

kg[°] d,全身各主要组织未见病理改变,血液指标也无明显变化^[11]。本实验应用行为畸胎学方法对豆腐果苷进行神经行为毒性效应评价,结果表明: Wis-tar大鼠在妊娠第 6~ 15天给予人日用剂量及其 10倍、50 倍的豆腐果苷 ig 后,未出现母体毒性;仔代大鼠出生后体重增长、早期生理发育和神经行为发育指标 3 个剂量组与对照组相比均无显著性差异,仔鼠操作行为测试也未出现学习记忆的障碍:无论是 DRH 与 DRL 的成绩,还是明暗分辨成绩,各剂量组和对照组之间的成绩均无显著性差异;各剂量组仔鼠的脑重、脑组织切片、脑组织单胺类神经递质的含量与对照组相比差异无显著性。

研究表明,大鼠妊娠期给予大剂量豆腐果苷未观察到对仔代的神经行为致畸效应和脑组织学效应,与其它镇静安眠类药物相比,豆腐果苷具有天然低毒、应用比较安全的优点。

致谢:本研究得到舒晔教授、刘汉钧教授、黄翠仙老师、刘兴良和甘献文先生的帮助。

参考文献:

[1] 汤甫琴,伍绪忠,向义安,等. 神衰果素片治疗神经衰弱症候群

的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(3): 170-171.

[2] Henck J W, Frahm D T, Anderson J A. Validation of automated behavioral test systems [J]. Neurotoxicol Teratol 1996, 18(2): 189-197.

[3] Caginao R, De Salvia M A, Perischella M, *et al.* Behavioural changes in the offspring of rats exposed to diazepam during gestation [J]. Eur J Pharmacol, 1990, 177(1-2): 67-74.

[4] Jaiswal A K, Bhattacharya S K. Effects of gestational under-nutrition, stress and diazepam treatment on spatial discrimination learning and retention in young rats [J]. Indian J Exp Biol, 1993, 31(4): 353-359.

[5] Laegreid L, Hagberg G, Lunderg A. Neurodevelopment in late infancy after prenatal exposure to benzodiazepines—aprospective study [J]. Neuropediatrics, 1992, 23(2): 60-67.

[6] 匡培根,周新富,徐波. 脑组织中单胺类神经递质的提取和荧光分光光度测定法 [J]. 中国人民解放军军医进修学院学报, 1982, 3(2): 315-319.

[7] 张铤,刘毓谷. 毒理学 [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997.

[8] Niesink R J M, Jaspers R M A, Kornet L M W, *et al.* Introduction to neurobehavioral toxicology: food and environment [M]. Boca, Raton, London, New York, Washington, DC CRC press, 1999.

[9] Cho D, Lyu H, Lee H, *et al.* Behavioral teratogenicity of methamphetamine [J]. Toxicol Sci, 1991, 16(Suppl): 37-49.

[10] Mari J C. Effects on offspring of chronic maternal MA exposure [J]. Dev Psychobiol, 1975, 8: 397-404.

[11] 沙静姝,毛洪奎. 豆腐果苷 (昆明神衰果素) [J]. 药学通报, 1987, 22(1): 27-27.

喘宁软胶囊对嗜酸性粒细胞和肥大细胞的抑制作用

金赛红¹, 谢强敏¹, 沈文会¹, 陈季强¹, 赵余庆², 徐有信^{2*}

(1. 浙江大学医学院呼吸药物研究重点实验室, 浙江 杭州 310031; 2. 沈阳东宇天然药物研究院, 辽宁 沈阳 110015)

摘要: 目的 初步探讨喘宁软胶囊的平喘作用机制。方法 采用整体试验观察致敏小鼠抗原攻击后肺灌洗液和周围血中的嗜酸性粒细胞聚集反应, 采用离体试验观察致敏大鼠抗原攻击后腹腔肥大细胞脱颗粒反应。结果 喘宁软胶囊 2, 4, 8 g/kg 和对照药地塞米松 2 mg/kg ig 给药显著减少肺灌洗液和周围血中嗜酸性粒细胞的浸润。喘宁软胶囊 33. 3, 66. 7 mg/L 和对照药酮替芬 0. 333 mg/L 明显抑制致敏大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒反应。结论 初步证明喘宁软胶囊的平喘作用可能与其抑制嗜酸性粒细胞浸润和稳定肥大细胞膜有关。

