

# 中药复方“别敏”治疗呼吸道变应性疾病作用机制的实验研究

张素琴<sup>1</sup>, 张新民<sup>1\*</sup>, 胡国让<sup>2</sup>, 刘闰红<sup>1</sup>, 陈伟华<sup>1</sup>

(1. 复旦大学附属华山医院中西医结合研究所, 上海 200040;  
2. 澳大利亚悉尼大学 Concord 医院 免疫与变态反应科)

[摘要] 目的: 探讨中药复方“别敏”治疗呼吸道变应性疾病的作用机制。方法: 将豚鼠分为5组: 正常组, 模型组, “别敏”高、中、低剂量组。于实验第1天用10%卵蛋白腹腔注射致敏豚鼠, 于第15天用5%卵蛋白雾化吸入诱发哮喘发作, 观察各组豚鼠引喘潜伏期, 外周血、支气管肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞和IL-5水平变化, 脾淋巴细胞增殖反应及血清皮质酮水平变化。结果: 模型组豚鼠外周血和BALF中嗜酸性粒细胞、血清IL-5以及血清皮质酮水平明显高于正常组( $P < 0.05$ )。中药复方“别敏”能够明显延长致敏豚鼠引喘潜伏期( $P < 0.05$ ), 抑制外周血及BALF中嗜酸性粒细胞水平升高( $P < 0.05$ ), 抑制脾淋巴细胞的增殖反应特别是高剂量组( $P < 0.05$ ), 降低血清IL-5水平尤其是高、中剂量组( $P < 0.05$ )。结论: 中药复方“别敏”能有效防治呼吸道变应性疾病, 其机制可能通过调节淋巴细胞功能, 降低IL-5水平, 降低气道和外周血嗜酸性粒细胞的数量而起作用。

[关键词] 变态反应; 呼吸道; 嗜酸性粒细胞; 白介素-5; 别敏

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)04-0037-04

## Experimental Study of the Chinese Herbal Formulation Biminne in Treating Airway Allergic Disease

ZHANG Su-qin<sup>1</sup>, ZHANG Xin-min<sup>1\*</sup>, HU Guo-rang<sup>2</sup>, LIU Run-hong<sup>1</sup>, CHEN Wei-hua<sup>1</sup>

(1. Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai, 200040, China;  
2. Concord Hospital, Sydney University, Sydney, Australia)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of the Chinese herbal formulation Biminne in treating airway allergic disease. **Methods:** We used guinea pig model of allergic disease to study the effects of the Chinese herbal formulation Biminne on the airway allergic disease. The guinea pigs were divided to 5 groups: normal group, model group, high-dose group, middle-dose group, low-dose group. On day 1 the guinea pigs were sensitized by injecting intraperitoneally with 10% ovalbumin(OVA), and on day 15 the sensitized guinea pigs were subjected to 5% OVA inhalation challenge. Then we observed the index such as the eosinophil and IL-5 levels in blood and bronchial airway lavaging fluid(BALF), corticosteroid level in blood and the spleen cell proliferation responsiveness. **Results:** Compared with normal group, the eosinophil number in blood and BALF, and IL-5 level in blood increased significantly in model group ( $P < 0.05$ ), But Biminne could significantly prolong the time when the asthma attack happened, attenuated the increase in the eosinophil and IL-5 levels, especially the high-dose and middle-dose groups( $P < 0.05$ ), and also suppressed the proliferation of spleen cells, especially the high-dose group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The results suggest that the Chinese herbal

[收稿日期] 2006-10-23

[基金项目] 上海市科委攻关项目(02DZ19128)

[通讯作者] \* 张新民(021)62489999-6517; E-mail: xmzhang54@yahoo.com

formulation Biminne has some antiasthmatic effect, partly mediated by attenuating eosinophil and IL-5 levels and suppressing the spleen cell proliferation in OVA-sensitized guinea pigs. Thus the Chinese herbal formulation Biminne may be useful in preventing and treating allergic disease.

