·实验研究·

敛肺止咳方干预肺纤维化相关咳嗽的作用机制*

范艺龄[1]，孔金莉[2]，苗青[1]

1. 中国中医科学院西苑医院，北京 100091；2. 北京中医药大学研究生院，北京 100029

摘要：目的：探讨敛肺止咳方干预肺纤维化相关咳嗽的作用机制。方法：将 112 只豚鼠随机分为造模组 96 只和假手术组 16 只。造模组豚鼠气管内给予博来霉素（8 U·kg^{-1}），制备肺纤维化模型。将造模成功的豚鼠随机分为模型组、敛肺止咳方低剂量组（6.35 g·kg^{-1}）、敛肺止咳方中剂量组（12.70 g·kg^{-1}）、敛肺止咳方高剂量组（25.40 g·kg^{-1}）、吡非尼酮组（130.70 mg·kg^{-1}）、K－252a 组（75 μg·kg^{-1}）。以造模日为第 0 天，第 28 天开始分别给予相应药物或生理盐水灌胃，连续 4 周。采用辣椒素检测各组豚鼠咳嗽次数，瑞氏染色对支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）进行细胞分类，并计算百分比。采用 HE 染色及 Masson 染色法观察肺组织病理形态，碱水解法检测肺组织羟脯氨酸含量。采用 HE 染色及扫描电镜观察气管病理形态，免疫组化法检测气管 P 物质（substance P，SP）蛋白表达水平。结果：与假手术组比较，模型组豚鼠的咳嗽次数增加（$P<0.001$）；与模型组比较，敛肺止咳方高剂量组、敛肺止咳方中剂量组及吡非尼酮组豚鼠的咳嗽次数减少（$P<0.05$）。与假手术组比较，模型组豚鼠 BALF 巨噬细胞百分比降低（$P<0.001$），淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比升高（$P<0.05$）。与模型组比较，敛肺止咳方中剂量组、高剂量组豚鼠巨噬细胞百分比升高（$P<0.01$）。HE 染色显示，假手术组豚鼠肺组织形态基本正常。模型组豚鼠支气管壁、肺泡间隔增厚，伴炎症细胞浸润及胶原纤维渗出。与模型组比较，各药物组豚鼠肺组织病理形态改善。Masson 染色显示，假手术组豚鼠肺组织结构基本正常。模型组豚鼠肺组织可见大量蓝色胶原纤维沉积。与模型组比较，各药物组豚鼠胶原纤维沉积减少。与假手术组比较，模型组豚鼠 Ashcroft 评分、肺组织羟脯氨酸含量升高（$P<0.000\ 1$）；与模型组比较，各药物组豚鼠 Ashcroft 评分降低（$P<0.05$）。HE 染色显示，假手术组豚鼠气管形态基本正常。模型组豚鼠气管黏膜上皮脱失，管壁及周围组织见少量炎症细胞浸润。与模型组比较，各药物组豚鼠气管病理形态改善。扫描电镜显示，假手术组豚鼠气管上皮纤毛排列整齐、密度大。模型组豚鼠气管上皮纤毛排列紊乱、稀疏、短小，并出现倒伏现象。各药物组豚鼠气管纤毛排列较模型组整齐，数量增多。免疫组化显示，与假手术组比较，模型组豚鼠气管 SP 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，敛肺止咳方低剂量组、中剂量组、吡非尼酮组、K－252a 组豚鼠 SP 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。结论：敛肺止咳方可改善肺纤维化豚鼠症状，其机制可能与减轻肺与气管损伤，降低气管 SP 蛋白表达水平有关。

关键词：敛肺止咳方；肺纤维化；咳嗽

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.02.068

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)02－0413－10

Action Mechanism of Lianfei Zhike Formula Intervening Pulmonary Fibrosis Associated Cough

FAN Yiling[1]，KONG Jinli[2]，MIAO Qing[1]

1. Xiyuan Hospital，China Academy of Chinese Medical Sciences，Beijing China 100091；2. Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine，Beijing China 100029

Abstract：Objective：To investigate the mechanism of action of Lianafei Zhike Formula in intervening cough associated with pulmonary fibrosis. Methods：All of the 112 guinea pigs were randomly divided into 96 in the modeling group and 16 in the sham operation group.

* **基金项目**：国家自然科学基金面上项目（82074422）

The guinea pigs in the modeling group were given bleomycin (8 U · kg^{-1}) intratracheally to prepare the lung fibrosis model. Successfully modeled guinea pigs were randomly divided into the model group, the low – dose group of Lianafei Zhike Formula (6.35 g · kg^{-1}), the medium – dose group of Lianafei Zhike Formula (12.7 g · kg^{-1}), the high – dose group of Lianafei Zhike Formula (25.4 g · kg^{-1}), the pirfenidone group (130.7 mg · kg^{-1}), and the K – 252a group (75 g · kg^{-1}). The modeling day was taken as day 0, and the corresponding drugs or saline were given by gavage starting from day 28 for 4 weeks, respectively. Capsaicin was used to detect the number of coughs of guinea pigs in each group, and Rachel′s staining was used to classify the cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and calculate the percentage. HE staining and Masson staining were used to observe the pathological morphology of lung tissue, and the hydroxyproline content of lung tissue was detected by alkaline hydrolysis method. HE staining and scanning electron microscopy were used to observe the pathological morphology of trachea, and the protein expression level of tracheal substance P (SP) was detected by immunohistochemistry. Results: Compared with the sham – operated group, the number of coughs of guinea pigs in the model group increased ($P < 0.001$); compared with the model group, the number of coughs of guinea pigs in the high – dose group of Lianafei Zhike Formula, the medium – dose group of Astringent Lung and Cough Suppressing Formula and the pirfenidone group decreased ($P < 0.05$). Compared with the sham – operated group, guinea pigs in the model group showed a decrease in the percentage of BALF macrophages ($P < 0.001$) and an increase in the percentage of lymphocytes and neutrophils ($P < 0.05$). Compared with the model group, the percentage of macrophages increased in the middle – dose and high – dose groups of Lianafei Zhike Formula ($P < 0.01$). HE staining showed that the morphology of guinea pig lung tissue in the sham – operated group was basically normal. The bronchial wall and alveolar septum of guinea pigs in the model group were thickened, accompanied by inflammatory cell infiltration and collagen fiber exudation. Compared with the model group, the histopathological morphology of the lungs of guinea pigs in each drug group was improved, and Masson staining showed that the structure of the lungs of guinea pigs in the sham – operated group was basically normal. Masson staining showed that the lung tissue of guinea pigs in the sham – operated group was basically normal. Compared with the model group, the collagen fiber deposition was reduced in the guinea pigs of each drug group. Compared with the sham – operated group, the Ashcroft score and hydroxyproline content of the lung tissue of guinea pigs in the model group were elevated ($P < 0.000\ 1$); compared with the model group, the Ashcroft score of guinea pigs in each drug administration group was reduced ($P < 0.05$). HE staining showed that the morphology of trachea of guinea pigs in the sham – operated group was basically normal. In the model group, the epithelium of the tracheal mucosa was lost, and a small amount of inflammatory cell infiltration was seen in the wall and surrounding tissues. Compared with the model group, the pathologic morphology of the trachea of guinea pigs in each administration group improved. Scanning electron microscopy showed that the epithelial cilia of guinea pig trachea in the sham – operated group were neatly arranged and densely packed. In the model group, the epithelial cilia of guinea pig trachea were disorganized, sparse, short, and appeared to be inverted. The tracheal cilia of guinea pigs in each drug administration group were more neatly arranged and more numerous than those in the model group. Immunohistochemistry showed that compared with the sham – operated group, the expression level of guinea pig tracheal SP protein was elevated in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the SP protein expression level of guinea pigs in the low – dose group, medium – dose group, pirfenidone group and K – 252a group of Lianafei Zhike Formula decreased ($P < 0.05$). Conclusion: Lianafei Zhike Formula can improve the symptoms of guinea pigs with pulmonary fibrosis, and its mechanism may be related to the reduction of lung and airway damage and the reduction of airway SP protein expression level.

