

表 2 松节藻醇提取物对正常小鼠血清中 SOD、GSH-Px 活性与 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of ethanol extract from *R. confervoides* on activities of SOD and GSH-Px, and level of MDA in serum of normal mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	SOD/ (U · mL ⁻¹)	GSH-Px/ (U · mL ⁻¹)	MDA/ (nmol · mL ⁻¹)
对照	-	178.88 ± 5.17	190.19 ± 17.38	12.520 ± 1.203
松节藻醇提取物	25	240.18 ± 22.16	241.05 ± 16.04	5.027 ± 1.331*
	50	250.50 ± 16.89*	252.08 ± 17.19	9.583 ± 1.134
	100	234.75 ± 18.77	215.62 ± 24.51	11.686 ± 0.895

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

H₂O₂ 诱导的小鼠淋巴细胞 DNA 损伤,同时提高小鼠体内的 SOD 和 GSH-Px 活性,降低血清中脂质过氧化终产物 MDA 的量,减轻活性氧自由基对机体的攻击,具有一定的抗氧化应用前景。

参考文献:

[1] Fan X, Xu N J, Shi J G Bromophenols from the red alga *Rhodomela confervoides* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 455-458.

[2] Pederson Marianne. Bromochlorophenols and a brominated diphenylmethane in red algae [J]. *Phytochemistry*, 1978, 17 (2): 291-293.

[3] 史大永, 韩丽君, 贺娟, 等. 松节藻抗肿瘤活性 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 229-233.

[4] 王小红, 江洪. 单细胞凝胶电泳技术的研究进展及其应用 [J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2001, 22(1): 5-7.

[5] 陈玮琳, 何继亮. 快速敏感检测 DNA 断裂的方法-彗星实验 [J]. 国外医学: 卫生学分册, 1998, 5(2): 101-104.

[6] 马爱国, 韩秀霞, 刘四朝, 等. 两种 DNA 断裂损伤检测方法敏感性的比较 [J]. 遗传, 1997, 19(1): 32-34.

[7] 袁守军, 韩锐. 单细胞 DNA 损伤的微凝胶彗星电泳检测法 [J]. 中国药理学通报, 1998, 14(1): 86-87.

[8] 李益新, 方允中. 超氧化物歧化酶活力测定的新方法-化学发光法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1983, 2: 95-97.

[9] 夏奕明, 朱莲珍, 江景观. 用硫代巴妥酸法测定脂质过氧化物条件的探讨 [J]. 铁道劳动卫生通讯, 1987, 40: 47.

[10] Bagchi D, Garg A, Krohn R, et al. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice [J]. *Gen Pharmacol*, 1998, 30: 771-776.

佛手挥发油对支气管哮喘小鼠外周血、肺泡灌洗液及肺组织中嗜酸性粒细胞的影响

施长春¹, 王建英¹, 朱婉萍², 黄伟华², 施金俏¹, 薛洪燕¹

(1. 浙江省金华市人民医院, 浙江 金华 321000; 2. 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310009)

摘要:目的 观察支气管哮喘模型小鼠外周血、支气管肺泡灌洗液 (BALF) 及肺组织中嗜酸性粒细胞 (EOS) 的改变以及佛手挥发油对以上指标的影响。方法 C₅₇ 小鼠以卵白蛋白 (OVA) 致敏造成哮喘模型, 分为模型组, 对照药物组, 佛手挥发油高、中、低 3 个剂量组, 另外 10 只为健康对照组。分别检测各组小鼠外周血、BALF 中 EOS 的水平并观察肺组织病理切片中 EOS 的浸润情况。结果 模型组外周血、BALF 与对照组比较, EOS 均明显增加 ($P < 0.01$); 肺组织病理切片显示支气管及血管周围大量 EOS 浸润。各佛手挥发油组与模型组相比外周血 BALF 中 EOS 均有不同程度下降, 高剂量组差异尤为显著 ($P < 0.01$)。各组肺组织病理切片中 EOS 浸润较模型组减少, 剂量越大此作用越明显。结论 佛手挥发油可抑制哮喘小鼠外周血、BALF 中 EOS 水平, 减少肺组织 EOS 浸润, 拮抗气道炎症而发挥平喘作用, 作用强度与剂量有关。

