

• 药理 •

三拗汤及类方挥发油 对卵蛋白致敏哮喘豚鼠模型的效应评价

冯 里¹, 徐 立¹, 范欣生^{2*}, 俞晶华³, 唐于平², 纪蕾蕾¹

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046;

2. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046;

3. 南京中医药大学中医药研究院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的: 通过观察三拗汤及类方挥发油对哮喘豚鼠模型的影响, 初步比较它们对哮喘的作用以及作用之间的联系。方法: 采用卵蛋白(OVA)致敏复制哮喘豚鼠模型, 灌胃给予三拗汤及类方挥发油, 观察豚鼠的引喘潜伏期、行为学体征、嗜酸性粒细胞(EOS)、血清白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素 5(IL-5)、干扰素 γ (IFN- γ) 和肺组织病理学的变化。结果: 三拗汤类方 I 挥发油和三拗汤类方 II 挥发油均可改善支气管肺泡灌洗液(BALF)中 EOS 百分率、血清 IL-4、IL-5、IFN- γ 含量和肺组织病理学评分。三拗汤类方 II 挥发油可显著改善 BALF 中 EOS 百分率和肺组织病理学评分($P < 0.01$)。三拗汤挥发油可改善 BALF 中 EOS 百分率、血清 IFN- γ 和 IL-4 含量。结论: 三拗汤类方 I 挥发油和类方 II 挥发油可以从多方面调节机体的免疫功能, 调节细胞因子、改善并抑制支气管炎症, 并且可能有直接抑制气管平滑肌痉挛的作用, 从而达到其抑制哮喘症状的作用。三拗汤类方 II 挥发油对于抑制呼吸道 EOS 的产生和聚集效果最为显著。

[关键词] 哮喘; 三拗汤; 嗜酸性粒细胞; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)05-0035-04

Effects in Volatile Oil of San Ao Tang and its Serial Decoctions on Ovalbumin Induced Asthma Model in Guinea Pig

FENG Li¹, XU Li¹, FAN Xin-sheng^{2*}, YU Jin-hua³, TANG Yu-ping², JI Lei-lei¹

(1. School of Pharmacy of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Prescription Key Laboratory, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

3. Institute of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** By observed the effect in volatile oil of San Ao Tang and its Serial decoctions on ovalbumin induced asthma model in guinea pig, their action on asthma is preliminary compared. **Methods:** Guinea pigs were sensitized intraperitoneally with 10% ovalbumin(OVA). Two weeks after sensitization they were challenged with 1% OVA aerosol. The delitescence, scores on ethology, percentages of eosinophils (EOS) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), levels of interleukin (IL)-4, IL-5 and interferon gamma (IFN- γ) in serum were detected by enzyme-linked immunoassay (ELISA). **Results:** Volatile oil of San Ao Tang Decoction I and II could improve the percentages of EOS in

[收稿日期] 2008-11-11

[基金项目] 国家十一五支撑计划 三拗汤类方等中药药效评价研究(2006BAI06A02)

[通讯作者] * 范欣生, Tel: (025) 85811070, E-mail: fanxsh@njutcm.edu.cn

BALF, IL-4, 5 and IFN- γ in serum, and scores of lung tissue pathology. Volatile oil of San Ao Tang Decoction III can significantly improve the percentages of EOS in BALF and pathological scores of lung tissue ($P < 0.01$). Volatile oil of San Ao Tang can improve the percentages of EOS in BALF, and IL-4, IFN- γ in serum. **Conclusion:** Volatile oil of San Ao Tang Decoction I and II could regulate the immune function of the body, in aspects of regulating the cytokines, suppressing the inflammation in respiratory, and may directly inhibit the role of tracheal smooth muscle spasm, reaching its role of suppression in asthma symptoms. Volatile oil of San Ao Tang Decoction III has the significant effects in inhibiting the production and aggregation of the EOS in respiratory.