关键词: 喘宁软胶囊; 酮替芬; 地塞米松; 嗜酸性粒细胞; 肥大细胞

中图分类号: R286. 43 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2002)03- 0242- 03

Inhibitory effect of CHUANNING SOFT CAPSULE^{*} on eosinophils and mast cells

JIN Sai-hong¹, XIE Qiang-min¹, SHEN Wen-hui¹, CHEN Ji-qiang¹, ZHAO Yu-qing², XU You-xin²

(1. Key Laboratory of Respiratory Drugs Research, Medical College, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310031, China;

2. Shenyang Dongyu Institute of Natural Drug, Shenyang Liaoning 110015, China)

Abstract Object To explore the antiasthma mechanism of CHUANNING SOFT CAPSULE (CNSC). **Methods** The eosinophils accumulation in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood in the ovalbumin-sensitized mice after challenged with antigen *in vivo* was examined and the granula-

* 收稿日期: 2001-08-10

基金项目: 国家重点科技(攻关)项目 (96-901-05-213)

作者简介: 金赛红 (1965-), 女, 浙江籍, 杭州师范学院医学院讲师。1988年在浙江中医学院获学士学位, 目前在浙江大学医学院攻读药理学硕士学位。Tel and Fax: 0571-87217380 E-mail: xieqm@ zju. edu. cn

tion of the peritoneal mast cells in the ovalbumin-sensitized rats after challenge of antigen *in vitro* was observed. **Results** CNSC 2, 4, 8 g/kg (ig) and dexamethasone 2 mg/kg (ig) significantly reduced the eosinophils infiltration in BALF and peripheral blood. CNSC 33.3, 66.7 mg/L and ketotifen 0.333 mg/L significantly inhibited granulation of mast cells. **Conclusion** The antiasthma mechanism of CNSC probably correlates with suppressing eosinophils infiltration in lung and stabilizing mast cell membranes.

Key words CHU ANNING SOFT CAPSULE (CNSC); ketotifen; dexamethasone; eosinophils; mast cells

* CHU ANNING SOFT CAPSULE is composed of insatiable fatty acid, such as oleic acid, suboleic acid, and linenic acid. It has the function of antiasthma.

喘宁软胶囊主要含油酸、亚油酸、亚麻酸等不饱和脂肪酸类成分。许多实验已证明亚麻酸等不饱和脂肪酸对过敏反应及炎症有抑制作用^[1]。为初步探讨喘宁软胶囊的平喘作用机制,我们观察了该药对小鼠嗜酸性细胞聚集反应和大鼠肥大细胞脱颗粒反应的影响。

1 材料与方法

1.1 动物:昆明种小鼠,普通级,雌雄各半,体重 20~28 g,由浙江省药品检验所实验动物中心提供,合格证号:医动字第 22-9601017 SD 大鼠,清洁级,雄性,体重 180~200 g,浙江大学医学院实验动物中心提供,合格证号:医动字第 22-9601018

1.2 药品与试剂:喘宁软胶囊由沈阳东宇天然药物研究院提供,呈油状,应用时以 1% 吐温-80 配制成适当浓度备用;卵白蛋白 Ovalbumin (OA, V 级)为 Sigma 公司产品;富马酸酮替芬为上海第十六制药厂产品。肝素钠注射液为徐州万邦生化制药有限公司产品。地塞米松磷酸钠注射液为江苏高邮市制药厂产品。

1.3 仪器:日本 Olympus BX 51 显微镜;德国 Eppendorf 5804R 冷冻离心机;德国 PARI (Master) 雾化器;Sigma Stat 统计软件。

1.4 分组与造模:将 78 只昆明种小鼠随机分 6 组,即对照组、模型组、喘宁软胶囊 2, 4, 8 g/kg 组、地塞米松 2 mg/kg 阳性对照组。用 0.2% OA (10% 氢氧化铝凝胶为佐剂) 每只小鼠 1 mg 脚掌 sc 致敏。从第 2 天开始,各组分别每天 1 次等容 ig, 共 ig 22 d,从第 15 天开始,对照组除外,每天用 1% OA 密闭钟罩下雾化 30 min,到第 22 天。

