

3 讨论

银杏叶片每片含总黄酮 19.2 mg, 黄酮具有扩张血管、降低胆固醇、解除平滑肌痉挛和松弛支气管等作用^[1]。实验表明, 银杏叶显著降低狗的心肌耗氧量, 显著降低狗的血压, 对狗心率无影响^[2]。银杏叶提取成分具有降低血清胆固醇作用, 对原发性高血压有一定的降血压作用。综上所述, 银杏叶片治疗冠心病的作用机制可能是扩张血管作用, 增加心肌供血; 使血液黏滞性减低, 血流加速, 使脑和心机的供血增加, 降低心肌耗氧量, 增加心机的耐缺氧能力; 逐渐地使心肌缺血性损害——缺血性的 ST-T 改变得到明显好转或完全恢复正常。

银杏叶治疗冠心病, 对患者的胸痛、胸闷、心悸、气急、头晕等症的总有效率高。银杏叶片对冠心病者心电图 ST-T 改善的总有效率也较复方丹参滴丸高。提示银杏叶片对减轻或消除冠心病患者的胸痛、胸闷、气急等症有很好效果, 对抬高或恢复心电图压低的 ST 段和/或倒置的 T 波有显著的疗效。本研究结果同时表明, 银杏叶片使血清 TC、LDL-C 下降, 使 HDL-C 升高。TC 和 TG 的降低及

HDL-C 的水平提高, 可使动脉粥样硬化的斑块减少和显著地降低心血管病的发病危险率和病死率^[3]。银杏叶片治疗后, 未见其他不良反应。

银杏叶片是一种治疗冠心病心绞痛的新药, 对减轻或消除冠心病的胸痛、胸闷、气急、头晕等症状疗效 > 95%, 是当前纠正缺血性 T 波改变较为理想的药物之一。对冠心病并发高脂血症患者具有降低 TC、升高 HDL-C 的作用, 低毒或无毒、不良反应少, 使用方便, 安全可靠。当前冠心病心绞痛的治疗主要以冠脉内支架植入为主, 银杏叶片活血化瘀, 降低心脏氧耗和改善供血, 但在改善已有冠脉狭窄方面有待进一步研究。银杏叶片可以作为一种辅助治疗药物, 值得临床推广使用。

参考文献:

- [1] 朱 福, 王美华. 植物黄酮类药物在心血管病中的应用 [J]. 心血管病学进展, 2001, 22(5): 195-197.
- [2] 张志雄, 祁小燕, 王 翔, 等. 银杏叶提取物 (ECB76) 抗心律失常的实验研究 [J]. 上海中医药杂志, 2002, 36(11): 40-42.
- [3] 徐学志. 急性心肌梗塞患者血脂水平分析 [J]. 国际医药卫生导报, 2004, 10(16): 62-66.

金耳多糖对哮喘大鼠气道炎症反应的影响

蒋剑平^{1,2}, 熊耀康^{2*}

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310007)

摘要: 目的 研究金耳多糖 (*Tremella polysaccharide*, TP) 对抗原诱导的大鼠过敏性气道炎症反应的影响。方法 用卵白蛋白 (OA) 致敏大鼠, 10 d 后开始 ig 给予 TP 0.4、0.8、1.6 g/kg, 每天 1 次, 连续 10 d; 大鼠致敏后第 15 天开始用 OA (10 g/L, 每天 1 次) 攻击, 连续 6 d, 观察第 6 次 OA 攻击 24 h 后支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症细胞的数量和支气管肺组织病理学改变情况, 测定肺组织中白细胞介素 4 (IL-4) 的量。结果 TP 能明显降低 BALF 中炎症细胞总数及嗜酸性粒细胞数, 能抑制肺组织中炎症细胞特别是嗜酸性粒细胞的浸润, 减轻组织水肿及上皮损伤等气道炎症反应; 降低哮喘大鼠肺组织中 IL-4 的量。结论 TP 对大鼠过敏性气道炎症具有抑制作用, 其作用机制与 IL-4 释放减少有关。

关键词: 金耳多糖; 哮喘; 气道炎症; 嗜酸性粒细胞

中图分类号: R286.43

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)10-1623-04

气道炎症是支气管哮喘的基本特性, 主要表现为支气管中炎症细胞增加, 细支气管和小血管周围水肿及大量嗜酸性粒细胞 (eosinophil, EOS) 渗出浸润等。金耳 *Tremella mesenterica* (Schaeff.)