[ **Key words** ] allergic reaction; airway; eosinophil; IL-5; Biminne

呼吸道变应性疾病包括变应性鼻炎和哮喘,两者在病因学、发病机制和病理改变等方面均极为相似,发病率均有逐年增加趋势,严重影响人类的健康和<sup>[1]</sup>生活质量。从中医药中开发出有效治疗呼吸道变应性疾病的药物前景广阔。中药复方别敏由黄芪、防风、黄芩、淫羊藿、五味子等 11 味药材按一定比例制作而成,主要功效为温肾益气、祛风散邪。在澳大利亚进行了严格随机、双盲对照临床试验显示:中药复方别敏能明显改善变应性鼻炎患者鼻痒、喷嚏、流涕、鼻塞等临床症状,且能降低患者血清总 IgE 水平<sup>[2]</sup>。本研究进一步利用哮喘豚鼠模型,观察外周血和 BALF 中嗜酸性细胞数和 IL-5 水平变化,脾淋巴细胞增殖反应及血清皮质酮浓度变化,探讨“别敏”复方在治疗呼吸道变应性疾病中抑制炎症及调节整体内分泌免疫功能中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康雄性豚鼠 75 只,由复旦大学上海医学院实验动物部提供,普通级,体重(200~250)g,合格证号:SCXK 沪 2002-0011。

**1.1.2 实验试剂** 别敏胶囊由澳大利亚悉尼大学提供(黄芪 5.52 g,防风、地黄、黄芩、银杏叶、淫羊藿、补骨脂各 4.6 g,黄精、五味子、白芷各 3.68 g,乌梅肉 1.84 g,制成 6 g 浸膏粉,分装 10 粒胶囊,成人每天分 2 次服用;利用高效液相测定法,测定黄芪甲甙、淫羊藿总黄酮,黄芩甲苷的含量,制定其标准;利用气相色谱测定法,监测各重金属离子,进行质量控制),卵清蛋白(OVA, II 级, Sigma), Hanks 液、1640-RPMI (Sigma 公司),胎牛血清(GIBCO);淋巴细胞分离液(上海华精生物高科技有限公司),<sup>3</sup>H-TdR(上海原子能研究所),闪烁液 PPO、POPOP(国药集团化学试剂有限公司),乙酸(国药集团化学试剂有限公司),瑞士染液(由我院检验科提供),豚鼠血清皮质酮 ELISA 试剂盒(Rapidbio lab, USA),豚鼠 IL-5 ELISA 试剂盒(Rapidbio lab, USA)。

**1.1.3 实验仪器** 超声雾化器(上海亿圣科技有限公司),多头细胞收集器(绍兴卫星医疗设备制造有

限公司,原上海医科大学监制),液体闪烁计数器(LKB WALLAC),酶标仪(MQX200, Bio-IEK 公司),离心机(Centrifuge 5804, Eppendorf 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组与模型建立** 75 只雄性豚鼠随机分为 5 组即正常对照组、模型组、低剂量别敏组、中剂量别敏组、高剂量别敏组,每组 15 只。模型制备参照文献<sup>[3]</sup>,即模型组、低、中、高剂量别敏组豚鼠在实验第 1 天用 10% 卵蛋白生理盐水溶液 1 mL 腹腔注射致敏动物,于实验第 15 天用 5% 卵蛋白生理盐水溶液恒压雾化吸入,诱发哮喘发作。正常对照组用生理盐水溶液腹腔注射和雾化吸入。

**1.2.2 给药** 给药时间从动物致敏后第 2 天开始到雾化吸入前 1 天结束,共 13 天。高剂量别敏组(2 g/kg 体重),中剂量别敏组(1 g/kg),低剂量别敏组(0.5 g/kg 体重),灌胃体积为 2 mL/只,正常对照组和模型组灌胃等体积饮用水。

**1.2.3 引喘** 实验第 15 天,即在给药结束后 1 天,将豚鼠放入一密闭容器中,用 5% 卵蛋白生理盐水溶液向容器内恒压喷雾 30 s,观察和记录在 3 min 内豚鼠发生哮喘的潜伏期,实验对照组用生理盐水雾化吸入。如豚鼠在 3 min 内未发生呼吸困难则引喘潜伏期按 180 s 计算(引喘潜伏期是雾化吸入开始到豚鼠发生点头样呼吸困难时的时间)。