1.5 肺灌洗液 (BALF) 和周围血中嗜酸性粒细胞测定^[2]:末次 ig 1 h 后,尾静脉取周围血,涂片, Wright-Giemsa 染色,高倍镜下白细胞分类计数。用 25% 乌拉坦 1 mL/kg 麻醉小鼠,分离气管,气管插管,用注射器吸取 1 mL 含 5 U/mL 肝素钠的 Hanks 液注入气道,来回灌洗 2 次,回收率为 80% 以

上。用计数板计数白细胞数目,其余 BALF 在 1 500 r/min 离心 10 min,弃去上清液,取沉淀部分涂片,用嗜酸性粒细胞特殊染色法染色^[3],在显微镜油镜下分类计数 200 个细胞,嗜酸性粒细胞呈伊红色,其余部分按单核淋巴细胞计数 (中性粒细胞极少,忽略不计)。

1.6 腹腔肥大细胞脱颗粒测定^[4]:用 2% OA (10% 氢氧化铝凝胶为佐剂) 每只大鼠 1 mg 脚掌 sc 致敏,3 周后股动脉放血处死大鼠,ip Hanks 液 10 mL,轻揉腹部 1 min,剖腹收集腹腔内的液体,置 10 mL 塑料试管内,室温 1 200 r/min 离心 10 min,去上清液,加适量 Hanks 液悬浮细胞,分装于 1.0 mL 塑料试管内,每管 0.2 mL,随即分 6 组,对照组和模型组分别加 0.4 和 0.2 mL Hanks 液,酮替芬组和喘宁软胶囊组分别加 1.0 mg/L 酮替芬溶液和 0.08, 0.1, 0.2 g/L 喘宁软胶囊 0.2 mL。37℃ 水浴孵育 5 min,对照组除外,其余各组加 0.01 g/L OA 0.2 mL 抗原攻击,37℃ 水浴孵育 10 min,取出置于冰浴中。肥大细胞脱颗粒计数:将中性红染色液滴于载玻片上,待玻片干燥,分别取各管细胞悬液 2~3 滴于片上,在显微镜高倍镜下观察肥大细胞脱颗粒的情况,计数 200 个细胞,计算出净脱颗粒% 和抑制%。净脱颗粒% = 模型组脱颗粒% - 对照组脱颗粒%;抑制% = [(模型组净脱颗粒% - 用药组净脱颗粒%) / 模型组净脱颗粒%] × 100%

1.7 统计学处理:所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的显著性用 *t* 检验和 Mann-Whitney Rank Sum 检验。

2 结果

2.1 喘宁软胶囊对致敏小鼠抗原攻击后 BALF 中炎症细胞的影响:如表 1 所示,模型组致敏小鼠抗原攻击后 BALF 中的白细胞总数较对照组升高 7.5 倍;分类计数中,模型组的嗜酸性粒细胞比率高于对照组 150 倍,相反淋巴单核细胞比率明显低于对照组。中性粒细胞的比率极低 (<5%),故忽略不计。喘

宁软胶囊 2, 4, 8 g /kg 呈剂量依赖抑制 BALF中白细胞总数的增加;虽然 3组均可明显减少嗜酸性粒细胞比率,增加淋巴单核细胞比率,但无明显量效关系。

表 1 喘宁软胶囊对致敏小鼠抗原攻击后 BALF 中炎症细胞的影响 (n= 13, $\bar{x}\pm s$)

组 别	剂 量 (g/kg)	白细胞总数 (K 10 ⁶ /L)	嗜酸性粒细胞 (%)	淋巴单核细胞 (%)
对照组	-	0.95± 0.27	0.4± 0.24	99.59± 0.24
模型组	-	7.5± 2.58 ^{##}	61.52± 18.72 ^{##}	38.48± 18.72 ^{##}
地塞米松	0.002	1.02± 0.48 ^{***}	23.5± 13.53 ^{***}	76.49± 13.53 ^{***}
喘宁软胶囊	2	6.96± 3.72	42.80± 23.13 [*]	57.20± 23.13 [*]
	4	4.94± 2.01 [*]	44.53± 15.45 [*]	55.47± 15.45 [*]
	8	4.54± 2.34 [*]	40.62± 22.32 [*]	59.38± 22.32 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.001$
与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{***} $P < 0.001$

2.2 喘宁软胶囊对致敏小鼠抗原攻击后周围血白细胞分类的影响:如表 2所示,模型组致敏小鼠抗原攻击后周围血嗜酸性粒细胞比对照组升高 5.38倍,中性粒细胞和淋巴单核细胞无明显影响。喘宁软胶囊 2, 4, 8 g /kg 和地塞米松 2 mg /kg 均能明显抑制周围血嗜酸性粒细胞升高反应。