Key words: Lianfei Zhike Formula; pulmonary fibrosis; cough

咳嗽是间质性肺病(interstitial lung disease, ILD)患者的常见症状,高达 86.1% 的 ILD 患者存在干咳[1]。其中,特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)患者咳嗽的发病率最高[2-3]。IPF 患者往往表现为剧烈而频繁的咳嗽,咳嗽频率为 9.4 次 · h^{-1},最高可达 39.4 次 · h^{-1},远高于哮喘和慢性阻塞性肺疾病患者[4]。与其他慢性咳嗽相似,IPF 相关的咳嗽常导致患者难以入睡或半夜咳醒等,咳嗽一旦发作,难以控制,进而引发严重疲劳、呼吸短促、外周血氧饱和度降低,甚至患者感觉无法呼吸,严重影响其生活质量[5-7]。此外,咳嗽的严重程度可独立预测 IPF 疾病进展、患者死亡或肺移植时间[3]。IPF 的病理变化主要影响神经分布较少的肺实质和肺泡,其病灶位置本不应引发咳嗽,但临床观察显示,咳嗽是其典型症状之一。IPF 相关咳嗽的机制可能与肺纤维化及炎症影响近中央气道有关。

IPF 多发生于中年后,中医认为其发病年龄体现了脏腑亏虚在疾病发生中的基础作用,尤以肺肾两虚为甚。基于 IPF 肺肾两虚的病机关键,本课题组主张以“虚咳”“虚嗽”论治 IPF 相关咳嗽,常以敛肺止咳方进行治疗,临床实践表明其对 IPF 相关咳

嗽具有显著疗效。本研究以气管和气道炎症为切入点，观察敛肺止咳方对肺纤维化咳嗽豚鼠气管和气道炎症的影响，探讨其作用机制，旨在为临床应用敛肺止咳方治疗肺纤维化相关咳嗽提供科学依据。

1　材料

1.1　动物　健康雄性 Hartley 豚鼠 112 只，纯白色，体质量 250 ~ 300 g，购自北京芳元缘养殖场，许可证编号：SCXK（京）2020 - 0001。动物饲养于中国中医科学院西苑医院普通级动物房，12 h/12 h 明暗循环，温度（22 ± 2）℃，湿度 50% ~ 60%，自由摄食和饮水。本实验已获得中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批通过，批准号：2021XLC040 - 2。

1.2　药物　敛肺止咳方由旋覆花、炙麻黄、苦杏仁、白芍、蜜紫菀、炙百部、炙黄芪、山茱萸等 10 味中药组成，由河北百草康神药业有限公司提供。将原方制成流浸膏，流浸膏 1 g 相当于生药 2.08 g。吡非尼酮胶囊（北京康蒂尼药业有限公司，规格 100 mg/粒，批准文号：国药准字 H20133376）。注射用盐酸博来霉素（瀚辉制药有限公司，批准文号：国药准字 H20055883）。

1.3　主要试剂与仪器　K - 252a、辣椒素（MedChemExpress 公司，货号：HY - N6732、HY - 10448）；10% 中性福尔马林固定液、电镜固定液（北京索莱宝科技有限公司，货号：G2161、G1102）；羟脯氨酸试剂盒（南京建成生物工程研究所有限公司，货号：A030 - 2 - 1）；P 物质（substance P，SP）抗体（Abcam 公司，货号：ab14184）。

HY - LWH03 型微量液体气管内雾化器（北京元森凯德生物技术有限公司）；YLS - 8B 型小动物雾化给药仪（济南益延科技发展有限公司）；MEK6318 型血细胞分析仪（日本光电）；JJ - 12J 型脱水机、JB - P5 型包埋机、RM2016 型病理切片机（武汉俊杰电子有限公司）；DHG - 9140A 型烤箱（上海慧泰仪器制造有限公司）；KD - P 型组织摊片机（浙江省金华市科迪仪器设备有限公司）；Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜、NIKON DS - U3 型成像系统（日本尼康）；SU8100 型扫描电子显微镜（HITACHI）。

2　方法

2.1　造模方法　将 112 只豚鼠随机分为假手术组 16 只和造模组 96 只。造模组豚鼠参照文献[8 - 10]建立肺纤维化模型，具体方法如下：豚鼠适应性喂养 1 周后，禁食 12 h，用 1% 戊巴比妥钠（30 mg · kg^{-1}）进行麻醉。将豚鼠呈仰卧位固定于鼠板上，在喉镜下用专用棉签清理咽部分泌物，看见透亮的声门后，手持微量注射器沿着上颚中线进针，在豚鼠声门打开的瞬间插入气管内，迅速推注 8 U · kg^{-1}博来霉素（溶于约 0.2 mL 生理盐水），快速从气道拔出注射器。将豚鼠直立旋转（前后左右轻轻摇晃），使药物在肺内分布均匀，同时避免液体堵塞气道致豚鼠窒息死亡，将其呈侧卧位放置于温暖的毛毯上。假手术组豚鼠气管内给予等体积生理盐水。

