

吕天宜,李得民,杨道文,等. 卵清蛋白(OVA)致敏联合烟熏法建立咳嗽变异型哮喘豚鼠模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 1-7.

Lyu TY, Li DM, Yang DW, et al. Establishment of a cough variant asthma guinea pig model induced by cigarette smoke exposure and OVA sensitization [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(10): 1-7.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.10.001

卵清蛋白(OVA)致敏联合烟熏法建立咳嗽 变异型哮喘豚鼠模型

吕天宜,李得民*,杨道文,程思益

(中日友好医院中医肺病科 中日友好医院呼吸中心 国家呼吸疾病临床研究中心,北京 100029)

【摘要】 目的 尝试用卵清蛋白联合烟熏建立相似度更高的豚鼠 CVA 模型。方法 选取 SPF 级雌雄各半豚鼠 24 只,随机分为空白对照组、OVA 致敏组与 OVA 致敏+烟熏组,共 3 组,每组 8 只豚鼠。OVA 致敏组以卵清蛋白致敏法造模,OVA 致敏+烟熏组以卵清蛋白致敏联合烟熏法造模,余方法一致。检测 3 组受试豚鼠肺顺应性(Cydn)、乙酰甲胆碱激发后气道阻力(RI)、辣椒素激发后咳嗽次数与首次咳嗽时间、肺组织病理及 Ashcroft 分级表评分指标变化,以评估模型。结果 相较于空白对照组,OVA 致敏组与 OVA 致敏+烟熏组 Cydn 明显下降、RI 明显上升、10 min 咳嗽次数明显增加、首次咳嗽时间明显提前、肺组织病理变化明显、Ashcroft 分级表评分明显上升,以上表现均符合咳嗽变异型哮喘特征。同时,相较于 OVA 致敏组,OVA 致敏+烟熏组在咳嗽症状及 RI 变化上有更好表现,更符合咳嗽变异型哮喘特征,这可能与降低 OVA 致敏浓度避免免疫反应过度、烟熏增加咳嗽敏感性密切相关。结论 用 OVA 致敏联合烟熏的方法能建立相似度跟高的咳嗽变异型哮喘豚鼠模型。

【关键词】 呼吸系病;CVA 豚鼠模型;动物实验;卵清蛋白;烟熏

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 10-0001-07

Establishment of a cough variant asthma guinea pig model induced by cigarette smoke exposure and OVA sensitization

LYU Tianyi, LI Demin*, YANG Daowen, CHENG Siyi

(Pulmonary Disease Department, China-Japan Friendship Hospital, National Respiratory Disease
Clinical Research Center, Beijing 100029, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a cough variant asthma (CVA) guinea pig model induced by cigarette smoke exposure and OVA sensitization. **Methods** Twenty-four specific pathogen-free guinea pigs were randomly assigned to three experimental groups: control ($n=8$), OVA ($n=8$), and CS (cigarette smoke)+OVA ($n=8$). Guinea pigs in the OVA group were sensitized with ovalbumin (OVA) and those in the CS+OVA group were sensitized with ovalbumin and exposed to cigarette smoke. At the end of experiment, airway resistance (RI) challenged by four doses of methacholine (0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mg/mL) and lung compliance (Cydn) were measured to determine airway hyper-responsiveness (AHR), and cough latency and the frequency of coughing challenged by capsaicin within 10 minutes were analyzed to

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81704045)。

【作者简介】 吕天宜(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中医药治疗肺系疾病。E-mail:504018469@qq.com

【通信作者】 李得民(1982—),男,主治医师,研究方向:中医药治疗肺系疾病。E-mail:deminli2008@sina.com

evaluate symptoms. Hematoxylin and eosin staining and the Ashcroft score were used to observe the state of lung injury.

Results Compared with the control group, RI, Ashcroft score, and the frequency of coughing in OVA and OVA+CS groups were increased significantly, and Cydn and cough latency were decreased significantly. Compared with the OVA group, the OVA+CS group had better performance in terms of cough symptoms and RI, which was more similar to the characteristics of cough variant asthma. This may be closely related to appropriate reduction of the OVA dose. **Conclusions** The CS+OVA guinea pig model is more consistent with the clinical features of cough variant asthma and can be used as an animal model of cough variant asthma.

