

龟芪散对哮喘大鼠肺组织 β -肾上腺素能受体及 cAMP 的影响

上海中医药大学中医基础理论教研室(200032)

包照日格图* 吴敦序 陈淑俊

吴昆懿 童舜华 奚蓓莉

摘要 大鼠哮喘连续激发后肺组织细胞膜 β -AR 和胞浆 cAMP 水平逐日下降,在第 7 日明显低于正常对照组($P<0.01$);激发第 7 日,龟芪散明显上调 β -AR 密度($P<0.05$)并使 cAMP 水平明显上升($P<0.05$)。提示龟芪散治疗哮喘可能与其上调 β -AR,提高 cAMP 水平作用有关,联合用药可提高糖皮质激素的疗效。

关键词 龟芪散 哮喘大鼠 β -肾上腺素能受体(β -AR) 环磷酸腺苷(cAMP)

支气管哮喘是一种常见的呼吸道疾病, β -肾上腺素能受体(β -AR)激动剂是目前最有效的支气管扩张剂,该类药物通过兴奋 β -AR,舒张支气管平滑肌而使哮喘得以控制^[1]。与糖皮质激素(GC)合用,作用可加强^[2]。但是,长期使用 GC 出现的全身性副作用和 β -AR 激动剂长期用药出现剂量依赖性心动过速和诱发心律失常甚至导致某些患者的死亡等问题却困扰着医学界^[3]。实践表明,采用中药与 β 受体激动剂联合用药,加强 β 受体激动剂的疗效,改善 β 受体激动剂的快速减敏,消除或部分消除其副作用而提高哮喘的治愈率。我们在临床上长期应用补肾健脾中药方龟芪散防治支气管哮喘的基础上,通过动物实验直接观察哮喘大鼠肺组织 β -AR 的 RT 值及 cAMP 含量的变化来探讨龟芪散治疗哮喘的作用机制。

1 实验材料

1.1 试剂:卵蛋白为 Sigma 公司产品;百日咳杆菌疫苗由上海市传染病研究所提供;丙酸倍氯米松(商品名为必可酮)为重庆葛兰素制药有限公司产品;¹²⁵I-NaI,无载体,Amer-sham 公司产品;¹²⁵I-心得静,我校同位素室标记,比活度为 2 176 Ci/mmol;心得安,北

京制药厂产品;cAMP 试剂盒为本校同位素室提供。

1.2 中药:龟芪散由黄芪、人参、白术、甘草、龟板、鹿角片、巴戟和紫河车等 21 味中药组成。由上海药材公司提供,加工制粉与鼠饲料相混匀,制饼备用。

1.3 动物:雄性 SD 大鼠,体重 200 g 左右,由上海计划生育研究所提供。

2 实验方法

2.1 大鼠哮喘模型制备:参照吕国平等人的方法^[4],略加改动。先将动物随机分为正常对照组、模型组、龟芪散组、必可酮组及龟芪散加必可酮组,观察 24 h。然后,除正常对照组外,其余各组再分第 1、3、7 日组,ip 卵蛋白 100 mg,灭活百日咳杆菌疫苗 5×10^9 个和氢氧化铝干粉 100 mg 致敏,2 周后予超声雾化吸入 1% 卵蛋白激发,每日 08:00~09:00 吸入 20 min 重复激发。正常对照组用生理盐水代替抗原液进行注射和雾化吸入。各组在相应预定时间处死摘取肺脏。

2.2 给药方法:龟芪散在大鼠哮喘激发前 2 周开始给药,含药物饲料吃净,补加普通饲料,直至动物处死为止,每鼠剂量为 2.4 g/d;必可酮在每日激发哮喘的同时给予大鼠喷雾

* Address: Bao Zhaorigetu, Department of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

包照日格图 男,博士,研究方向为中药药理。现在上海中医药大学博士后流动站从事博士后研究工作。先后承担和参加国家自然科学基金、中医药管理局和省级科研项目多项。现正从事上海市教委和中医药管理局基金资助项目“扶正与化痰中药对哮喘大鼠肺组织 β -肾上腺素能受体和糖皮质激素受体的调节作用”的研究。