Retz. ex Fr. 为银耳科银耳属真菌金耳的子实体。金耳性温中带寒, 味甘, 能化痰、止咳、定喘、调气、平肝肠, 主治肺热、痰多、感冒咳嗽、气喘等^[1], 民间多用于哮喘和气管炎的治疗。现代研究表明, 金耳多

* 收稿日期: 2009-03-20

基金项目: 国家教育部重点资助项目 (02066)

作者简介: 蒋剑平 (1977—), 男, 浙江绍兴人, 博士研究生, 从事中药活性物质的研究。

Tel/Fax: (0571) 86611022 E-mail: jiangjp77@163.com

* 通讯作者 熊耀康 Tel: (0571) 86613533 E-mail: xiongyaokang@tom.com

糖 (*Tremella polysaccharide*, TP) 具有免疫调节^[2]、调血脂^[3]、降血糖^[4]等作用,然而,国内外关于TP对气道炎症作用方面至今未见报道。本实验采用卵白蛋白致敏大鼠,ig给予TP,观察其对大鼠气道炎症的作用,并对其作用机制进行初步探讨,为进一步研究TP治疗哮喘和气管炎的机制,开发金耳的新药资源提供药理学依据。

1 材料与方法

1.1 动物:SD大鼠72只,体质量(160 ± 10)g,雌雄各半,浙江中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂:金耳药材采自浙江省缙云县,经浙江中医药大学药学院资源鉴定教研室熊耀康教授鉴定为银耳科银耳属真菌金耳的子实体;金耳多糖(多糖质量分数83%),金耳药材经水提醇沉法提取纯化制备金耳多糖溶液,由最佳喷雾干燥工艺^[5]制得金耳多糖喷干粉,临用时配成质量浓度为20、40、80g/L溶液;卵白蛋白(OA,V级,美国Sigma公司,批号122k7044);地塞米松片(DXM,浙江仙居制药有限公司,批号030844);白细胞介素-4(IL-4)酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒(Ucy Tech Biosciences,荷兰,批号020103);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器:冷冻离心机(Eppendorf Centrifuge 5804R,德国),显微镜(Olympus BX51,日本),酶标仪(BIOTEK ELX800,美国),超声雾化器(980-A型,上海医械有限公司),水平离心机(LHZ5-2型,北京医用离心机厂),控时调速式高速分散器(GF-1型,江苏麒麟医用仪器厂)。

1.4 大鼠哮喘模型的制备:参照Santing等^[6]的方法,将OA 2mg溶于氢氧化铝(自制)中,配制成0.2%OA溶液。每只大鼠两后足掌、前足掌各注射0.05mL,两后腿、两腹股沟、腰、背各sc 0.05mL,同时ip 0.5mL,每只大鼠共注射1.0mL进行致敏。对照组仅用10%氢氧化铝凝胶同法注射。致敏第15天抗原攻击,将致敏大鼠置于20cm×30cm×50cm有机玻璃密闭容器内,雾化吸入器雾化1%OA(用生理盐水配制)30min,雾量2mL/min,以激发哮喘,对照组用生理盐水代替进行攻击,连续攻击6d后供实验用。