关键词: 佛手挥发油; 哮喘; 外周血; 支气管肺泡灌洗液 (BALF); 嗜酸性粒细胞 (EOS)

中图分类号: R286.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)01-0099-03

近年来,对支气管哮喘的研究取得了重大进展,哮喘的本质是气道反应性增高为特点的慢性炎症疾病,其治疗以抗炎平喘为主^[1]。佛手具有舒肝理气、宽胸化痰等功效,在临床上普遍用于支气管炎和支气管哮喘的治疗,具有较好的疗效。挥发油是佛手

所含的主要成分,佛手挥发油及醇提液具有抗炎、平喘、祛痰等作用^[2]。本研究旨在利用 C₅₇ 小鼠哮喘模型,观察佛手挥发油对致敏 C₅₇ 小鼠外周血、肺泡灌洗液 (BALF) 及肺组织中嗜酸性粒细胞 (EOS) 的影响,探讨佛手挥发油平喘的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂:佛手挥发油[GC-MS 测定,含 D-柠檬烯 40.02%、(+)-2-萜烯 21.35%]的提取方法见文献方法^[3],以无水乙醇-佛手挥发油-纯化水-聚山梨酯 80 按 1:1:2.8:0.2 配成佛手挥发油乳液;桂龙咳喘宁胶囊由山西桂龙医药有限公司提供,批号 20020603。卵白蛋白(ovalbumin, OVA)由 Sigma 公司提供,批号 052K1275;佐剂液态铝由 Pierce 公司提供,批号 FG70976A。

1.2 动物及分组:60 只 C₅₇BL/6 小鼠,6~8 周,体重 18~22 g,雄性,由浙江省中医药研究院实验动物中心提供,许可证号 SYXK(浙)2004-0034。随机分为 6 组,每组 10 只。其中 1 组设为生理盐水(NS)刺激健康小鼠对照组,另外 5 组以 OVA 致敏造成哮喘模型。5 组哮喘模型小鼠分为无干预模型组、对照药物组(以桂龙咳喘宁胶囊干预,0.58 g/kg),佛手挥发油高、中、低剂量(1.753、0.877、0.175 g/kg)组。

1.3 方法

1.3.1 致敏液的配制:称取 20 mg OVA 加入 1 mL 生理盐水中,充分溶解后,取出 0.4 mL 加入 9.6 mL 生理盐水中,混匀,取该液与等体积的佐剂液态铝混合,4℃ 放置 30 min 后使用。

1.3.2 致敏:5 个致敏组于实验第 0 天与第 14 天每只小鼠分别 ip 上述致敏液 0.2 mL,对照组 ip 等体积的生理盐水。

1.3.3 药物干预:实验第 17 天对照药物组 ig 桂龙咳喘宁胶囊 0.58 g/kg,佛手挥发油高、中、低剂量组分别 ig 20% 佛手挥发油 0.773、0.309、0.154 mL/kg,每日 1 次,均给药 10 d。模型组和对照组不用任何药物干预。

1.3.4 激发:实验第 24、25、26 天,将小鼠置于一密闭容器中,以 1% OVA 溶液 10 mL 雾化吸入,每天 1 次。

1.3.5 标本采集及检测:于最后 1 次抗原激发后 48 h(实验第 28 天),将小鼠处死,收集外周血及 BALF 标本。在显微镜下由专人进行白细胞计数。以瑞氏液染色,分别计数其中的 EOS 及其他白细胞分类。切取左肺叶小片组织制成石蜡切片,以 HE 染色,镜检观察支气管周围及肺组织细胞变化。

1.3.6 统计学处理:数据采用 SPSS 10.0 软件进行统计,所得结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对各组数据先进行正态检验和方差分析,若符合正态分布和方差齐性,则进行单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法;若