**1.2.4 血样采集及检测** 豚鼠引喘实验结束后用 2% 戊巴比妥钠麻醉,开胸心脏采血。用毛细吸管精确吸取 20  $\mu$ L 血液加到 380  $\mu$ L 白细胞稀释液(2% 稀醋酸)中进行白细胞计数。并取血液涂片用瑞氏染色进行白细胞分类计数,油镜下计数 200 个细胞,计算嗜酸性粒细胞百分比。剩余的血液放置于试管中,4  $^{\circ}$ C 1 500 r/min 离心 10 min 后取上清,分装后冻存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱,待测血清 IL-5 和皮质酮水平,测定过程严格按照试剂盒说明书进行。

**1.2.5 BALF 标本采集及检测** 豚鼠引喘实验结束后用 2% 戊巴比妥钠麻醉,切开颈部皮肤,钝性分离气管,暴露气管,剪一切口,用聚氯乙烯管从切口朝胸腔方向插入气管,聚氯乙烯插管连接注射器,用 3

mL 生理盐水灌入后,立即回抽,回收灌洗液,共重复灌洗 3 次,回收率 > 80%。将 BALF 于 4 ℃, 1 500 r/min 离心 10 min, 收集上清,分装后冻存于 - 20 ℃,待测 IL-5 水平。细胞沉渣用 0.5 mL 生理盐水混悬,镜下计白细胞总数;并进行涂片,瑞氏染色后在油镜下计数 200 个细胞,进行嗜酸性粒细胞计数。IL-5 的测定严格按照试剂盒说明书进行。

**1.2.6 脾淋巴细胞增殖反应** 无菌取脾,淋巴细胞分离液分离脾淋巴细胞,常规用 10% FBS-RPMI-1640 培养液制备  $5 \times 10^6$ /mL 的细胞悬液,于 96 孔培养板中,每孔加入 100  $\mu$ L 脾细胞悬液,每鼠 2 个复孔。每实验孔加植物血凝素( PHA) 5  $\mu$ g,对照孔加等体积培养液。饱和湿度,5% CO<sub>2</sub>, 37 ℃ 培养 48 h,终止培养前 18 h 每孔加 1  $\mu$ Ci<sup>3</sup>H-TdR。用多头细胞收集仪收集细胞于膜片上,膜片干燥后,置测量杯中,加 3 mL 闪烁液,用液体闪烁计数仪测定每 min 脉冲数(cpm),计算刺激指数 SI= 实验孔 cpm/对照孔 cpm。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件,进行单因素方差分析,方差不齐时采用秩和检验,组间两两比较采用 *q* 检验,实验数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示, (*P* <

0.05) 差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 别敏对致敏豚鼠引喘潜伏期的影响** 见表 1。高剂量别敏组和中剂量别敏组引喘潜伏期较模型组明显延长(*P* < 0.05)。正常对照组豚鼠雾化吸入过程中未发现有呼吸困难表现。

表 1 “别敏”对致敏豚鼠引喘潜伏期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量(g/kg)	引喘潜伏期时间(s)
模型组	—	81 ± 40.07
别敏高剂量组	2.0	123.53 ± 53.73 <sup>1)</sup>
别敏中剂量组	1.0	117.44 ± 48.34 <sup>1)</sup>
别敏低剂量组	0.5	101.4 ± 53.86

注:与模型组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01, 下同。

**2.2 别敏对致敏豚鼠外周血、BALF 中白细胞总数和嗜酸性细胞计数的影响** 见表 2。与正常对照组相比,模型组外周血嗜酸性细胞明显升高, BALF 中白细胞总数和嗜酸性细胞显著升高,差异均有统计学意义;经别敏治疗后,外周血嗜酸性细胞和 BALF 中白细胞总数及嗜酸性细胞较模型组明显降低,其中高、中剂量组的效果较明显,差异有统计学意义。

