

# Brown-Norway 大鼠咳嗽变异性哮喘模型的建立

楚慧伦<sup>1</sup>, 孔德明<sup>1</sup>, 丁子桐<sup>1</sup>, 高琴琴<sup>1</sup>, 续艳<sup>1</sup>, 阎玥<sup>2</sup>, 李友林<sup>2</sup>, 孙文燕<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中日友好医院国家中医药管理局肺病慢性咳嗽重点研究室, 北京 100102)

**【摘要】 目的** 通过卵蛋白(OVA)致敏 Brown-Norway(BN)大鼠,建立一种简单易行的咳嗽变异性哮喘动物模型。**方法** 36只BN大鼠分为三组:正常对照组、模型对照组、给药组。第1日大鼠腹腔内注射2 mg 卵蛋白和100 mg Al(OH)<sub>3</sub>凝胶,3周后再次腹腔注射0.01 mg OVA及100 mg Al(OH)<sub>3</sub>凝胶,正常对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水。3周后模型对照组和给药组用1% OVA雾化,正常对照组用生理盐水雾化,隔日一次,共7次。雾化当天给药组开始灌胃给药,其余两组给等量生理盐水,每天一次,共14次。最后一次给药24 h后,进行辣椒素引咳、肺功能实验(激发实验)。**结果** 与正常对照组比较,模型对照组咳嗽次数显著增多( $P < 0.01$ ),吸气总气道阻力( $R_L$ )显著上升( $P < 0.05$ ),动态顺应性( $C_{dyn}$ )显著下降( $P < 0.05$ );与模型对照组比较,给药组的咳嗽次数显著减少( $P < 0.05$ ), $R_L$ 显著下降( $P < 0.05$ ), $C_{dyn}$ 显著上升( $P < 0.05$ )。**结论** 此种动物模型与咳嗽变异性哮喘多种临床特征相似,操作简便易行,故可作为咳嗽变异性哮喘的动物模型。

**【关键词】** 咳嗽变异性哮喘;动物模型;BN大鼠;卵蛋白;肺功能

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 03-0063-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.03.012

## Establishment of a Brown-Norway rat model of cough variant asthma

CHU Huilun<sup>1</sup>, KONG Deming<sup>1</sup>, DING Zitong<sup>1</sup>, GAO Qinqin<sup>1</sup>, XU Yan<sup>1</sup>, YAN Yue<sup>2</sup>,  
LI Youlin<sup>2</sup>, SUN Wenyan<sup>1\*</sup>

(1. School of Chinese Materia Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China.

2. Key Institute of Pneumopathy Chronic Cough and Dyspnea, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100102)

**【Abstract】 Objective** To establish a simple animal model of cough variant asthma (CVA) through sensitizing Brown-Norway (BN) rats with ovalbumin (OVA). **Methods** A total of 36 BN rats were randomly divided into three groups, including the normal control group, the model control group and the montelukast group. BN rats in the model group and the montelukast group were intraperitoneally administered with 2.0 mg of OVA and 100 mg of Al(OH)<sub>3</sub>, and the same volume of sterile saline was given to the normal group by intraperitoneal injection. Boosting was carried out by intraperitoneal administration with 0.01 mg of OVA and 100 mg of Al(OH)<sub>3</sub> 3 weeks later, and the rats in the normal group were injected with the same dose of physiological saline. Three weeks later, the actively sensitized BN rats were challenged with aerosolized OVA for 7 times on alternative days, and the rats in the normal group were treated with sterile saline instead of OVA. At the same time, the montelukast group was given 1.3 mg/kg of montelukast 30 minutes before atomization by intragastric administration once a day for 2 weeks, and the normal group and the model group were given the same volume of water. The

**【基金项目】**北京市科委十病十药项目(编号:Z151100003815025)。

**【作者简介】**楚慧伦(1992—),女,研究生在读,研究方向:中药抗炎免疫药理。E-mail: chuhuilun@bucm.edu.cn

**【通信作者】**孙文燕(1970—),男,副教授,博士,研究方向:中药抗炎免疫药理。E-mail: sunwy@bucm.edu.cn

tests of cough sensitivity to capsaicin and bronchial responsiveness were performed 24 h after the last administration. **Results**