不符合方差齐性的要求,则采用秩和检验,多重比较用 Mann-Whitney 法。

2 结果

2.1 对哮喘小鼠外周血白细胞总数及 EOS 的影响:结果见表 1。模型组与对照组比较,外周血白细胞数有显著增高,EOS 也明显增加($P < 0.01$)。用不同剂量佛手挥发油干预后外周血白细胞数和 EOS 均较模型组有所下降。此作用与对照药物相当。

表 1 佛手挥发油对哮喘小鼠外周血及 BALF 中的细胞总数和 EOS 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of volatile oil from Fructus Citri on WBC and EOS in peripheral blood and BALF of asthma mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	外周血		BALF	
		WBC/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	EOS/ ($\times 10^4 \cdot mL^{-1}$)	WBC/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	EOS/ ($\times 10^4 \cdot mL^{-1}$)
对照	-	2.59 ± 0.80	0.50 ± 0.84	1.41 ± 0.77	0.30 ± 0.52
模型	-	4.71 ± 1.50 [#]	2.57 ± 0.98 [#]	15.06 ± 5.64 [#]	10.29 ± 6.75 [#]
桂龙咳喘宁	0.58	3.33 ± 0.23 ^{**}	0.83 ± 0.98 ^{**}	14.20 ± 8.91 ^{**}	5.50 ± 8.53 ^{**}
佛手挥发油	1.753	3.17 ± 0.79 ^{**}	1.33 ± 0.82 [*]	8.84 ± 3.91 [*]	1.00 ± 1.26 ^{**}
	0.877	3.28 ± 0.40 ^{**}	1.17 ± 1.17 [*]	16.60 ± 13.55	1.50 ± 1.76 [*]
	0.175	3.20 ± 0.70 ^{**}	1.14 ± 0.69 ^{**}	10.71 ± 7.83	4.14 ± 4.06

与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

2.2 对哮喘小鼠 BALF 中细胞总数及 EOS 的影响:结果见表 1。模型组与对照组比较,BALF 中白细胞数也有显著增高,EOS 也明显增加($P < 0.01$)。用不同剂量佛手挥发油干预后高剂量组 BALF 白细胞数、高中剂量组 BALF 中 EOS 较模型组有所下降。而对照药物组及佛手挥发油低剂量组与模型组相比无明显下降。

2.3 对哮喘小鼠肺组织 EOS 浸润的影响:肺组织病理切片显示对照组支气管及血管周围无炎症细胞浸润,未见 EOS,上皮完整,平滑肌层均匀;模型组支气管及血管周围大量炎症细胞浸润,EOS 多见,局部上皮不完整,平滑肌增厚明显。佛手挥发油干预后支气管及血管周围炎症细胞浸润较模型组减少,EOS 减少,局部上皮细胞破坏情况减轻,平滑肌增厚不明显。以上改变随佛手挥发油剂量的加大而好转。结果见图 1。