[**Key words**] asthma; San Ao Tang; eosinophils; cytokines

现代研究认为,迟发性支气管哮喘是以慢性气道炎症为主的变态反应性疾病,以肥大细胞、嗜酸性粒细胞(EOS)等细胞与白介素 4(IL-4),白介素 5(IL-5), γ 干扰素(IFN- γ)等细胞因子参与为主要特征,其中 EOS 浸润在炎症反应中起着关键作用,血清 IL-4, IL-5, IFN- γ 变化能够反映辅助性 T 淋巴细胞(Th)中 Th1/Th2 的平衡关系,其中 IL-5 是影响呼吸道中 EOS 生成和活化的重要细胞因子^[1]。三拗汤是治疗哮喘的经典方药,本实验室曾对三拗汤及其类方进行了药效学比较研究,结果表明三拗汤及其类方对 OVA 致豚鼠哮喘模型具有不同程度的对抗作用(另文发表)。本实验对三拗汤及类方挥发油部位干预 OVA 致豚鼠哮喘模型的作用以及对细胞因子 IL-4、IL-5、IFN- γ 的影响进行比较研究。

1 材料

1.1 动物 豚鼠, (250 \pm 20) g, 雌雄各半, 购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场, 动物合格证号: SCXK2007-0008。

1.2 药物与试剂 三拗汤(麻黄:苦杏仁:甘草=3:5:2)置圆底烧瓶中,浸泡 30 min,采用水蒸气蒸馏法提取 8 h 得到挥发油(以下各方),得率为 0.27%。三拗汤类方 I(麻黄:苦杏仁:甘草:桔梗=3:5:2:4)、三拗汤类方 II(麻黄:苦杏仁:甘草:生石膏=3:5:2:10)、三拗汤类方 III(麻黄:苦杏仁:甘草:细辛=6:10:4:3)提取方法与三拗汤相同,得率分别为 0.28%、0.75%、0.79%,批号:20070829,由南京中医药大学方剂重点实验室提供。卵蛋白(OVA),批号:060901,上海伯奥生物科技有限公司;嗜酸性粒细胞(EOS)计数液,批号:20070419,南京建成生物工程研究所;戊巴比妥钠,批号:020402,北京化学试剂公司;瑞姬氏染液,批号:20070806,南京建成生物工程研究所第一分所;豚鼠 IL-4、IL-5、IFN- γ 试剂盒,批号:08/01/20, ADLITERAM DLAGNOSTIC

LABORATORIES。

1.3 仪器 超声波雾化器, S-888F 型,中外合资南京道芬电子有限公司;OLYMPUS 显微镜, X21 型,OLMPUS 公司;酶标仪, SPEPRAMAX190, 美国 MD 公司。

2 方法

2.1 实验动物哮喘行为学评分 参考文献方法^[2-3],对实验动物行为学体征评分:颤动或点头为 1 分,咳嗽或呼吸加深为 2 分,节律性收腹样喘促为 3 分,跌倒为 6 分,以出现的最严重行为学体征记分。

2.2 卵蛋白致敏哮喘模型豚鼠的复制^[4-5] d1 致敏:10% OVA 按 0.5 g \cdot kg⁻¹ ip, 体积为 5 mL \cdot kg⁻¹; d15 将豚鼠置于自制体描箱中,以 1% OVA 雾化激发 100 s,观察实验豚鼠行为学体征,选取行为学评分达到 3 分的豚鼠,随机分为模型组、三拗汤挥发油组、三拗汤类方 I 挥发油组、三拗汤类方 II 挥发油组和三拗汤类方 III 挥发油组,每组 6 只。正常对照组以等体积生理盐水(NS)代替 OVA。

2.3 给药 d16 起各给药组分别 ig 予临床等效量三拗汤挥发油、三拗汤类方 I 挥发油、三拗汤类方 II 挥发油和三拗汤类方 III 挥发油,剂量以 g 生药 \cdot kg⁻¹ 体重表示,给药体积均为 3 mL \cdot kg⁻¹。模型组和正常对照组给予等体积 NS,连续 6 d。

2.4 引喘潜伏期和行为学评分 d20 将豚鼠置于自制体描箱中,以 1% OVA 雾化激发 100 s,记录豚鼠出现全身节律性收腹样喘促的时间为引喘潜伏期。如超过 6 min,仍不出现上述表现者,其潜伏期以 360 s 计算。同时观察受试豚鼠行为学体征,按上述标准评分。

2.5 细胞学检查 末次药后 1 h,以 1% 戊巴比妥钠按 30 mg \cdot kg⁻¹ ip 麻醉,颈总动脉取血,取 10 μ L 血液与 0.19 mL 嗜酸性粒细胞计数液混匀,100 倍光镜下于血细胞计数池计血 EOS 数量。结扎左支气管肺门