Compared with the normal group, the times of coughing ( $P < 0.01$ ) and the lung resistance ( $R_L$ ) ( $P < 0.05$ ) in the model group were significantly increased, while the lung compliance ( $C_{dyn}$ ) was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). There was a significant difference ( $P < 0.05$ ) in the times of coughing caused by capsaicin between the model group and the montelukast group. Compared with the model group,  $R_L$  in the montelukast group was decreased significantly ( $P < 0.05$ ), and  $C_{dyn}$  was increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** This rat model of CVA is similar to a variety of clinical features of CVA and is easy to operate. Thus it can be used as an effective animal model of CVA.

**【Key words】** cough variant asthma, CVA; animal model; Brown-Norway rats; ovalbumin, OVA; pulmonary function

咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma, CVA)是一种特殊类型的哮喘,临床主要表现为慢性持续性干咳<sup>[1]</sup>,通常咳嗽比较剧烈,以夜间咳嗽为其重要特征,但无明显喘息、气促等症状或体征。感冒、冷空气、灰尘、油烟等容易诱发或加重咳嗽<sup>[2]</sup>。有研究表明,CVA是典型哮喘的前驱,约有30%的患者随着接触变应原时间的增长而发展为典型哮喘<sup>[3-4]</sup>,严重威胁公众健康。

CVA的发病机制与典型哮喘的发病机制相似<sup>[5]</sup>,主要与变应原致敏、气道慢性炎症反应、气道高反应性和气道重塑等密切相关。研究表明气道慢性炎症是各型各期哮喘病的共同病理学特征,是气道可逆性阻塞和非特异性气道高反应性的重要决定性因素,炎症的轻重反映哮喘病情的轻重。

Brown-Norway (BN)大鼠是高免疫球蛋白(尤其是IgE)应答品系<sup>[6]</sup>,更易诱发出CVA症状以及气道变应性炎症与气道高反应性,而目前我国常用的SD大鼠、Wistar大鼠等稳定性欠佳。故本研究拟用卵蛋白(ovalbumin, OVA)腹腔注射加雾化激发的方法,建立一种简便易行的咳嗽变异性哮喘BN大鼠模型,并使用临床常用的咳嗽变异性哮喘治疗药物孟鲁斯特钠作为阳性药,以评价模型的适用性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

Brown-Norway (BN)大鼠36只,SPF级,雌雄各半,体重180~200 g,8周龄左右,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2016-0011]。动物饲养于中日友好医院屏障环境中[SYXK(京)2016-0043],温度22℃~24℃,湿度44%~50%。

### 1.2 主要试剂与仪器

顺尔宁片(孟鲁斯特钠),杭州默沙东制药有限公司,产品批号:N007972;卵清白蛋白(卵蛋白, OVA):美国Sigma公司,批号:09/2017;辣椒素:美

国Sigma公司,批号:MKBN8613V;溴化乙酰胆碱,东京化成工业株式会社,批号:JQTEN-BD;戊巴比妥钠,德国Merck公司,生产批号:08/2017。

A02AI超声波雾化器:上海鱼跃医疗设备有限公司;AniRes2005动物肺功能分析系统:北京贝兰博科技有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 模型的制备及分组给药

大鼠随机分成三组(正常对照组、模型对照组、给药组)。第1日腹腔注射2 mg 卵蛋白(OVA)和100 mg  $Al(OH)_3$ ,3周后再次腹腔注射0.01 mg OVA及100 mg  $Al(OH)_3$ ,正常对照组注射等量生理盐水。3周后模型对照组和给药组开始用1% OVA进行雾化攻击,正常对照组用生理盐水,隔日一次,共7次。雾化当天开始给药,在雾化前30 min给药组进行孟鲁斯特钠(1.3 mg/kg)灌胃给药,模型对照组与正常对照组灌胃等量饮用水,每天一次,共14次。本实验方案经过中日友好医院实验动物福利伦理委员会审查,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理相关规定,编号:170101。本实验实施过程中严格遵守动物使用的3R原则。

