

罗景舒, 马建岭, 罗敬月, 等. 咳嗽动物模型国内外研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(9): 99-112.

Luo JS, Ma JL, Luo JY, et al. Research progress in animal models of cough [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(9): 99-112.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.09.012

咳嗽动物模型国内外研究进展

罗景舒¹, 马建岭^{2*}, 罗敬月³, 史利卿², 温绍惠², 李扭扭², 王丽云²

(1.北京中医药大学第二临床医学院, 北京 100078; 2.北京中医药大学东方医院呼吸热病科, 北京 100078;
3.首都医科大学附属北京胸科医院中医科, 北京 101149)

【摘要】 咳嗽为临床上常见症状, 近年胸部影像无明显异常的慢性咳嗽发病率升高, 其病因复杂, 误诊误治率高, 受到重视。目前研究认为咳嗽高敏感性是其重要的临床与病理生理学特征, 与瞬时受体电位通路激活、气道炎症、神经通路及咳嗽中枢的易化等相关, 然而其机制复杂, 仍需深入研究。咳嗽机制的研究对于新药物的开发、临床疗效的提高、社会经济负担减轻等方面有着重要意义。而咳嗽动物模型对于咳嗽实验研究开展以及其机制阐明具有至关重要的作用, 目前咳嗽动物模型分为单纯咳嗽模型和疾病咳嗽模型, 但因为咳嗽发病机制复杂, 病因较多, 尚无统一的咳嗽模型制备标准, 且仍处于不断的补充与完善之中。针对咳嗽动物模型建立的机制方法和研究进展, 通过查阅和整理近年来国内外的相关文献, 从模型动物的选择、单纯及疾病咳嗽动物模型的建立和应用等方面综合概述该类模型的研究现状, 并进行比较评价, 对当前咳嗽模型制备中的问题进行了思考与阐述, 以期在实验研究中制备咳嗽动物模型、深入研究咳嗽的发病机制、治疗方法等提供参考。

【关键词】 咳嗽; 发病机制; 动物模型; 咳嗽反射; 咳嗽敏感性增高

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 09-0099-14

Research progress in animal models of cough

LUO Jingshu¹, MA Jianling^{2*}, LUO Jingyue³, SHI Liqing², WEN Shaohui², LI Niuniu², WANG Liyun²

(1. the Second Clinical School of Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078, China.

2. Department of Respiratory, Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078.

3. Traditional Chinese Medicine Department, Beijing Chest Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 101149)

【Abstract】 Cough is a common clinical symptom. The incidence of chronic cough without significant abnormalities on chest radiography has recently increased, and its complex etiology and high rates of misdiagnosis and mismanagement have received attention. Cough hypersensitivity has been identified as an important clinical and pathophysiological feature, associated with transient receptor potential pathway activation, airway inflammation, neural pathways, and cough-center facilitation; however, the mechanisms are complex and further detailed studies are needed. Information on cough mechanisms has important implications for the development of new drugs, improvements in clinical efficacy, and the reduction of socioeconomic burdens. Animal models of cough are crucial for experimental research and elucidating the mechanisms responsible for cough. Animal models of cough are currently divided into simple cough models and disease cough models; however, its complex pathogenesis and multiple causes mean that there is no unified standard for preparing cough models, and these continue to be modified and improved. The current review discusses the mechanisms, methods

【基金项目】 北京市自然科学基金 (7192115, 7184224); 国家自然科学基金 (81373588); 东方医院“1166”人才培养项目 (040204001001002012); 北京中医药大学科研基金 (2017-JYB-JS-102, 2018-JYBZZ-JS144)。

【作者简介】 罗景舒 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 呼吸系统疾病中医药防治。E-mail: ljrsrabbit@126.com

【通信作者】 马建岭 (1982—), 男, 主任医师, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 慢性咳嗽的中西医诊疗。E-mail: ponyml@sina.com

and research progress of animal cough models, and comprehensively summarizes the research statuses of these models from the perspectives of animal selection, establishment, and the application of simple and disease cough models, by reviewing the recent relevant global literature. We present a comparative evaluation and reflect and elaborate on the current problems in preparing cough models, to provide references for the preparation of animal models for experimental research and for in-depth research on the pathogenesis and treatment strategies of cough.

[Keywords] cough; pathogenesis; animal model; cough reflex; increased cough sensitivity

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

咳嗽是呼吸门诊常见就诊原因,其中慢性咳嗽占比约 1/3^[1],逐渐受到重视,1998 年美国胸科医师协会制定了第一部咳嗽机制专家共识,此后咳嗽神经生理学相关指南及诊断和治疗指南多次更新,国内于 2021 年更新了最新版指南—《咳嗽的诊断与治疗指南》。尽管咳嗽相关研究在逐步完善,由于其病因复杂,故临床误诊误治率较高,且长期、反复的咳嗽对患者的身心、医疗经济负担及社会保障等方面均造成影响^[1]。而咳嗽机制研究对临床疗效的提高、新药的研制、减少社会经济保障负担等方面具有重要意义。

关于发病机制研究,人体试验目前只有针对死亡患者短期内捐献遗体迷走神经及气道平滑肌的相关研究^[2],其仍具有相对复杂、标本较少、取材及时限短等局限性,因此动物实验研究为主要途径。可靠且可重复的动物模型是研究疾病病因、发病机制、治疗方法及开发新药的基础,选择合适的实验动物以及造模方法对咳嗽相关研究也具有重要意义。随着认识的不断深入,实验技术的推进,咳嗽动物模型造模方法亦在不断改进,另外基于国内外咳嗽指南不断发布,咳嗽分类及相关病种亦有较大变化,相关疾病模型有较多探讨,检索发现专项咳嗽动物模型文献亟待更新。本团队咳嗽专项临床及实验研究 20 年,笔者导师近期于英国帝国理工大学国立心肺研究所对咳嗽机制方面进行了专项实验研究,相关成果于国际会议学术交流^[3-4],对各种咳嗽模型的制备有较为深入的研究,并参与国内最新版指南制定,结合既往经验,现对咳嗽动物实验相关动物模型研究新进展进行整理比较及总结,以为相关研究提供参考(表 1、表 2)。

1 模型动物的选择

目前豚鼠、大小鼠、犬、猫、猪等动物常用,不同动物咳嗽反射的形式相异,其调节咳嗽反射的方式有所不同,对激发咳嗽的因素和反应也各有不同,因此为了适应不同研究目的及要求,应选用合理的

模型动物。

啮齿类小型动物如大小鼠、豚鼠,繁殖快,数量大,饲养繁殖及药物成本低,更易操作及进行大批量研究。大小鼠的咳嗽反射与人类差异较大,且不敏感,但小鼠转基因型模型完备,可用新技术较多,既往认为小鼠气道可能缺乏咳嗽反射所需部分神经突触及通路,难以区分咳嗽反射和呼气反射,然而近年来有研究表明可通过 Buxco 公司的全身体积描记系统(whole body plethysmography, WBP)识别小鼠咳嗽反射^[5],故用小鼠进行咳嗽研究也更普遍。而大鼠需要麻醉,抑制中枢,难于产生咳嗽,且其咳嗽反射来源于喉不是支气管束,并不是咳嗽模型的理想动物。

犬、猫、猪等大型动物的实验操作较为容易,可用于研究药物的进一步筛选。犬适用于观察镇咳药物的作用时间,猫在受机械或化学刺激后易诱发咳嗽,但该类动物成本高,故由于经济和来源上的考虑,上述动物多用于确定药物初筛后的镇咳疗效。

豚鼠免疫系统发达,对于化学刺激十分敏感,大多雾化引咳药易引起咳嗽,其咳嗽反射与人类相似;与清醒状态下的动物相比,麻醉动物和人之间的咳嗽反应性存在不同,而豚鼠可在清醒、不限制活动的状态下进行研究;体外研究提示机械刺激豚鼠迷走神经引起的去极化过程与人类亦较为相似;另外豚鼠还有占地小、脾气温顺、无攻击性的特点,其咳嗽监测也有成熟的软件,因此豚鼠作为咳嗽模型动物最为理想,是近年来咳嗽新药药理研究、咳嗽反射及相关研究最常用的动物^[6-7]。

