verification stage of the formulas. Since the 19th day, 10 ml/kg of *Xiebai Zengye Decoction* with a concentration of 1.48 g/ml and 5 ml/kg of *Juhong Tanke Liquid* were given by gavage to the corresponding two groups, respectively, while 10 ml/kg of normal saline was administered by gavage to the blank group and model group, once daily for seven days. On the 1st, 10th, and 19th day of the experiment, the rats in the blank group and the model group were compared for changes in anal temperature, paw temperature, precordial temperature, body weight, feces moisture content, and water intake. On the 26th day, the outcomes mentioned above were measured and compared among the four groups. On the 27th day, the cough sensitivity was measured, and the cough latency and the number of coughs within 5 minutes were recorded. The pulmonary function indicators including expiratory time (TE), enhanced expiratory pause (PENH), end-expiratory pause (EEP) and relaxation time (RT) were detected, as well as the alveolar lavage fluid cell differential counts and inflammatory factors including tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 1β (IL- 1β) levels. The content of serum cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) were detected, and the value of cAMP/cGMP was calculated. Lung histopathology was observed by HE staining. **Results** On the 19th day of the experiment, compared to those in the blank group, the body weight of the rats and the feces moisture content significantly decreased in the model group, while the water intake, anal temperature, paw temperature and precordial temperature

increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). On the 26th day, the model group had significantly decreased body weight and feces moisture content, increased anal and paw temperatures, increased water intake, shortened cough latency, TE and EEP, grewed cough number within 5 minutes, RT and PENH, increased levels of neutrophils, macrophages, lymphocytes, eosinophils in the alveolar lavage fluid, as well as the IL-1 β and TNF- α levels, and serum cAMP level and cAMP/cGMP value than the blank group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the body weight and feces moisture content in the *Xiebai Zengye Decoction* group increased, with decreased anal and paw temperatures, reduced water intake, prolonged cough latency, TE and EEP, decreased RT, PENH and cough number within 5 minutes, reduced levels of neutrophils, macrophages, lymphocytes, eosinophils in the alveolar lavage fluid, as well as the IL-1 β and TNF- α levels, and serum cAMP level and cAMP/cGMP value ($P < 0.05$); the cough latency, TE and EEP were prolonged in the *Juhong Tanke Liquid* group, with reduced cough number within 5 minutes, decreased neutrophils and lymphocytes, and the level of TNF- α ($P < 0.05$). HE staining showed that the lung and bronchi tissues of the rats in the blank group were basically normal; the lung tissues of the model group were mostly seen with vascular hyperemia and congestion, inflammatory changes in and around the bronchi, large area of moderately thickened alveolar walls, and widened alveolar spacing; the pathological damage of lung tissues in the *Xiebai Zengye Decoction* group and *Juhong Tanke Liquid* group were alleviated to varying degrees than in the model group, but without significant differences. **Conclusion** The post-infectious cough juvenile rat model prepared by combination of smoke exposure, lipopolysaccharide nasal drops and capsaicin atomization has the characteristics of lung heat and yin deficiency syndrome.

Keywords post-infectious cough; lung heat and yin deficiency syndrome; animal model; syndrome testing with formula; combination of disease and syndrome

(收稿日期: 2022-05-20; 修回日期: 2022-07-18)

[编辑: 邓媛]

广告

《中医杂志(英文版)》欢迎投稿

Journal of Traditional Chinese Medicine [《中医杂志(英文版)》] (ISSN 0255-2922, CN 11-2167/R, 双月刊) 由中华中医药学会与中国中医科学院联合主办, 是我国中医药界具有权威的中医药英文科技期刊, 现发行和交换 90 多个国家和地区。

《中医杂志(英文版)》自 1981 年创刊以来一直坚持正确的办刊宗旨, 国际影响力不断提升。2010 年入选 SCI-E (《科学引文索引》扩刊版), 2011 年获得中国中医科学院自主选题项目资助, 2013 年获得“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助, 自 2012 年起连续被评为“中国最具国际影响力学术期刊”。本刊先后被国际知名文献数据库 MEDLINE、《化学文摘》(CA)、《医学文摘》(EM) 等收录, 是 MEDLINE 收录的第一份中国出版的中医药期刊, 是 SCI 收录的 30 余种全科医学和替代医学期刊中的中国传统医学综合性学术期刊之一。

《中医杂志(英文版)》主要栏目包括循证研究、理论研究、基础研究、临床观察、中药研究、文献研究, 思路与方法、综述等。内容以报道中医药基础、临床研究成果和科研前沿进展为主, 覆盖中医药学科各个领域。欢迎广大专家学者积极投稿。作者可直接登录本刊网站 <http://www.journaltcm.com> 投稿。

联系邮箱: jtcmen@126.com。电话: 010-64089190。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。