

三种中药药效成分抗支气管哮喘变应性炎症的实验研究

倪 健¹, 董竞成²

(1 上海市肺科医院, 上海 200433;

2. 复旦大学附属华山医院中西医结合肺与特应性疾病研究室, 上海 200040)

摘要:目的: 通过豚鼠哮喘动物模型研究三种中药有效成分(银杏内酯、黄芩甙、川芎嗪)雾化吸入抗哮喘气道变应性炎症的作用。方法: 以卵蛋白致敏豚鼠为动物模型, 雾化吸入予以银杏内酯、川芎嗪、黄芩甙。观察治疗前后各组豚鼠的血嗜酸性粒细胞数、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)以及支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎性细胞和嗜酸性粒细胞、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白改变。结果: 同模型组相比, 银杏内酯、黄芩甙、川芎嗪均可不同程度地抑制哮喘豚鼠外周血嗜酸性粒细胞计数; 黄芩甙和川芎嗪对 BALF 中的嗜酸性细胞及炎性细胞总数均有抑制作用, 而银杏内酯仅抑制 BALF 中嗜酸性细胞聚集。各治疗组均未显示预防哮喘发作的作用, 各组的 ECP 也无显著性差异。结论: 银杏内酯、黄芩甙、川芎嗪通过抑制哮喘动物外周血及 BALF 中嗜酸性细胞聚集而具有一定的抗哮喘气道变应性炎症的作用。

关键词: 豚鼠哮喘模型; 慢性气道变应性炎症(AAI); 银杏内酯; 黄芩甙; 川芎嗪

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)04-0049-03

Experimental Study of the Effect of Components of Three Traditional Chinese Medicines on Airway Allergic Inflammation in Guinea Pigs with Bronchial Asthma.

NI Jian¹, DONG Jing-cheng²

(1 Shanghai Pulmonary Disease Hospital, Shanghai 200433, China; 2 Institute of Integrated Chinese and Western Medicine in Lung and Allergic disease, Fudan University affiliated Huashan Hospital, Shanghai 200040, China)

Abstract: Objective: To observe the effect of ginkgolide, baicalin and linguitrizin on airway allergic inflammation in Guinea pigs with asthma. Methods: Eosinophil cells count in blood and bronchial alveolar lavage fluid(BALF), as well as total cells count in BALF were measured by traditional methods. Eosinophil cation protein (ECP) level in blood and BALF was detected by radioimmunoassay. Results: Treatments with ginkgolide, baicalin and linguitrizin could significantly inhibit blood eosinophil gathering in asthma animals comparing with the untreated animals. Baicalin and linguitrizin also reduced eosinophil and total cells count in BALF, while ginkgolide only could inhibit the total cells count. All components of TCM concerned had no protection effect on asthma attack. No difference was shown on ECP levels among all groups. Conclusion: Ginkgolide, baicalin and linguitrizin could inhibit the AAI of asthma animals by reducing eosinophol gathering in blood and BALF. There was no protection effect found suggested that the compound of such components might be effective in treating and preventing asthma attack.

Key words: bronchial asthma; Airway allergic inflammation(AAI); ginkgolide; baicalin; linguitrizin

支气管哮喘是一种以气道高反应性(Bronchial Hyperresponsiveness, BHR)为主要特征, 有多种炎性细胞(包括嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞等)和炎性介质参与的慢性气道变应性炎症(Airway Allergic Inflammation, AAI)性疾病。目前应用于临床的抗 AAI 药物有糖皮质激素、

色甘酸钠、白三烯受体拮抗剂等药物, 种类和剂型均十分丰富。但是由于哮喘患者的发病机制复杂, 对皮质激素的认识不足等原因, 致使对上述药物的依从性低, 导致哮喘的控制率不尽人意, 死亡率较高^[1]。因此寻求更多的诊治手段是未来哮喘研究的重要内容。

祖国医学早在内经中就有“喘鸣”的记录, 与本病的发作特点相似, 我们根据研究所长期从事哮喘

的临床和科研工作的经验积累,选择三味具有抗炎效应的中药,利用其主要药效成分用于哮喘的治疗,并根据呼吸系统疾病可吸入给药的特点,采用中药吸入疗法,对银杏内酯、黄芩甙、川芎嗪抗 AAI 的作用进行了比较。

1 材料与方

1.1 动物与分组 健康清洁级豚鼠,雌雄各半,体重 250 ± 50g,由上海医科大学实验动物部提供。随机分 5 组,空白组、模型组、银杏内酯组、黄芩甙组、川芎嗪组,每组 10~ 15 只豚鼠。

1.2 试剂及药品 ECP 测试盒:Pharmacia \$ Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Sweden 产品;银杏内酯吸入液(Ginkgolide):上海信谊药业有限公司生产,批号 990101;川芎嗪吸入液(Linguitrazin):无锡市第七制药厂生产,批号 9805091;黄芩甙吸入液(Baicalin):北京建昊生物制药有限公司,批号 990708。