2 单纯咳嗽模型

人类咳嗽的病理生理改变包括无明显的肺部炎症,以及对外界环境的刺激表现为咳嗽敏感性的提高,理想的咳嗽动物模型应具备上述特点^[6]。

单纯咳嗽模型是指直接通过刺激物刺激而制备的咳嗽模型,此类模型常被用于研究咳嗽反射的发生机制和咳嗽新药的研发等。咳嗽由一系列神

表 1 单纯咳嗽动物模型比较
Table 1 Comparison of animal models of simple cough

造模方法 Methods	具体分类 Sorts	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	适宜研究类型 Suitable study types
机械刺激法 Mechanical Stimulation	直接操作 Direct operation	简便易行 Easy to use	需麻醉,不能保证刺激强度一致,难以定量比较 Requires anesthesia, does not guarantee consistent stimulus intensity, difficult to compare quantitatively	咳嗽反射机制 Cough reflex mechanism
	改良仪器 Improved instrumentation	较为复杂 More complex	需麻醉,可以控制强度,定量比较 Requires anesthesia, can control intensity, comparison quantitatively	
	氨水引咳法 Ammonia induced cough method	试剂用量少,较易操作 Low dosage of reagents, easier to handle	对肺部有损伤,咳嗽反应性差异较大 Damage to the lungs and wide variation in cough responsiveness	初步筛选镇咳药物 Initial screening of cough suppressants
化学刺激法 Chemical stimulation	雾化吸入 Nebulized inhalation	较为便捷 More convenient	真正药物吸入量难以控制,刺激局部,引起咳嗽混淆动作 Amount of real drug inhalation is difficult to control, irritating the local area and causing confusing coughing movements	咳嗽反射机制、药物干预及新药开发等研究,可激活 C 纤维上的 TRPV1 受体和 Aδ 传入纤维末端 Research on cough reflex mechanisms, pharmacological interventions and new drug development activates TRPV1 receptors on C-fibers and Aδ afferent fiber ends
	柠檬酸引咳法 Citric acid cough inducing method	较少引起混淆动作;控制咳嗽刺激物作用部位;确保咳嗽刺激物用量的准确性 Less likely to cause confusion; control the site of action of the cough stimulant; ensure the accuracy of the cough stimulant dosage	耗时间久、需要麻醉、操作技术复杂、动物死亡率相对偏高 Time consuming, requires anesthesia, complex operation techniques, and relatively high animal mortality	
	辣椒素引咳法 Capsaicin cough inducing method	具体分类及优缺点同柠檬酸引咳法 The specific classification and advantages and disadvantages are the same as citric acid induced cough method		咳嗽反射机制、药物干预及新药开发等研究,可激活 C 纤维上的 TRPV1 受体 Studies on cough reflex mechanisms, pharmacological interventions and new drug development that activate TRPV1 receptors on C-fibers
电刺激法 Electrical stimulation method	AITC 引咳法 AITC cough inducing method	/	诱咳效力弱于辣椒素 Weaker cough inducing effect than capsaicin	咳嗽反射机制,可特异性激活迷走 C 纤维上的 TRPA1 受体 Cough reflex mechanism that specifically activates TRPA1 receptors on vagal C fibers
	/	刺激频率和强度可以精确定量比较 Stimulation frequency and intensity can be compared precisely and quantitatively	需麻醉,动物损伤大,操作复杂 Requires anesthesia, animal damage, complex operation	分析药物是中枢镇咳还是末梢止咳 Analysis of whether the drug is a central or peripheral cough suppressant

表 2 疾病咳嗽动物模型比较

Table 2 Comparison of animal models of disease cough

疾病 Diseases	造模方法 Methods	模型特点 Features	存在问题 Problems
感染后咳嗽 Post-infectious cough	呼吸道合胞病毒感染法 Respiratory syncytial virus infection method	模拟亚急性病程, 气道炎症和气道高反应性 Simulates a subacute course with airway inflammation and airway hyperresponsiveness	/
	脂多糖感染法 Lipopolysaccharide infection method	具有咳嗽敏感性增高、呼吸道黏膜损伤、气道炎症、氧化应激的特点 Characterized by increased cough sensitivity, respiratory mucosal damage, airway inflammation, and oxidative stress	气管内滴注操作较为复杂, 小鼠死亡率高 Intratracheal drip is more complex and has high mortality in mice
	上述两种方法联合烟熏 Above two methods combined with fuming	增强气道高反应性及咳嗽高敏感性 Enhanced airway hyperresponsiveness and cough hypersensitivity	/
变应性咳嗽 Atopic cough	卵蛋白致敏引咳法 Ovalbumin sensitization method to induce cough	干咳(支气管扩张剂处理有效)、无喘息、全气道嗜酸粒细胞炎症、气道反应性轻度升高 Dry cough (effective with bronchodilator treatment), no wheezing, whole airway eosinophilic inflammation, mildly elevated airway responsiveness	与我国临床变应性咳嗽诊断标准不同 Different diagnostic criteria from our clinical allergic cough
	卵蛋白致敏联合环磷酰胺加强免疫抑制 Enhanced immunosuppression by ovalbumin sensitization combined with cyclophosphamide	气道收缩反应随乙酰甲胆碱浓度增高而平缓上升 Airway constriction response rises gently with increasing acetylcholine concentration	动物死亡率较高、咳嗽反应均一性较差 Higher animal mortality and poorer uniformity of cough response
咳嗽变异性哮喘 Cough variant asthma	卵蛋白致敏引咳法 Ovalbumin sensitization method to induce cough	干咳(支气管扩张剂处理有效)、无喘息、组织病理示全气道嗜酸粒细胞炎症、气道反应性轻度升高 Dry cough (effective with bronchodilator treatment), no wheezing, histopathology shows total airway eosinophilic inflammation, mildly elevated airway reactivity	/
	卵蛋白致敏联合烟熏 Ovalbumin sensitization combined with fuming	咳嗽敏感性增高、气道阻力平缓上升、肺组织嗜酸性粒细胞浸润增多; 更符合 CVA 气道高反应性较典型哮喘略低的重要特征 Increased cough sensitivity, gentle rise in airway resistance, and increased eosinophil infiltration of lung tissue; more consistent with the important features of CVA airway hyperresponsiveness being slightly lower than typical asthma	/
上气道咳嗽综合征 Upper airway cough syndrome	膨胀海绵填塞鼻腔联合香烟雾化 Expansion sponge stuffing of the nasal cavity combined with cigarette nebulization	避开致敏, 将鼻窦疾病与气道炎症等因素结合起来 Avoiding sensitization and combining sinus disease with airway inflammation and other factors	病因复杂, 单一造模不能完全模拟该病 Etiology is complex and a single modeling cannot fully simulate the disease
嗜酸性粒细胞性支气管炎 Eosinophilic bronchitis	多粘菌素 B 刺激 Polymyxin B stimulation	气管及支气管粘膜有大量嗜酸性粒细胞浸润、肺泡结构及气道反应性正常、咳嗽敏感性增高 Massive eosinophil infiltration in tracheal and bronchial mucosa, normal alveolar structure and airway responsiveness, increased cough sensitivity	多粘菌素 B 仅是肥大细胞、嗜碱性粒细胞释放组胺的刺激剂, 并不是公认的抗原刺激剂 Polymyxin B is only a stimulator of histamine release from mast cells and basophils and is not a recognized antigenic stimulant

续表2

疾病 Diseases	造模方法 Methods	模型特点 Features	存在问题 Problems
	卵蛋白激发 Ovalbumin stimulation	具有慢性咳嗽、气道嗜酸性粒细胞浸润、对类固醇治疗有反应、无气道高反应性的基本特征 Essential features of chronic cough, airway eosinophil infiltration, response to steroid therapy, and absence of airway hyperresponsiveness	/
胃食管反流性咳嗽 Gastroesophageal reflux-related chronic cough	手术造模 Surgical moulding	/	手术复杂, 术后死亡率高 Complex surgery and high postoperative mortality
	反复食管滴注盐酸 Repeated esophageal drips of hydrochloric acid	食管下段与食管炎模型类似, 气管、支气管组织有炎症细胞浸润, 可引起豚鼠气道神经源性炎症 Lower esophagus is similar to the esophagitis model with inflammatory cell infiltration in tracheal and bronchial tissues, which can cause neurogenic inflammation in the guinea pig airway	/
其他咳嗽高敏综合征 Cough hypersensitivity syndrome	空气污染物暴露 Air pollutant exposure	咳嗽敏感性增高, 非过敏性嗜酸性炎症 Increased cough sensitivity, non-allergic eosinophilic inflammation	/
	香烟烟雾诱导 Cigarette smoke induction	咳嗽敏感度增加, 非特异性呼吸道炎症 Increased cough sensitivity, non-specific respiratory inflammation	/

经反射所构成, 受刺激后, 迷走神经传导信号至位于延髓的咳嗽中枢, 中枢整合后再下传至相应的运动神经, 进而引发。与咳嗽反射密切相关的气道传入神经为 A δ 纤维(有髓鞘)和 C 纤维(无髓鞘), 其末梢突触分别主要感受机械刺激及化学刺激。根据以上神经反射机制, 单纯咳嗽模型的制备主要有机械刺激、化学刺激、电刺激、抗原致敏引咳等方法。

2.1 机械刺激法

机械刺激法是指通过刺激有髓鞘的迷走 A δ 传入纤维引起单纯咳嗽, 基本操作方法如下: 将细长纤维如聚乙烯管、兔胡须等置入动物喉部或者气道内, 反复操作 2~3 次, 可导致其剧烈、快速的咳嗽; 或者用异物直接放入气管套管内操作来引发咳嗽。Poliacek 等^[8]使用软聚乙烯导管机械刺激麻醉猫的胸腔内气道, 导管在气管内周期性来回移动 6~8 次, 持续 10 s, 以引起反复咳嗽, 该法所有刺激都由一名实验者进行, 以尽量保证刺激强度的可比性。机械刺激法简便易行, 但需在麻醉状态下进行, 尽管由同一名实验者进行, 仍不能保证刺激强度一致, 难以定量比较。

