

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.05.013

祛风通窍止咳方对上气道咳嗽综合征模型豚鼠咳嗽敏感性 及肺组织、鼻黏膜组织 TRPV4 及神经源性炎症的影响

罗景舒¹, 马建岭²✉, 史利卿², 季坤², 刘松¹, 范钰晗¹, 李先莉¹, 郭兆迪¹

1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 北京中医药大学东方医院

[摘要] **目的** 探讨祛风通窍止咳方治疗上气道咳嗽综合征(UACS)的可能作用机制。**方法** 24只豚鼠随机分为空白组、模型组、中药组、抑制剂组,每组6只。除空白组外,其余各组豚鼠采用腹腔注射卵清蛋白+氢氧化铝致敏后卵清蛋白滴鼻联合烟熏的方法构建UACS豚鼠模型。造模后中药组予祛风通窍止咳方0.9 g/(100 g·d)灌胃,抑制剂组予瞬时受体电位香草酸亚型4(TRPV4)抑制剂GSK2193874 1 mmol/L雾化,每天1次,每次5 min。空白组、模型组给予2 ml/(100 g·d)生理盐水灌胃,每日1次。给药7天后,以0.4 mol/L柠檬酸进行咳嗽激发试验;ELISA检测血清中IgE水平及血清、肺泡灌洗液、鼻腔灌洗液中炎症因子[包括白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素8(IL-8)]水平;HE染色观察肺组织及鼻黏膜组织病理改变;免疫组化法检测肺组织、鼻黏膜组织TRPV4及神经源性炎症因子[包括P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)]蛋白水平;实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)检测肺组织TRPV4、SP、CGRP mRNA表达。**结果** HE染色结果显示,模型组肺组织及鼻黏膜组织结构破坏明显、炎症细胞浸润,而中药组和抑制剂组肺组织、鼻黏膜组织病理损伤有所改善。与空白组比较,模型组咳嗽次数、血清IgE水平及血清、肺泡灌洗液、鼻腔灌洗液中IL-6、IL-8水平增加,肺组织、鼻黏膜组织中TRPV4、SP、CGRP蛋白水平及其mRNA表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,中药组和抑制剂组咳嗽次数、血清IgE水平及肺组织TRPV4、SP mRNA表达降低,中药组血清、肺泡灌洗液、鼻腔灌洗液中IL-6、IL-8水平降低,肺组织、鼻黏膜组织中TRPV4、CGRP蛋白水平降低,抑制剂组血清IL-6、IL-8水平降低,肺泡灌洗液中IL-6水平降低,鼻腔灌洗液中IL-8水平降低,肺组织TRPV4、SP、CGRP蛋白水平及鼻黏膜组织SP、CGRP蛋白水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与中药组比较,抑制剂组血清IgE、IL-6、IL-8水平增加,肺泡灌洗液中IL-6水平增加,鼻腔灌洗液中IL-8水平增加,肺组织SP蛋白水平降低,肺组织TRPV4、SP mRNA表达增加($P<0.01$)。**结论** 祛风通窍止咳方有效减少UACS模型豚鼠咳嗽次数,其机制可能为通过抑制TRPV4的激活,改善气道神经源性炎症,减轻炎症反应,从而降低咳嗽高敏感性。

[关键词] 上气道咳嗽综合征;咳嗽敏感性;瞬时受体电位香草酸亚型4;神经源性炎症;祛风通窍止咳方

上气道咳嗽综合征(upper airway cough syndrome, UACS)是由耳、鼻、喉等上气道各种疾病引起的,由慢性咳嗽、上气道典型临床表现和基础病共同构成的综合征^[1]。UACS发病率高,是我国慢性咳嗽的常见病因之一^[2]。本病可分为鼻源性和咽喉源性,包括鼻炎、鼻窦炎、咽喉炎等,其发病机制与

气道慢性炎症、咳嗽敏感性增高等相关^[3]。其中咳嗽敏感性增高与神经源性炎症关系密切^[4]。研究^[5]表明,气道感觉神经末梢释放的神经肽所致的神经源性炎症广泛存在于UACS患者的气道中。瞬时受体电位(TRP)离子通道定位于气道感觉神经的特定亚群中,被激活后可释放大量神经肽类物质,诱导神经源性炎症^[6]。瞬时受体电位香草酸亚型4(TRPV4)属于TRP离子通道的一员,广泛表达在呼吸道的上皮细胞、巨噬细胞等细胞上,在背根

基金项目:国家自然科学基金(82474472);2023年北京中医药大学研究生自主科研课题(ZJKT2023096)

✉ 通讯作者:ponymjl@sina.com

节、肺感觉神经元也有所表达,可以被多种刺激物所激活,并参与介导咳嗽高敏感性^[7]。

根据 UACS 的临床特点,中医学多将其归于“久咳”“鼻鼽”“鼻渊”“鼻咽喉”等范畴,并认为风痰恋肺、鼻窍不利、咽喉不畅、肺气失宣是 UACS 的基本病机^[8-9]。本课题组前期研究发现,风邪伏肺为 UACS 患者的重要病机^[10],基于祛风宣肺法拟定的祛风通窍止咳方,临床应用多年,疗效较好。本研究从咳嗽高敏感性、TRPV4 及神经源性炎症角度,探讨祛风通窍止咳方治疗 UACS 的可能作用机制。本实验方案已通过北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会审查(编号:BUCEM-2023112806-4141)。

1 材料

1.1 动物

24 只普通级雄性健康 Hartley 豚鼠,2 周龄,体质量 200~250 g,购于北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司,实验动物许可证号:SYXK(京)2023-0011。饲养于北京中医药大学北京中医药研究院动物实验中心,室温 20~22℃,湿度 30%~50%,12 h 明暗循环,自由进食、饮水,适应性饲养 1 周。