以造模日为第 0 天，造模后第 21 天，假手术组与造模组随机抽取 2 只豚鼠，获取肺组织，进行 HE 染色和 Masson 染色。若豚鼠肺组织出现较多蓝色胶原纤维沉积，则判定肺纤维化模型复制成功。

2.2　分组及给药　将造模成功的豚鼠采用随机分层抽样法分为模型组、敛肺止咳方低剂量组、敛肺止咳方中剂量组、敛肺止咳方高剂量组、吡非尼酮组、K - 252a 组（NGF 受体抑制剂）。参照《药理实验方法学》《中药药理研究方法学》，按动物体质量折算系数进行换算，敛肺止咳方低剂量组的灌胃剂量为 6.35 g · kg^{-1}，敛肺止咳方中剂量组的灌胃剂量为 12.70 g · kg^{-1}，敛肺止咳方高剂量组的灌胃剂量为 25.40 g · kg^{-1}，吡非尼酮组的灌胃剂量为 130.7 mg · kg^{-1}。造模后第 28 天开始给药，假手术组、模型组及 K - 252a 组豚鼠给予等体积生理盐水灌胃，每日 1 次，连续 4 周。K - 252a 组豚鼠在取材前 1 周给予 K - 252a 腹腔注射（75 μg · kg^{-1}），每日 1 次，连续 1 周。

2.3　行为学观察　实验期间每天观察并记录豚鼠进食、饮水、毛发、呼吸、精神、活动等情况。

2.4　豚鼠咳嗽次数检测　辣椒素溶液制备：取 30.5 mg 辣椒素，溶解在 1 mL 无水乙醇和 1 mL 吐温 - 80 中，然后进一步溶解在 8 mL 生理盐水中，得到 0.01 mol · L^{-1}的储备溶液，使用时用生理盐水稀释至 50 μmol · L^{-1}的浓度。

各组豚鼠在药物干预后第 27 天，使用小动物雾化给药仪检测咳嗽次数，即雾化 3 min，观察 8 min 内的咳嗽次数。由受过培训的观察员进行计数，咳嗽的典型特征为豚鼠前脚张开，脖子向前伸展，特征性张口姿态，腹部急速抽动以及特征性声音[11]。

2.5　样本制备

2.5.1　支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）　各组豚鼠给药 4 周，以 3% 戊巴比妥腹腔注射麻醉。取血后，暴露气管、支气管、肺，钝性

分离气管、支气管，有创气管插管，止血钳夹闭右主支。在插管处注入生理盐水 3 mL(2 次共 6 mL)，每注射 3 mL 反复灌洗 3 次，平缓灌洗左肺，获得 BALF，回收率为 70% ~80%，取大约 1 mL 用于细胞分类与计数。

2.5.2　肺组织和气管　取未灌洗的右肺中叶肺组织和下段气管，置于 10% 中性福尔马林固定液中常规固定。固定完成后，气管进行 HE 染色，肺组织进行 HE 染色、Masson 染色。取下段气管置于电镜固定液中常规固定，用于电镜观察。

2.6　BALF 细胞分类与计数　使用血细胞分析仪检测 BALF 中有核细胞数目。用 PBS 调整细胞数量至 1×10^4 mL^{-1}，细胞涂片，常规瑞氏染色 10 min。选择细胞涂片最为均匀处，在油镜(100 倍)下顺序计数 200 个完整的有核细胞，计算巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞百分比。

2.7　HE 染色检测气管、肺组织病理形态　以二甲苯Ⅰ、Ⅱ各 20 min，无水乙醇Ⅰ、Ⅱ各 5 min，75% 酒精 5 min 为主要步骤进行石蜡切片脱蜡至水；苏木素染色；梯度酒精脱水后进行伊红染色。以无水乙醇Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ各 5 min，二甲苯Ⅰ、Ⅱ各 5 min 透明，使用中性树胶封片，显微镜下采集图像。

2.8　Masson 染色检测肺组织病理形态　石蜡切片常规脱蜡至水，切片浸入 Masson A 液中浸泡过夜。按照规范操作分别以 Masson B 液与 Masson C 液等比例混合染液，Masson D、Masson E、Masson F 浸染，用 1% 冰醋酸漂洗分化，无水乙醇脱水。之后进行透明封片，显微镜下采集图像。

肺组织纤维化程度通过 Ashcroft 评分系统[12]进行量化，评分从 0 级(正常肺)至 8 级(纤维闭塞)。

2.9　肺组织羟脯氨酸含量检测　使用羟脯氨酸测定试剂盒，根据说明书测定各组豚鼠肺组织中羟脯氨酸含量。

2.10　扫描电镜检测气管超微结构　取固定好的气管，用 0.1 mmol · L^{-1} 磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗 3 次，每次 15 min。以 1% 锇酸室温避光固定 1 ~2 h，磷酸缓冲液再次漂洗。将气管依次放入不同浓度的酒精中，每次 15 min，乙酸异戊酯 15 min 进行脱水。将气管放入临界点干燥仪内干燥，导电处理后，扫描电子显微镜下观察并采集图像。

2.11　免疫组化法检测气管 SP 蛋白表达情况　按要求将石蜡切片脱蜡至水，切片置于柠檬酸抗原修复缓冲液内，在微波炉内进行抗原修复。切片放入 3% 双氧水溶液，室温避光孵育 25 min。滴加 3% BSA，室温封闭 30 min。加一抗 4 ℃孵育过夜，加二抗室温孵育 50 min。加 DAB 显色液，呈棕黄色时终止显色。以苏木素进行细胞核复染，脱水封片，显微镜下采集图像。

每组取 3 个样本，每张载玻片取 6 张图像进行量化。采用 Image Pro Plus 6.0 软件获取光密度(IOD)和阳性面积(Area)，计算两者的比值，即平均光密度值，以评估 SP 蛋白表达水平。

2.12　统计学方法　所有数据以 SPSS 23.0 统计学软件进行分析，以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。若数据符合正态分布且方差齐，多组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 *LSD* 检验；若不符合正态分布，采用非参数检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　各组豚鼠一般情况　假手术组豚鼠精神状态良好，无异常行为表现，毛发光泽顺滑，进食饮水正常，二便正常，体质量平稳增长。模型组豚鼠有精神萎靡现象，毛发逐渐稀疏松散，光泽度欠佳，体质量较假手术组呈不同程度减轻；部分豚鼠精神萎靡严重，皮毛枯槁无光泽，严重消瘦，反应迟钝，喘息气急，甚至出现拱背，口唇、爪甲及尾尖青紫现象。各药物组豚鼠随着用药时间延长，行为学表现较模型组有所改善。