表 2 别敏对豚鼠外周血、BALF 中白细胞总数和嗜酸性细胞数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(g/kg)	外周血			BALF		
		例数	白细胞总数( $10^9$ /L)	嗜酸性细胞( $10^7$ /L)	例数	细胞总数( $10^9$ /L)	嗜酸性细胞( $10^7$ /L)
正常对照组	—	15	3.92 ± 3.01	4.44 ± 5.32 <sup>2)</sup>	13	1.69 ± 0.45 <sup>1)</sup>	1.70 ± 0.43 <sup>2)</sup>
模型组	—	14	3.79 ± 2.09	16.68 ± 10.89	12	3.84 ± 2.43	16.16 ± 7.46
别敏高剂量组	2.0	13	3.02 ± 1.38	4.95 ± 3.54 <sup>2)</sup>	11	1.83 ± 1.37 <sup>1)</sup>	4.55 ± 2.91 <sup>2)</sup>
别敏中剂量组	1.0	14	3.45 ± 2.10	6.64 ± 7.67 <sup>2)</sup>	12	2.39 ± 1.61	7.56 ± 4.64 <sup>2)</sup>
别敏低剂量组	0.5	14	3.06 ± 1.55	8.35 ± 12.95 <sup>1)</sup>	12	2.94 ± 1.33	12.58 ± 5.33

**2.3 别敏对致敏豚鼠血清及 BALF 中 IL-5 水平的影响** 见表 3。模型组血清 IL-5 水平较对照组有显著升高(*P* < 0.05)。别敏高、中剂量组血清 IL-5 水平较模型组明显降低(*P* < 0.05)。BALF 中 IL-5 水平在各组间差异无统计学意义。

表 3 别敏对豚鼠血清及 BALF 中 IL-5 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量(g/kg)	血清 IL-5 (pg/mL)	BALF 中 IL-5 (pg/mL)
正常对照组	—	49.03 ± 6.23 <sup>1)</sup>	62.02 ± 3.98
模型组	—	60.14 ± 6.86	65.73 ± 5.19
别敏组高剂量	2.0	52.07 ± 5.72 <sup>1)</sup>	62.03 ± 4.33
别敏组中剂量	1.0	54.79 ± 3.40 <sup>1)</sup>	64.93 ± 5.96
别敏组低剂量	0.5	58.67 ± 3.48	64.34 ± 3.81

**2.4 别敏对致敏豚鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响**

见表 4。模型组豚鼠脾淋巴细胞的 PHA 刺激后 cpm 值和刺激指数高于对照组。别敏高剂量组脾淋巴细胞的 PHA 刺激后 cpm 值和刺激指数较模型组明显降低(*P* < 0.05)。

**2.5 别敏对豚鼠血清皮质酮含量的影响** 见表 5。模型组血清皮质酮水平明显高于对照组,别敏各剂量组与模型组无显著差异。

## 3 讨论

近年来许多研究表明,哮喘和变应性鼻炎同为呼吸道变应性炎症疾病,两者在致病诱因、发病机制等方面均非常相似,仅仅是病变部位不同,两组症状可同时或先后出现,因此有学者提出“一个气道、一种疾病”的观点<sup>[1]</sup>。本实验结果显示:引喘时模型组豚鼠出现明显呼吸困难、腹肌痉挛甚至抽搐、跌倒死

亡等症状, 平均引喘潜伏期为 (81 ± 40.07) s, 别敏能够减轻模型动物哮喘发作, 哮喘发作潜伏期较模型组明显延长, 高、中剂量效果较好 ( $P < 0.05$ )。这与

别敏能够明显改善变应性鼻炎患者临床症状的观察结果相一致, 同时也提示别敏对整个呼吸道变态反应都有治疗作用。

表 4 别敏对脾淋巴细胞增殖反应的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(g/kg)	例数	未刺激 cpm	PHA 刺激后 cpm	刺激指数(SI)
正常对照组	—	14	2 072.35 ± 1 012.41	34 070.17 ± 26 637.78	17.86 ± 19.81
模型组	—	14	2 270.25 ± 1 143.77	41 046.74 ± 19 583.19	25.04 ± 21.33
别敏高剂量组	2.0	12	1 906.88 ± 1 092.37	21 177.51 ± 11 396.4 <sup>1)</sup>	13.82 ± 12.09 <sup>1)</sup>
别敏中剂量组	1.0	13	2 089.21 ± 1 156.76	32 270.22 ± 31 603.4	18.75 ± 14.62
别敏低剂量组	0.5	14	1 518.58 ± 667.56	37 054.13 ± 34 150.69	23.85 ± 23.79