1.2 药物

祛风通窍止咳方:蜜麻黄 6 g,青风藤 14 g,蜜百部 12 g,蜜紫菀 12 g,前胡 10 g,厚朴 6 g,炒苍耳子 10 g,辛夷 10 g,白芷 10 g,薄荷 6 g,蝉蜕 6 g,桔梗 6 g,防风 10 g。饮片购自上海真仁堂药业有限公司,并由该公司制备为浓缩配方代煎液(按药材 2~3 倍量加水,恒温煎煮 40~60 min,采用夹层锅浓缩蒸发水分),浓度为含生药量 2.85 g/ml;TRPV4 抑制剂 GSK2193874 (Med Chem Express 公司,货号 HY-100720)。

1.3 主要试剂及仪器

卵清蛋白(货号 A8041)、二甲基亚砜(DMSO)(货号 D8370)、豚鼠白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒(货号 SEKG-0006),北京索莱宝科技有限公司;氢氧化铝(上海源叶生物科技有限公司,货号 S30353);水合柠檬酸(国药集团化学试剂有限公司,货号 5949-29-1);豚鼠免疫球蛋白 E (IgE,货号 ml203502)、白细胞介素 8 (IL-8) ELISA 试剂盒(货号 ml028194),上海酶联生物科技有限公司;苏木素染液(货号 ZLI-9609)、中性树胶(货号 ZLI-9555)、通用型 P 物质 (SP) 试剂盒(货号 SP-

9000)、DAB 试剂盒(货号 ZLI-9017),北京中杉金桥有限公司;TRIpure 试剂(北京艾德莱生物科技有限公司,货号 RN0102);SuperScript III RT 逆转录试剂盒(成都市蓉为基因生物科技有限公司,货号 A502);TRPV4 抗体(货号 DF8624)、P 物质 (SP) 抗体(货号 DF7522)、降钙素基因相关肽 (CGRP) 抗体(货号 DF7386),美国 Affinity 公司。

自制改良动物雾化箱(有机玻璃,规格:90 cm×90 cm×90 cm,箱体购自北京贝兰博科技有限公司,在此基础上进行了改良);DM3000 型显微镜、ASP200S 型全自动脱水机、G1150 H 型加热石蜡包埋系统、RM2235 型石蜡切片机,德国 Leica 公司;Q2000B 型荧光定量 PCR 仪,杭州朗基科学仪器有限公司。

1.4 分组、造模及给药

将 24 只豚鼠适应性喂养 7 天后,采用随机数字表法分为空白组、模型组、中药组、抑制剂组,每组 6 只。除空白组外其余各组豚鼠建立 UACS 模型^[11-13]:分别于第 1、7、14 和 21 天腹腔注射溶于生理盐水的卵清蛋白(100 μg)和氢氧化铝(5 mg)致敏豚鼠。从第 23 天起,将豚鼠放入自制烟熏箱(规格:90 cm×50 cm×40 cm),连续 14 天,每天 2 次,上午和下午各 10 支香烟(红塔山,含 10 mg 焦油,1 mg 尼古丁),每次 20 min。第 28 天起,用移液枪将卵清蛋白溶液(60 mg/ml)滴入豚鼠双侧鼻腔(每侧 20 μl),连续 7 天致敏。造模结束后进行动物模型初步评价。成模标准^[14]:1) 0.4 mol/L 柠檬酸雾化 5 min,10 min(包括雾化时间)咳嗽次数≥20 次;2) 末次鼻腔激发致敏后 30 min 内,喷嚏次数:1~3 次为 1 分,4~10 次为 2 分,11 次及以上为 3 分;抓鼻次数:1~4 次为 1 分,4 次以上为 4 分;鼻涕:流至前鼻孔为 1 分,超出前鼻孔为 2 分,涕流满面为 3 分。进行积分累加,其症状观察时间为每次给致敏物开始计时,共 30 min,总分≥5 分。

初步验证模型后每侧鼻腔给予 20 μl 卵清蛋白溶液(60 mg/ml)滴鼻维持致敏 7 天,并于每天滴鼻前 1 h,空白组和模型组豚鼠给予生理盐水 2 ml/(100 g·d)灌胃,中药组豚鼠给予祛风通窍止咳方溶液 0.9 g/(100 g·d)灌胃(剂量按照成人体重 70 kg,根据人与豚鼠体表面积药物剂量换算系数计算^[15]),各组均每天灌胃 1 次,持续 7 天;抑制剂组豚鼠给予 GSK2193874 雾化,每天 1 次,剂量为 1 mmol/L,每次 5 min,持续 7 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般状态 自造模开始至给药结束,每日

观察豚鼠一般情况及行为学的变化,包括咳嗽、流涕、打喷嚏、进食饮水、运动等。

1.5.2 咳嗽次数测定 各组豚鼠在最后 1 天给药 10 min 后予以 0.4 mol/L 柠檬酸进行咳嗽激发试验,雾化 5 min,记录 10 min (含雾化时间 5 min) 内的咳嗽次数。

1.5.3 血清炎症因子和 IgE 含量 各组豚鼠于咳嗽次数测定结束后,用乌拉坦 1.5 g/kg 腹腔注射进行麻醉,腹主动脉取血并分离血清。采用 ELISA 法检测血清 IL-6、IL-8、IgE 含量,严格按照说明书进行操作。

