

·方药研究·

五味地龙汤对哮喘豚鼠炎症细胞和细胞因子的影响

李祥华 涂献玉 张德新 许甲凤 王文英 张 渊 杜亚明

(长江大学医学院, 湖北省荆州市沙市区江汉路55号, 434000)

[摘要] **目的** 探讨五味地龙汤治疗哮喘的作用及其机制。**方法** 采用卵白蛋白喷雾引喘制作动物模型, 致敏15天后开始灌胃给药, 每日1次, 连续8天。取血分别进行白细胞总数、嗜酸性粒细胞(EOS)、淋巴细胞分类计数、 γ 干扰素($IFN-\gamma$)和二羧酸白三烯(LTB_4)测定。**结果** 哮喘模型组白细胞总数、EOS、淋巴细胞均显著升高, 与五味地龙汤各剂量组比较, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。哮喘模型组动物血清 LTB_4 含量明显升高, $IFN-\gamma$ 水平明显降低, 给予五味地龙汤后, 大、中、小3个剂量组均使血清 LTB_4 含量降低、 $IFN-\gamma$ 上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 五味地龙汤能抑制哮喘状态下的炎症细胞浸润和扩散, 对 LTB_4 和 $IFN-\gamma$ 有调节作用, 其可能是五味地龙汤治疗哮喘的重要机制之一。

[关键词] 哮喘; 细胞因子; 中医药疗法; 五味地龙汤

Effect of Wuwei Dilong Decoction on Inflammatory Cells and Cytokines in Asthma Model Guinea Pigs

LI Xiang-hua, TU Xian-yu, ZHANG De-xin, et al.

(Medical School of Yangtze University, Jingzhou 434000)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect and mechanism of Wuwei Dilong Decoction (Schisandra Fuit and Earthworm Decoction) on asthma. **Methods** The guinea pigs for experiment were sensitized with ovalbumin (OVA) to establish asthmatic animal models. Fifteen days later, the guinea pigs were administered Wuwei Dilong Decoction once a day for 8 days in succession. Blood sample was taken for testing the total leucocytes, eosinophil (EOS), lymphocytes, interferon- γ ($IFN-\gamma$) and leukotriene B_4 (LTB_4). **Results** In the asthma model group, the total leucocytes, EOS and lymphocytes were all increased, comparing with the Wuwei Dilong Decoction groups of different dosages, the difference was significant ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The serum LTB_4 of asthma model group were obviously increased and $IFN-\gamma$ decreased. Upon administration of Wuwei Dilong Decoction, the large, medium and small dosages could make LTB_4 decreased ($P < 0.01$) while $IFN-\gamma$ increased. **Conclusion** Wuwei Dilong Decoction can inhibit the infiltration and diffusion of inflammatory cells in asthma, functioning to regulate LTB_4 and $IFN-\gamma$ which might be one of the important mechanism of Wuwei Dilong Decoction in relieving asthma.

Key Words Asthma; Cytokines; TCM therapy; Wuwei Dilong Decoction (schisandra fuit and earthworm decoction)

支气管哮喘是由嗜酸性粒细胞(EOS)、肥大细胞和T淋巴细胞等多种炎症细胞参与的慢性呼吸道炎症。为进一步探讨五味地龙汤的作用机制, 我们观察了五味地龙汤对哮喘豚鼠细胞总数、EOS和淋巴细胞计数以及二羧酸白三烯(LTB_4)和 γ 干扰素($IFN-\gamma$)的影响, 现报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

2月龄豚鼠, 体重(280 ± 20)g, 雌雄各半, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK(鄂)2004-0007, 实验动物许可证号: SYXK(鄂)2004-0028。动物标准颗粒饲料由华中科技大学同济医学院动物中心提供。

1.2 药物制备

五味地龙汤(由地龙、鱼腥草、柴胡、射干、葶苈子、炙麻黄、蜂房、五味子、甘草组成)由荆州市中医医院中药制剂室提供。将该方加3倍量的水浸泡30分钟后, 煎煮60分钟, 过滤, 滤液另器保存, 药渣再加2倍量水煎煮30分钟, 过滤, 将两次滤液合并, 置于80℃水浴浓缩至1ml相当于原生药量的1.5g, 置4℃冰箱中备用。

1.3 药品与试剂

地塞米松片, 浙江仙路制药股份有限公司生产, 批号: 051263; 卵白蛋白(OVA), Sigma公司产品, 武汉生命技术有限公司分装, 批号: 20041008; 戊巴比妥钠, 中国医药(集团)上海化学试剂公司产品, 批号: F20030816; 氢氧化铝, 天津市光复精细化工研究所生产, 批号: 20041229; 豚鼠 $IFN-\gamma$ ELISA试剂盒, RapidBio Lab California, 批号: 03260502; 豚鼠 LTB_4 ELISA