部,分离气管,于气管环状软骨下方剪一 V 型切口,插入直径约 2 mm 长约 3 cm 的无菌塑料管,结扎固定,以 9 mL NS 分 3 次灌洗,将回收的 BALF 保存于试管中,4 °C,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取沉淀涂片、固定并染色,于 1 000 倍光镜下数 100 个白细胞中 EOS 数量,得到 EOS 在白细胞中所占百分比。

2.6 细胞因子检测 血清中 IL-4、IL-5、IFN- γ 水平检测按照试剂盒说明书操作。

2.7 组织病理检测 摘取结扎的左肺以 10% 甲醛固定,常规制片,HE 染色,进行病理学检查。

2.8 统计学方法 计数资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,行为学评价用 SPSS 11.5 统计软件作秩合检验分析,其他数据用 Microsoft EXCEL2003 软件作 *t* 检验分析。

3 结果

3.1 三拗汤及类方挥发油对豚鼠引喘潜伏期和行为学的影响 见表 1。

表 1 三拗汤及类方挥发油对豚鼠引喘潜伏期和
行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	引喘潜伏期 (s)	行为学 评分值
正常对照组	-	360 \pm 0 ²⁾	0 \pm 0 ²⁾
模型组	-	172 \pm 57	4.0 \pm 0
三拗汤挥发油组	1.5	264 \pm 85	2.8 \pm 1.8
三拗汤类方 I 挥发油组	2.6	250 \pm 126	2.0 \pm 2.2 ¹⁾
三拗汤类方 II 挥发油组	4.9	284 \pm 99 ¹⁾	3.0 \pm 1.1 ¹⁾
三拗汤类方 III 挥发油组	1.7	210 \pm 93	3.3 \pm 1.6

注:与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(下同)

结果显示,三拗汤类方 I 和类方 II 挥发油组与模型组相比能明显改善豚鼠的行为学评分 (*P* < 0.05),其中三拗汤类方 II 挥发油组还能明显延长豚鼠的引喘潜伏期 (*P* < 0.05)。

3.2 三拗汤及类方挥发油对豚鼠全血和 BALF 中 EOS 的影响 见表 2。

表 2 三拗汤及类方挥发油对豚鼠全血和
BALF 中 EOS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	血 EOS ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	BALF 中 EOS (%)
正常对照组	-	1.77 \pm 1.68	2.67 \pm 1.03 ²⁾
模型组	-	2.22 \pm 3.00	8.17 \pm 1.17
三拗汤挥发油组	1.5	8.49 \pm 9.88	5.00 \pm 1.83 ²⁾
三拗汤类方 I 挥发油组	2.6	1.17 \pm 2.06	2.50 \pm 1.38 ²⁾
三拗汤类方 II 挥发油组	4.9	2.78 \pm 4.87	2.67 \pm 2.16 ²⁾
三拗汤类方 III 挥发油组	1.7	0.81 \pm 0.59	2.57 \pm 1.872 ²⁾

结果表明,三拗汤及各类方挥发油组与模型组相比, BALF 中 EOS 百分率均有显著降低 (*P* < 0.01),但三拗汤及各类方挥发油组的血 EOS 含量与模型组相比均无差异。

3.3 三拗汤及类方挥发油对豚鼠血清 IL-4、IL-5、IFN- γ 的影响 见表 3。

表 3 三拗汤及类方挥发油对豚鼠血清 IL-4、IL-5、IFN- γ
的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	IL-4	IL-5	IFN- γ
		(pg·mL ⁻¹)		
正常对照组	-	15.11 \pm 5.77 ¹⁾	13.30 \pm 7.49 ²⁾	22.77 \pm 10.69 ¹⁾
模型组	-	27.60 \pm 8.68	61.74 \pm 22.56	9.11 \pm 4.74
三拗汤挥发油组	1.5	23.87 \pm 1.90	8.51 \pm 3.90 ²⁾	20.92 \pm 5.09 ²⁾
三拗汤类方 I 挥发油组	2.6	16.30 \pm 3.74 ¹⁾	19.97 \pm 15.54 ²⁾	19.33 \pm 5.59 ²⁾
三拗汤类方 II 挥发油组	4.9	18.37 \pm 3.00 ¹⁾	23.22 \pm 21.78 ¹⁾	19.75 \pm 6.84 ¹⁾
三拗汤类方 III 挥发油组	1.7	20.05 \pm 9.06	43.08 \pm 37.80	15.74 \pm 8.79