1.5.4 肺泡灌洗液、鼻腔灌洗液中 IL-6、IL-8 含量 豚鼠取血完毕后处死,开胸暴露气管及肺,经气管行左肺灌洗,注入完毕停留 30 s 后回吸,收集回吸的灌洗液,反复抽吸 3 次,4 ℃、1500 r/min (离心半径 10 cm) 离心 10 min 后收集上清液。将豚鼠断颈,用磨平大号输液针头前段向上插入气管,缓慢注射生理盐水行鼻腔灌洗,灌洗液自豚鼠前鼻孔流出,1.5 ml 离心管采集,收集约 1 ml。4 ℃、1500 r/min (离心半径 10 cm) 离心 10 min 后取上清液。采用 ELISA 法检测肺泡灌洗液、鼻腔灌洗液中 IL-6、IL-8 含量,严格按照说明书进行操作。

1.5.5 HE 染色观察肺组织、鼻黏膜病理学变化

将豚鼠头部置于冰面,剖开皮肤,钝性分离,沿鼻底将鼻中隔从下方剪断后,再于其后端垂直剪断,取出完整鼻中隔,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h。豚鼠经右心室行肺循环灌流后,取右肺中叶,将其置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,石蜡包埋。将其余各肺叶组织剪切后放入冻存管,置于液氮中。各组豚鼠石蜡包埋的肺组织、鼻黏膜组织切片,脱蜡水化后进行 HE 染色,观察肺组织、鼻黏膜组织病理形态学变化、炎症细胞浸润程度、杯状细胞增生程度等。

1.5.6 肺组织、鼻黏膜组织 TRPV4 及神经源性炎症相关蛋白表达 采用免疫组化法检测,待肺组织和鼻黏膜组织固定 48 h 后,常规石蜡包埋、切片,60 ℃ 烘片 1 h,经二甲苯脱蜡后,用梯度酒精水化,将切片置于 0.1 mol/L 的枸橼酸修复液中进行抗原修复。完成后以 3% H₂O₂ 孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性,封闭,滴加适量一抗置湿盒中 4 ℃ 孵育过夜,后滴加生物素化二抗工作液,室温置湿盒中孵育 20 min。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温置湿盒中孵育 20 min。DAB 剂显色,自来水冲洗,进行苏木素复染,脱水,透明,中性

树胶封片,进行镜检。阳性表达为阳染细胞呈棕黄色。每份标本切片 1 张,每张切片随机选择 3 个高倍镜下支气管视野,采用 Image J 1.54f 图像分析软件系统计算豚鼠肺组织、鼻黏膜组织 TRPV4、SP、CGRP 平均光密度 (AOD) 值。

1.5.7 检测肺组织 TRPV4、神经源性炎症相关因子 mRNA 表达 采用 Real-time PCR 法检测,将肺组织样品研磨粉碎后加入 1 ml Trizol,震荡混匀后,离心,弃上清沉淀,20 μl DEPC 水溶解 RNA 沉淀,提取总 RNA 并进行质量检测,按照逆转录试剂盒说明将 RNA 逆转录为 cDNA,进行扩增,反应条件:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 10 s,58 ℃ 退火 20 s,共 40 个循环,72 ℃ 延伸 20 s。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析 mRNA 相对表达量。引物由北京百奥思科生物医学技术有限公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1 豚鼠肺组织 TRPV4 及神经源性炎症相关因子引物序列
Table 1 Primer sequences for TRPV4 and neurogenic inflammation-related factors in guinea pig lung tissue

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
Actin	上游 CCACCATGTACCCAGGCATT	20
	下游 ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	20
TRPV4	上游 CATGAAGTTCCAGGGTGCCT	20
	下游 GCTGGGATGGTGACGATAGG	20
SP	上游 CCCAGAACCTCAGCCTTCTG	20
	下游 AGAGAACAGGAACCCAGGGT	20
CGRP	上游 GCCACAAACTGACCAAAGCT	20
	下游 GATCTGCTCTCTTCCGTGA	20

注:TRPV4,瞬时受体电位香草酸亚型 4;SP,P 物质;CGRP,降钙素基因相关肽。

1.6 统计学方法

采用 SPSS27.0 统计软件分析数据,计量资料均符合正态分布,用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Tamhane's *T*² 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组豚鼠一般状态比较

空白组豚鼠活动自如、毛色光泽、进食水量正常;模型组、中药组、抑制剂组部分豚鼠掉毛,毛色欠光泽,进食、饮水减少,出现咳嗽、流涕、打喷嚏症状,其中模型组豚鼠较为明显。随着给药时间延长,中药组及抑制剂组豚鼠毛发逐渐恢复蓬松,进食、饮水趋于正常,豚鼠自发咳嗽次数减少,流涕、打喷嚏症状不明显,且中药组豚鼠在毛

色光泽恢复方面优于抑制剂组。

2.2 各组豚鼠咳嗽次数和血清 IgE 水平比较

表 2 示，与空白组比较，模型组豚鼠咳嗽次数增加，血清 IgE 水平升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，中药组、抑制剂组咳嗽次数减少，血清 IgE 水平降低 ($P<0.01$)。与中药组比较，抑制剂组咳嗽次数差异无统计学意义 ($P>0.05$)，血清 IgE 水平升高 ($P<0.01$)。

表 2 各组豚鼠咳嗽次数及血清 IgE 水平比较
Table 2 Comparison of cough frequency and serum IgE levels among guinea pig groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	咳嗽次数/次	IgE/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
空白组	6	14.33±6.83	21.09±4.74
模型组	6	65.67±14.57 ^{a)}	166.09±4.34 ^{a)}
中药组	6	20.33±9.97 ^{b)}	82.26±5.08 ^{b)}
抑制剂组	6	19.83±18.09 ^{b)}	138.54±4.02 ^{b) c)}

