

保肺冲剂治疗哮喘的实验研究

天津干部疗养院内科(300191)

王淑芬*

天津医科大学药理教研室

翁福海[†] 林秀珍 张 骏

摘 要 探讨保肺冲剂(BC)治疗哮喘作用的机制。测定动物迟发性超敏反应;血清溶血素值、血液 CD_4/CD_8 细胞比值及对离体豚鼠肠管平滑肌抗乙酰胆碱、组织胺作用。结果表明BC使小鼠耳片重量明显减轻;使小鼠脾指数增加,胸腺指数降低;显著提高被环磷酰胺抑制的 CD_8 细胞,使T淋巴细胞亚群 CD_4/CD_8 细胞比值增加及有拮抗乙酰胆碱、组织胺收缩离体豚鼠肠管平滑肌的作用。

关键词 保肺冲剂 迟发性超敏反应 血清溶血素 脾/胸腺指数 CD_4 细胞 CD_8 细胞

保肺冲剂(简称BC)由川贝母、桑白皮、黄芩、生石膏等组成,用于治疗喘息性支气管炎或支气管哮喘,疗效显著。我们探讨了BC治疗哮喘作用的机制:1)对细胞免疫(迟发性超敏反应)影响;2)对免疫器官重量的影响;3)对体液免疫(血清溶血素产生)的影响;4)对外周血中T淋巴细胞亚群 CD_4 、 CD_8 细胞数及其比值的影响;5)拮抗乙酰胆碱、组织胺收缩豚鼠离体肠管平滑肌的作用。

1 材料

1.1 动物:昆明种小鼠,体重(23.81 ± 2.07)g,大鼠体重(180 ± 25)g,雌雄各半,豚鼠体重(300 ± 45)g,雌雄各半。以上均由天津药物研究院动物室提供。

1.2 药品:保肺冲剂(BC)由天津肺科医院提供,94津卫药制剂(33)第73号;1%二硝基氯苯(1%DNCLB),北京化工厂生产,批号:810928;碱性磷酸酶桥联酶标试剂盒(大鼠T细胞亚群检测试剂盒,APAAP Kit),北京军事医学科学院生物制品发展中心提供,内含小鼠抗大鼠 CD_3 分子与 CD_4 分子的单抗(MaR- CD_3 , MaR- CD_4)及酶联二抗等制剂。环磷酰胺 Endoxan-Asta 200 mg,德国制品。大鼠淋巴细胞分离液,由中国医学科学院

血液学研究院供应,体积质量比 1.087 ± 0.002 。磷酸缓冲液(PBS)0.01 mol/L, pH 7.2 (Na_2HPO_4 153.30 g, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 57.96 g, NaCl 1227.24 g,加双蒸水至15 L。二盐酸组织胺(生化试剂,由中国科学院上海生物化学研究所);氯化乙酰胆碱(生化试剂,北京东环联合化工厂);Tyrosine(台氏液,每升含NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, $CaCl_2$ 0.2 g, $MgCl_2$ 0.1 g, NaH_2PO_4 0.05 g, $NaHCO_3$ 1 g, 葡萄糖 10 g)。

1.3 仪器:722型光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂生产, LB801型超级恒温器; LMS-2A型二道生理双笔记录仪;离体组织水浴槽。

2 方法和结果

2.1 对小鼠迟发型变态反应的影响:将小鼠随机分为7组,即对照组,等容量生理盐水0.4 mL/10 g,环磷酰胺(CY)组[16 mg/(kg · d) ip 每隔日1次,共5次], BC大、中、小剂量组(14.56、2.91、1.46 g/kg)。每组均按0.4 mL/10 g体重ig,连续给药10 d。给药第6天除盐水组外,以1%DNCLB(250 μ L)涂于小鼠腹部(去毛)3 cm × 3 cm面积致敏,致敏后第5天涂右耳攻击,左耳为对照,24 h

* Address: Wang Shufen, Tianjin Cardre Convalescent Hospital, Tianjin

王淑芬 天津干部疗养院新悦医疗中心主任,内科副主任医师。多年研究中西医结合治疗常见病,与天津医科大学合作参与天津市科委研究项目,如中药抗炎机制与对腹腔巨噬细胞产生释放白三烯B4及细胞内钙离子的影响,保肺冲剂治疗哮喘机制研究,衰老机制与T淋巴细胞亚群相关性等。1996年~1999年发表论文10余篇,在国内外学术会议上获优秀论文奖。