1.5 分组、给药剂量及方式:72只大鼠,随机分成6组,每组12只,即模型组(生理盐水20mL/kg),对照组(不致敏,生理盐水20mL/kg),TP 3个剂量组(20、40、80g/L TP溶液,20mL/kg),致敏第10天均ig给药,每天1次,共10d;DXM组(0.5mg/

kg)于第11、13、15、17、19天ig给药,共5次。

1.6 样本的采集与制备:于抗原末次攻击后24h,大鼠ip 30g/L戊巴比妥(1.5mL/kg)进行麻醉,即刻打开胸腔,用丝线结扎左肺两叶,行气管插管,用5%小牛血清生理盐水溶液10mL分2次进行支气管肺泡灌洗,每次5mL,回收支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),回收率80%。取BALF 40μL,加白细胞计数液360μL,用细胞计数板计数白细胞总数。剩余BALF以1000r/min离心10min,弃去上清液,取40μL沉淀涂片,甲醇固定3min后,瑞氏-姬姆萨染色,计数200个细胞,进行白细胞分类计数。

1.7 肺组织病理切片及细胞因子IL-4测定:右肺上叶用100g/L福尔马林溶液固定后做病理切片,苏木素-伊红染色后观察肺组织炎症变化情况。右肺下叶,用生理盐水洗净后立即存放于液氮中保存,测定细胞因子IL-4时取出,加入Hanks液,低温下匀浆,在4℃以下3000r/min离心10min,取上清液按ELISA法测定IL-4量。

1.8 统计学方法:用SPSS 11.0统计实验数据,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用Student-Newman-Keuls进行检验。

2 结果

2.1 TP对哮喘大鼠肺气道内炎症细胞聚集的抑制作用:致敏大鼠气雾吸入OA 24h后,模型组BALF中白细胞总数明显增多,与对照组比较差异有显著性($P < 0.001$),说明抗原攻击致敏大鼠形成的大鼠哮喘模型成立。TP 0.8、1.6g/kg组与模型组比较, BALF中白细胞总数均显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),阳性药物DXM组BALF中白细胞总数与模型组相比也显著降低($P < 0.001$)。模型组BALF中EOS比例明显升高,与对照组比较有显著差异($P < 0.001$)。TP 0.4g/kg组BALF中EOS与模型组差异不明显($P > 0.05$),TP 0.8、1.6g/kg组及DXM组EOS比例明显低于模型组($P < 0.01$ 、 0.001),结果见表1。

2.2 TP对哮喘大鼠肺气道炎症细胞浸润的抑制作用:高倍镜下观察到对照组大鼠肺部正常,而模型组大鼠肺部可见明显过敏性炎症,细支气管和小血管的管壁增厚、炎症细胞浸润、EOS数量明显增多、气道上皮损伤、周围组织疏松水肿。DXM组肺部基本正常,有时可见轻度炎症细胞浸润。TP 0.4g/kg组大鼠肺部炎症较为明显,但随着剂量的增加,炎症明显减轻,特别是TP 1.6g/kg组50%大鼠

表 1 TP 对 OA 致敏大鼠抗原攻击后 BALF 中炎症细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of TP on inflammatory cell in BALF of OA-sensitized rats after antigen challenge ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	白细胞总数/ (10 ⁸ ·L ⁻¹)	EOS/ %	中性粒细胞/ %	淋巴细胞/ %
对照	-	10	20±3	2.0±1.1	2.9±1.6	95.1±2.3
模型	-	12	41±9 ^{###}	33.7±8.6 ^{##}	21.9±7.5 ^{##}	44.3±5.8 ^{##}
TP	0.4	11	35±3	27.4±5.6	26.3±5.5	46.1±8.3
	0.8	11	32±4 [*]	22.9±4.6 [*]	27.7±7.1	49.3±8.9
	1.6	11	29±4 ^{**}	12.1±4.7 ^{**}	23.1±8.5	64.6±9.6 ^{**}
DXM	0.0005	10	25±5 ^{***}	4.9±3.3 ^{***}	29.2±6.5 [*]	65.8±8.1 ^{***}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$
与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$
^{###} $P < 0.001$ vs control group
^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