注：IgE，免疫球蛋白 E。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
c) 与中药组比较， $P<0.01$ 。

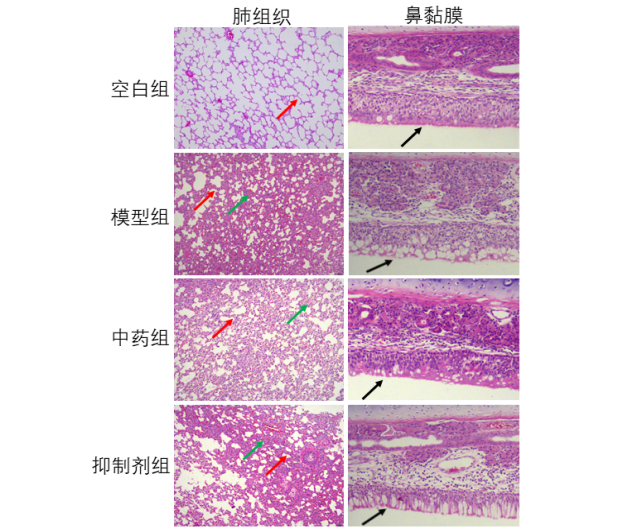
2.3 各组豚鼠血清、肺泡灌洗液、鼻腔灌洗液中 IL-6、IL-8 水平比较

表 3 示，与空白组比较，模型组血清、肺泡灌洗液、鼻腔灌洗液中 IL-6、IL-8 水平均明显增加 ($P<0.01$)；中药组、抑制剂组血清 IL-6、IL-8 水平明显增加，肺泡灌洗液中 IL-6 水平明显增加，鼻腔灌洗液中 IL-8 水平明显增加，抑制剂组肺泡灌洗液中 IL-8 水平、鼻腔灌洗液中 IL-6 水平明显增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，而中药组肺泡灌洗液中 IL-8 水平、鼻腔灌洗液中 IL-6 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组比较，中药组血清、肺泡灌洗液及鼻腔灌洗液 IL-6、IL-8 水平明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；抑制剂组血清 IL-6、IL-8 水平，

肺泡灌洗液 IL-6 水平，鼻腔灌洗液 IL-8 水平均明显降低 ($P<0.01$)，而肺泡灌洗液 IL-8 水平、鼻腔灌洗液 IL-6 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与中药组比较，抑制剂组血清 IL-6、IL-8 水平，肺泡灌洗液 IL-6 水平，鼻腔灌洗液 IL-8 水平均明显增加 ($P<0.01$)，而肺泡灌洗液 IL-8 水平、鼻腔灌洗液 IL-6 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组豚鼠肺组织、鼻黏膜组织病理学比较

图 1 示，空白组豚鼠肺组织结构正常，肺泡间隔薄，未见明显炎性细胞浸润；鼻黏膜组织上皮细胞结构完整，纤毛排列整齐。与空白组比较，模型组豚鼠肺组织肺泡壁增厚，伴大量炎性细胞浸润，组织有血细胞渗出，可见局部肺泡壁断裂损伤；鼻



注：红色箭头指示为肺泡间隔，绿色箭头指示为炎性细胞，黑色箭头指示为鼻上皮黏膜组织。

图 1 各组豚鼠肺组织、鼻黏膜组织病理结果 (HE 染色， $\times 100$)

Figure 1 Pathological results of lung and nasal mucosal tissues in guinea pig groups (HE staining, $\times 100$)

表 3 各组豚鼠血清、肺泡灌洗液、鼻腔灌洗液中 IL-6、IL-8 水平比较
Table 3 Comparison of IL-6 and IL-8 levels in serum, bronchoalveolar lavage fluid, and nasal lavage fluid among guinea pig groups (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	血清		肺泡灌洗液		鼻腔灌洗液	
		IL-6	IL-8	IL-6	IL-8	IL-6	IL-8
空白组	6	65.68±16.34	41.91±4.27	36.96±7.82	35.54±4.00	55.90±14.43	37.32±3.64
模型组	6	620.75±12.01 ^{a)}	171.48±5.13 ^{a)}	920.07±23.59 ^{a)}	145.50±3.20 ^{a)}	650.05±25.85 ^{a)}	168.23±6.10 ^{a)}
中药组	6	138.88±20.60 ^{a) c)}	72.67±4.84 ^{a) c)}	136.73±12.56 ^{a) c)}	64.68±4.71 ^{d)}	158.14±9.69 ^{d)}	92.27±3.89 ^{a) c)}
抑制剂组	6	507.63±26.02 ^{a) c) e)}	121.91±2.66 ^{a) c) e)}	718.73±32.73 ^{a) c) e)}	103.87±2.87 ^{b)}	525.29±13.90 ^{b)}	111.62±4.50 ^{a) c) e)}

注：IL-6，白细胞介素 6；IL-8，白细胞介素 8。
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， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与中药组比较， $P<0.01$ 。