吸入 100 $\mu\text{g}/\text{d}$, 对照组吸入等容积生理盐水。

2.3 肺组织 β -AR RT 值测定: 肺组织放入加蔗糖缓冲液中, 以细胞分散器粉碎, 然后以 teflon 匀浆器匀浆, 27 000 r/min 离心 15 min, 取沉淀以反应缓冲液配成所需浓度的膜蛋白悬液。反应试管中加入 ^{125}I -心得静 50 μL 和膜蛋白悬液 200 μL , 平行非特异管另加入 100 μL 心得安, 总容积为 400 μL 。以上操作均在 0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 中进行。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 30 min 后, 收集结合部分于玻璃纤维滤膜上, 以放射免疫 γ 计数器测量放射性。再以公式算出结合位点数(RT)。

$$\text{RT} = (\text{总结合} - \text{非特异性结合}) / (\text{仪器效率} \times \text{比活度} \times \text{蛋白量}(\text{mg}))^{(5)}$$

2.4 肺组织 cAMP 的测定: 称取 50 mg 肺组织放入 2 mL 醋酸缓冲液中粉碎匀浆(冰浴), 再加入 2 mL 无水乙醇混匀静置 5 min, 3 500 r/min 离心 15 min 取上清液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 蒸发致干, 然后以放射免疫分析法测定。

2.5 蛋白含量测定: 用 lowry 微量定蛋白法。

3 实验结果

3.1 龟芪散对哮喘大鼠肺组织 β -AR RT 值的影响: 见表 1。

表 1 龟芪散对哮喘大鼠肺组织 β -AR RT 值的影响

组别	动物数 (只)	RT fmol/mg 蛋白 ($\bar{x} \pm s$)		
		第 1 日	第 3 日	第 7 日
正常对照	9	144.2 $\pm$ 32.3	144.2 $\pm$ 32.3	144.2 $\pm$ 32.3
哮喘模型	9	131.4 $\pm$ 34.8	91.3 $\pm$ 36.1 Δ	41.3 $\pm$ 23.1 $\Delta\Delta$
必可酮	9	160.7 $\pm$ 25.6	90.4 $\pm$ 34.5	68.8 $\pm$ 19.2*
龟芪散	9	123.6 $\pm$ 39.5	102.5 $\pm$ 22.4	73.2 $\pm$ 22.3*
必可酮+龟芪散	9	147.8 $\pm$ 38.3	99.2 $\pm$ 35.3	71.4 $\pm$ 24.4*

与正常对照组比较: $\Delta P > 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$;

与哮喘模型组比较: * $P < 0.05$

从表 1 可见, 哮喘激发第 3 日, 模型组 β -AR 的 RT 值低于正常对照组, 各用药组的 RT 值与模型组比较无明显差异。哮喘激发第 7 日, 哮喘模型组的 RT 值显示继续下降, 与正常对照组相比较 $P < 0.01$, 有非常显著性意义。另一方面, 必可酮组, 龟芪散组及中

西药组的 RT 值均明显高于模型组(均为 $P < 0.05$)。

3.2 龟芪散对哮喘大鼠肺组织 cAMP 含量的影响: 见表 2。

表 2 龟芪散对哮喘大鼠肺组织 cAMP 含量的影响

组别	动物数 (只)	cAMP 含量 pmol/50mg 肺组织 ($\bar{x} \pm s$)		
		第 1 日	第 3 日	第 7 日
正常对照	9	4.04 $\pm$ 0.84	4.04 $\pm$ 0.84	4.04 $\pm$ 0.84
哮喘模型	9	3.60 $\pm$ 0.71	3.02 $\pm$ 0.92 Δ	2.70 $\pm$ 1.1 $\Delta\Delta$
必可酮	9	3.50 $\pm$ 0.66	3.94 $\pm$ 1.10	4.02 $\pm$ 1.42*
龟芪散	9	3.52 $\pm$ 0.88	3.30 $\pm$ 0.78	3.88 $\pm$ 1.28*
必可酮+龟芪散	9	3.60 $\pm$ 0.68	4.10 $\pm$ 1.22	4.68 $\pm$ 1.68**

与正常对照组比较: $\Delta P > 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$;

与哮喘模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

从表 2 可见, 哮喘激发第 3 日, 模型组肺组织 cAMP 含量低于正常对照组。哮喘激发第 7 日, 模型组肺组织 cAMP 含量显著低于正常对照组($P < 0.01$)。与模型组比较, 必可酮组($P < 0.05$)、龟芪散组($P < 0.05$)及中西药组($P < 0.01$)肺组织 cAMP 含量均显著高于模型组肺组织 cAMP 含量。

4 讨论

支气管哮喘是以呼吸道慢性非特异性炎症和阵发性通气障碍为主的疾病, 其病理生理变化涉及到免疫系统和神经内分泌系统多个环节, 其中肾上腺素能 β -AR 功能低下是重要一环。