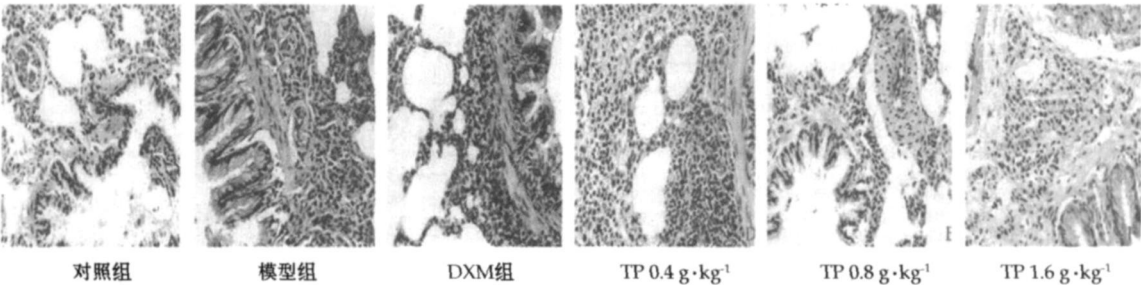


图 1 TP 对大鼠支气管肺组织炎症细胞浸润的影响 (HE 染色)

Fig. 1 Effect of TP on inflammatory cells infiltration of bronchus pulmonary tissue in rats (HE stain)

表 2 TP 对哮喘大鼠肺组织病理组织学分级评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of TP on score of pathological and histological grade in lung tissue of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	细支气管和小血管 的 EOS 增加	组织水肿	气道上皮 损伤
对照	-	7	0.3±0.2	0.1±0.1	0.1±0.2
模型	-	9	3.2±1.6 ^{##}	5.2±0.5 ^{##}	4.9±0.4 ^{##}
TP	0.4	9	2.0±0.9 ^{##}	3.3±0.4 ^{##}	3.1±0.3 ^{##}
	0.8	10	1.5±0.8 [*]	0.8±0.6 [*]	0.7±0.3 [*]
	1.6	11	0.9±0.6 ^{**}	0.6±0.6 [*]	0.5±0.5 [*]
DXM	0.0005	11	0.4±0.3 ^{**}	0.1±0.3 [*]	0.1±0.3 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

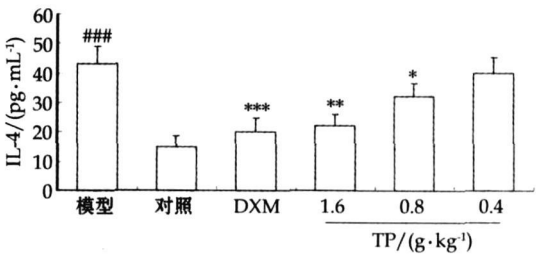
($P > 0.05$); TP 0.8、1.6 g/kg 组大鼠肺组织中的 IL-4 的质量浓度明显低于模型组 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), DXM 组肺组织中 IL-4 质量浓度与模型组相比显著降低 ($P < 0.001$), 结果见图 2。

3 讨论

目前临床治疗哮喘首选药物为免疫抑制剂糖皮质激素, 但长时间使用会发生许多不良反应。因此, 人们设法采用其他抗炎药物来替代激素治疗。中医

肺部表现正常, 其余仅见轻度炎症细胞浸润 (图 1)。根据 Underwood 等^[7]对致敏动物抗原攻击后肺组织炎症病理学分级评分标准做半定量分析, 无论是总评分, 还是单项指标, 模型组大鼠支气管肺组织病理学切片检查评分都明显高于对照组; DXM 组的评分显著低于模型组 ($P < 0.01$), TP 给药组病理学评分也随着剂量的升高而降低; 但低剂量 TP 0.4 g/kg 组与模型组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 而 TP 0.8、1.6 g/kg 组与模型组比较有显著差异 ($P < 0.01$), 结果见表 2。

2.3 TP 对大鼠肺组织 IL-4 量的影响: 与对照组比较, 模型组肺组织中 IL-4 质量浓度明显增高 ($P < 0.001$); TP 0.4 g/kg 组大鼠肺组织中 IL-4 的质量浓度与模型组比较, 有所降低, 但无显著性差异