【Keywords】 respiratory disease; CVA guinea pig model; animal experiment; ovalbumin; cigarette smoke

咳嗽变异型哮喘(CVA)是慢性咳嗽的主要病因之一,也被认为是哮喘的前期先兆^[1-2]。一方面CVA在病理特征上与典型哮喘相似,另一方面其在咳嗽症状与气道高反应性(AHR)上与典型哮喘有一定的差异^[3]。在目前的文献报道中最常见的咳嗽变异型哮喘造模方法为卵清蛋白致敏法,CVA的发病可能与接触过敏原相关为这一造模方法提供理论依据^[4-5]。但在OVA致敏豚鼠CVA模型中,受试动物常出现对于OVA的免疫过度反应,使得CVA模型反而更趋近于哮喘模型^[6-7]。近些年来,研究人员提出烟熏的方法可以提高模型动物的咳嗽敏感性^[8-9]。因此,本实验组尝试以OVA致敏联合烟熏法建立相似度更高的豚鼠CVA模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级豚鼠24只,雌雄各半,体重280~320 g,6周龄,购于北京科宇动物养殖中心[SCXK(京)2018-0010],饲养于中国中医科学院中药研究所[SYXK(京)2019-0002],研究方案经中国中医科学院委员会机构动物伦理委员会批准(IACUC 20193001),并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

高纯度卵清蛋白(批号:A8041,纯度 $\geq 60\%$)购自Solarbio公司(中国);氢氧化铝(批号:A7130)购自Solarbio公司(中国);二氢辣椒碱(批号:YZ-111666)购自Solarbio公司(中国);乙酰甲胆碱(批号:62-51-1)购自sigma公司(美国);本实验所用香烟为“中南海”彩色纤维素粒子滤嘴香烟(北京卷烟厂;焦油量8 mg;烟气烟碱量0.7 mg;烟气一氧化碳量10 mg)。荧光正置显微镜(厂家:日本奥林巴斯,型号:BX53);离心机(厂家:日本久保田,型号:6500);动物无创肺功能仪与气道阻力和肺顺应性检查系统(RC系统)(厂家:美国DSI公司,型号:BUXCO);压缩雾化吸入机(德国PARI公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂制备

0.2%卵清蛋白溶液:将2 mg OVA和100 mg 氢氧化铝溶于1 mL生理盐水(NS)中配置成;卵清蛋白增敏溶液:将0.01 mg OVA和100 mg 氢氧化铝溶于1 mL NS中;1.0%卵清蛋白溶液:将100 mg OVA溶于10 mL NS中。辣椒素溶液:将30.5 mg 二氢辣椒碱溶于1 mL吐温-80溶液与1 mL无水乙醇中,再加入8 mL NS配置成 10^{-2} mol/L原液,取1 mL 10^{-2} mol/L原液,加入100 mL NS配置成 10^{-4} mol/L辣椒素溶液。乙酰甲胆碱溶液:将0.8 mg乙酰甲胆碱溶于1 mL NS中,取0.75 mL 0.8 mg/mL乙酰甲胆碱溶液加入0.25 mL NS配置成0.6 mg/mL乙酰甲胆碱,将0.8 mg/mL溶液对倍稀释成0.4 mg/mL和0.2 mg/mL乙酰甲胆碱溶液。

1.3.2 建模与分组处理

(1) 烟熏箱与使用方法

烟熏箱为定制的长、宽、高分别为70 cm \times 45 cm \times 50 cm的玻璃箱体。每次放入4个烟熏盒,每个烟熏盒中放入2只豚鼠,共8只豚鼠,在烟熏盘中点燃3只香烟,每次烟熏30 min。