2 实验方法

2.1 动物诱喘及用药装置 参照刘国雄^[2]的方法。豚鼠腹腔注射 10% 卵蛋白生理盐水溶液(200mg/kg),第 15d,放入诱喘装置,待呼吸平稳后,予 5% 卵蛋白生理盐水溶液雾化吸入 20s(雾化量为 0.102ml/min),装置内封闭时间共 30s,根据吸入前后呼吸生理改变(呼吸频率增加 ≥ 20%)及动物取出后的表现(咳嗽、呼吸困难、烦躁、抽搐、跌倒甚至死亡)选取有哮喘发作的动物进行实验。

2.2 用药过程中哮喘防治作用观察 按表 3 剂量用药第 5d 及第 12d,运用上述装置再次对豚鼠进行激发试验。予 5% 卵蛋白生理盐水溶液吸入 10s,封闭时间共 20s。记录各组动物哮喘发生率及严重程度。

2.3 取血 1.5% 戊巴比妥钠 60 mg/kg 腹腔注射麻醉,开胸心脏取血,置于 EDTA 抗凝管(细胞总数和嗜酸性粒细胞计数)和清洁血清管(ECP 检测,参照说明书测定)。

2.4 肺泡灌洗液细胞计数 取血后,行支气管肺泡灌洗,灌洗回收率大于 80% 者在 4℃ 下离心,500g × 10min,上清液用于 ECP 检测(4℃ 下离心,1370g × 15min,获得的上清液移入另一洁净试管中, - 30℃ 存在);沉淀细胞以 Hank's 液处理后即刻在显微镜下计数细胞总数,细胞浓度调至 2 × 10⁶/ml,涂片,瑞氏染色,计数嗜酸性粒细胞。

2.5 气道反应性测定 参照 Fujimura M^[3] 等和王长征等^[4]的方法,豚鼠麻醉后以动物微型呼吸机辅助

通气,以吸入组胺后的气管内压力(IP)变化作为支气管收缩的指标。首先在呼吸平稳后,喷入生理盐水 60s 作为对照,以 0.04mg/ml 磷酸组胺溶液雾化吸入,依次为 30s、60s、120s、120s、120s,喷入后立刻记录 IP,作剂量-反应曲线。

2.6 统计学处理 实验结果以平均数 ± 标准差表示,显著性检验采用 *t* 检验(具体见结果分析)。

3 结果

3.1 血嗜酸细胞及嗜酸细胞阳离子蛋白的影响 对数转换 *t* 检验显示:各中药药效成分均对嗜酸性粒细胞有抑制作用,表现为各治疗组与模型组相比嗜酸性粒细胞计数减低(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)(见表 1)。ECP 测定结果在各组中无明显差异。

表 1 对血嗜酸性粒细胞数的影响

组别	剂量 (mg/kg/d)	<i>n</i>	血嗜酸细胞绝对值 (× 10 ⁷ /L)	血嗜酸细胞百分比 (%)
银杏内酯组	4	7	9.60(3.34- 27.67)*	6.36(1.96- 20.67)
黄芩甙组	30	6	4.45(1.63- 12.20)* ×	3.64(1.58- 8.39) ×
川芎嗪组	15	6	4.02(1.52- 10.62)* ×	2.49(1.39- 4.45)* ×
模型组	—	15	28.4(12.82- 62.99)	10.64(4.82- 23.46)

注:与模型组相比* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01(下同)。

3.2 对肺泡灌洗液细胞总数与嗜酸细胞的影响 黄芩甙组和川芎嗪组对 BALF 中细胞总数和嗜酸性粒细胞计数均有抑制关系,银杏内酯对嗜酸性粒细胞计数有抑制作用。各组 BALF 中的 ECP 浓度无明显差异(见表 2)。

表 2 对 BALF 细胞数的影响

组别	剂量 (mg/kg/d)	<i>n</i>	细胞总数 (× 10 ⁶ /L)	嗜酸细胞计数 (× 10 ⁶ /L)
银杏内酯组	4	7	10.12(2.19- 45.17)	0.61(0.32- 1.01)*
黄芩甙组	30	6	5.70(2.19- 15.33)*	0.41(0.15- 0.82)**
川芎嗪组	15	6	4.36(2.14- 8.91)**	0.42(0.23- 0.95)**
模型组	—	15	14.69(4.36- 50.12)	1.32(1.48- 3.55)