假手术组豚鼠在整个实验期间无死亡情况。造模组豚鼠在给予博来霉素 28 d 内，死亡 5 只；剩余 89 只豚鼠随机分为模型组 15 只，敛肺止咳方低剂量组 15 只，敛肺止咳方中剂量组 15 只，敛肺止咳方高剂量组 15 只，吡非尼酮组 15 只以及 K-252a 组 14 只。给药期间，模型组死亡 2 只，敛肺止咳方低剂量组死亡 2 只，敛肺止咳方中剂量组死亡 2 只，敛肺止咳方高剂量组死亡 1 只，吡非尼酮组死亡 2 只，K-252a 组死亡 2 只。

3.2　各组豚鼠 8 min 内咳嗽次数变化　与假手术组比较，模型组豚鼠的咳嗽次数增加($P < 0.001$)；与模型组比较，敛肺止咳方高剂量组、敛肺止咳方中剂量组及吡非尼酮组豚鼠的咳嗽次数减少($P < 0.01$，$P < 0.05$，$P < 0.05$)，见表 1。

3.3　各组豚鼠 BALF 细胞分类变化　与假手术组比较，模型组豚鼠 BALF 巨噬细胞百分比显著降低($P < 0.001$)；与模型组比较，敛肺止咳方中剂量组、高剂量组豚鼠巨噬细胞百分比显著升高($P < 0.01$，

$P<0.001$）。

与假手术组比较，模型组豚鼠 BALF 淋巴细胞百分比明显升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各药物组豚鼠 BALF 淋巴细胞百分比呈降低趋势，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

与假手术组比较，模型组豚鼠 BALF 中性粒细胞百分比显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各药物组豚鼠 BALF 中性粒细胞百分比呈降低趋势，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

与假手术组比较，模型组豚鼠 BALF 嗜酸性粒细胞百分比呈升高趋势，差异无统计学意义（$P>0.05$）；与模型组比较，各药物组豚鼠 BALF 嗜酸性粒细胞百分比呈降低趋势，差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 2。

表 1　各组豚鼠 8 min 内咳嗽次数比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	咳嗽次数/次
假手术组	14	5.21 ± 2.46
模型组	13	12.77 ± 2.24***
敛肺止咳方低剂量组	13	9.46 ± 3.36
敛肺止咳方中剂量组	13	7.46 ± 4.70#
敛肺止咳方高剂量组	14	6.36 ± 5.11##
吡非尼酮组	13	7.46 ± 5.06#
K－252a 组	12	8.83 ± 3.19

注：与假手术组比较，*** $P<0.001$；与模型组比较，# $P<0.05$，## $P<0.01$。

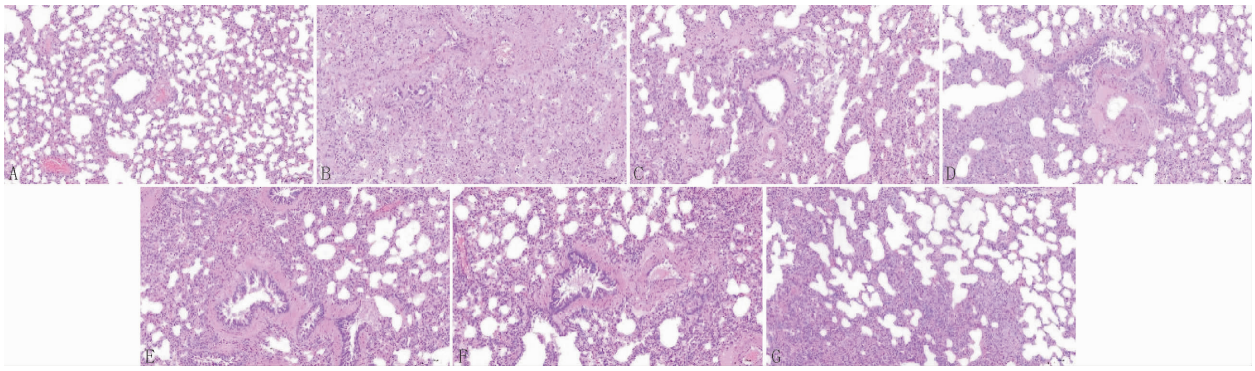
表 2　各组豚鼠 BALF 巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞百分比比较　（$\bar{x}\pm s$，%）

组别	n	巨噬细胞	淋巴细胞	中性粒细胞	嗜酸性粒细胞
假手术组	14	78.46 ± 9.47	6.29 ± 3.58	5.86 ± 4.83	9.39 ± 4.26
模型组	13	45.85 ± 9.60***	13.00 ± 6.81*	23.38 ± 14.17**	17.77 ± 7.40
敛肺止咳方低剂量组	13	55.88 ± 12.33	8.38 ± 4.62	19.27 ± 19.98	16.46 ± 12.08
敛肺止咳方中剂量组	13	67.54 ± 10.64##	12.19 ± 5.64	10.12 ± 6.34	10.15 ± 6.06
敛肺止咳方高剂量组	14	71.29 ± 9.51###	11.61 ± 4.02	10.61 ± 6.61	6.50 ± 5.22
吡非尼酮组	13	57.00 ± 12.47	8.50 ± 5.00	23.19 ± 11.45	11.31 ± 8.02
K－252a 组	12	63.54 ± 12.00	9.75 ± 4.06	14.54 ± 10.46	12.17 ± 9.32

注：与假手术组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$，*** $P<0.001$；与模型组比较，## $P<0.01$，### $P<0.001$。

3.4　各组豚鼠肺组织病理形态变化

3.4.1　HE 染色结果　假手术组豚鼠肺组织形态结构基本正常，肺泡间隔清晰可见，无明显炎症细胞浸润及纤维渗出。模型组豚鼠肺组织形态结构破坏明显，支气管壁、肺泡间隔增厚，有炎症细胞浸润及胶原纤维渗出。与模型组比较，各药物组豚鼠肺组织病理形态改善。见图 1。



注：A：假手术组；B：模型组；C：敛肺止咳方低剂量组；D：敛肺止咳方中剂量组；E：敛肺止咳方高剂量组；F：吡非尼酮组；G：K－252a 组；比例尺 = 100 μm。