(2) 模型制备方法

实验动物随机分组,分为空白对照组、OVA致敏组与OVA致敏+烟熏组,每组8只豚鼠,雌雄各半,共24只豚鼠。24只豚鼠适应性喂养3 d。第4天OVA致敏组、OVA致敏+烟熏组每只豚鼠腹腔注射0.2%卵清蛋白溶液1 mL,空白组腹腔注射NS 1 mL;第11天OVA致敏组与OVA致敏+烟熏组每只豚鼠腹腔注射增敏卵清蛋白溶液1 mL,空白组腹腔注射1 mL NS;第18~24天OVA致敏组与OVA致敏+烟熏组每只豚鼠以1.0%卵清蛋白雾化攻击,每天每次60 s。第4~24天OVA致敏+烟熏组,每天烟熏30 min。所有动物饲养于SPF级动物房,自由饮用经过净化和消毒处理的动物饮用水,使用经过辐射灭菌的颗粒饲料。

1.3.3 观察指标

(1)咳嗽反应测定

1.0%卵清蛋白溶液雾化攻击结束后第 2 天,将豚鼠放入长、宽、高分别为 40 cm×30 cm×25 cm 引咳箱,引咳箱左右 2 个侧面各有 1 个直径为 2 cm 换气口。用 10⁻⁴ mmol/L 辣椒素溶液引咳 5 min,观察 10 min,以受试豚鼠出现伸出前脚、颈部伸向前、张口等明显咳嗽反应,专用设备扩音后豚鼠咳嗽出声记为一次咳嗽,经 2 名受过培训的专业人员记录首次咳嗽时间及 10 min 咳嗽次数。

(2)气道高反应测定

采用 RC 系统,观测豚鼠气道阻力(RI)和肺顺应性(Cydn)变化。以戊巴比妥钠麻醉受试豚鼠,行气管插管后,测定基值 5 min 并进行 Cydn 测定,之后以 NS 及 4 个剂量乙酰甲胆碱激发,每次给药量 20 μL,顺序为 NS、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL 乙酰甲胆碱溶液进行雾化激发,每次雾化 30 s,记录 4 min 每次药量下的 RI 值。

(3)HE 染色及评分

受试豚鼠行肺功能测试后,立即摘除左肺,置固定液中保存;常规脱水,石蜡包埋,做 4 μm 连续切片,

烤片后放入苏木精染料 10 min 后蒸馏水流水冲洗 1 min,伊红染料 10 min 后常规脱水封片,显微镜下观察肺组织形态并拍照。以 Ashcroft 分级表进行评分。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据的统计分析,数据经检验符合正态分布后(α=0.05),以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行组间比较,两两比较采用 Turkey 法,以 P<0.05 认为具有显著性差异;若数据不符合正态分布,以中位数(四分数间距)(P50(Q))表示,采用非参数分析进行组间比较,两两比较采用 Dumn 法,以 P<0.05 认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 豚鼠首次咳嗽时间及 10 min 咳嗽次数

与空白对照组比较,OVA 致敏组的 10 min 咳嗽次数明显增多(P<0.05),首次咳嗽时间明显提前(P<0.05),差异具有统计学意义。OVA 致敏+烟熏组相对于空白对照组的首次咳嗽时间明显提前(P<0.01),咳嗽次数明显增多(P<0.01),具统计学差异。详见表 1,图 1、2。

表 1 3 组豚鼠咳嗽症状比较^Δ

Table 1 Cough symptoms of guinea pigs in three groups

组别 Groups	10 min 咳嗽次数(次) Cough number in 10 minutes(freq)	首次咳嗽时间(s) Cough latency
空白对照组 Control group	1(0.75)	537.75±66.57
OVA 致敏组 OVA group	4.5(2.5)*	349.75±155.40*
OVA 致敏+烟熏 OVA+CS group	5.5(2.75)**	200.63±114.84**

注:与 Control 组相比,*P<0.05,**P<0.01。^Δ数据符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示,数据不符合正态分布以 P50(Q)表示。下同。

Note. Compared with Control group, *P<0.05, **P<0.01. ^ΔNormal distribution, ($\bar{x} \pm s$). If not,P50(Q).The same as below.