Varechova 等^[9]和 Foucaud 等^[10]使用改良仪器来进行气管机械刺激引咳, 具体如下: 在麻醉兔气管切开后, 置入硅胶半刚性导管, 穿过气管导管的侧端口直至引发咳嗽(一般距离导管出口 3~4

cm)。该导管由一个小型电机驱动, 该电机旋转导管(每秒 60 个周期)并在短时间(刺激时间设置为 150 ms)内将其尖端摩擦到气道粘膜上, 而来自发动机的电信号可以作为准确识别刺激时间过程的标记。此种方法虽然较上述方法稍繁琐, 但是可以控制强度, 从而能够定量比较。

2.2 化学刺激法

化学刺激法是指采用化学物质(咳嗽刺激剂)刺激呼吸系统引起咳嗽, 该法快速简便易行、对样本伤害小、引咳时可保证样本处于清醒状态, 因此常用, 其药物多选用氨水、柠檬酸、辣椒素、异硫氰酸烯丙酯(allyl isothiocyanate, AITC)等。

氨水引咳法是常用的化学刺激法, 多采用小鼠进行造模。梁婷等^[11]采用氨水诱咳造模法如下: 以雄性 ICR 小鼠为例, 在倒扣烧杯(500 mL)中放入一个棉球, 并将 300 μ L 25% 的氨水滴入该棉球中, 待 1 min 饱和后再将小鼠放入该烧杯中 45 s, 取出后置于另一烧杯中, 对小鼠咳嗽情况进行记录, 观察典型咳嗽动作(腹肌收缩, 有咳声), 记录咳嗽潜伏期(从取出开始到第 1 次咳嗽的时间)及 5 min 内咳嗽次数。结果显示模型小鼠咳嗽次数增加, 咳嗽潜伏期缩短, 提示造模成功。氨水引咳法中, 氨水体积浓度常在 13%~25% 之间, 建议在开展正式实验前进行咳嗽敏感性筛选的预实验以确定适合的激动

剂浓度。使用倒扣烧杯进行氨水引咳为常用的简便诱咳方法之一,但是烧杯容量、氨水用量、饱和时间等尚无统一标准,且氨水挥发量受温度、时间影响。而多功能诱咳引喘仪可以控制药物定时、定量、定浓度,保持物质原有性质,相较于使用烧杯进行氨水诱咳法更易定量控制,故近年来应用较多^[12]。氨水诱咳用量小,较易操作,但吸入氨水对肺部有损伤,且氨水诱发小鼠咳嗽反应性差异较大,故氨水诱咳制备模型多用于初步筛选镇咳药物。

近年来瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)家族在咳嗽发生机制中的作用逐渐受到关注。TRP 通道属于非选择性的阳离子通道蛋白,受环境温度、pH、化学物质、渗透压等刺激后,细胞内外阳离子通透性变化,进而调节细胞功能。气道中分布众多感觉神经元上皮,其可表达多种 TRP 家族成员,被各种外源或内源性物质激活后,产生各种神经肽,继而出现局部组织血管扩张和通透性增加、炎性细胞渗出、黏膜出血水肿等神经源性炎症现象,导致咳嗽^[13-15]。在 TRP 家族中,瞬时感受器电位香草酸受体 1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)和瞬时受体电位锚蛋白 1(transient receptor potential ankyrin 1, TRPA1)近年来研究较为深入,TRPV1 为非选择性阳离子通道,首先被证实可介导豚鼠咳嗽反射,而 TRPA1 为非选择性钙离子通道,与 TRPV1 相类似,二者均广泛分布于感觉神经元细胞,因此其激动剂多用于诱咳及评价咳嗽敏感性。常用激动剂包括柠檬酸、辣椒素、AITC 等^[6,16]。

柠檬酸通过刺激 C 纤维上的 TRPV1 受体和 A δ 传入纤维末端致咳,造模动物多选择豚鼠或小鼠,其咳嗽模型主要用于咳嗽反射机制、药物干预及新药开发等研究,给药途径主要包括雾化吸入和局部注射。张童洋子等^[17]采用雾化吸入造模具体操作如下:将豚鼠置于双室体描箱中,头部和躯体分别在体描箱的头室和体室内,超声雾化器与体描箱的头室相连,清醒豚鼠每天雾化吸入 0.4 mol/L 柠檬酸 2 次,每次持续 3 min,共 15 d。造模结束后对模型豚鼠进行咳嗽反应性检测,计算从吸入激发溶液到停止吸入后 1 min,共 3 min 内豚鼠出现的咳嗽次数。结果显示模型组豚鼠激发后咳嗽次数增加,咳嗽反应性增强,提示造模成功。柠檬酸常用浓度为 0.05~0.80 mol/L,雾化时间可根据具体情况及预实验结果适当延长,有学者认为,较长时间(3 周)的柠檬酸反复刺激,可以更好的模拟人体慢性咳嗽的

疾病过程^[18]。局部注射参照 Tanaka 等^[19]采用的方法,具体操作如下:腹腔注射麻醉豚鼠后,分离气管,将聚乙烯导管(内径 0.4 mm,长 13 cm)插入气管至第 5-6 气管软骨,将导管尖端放置在喉下,距离喉部约 10 mm 处固定(导管用线固定于第 6 气管软骨),导管另一端从背部皮下引出,注射 0.4 mol/L 柠檬酸 20 μ L(注射 10 次,每次间隔 30 s)以制备豚鼠模型,模型豚鼠咳嗽次数增加,造模成功。柠檬酸雾化造模较为便捷,但是动物真正药物吸入量难以控制,且通过雾化给药常对局部造成刺激,引起咳嗽之外的混淆动作,由于 TRPV1 受体分布于全身,柠檬酸雾化易引起豚鼠全身颤抖,故需要探索出提高气道利用率的方法。相较于此,局部给药有以下优势:(1)制备过程中较少引起打喷嚏等混淆动作,有利于确定咳嗽症状;(2)可改变内置导管所在处进而来控制咳嗽刺激物刺激的部位;(3)可以确保咳嗽刺激物用量的可比性和准确性。但是局部给药仍存在耗费时间久、需要麻醉、操作技术复杂、动物死亡率相对偏高的特点,因此临床上雾化造模更为常用。

辣椒素通过刺激 C 纤维上的 TRPV1 受体来引发咳嗽,造模动物以豚鼠或小鼠为主。辣椒素的研究用途与柠檬酸类似,多用于研究咳嗽反射机制、药物开发等,其给药途径与柠檬酸类似。以雾化为例,采用豚鼠造模具体操作如下:将 Hartley 豚鼠置于透明塑料广口瓶中,用超声雾化器将动物暴露于辣椒素水溶液(0.2 mmol/L)中 15 s,然后记录咳嗽次数和咳嗽潜伏期,共 3 min,造模成功入选标准为:10 s<咳嗽次数<50 s(3 min 内)和 10 s<咳嗽潜伏期<120 s^[20]。Iwata 等^[21]选用 C57BL/6 小鼠进行辣椒素雾化造模,将小鼠置于全身体积描记仪中,用雾化器使小鼠暴露于 50 μ mol/L 辣椒素中,雾化 10 min 引咳。辣椒素雾化浓度多为 0.01~10 mmol/L,具体造模时间尚无统一标准。与激活多通路的柠檬酸相比,辣椒素造模多用于研究单纯 TRPV1 通路涉及的咳嗽反射机制及新药研究。

AITC 可以特异性激活迷走 C 纤维上的 TRPA1 受体,引起咳嗽的产生,其模型动物多选用豚鼠。Sterusky 等^[22]在研究雌性和雄性豚鼠咳嗽模型的差异时,使用全身体积描记仪雾化吸入 10 mmol/L AITC 5 min 来建立豚鼠咳嗽模型,其基本操作同柠檬酸及辣椒素诱咳,模型豚鼠咳嗽次数增加,咳嗽潜伏期缩短,造模成功。Daller 等^[23]在 Andrè 等^[24]基础上应用 AITC 诱咳来评估自制雾化设备,具体

如下:将 Hartley 豚鼠置于装有麦克风、摄像头和气压计的透明小动物麻醉诱导箱中,该诱导箱可以实时采集音频、视频、气流和气压并进行数据采集和分析。制备聚山梨酯 80/乙醇(AITC 载体)的 50/50 溶液,再将 AITC 添加到载体溶液中,以达到 80 mmol/L AITC 的浓度,使用自制雾化器进行雾化(5 min)成功诱咳,咳嗽次数增加,造模成功。通常应用 AITC 浓度为 0.3~30 mmol/L,但并非一成不变,可在开展正式试验前进行咳嗽敏感性筛选的预实验。应用 AITC 诱咳能够特异性激活 TRPA1 受体,从而进行 TRPA1 相关机制研究。有研究对比 TRPA1 与 TRPV1 激动剂在诱导咳嗽中产生的效力,显示 AITC(10 mmol/L)诱导的 C 纤维活化及咳嗽次数,要比辣椒素(50 μ mol/L)弱 3 倍左右^[6],所以应用 AITC 进行单纯诱咳及咳嗽敏感性评价较少。