表 2 喘宁软胶囊对致敏小鼠抗原攻击后周围血白细胞分类的影响 (n= 13, $\bar{x}\pm s$)

组 别	剂 量 (g/kg)	嗜酸性粒细胞 (%)	中性粒细胞 (%)	淋巴单核细胞 (%)
对照组	-	0.50± 0.21	15.10± 9.24	84.40± 11.52
模型组	-	2.69± 2.59 [*]	23.46± 19.05	73.78± 19.53
地塞米松	0.002	0.29± 0.63 [*]	26.92± 18.87	72.79± 18.96
喘宁软胶囊	2	0.62± 0.87 [*]	35.82± 12.36	63.74± 12.30
	4	0.33± 0.66 [*]	29.93± 13.36	67.75± 13.33
	8	0.45± 0.51 [*]	30.69± 13.68	68.69± 13.56

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$
与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

2.3 喘宁软胶囊对致敏大鼠抗原攻击后腹腔肥大细胞脱颗粒的影响:如表 3所示,致敏大鼠腹腔肥大细胞无抗原攻击时脱颗粒数目仅占 13.80%,抗原攻击后脱颗粒数目明显增加到 52.71% 喘宁软胶囊 33.3, 66.7 mg /L和酮替芬 0.333 mg /L明显抑制肥大细胞脱颗粒反应。

3 讨论

众所周知,肥大细胞、嗜酸性粒细胞是支气管哮喘发病的主要效应细胞,在哮喘慢性气道炎症的病理变化中起重要作用。哮喘的主要表现为肥大细胞

表 3 喘宁软胶囊对致敏大鼠抗原攻击后腹腔肥大细胞颗粒的影响 (n= 6, $\bar{x}\pm s$)

组 别	剂 量 (mg/L)	脱颗粒肥大细胞 (%)	净脱颗粒 (%)	抑制 (%)
对照组	-	13.80± 7.38		
模型组	-	52.71± 3.36 [#]	38.91	
酮替芬	0.333	25.54± 3.69 [*]	11.74	69.82
喘宁软胶囊	26.7	38.53± 20.37	24.73	36.44
	33.3	36.32± 6.21 [*]	22.52	42.12
	66.7	33.51± 4.02 [*]	19.71	49.34

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$
与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

脱颗粒反应和嗜酸性粒细胞炎症浸润。肥大细胞作为始动效应细胞,在抗原刺激下发生脱颗粒反应,释放炎症介质(组胺、白三烯、过氧化物酶等),引起平滑肌收缩,粘液分泌亢进,血管通透性增加,慢性炎症反应及气道高反应性。大量的研究表明,哮喘患者肺灌洗液和周围血中嗜酸性粒细胞数量增加,嗜酸性粒细胞能分泌具有神经和细胞毒性的蛋白颗粒,主要包括主碱基蛋白(MBP)、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)、嗜酸性粒细胞神毒素(EDN)和嗜酸性粒细胞过氧化物酶(EPO),能直接损伤气道上皮,导致气管炎症和气道高反应性^[5]。本研究选择动物哮喘模型的迟发相模型——致敏小鼠抗原攻击后嗜酸性粒细胞浸润反应观察喘宁软胶囊的抗过敏性炎症反应,选择致敏大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒反应模型观察喘宁软胶囊对哮喘速发相的抑制作用。结果表明喘宁软胶囊能明显抑制肺灌洗液和周围血中炎症细胞(特别是嗜酸性粒细胞)的聚集反应和致敏大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒反应。因此我们初步证明喘宁软胶囊的平喘作用可能与其抑制嗜酸性粒细胞浸润和稳定肥大细胞膜有关。

参考文献:

[1] 王淑丽,陈济民. 苏子油与 α -亚麻酸 [J]. 沈阳药科大学学报, 1995, 12(3): 228-233.
[2] 谢强敏,王 砚,卞如濂. 豚鼠肺过敏性炎症模型及药物对其影响 [J]. 中国药理学通讯, 1995, 12(3): 65.
[3] 叶世泰. 变态反应学 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
[4] 徐叔云,卞如濂. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
[5] Gerald J, Cleich M D, Rochester Ninn. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation [J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(4): 651-662.