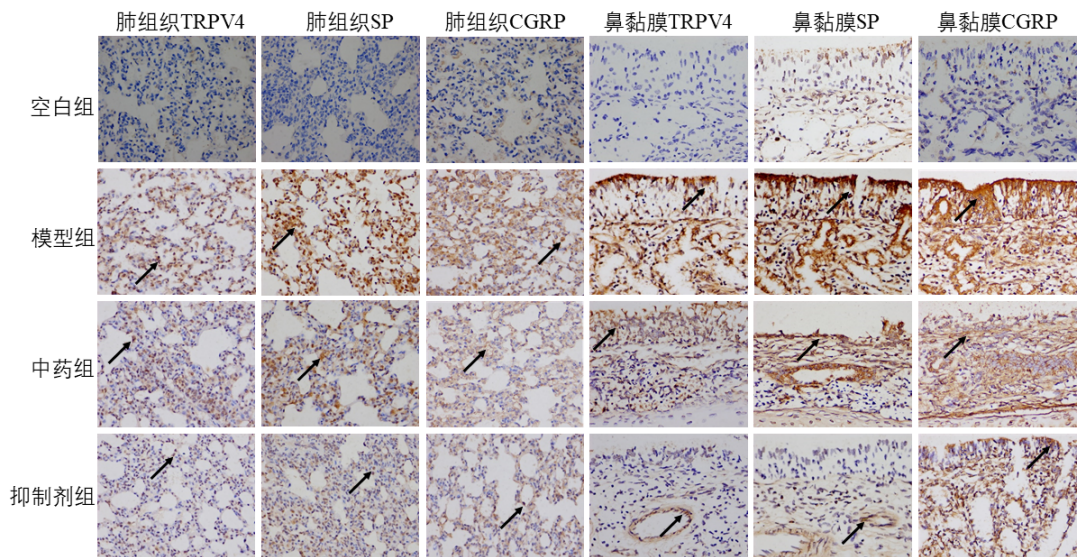
黏膜组织上皮细胞排列紊乱, 黏膜纤毛大量脱落及倒伏, 可见嗜酸性粒细胞浸润和大量杯状细胞增生, 黏膜下嗜酸性粒细胞浸润明显, 可见腺体增生。与模型组比较, 中药组、抑制剂组肺组织及鼻黏膜组织炎性细胞浸润减轻, 结构破坏较轻。与中药组比较, 抑制剂组肺组织炎性细胞浸润、肺泡壁结构破坏及鼻黏膜组织杯状细胞增生更明显。

2.5 各组豚鼠肺组织、鼻黏膜组织 TRPV4、SP、CGRP 蛋白免疫组化检测结果比较

TRPV4、SP、CGRP 表达的免疫阳性反应物呈棕黄色颗粒状, 主要表达在肺泡壁、鼻黏膜上皮、黏膜下腺体。图 2 示, 与空白组比较, 模型组肺组织、鼻黏膜组织内棕黄色颗粒较多, 多数成群分布, 部分呈片状分布。与模型组比较, 中药组、抑

制剂组肺组织、鼻黏膜组织中棕黄色颗粒相对较少, 呈散在分布。与中药组比较, 抑制剂组鼻黏膜组织中 TRPV4、SP 表达的棕黄色颗粒主要分布在黏膜下腺体中。

表 4 示, 与空白组比较, 模型组豚鼠肺组织、鼻黏膜组织中 TRPV4、SP、CGRP 蛋白水平明显增加 ($P<0.01$); 中药组、抑制剂组豚鼠肺组织中 TRPV4、SP 蛋白水平及鼻黏膜组织中 TRPV4、SP、CGRP 蛋白水平均明显增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而中药组、抑制剂组豚鼠肺组织中 CGRP 蛋白表达增加, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组比较, 中药组肺组织、鼻黏膜组织中 TRPV4、CGRP 蛋白水平明显减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 肺组织、鼻黏膜组织 SP 蛋白水平差异无统计学意



注: TRPV4, 瞬时受体电位香草酸亚型 4; SP, P 物质; CGRP, 降钙素基因相关肽; 黑色箭头指示分别为 TRPV4、SP、CGRP 蛋白。

图 2 各组豚鼠肺组织、鼻黏膜组织 TRPV4、SP、CGRP 蛋白免疫组化染色结果 (x400)

Figure 2 Immunohistochemical staining results of TRPV4, SP, and CGRP in lung and nasal mucosal tissues of guinea pig groups (x400)

表 4 各组豚鼠肺组织、鼻黏膜组织 TRPV4、SP、CGRP 蛋白免疫组化 AOD 值比较

Table 4 Comparison of AOD values for TRPV4, SP, and CGRP protein immunohistochemistry in lung and nasal mucosal tissues among guinea pig groups ($\times 10^{-2}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肺组织			鼻黏膜组织		
		TRPV4	SP	CGRP	TRPV4	SP	CGRP
空白组	3	0.47±0.13	0.31±0.18	0.42±0.23	0.23±0.16	0.50±0.23	0.54±0.49
模型组	3	3.70±1.25 ^{a)}	4.16±2.05 ^{a)}	2.39±1.27 ^{a)}	4.34±2.13 ^{a)}	4.38±2.42 ^{a)}	6.16±2.12 ^{a)}
中药组	3	1.80±0.47 ^{a) c)}	2.13±0.29 ^{a)}	0.61±0.30 ^{d)}	1.74±0.71 ^{a) d)}	2.58±2.06 ^{b)}	2.41±0.87 ^{a) c)}
抑制剂组	3	1.64±0.46 ^{a) c)}	1.01±0.43 ^{a) d) c)}	0.52±0.30 ^{d)}	1.86±1.21 ^{b)}	1.10±0.35 ^{a) d)}	1.83±0.47 ^{a) c)}

注: TRPV4, 瞬时受体电位香草酸亚型 4; SP, P 物质; CGRP, 降钙素基因相关肽; AOD, 平均光密度。

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, $P<0.01$; d) 与模型组比较, $P<0.05$; e) 与中药组比较, $P<0.01$ 。

义 ($P>0.05$); 抑制剂组肺组织 TRPV4、SP、CGRP 蛋白及鼻黏膜组织 SP、CGRP 蛋白水平明显减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 鼻黏膜组织 TRPV4 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与中药组比较, 抑制剂组肺组织 SP 蛋白水平明显减少 ($P<0.01$), 肺组织 TRPV4、CGRP 及鼻黏膜组织 SP、CGRP、TRPV4 蛋白水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.6 各组豚鼠肺组织 TRPV4、SP、CGRP mRNA 表达比较