表1 各组豚鼠血细胞分类计数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量(g/kg)	白细胞总数($\times 10^9/\text{mm}^3$)	嗜酸性粒细胞(%)	淋巴细胞(%)
正常对照组	10	—	6.98±0.46**	1.17±0.41**	3.60±0.88**
哮喘模型组	10	—	23.71±4.03	16.71±1.11	11.17±1.06
阳性药物组	10	0.001	7.53±0.82**	1.50±1.00**	5.38±1.49**
试药大剂量组	10	18	7.60±0.52**	1.37±0.81**	5.43±0.55**
试药中剂量组	10	12	9.30±0.82**	2.44±0.53**	7.56±0.63**
试药小剂量组	10	6	16.10±2.30**	5.71±2.23**	9.39±0.22*

与哮喘模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

试剂盒, RapidBio Lab California, 批号: 02040605, 以上试剂盒均购自上海生物试剂公司。

1.4 仪器

JSC-OK 双头式多功能型超声波雾化器, 辽宁省鞍山市电子医疗器械厂; VEX380型-80℃低温冰箱, 日本 SANYO 公司; ThermoLabsystems Multiskan MK3 酶标分析仪(芬兰); LD4-2A 离心机(北京); Leica DMLB2型光电显微照相机(德国)。

2 方法

2.1 动物分组

取筛选合格的豚鼠60只, 随机分为正常对照组, 哮喘模型组, 地塞米松(阳性药物)组, 五味地龙汤(试药)大、中、小剂量组, 共6组, 每组10只。

2.2 模型制备

动物模型的制作参照文献[1]方法进行。并于喷雾引喘致敏15天后给予药物灌胃治疗, 每日1次, 连续8天。其中哮喘模型组只致敏不给药; 阳性药物组给予地塞米松0.001g/kg; 试药大、中、小剂量组分别给予五味地龙汤水煎液18g/kg、12g/kg、6g/kg; 正常对照组给予同样量的生理盐水。

2.3 标本制作

于末次给药后1小时, 戊巴比妥钠0.03g/kg腹腔注射麻醉豚鼠, 立即分离颈动脉取血8ml, 一部分用于血白细胞总数、EOS 和淋巴细胞计数; 另一部分静置2小时, 以3000转/分钟的速度离心10分钟, 取血清, 放置低温冰箱中待用。

2.4 LTB4和 IFN-γ的测定

LTB4和 IFN-γ的测定按试剂盒说明, 采用 ThermoLabsystems Multiskan MK3 酶标分析仪, 以 ELISA 法进行。

2.5 统计学方法

应用 SPSS10.0统计软件对数据进行处理, 数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计量资料样本均数间多重比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 五味地龙汤对哮喘豚鼠血细胞分类计数的影响

表1示, 正常对照组豚鼠血液中白细胞总数、EOS

和淋巴细胞计数属正常值范围; 哮喘模型组血中白细胞总数、EOS 和淋巴细胞计数均显著高于正常对照组($P<0.01$)。阳性药物组、试药大剂量组、中剂量组和小剂量组血液中白细胞总数、EOS、淋巴细胞与正常对照组比较差异无统计学意义, 但与哮喘模型组比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.2 五味地龙汤对哮喘模型豚鼠血清 LTB4有 IFN-γ水平的影响

表2 各组豚鼠血清 LTB4、IFN-γ含量比较($\text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量(g/kg)	LTB4	IFN-γ
正常对照组	10	—	11.90±0.51**	35.41±2.31**
哮喘模型组	10	—	17.49±1.61	18.74±2.22
阳性药物组	10	0.001	11.17±0.68**	39.08±1.06**
试药大剂量组	10	18	11.33±0.85**	35.06±2.83**
试药中剂量组	10	12	11.91±1.47**	31.80±1.83**
试药小剂量组	10	6	12.09±1.39**	29.74±1.84*

与哮喘模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表2示, 哮喘模型组血清 LTB4含量较阳性药物组、试药大剂量组、试药中剂量组、试药小剂量组和正常对照组明显升高($P<0.01$); 哮喘模型组豚鼠血清中 IFN-γ水平较阳性药物组、试药大剂量组、试药中剂量组、试药小剂量组和正常对照组明显降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。除哮喘模型组外, 其余各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 讨论

泻肺、平喘、解痉是中医治疗哮喘的重要原则, 五味地龙汤方中地龙解痉平喘, 麻黄宣肺平喘, 葶苈子泻肺平喘, 佐以鱼腥草消痰化饮, 柴胡调理气机, 射干化痰利咽, 五味子敛肺滋肾, 蜂房祛风, 共奏解痉、泻肺、平喘之功。