图 1　各组豚鼠肺组织 HE 染色图

3.4.2　Masson 染色结果　假手术组豚鼠肺组织结构基本正常，有少量蓝色胶原纤维沉积。模型组豚鼠肺组织结构破坏明显，可见大量蓝色胶原纤维沉积，支气管壁、血管壁周围尤其明显。各药物组豚鼠肺组织结构部分破坏，见较多胶原纤维沉积，胶原纤维面积较模型组减少。

与假手术组比较，模型组豚鼠 Ashcroft 评分显著升高（$P<0.000\ 1$）。与模型组比较，敛肺止咳方低剂量组、中剂量组、高剂量组、吡非尼酮组及 K－252a 组豚鼠 Ashcroft 评分明显降低（$P<0.05$，

$P<0.01$，$P<0.05$，$P<0.001$，$P<0.01$）。见表 3、图 2。

3.5　各组豚鼠湿肺组织羟脯氨酸含量变化　与假手术组比较，模型组豚鼠湿肺组织羟脯氨酸含量显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，各药物组豚鼠湿肺组织羟脯氨酸含量呈降低趋势，差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 4。

表 3　各组豚鼠肺组织纤维化评分比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Ashcroft 评分/分
假手术组	6	1.72 ± 0.47
模型组	6	4.67 ± 0.49****
敛肺止咳方低剂量组	6	3.50 ± 0.77$^{\#}$
敛肺止咳方中剂量组	6	3.17 ± 0.41$^{\#\#}$
敛肺止咳方高剂量组	6	3.42 ± 0.80$^{\#}$
吡非尼酮组	6	3.05 ± 0.54$^{\#\#\#}$
K－252a 组	6	3.17 ± 0.75$^{\#\#}$

注：与假手术组比较，$****P<0.0001$；与模型组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$，$\#\#\#P<0.001$。

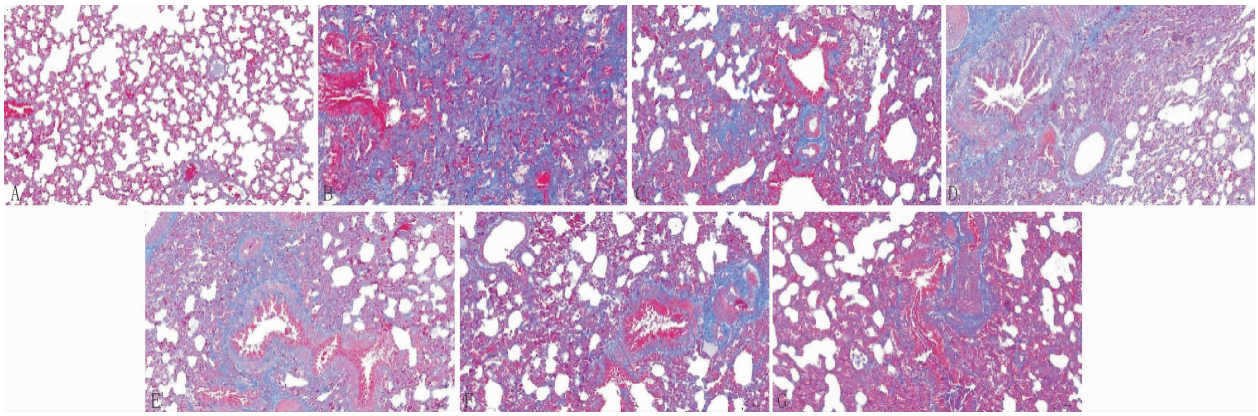
3.6　各组豚鼠气管病理形态变化

3.6.1　HE 染色结果　假手术组豚鼠气管黏膜上皮连续完整，管腔内基本无脱落细胞，管壁及周围组织基本无炎症细胞浸润。模型组豚鼠气管黏膜上皮黏附性差、脱失，管壁及周围组织见少量炎症细胞浸润，小血管增生，柱状细胞低平，纤毛排列不整齐。各药物组豚鼠气管黏膜上皮脱失程度、管壁及周围组织炎症细胞浸润程度较模型组减轻。见图 3。

表 4　各组豚鼠湿肺组织中羟脯氨酸含量比较　（$\bar{x}\pm s$）

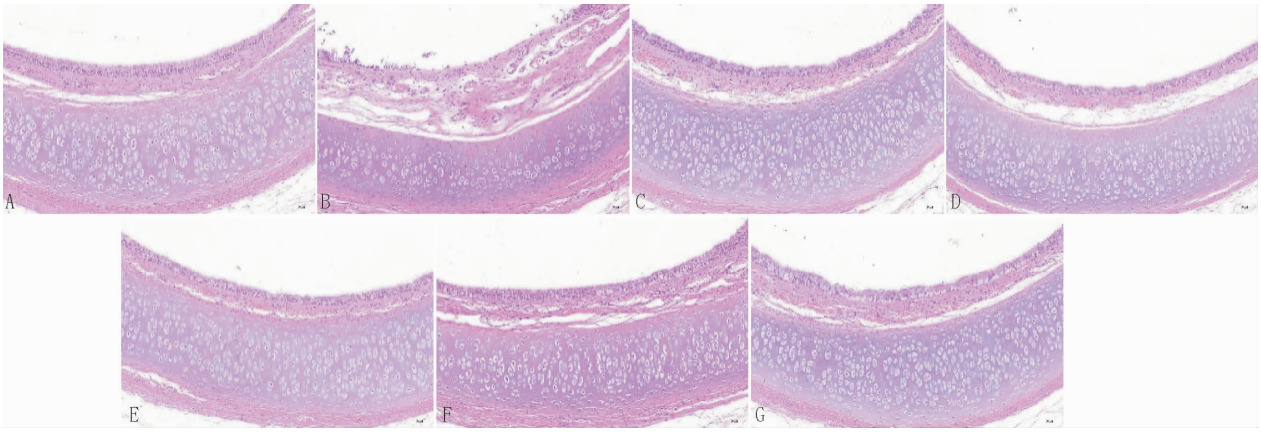
组别	n	羟脯氨酸含量/μg·mg^{-1}
假手术组	11	0.78 ± 0.16
模型组	11	1.16 ± 0.26**
敛肺止咳方低剂量组	11	0.97 ± 0.22
敛肺止咳方中剂量组	11	0.92 ± 0.28
敛肺止咳方高剂量组	11	0.96 ± 0.15
吡非尼酮组	11	0.92 ± 0.24
K－252a 组	10	0.94 ± 0.26

注：与假手术组比较，$**P<0.01$。



注：A：假手术组；B：模型组；C：敛肺止咳方低剂量组；D：敛肺止咳方中剂量组；E：敛肺止咳方高剂量组；F：吡非尼酮组；G：K－252a 组；比例尺 = 100 μm。