表 5 示, 与空白组比较, 模型组肺组织 TRPV4、SP、CGRP mRNA 表达明显增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 中药组、抑制剂组 TRPV4、SP mRNA 表达明显增加 ($P<0.01$), 但 CGRP mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组比较, 中药组、抑制剂组肺组织 TRPV4、SP mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$), 但 CGRP mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与中药组比较, 抑制剂组肺组织 TRPV4、SP mRNA 表达明显增加 ($P<0.01$), 抑制剂组 CGRP mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 5 各组豚鼠肺组织 TRPV4、SP、CGRP mRNA 表达比较
Table 5 Comparison of TRPV4, SP, and CGRP mRNA expression in guinea pig lung tissues among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TRPV4 mRNA	SP mRNA	CGRP mRNA
空白组	3	0.50±0.08	0.53±0.10	0.57±0.09
模型组	3	1.55±0.07 ^{a)}	2.15±0.14 ^{a)}	1.71±0.11 ^{b)}
中药组	3	1.01±0.03 ^{a) c)}	0.98±0.04 ^{a) c)}	1.03±0.06
抑制剂组	3	1.31±0.07 ^{a) c) d)}	1.83±0.07 ^{a) c) d)}	1.34±0.09

注: TRPV4, 瞬时受体电位香草酸亚型 4; SP, P 物质; CGRP, 降钙素基因相关肽。
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, $P<0.01$; d) 与中药组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

上气道咳嗽综合征是慢性咳嗽的常见病因, 主要临床表现是反复发作的咳嗽, 伴有鼻塞、流涕、喷嚏、鼻后滴流等, 影响患者的生活质量, 临床主要针对其原发疾病进行病因治疗^[16]。本病原发疾病以鼻炎、鼻窦炎、咽喉炎为主, 其中变应性鼻炎较为常见^[17]。研究表明, 变应性鼻炎豚鼠可伴有咳嗽敏感性增高, 其是 UACS 的重要病理生理学特征^[18]。本课题组前期研究结果显示, 风邪伏肺是 UACS 患者最常见的证候类型^[10]。外风内袭, 伏于肺脏, 或脏气不平, 内风扰动, 致伏风盘踞于肺系, 若遇外邪引动, 内外相合, 则肺气失宣, 气逆引咳^[19]。风邪外袭, 留恋肺窍, 肺鼻失和, 清窍不利, 则见鼻塞流涕诸症。治疗 UACS 当以祛风为

大法, 兼以宣肺通窍。祛风通窍止咳方为课题组治疗 UACS 临床常用方剂, 方中蜜麻黄解表宣肺, 功擅祛风, 为君药; 前胡疏散风邪, 降气化痰, 助君药宣肺止咳, 炒苍耳子、辛夷、白芷祛风散寒、通利鼻窍, 助君药祛风通窍, 此四者共为臣药; 厚朴行气宽胸, 可宣通郁结之肺气, 蜜百部、蜜紫菀具润肺化痰止咳之功, 青风藤祛风除湿, 可增强祛风之力, 薄荷、蝉蜕疏散风热, 开窍利咽, 亦可制约诸药温燥之性, 此六者共为佐药; 桔梗宣肺利咽, 可载药上行, 防风祛风解表, 可引药达表, 予风邪以出路, 为使药。本方温中寓清, 升降相济, 共奏祛风宣肺、通窍止咳之功。本研究发现, 祛风通窍止咳方可减少 UACS 模型豚鼠咳嗽次数, 对改善咳嗽高敏感性有积极作用。

UACS 的发病与 Th1/Th2 失衡相关, Th1 型细胞减少, Th2 型细胞增加可加重 UACS 患者的气道炎症细胞浸润^[20]。IL-6、IL-8 属 Th2 型细胞因子, 既往研究发现, UACS 患者血清 IL-6 水平升高^[21], UACS 模型豚鼠血清 IL-6、IL-8 水平升高^[22]。Th2 型细胞因子的激活可导致过敏原特异性 B 细胞合成 IgE, IgE 可活化肥大细胞, 与 UACS 患者气道基底膜的厚度、血管数量以及杯状细胞增生相关^[23]。本研究结果显示, 祛风通窍止咳方下调了 IL-6、IL-8 水平, 减轻外周及局部 Th2 型炎症并降低外周 IgE 水平。HE 染色发现祛风通窍止咳方减轻肺组织、鼻黏膜组织的炎症细胞浸润、血管及杯状细胞增生等情况。初步提示祛风通窍止咳方可能通过降低 IL-6、IL-8 水平来改善 Th2 型炎症, 恢复 Th1/Th2 平衡, 从而减轻 UACS 气道炎症反应。

研究表明, 气道神经源性炎症介导的咳嗽敏感性增高是慢性咳嗽的共同病理机制, 亦是风邪伏肺病机的重要物质基础^[19]。气道神经源性炎症是由轴索反射释放神经肽引起的炎症, SP、CGRP 等神经肽类物质可促进肥大细胞释放大量炎症介质及炎症因子, 诱发气道神经源性炎症反应, 导致咳嗽敏感性增高^[24]。而鼻黏膜神经末梢释放感觉神经肽亦可引发神经源性炎症, 从而诱发变应性鼻炎^[25]。TRPV4 在气道感觉神经元中表达, 其处于气道神经源性炎症的始动环节, 同时表达于鼻黏膜, 与鼻炎、鼻窦炎的发病机制相关^[7, 26-27]。本研究结果显示, UACS 模型豚鼠的肺组织中 TRPV4、SP、CGRP 蛋白及其 mRNA 表达增加, 鼻黏膜组织 TRPV4、SP、CGRP 蛋白表达增加, 而 TRPV4 抑制剂可下调 UACS 模型豚鼠肺组织 TRPV4、SP、CGRP 及鼻黏膜组织 SP、CGRP 蛋白表达, 同时下调肺组织