2.3 电刺激法

实验动物被一定频率和强度的电刺激后,会产生咳嗽反射,该方法即为电刺激法,选用动物种类较多,常用刺激部位包括:(1)豚鼠或狗的气管粘膜;(2)豚鼠或猫的喉上神经;(3)猫延髓的背侧部;(4)狗的胸膜。

在 Malandrino 等^[25]基础上,王笃军等^[26]对豚鼠进行电刺激引咳,具体如下:腹腔注射麻醉后进行气管插管,切开颈部皮肤,剥离气管,插入 Y 型气管套管,一个支管经压力换能器与 PowerLab 数据采集分析系统相连接记录呼吸频率和振幅,将刺激器的铂单电极固定在气管的背面,尽可能的接近胸部,另一无关电极插入胸部皮下组织中,调节刺激器,刺激强度 3.5 V、脉冲宽度 50 ms、频率每秒 10 次、刺激时间 20 s,两次刺激的间隔时间为 5 min,记录刺激后 5 min 内豚鼠的咳嗽次数,模型豚鼠咳嗽次数显著增加,造模成功。具体参数尚无统一标准,如 Sugiyama 等^[27]通过电刺激豚鼠含有气管和喉部传入纤维的喉返神经来诱发假想咳嗽,其参数为脉冲持续时间 0.2 ms;频率 10 Hz,强度 40~60 A。

电刺激法的刺激频率和强度可以定量比较,较机械刺激法更为准确。其中,电刺激喉上神经引咳法通常可用于初筛止咳药物之后,分析药物是中枢镇咳还是末梢止咳,从而进一步确定药物的作用部位。然而和机械刺激法相似,电刺激法需在麻醉状态下进行,且相较于其他方法来说,对动物造成较大损伤,操作也更为复杂。

2.4 抗原致敏引咳法

实验动物多次被抗原致敏后,再次予以该抗原或其他致咳剂激发,以提高其咳嗽敏感性,加重咳嗽反应,即为抗原致敏引咳法,主要用于过敏性咳嗽动物模型的制备(具体内容见后文变应性咳嗽模型详细论述),较辣椒素引起的咳嗽来说,该类咳嗽更易被短效 β_2 受体激动剂以及抗组胺药所抑制。

3 疾病咳嗽模型

依据各国内外指南,咳嗽多分为急性、亚急性及慢性咳嗽,病因各有不同,其中亚急性咳嗽主要是感染后咳嗽(postinfectious cough, PIC),而咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma, CVA)、上气道咳嗽综合征(upper airway cough syndrome, UACS)、嗜酸性粒细胞性支气管炎(eosinophilic bronchitis, EB)、变应性咳嗽(atopic cough, AC)、胃食管反流性咳嗽(gastroesophageal reflux-related chronic cough, GERC)等则为慢性咳嗽常见病因,咳嗽高敏综合征也是引起慢性咳嗽的重要因素,不同疾病涉及相对特异的发病机制,据此进行模型制备,可以更好的研究相关疾病。

3.1 感染后咳嗽模型(PIC)

PIC^[1]是指呼吸道急性感染后,咳嗽依然存在,持续 3~8 周,多表现为刺激性干咳,伴或不伴少量白痰,胸片检查正常,多由病毒性感冒引起,某些细菌性感染亦可导致。目前病理生理机制尚未完全明确,呼吸道病原体感染后引起的气道粘膜损伤、气道炎症、咳嗽敏感性增高、一过性气道高反应、氧化应激等是 PIC 重要的发病机制。据此,PIC 模型造模方法主要包括病毒滴鼻感染法,脂多糖滴鼻法等,也有在此基础上结合烟熏者,常用动物包括豚鼠、小鼠、大鼠。

由于病毒性感冒引起 PIC 多见,故病毒滴鼻感染法为常用方法之一。王敏等^[28]采用幼龄 Balb/c 小鼠作为造模对象,用乙醚轻度麻醉小鼠,使用半数组织培养感染量(50% tissue culture infections dose, TCID₅₀)为 10^{-3} 的呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)病毒悬液滴鼻,共连续感染 3 d,每只 50 μ L。感染后第 13 天对小鼠行辣椒素激发试验,若小鼠出现咳嗽、抓脸、打喷嚏明显增多,呼吸加快,脚前伸、颈前伸、腹部收缩等特征体位,且 3 min 内咳嗽次数大于 10 次,即提示造模成功。该模型采用幼龄 Balb/c 小鼠作为造模对象,与临床上婴幼儿更易被 RSV 感染造成咳嗽表现一致。有

研究表明应用 RSV 感染 Balb/c 小鼠后, RSV 病毒可在模型小鼠体内长期存在, 因此, RSV 滴鼻感染法可以模拟亚急性病程, 且模型气道炎症和气道高反应性明显增高, 符合 PIC 发病机制。在该造模过程中, 对于模型小鼠的肺组织病理、支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 等也进行了观察, 结果显示模型小鼠肺泡结构改变, 气道炎性细胞浸润, BALF 嗜酸性粒细胞升高, 血清中多种高敏及炎症相关的细胞因子表达上升, 符合 PIC 气道粘膜损伤、气道炎症、咳嗽敏感性增高、气道高反应性的发病机制特点, 进一步佐证 RSV 滴鼻可成功建立感染后咳嗽模型。也有在此基础上加以烟熏者, 吴怡等^[29]采用豚鼠制备 PIC 模型, 将燃有 10 支香烟的 50 g 刨花置于自制烟熏箱内, 将豚鼠置于该烟熏箱内 (每笼 5 只, 每箱 6 笼), 持续烟熏 30 min, 每天 1 次, 连续 7 d, 分别于第 2 天和第 3 天, 经鼻腔给药, 给予豚鼠 RSV 病毒冻存液 (滴度 $7 \cdot 10^6$ PFU/mL, 滴入体积以豚鼠质量 $1 \mu\text{L/g}$ 计算), 最后一次给药后, 间隔 40 min, 使用柠檬酸激发。结果显示模型豚鼠肺组织细胞肿胀、变圆、聚集, 细胞间隙增宽, 出现融合细胞, 提示 RSV 病毒感染成功。模型豚鼠肺组织大量炎性细胞浸润, 肺泡壁增厚, 少有肺泡融合, 未造成实质性炎症, 且柠檬酸激发后咳嗽次数显著提高, 提示产生气道咳嗽高敏感性, 另外, 血清中白介素-4 (interleukin-4, IL-4)/干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 比值显著增高, 导致 Th1 型与 Th2 型免疫细胞失衡, 促进炎症反应, 与 PIC 发病机制一致。该造模方法将 RSV 感染与烟熏结合起来, 相关研究提示, 烟雾刺激可以形成气道高反应性及咳嗽高敏感性, 因此结合烟熏可以更好的复制 PIC 的发病机制^[30]。

革兰氏阴性菌是细菌感染致 PIC 主要的致病菌之一^[31], 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是衡量革兰氏阴性菌致病力大小的关键毒素, 能激发动物的强烈免疫反应, 从而可能引起 PIC 的炎症反应, 故目前采用 LPS 造模也较为多见, 多通过气管内滴注、滴鼻或雾化途径, 常合并烟熏法或辣椒素雾化。Zhao 等^[32]利用 LPS 气管内滴注联合烟熏造模, 具体如下: 腹腔注射麻醉 ICR 小鼠后行气管插管 (长 30 mm, 外径 1.5 mm)。使小鼠呈仰卧抬头位, 经气管插管插入静脉导管, 注入含有 80 μg LPS 的无菌生理盐水 50 μL 。第 8 天, 将小鼠置于烟室中, 每天暴露于 5 支香烟中 30 min, 共 30 d 完成造模, 记录小鼠咳嗽次数, 收集小鼠血液、肺泡灌洗液、肺组织