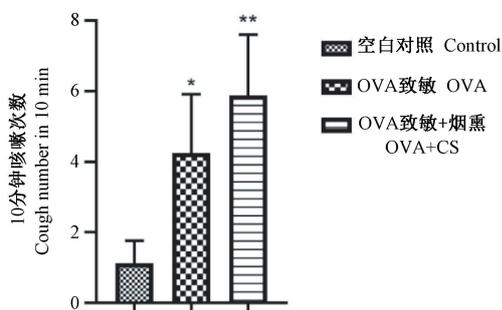


图 1 3 组豚鼠 10 分钟咳嗽次数比较

Figure 1 Cough number in 10 minutes of guinea pig in three groups

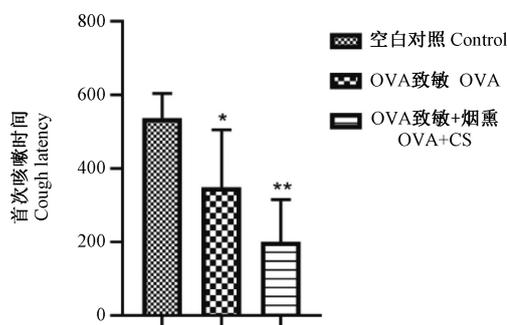


图 2 3 组豚鼠首次咳嗽时间比较

Figure 2 Cough latency in 10 minutes of guinea pig in three groups

2.2 豚鼠气道高反应

气道高反应性是哮喘最重要的病理特征,通常用于区别 CVA 与其他气道炎症疾病。采用四个剂量乙酰甲胆碱雾化攻击,测试空白对照组、OVA 致敏组、OVA 致敏+烟熏组气道阻力变化。结果显示,在盐水及第一个激发量(0.2 mg/mL)时,与空白对照组相比,OVA 致敏组、OVA 致敏+烟熏组的 RI 无明显统计学差异($P>0.05$)。第二个激发量(0.4 mg/mL)激发时,与空白对照组相比,OVA 致敏组 RI 明显上升,有统计学差异($P<0.05$),OVA 致敏+烟熏组 RI 无明显统计学差异($P>0.05$)。在第三个激发量(0.6 mg/mL)时,与空白对照组相比,OVA 致敏组($P<0.01$)、OVA 致敏+烟熏组($P<0.05$) RI 明显上升。在第四个激发量(0.8 mg/mL)时,与空白对照组相比,OVA 致敏组、OVA 致敏+烟熏组 RI 明

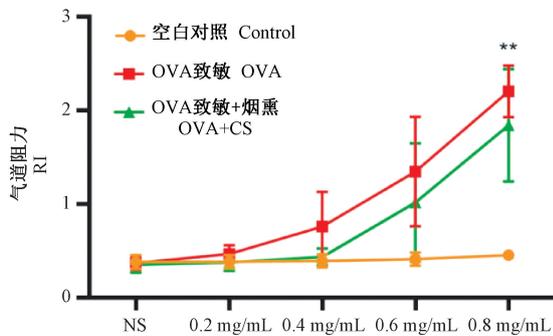


图 3 3 组豚鼠 RI 值比较

Figure 3 RI of guinea pig in three groups

表 2 3 组豚鼠 RI 值比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 RI of guinea pigs in three groups

组别 Groups	NS	0.2 mg/mL	0.4 mg/mL	0.6 mg/mL	0.8 mg/mL
空白对照组 Control group	0.38±0.07	0.39±0.07	0.39±0.07	0.41±0.07	0.46±0.06
OVA 致敏组 OVA group	0.37±0.07	0.47±0.09	0.76±0.37*	1.34±0.59**	2.21±0.28**
OVA 致敏+烟熏组 OVA+CS group	0.35±0.08	0.38±0.09	0.44±0.09	1.02±0.63*	1.85±0.60**

表 3 3 组豚鼠 cydn 值比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Cydn of guinea pigs in three groups

组别 Groups	肺顺应性 Cydn
空白对照组 Control group	0.47±0.10
OVA 致敏组 OVA group	0.32±0.06*
OVA 致敏+烟熏组 OVA+CS group	0.30±0.05*

注:与 Control 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 4 3 组豚鼠 Ashcroft 分级表计分比较(P50(Q))

Table 4 Ashcroft score of guinea pigs in three groups

组别 Groups	Ashcroft 计分 Asherofe score
空白对照组 Control group	1.5(1)
OVA 致敏组 OVA group	6(1)**
OVA 致敏+烟熏组 OVA+CS group	6(1.75)**