TRPV4、SP mRNA 表达, 并降低血清 IL-6、IL-8 和 IgE 水平及肺泡灌洗液 IL-6、鼻腔灌洗液 IL-8 水平, 减少豚鼠咳嗽次数, 说明 TRPV4 激活诱导上下气道神经源性炎症可能是 UACS 咳嗽敏感性增高的发病机制。与模型组相比, 祛风通窍止咳方降低了 UACS 模型豚鼠肺组织 TRPV4、CGRP 蛋白及 TRPV4、SP mRNA 表达水平, 降低鼻黏膜组织 TRPV4、CGRP 蛋白表达。祛风通窍止咳方可降低 UACS 豚鼠升高的 TRPV4 表达, 还可不同程度降低神经肽类物质的表达, 表明祛风通窍止咳方对肺组织和鼻黏膜组织 TRPV4 离子通道均有抑制作用, 从而调控气道神经源性炎症的始动环节。与中药组相比, 抑制剂组肺组织 SP 蛋白水平减少, 肺组织 TRPV4、SP mRNA 表达增加, 且血清 IL-6、IL-8、IgE 水平, 肺泡灌洗液 IL-6 水平及鼻腔灌洗液 IL-8 水平均增加。TRPV4 抑制剂 GSK2193874 可选择性的与 TRPV4 结合, 其主要在蛋白功能水平进行调控^[28]。虽然抑制剂在降低神经肽的蛋白水平层面优于中药, 但由于中药具有多靶点、多途径的特点, 其较抑制剂在基因水平上对 TRPV4 及神经肽类物质的调控作用更明显, 更有效减轻炎症反应。以上结果提示祛风通窍止咳方可以抑制 TRPV4 激活, 调控气道神经源性炎症。

综上所述, 祛风通窍止咳方可以有效减少 UACS 模型豚鼠咳嗽次数, 其机制可能为通过抑制 TRPV4 激活, 改善气道神经源性炎症, 减轻炎症反应, 从而降低咳嗽高敏感性。本研究初步探讨了祛风通窍止咳方对 TRPV4 的调控作用, 但未对相关信号通路展开研究, 存在一定局限性, 后续研究可据此进行深入探索。

参考文献

- [1] 赖克方. 慢性咳嗽[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 241.
- [2] LAI K, CHEN R, LIN J, et al. A prospective, multi-center survey on causes of chronic cough in China[J]. Chest, 2013, 143(3): 613-620.
- [3] YU L, XU X, LV H, et al. Advances in upper airway cough syndrome[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2015, 31(5): 223-228.
- [4] CHUNG KF, MCGARVEY L, SONG WJ, et al. Cough hypersensitivity and chronic cough[J]. Nat Rev Dis Primers, 2022, 8(1): 45.
- [5] 季俊峰, 许莉, 张勇, 等. 气道神经源性炎症在上气道咳嗽综合征中的作用[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(9): 1449-1451.
- [6] 马建岭, 王丽云, 季坤, 等. 基于“气道神经源性炎症-TRP 通路”探讨慢性咳嗽发病机制及中医治疗[J]. 天津中医药, 2019, 36(7): 719-723.
- [7] BONVINI SJ, BIRRELL MA, GRACE MS, et al. Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 and airway sensory afferent activation: role of adenosine triphosphate[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(1): 249-261.
- [8] 史锁芳, 张念志, 万丽玲, 等. 上气道咳嗽综合征的中医辨治思路探析[J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(8): 26-28.
- [9] 慕青翔, 代昭欣, 樊茂蓉. 基于“肺阳虚”理论探讨上气道咳嗽综合征的治疗[J]. 北京中医药, 2024, 43(9): 1057-1060.
- [10] 罗景舒, 马建岭, 史利卿, 等. 基于临床回顾性研究的上气道咳嗽综合征证候分布特点探析[J]. 中国医药导报, 2023, 20(34): 139-143.
- [11] BAHEKAR PC, SHAH JH, AYER UB, et al. Validation of guinea pig model of allergic rhinitis by oral and topical drugs[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(11): 1540-1551.
- [12] ZHONG S, NIE YC, GAN ZY, et al. Effects of Schisandra chinensis extracts on cough and pulmonary inflammation in a cough hypersensitivity guinea pig model induced by cigarette smoke exposure[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 165: 73-82. doi: 10.1016/j.jep.2015.02.009.
- [13] 曹治山, 史锁芳. 上气道咳嗽综合征大鼠模型的建立与评价[J]. 江西中医药, 2015, 46(1): 40-42.
- [14] 苗明三, 项丽玲, 苗艳艳. 变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)[J]. 中草药, 2018, 49(1): 50-57.
- [15] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1262.
- [16] 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.
- [17] 张罗, 王向东, 韩德民. 导致慢性上气道咳嗽综合征的鼻腔鼻窦疾病[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2008, 7(6): 404-407.
- [18] BROZMANOVA M, PLEVKOVA J, TATAR M, et al. Cough reflex sensitivity is increased in the guinea pig model of allergic rhinitis[J]. J Physiol Pharmacol, 2008, 59(Suppl 6): 153-161.
- [19] 师艺航, 孙增涛. 从“风邪致病”论治慢性咳嗽高敏感性[J]. 中医杂志, 2021, 62(7): 638-640.
- [20] 张卓然, 靳伟, 陈杰. 上气道咳嗽综合征患者 Th1、Th2 细胞表达水平研究[J]. 中华哮喘杂志(电子版), 2011, 5(4): 247-249.
- [21] 李英会, 张瑾, 杨环玮, 等. 加味取渊汤治疗痰热郁肺型上气道咳嗽综合征疗效及对患儿免疫功能和血清 IL-6、TNF- α 水平的影响[J]. 陕西中医, 2020, 41(3): 308-311.