等进行检测。小鼠模型出现咳嗽次数增加, 提示咳嗽敏感性增高, 肺泡灌洗液中白细胞及中性粒细胞升高, 血清中促炎细胞因子白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和 C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 水平显著升高, 支气管血管周围中性粒细胞聚集, 支气管粘膜上皮肿胀脱落, 气道腔内有炎性细胞渗出, 提示存在呼吸道黏膜损伤、气道炎症, 造模成功。此外, 氧化应激在 PIC 的发生发展中起重要作用, 该模型小鼠血清和组织匀浆中超氧化物歧化酶活性明显下降、丙二醛含量上升, 提示造模小鼠存在过氧化。Zhao 等^[32]利用 LPS 滴注和香烟雾化, 成功复制了伴有咳嗽敏感性增高、呼吸道黏膜损伤、气道炎症、氧化应激等 PIC 发病机制特点的模型。然而气管内滴注操作较为复杂, 小鼠死亡风险高, 雾化或鼻内滴注法则相对简便^[33-34]。Zhu 等^[35]采用 LPS 雾化联合烟熏、辣椒素雾化制备 PIC 模型, 将 SD 大鼠置于 0.5 平方米的烟室中, 以 10 支香烟, 烟熏 10 d, 每天 1 次, 每次 30 min, 在第 11、14 和 17 天, 将大鼠乙醚麻醉后使用 LPS 雾化, 在 250 μL 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 中加入 20 μg LPS, 第 12、13、15、16、18 天雾化吸入辣椒素 (10^{-4} mol/L) 每天 1 次, 每次 3 min, 收集肺泡灌洗液、肺组织。模型大鼠肺泡灌洗液中白细胞总数及巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞百分比均显著升高, 支气管上皮大量坏死脱落, 支气管腔扩张, 支气管壁及周围组织有大量淋巴细胞和中性粒细胞渗入, 提示气道粘膜损伤, 出现呼吸道炎症, 且模型组肺泡灌洗液中神经肽类物质如 P 物质 (substance P, SP)、神经激肽 A (neurokinin A, NKA)、神经激肽 B (neurokinin B, NKB)、降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 值显著升高, 提示气道神经源性炎症存在, 其是咳嗽敏感性增高的物质基础, 造模成功。该造模方法中采用 LPS 雾化造模, 用量较小, 可能与结合辣椒素激发增加咳嗽敏感性相关, 由于不同浓度的 LPS 可诱导不同程度的气道炎症, 故可调整 LPS 剂量使得气道炎症更好模拟 PIC 的病理特点。LPS 滴鼻联合烟熏法易重复, 可操作性较好, 但是造模时间较长, 仲坤等^[31]通过增加香烟数量来缩短造模周期, 结果显示, 以 13 支香烟进行烟熏, 可将造模时间由传统烟熏造模的 10 d 缩短至 7 d, 成功建立了一种短周期的造模方法: 采用 Wistar 大鼠 (雄性, 180~220 g), 置于烟室中, 13 支香烟, 每日烟熏 15 min, 每天 1 次, 共 7 d。烟熏结束后的第 1、4、7 天, 各组大鼠鼻

腔滴入含 0.4 mg/mL 的 LPS,以 1 mL/kg 的体积滴入鼻腔。第 2、3、5、6 天将该组大鼠置于密闭容器中以柠檬酸溶液雾化激发(2.5 mol/L),每天 1 次,每次 5 min。观察各组大鼠状态并于末次滴鼻 24 h 后测定相关指标。模型大鼠柠檬酸激发咳嗽潜伏期缩短,咳嗽次数明显增多,肺泡灌洗液中白细胞的数量增多,模型大鼠肺组织病理切片可见明显炎性细胞浸润,肺内细支气管上皮细胞脱落,支气管壁增厚,病变区域的比例大于正常区域的比例,符合感染后咳嗽的病理特征。

3.2 变应性/过敏性咳嗽模型(AC)

与日本学者对 AC 的定义不同,我国指南中 AC 不包括嗜酸性粒细胞性支气管炎。据此国内标准诊断的 AC 患者具有特应质、痰嗜酸性粒细胞正常、无气道高反应性等特征,糖皮质激素、抗组胺药物治疗有效。然而其发病机制有待进一步明确,可能与环境暴露刺激或吸入变应原致咳嗽敏感性升高以及非嗜酸粒细胞性气道炎症相关^[6,36]。豚鼠免疫系统发达,咳嗽反射与人类相似,故多使用豚鼠进行 AC 造模。

AC 模型为研究咳嗽敏感性增高的常用模型^[6],其利用抗原(卵蛋白腹腔注射)多次致敏后,再次予以抗原激发,可显著提高其咳嗽敏感性,模拟过敏性咳嗽的病理生理过程,目前比较成熟的造模是参照 Muraki 等^[37]方法建立的豚鼠过敏性咳嗽模型,具体如下:以豚鼠(200~250 g)为例,第 1 天豚鼠腹腔注射环磷酰胺 30 mg/kg,第 3 天在腹腔注射 1 mL 2 mg 卵蛋白(ovalbumin, OVA)+100 mg 氢氧化铝混悬液,3 周后腹腔注射 1 mL 0.01 mg OVA+100 mg 氢氧化铝的混悬液来加强豚鼠致敏。加强免疫后 3 周,给予雾化吸入 10 mg/mL 的 OVA 溶液 90 s 激发,计数 3 min 内的咳嗽次数,筛选出对刺激有咳嗽反射,咳嗽次数>10 次,并能重复发生的豚鼠。赖克方^[6]利用上述造模方法复制的豚鼠 AC 模型,在激发后 72 h,具有干咳(支气管扩张剂处理有效)、无喘息、组织病理示全气道嗜酸粒细胞炎症、气道反应性轻度升高的特点,据此得出该模型可以模拟人类 CVA 模型。然而 AC 患者中心气道粘膜活检可见嗜酸性粒细胞浸润,无外周气道嗜酸性粒细胞浸润,后者是 EB 的特征。该模型对支气管扩张剂反应性好、出现全气道嗜酸性炎症及气道反应性轻度升高,与我国临床 AC 诊断标准有较大出入,需进一步完善。

为了减轻过度致敏状态,多使用环磷酰胺注射

加强免疫抑制或减少 OVA 用量,王谦等^[38]比较环磷酰胺+高剂量 OVA 及低剂量 OVA 两种主动免疫过程,分析咳嗽频次及气道激发情况,发现后者气道收缩反应更为强烈,乙酰甲胆碱浓度阈值较低,更偏向于哮喘模型,而前者随着乙酰甲胆碱浓度增高而平缓上升,可很好的模拟咳嗽敏感性增高状态,可以得出,加入免疫抑制剂的模型较单纯减少主动免疫 OVA 剂量模型更优,但仍存在豚鼠死亡率较高、咳嗽反应均一性较差等问题,之后研究可以考虑在加用免疫抑制剂的同时控制 OVA 用量,以期降低豚鼠死亡率,建立更符合临床 AC 特征的动物模型。

3.3 咳嗽变异性哮喘模型(CVA)

CVA 是一种以咳嗽为主要表现的特殊类型哮喘,不伴有明显喘息胸闷等典型哮喘症状,气道炎症主要以嗜酸性粒细胞为主,具有气道高反应性,是慢性咳嗽最常见病因,约占 1/3。CVA 的发病原因与遗传因素和环境理化因素相关,接触各种过敏原对于本病的发生有一定的促进作用。与典型哮喘相似,其发病机制与气道高反应性、神经机制、多种细胞参与的气道慢性炎症和免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 介导的变态反应有关。但是 CVA 的咳嗽敏感性较高、气道反应性较典型哮喘低、喘鸣阈值较哮喘高,是其有别于典型哮喘的机制特点^[6]。常用动物包括豚鼠、小鼠、大鼠。

既往 CVA 的造模方法多参考 AC 造模^[37]。吕天宜等^[39]在前人基础上,用 OVA 联合烟熏建立相似度更高的豚鼠 CVA 模型,CVA 的发病可能与接触过敏原相关,且烟熏可提高气道反应性,为该造模方法提供了理论依据,具体如下:先适应性喂养豚鼠 3 d,第 4 天腹腔注射 0.2% OVA 溶液 1 mL,第 11 天腹腔注射增敏 OVA 溶液 1 mL(OVA 增敏溶液:将 0.01 mg OVA 和 100 mg 氢氧化铝溶于 1 mL NS 中),第 18~24 天以 1.0% OVA 雾化攻击豚鼠,每天每次 60 s,同时第 4~24 天每天烟熏 30 min。成模标准:首次咳嗽时间明显提前、咳嗽次数明显增多;气道阻力平缓上升;肺组织嗜酸性粒细胞浸润增多。该豚鼠 CVA 模型在咳嗽反应、肺功能测定、肺组织病理学表现三方面均符合 CVA 特征,且咳嗽次数显著上升、首次咳嗽时间明显提前、气道阻力上升更加平缓,表明 OVA 联合烟熏造模 CVA 豚鼠的方法有更好的咳嗽敏感性,更加符合 CVA 气道高反应性较典型哮喘略低的重要特征,该法可行性强,重复性和稳定性好。不同学者在进行造模时

药物用量有所差别,且通过改变 OVA 的剂量、注射时间及次数和烟熏剂量等可以建立特殊类型的 CVA 模型,如糖皮质激素不敏感 CVA 模型等^[40],这也为建立特殊类型的其他疾病咳嗽模型提供了相关思路。