后脱臼处死,同时用直径 8 mm 打孔器取两耳片称重,以两耳片称重之差值进行统计学处理,结果见表 1。

表 1 对小鼠迟发型超敏反应的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	鼠数	耳片重量差(mg)
对照组	11	4.625±2.13 $\Delta\Delta$
CY 组	12	1.75±0.89**
BC 大剂量	8	2.875±1.13 Δ
BC 中剂量	10	2.167±0.75*
BC 小剂量	10	1.89±0.78**

与 CY 组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$
与对照组比较:* $P<0.05$ ** $P<0.01$ (下同)

结果表明各剂量组 BC 均使小鼠耳片重量明显减小,与正常对照组比较有显著性差

表 2 对小鼠免疫器官重量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	脾重量(mg)	脾指数	胸腺重量(mg)	胸腺指数
组别	11	113.27±20.20	47.91±12.94 $\Delta\Delta$	74.55±21.49	28.14±8.30
CY	10	104.10±49.75	36.69±15.94	18.20±6.25**	6.40±2.38**
BC 大剂量	8	144.60±43.72*	57.21±11.97	48.80±16.91** $\Delta\Delta$	19.22±6.63* Δ
BC 中剂量	10	144.70±46.99	64.18±24.18	46.70±21.47* $\Delta\Delta$	20.56±10.30
BC 小剂量	10	162.87±35.56**	68.6±13.91** $\Delta\Delta$	48.38±14.80* $\Delta\Delta$	20.15±5.52* $\Delta\Delta$

显著性差异;其抑制作用小于 CY 组。

2.3 对小鼠血清溶血素产生的影响:分组及给药方法同 2.1,于给药后第 10 天用 60% SRBC 0.2 mL/只 ip 免疫,5 d 后取血,并作补体结合实验,用 722 型分光光度计测定血清溶血素半数溶血素值(HC₅₀),并进行组间 *t* 检验,结果见表 3。

表 3 对小鼠血清溶血素的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	鼠 数	HC ₅₀
对照组	11	9.77±0.40
CY 组	10	3.91±1.40**
BC 大剂量	10	27.93±14.28**
BC 中剂量	10	31.96±17.47**
BC 小剂量	8	21.61±7.10**

结果表明 各剂量组的 BC 测定的小鼠血清 HC₅₀明显大于对照组或 CY 组,表明该药有增强体液免疫作用;CY 组显著抑制体液免疫作用,HC₅₀明显减少。

2.4 对大鼠外周血中 T 淋巴细胞亚群的影响:将 SD 大鼠随机分为 4 组,即对照组(NS 组)0.4 mL/100 g,ig,每日 1 次,共 10 d;BC 组 14.6 g/kg(0.4 mL/100 g)ig,每日 1 次,

异($P<0.05$),与 CY 组相似,表明该药对细胞免疫(迟发型超敏反应)有明显抑制作用。

2.2 对小鼠免疫器官胸腺及脾脏指数的影响:取 2.1 小鼠处死后摘除胸腺及脾脏称重并计算胸腺及脾指数(每 10 g 小鼠体重含有的胸腺或脾 mg 重量,mg/10 g),结果见表 2。

结果表明 BC 各剂量组均使小鼠脾脏重量及脾脏指数明显增加,与对照组比较有显著性差异($P<0.05$),与 CY 组抑制作用比较有极显著性差别($P<0.01$)。各剂量组均使小鼠胸腺重量明显减低,与对照组比较有

共 10 d,CY 组 16 mg/kg·d,ip,隔日 1 次,共 5 次,BC+CY 组(中药小剂量及 CY 用量同上)。应用碱性磷酸酶桥联免疫组化法(A-PAAP)测试方法如下:(1)单个核细胞涂片制备方法:大鼠眼内取血 3 mL 置于肝素管内,以 PBS 稀释 3 倍,重层于含有 3 mg 淋巴细胞分离试管内,离心,吸取血浆和分离液之间的单个核细胞层,加 PBS 液洗涤,离心,去掉上清液,沉淀即为单个核细胞。用手推片法制备细胞图片标本。(2)标本染色:细胞图片标本干燥后用丙酮固定 3 min 后用 PBS 液洗 3 次,依次加抗大鼠 T 细胞亚群单克隆抗体 MaR-CD₃ 或 MaR-CD₄ 单克隆后加羊抗鼠 IgG 二抗,加 APAAP 复合物,加碱性磷酸底物显色。以上每步骤均用 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 液洗 3 次,最后加苏木素复染。(3)高倍镜下观察,细胞核呈兰色,细胞表面有红色标志物的细胞为阳性细胞,无红色标记物的细胞为阴性细胞。计数 200 个单个核细胞,计算阳性细胞百分率(%),结果用 *t* 检验作统计学处理,见表 4。