我们的实验结果显示, 哮喘大鼠肺胞膜 β -AR 的 RT 值随哮喘持续激发而逐日下降, 在第 3 日即低于正常对照组, 在第 7 日进一步下降。伴随着 β -AR 的 RT 值下降, 哮喘大鼠肺组织 cAMP 水平也出现降低, 在第 7 日达最低水平。当然, cAMP 作为“第二信使”, 是一种非特异性的介质, 许多因素都可使其变化。但在哮喘发生过程中肺胞浆 cAMP 水平变化则与胞膜 β -AR 的密度变化关系密切。实验结果亦提示了这一点。

临床上龟芪散用于防治支气管哮喘的发作已有数年。在哮喘缓解期开始给药, 哮喘发作时与皮质激素和 β -AR 激动剂联合用药,

确实具有使哮喘发作次数大为减少,发作容易控制和减少皮质激素及 β -AR激动剂的副作用等特点。龟芪散组方由补肾健脾两类中药组成,方义为温补肾阳、纳气利水,补益脾肺之气,堵截生痰之源。实验中在哮喘激发第7日,龟芪散和必可酮均使已经下降的哮喘大鼠肺组织 β -AR RT 显著上调,同时显著提高肺组织cAMP水平。可见,龟芪散和GC一样对 β -AR具有上调作用并提高cAMP水平。资料表明,温肾中药可改善皮质功能和 β -AR功能;健脾固本中药调节细胞和体液免疫,提高cAMP水平,阻抑过敏介质释放^[6~8]。可以推论,龟芪散上调 β -AR及提高

cAMP水平作用可能与其类皮质激素样作用,改善肾上腺皮质功能和免疫调解等诸方面的因素有关。

参考文献

- 1 Bel E H, *et al.* Thorax, 1991; 46: 9
- 2 Mak J C W, *et al.* Am Rev Respir Dis, 1992; 145: A834
- 3 Fahy J V, *et al.* Clin Chest Med, 1995; 16(4): 715
- 4 吕国平,等. 中华结核和呼吸杂志, 1995; 18: 377
- 5 易宁育,等. 中药药理与临床. 1992; 8(5): 40
- 6 胡国让,等. 中西医结合杂志, 1987; 7(2): 71
- 7 赵树进,等. 中国中药杂志, 1991; 16(6): 370
- 8 许得盛,等. 中国中西医结合杂志, 1993; 13(5): 311

(1997-12-08 收稿)

Effect of Guqisan (GQS) on β -Adrenergic Receptors and Cyclic AMP Level of Lung Tissues of Asthmatic Rat

Bao Zhaorigetu, Wu Dunxu, Chen Shujun, *et al.* (Department of Basic Theory, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032)

Abstract Guqisan (GQS), a recipe with kidney-nourishing and spleen-invigorating effects, has been shown to prevent asthmatic attacks effectively in clinics. GQS was administered to rat a week before the experiment and consecutively during the experiment (2.4 g/d, rat) daily while the rat was consecutively challenged with asthmatic attacks. The β -adrenergic receptor (β -AR) density and cAMP level of lung tissues in the rat were determined by radio ligand-binding assay and radioimmunity assay at 1st, 3rd and 7th day. Results showed that the β -AR density and cAMP level of asthmatic control group gradually decreased to significant low levels on the 7th day ($P < 0.01$), while that of the GQS pretreated group showed a statistically significant elevation on the 7th day ($P < 0.05$). The above results indicated that GQS can elevate the decreased β -AR density and cAMP level of lung tissues in asthmatic rat and seemed to enhance the β -AR up-regulation effect of beclomethasone dipropionate (BDP) when GQS and BDP were administered simultaneously.

Key words kidney-nourishing and spleen-invigorating herbs Asthmatic rat β -adrenergic receptor cAMP

《中草药》杂志 1997 年第 28 卷增刊(总第 297 期)征订启事

经国家科委(国科发信字[1997]281号文)批准,我们编辑出版了《中草药》杂志1997年第28卷增刊(总第297期)。本增刊共收入论文92篇,其中紫杉醇研究方面的论文12篇,包括紫杉醇的化学成分、提取工艺、组织培养方面科研论文,并特邀国内从事紫杉醇研究的知名专家和中青年学科带头人撰写综述文章,充分反映了我国从事紫杉醇研究方面的新成果,新进展和新动态。另外,还有反映国内中药植化、药理、分析、制药、药材、临床等方面的新理论,新方法,新成就的科研论文和有关综述性文章80余篇。

增刊为16开本,144页(约30万字左右),天津市报刊增刊特准印证(97)第061号,定价40元,另加包装费、邮局附加费5元。凡订阅者请向我部索取订单:300193 天津市鞍山山西道308号《中草药》杂志编辑部。