也可采用大鼠与小鼠来建立 CVA 模型,多采用 OVA 造模,或联合烟熏,侯丹等^[41]采用 OVA 致敏 SD 大鼠造模的方法具体如下:分别于第 1、8 天向 SD 大鼠腹腔注射 1 mL 致敏液(含 OVA 100 mg,氢氧化铝 0.25 mL,生理盐水 0.75 mL);第 15 天开始每天雾化吸入 1% OVA 溶液,激发 20 min(流量 2 mL/min),连续 14 d,造模结束。模型大鼠第 0.1 秒用力呼气量(forced expiratory volume 0.1, FEV_{0.1}),第 0.1 秒用力呼气量与用力肺活量(forced vital capacity, FVC)之比(FEV_{0.1}/FVC),用力呼气中期流速(forced expiratory flow 50%, FEF50%)明显降低,外周血白细胞计数、嗜酸性粒细胞计数显著升高,血清炎性因子 IL-4、IL-5、IL-10 水平升高,肺组织及支气管可见结构破坏、大量炎细胞浸润,肺组织核转录因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B) p65 蛋白表达升高, I κ B α (inhibitor of NF- κ B) 蛋白表达降低,提示模型豚鼠气道反应性升高,存在气道炎症,符合 CVA 患者的临床特征。甘雨等^[42]采用 SD 大鼠复制 CVA 模型,在卵蛋白注射致敏的基础上,每天在熏烟箱中熏烟 30 min,连续 2 周。联合烟熏法与单纯卵蛋白注射法造模结果区别不大,为减少操作的复杂性,目前多采用单纯卵蛋白造模的方法。在大鼠选择方面, Brown-Norway (BN) 大鼠是高免疫球蛋白(尤其是 IgE)的应答品系,更易诱发出气道变应性炎症与气道高反应性,故较 SD 大鼠、Wistar 大鼠等更适合进行 CVA 的造模。楚慧伦等^[43]采用 BN 大鼠建立了一种较为简便易行的 CVA 大鼠模型,具体如下:BN 大鼠,体重 180~200 g,第 1 天腹腔注射 2 mg OVA 和 100 mg 氢氧化铝,3 周后再次腹腔注射 0.01 mg OVA 及 100 mg 氢氧化铝,3 周后用 1% OVA 进行雾化攻击,隔天 1 次,共 7 次,造模结束,其咳嗽症状和气道高反应性符合 CVA 的临床症状,但其免疫反应特征尚需进一步探索。

也有应用小鼠制备 CVA 模型报道, Hua 等^[44]采用以下方法制备该模型:在 D1 和 D14,腹腔注射 80 μ g OVA 和等量氢氧化铝进行致敏。第 2 次致敏 10 d 后起,小鼠每天使用 OVA 雾化(1.5% OVA 溶解在 0.9% 生理盐水中)激发 45 min,共持

续 20 d,造模结束,测定其气道反应性增高,为造模成功的重要指标。小鼠体积小,活动灵敏,注药等操作较为困难,且小鼠自主呼吸及肺功能测定难度较大,故不是 CVA 造模首选动物。

3.4 上气道咳嗽综合征模型(UACS)

UACS 旧称鼻后滴流综合征(postnasal drip syndrome, PNDS),指鼻部分泌物倒流至咽喉等部位,直接或间接刺激该处咳嗽感受器,引起以咳嗽为主要特征的疾病,其发病机制尚未完全阐明,且与鼻后滴流的相关性也并不确切,因此指南提议用 UACS 替代 PNDS^[36]。除鼻后滴流学说以外,其病理生理学机制可能与气道炎症、感觉神经敏感性增高、鼻功能异常等相关^[6]。本病造模方法较少,目前采用 SD 大鼠进行造模。

UACS 被认为与鼻炎、鼻窦炎性疾病以及咽喉炎、扁桃体炎等相关^[1],基于国内外文献,曹治山等^[45]使用膨胀海绵填塞鼻腔联合香烟雾化 SD 大鼠的方法进行造模,具体如下:将膨胀明胶海绵片(3 mm \times 5 mm)置入麻醉后大鼠左侧鼻腔的窦口鼻道复合体处(距离前鼻孔约 15 mm),后于该侧鼻腔内滴注 0.5 mL 金葡菌悬浊液,海绵放置 4 周后,让大鼠被动吸烟 2 h/d,连续 20 d,具体被动吸烟方法为将大鼠置于烟熏箱内,3 支香烟/次,持续 20 min,共 3 次,燃烧 9 支香烟,6 h 后重复第 2 轮。自香烟雾化结束后开始观察 30 min,以抓鼻、喷嚏、咳嗽、清喉等系列症状的严重程度设置评分标准,若总分超过 5 分,则造模成功,同时出现鼻窦黏膜充血水肿,鼻窦、咽喉大量的炎性细胞浸润,血清炎性介质 IL-8、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平明显升高。鼻窦炎是 UACS 发病的原因之一,本法联合了鼻窦炎的造模,符合 UACS 的发病特点,而短时间的烟雾刺激也增加了气道炎症。该造模方法避开了致敏,将鼻窦疾病与气道炎症等因素结合起来,符合鼻窦炎导致 UACS 的临床表现和机制特点。但由于咳嗽病因十分复杂,此造模过程还必须排除其他导致咳嗽的可能因素。且临床上 UACS 的发病还可由于慢性鼻炎、过敏性鼻炎等其他鼻部疾病以及咽喉疾病造成,故单一的鼻窦炎联合气道炎症模型不能完全模拟该病,还需要联合其他疾病模型或从病理生理机制层面对本病进行模型复制。

3.5 嗜酸粒细胞性支气管炎模型(EB)

EB 部分临床表现类似 CVA,以咳嗽为主要症状,特征是气道内嗜酸性粒细胞浸润,因而检查痰中嗜酸性粒细胞增高,而气道炎症范围及平滑肌肥

大细胞浸润密度均低于哮喘,氧化应激水平、炎症程度则低于 CVA^[36],无气道反应性,糖皮质激素疗效确切。造模可选用豚鼠或小鼠。

目前尚无一种动物模型可模拟人类 EB 的所有特征,国内外研究者常以 EB 的病理基础嗜酸性粒细胞性气道炎症和无气道高反应性作为造模成功的标准^[46]。研究表明多粘菌素 B 可以导致豚鼠嗜酸性肺炎,故而既往采用多粘菌素 B 刺激的方法建立 EB 模型。Ogawa 等^[46]采用多黏菌素 B 点鼻的方法进行 EB 豚鼠造模,具体如下: Hartley 豚鼠(300~350 g),轻度麻醉后,经鼻给予多粘菌素 B 生理盐水溶液(5 mg/(mL·kg)),每周 2 次,一共 3 周。末次注射多粘菌素 B 6 d 后进行观察, BALF 中嗜酸性粒细胞比例较模型组明显升高,气管、支气管粘膜有大量嗜酸性粒细胞浸润,而肺泡结构、气道反应性正常,予多梯度辣椒素行咳嗽激发时模型豚鼠咳嗽次数明显增加,咳嗽敏感性增高,符合 EB 的病理基础。

实验动物选择豚鼠或 Balb/c 小鼠,豚鼠的研究较早,而小鼠被认为是过敏性气道炎症研究的标准模型,且 Balb/c 小鼠具有基因型稳定、大小相似、易重复等特点,相关生物学试剂和抗体易获得,故而近来相关研究多选用小鼠造模。李琳等^[47]采用多粘菌素 B 滴鼻的方法成功复制了 EB 小鼠模型,具体如下:选用雌性 Balb/c 小鼠,18~19 g,予 12 μ L 的 0.5%多粘菌素 B 滴鼻,每天 1 次,共 21 d,造模结束。结果显示多粘菌素 B 滴鼻造模的小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞数明显升高,且与对照组相比,肺顺应性及气道阻力无明显差异,故而认为该造模方法体现了 EB 嗜酸性粒细胞浸润,无气道高反应性的两个病理生理学特征,造模成功,且该实验进一步证实了嗜酸性粒细胞激活在气道高反应性上起重要作用。然而由于多粘菌素 B 仅是肥大细胞、嗜碱性粒细胞释放组胺的刺激剂,并不是公认的抗原刺激剂,因此该模型是否能真正模拟人类 EB 的病因及其发生、发展,仍有待进一步的探索^[6]。

钟南山团队模拟哮喘模型,通过改变卵蛋白激发途径、频次、剂量及变应原颗粒大小建立了无气道高反应性的嗜酸性粒细胞气道炎症小鼠模型^[48-49]。陈莉延通过与哮喘小鼠模型同等剂量 OVA 进行滴鼻激发,减少滴鼻次数可得到该小鼠模型,具体方法如下:于第 0、7、14 天腹腔注射 200 μ L 10 μ g OVA 和 1.3 mg Al(OH)₃ 生理盐水混悬液致敏小鼠,第 21、22、23 天腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/

kg,并给予 10 μ g OVA 滴鼻激发。雾化辣椒素(0.1 mmol/L)用于咳嗽刺激,并使用 Finepointe 软件自动检测、记录小鼠的咳嗽频率,进而测定咳嗽敏感性;麻醉小鼠后将其置于体积描记器室内,使用小动物呼吸机辅助通气,呼吸机设置:频率 120 times/min,潮气量 0.2 mL。在 PBS 刺激后,以及在使用浓度分别为 6.25 mg/mL、12.5 mg/mL 和 25 mg/mL 的乙酰甲胆碱(methacholine, MCh)雾化时,测量肺阻力的变化,进而评估动物的气道反应性。该模型具有慢性咳嗽、气道嗜酸性粒细胞浸润、对类固醇治疗有反应、无气道高反应性的基本特征,可以较为完善的复制 EB 模型。

3.6 胃食管反流性咳嗽模型(GERC)