3 讨论

哮喘是一种气道慢性变应炎症性疾病,EOS、肥大细胞及 T 淋巴细胞等多种炎症细胞参与气道慢

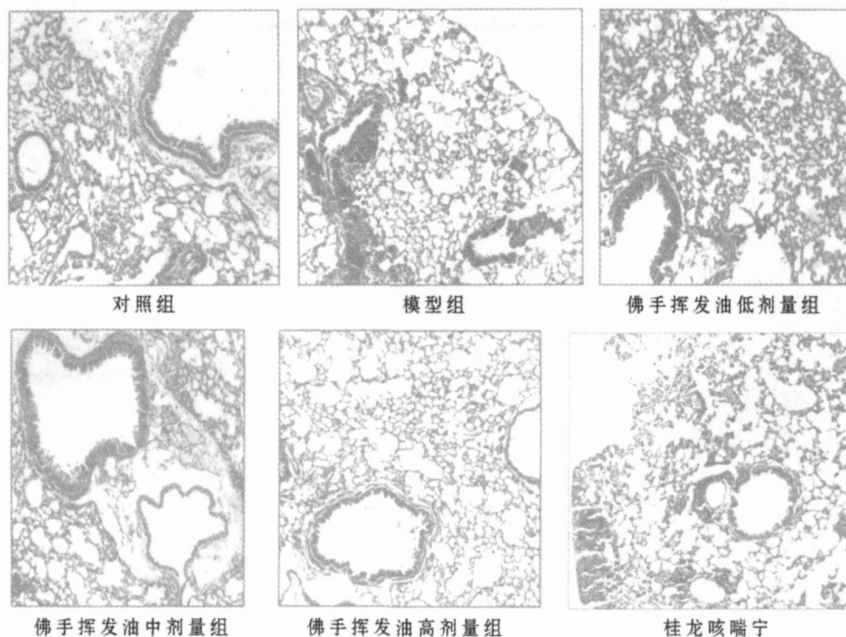


图 1 佛手挥发油对哮喘小鼠肺组织 EOS 的影响

Fig. 1 Effect of volatile oil from Fructus Citri on EOS in lung tissue of asthma mice

性炎症的发生。糖皮质激素及支气管平滑肌解痉药(平喘药)由于能抑制气道慢性炎症,降低气道高反应性,可缓解哮喘的急性发作,被认为是目前治疗哮喘最有效的药物。然而应用糖皮质激素和平喘药副作用较多,使病人难以长期坚持用药^[4]。因此,寻求安全有效和依从性较好的既有抗炎又有平喘、祛痰、止咳等作用的支气管哮喘治疗药物成了国内外哮喘研究领域的热门课题。

佛手原产于佛教之国印度,后传入我国种植。根据种植地的不同有广东的广佛手、福建的建佛手、四川的川佛手和浙江金华的金佛手之分。本实验所用的金佛手,据《本草纲目》记载:“香味浓郁,味辛、苦、酸,归肝脾经”,具有理气止痛、宽胸化痰、和胃止呕等功效。现代药学研究发现佛手含有挥发油、多糖类、黄酮类、香豆素类等物质,其中挥发油是佛手所含的主要药效成分^[2]。本课题组曾对金佛手挥发油的化学成分进行过气相色谱-质谱分析,发现主要为 D-柠檬烯和萜烯,质量分数分别达到 40.02% 和 21.35%^[5]。还发现佛手挥发油在动物实验中具有对抗二甲苯和甲醛所致炎症的作用^[3]。国内学者曾报道佛手醇提物能减少氨水所致小鼠咳嗽次数,增

加小鼠呼吸道酚红分泌量,延长吸入组胺所致豚鼠哮喘的潜伏期限,具有明显的镇咳、祛痰、平喘等作用^[2]。通过本实验研究,发现经过佛手挥发油的干预,支气管哮喘小鼠外周血、BALF 中白细胞总数和 EOS 均较哮喘模型组下降,以高剂量干预组差异尤为显著。小鼠肺组织切片病理学检查也发现哮喘小鼠支气管、血管周围有大量炎症细胞、EOS 浸润,而经高剂量佛手挥发油干预后炎症细胞和 EOS 浸润均较模型组减少。提示佛手挥发油可抑制哮喘小鼠外周血、BALF 中 EOS 水平,减少支气管周围 EOS 浸润,通过拮抗气道变应性炎症而发挥平喘作用,作用强度与剂量有关。

参考文献:

- [1] Barnes PJ. New therapies for asthma [J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(11): 515-520.
- [2] 梁永枢,许楚纬,段启. 佛手研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2006, 8(5): 24-27.
- [3] 王建英,施长春,朱婉萍,等. 金华佛手挥发油抗炎及急性毒性的实验研究 [J]. *现代中药研究与实践*, 2004, 18(2): 46-48.
- [4] Vignola A M, Chanez P, Bonsignore G, et al. Structural consequences of airway inflammation in asthma [J]. *Allerg Clin Immunol*, 2000, 105: 514-517.
- [5] 施长春,王建英,朱婉萍,等. 金佛佛手挥发油化学成分的 GC-MS 分析 [J]. *药实践杂志*, 2004, 22(4): 209-210.