注:与 Control 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

显上升,具有统计学差异($P<0.01$)。以 RC 系统测定实验豚鼠 5 min Cydn 变化,与空白对照组相比,OVA 致敏组、OVA 致敏+烟熏组的 Cydn 明显下降,具有统计学差异($P<0.05$)。详见图 3、4、表 2、3。

2.3 豚鼠组织病理学

空白对照组粘膜上皮正常,管腔内脱落细胞少,管壁及周围平滑肌无增厚,嗜酸性粒细胞浸润较少;OVA 致敏组及 OVA 致敏+烟熏组肺组织官腔内脱落细胞多,管壁及周围平滑肌增厚,嗜酸性粒细胞浸润多,临近血管壁增厚,肺泡间隔及肺组织破坏明显。根据以前的研究^[10],我们以 Ashcroft 分级表对 HE 染色涂片进行评分,相较于空白对照组,OVA 致敏组($P<0.01$)与 OVA 致敏+烟熏组($P<0.01$)评分均上升,具有统计学差异。详见图 5、6、表 4。

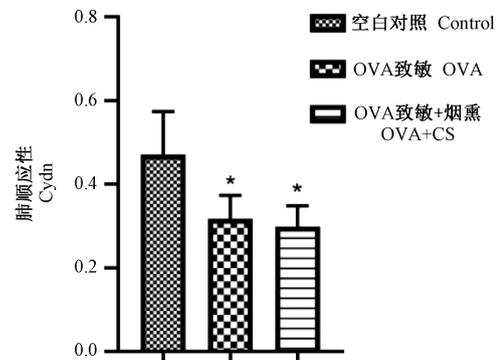


图 4 3 组豚鼠 Cydn 值比较

Figure 4 Cydn of guinea pig in three groups

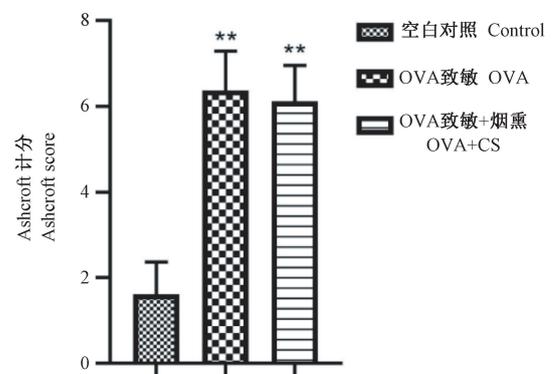
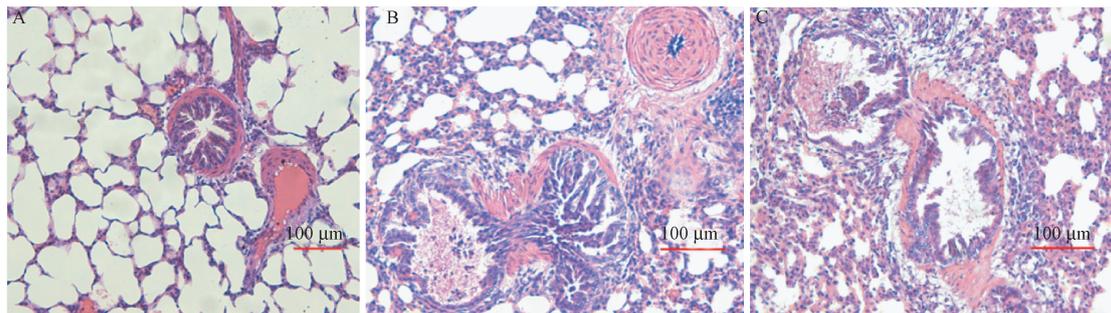


图 5 3 组豚鼠 Ashcroft 分级表计分比较

Figure 5 Ashcroft score of guinea pig in three groups



注:A:空白对照组;B:OVA 致敏组;C:OVA 致敏+烟熏组。

图 6 3 组豚鼠肺组织的病理学改变

Note. A, Control group. B, OVA group. C, OVA+CS group.