结果表明 CY 组 CD₈ 细胞数明显增加,

大于盐水对照组及 BC 组；加入 BC 后 CD₈

表 4 对大鼠外周血中 T 淋巴
细胞亚群的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CD ₄ 细胞(%)	CD ₈ 细胞(%)	CD ₄ /CD ₈
对照组	6	51.16±5.98	23±6.03	2.31±0.45
BC 组	7	57.29±23.07	38.57±18.83 [△]	1.85±0.90
CY 组	7	64.29±16.37	62.57±13.76 ^{**}	1.06±0.34 ^{**}
CY+BC 组	6	50.68±15.83	24±4.15 ^{△△}	2.15±0.09 ^{△△}

细胞数明显减小,CD₄/CD₈ 的比值增加。

2.5 抗过敏介质及抗乙酰胆碱作用:按文献制备豚鼠离体回肠实验标本^[1]。取豚鼠离体回肠段置离体组织水浴槽液中稳定 30 min 后(回肠自然收缩蠕动消失),描记基线。1)在充满台氏液的浴槽中加入生理盐水,描记收缩活动,观察 15 min 未见明显收缩;2)将水浴中液体排出换取新液依次分别加入组织胺液和乙酰胆碱液(在浴槽中终浓度均为 2×10⁻⁷ g/mL,可见肠管立即收缩,观察描记 15 min,待肠管的收缩反应恢复到基线水平时再加入相同量的组织胺液或乙酰胆碱液以及 BC 原液(终浓度为 6×10⁻² g/mL),记录描记肠管的收缩幅度。以 *t* 检验比较加入 BC 前后组织胺组和乙酰胆碱组肠管的收缩幅度,并与生理盐水对照组进行比较,结果见表 5。

表 5 抗组织胺及抗乙酰胆碱对豚鼠
离体回肠的收缩作用($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	加 BC 前(mm)	加 BC 后(mm)
对照组	8	0.24±0.33	0.26±0.23
组织胺组	8	5.59±1.79 ^{**}	0.34±0.32 ^{△△}
乙酰胆碱组	8	7.69±4.72 ^{**}	1.06±2.00 ^{**}

与对照组比较:^{**}*P*<0.01

与加中药前比较:^{△△}*P*<0.01

结果表明豚鼠离体回肠在加入 BC 前对组织胺及乙酰胆碱的收缩幅度显著大于对照组;加入 BC 后收缩幅度显著性减小,显示 BC 有拮抗组织胺及乙酰胆碱收缩豚鼠离体回肠作用。

3 讨论

胸腺是 T 淋巴细胞分化成熟的免疫器官,含有大量的 T 细胞,它释放多种细胞因子,参与调节细胞免疫及体液免疫作用^[2,3]。

BC 使小鼠耳片重量减轻(迟发型超敏反应, DTH),使小鼠胸腺重量显著减轻,表明对细胞免疫有抑制作用。BC 明显升高小鼠溶血素值(HC₅₀),与正常对照组比较有显著性差别(*P*<0.05),与 CY 抑制作用比较有极显著性差别(*P*<0.01)。脾脏含有大量 B 细胞和浆细胞,是体内产生抗体的重要器官,BC 使小鼠脾重量及脾指数明显增加,表明它有增强体液免疫作用^[4]。BC 明显提高 CD₄ 及 CD₈ 细胞比值,尤其对 CY 作用后处于免疫抑制状态的大鼠,能使其比值恢复到正常,表明该药可能具有调节 T 淋巴细胞亚群的作用。T 淋巴细胞亚群主要包括 CD₄ 细胞(辅助性/诱导性 T 细胞,Th)及 CD₈ 细胞(抑制性/细胞毒性 T 细胞,Ts),CD₄ 细胞促进 B 细胞增殖和分化,CD₈ 细胞则抑制之,使抗体 IgE 的合成减少。CD₄ 细胞与 CD₈ 细胞比势调节保持体内细胞免疫及体液免疫动态平衡,当 CD₄ 细胞显著减少或 CD₈ 细胞异常增高时,导致 CD₄/CD₈ 比值减少或倒置,它使自身抗体增多,诱发自身免疫性疾病或免疫病理反应,诱发或加重哮喘发病进程。据文献报道^[5],当 CD₄/CD₈ 比值超过 2.0 时,机体免疫应答能力增强,当 CD₄/CD₈ 比值小于 1.0 时,机体免疫功能减弱。临床观察保肺冲剂可使哮喘病人血中 CD₄ 细胞增加或 CD₈ 细胞数量减小,使两者比值恢复正常,本实验结果与之相符。组织胺为速发型变态反应过程中由肥大细胞、嗜碱性粒细胞、肺组织等释放的过敏性介质,在哮喘病人支气管肺泡灌洗液中可检出大量上述炎性细胞以及它们释放的炎性介质^[6],它同乙酰胆碱一样均具有强大的收缩支气管平滑肌作用。本实验结果表明,BC 明显抑制组织胺及乙酰胆碱对豚鼠离体回肠的收缩作用。总之,保肺冲剂抗喘作用机制可能与抑制细胞免疫,增强体液免疫作用有关;与调节 T 淋巴细胞亚群细胞间的相互作用有关,以及与拮抗组织胺及乙酰胆碱收缩平滑肌的作用有关^[7,8]。