- [22]唐贤豪, 张徐非, 张进兴, 等. 加味喉科六味汤对上气道咳嗽综合征大鼠血清 IL-6、IL-8、TNF- α 的影响[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(5): 666-669.
- [23]NIIMI A. Structural changes in the airways: cause or effect of chronic cough? [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2011, 24(3): 328-333.
- [24]BARNES PJ. Neurogenic inflammation in the airways [J]. Respir Physiol, 2001, 125(1/2): 145-154.
- [25]李椿莹, 黄海云, 刘晓佳, 等. P 物质在变应性鼻炎发病机制中的研究进展[J]. 中国医药, 2022, 17(1): 153-156.
- [26]LEE K, BYUN J, KIM B, et al. TRPV4-mediated epithelial junction disruption in allergic rhinitis triggered by house dust mites [J]. Am J Rhinol Allergy, 2021, 35(4): 432-440.
- [27]BHARGAVE G, WOODWORTH BA, XIONG G, et al. Transient receptor potential vanilloid type 4 channel expression in chronic rhinosinusitis [J]. Am J Rhinol, 2008, 22(1): 7-12.
- [28]CHEUNG M, BAO W, BEHM DJ, et al. Discovery of GSK2193874: an orally active, potent, and selective blocker of transient receptor potential vanilloid 4 [J]. ACS Med Chem Lett, 2017, 8(5): 549-554.

The Effects of *Qufeng Tongqiao Cough-Relieving Decoction* (祛风通窍止咳方) on Cough Sensitivity, TRPV4 in Lung and Nasal Mucosal Tissues, and Neurogenic Inflammation in a Guinea Pig Model of Upper Airway Cough Syndrome

LUO Jingshu¹, MA Jianling², SHI Liqing², JI Kun², LIU Song¹, FAN Yuhua¹, LI Xianli¹, GUO Zhaodi¹

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the potential mechanism of action of the *Qufeng Tongqiao Cough-relieving Decoction* (祛风通窍止咳方, QTCD) in the treatment of upper airway cough syndrome (UACS). **Methods** Twenty-four guinea pigs were randomly divided into blank group, model group, traditional Chinese medicine (TCM) group, and inhibitor group, with six guinea pigs in each group. Except for the blank group, guinea pigs were sensitized with ovalbumin and aluminum hydroxide via intraperitoneal injection, followed by ovalbumin nasal drops combined with smoke exposure to establish the UACS model. After modeling, the TCM group was administered QTCD 0.9 g/(100 g·d) by gavage, the inhibitor group received the transient receptor potential vanilloid receptor 4 (TRPV4) inhibitor GSK2193874 1 mmol/L, 5 min by nebulisation, and the blank group and model group were given 2 ml/(100 g·d) normal saline by gavage once daily. After 7 days of treatment, a cough provocation test was performed using 0.4 mol/L citric acid. The levels of IgE in serum and inflammatory cytokines, including interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) in serum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and nasal lavage fluid (NLF) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Histopathological changes in lung and nasal mucosal tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Immunohistochemistry was used to detect the protein levels of TRPV4, substance P (SP), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in lung and nasal mucosal tissues. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of *TRPV4*, *SP*, and *CGRP* in lung tissues. **Results** HE staining showed significant structural damage and infiltration of inflammatory cells in the lung and nasal mucosal tissues in the model group, while the TCM group and inhibitor group showed improved pathological changes. Compared with the blank group, the model group showed increased cough frequency, serum IgE level, and IL-6 and IL-8 levels in serum, BALF, and NLF. The protein levels of TRPV4, SP, and CGRP in lung and nasal mucosal tissues and their mRNA expression were elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the TCM group and inhibitor group showed reduced cough frequency, serum IgE level, and *TRPV4* and *SP* mRNA expression in lung tissues. The TCM group showed reduced IL-6 and IL-8 levels in serum, BALF, and NLF, and reduced TRPV4 and CGRP protein levels in lung and nasal mucosal tissues. The inhibitor group showed reduced IL-6 and IL-8 levels in serum, BALF, and NLF, reduced IL-6 in BALF, reduced IL-8 in NLF, and decreased TRPV4, SP, and CGRP protein levels in lung tissues and SP and CGRP protein levels in nasal mucosal tissues ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the TCM group, the inhibitor group had increased serum IgE, IL-6, and IL-8 levels, increased IL-6 level in BALF, and increased IL-8 level in NLF, but decreased SP protein level in lung tissues and increased *TRPV4* and *SP* mRNA expression in lung tissues ($P < 0.01$). **Conclusion** QTCD effectively reduces cough frequency in the UACS guinea pig model. Its mechanism may involve inhibiting the activation of the TRPV4 pathway, improving airway neurogenic inflammation, alleviating inflammatory responses, and reducing cough hypersensitivity.

Keywords upper airway cough syndrome; cough sensitivity; transient receptor potential vanilloid receptor 4 (TRPV4); neurogenic inflammation; *Qufeng Tongqiao Cough-relieving Decoction* (祛风通窍止咳方)

(收稿日期: 2024-09-14; 修回日期: 2024-11-10)

[编辑: 叶晨]