GERC 是指胃酸或其他胃内容物反流至食管导致的咳嗽,发病率亦较高,目前其发病机制尚不完全清楚,主要包括反流理论和反射理论,如微量误吸、食管-支气管反射、食管运动功能失调、自主神经功能失调与气道神经源性炎症等,其中食管-支气管反射引起的气道神经源性炎症及中枢咳嗽高敏感性在 GERC 的发病过程中起重要作用,食管细菌定植也可能影响其发生和发展^[6,50]。

既往文献曾报道的大鼠、狗、兔等模型,多通过全胃切除+食管-空肠吻合术、贲门成形等手术建立,手术复杂,术后死亡率高,因此使用手术构建 GERC 模型较为困难^[6]。赖克方团队使用反复食管滴注盐酸建立了相关模型,多采用豚鼠、大鼠,制备方法如下:选取豚鼠(350~450 g),灌注前氯氨酮 50 mg/kg,腹腔注射轻度麻醉豚鼠,插入 5F 胃管于食管中下段,胃管上端则外接输液泵,以 8 drops/min 速度滴入 0.1 mol/L HCl(包括 0.5%胃蛋白酶)至食管下段,20 min/d,灌注时用绷带固定好豚鼠,使其呈头部垫高的仰卧位,连续 14 d^[51-52],造模结束后,光镜下可见食管下段粘膜基底细胞层增生,乳头延长,过度角化,部分食管鳞状上皮过度增生、核形态发生改变,与食管炎模型类似,且在光镜下可以观察到模型豚鼠的气管、支气管组织有炎症细胞浸润,同时可引起豚鼠气道神经源性炎症。该法可成功复制伴有气管、支气管黏膜炎症的豚鼠 GERC 模型,而迷走神经切断术可以减轻该模型豚鼠的神经源性呼吸道炎症和延髓神经元的活动。利用大鼠制备 GERC 模型方法同上^[50],药物剂量、时间、操作方法相同,在此基础上,以柠檬酸(0.8 mol/L)处理 5 min,每天 1 次,连续 14 d 诱发咳嗽,进而发现了在盐酸灌流和柠檬酸诱发咳嗽的大鼠模型中,出

现了多个延髓核团的兴奋,推断相关神经元可能参与了 GERC。

3.7 其他咳嗽敏感增高模型

由于慢性咳嗽患者普遍存在咳嗽高敏感性,故近年来提出咳嗽高敏综合征(cough hypersensitivity syndrome, CHS)这一概念。咳嗽敏感性是指外界刺激机体时,其表现的咳嗽难易程度。咳嗽高敏感性是慢性咳嗽重要的临床与病理生理学特征,其发生机制尚未完全明确,目前国内外研究认为与 TRP 通路及嘌呤受体 P2X3(purinergic P2X3)激活、气道炎症、神经通路及咳嗽中枢的易化等相关^[6]。

在构建动物模型时应尽量与 CHS 病理生理学改变类似,即在较低水平的温度、机械及化学刺激时即可表现出较为显著的咳嗽高敏感性,而以非特异性气道炎症为主或无明显的肺部炎症改变。目前构建咳嗽高敏感性模型的方法包括空气污染物暴露、病毒感染等^[6]。

空气污染问题日益突出,对呼吸健康有着较多不利影响,机动车燃烧排放的废气是空气污染的主要来源,而柴油机动车可以排放更多的细颗粒物(particulate matter, PM)、NO_x。陈法桂^[53]既往以柴油尾气暴露诱导咳嗽敏感增高模型,具体如下:暴露前筛选出咳嗽敏感性正常的豚鼠,构建柴油发动机尾气与暴露室连通的装置,待室内颗粒物浓度稳定到目标浓度时,将豚鼠放入暴露室内进行暴露,以 PM_{2.5} 的浓度作为主要指标,目标浓度为 200 μg/m³,每日暴露于柴油尾气环境 3 h,连续暴露 14 d,尾气暴露结束之后的第 12 h,对照组豚鼠和所有暴露豚鼠进行咳嗽激发试验。暴露豚鼠咳嗽次数增加,咳嗽潜伏期变短, BALF 细胞总数增多,以中性粒细胞和嗜酸性粒细胞为主,且随尾气浓度增加而上升,肺组织病理显示不同程度的支气管周围炎,SP 增加,肺组织、结状神经节和颈静脉神经节的 TRPA1 表达增加,说明柴油尾气诱导的豚鼠非特异性气道炎症与气道神经源性炎症和 TRPA1 的表达相关。该实验构建的柴油尾气室内暴露可成功诱导豚鼠咳嗽敏感性增高,实验条件稳定可控,低浓度尾气暴露组的 PM_{2.5} 浓度为(210±60) μg/m³,与真实世界 PM_{2.5} 浓度更相近,因此该暴露浓度可以作为造模参考。该团队也提出一个自然实验模型^[54],即将豚鼠暴露于交通隧道的交通尾气污染物中 7~14 d(珠江隧道,平均每小时车辆数量超过 2000 辆,交通尾气浓度远高于过滤空气环境,与交通相关的 PM_{2.5} 大约是过滤空气中的 4 倍),交通

尾气污染物暴露可增加豚鼠自发性咳嗽,引起 BALF 中嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的显著增加,并导致气管和支气管粘膜下层嗜酸性粒细胞的显著浸润,可被地塞米松显著抑制,说明该造模方法可诱导豚鼠的咳嗽敏感性增高和非过敏性嗜酸性炎症,自然实验模型可以更好的拟合实际暴露条件,有利于更真实地研究城市大气污染致病机制,但是存在地点和浓度的差异,操作中亦有诸多不便,因此建议将自然条件与室内暴露进行有机结合,以期完善该类模型。

此外亦有香烟烟雾诱导模型;Zhong 等^[55]和 Xiang 等^[56]使用烟熏造豚鼠咳嗽高敏感性模型:1 d 烟熏两次,每次 10 支香烟,连续 14 d,最后一次烟熏暴露 24 h 后使用 0.8 mol/L 柠檬酸 1 min 雾化攻击诱咳,分别于雾化 1 min 和雾化 5 min 后用 Buxco 系统自动检测和记录咳嗽次数。模型豚鼠的咳嗽频率显著增加,潜伏期变短, BALF 中细胞总数增加,中性粒细胞比例升高,肺组织中炎性细胞浸润增加,中央气道上皮和粘膜增厚,小气道上皮和平滑肌明显增厚,正常肺泡结构消失,肺组织中的 TNF-α 和 IL-8 水平显著升高,该团队建立的香烟暴露慢性咳嗽豚鼠模型不仅咳嗽敏感度增加,而且明显激活非特异性呼吸道炎症,是诱导咳嗽敏感性增高的可行模型。

4 小结

咳嗽发病率高,社会经济负担重,逐渐成为研究热点。随着近年来分子生物学和神经生物学技术的不断发展和应用,多环节、多靶点相互影响的神经生理反射机制逐渐被认识,相关实验研究方法日趋完善。豚鼠是目前研究咳嗽最常用的动物,而随着新技术的发展,转基因型小鼠和大鼠的应用也日渐增多,根据研究目的不同可选择应用单纯咳嗽模型和疾病相关动物模型。然而目前咳嗽模型还存在以下问题:尽管咳嗽模型有着较为完善的造模原理及方法,但少有规范统一的药物剂量、时间、给药方式等,且每个疾病成模标准及评价方法不一,多根据各课题组经验进行调整,难以形成标准的造模体系;另外针对慢性咳嗽不同疾病分类有着特殊的临床表现,譬如 CVA 表现为刺激性干咳、夜间及凌晨咳嗽为主,动物模型难以模仿这些咳嗽特征;目前咳嗽模型多为诱咳,自发性咳嗽模型较少;动物模型致敏方式多以腹腔注射为主,与人类致敏的方式有一定差距;某些动物实验显示有效的咳嗽抑