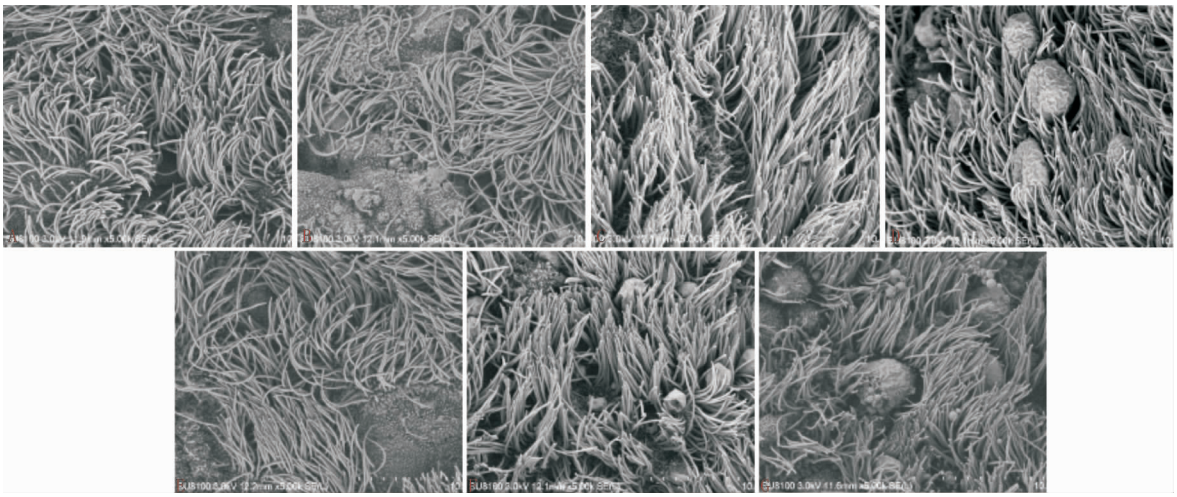
图 2　各组豚鼠肺组织 Masson 染色图



注：A：假手术组；B：模型组；C：敛肺止咳方低剂量组；D：敛肺止咳方中剂量组；E：敛肺止咳方高剂量组；F：吡非尼酮组；G：K－252a 组；比例尺 = 100 μm。

图 3　各组豚鼠气管 HE 染色图

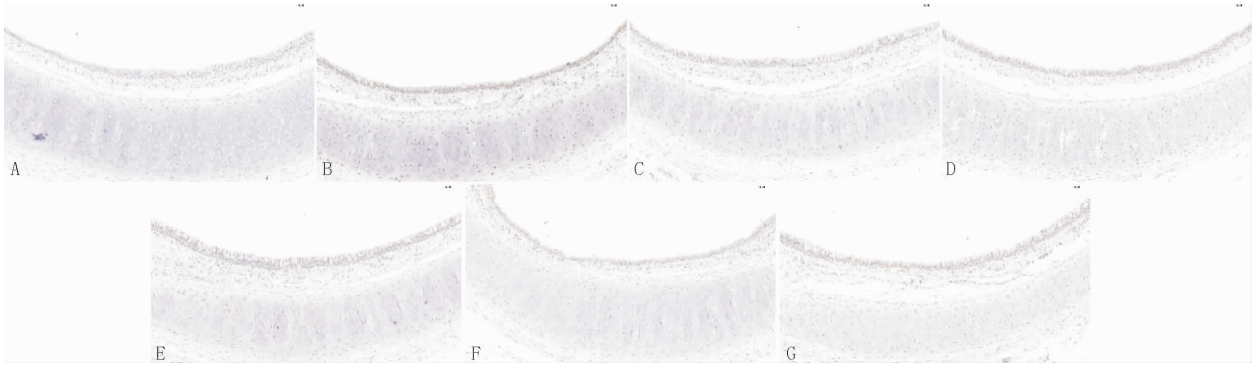
3.6.2　扫描电镜结果　假手术组豚鼠气管上皮纤毛排列整齐、密度大。模型组豚鼠气管上皮纤毛排列紊乱、稀疏、短小，并出现倒伏现象。各药物组豚鼠气管纤毛排列较模型组整齐，数量增多。见图 4。



注：A：假手术组；B：模型组；C：敛肺止咳方低剂量组；D：敛肺止咳方中剂量组；E：敛肺止咳方高剂量组；F：吡非尼酮组；G：K－252a 组。

图 4　各组豚鼠气管扫描电镜图

3.7　各组豚鼠气管 SP 蛋白表达水平变化　免疫组化显示，与假手术组比较，模型组豚鼠气管 SP 蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，敛肺止咳方低剂量组、中剂量组、吡非尼酮组、K－252a 组豚鼠气管 SP 蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$，$P<0.01$，$P<0.05$，$P<0.05$）。各药物组豚鼠气管 SP 蛋白表达水平比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 5、表 5。



注：A：假手术组；B：模型组；C：敛肺止咳方低剂量组；D：敛肺止咳方中剂量组；E：敛肺止咳方高剂量组；F：吡非尼酮组；G：K－252a 组；比例尺＝100 μm。

图 5　各组豚鼠气管 SP 蛋白免疫组化染色图

表 5　各组豚鼠气管 SP 蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	SP 蛋白表达水平
假手术组	3	0.008 ± 0.006
模型组	3	0.024 ± 0.000**
敛肺止咳方低剂量组	3	0.009 ± 0.002##
敛肺止咳方中剂量组	3	0.013 ± 0.004##
敛肺止咳方高剂量组	3	0.017 ± 0.005
吡非尼酮组	3	0.013 ± 0.008#
K－252a 组	3	0.015 ± 0.001#

注：与假手术组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$。

4　讨论

本课题组基于长期临床实践发现，肺肾两虚是 IPF 相关咳嗽发生的关键。脏腑虚损之体极易内生痰、瘀，或是感受风、寒之邪，导致肺气失宣，发为咳嗽。IPF 咳嗽多表现为阵发性剧烈干咳、气促而咳，尤以活动后明显。我们认为 IPF 咳嗽不仅存在肺气失宣，同时由于肺气不足、肺气上壅不能下归于肾元，失于敛降而致肺气上逆，发为咳喘。敛肺止咳方由旋覆花、炙麻黄、苦杏仁、白芍、蜜紫菀、炙百部、炙