#### 1.3.2 辣椒素引咳实验

最后一次给药24 h后,各组大鼠置于雾化箱内,雾化吸入 $10^{-4}$  mol/L辣椒素溶液60 s,记录2 min内各组大鼠的咳嗽次数。

#### 1.3.3 肺功能测定(激发实验)

将各组大鼠以2%戊巴比妥钠80 mg/kg腹腔注射麻醉,行气管有创插管,仰卧于小动物呼吸机的密闭体描箱内,气管插管与体描箱相连,观察气道压力波形正常后,建立颈总静脉给药通路,保证通路顺畅后关闭体描箱,待气道压力曲线平稳后,每隔5 min依次输入以下四个剂量的乙酰甲胆碱:0.025 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg。检测用药后大鼠吸气总气道阻力( $R_L$ )和动态顺应性( $C_{dyn}$ )。

1.4 统计学方法

采用 SAS 9.3 统计软件进行数据处理,实验数据均以平均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。数据服从正态分布采用方差分析,两两比较采用  $t$  检验;数据不服从正态分布或方差不齐采用非参数检验,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

2 结果

2.1 辣椒素引咳实验

与正常对照组比较,模型对照组咳嗽次数显著增多( $P < 0.01$ );与模型对照组比较,给药组的咳嗽次数显著减少( $P < 0.05$ ),说明模型对照组对辣椒素的刺激更加敏感(见表 1)。

2.2 肺功能(激发实验)测定

2.2.1 吸气总气道阻力( $R_L$ )

第一次激发,各组之间差异无显著性( $P > 0.05$ )。第二次激发,与正常对照组比较,模型对照组  $R_L$  显著上升( $P < 0.05$ );与模型对照组比较,给药组  $R_L$  显著下降( $P < 0.01$ )。第三次激发,与正常对照组比较,模型对照组  $R_L$  显著上升( $P < 0.05$ );与模型对照组比较,给药组  $R_L$  显著下降( $P < 0.05$ )。第四次激发中,与正常对照组比较,模型

对照组  $R_L$  显著上升( $P < 0.05$ )(见表 2)。说明模型对照组吸气气道阻力明显高于正常对照组。

2.2.2 动态顺应性( $C_{dyn}$ )

与正常对照组比较,模型对照组  $C_{dyn}$  在第二、三次激发中显著下降( $P < 0.05$ ),在第四次激发中也显著下降( $P < 0.01$ )。与模型对照组比较,给药组  $C_{dyn}$  在第二次( $P < 0.01$ )、第三次( $P < 0.05$ )、第四次( $P < 0.01$ )激发中均显著上升,说明模型对照组肺动态顺应性明显低于正常对照组,而孟鲁斯特钠可以有效缓解这一症状(见表 3)。

表 1 咳嗽次数比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.1 Comparison of times of coughing

| 组别<br>Groups                  | 大鼠数量<br>Number of rats | 咳嗽次数<br>Times of coughing |
|-------------------------------|------------------------|---------------------------|
| 正常对照组<br>Normal control group | 12                     | 3.67 ± 2.23               |
| 模型对照组<br>Model group          | 11                     | 12.33 ± 6.56**            |
| 孟鲁斯特钠组<br>Montelukast group   | 12                     | 4.92 ± 2.31 <sup>△</sup>  |

注:与正常对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型对照组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。  
Note. Compared with the normal control group,\*\* $P < 0.01$ . Compared with the model group,<sup>△</sup> $P < 0.05$ .