制药物在实际临床上效果并不满意, Plevkova 等^[57]认为无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级动物肠道和呼吸道微生物群的异质性可能是动物研究显示有希望的药物开发和未能转化为人类有效药物之间的脱节原因, 往后可就此展开系列研究以评估 SPF 级动物模型的应用。这些问题说明目前咳嗽动物模型与临床疾病表现还有一定距离, 而相关模型的制备也需进一步标准化, 为研究的深入及药物开发提供基础。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Robinson RK, Birrell MA, Adcock JJ, et al. Mechanistic link between diesel exhaust particles and respiratory reflexes [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(3): 1074-1084.
- [3] Ma JL, Bonvini SJ, Dubuis E, et al. Investigation into the mechanisms driving hypo-osmotic stress-triggered activation of airway sensory nerves [J]. Am J Resp Crit Care, 2018, 197: 1011.
- [4] Bonvini SJ, Wortley MA, Adcock JJ, et al. T2 Oestrogen: an endogenous agonist for trpm3 triggered sensory nerve activation in the airway? [A] BTS/BALR/BLF Early Career Investigator awards symposium [C]. BMJ Publishing Group Ltd and British Thoracic Society; 2017.
- [5] Chen Z, Lin MT, Zhan C, et al. A descending pathway emanating from the periaqueductal gray mediates the development of cough-like hypersensitivity [J]. iScience, 2022, 25(1): 103641.
- [6] 赖克方. 慢性咳嗽 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社; 2019.
- [7] Morice AH, Fontana GA, Belvisi MG, et al. ERS guidelines on the assessment of cough [J]. Eur Respir J, 2007, 29(6): 1256-1276.
- [8] Poliaček I, Simerá M, Veterník M, et al. Role of the dorsomedial medulla in suppression of cough by codeine in cats [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2017, 246: 59-66.
- [9] Varechova S, Poussel M, Demoulin B, et al. Within breath ventilatory responses to mechanical tracheal stimulation in anaesthetised rabbits [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2010, 23(5): 397-402.
- [10] Foucaud L, Demoulin B, Leblanc AL, et al. Modulation of protective reflex cough by acute immune driven inflammation of lower airways in anesthetized rabbits [J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0226442.
- [11] 梁婷, 黄露, 曹征宇. 清宣止咳颗粒止咳、祛痰、抗炎作用评价 [J]. 中成药, 2022, 44(2): 410-415.
- [12] 胡少丹, 仕丽, 王旭. 助阳补肺除痹颗粒药效学实验研究 [J]. 吉林中医药, 2021, 41(11): 1484-1488.
- [13] Muraki M, Iwanaga T, Haraguchi R, et al. Continued inhalation of lidocaine suppresses antigen-induced airway hyperreactivity and airway inflammation in ovalbumin-sensitized Guinea pigs [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(5): 725-731.
- [14] Luo YL, Li PB, Zhang CC, et al. Effects of four antitussives on airway neurogenic inflammation in a Guinea pig model of chronic cough induced by cigarette smoke exposure [J]. Inflamm Res, 2013, 62(12): 1053-1061.
- [15] 王颖, 史利卿, 马建岭, 等. TRP 通道在慢性咳嗽中的作用机制探讨 [J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(10): 1910-1913.
- [16] Mukhopadhyay I, Kulkarni A, Aranake S, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 receptor activation *in vitro* and *in vivo* by pro-tussive agents; GRC 17536 as a promising anti-tussive therapeutic [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97005.
- [17] 张童洋子, 魏为利, 邱忠民. 豚鼠咳嗽反应性的不同检测方法研究 [J]. 同济大学学报 (医学版), 2017, 38(1): 24-29.
- [18] Cui S, Ito I, Nakaji H, et al. Induction of airway remodeling and persistent cough by repeated citric acid exposure in a Guinea pig cough model [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2019, 263: 1-8.
- [19] Tanaka M, Maruyama K. Cough reflex induced by microinjection of citric acid into the larynx of Guinea pigs: new coughing model [J]. J Pharmacol Sci, 2003, 93(4): 465-470.
- [20] Zhang L, Sun T, Liu L, et al. The research of the possible mechanism and the treatment for capsaicin-induced cough [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2018, 49: 1-9.
- [21] Iwata T, Ito I, Niimi A, et al. Mechanical stimulation by postnasal drip evokes cough [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0141823.
- [22] Sterusky M, Plevkova J, Grendar M, et al. Female Guinea pig model for cough studies and its response to most common tussive substances [J]. Physiol Res, 2020, 69 (Suppl 1): S171-S179.
- [23] Daller JR, Wong J, Brooks BD, et al. An inexpensive system for evaluating the tussive and anti-tussive properties of chemicals in conscious, unrestrained Guinea pigs [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2012, 66(3): 232-237.
- [24] Andrè E, Gatti R, Trevisani M, et al. Transient receptor potential ankyrin receptor 1 is a novel target for pro-tussive agents [J]. Br J Pharmacol, 2009, 158(6): 1621-1628.
- [25] Malandrino S, Melillo G, Bestetti A, et al. Antitussive properties of levodropropizine [J]. Arzneimittelforschung, 1988, 38(8): 1141-1143.
- [26] 王笃军, 康立欣, 赵力, 等. 桑叶经霜对其传统功效清肺润燥作用的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(9): 1546-1550, 1601.
- [27] Sugiyama Y, Shiba K, Mukudai S, et al. Activity of respiratory neurons in the rostral medulla during vocalization, swallowing, and coughing in Guinea pigs [J]. Neurosci Res, 2014, 80: 17-31.
- [28] 王敏, 白晓红, 刘芳, 等. 桑皮止咳方对呼吸道合胞病毒诱导的感染后咳嗽小鼠 c-fos 蛋白及相关炎症因子表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 6038-6042.

- [29] 吴怡, 姜鸿, 张颖, 等. 鸢尾黄素对感染后咳嗽豚鼠的抗炎气道炎症作用 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 106-109, 269.
- [30] Joad JP, Munch PA, Bric JM, et al. Passive smoke effects on cough and airways in young Guinea pigs: role of brainstem substance P [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 169(4): 499-504.
- [31] 仲坤, 齐越, 李昭, 等. 感染后咳嗽大鼠模型建立研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(2): 23-26.
- [32] Zhao YL, Yang ZF, Shang JH, et al. Effects of indole alkaloids from leaf of *Alstonia scholaris* on post-infectious cough in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 218: 69-75.
- [33] 魏稼黎, 李李, 刘镛. 光纤引导直视下啮齿目动物气管插管的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(10): 69-70, 87-88.
- [34] 孙刚强, 郭文俊. 大鼠气管插管方法研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 116-121.
- [35] Zhu J, Li F. Effects of Qufeng Xuanfei Decoction in animal model of post-infectious cough [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 70(2): 881-885.
- [36] 苏楠. 《咳嗽基层诊疗指南(2018年)》的解读 [J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(11): 1112-1114.
- [37] Muraki M, Tohda Y, Sugihara R, et al. The effect of TYB-2285 on dual phase bronchoconstriction and airway hypersensitivity in guinea-pigs actively sensitized with ovalbumin [J]. J Pharm Pharmacol, 1994, 46(11): 883-886.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] Lyu T, Li D, Zhang H, et al. *Suhuang* antitussive capsule ameliorates corticosteroid insensitivity in cough variant asthma Guinea pigs by inhibiting p38 MAPK signal pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 1699429.
- [41] 侯丹, 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.
- [42] 甘雨, 乔敏, 丁春晓, 等. 固本止咳平喘颗粒对咳嗽变异性哮喘大鼠肺组织病理及Th1/Th2类细胞因子的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(11): 2614-2617, 2822.
- [43] 楚楚伦, 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.
- [44] 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: 5621-5629.
- [45] 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.
- [46] Ogawa H, Fujimura M, Saito M, et al. The effect of the neurokinin antagonist FK-224 on the cough response to inhaled capsaicin in a new model of guinea-pig eosinophilic bronchitis induced by intranasal polymyxin B [J]. Clin Auton Res, 1994, 4(1-2): 19-28.
- [47] 李琳, 林江涛. 嗜酸粒细胞性支气管炎小鼠模型的建立及嗜酸粒细胞激活对气道反应性的影响 [J]. 中华医学杂志, 2017, 97(16): 1259-1264.
- [48] Chen L, Li C, Peng M, et al. Establishment of a mouse model with all four clinical features of eosinophilic bronchitis [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 10557.
- [49] Chen L, Liu S, Xiao L, et al. An initial assessment of the involvement of transglutaminase2 in eosinophilic bronchitis using a disease model developed in C57BL/6 mice [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 11946.
- [50] Chen Z, Gu D, Fan L, et al. Neuronal activity of the medulla oblongata revealed by manganese-enhanced magnetic resonance imaging in a rat model of gastroesophageal reflux-related cough [J]. Physiol Res, 2019, 68(1): 119-127.
- [51] Chen Z, Chen H, Chen F, et al. Vagotomy decreases the neuronal activities of medulla oblongata and alleviates neurogenic inflammation of airways induced by repeated intra-esophageal instillation of HCl in Guinea pigs [J]. Physiol Res, 2017, 66(6): 1021-1028.
- [52] Liu C, Chen R, Luo W, et al. Neurogenic airway inflammation induced by repeated intra-esophageal instillation of HCl in Guinea pigs [J]. Inflammation, 2013, 36(2): 493-500.
- [53] 陈法桂. 柴油尾气污染物诱导豚鼠咳嗽高敏感性及其气道炎症探讨 [D]. 广州: 广州医科大学, 2017.
- [54] Fang Z, Huang C, Zhang JJ, et al. Traffic-related air pollution induces non-allergic eosinophilic airway inflammation and cough hypersensitivity in guinea-pigs [J]. Clin Exp Allergy, 2019, 49(3): 366-377.
- [55] Zhong S, Bai LP, Liu XD, et al. Cough inhibition activity of *Schisandra chinensis* in Guinea pigs [J]. J Med Food, 2021, 24(4): 348-357.
- [56] Xiang J, Liu X, Zhong S, et al. *Fructus mume* protects against cigarette smoke induced chronic cough Guinea pig [J]. J Med Food, 2020, 23(2): 191-197.
- [57] Plevkova J, Brozmanova M, Matloobi A, et al. Animal models of cough [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2021, 290: 103656.