Figure 6 Histopathology of the lung tissues of guinea pigs in three groups

3 讨论

咳嗽变异性哮喘(CVA)是常见的呼吸系统疾病,据统计有 50%~80% 儿童和 10%~33% 成人 CVA 患者会发展成为典型哮喘,其也是慢性咳嗽的最主要病因之一^[11-12]。咳嗽症状、肺功能实验以及肺组织病理学改变是诊断 CVA 的最主要依据^[10,13]。CVA 豚鼠模型被广泛应用于咳嗽变异型哮喘的研究,且如何提高模型咳嗽敏感性、降低实验动物死亡率、避免免疫反应过度使得 CVA 模型成为哮喘模型是造模的核心问题^[14-15]。相关研究表明香烟烟雾会导致咳嗽敏感性增加,近些年来多位学者尝试以烟熏的方式增加模型动物的咳嗽敏感性^[16-17]。同时,卵清蛋白致敏法是最为经典的 CVA 造模方法,造模过程主要分为 OVA 腹腔注射及 OVA 雾化攻击两阶段,不同实验组在 OVA 使用浓度上存在较大差异,在 OVA 腹腔注射阶段 OVA 浓度大多在 0.1%~10.0%,在雾化攻击阶段 OVA 浓度大多在 1.0%~5.0%,致敏所用的 OVA 在产家、批次、纯度上差异可能是导致其浓度不同的关键因素^[18-20]。相关研究表明适量减少 OVA 用量可以提高实验模型稳定性,避免免疫反应过度^[21]。

基于以上的论述,本课题组提出以 OVA 致敏联合烟熏的方法制备一批咳嗽变异型哮喘豚鼠模型,并通过测定咳嗽反应、肺功能、评价肺组织病理学改变三种方法评估此动物模型。本课题组在预实验中发现,以 2.0% OVA 溶液腹腔注射,以 10.0%、5.0% OVA 溶液雾化攻击的受试豚鼠,在造模及气道高反应测定阶段时均易产生免疫过度反应,且死亡率也较高,而当 OVA 溶液腹腔注射浓度降低到

0.2%、OVA 溶液雾化攻击浓度较低到 1.0%时,受试豚鼠死亡率明显降低且表现出较为稳定的高气道反应。故在正式实验中,本课题组选用 0.2% OVA 溶液腹腔注射,1.0%浓度 OVA 溶液雾化攻击。实验结果显示与空白对照组相比,OVA 致敏组($P < 0.05$)、OVA 致敏+烟熏组($P < 0.01$)咳嗽次数显著上升,首次咳嗽时间明显提前,且 OVA 致敏+烟熏组($P < 0.01$)更具有统计学差异。这表明 OVA 致敏及 OVA 致敏联合烟熏这两种方法均导致实验动物咳嗽反应增强,而 OVA 致敏联合烟熏相较于单独使用 OVA 致敏咳嗽反应增强更加明显。本实验组在预实验中发现,1.6 mg/mL 乙酰甲胆碱激发试验中实验豚鼠死亡率较高,而在 0.6 mg/mL 时部分豚鼠 RI 已有显著提升,故在正式实验中以 0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL 四个剂量乙酰甲胆碱激发。结果显示,在 NS 及第一个激发剂量(0.2 mg/mL)时,与空白对照组相比,OVA 致敏组、OVA 致敏+烟熏组的 RI 无明显上升。在后三个剂量激发时,与空白对照组相比,OVA 致敏组 RI 明显上升,有统计学差异(0.4 mg/mL $P < 0.05$, 0.6 mg/mL $P < 0.01$, 0.8 mg/mL $P < 0.01$)。直到第三个剂量激发时,与空白对照组相比,OVA 致敏+烟熏组 RI 开始明显上升,具有统计学差异(0.6 mg/mL $P < 0.05$, 0.8 mg/mL $P < 0.01$)。这符合临床及相关实验中气道激发试验时,小剂量乙酰甲胆碱激发时 RI 上升较少,而增大乙酰甲胆碱激发量时 RI 显著上升的特点^[22-23]。这表明相较于空白对照组,OVA 致敏组与 OVA 致敏+烟熏组气道均呈高反应性。值得一提的是,相较于 OVA 致敏组,OVA 致敏+烟熏组 RI 上升更加平缓,这与 CVA 患者的气道高反应性比典型哮喘略低,是