结果表明,与模型组相比,三拗汤类方 III 挥发油组对 3 种细胞因子的影响均无差异;三拗汤类方 I 挥发油组和三拗汤类方 II 挥发油组对 IL-4、IL-5 和 IFN- γ 的影响均有差异 (*P* < 0.05),其中三拗汤类方 I 挥发油组对 IL-5 和 IFN- γ 有非常显著差异 (*P* < 0.01);三拗汤挥发油组对 IL-5 和 IFN- γ 的影响有非常显著差异 (*P* < 0.01)。

3.4 三拗汤及类方挥发油对肺组织病理形态学的影响 见图 1。组织病理学结果显示:模型组(b)豚鼠肺部呈炎性病变,主要表现为支气管周围炎及血管周围炎。炎细胞类型主要为中性粒细胞、单核巨噬细胞,可见少数淋巴细胞及嗜酸性粒细胞。此外尚有间质性肺炎的病变。药物应用后能减轻支气管周围炎等肺部炎性病变的程度,各给药组(c, d, e, f)病理形态学观察均有明显改善。

4 讨论

哮喘是由 EOS 等多种细胞和细胞组分参与作用的慢性气道炎症性疾病。在哮喘的免疫机制中, T 细胞被激活后, Th2 细胞释放 IL-4 和 IL-5 等, 直接激活 EOS 等多种炎症细胞在气道浸润和聚集^[1]。在哮喘的发生和发展中, 引喘潜伏期和行为学评分可以充分表达哮喘整体体征, BALF 中 EOS 百分比改变可以反映过敏性呼吸道炎症的程度, 血清 IL-4 和 IFN- γ 的含量反映 Th1/Th2 的平衡改变。