表 2 乙酰甲胆碱激发实验吸气总气道阻力比较( $\bar{x} \pm s$ , cmH<sub>2</sub>O/(mL/s))  
Tab.2 Comparison of  $R_L$  in the test of bronchial responsiveness

| 组别<br>Groups                  | 大鼠数量<br>Number of rats | 第一次激发<br>First excitation | 第二次激发<br>Second excitation | 第三次激发<br>Third excitation | 第四次激发<br>Fourth excitation |
|-------------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 正常对照组<br>Normal control group | 12                     | 0.55 ± 0.10               | 0.54 ± 0.09                | 0.56 ± 0.11               | 0.55 ± 0.06                |
| 模型对照组<br>Model group          | 11                     | 0.63 ± 0.16               | 0.65 ± 0.08*               | 0.69 ± 0.11*              | 0.79 ± 0.25*               |
| 孟鲁斯特钠组<br>Montelukast group   | 12                     | 0.57 ± 0.10               | 0.50 ± 0.05 <sup>△△</sup>  | 0.56 ± 0.07 <sup>△</sup>  | 0.60 ± 0.09                |

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型对照组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ 。  
Note. Compared with the normal control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ . Compared with the model group,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ .

表 3 乙酰甲胆碱激发实验动态顺应性( $C_{dyn}$ )比较( $\bar{x} \pm s$ , mL/cmH<sub>2</sub>O)  
Tab.3 Comparison of  $C_{dyn}$  in the test of bronchial responsiveness

| 组别<br>Groups                  | 大鼠数量<br>Number of rats | 第一次激发<br>First excitation | 第二次激发<br>Second excitation | 第三次激发<br>Third excitation | 第四次激发<br>Fourth excitation |
|-------------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 正常对照组<br>Normal control group | 12                     | 0.12 ± 0.02               | 0.12 ± 0.02                | 0.12 ± 0.02               | 0.12 ± 0.02                |
| 模型对照组<br>Model group          | 11                     | 0.11 ± 0.03               | 0.09 ± 0.03*               | 0.09 ± 0.04*              | 0.08 ± 0.03**              |
| 孟鲁斯特钠组<br>Montelukast group   | 12                     | 0.13 ± 0.02               | 0.13 ± 0.01 <sup>△△</sup>  | 0.13 ± 0.02 <sup>△</sup>  | 0.12 ± 0.01 <sup>△△</sup>  |

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型对照组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ 。  
Note. Compared with the normal control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ . Compared with the model group,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ .

### 3 讨论

咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma,CVA)是以慢性咳嗽为惟一或主要临床表现,不伴有明显喘息的一种特殊类型的支气管哮喘,又称为咳嗽型哮喘、隐匿型哮喘或过敏性咳嗽。患者具有气道高反应性和气道炎症等病理特征,其气道高反应性的程度与典型哮喘患者相似或略低,但 CVA 患者的呼吸道狭窄症状并没到引起喘息的程度,故只出现咳嗽而没有喘息症状,并且在支气管激发试验吸入乙酰胆碱的过程中,CVA 主要表现为咳嗽,喘息的发生率明显较低<sup>[7]</sup>。有研究显示,CVA 患者与典型哮喘患者相比,在生活中更加焦虑、压力更大<sup>[8]</sup>,严重危害公众健康,为了提高 CVA 疾病的治疗效果,CVA 动物模型的研发必不可少。

CVA 的发病机制与哮喘相似,因此两者的动物模型都主要通过卵蛋白(OVA)致敏造模。而 CVA 造模多用  $Al(OH)_3$  作为佐剂,哮喘多采用 OVA 联合百日咳的造模方法<sup>[9]</sup>。且因 CVA 的主要临床表现为咳嗽,所以实验中往往加入辣椒素引咳的内容,其结果也是证明模型成功与否的重要指标。

目前 CVA 动物模型的复制,国际上多使用 Brown-Norway(BN)大鼠,而国内常用的 SD 大鼠、Wistar 大鼠等稳定性欠佳,在国际上很难被认可。且有研究显示,BN 大鼠在致敏原的激发下,能产生较高水平的特异性 IgE、IgG 抗体,具有较强的致敏免疫反应<sup>[10]</sup>,与 CVA 临床症状接近。本研究即是在传统 CVA 动物模型复制方法的基础上<sup>[11-14]</sup>,通过采用 BN 大鼠,建立一种简便易行的 CVA 动物模型。