典型哮喘的先导阶段这一特征相符合^[24]。同时,相较于空白对照组,OVA 致敏组、OVA 致敏+烟熏组 Cydn 均明显下降,具有统计学差异($P<0.05$)。在组织病理学方面,相较于空白对照组,OVA 致敏组、OVA 致敏+烟熏组肺组织病理变化更符合咳嗽变异型哮喘肺部病理特征且 Ashcroft 分级表计分具有统计学差异($P<0.01$)。因此我们得出结论相较于空白对照组,OVA 致敏组与 OVA 致敏+烟熏组在咳嗽反应、肺功能测定、肺组织病理学三方面均符合咳嗽变异型哮喘特征。更重要的是,相较于 OVA 致敏组,OVA 致敏+烟熏组咳嗽次数显著上升、首次咳嗽时间明显提前、RI 上升更加平缓,这些结果表明 OVA 致敏+烟熏组有更好的咳嗽敏感性且更加符合咳嗽变异型哮喘气道高反应性较典型哮喘略低这一重要特征。

在此前的研究中,高明等^[9]研究人员已为卵清蛋白致敏联合烟熏建立咳嗽变异型哮喘豚鼠模型打下良好的基础,值得我辈借鉴。但此模型在低浓度乙酰甲胆碱激发时 RI 值明显增加,高浓度时 RI 值不增反降,与 Saito 等^[25]的研究结果有一定的差异,而在本次实验中,CVA 豚鼠模型取得了较好的 RI 表现,即小剂量乙酰甲胆碱激发时 RI 上升较少,而增大乙酰甲胆碱激发量时 RI 显著上升。OVA 致敏豚鼠模型是最经典的动物哮喘模型,但因豚鼠个体差异较大,经常出现受试动物过度反应死亡影响实验结果^[26]。Jiao 等^[8]提出以免疫抑制剂联合 OVA 来避免这种过度反应现象,由此看出对于 OVA 的过度反应是 OVA 致敏豚鼠模型普遍难题。而适量减低 OVA 浓度似乎可以在一定程度上减轻这种过度反应现象。由此我们推测此次 CVA 豚鼠模型取得较好的 RI 表现,可能与本实验组在预实验中排除了 2.0%~10.0% OVA 致敏浓度,选择以 0.2% OVA 溶液腹腔注射、以 1.0% OVA 溶液雾化攻击密切相关。

本研究结果显示:OVA 致敏联合烟熏的咳嗽变异型哮喘豚鼠模型在咳嗽反应、肺功能测定、肺组织病理学三方面均符合咳嗽变异型哮喘特征。同时,相较于单纯使用 OVA 致敏,OVA 致敏联合烟熏造模在咳嗽反应、气道高反应性方面表现更好,更符合咳嗽变异性哮喘的临床特点。一方面在特定实验条件下,降低 OVA 致敏浓度是本模型成功与否

的关键,由于在既往文献中对于致敏 OVA 的厂家、货号、纯度等信息不够重视,为复制模型造成了一定困难,故在先导实验中确定固定厂家、固定货号、固定纯度的 OVA 最适当的致敏浓度是重中之重。另一方面,烟熏提高咳嗽敏感性也是造模成功的重要因素,但为何 OVA 致敏在联合烟熏后气道阻力不升反降,是否烟熏对气道阻力有一定的积极影响这一问题仍待后续研究^[27]。

参考文献:

- [1] Asthma GIF. Pocket Guide for Health Professionals Updated 2019 (for Adults and Children Older than 5 Years) [M]. America: Fundamentals of numerical reservoir simulation, 2019.
- [2] Desai D, Brightling C. Cough due to asthma, cough-variant asthma and non-asthmatic eosinophilic bronchitis [J]. Otolaryngol Clin North Am, 2010, 43(1): 123-130.
- [3] Asthma GIF. Global strategy for asthma management and prevention (2019 update) [M]. America: Fundamentals of numerical reservoir simulation, 2019.
- [4] Kertys M, Grendar M, Kosutova P, et al. Plasma based targeted metabolomic analysis reveals alterations of phosphatidylcholines and oxidative stress markers in guinea pig model of allergic asthma [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(1): 165572.
- [5] Watanabe N, Horie S, Spina D, et al. Immunohistochemical localization of transient receptor potential vanilloid subtype 1 in the trachea of ovalbumin-sensitized guinea pigs [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2008, 146(1): 28-32.
- [6] Mehta AA, Agrawal AD, Appanna V, et al. Vitamin D improves corticosteroid efficacy and attenuates its side-effects in an animal model of asthma [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2015, 93(1): 53-61.
- [7] 陆月明. 咳嗽的动物模型研究方法 [J]. 临床肺科杂志, 2007, 32(5): 480-481.
- [8] Jiao HY, Su WW, Li PB, et al. Therapeutic effects of naringin in a guinea pig model of ovalbumin-induced cough-variant asthma [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2015, 33(8): 59-65.
- [9] 高明, 张忠德, 李际强, 等. 豚鼠咳嗽变异性哮喘模型的建立 [J]. 广东医学, 2016, 37(9): 1290-1292.
- [10] Wang Y, Zhu P, Tan J, et al. Therapeutic effects of kangzhi syrup in a guinea pig model of ovalbumin-induced cough variant asthma [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 54(5): 1-11.
- [11] Fujimura M, Oqawa H, Nishizawa Y, et al. Comparison of atopic cough with cough variant asthma: Is atopic cough a precursor of asthma? [J]. Thorax, 2003, 58(1): 14-18.

- [12] Ding H, Xu X, Wen S, et al. Changing etiological frequency of chronic cough in a tertiary hospital in Shanghai, China [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(8): 3482-3489.
- [13] Hossain SS, Islam MS, Rahman MM, et al. Clinical and demographic profiles of patients diagnosed as cough variant asthma attended at tertiary referral hospital [J]. *J Nation Institut Neurosci Banglad*, 2017, 2(1): 1-30.
- [14] Zhuang J, Zhao L, Gao X. An advanced recording and analysis system for the differentiation of guinea pig cough responses to citric acid and prostaglandin E2 in real time [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0217366.
- [15] Nishitsuji M, Fujimura M, Oribe Y, et al. A guinea pig model for cough variant asthma and role of tachykinins [J]. *Exp Lung Res*, 2004, 30(8): 723737.
- [16] Chung KF, Pavord ID. Prevalence, pathogenesis, and causes of chronic cough [J]. *Lancet*, 2008, 371(9621): 1364-1374.
- [17] 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(1): 73-82.
- [18] Hua S, Liu F, Wang M. Emodin alleviates the airway inflammation of cough variant asthma in mice by regulating the notch pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(1): 5621-5629.
- [19] Liu H, Tao S, Ma H, et al. Functional changes of airway epithelial cells and mitochondria in rat models of asthenic lung and phlegm blocking combined with cough variant asthma [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 5021-5024.
- [20] 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.
- [21] 王谦, 史利卿, 马建岭, 等. 咳嗽敏感性增高豚鼠模型两种造模方法比较研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(5): 92-95.
- [22] Murad HA, Hasanin AH. The anti-inflammatory effects of 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP) compared to dexamethasone in a guinea pig model of ovalbumin induced asthma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(15): 2228-2236.
- [23] Zhang C, Zhang LH, Wu YF, et al. Suhuang antitussive capsule at lower doses attenuates airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling in a murine model of chronic asthma [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21515.
- [24] 钱振福, 崔芳囡. 国内支气管哮喘气道重塑动物模型的研究进展 [J]. *医学综述*, 2009, 15(1): 14-18.
- [25] Saito N, Itoga M, Tamaki M, et al. Cough variant asthma patients are more depressed and anxious than classic asthma patients [J]. *J Psychosom Res*, 2015, 79(1): 18-26.
- [26] Daubeuf F, Frossard N. Eosinophils and the ovalbumin mouse model of asthma [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1178(5): 283-293.
- [27] Jung WJ, Lee SY, Choi SI, et al. Toll-like receptor expression in pulmonary sensory neurons in the bleomycin-induced fibrosis model [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193117.

[收稿日期]2020-04-09