三拗汤出自《太平惠民和剂局方·卷二》, 由连节麻黄、连皮杏仁、连梢甘草组成, 与常规炮制加工方

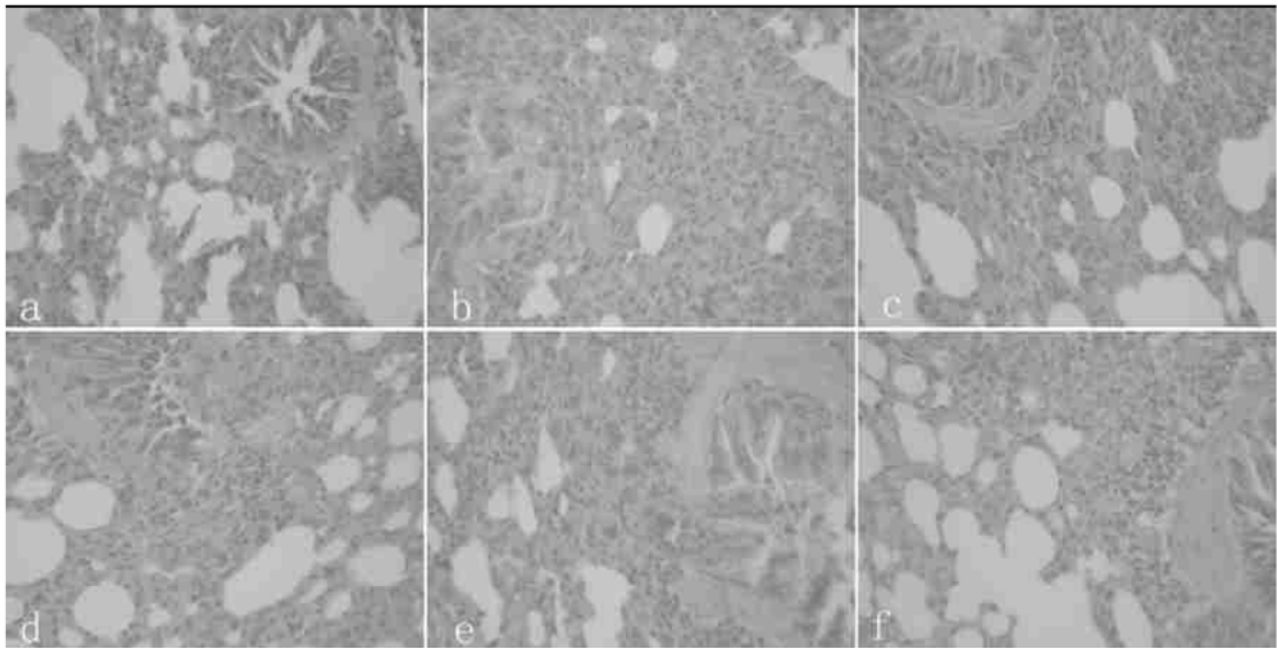


图 1 三拗汤及类方挥发油对肺组织病理形态学的影响

a 空白对照组 b 模型组 c 三拗汤挥发油组

d 三拗汤类方 I 挥发油组 e 三拗汤类方 II 挥发油组 f 三拗汤类方 III 挥发油组

法相拗,故名三拗汤,是治疗风寒伤肺的代表方,且根据证型变化的衍化方颇多,临床均具效验^[6]。

在整体水平,与模型组相比,三拗汤类方 I 和类方 II 挥发油组对豚鼠的行为学均有明显改善,降低动物行为学评分,三拗汤类方 II 挥发油还能明显延长动物的引喘潜伏期。各给药组 BALF 中 EOS 百分比与模型组相比均有显著差异,说明类方具有抗炎平喘的共有规律。三拗汤类方 I 和类方 II 挥发油能够明显抑制血清 IL-4 和 IL-5,提高血清 IFN- γ 含量;三拗汤挥发油能显著抑制血清 IL-5、升高 IFN- γ ,对 IL-4 的抑制并不明显;而三拗汤类方 III 挥发油对血清各细胞因子的影响均不明显。以上实验结果提示通过调节 Th1/Th2 的平衡,三拗汤类方 I 和类方 II 挥发油能改善炎症细胞因子的释放,抑制肺组织中主要炎症细胞 EOS 的聚集和浸润,达到明显改善实验模型动物行为学体征的作用。三拗汤虽然对 BALF 中 EOS、血清 IL-5 和 IFN- γ 有明显改善,但整体行为学评价并不明显;三拗汤类方 III 挥发油对 BALF 中 EOS 有改善,对血清中各细胞因子无明显作用,提示三拗汤类方 III 挥发油对 Th2 细胞释放细胞因子无明显作用,却能影响细胞因子介导的 EOS 在气道的浸润和聚集,其作用机制值得更深入的研究和探讨,说明类方在效应途径上有一些特异性。

本实验室已对三拗汤及类方全方的药效进行过研究^[7],结果显示类方 II 全方对豚鼠哮喘模型来说

整体效果较好,能够延长动物的引喘潜伏期,明显降低 BALF 中 EOS 数量。说明三拗汤类方系列在干预支气管哮喘中既有共同性,也有一定的差异,其机制值得深入研究。在本实验中,发现三拗汤类方 II 挥发油对于多种实验指标均有明显改善,结合前期实验结果,提示三拗汤类方 II 挥发油可能是三拗汤类方 II 全方抗哮喘作用的效应主要部位之一。

[参考文献]

- [1] Mapp CE, Saetta M, Maestrelli P, *et al.* Mechanisms and pathology of occupational asthma[J]. *Eur Respir J*, 1994, 7 (3): 544-54.
- [2] 刘金保,钟南山,李树浓,等. PPD 对豚鼠实验性哮喘气道炎症的作用[J]. *免疫学杂志*, 2002, 18(5): 350-352.
- [3] 黄艳,刘鑫,戴爱国,等. 柴朴汤对卵蛋白诱导豚鼠哮喘的干预作用及对核因子- κ B 的影响[J]. *中医药导报*. 2007. 13(6): 1-3.
- [4] 徐立,范欣生,何胜旭. 复方辛夷口服液对卵蛋白致敏豚鼠支气管哮喘的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2004, 20(2): 104-106.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修. *药理实验方法学*[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1991: 1165-1182.
- [6] 范欣生. 三拗汤方证与应用探讨[J]. *安徽中医学院学报*, 2006, 25(6): 1-3.
- [7] 纪蕾蕾,徐立,范欣生,等. 三拗汤及类方对卵蛋白致敏豚鼠哮喘模型引喘潜伏期及其 EOS 的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2008, 24(6): 391-393.