表 5 别敏对豚鼠血中皮质酮含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量(g/kg)	皮质酮(nmol/L)
正常对照组	—	6.74 ± 1.91 <sup>1)</sup>
模型组	—	9.76 ± 3.43
别敏高剂量组	2.0	10.71 ± 5.58
别敏中剂量组	1.0	9.51 ± 3.71
别敏低剂量组	0.5	9.96 ± 6.90

呼吸道变应性疾病是一种气道慢性炎症性疾病, 其中嗜酸性粒细胞的浸润是慢性变应性炎症的重要特征<sup>[4]</sup>。本实验研究发现: 中药复方别敏能够明显减少外周血和 BALF 中嗜酸性粒细胞数量, 从而达到减轻炎症, 抑制呼吸道变态反应的作用。

呼吸道变应性疾病还伴有全身免疫功能紊乱。IL-5 是嗜酸性粒细胞分化、增殖、迁移及在炎症部位聚集的关键因子, 并且能延长嗜酸性细胞的存活时间。研究发现哮喘发作期间, 血清 IL-5 浓度和痰液中嗜酸性细胞计数呈正相关<sup>[5]</sup>。本实验结果显示: 经别敏治疗后脾淋巴细胞的增殖反应较模型组降低, 特别是高剂量组, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。提示别敏对变态反应状态下脾淋巴细胞的增殖效应具有抑制作用。别敏能明显降低致敏豚鼠血清 IL-5 水平, 尤其是高、中剂量组差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。这与别敏能够明显降低外周血和 BALF 中嗜酸性细胞的作用有一致性。但该实验 BALF 中 IL-5 水平各组间未发现明显差异, 与本研究的实验方法可能有一定关系, 有研究发现致敏豚鼠 BALF 中 IL-5 水平在抗原攻击 60 min 后才有明显升高<sup>[6]</sup>, 而本实验在雾化吸入后 60 min 以内就完成了支气管肺泡灌洗, 可能是造成各组间 BALF 中 IL-5 水平无明显差异的

原因之一。

综合临床和实验研究表明: 中药复方别敏能够有效防治呼吸道变应性疾病, 其作用机理可能通过调节机体免疫功能状态, 抑制脾淋巴细胞增殖, 降低血 IL-5 水平, 减少外周血和 BALF 中嗜酸性粒细胞而起作用。具有温肾益气功效的别敏复方是否对整个神经-内分泌-免疫网络都有调节作用呢? 关于别敏在这方面的机制探讨还有待于进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Bousquet J, Vignola AM, Demoly P. Links between rhinitis and asthma[J]. ALLERGY, 2003, 58(8): 691-706.
- [2] Guorang Hu, Ronald S, Walls, et al. The Chinese herbal formulation Biminne in management of perennial allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, 12-week clinical trial [J]. Annals of Allergy Asthma and Immunology, 2002, 88: 478-487.
- [3] 宫兆华, 董竞成, 倪健. 豚鼠支气管哮喘模型建立[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(4): 204-206.
- [4] Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, et al. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease [J]. ALLERGY, 2004, 59(8): 793-805.
- [5] Onizuka R, Ishibatake H, Tanaka M, et al. An investigation of the clinical utility of serum interleukin 25 measurements in bronchial asthma patients [J]. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi, 1997, 35(11): 1215-1222.
- [6] Danahay H, Broadley KJ, McCabe PJ, et al. Temporal relationships between leukocytes, IL-5 and IL-8 in guinea pig lungs, plasma cortisol and airway function after antigen challenge [J]. Inflamm Res, 1999, 48(1): 41-47.