在支气管哮喘中, EOS 以及肥大细胞、T 淋巴细胞等被认为是哮喘慢性气道炎症形成的主要炎症细胞, 是此类疾病发病的中心环节。从20世纪初期开始, 人们就认识到了 EOS 和可逆性哮喘气道阻塞之间的联系, 是哮喘炎症的关键细胞, 通过释放已经生成并储存于细胞内的炎症介质起作用, 损伤气道上皮^[2,3]。在既往的研究中, 我们发现本方有抗气道变态反应的作

用^[4]和平喘作用^[5]。本实验观察到实验性哮喘模型豚鼠全血白细胞总数、EOS 和淋巴细胞数增加。五味地龙汤大、中剂量组 EOS 的浸润减少,与哮喘模型组比较差异有统计学意义。提示五味地龙汤可以抑制抗原诱导的 EOS 向气道内流入。

许多研究表明,IFN- γ 是一种重要的淋巴细胞衍生的细胞因子,参与了许多 T 细胞依赖的肺部疾病,可抑制气道黏膜中 EOS 的聚集及血中 IgE 的产生。本实验研究结果显示,五味地龙汤能使哮喘模型豚鼠血清 IFN- γ 含量上调至正常水平,与哮喘模型组比较有显著差异。这表明五味地龙汤治疗支气管哮喘,一方面可能通过调节 Th1/Th2 的平衡,抑制体内一些致喘炎症细胞因子如白细胞介素-4(IL-4) 的升高,另一方面对气道黏膜中 EOS 聚集和血中 IgE 产生有一定的抑制作用有关。

LTB₄可刺激人外周血单核细胞和 T 细胞产生 IL-1、TNF- α 和 IL-5^[6],还可使核转录因子过氧化物增殖剂-活化受体- α 和 IL-4 介导的 B 细胞 IgE 合成增加,亦可使中性粒细胞 CD11b/CD18 黏附蛋白和 L-选择素表达上调^[7]。故 LTB₄可促进多种炎症细胞因子的合成和释放,同时其自身的合成又受多种细胞因子的调控,从而在哮喘细胞因子网络中发挥着重要作用。本实验显示,五味地龙汤可降低处于哮喘状态下的豚鼠血清的 LTB₄水平。

综上所述,五味地龙汤对哮喘的作用不仅体现在

能对 EOS 和淋巴细胞等炎症细胞产生影响,还参与机体免疫调节,对 LTB₄和 IFN- γ 等细胞因子进行调节,这可能是五味地龙汤治疗哮喘的重要机制之一。

参考文献

- [1]徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学. 北京:人民卫生出版社,2003;1410~1517.
- [2]Lacy P, Moqbel R. Immune effector function of eosinophils in allergic airway inflammation. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2001, 1(1): 79~84.
- [3]Shen HH, Ochkur SI, McGarry MP, et al. A causative relationship exists between eosinophils and the development of allergic pulmonary pathologies in the mouse. J Immunol, 2003, 170(6): 3296~3305.
- [4]李祥华,王文英,张渊,等. 五味地龙汤抗气道变态反应的作用研究. 长江大学学报(自科版)医学卷, 2005, 2(6): 128~130.
- [5]王文英,涂献玉,杜亚明,等. 五味地龙汤对实验性哮喘豚鼠平喘作用的影响. 四川中医, 2007, 25(1): 55~57.
- [6]Stankova J, Dupuis G, Gaqnon N, et al. Priming of human monocytes with leukotriene B₄ enhances their sensitivity in IL-2 driven tumor necrosis factor- α production. Transcriptional and post-transcriptional up-regulation of IL-2 receptors. J Immunol, 1993, 150(9): 4041~4051.
- [7]Devchand PR, Keller H, Peters JM, et al. The PPAR α pathway: leukotriene B₄ pathway to inflammation control. Nature, 1996, 384(6604): 39~43.

(收稿日期:2007-01-25;修回日期:2007-05-12)

[编辑:赵艳]

行业内唯一通过ISO9001: 2000和ISO13485: 2003认证的企业



YZN-50多功能真空(提取 分离 蒸馏)浓缩机

留驻精华,留驻健康



中医中药中国行公益事业杰出贡献奖
中医中药中国行特约赞助单位

适用范围

广泛适用于诊所、药店、中医院、综合医院、药物研发、临床应用、研究机构、食品饮料加工业、化工行业等及其分支行业的制剂室、实验室、中试阶段研究、小批量生产以及为终端客户服务。

主要功能

- 真空低温煎药;
- 蒸馏浓缩中药,制作膏剂、粉剂;
- 有机溶剂提取(酒精、乙醚等);
- 果酱、凝胶体(成冻体)等的低温浓缩和提取;
- 芳香剂的提取、各种精油成分的分离;
- 红参制造功能(蒸熟和炖)等。

全国免费垂询热线: 800-810-0359



北京东华原医疗设备有限公司

电话: 010-89718013

传真: 010-89718021

地址: 北京市中关村昌平科技园区振超路1号

邮编: 102200

网址: www.donghuagroup.com