黄芪、山茱萸等 10 味中药组成。方中熟地黄、山茱萸补益肾精、纳气固本止咳，同时以黄芪补胸中大气。由于肺气宣发肃降失常贯穿 IPF 咳嗽始终，因此敛肺止咳方组方时在补虚扶正的基础上加入金沸草散与止嗽散中的旋覆花、炙麻黄、白芍、蜜紫菀、炙百部等宣降肺气，并加入苦杏仁加强降气止咳之效。白芍还可减少肺气耗散，防辛散太过、耗气伤阴。这对于 IPF 肺虚严重，肺气上壅而不能下归于肾元，肺气敛降失常尤为适宜，恰如《本草经疏》所载："气虚则上壅而不归元，酸以收之，摄气归元，则咳逆上气自除矣。"全方具有宣肺降气、敛肺止咳、益肺补肾之功。

慢性咳嗽本质上既可是特发性的，亦是大多数慢性肺部疾病的主要症状，包括 IPF、哮喘等。据文献报道，IPF 患者咳嗽敏感性增强，对多种刺激比较敏感，包括空气中的花粉、烟雾、气溶胶等。此外，日常活动中从轻度如步行、洗衣服至剧烈如爬楼梯，以及进食、谈话、躺下、清嗓或深呼吸均可能诱发咳嗽[2]。有研究提出，咳嗽最常见于有严重牵拉性支气管扩张的 IPF 患者和外周血氧饱和度下降时[7]。IPF 咳嗽具有与咳嗽变异性哮喘等慢性咳嗽相似的特点，即对空气中的刺激物比较敏感；同时存在疾病特异性，尤其在剧烈活动后咳嗽加重。本研究与现有文献报道[8,13]一致，与假手术组相比，模型组豚鼠在辣椒素刺激下咳嗽次数增加，提示肺纤维化豚鼠的咳嗽敏感性升高。给予敛肺止咳方干预后，豚鼠咳嗽次数减少，说明敛肺止咳方具有改善肺纤维化豚鼠咳嗽敏感性的作用。

咳嗽感受器在咽部、气管隆嵴分布最多，且敏感性最高，因此喉、气管、主支气管的病变多伴明显咳嗽，而小气道及肺泡病变往往不以咳嗽为主要症状[14]。IPF 咳嗽的机制可能与肺纤维化及炎症影响近中央气道有关。本研究显示，与假手术组相比，模型组豚鼠气管存在更严重的气道黏膜上皮损伤、脱落，小血管增生，以及纤毛排列紊乱。气道上皮位于内外环境的交界面，感染和炎症常可导致气道上皮损伤、脱落，进而暴露上皮下神经末梢，使其容易受物理或化学刺激的影响而引发咳嗽[14]。环境因素和炎症引发的气道上皮反复损伤、修复和再生过程，也可导致气道黏膜上皮的组织学变化和功能异常。研究报道，非哮喘与哮喘性慢性咳嗽患者均有明显的气道壁重构现象，伴有杯状细胞增生、上皮下纤维化和血管增生，其中某些变化可能与咳嗽反射增强有关[15]。基于此，我们推测气道壁黏膜和上皮的变化可能在 IPF 咳嗽敏感性变化方面发挥重要作用。IPF 患者遇空气刺激物引发的咳嗽特点可能与气管、支气管的病理变化有关，这与文献报道的上皮破坏和感觉神经暴露导致咳嗽反应加剧的机制具有一致性[16]。此外，本研究显示敛肺止咳方干预的豚鼠气管黏膜上皮损伤、脱落，小血管增生，以及纤毛排列紊乱等情况较模型组减轻，说明敛肺止咳方可能通过改善肺纤维化豚鼠气管损伤，从而缓解辣椒素引起的咳嗽敏感性增强。

在气道炎症存在的情况下，炎症介质不仅可以直接刺激气道黏膜中的咳嗽感受器，还可易化咳嗽感受器，造成咳嗽可塑性改变，使其被正常的阈下刺激所激活[14]。临床研究显示，与对照组相比，IPF 患者气道分泌物中白蛋白水平升高，中性粒细胞比例增加，表明气道炎症和呼吸上皮损伤可能与 IPF 咳嗽有关[17]。本研究结果显示，模型组豚鼠 BALF 中性粒细胞百分比较假手术组显著升高，提示肺纤维化豚鼠咳嗽敏感性增高可能与 BALF 中性粒细胞百分比升高有关。而敛肺止咳方干预后，中性粒细胞百分比显著降低，这有待进一步深入研究。此外，IPF 患者痰液中嗜酸性粒细胞计数较健康对照人群增加，提示嗜酸性气道炎症可能促进 IPF 患者气道咳嗽感觉通路的敏化，从而诱发咳嗽等症状[18]。亦有研究报道 IPF 患者与健康对照组的痰嗜酸性粒细胞计数未见显著差异[19-20]。本研究结果显示，模型组豚鼠 BALF 嗜酸性粒细胞百分比较假手术组有升高趋势，但差异无统计学意义；敛肺止咳方干预后，嗜酸性粒细胞百分比有降低趋势。本研究中，取材时间点可能并不是炎症反应的高峰期，这可能对 BALF 炎症细胞的实验结果产生一定影响。气道或与咳嗽相关的其他器官中广泛存在咳嗽的触发因素，气道炎症可能是多种不同病因慢性咳嗽的原因之一。如哮喘患者和无哮喘慢性咳嗽患者 BALF 中炎症介质升高，针对已确定的咳嗽或炎症触发因素的治疗已证实对多类患者群体的咳嗽有效[21]。因此，IPF 相关咳嗽中炎症的作用值得深入研究。

有研究表明，大多数 IPF 患者咳嗽与吸入 SP 直接相关，而与缓激肽无关[20]。IPF 患者 BALF 中 SP

样免疫反应物质有所升高，表明 SP 可能参与 IPF 的炎症及纤维化过程[22]。动物实验发现，在博来霉素诱导的咳嗽高敏感性豚鼠模型中，肺组织神经源性炎症介质 SP 等表达增加，提示神经源性炎症可能与 IPF 相关的咳嗽高敏感性有关[10]。在本研究中，与假手术组比较，模型组豚鼠气管 SP 蛋白表达水平显著升高，敛肺止咳方低剂量组、中剂量组豚鼠气管 SP 蛋白表达水平较模型组显著降低，提示敛肺止咳方可能通过下调气管 SP 蛋白表达水平，降低辣椒素引起的肺纤维化豚鼠咳嗽次数。