实验中辣椒素引咳结果显示,模型对照组咳嗽次数明显高于正常对照组,给药组咳嗽次数明显少于模型对照组,说明模型对照组对辣椒素的刺激更加敏感,符合 CVA 患者在外界因素刺激下咳嗽加剧的症状。

气道高反应性是 CVA 重要的生理学改变,也是诊断的重要指标<sup>[15]</sup>,本实验采用有创肺功能检测方法,观察乙酰甲胆碱激发实验中 BN 大鼠的  $R_L$  和  $C_{dyn}$  趋势。结果显示,第一次激发中各组之间  $R_L$  和  $C_{dyn}$  差异均无显著性,从第二次激发开始,模型对照组的  $R_L$  上升程度和  $C_{dyn}$  下降程度都明显超过正常对照组,给药组  $R_L$  上升幅度和  $C_{dyn}$  下降幅度都明显小于模型对照组。提示模型对照组肺功能明显低于正常对照组,而孟鲁斯特钠缓解了这一症状,与临床实验结果<sup>[16-17]</sup>接近。

本研究结果显示,模型对照组的咳嗽症状和气道高反应性符合 CVA 的临床症状,故所建立的 BN 大鼠咳嗽变异性哮喘模型与 CVA 患者的基本特征接近,可用于 CVA 治疗药物的干预性研究,而其生化及免疫反应特征尚有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 万力生. 支气管哮喘的诊治思路与研究 [M]. 北京: 学苑出版社, 2008: 51.
- [2] 曹玲, 陈育智. 咳嗽变异性哮喘 [J]. 中华儿科杂志, 1996, 34(1): 67-69.
- [3] Niimi A. Cough variant asthma; a major cause of chronic cough [J]. Clin Pulmonary Med, 2008, 15(4): 189-196.
- [4] Niimi A, Ohbayashi H, Sagara H, et al. Cough variant and cough-predominant asthma are major causes of persistent cough: a multicenter study in Japan [J]. J Asthma, 2013, 50(9): 932-937.
- [5] 谢林. 咳嗽变异型哮喘 30 例分析 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(1): 533-534.
- [6] 孙拿拿, 梁春来, 张倩男, 等. BN 大鼠致敏动物模型研究 [J]. 卫生研究, 2012, 41(3): 459-461.
- [7] 李娜, 卓宋明, 荀安营, 等. 布地奈德/福莫特罗干粉剂联合孟鲁司特治疗咳嗽变异性哮喘的效果 [J]. 广东医学, 2014, 35(10): 1605-1607.
- [8] 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.
- [9] 王雅娟, 赵一婷, 戴斌, 等. 两种大鼠哮喘模型的比较 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1175-1178.
- [10] Knippels LM, Houben GF, Spanhaak S, et al. An oral sensitization model in Brown Norway rats to screen for potential allergenicity of food proteins [J]. Methods, 1999, 19(1): 78-82.
- [11] Nishitsuji M, Fujimura M, Oribe Y, et al. Effect of montelukast in a guinea pig model of cough variant asthma [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2008, 21(1): 142-145.
- [12] 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: 883-886.
- [13] 吴继光, 黄漾, 王岚, 等. 不同类型支气管扩张剂对致敏豚鼠模型咳嗽反应的作用 [J]. 同济大学学报(医学版), 2008, 29(5): 15-18.
- [14] 蔡黎, 毕小利, 王忆勤, 等. 咳嗽变异性哮喘豚鼠模型的构建 [J]. 山西医科大学学报, 2007, 38(12): 1070-1073.
- [15] Ohta K, Yamaguchi M, Akiyama K, et al. Japanese guideline for adult asthma [J]. Allergology Int, 2011, 60: 115-145.
- [16] Takemura M, Niimi A, Matsumoto H, et al. Clinical, physiological and anti-inflammatory effect of montelukast in patients with cough variant asthma [J]. Respiration, 2012, 83(4): 308-315.
- [17] 庄明凤, 马敬斌, 殷汝昌, 等. 孟鲁司特咀嚼片对咳嗽变异性哮喘肺功能的影响 [J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(1): 89-92.