(下转第 539 页)

产生的最佳激素配比为:A2B2C0D2,即 2,4-D 1+6-BA 1+IBA 0.5。我们用这种配比的培养基进行验证实验,愈伤组织诱导快,且生长较好,诱导率达 100%。证明实验所得结果是正确的。

3 讨论

植物的细胞分化是一个复杂的生理生化过程。大量实验表明,植物激素和植物生长调节物质的种类、浓度,以及它们之间的组合直接影响着愈伤组织的诱导。从本实验来看,何首乌的组织培养过程中,必须要有植物激素和植物生长调节物质。如果没有,就不能诱导出愈伤组织。

实验按照正交设计进行了 2,4-D、6-BA、NAA、IBA 4 种激素 3 个水平组合的 9 次实验,每种组合均能诱导出愈伤组织。但如果得到较理想的结果,培养基中激素就必须按一定浓度进行配比,2,4-D 1+6-BA 1+IBA 0.5。对何首乌的组织培养具有一定的指导意义。我们的研究工作也说明,正交实验

设计与数据分析方法对于反映植物激素与愈伤组织诱导结果间的关系、选择最佳实验方案,都是十分有效的工具,其优越性在于能大量减少实验次数。本研究若进行全部实验,必须采用 $3^3=27$ 种配方,而正交实验只需做 9 种,节省了 3 倍工作量。由于相互间水平搭配得均衡,因此较少次数的正交实验大体能反映全部组合实验的效果。目前在植物组织培养领域中,大量研究工作限于人力、物力,只能对个别植物激素和植物生长调节物质实施部分组合实验。可以预料,若能广泛应用正交实验设计和分析,其工作效率及实验结果的正确性和可靠性将能得到较大幅度的提高。

参考文献

- 1 袁维纲,等. 中草药,1987,18(2):29
- 2 于荣敏,等. 中国药物化学,1995,5(2):131
- 3 倪宗瓚,等. 医学统计学. 北京:人民卫生出版社,1990:86

(1998-08-10 收稿)

Application of Orthogonal Design in Tissue Culture of Tuber Fleeceflower (*Polygonum multiflorum*)

Du Qin and Wang Zhenhua (Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510470)

Abstract Effects of 2,4-D, 6-BA, NAA and IBA on calli inducement of *Polygonum multiflorum* Thunb. were studied by $L_9(3^4)$ orthogonal design. The experimental results showed that the actions of 2,4-D and IBA were extremely remarkable, that of 6-BA was remarkable, while NAA was least effective. The order of their efficiencies was 2,4-D > IBA > 6-BA > NAA. The best medium for calli inducement was MS + 2,4-D, 1 mg/L + 6-BA, 1 mg/L + IBA, 0.5 mg/L.

Key words orthogonal design *Polygonum multiflorum* Thunb. tissue culture callus

(上接第 532 页)

参考文献

- 1 徐淑云,等. 药理实验方法学. 北京:人民卫生出版社,1991:1201
- 2 Bloom B R, et al. Immunol Today, 1992,13(4):131
- 3 吴昌归,等. 上海免疫学杂志,1997,17(1):34
- 4 Liu M C, et al. Am Rew Respir Dis. 1991, 144:51
- 5 Zhang Xiu-zhen, et al. CJIM, 1995, 1(3):171
- 6 潘 泽,等. 国外医学-内科学分册,1999,26(3):111
- 7 吴敏毓,等. 医学免疫学. 合肥:中国科学技术大学出版社,1993:96
- 8 平奎云,等. 中国免疫学杂志,1997,13(1):61

(1999-03-02 收稿)