肺纤维化可导致肺组织结构扭曲变形，由此引发的机械刺激增强被认为是 IPF 患者咳嗽的原因之一。因此，药物干预下肺纤维化病变程度改善也可能对咳嗽产生一定影响。本研究 Masson 染色显示，与模型组比较，敛肺止咳方组豚鼠的肺纤维化程度减轻。胶原合成的一个重要过程是脯氨酸经羟化酶作用转化为羟脯氨酸，羟脯氨酸是胶原蛋白的特征性成分之一，可用于衡量胶原组织代谢。因此，通过检测羟脯氨酸含量，可反映组织纤维化程度和抗纤维化药物的治疗效果[23]。本研究中，敛肺止咳方干预后，肺组织羟脯氨酸定量结果显示肺纤维化程度呈减轻趋势。

综上所述，肺纤维化过程中气管壁黏膜和上皮变化可能在调节豚鼠咳嗽敏感性方面发挥作用。敛肺止咳方可减少肺纤维化豚鼠咳嗽次数，其机制可能与减轻肺纤维化及气管上皮损伤、降低气管 SP 蛋白表达水平有关。本研究尚存在一些局限性，在药物干预后，部分结果仅显示出一定的变化趋势，如肺组织羟脯氨酸含量等，这可能与给药时间短有关。鉴于肺纤维化的治疗是一个长期的过程，考虑到模型的稳定性，本研究最终选择了 4 周的给药时间。未来可以探索持续时间更长，更贴合临床 IPF 疾病进展的豚鼠模型，这将更有利于 IPF 相关咳嗽的机制研究。此外，本研究于造模后第 28 天开始给药干预，此期肺纤维化已基本形成，这或许对药物干预的疗效产生影响。神经源性炎症在肺纤维化相关咳嗽中可能具有一定作用，本研究仅观察了 SP 蛋白在气管中的表达，未来可对更多相关指标进行深入研究，如 CGRP、NK1 等，以全面阐释其作用机制。

参考文献：

[1] JAFRI S, AHMED N, SAIFULLAH N, et al. Epidemiology and clinico – radiological features of interstitial lung diseases[J]. Pak J Med Sci, 2020, 36(3): 365 – 370.

[2] LAN N S H, MOORE I, LAKE F. Understanding cough in interstitial lung disease: a cross – sectional study on the adequacy of treatment[J]. Intern Med J, 2021, 51(6): 923 – 929.

[3] RYERSON C J, ABBRITTI M, LEY B, et al. Cough predicts prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Respirology, 2011, 16(6): 969 – 975.

[4] KEY A L, HOLT K, HAMILTON A, et al. Objective cough frequency in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Cough, 2010, 6: 4.

[5] Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration. The voice of the patient: a series of reports from the U. S. food and drug administration's (FDA's) patient – focused drug development initiative[C]. Idiopathic pulmonary fibrosis public meeting, 2014: 1 – 22.

[6] SWIGRIS J J, STEWART A L, GOULD M K, et al. Patients' perspectives on how idiopathic pulmonary fibrosis affects the quality of their lives[J]. Health Qual Life Outcomes, 2005, 3: 61.

[7] WAKWAYA Y, RAMDURAI D, SWIGRIS J J. Managing cough in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Chest, 2021, 160(5): 1774 – 1782.

[8] FERNANDEZ – BLANCO J A, AGUILERA M, DOMENECH A, et al. Enhanced cough reflex in a model of bleomycin – induced lung fibrosis in guinea pigs[J]. Clin Sci, 2015, 129(12): 1001 – 1010.

[9] GUO Y L, YING S, ZHAO X H, et al. Increased expression of lung TRPV1/TRPA1 in a cough model of bleomycin – induced pulmonary fibrosis in guinea pigs[J]. BMC Pulm Med, 2019, 19(1): 27.

[10] GUAN M Y, YING S, WANG Y G. Increased expression of transient receptor potential channels and neurogenic factors associates with cough severity in a guinea pig model[J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 187.

[11] MORICE A H, FONTANA G A, BELVISI M G, et al. ERS guidelines on the assessment of cough[J]. Eur Respir J, 2007, 29(6): 1256 – 1276.

[12] ASHCROFT T, SIMPSON J M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. J Clin Pathol, 1988, 41(4): 467 – 470.

[13] 李晗，高云航，宋玲，等. 复方苦参注射液抗博来霉素致大鼠肺纤维化药效学研究[J]. 药物评价研究，2022，45(2)：241 – 250.

[14]赖克方. 慢性咳嗽[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2019.

[15]NIIMI A,CHUNG K F. Airway inflammation and remodelling changes in patients with chronic cough:do they tell us about the cause of cough? [J]. Pulm Pharmacol Ther,2004,17(6):441 - 446.

[16]GARNER J,GEORGE P M,RENZONI E. Cough in interstitial lung disease[J]. Pulm Pharmacol Ther,2015,35:122 - 128.

[17]HARRISON N K. Idiopathic pulmonary fibrosis:a nervous cough? [J]. Pulm Pharmacol Ther,2004,17(6):347 - 350.

[18]BIRRING S S,PARKER D,MCKENNA S,et al. Sputum eosinophilia in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Inflamm Res,2005,54(2):51 - 56.

[19]BEEH K M,BEIER J,KORNMANN O,et al. Sputum matrix metalloproteinase - 9,tissue inhibitor of metalloproteinase - 1,and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease,idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects[J]. Respir Med,2003,97(6):634 - 639.

[20]HOPE - GILL B D M,HILLDRUP S,DAVIES C,et al. A study of the cough reflex in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med,2003,168(8):995 - 1002.

[21]CANNING B J,CHANG A B,BOLSER D C,et al. Anatomy and neurophysiology of cough:chest guideline and expert panel report[J]. Chest,2014,146(6):1633 - 1648.

[22]TAKEYAMA M,NAGAI S,MORI K,et al. Substance P - like immunoreactive substance in bronchoalveolar lavage fluids from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis[J]. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis,1996,13(1):33 - 37.

[23]吕雁,张琳琪,王娇. 益肾化瘀方对肾间质纤维化大鼠肾组织羟脯氨酸表达的影响[J]. 中医学报,2020,35(12):2619 - 2625.

收稿日期:2024 - 10 - 15

作者简介:范艺龄(1992 -),女,山东临沂人,医学博士,主治医师,主要从事中医药防治呼吸系统疾病研究。

通信作者:苗青(1967 -),河北保定人,医学博士,主任医师,主要从事中医药防治呼吸系统疾病研究。E - mail:miaoqing55@ sina. com

编辑:刘凯歌