4 讨论

对支气管哮喘发病机制,目前有大量学说,其中气道炎症学说已被广泛接受,即哮喘是一种涉及多种炎性细胞和炎性介质的慢性气道炎症性疾病,是以嗜酸细胞为主的多种炎性细胞介导了气道炎症过程,肥大细胞和嗜碱性粒细胞是气道炎症反应的始动细胞,而炎性细胞释放的化学介质和趋化因子及其它一些炎性介质(PAF、HA、LTs、TXA₂)引起支气管收缩、气道分泌亢进、血浆渗出、气道高反应性及气道结构改变。因此,本实验中以气道反应性和嗜酸

细胞作为观察指标能比较本质地反映所研究的中药有效成分对支气管哮喘的防治作用。

银杏具有敛肺止咳平喘的作用,银杏内酯(G)是从天然植物银杏叶中提取的一种 PAF 受体拮抗剂,大量实验证实其可有效抑制 PAF 和抗原引起的气道狭窄,并抑制哮喘动物的淋巴细胞激活和 IL-4、IL-5 的产生^[5];黄芩具有清热、泻火解毒作用,其有效成分之一黄芩甙(B)可明显抑制致敏豚鼠离体肺灌流释放慢反应物质(现已证实其结构和生物活性与硫肽白三烯极为相似),并且显著抑制肥大细胞释放组胺,因而具有抗炎和抗变态反应作用^[6];川芎可活血行气,祛风止痛,现代药理多侧重于血瘀证。其有效成分川芎嗪(L)具有抑制 TXA₂ 等炎症介质引起的豚鼠离体气管条和肺动脉条平滑肌痉挛的作用,并可提高机体免疫力,而 TXA₂ 是哮喘发病的重要介质之一,因此临床上曾用其静脉滴注治疗哮喘急性发作,报道有一定疗效^[7],基于上述认识,并结合吸入疗法等哮喘治疗理论,我们将上述三种中药药效成分雾化吸入用于致敏豚鼠,并从不同方面观察了这些药物抗哮喘气道炎症的作用。

哮喘作为一种嗜酸性粒细胞相关炎症,在机体受到各种变应原刺激后,外周血及组织中的嗜酸细胞数量和功能改变,释放各种活性产物,导致了气道高反应性和气道炎症的形成^[8],我们的实验结果显示,各中药药效成分治疗组可不同程度地减少哮喘豚鼠血及肺泡灌洗液内嗜酸性粒细胞计数及肺细胞灌洗液细胞总数,推测药物通过某些途径,抑制了炎症介质对嗜酸细胞的趋化活性。ECP 作为嗜酸细胞的活性产物之一,虽然临床大量试验证实它在哮喘患者的血清及支气管肺泡灌洗液中增多,但未查见相关动物实验的报导。我们在动物实验中也按照临床要求采集标本,结果显示各组动物的血及支气管肺泡灌洗液的 ECP 含量均极低,小于可测定范围(2μg),根据测试样本荧光点记录的结果在各组间无

差别。是否动物与人类间存在种属差异是导致这一现象的原因,尚有待今后进一步研究。

在进行中药药效成分雾化吸入治疗的第 5 及第 12d,各单用中药药效成分治疗的豚鼠不能预防再次吸入卵蛋白抗原后的哮喘发作,这很可能是因为哮喘的发生是多细胞、多介质共同。此外,剂量与疗程不足是否也影响了药物的预防作用尚需进一步大样本的研究。

综上所述,银杏内酯、川芎嗪、黄芩甙等中药有效成分可明显减低哮喘豚鼠血及支气管肺泡灌洗液中的嗜酸细胞计数。单一的中药效成分未显示出预防哮喘发作的作用,可能与药物的剂量、疗程或药物作用机制相对单一有关。

参考文献:

- [1] 李明华,殷凯生,董竞成.哮喘病药物治疗学[M].北京:人民卫生出版社,2001.19-21.
- [2] 刘国雄.用豚鼠评价止喘药物的记录装置[J].药学报,1980,15(3):189-191.
- [3] Fujimura M, Amemiya M, Myou S, et al. A guinea pig model of Ultrasonically Nebulized Distilled Water-induced bronchoconstriction[J]. Eur Respir J 1997, 10: 2237-2242.
- [4] 王长征,郭先健,王顺朝.豚鼠哮喘模型的气道反应测定[J].第三军医大学学报,1994,16(4):277-268.
- [5] Mahmoud F, Abul H, Onadeko B, et al. In vitro effect of Ginkgolide B on lymphocyte activation in atopic asthma: comparison with cyclosporine A[J]. Jpn J Pharmacol. 2000, 83(3):241-245.
- [6] 蒋韵,吴芬芬,刘桦,等.黄芩甙抗过敏机制的药理研究[J].中国实验临床免疫学杂志,1995,7(3):7-10.
- [7] 邵长荣.川芎嗪静脉滴注治疗发作期支气管哮喘[J].上海中医药杂志,1990,8:18.
- [8] Walsh GM. Advances in the immunobiology of eosinophils and their role in disease[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 1999, 36(5):453-496.