与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$
与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$
^{###} $P < 0.001$ vs control group
^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

图 2 TP 对哮喘大鼠肺组织 IL-4 量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Effect of TP on content of IL-4 in lung tissue of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

药治疗的整体调治、扶正固本, 在治疗疑难杂症上具有独特的优势。明代李时珍《本草纲目》记载, 金耳治“癖饮积聚, 腹痛金疮”, 金耳在民间多用于治疗气管炎与哮喘。该药用资源主要分布于我国云贵高原, 从 20 世纪 80 年代开始, 我国进行了金耳野生资

源调查及驯化栽培研究。目前,在云南、浙江等地已研究成功人工规模栽培金耳的技术^[8],为深入开发利用这一珍贵资源提供了物质保证。

本实验以 OA 为抗原,以 Al(OH)₃ 凝胶为佐剂,sc 和 ip 致敏,再气雾吸入 OA 进行攻击,建立大鼠哮喘模型。结果表明:模型大鼠 BALF 中白细胞总数比正常大鼠明显增加,EOS 数量也显著提高,肺部病理学切片检查可见 EOS 浸润,与文献报道一致^[9~11],这些结果提示本实验中采用的造模方法是成功的。

临床研究表明,哮喘病人血、痰及 BALF 中 EOS 数量增加,EOS 阳离子蛋白量上升,提示 EOS 及其分泌的物质对气道组织有明显的损伤作用,与哮喘严重程度及气道高反应性密切相关。近来又观察到 EOS 无论在体内或体外都能产生促炎症细胞因子。由于 EOS 在支气管哮喘中的重要作用,采用 BALF 和肺组织病理切片组织学观察,是否能减少哮喘时 EOS 的增多及其对支气管肺组织的浸润是评价药物对过敏性哮喘支气管肺组织炎症作用的重要标志。

本实验结果表明,TP ig 给药能抑制大鼠哮喘时 BALF 中 EOS 的增多,而且呈现出剂量依赖性。支气管肺组织的病理切片的结果显示,低剂量的 TP 即可明显改善哮喘大鼠肺组织的炎症表现,虽然低剂量的 TP 的疗效比 DXM 要差,但是高剂量 TP 组大鼠支气管肺组织病理切片的效果与 DXM 的效果类似,说明 ig 给予一定剂量的 TP 确实可以改善哮喘的组织病理变化。

目前认为,代表 Th2 水平的细胞因子 IL-4 可以诱发 T 细胞增殖,使未定型 T 细胞分化为 Th2 细胞,促进 B 细胞增殖生长并诱导 B 细胞分化为浆细胞,进而产生 IgE、IgG4,参与哮喘变态反应性炎症的发生和发展^[12]。实验结果显示中、高剂量的

TP 可以明显降低肺组织中 IL-4 的量,提示 TP 可以抑制气道炎症,改善症状,可能部分通过抑制 T 淋巴细胞活化,减少细胞因子 IL-4 的释放来实现,这可能是 TP 抗哮喘大鼠气道炎症的机制之一。

综上所述,ig 给予 0.8、1.6 g/kg TP 可以减轻和抑制哮喘大鼠的气道炎症,对大鼠变态反应性哮喘模型的迟发相有明显的保护作用。

参考文献:

- [1] 刘波. 中国药用真菌 [M]. 太原: 山西人民出版社, 1978
- [2] 王金华, 薛宝云, 戴宝强, 等. 金耳发酵液多糖免疫调节作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 1997, 4(5): 282-283
- [3] 汪虹, 瞿伟菁, 褚书地, 等. 金耳菌丝体多糖对小鼠高脂血症的防治作用 [J]. 营养学报, 2002, 24(4): 431-443.
- [4] Kihō T, Morimoto H, Kobayashi T, *et al.* Effect of a polysaccharide (TAP) from the bodies of *Tremella aurantia* on glucose metabolism in mouse liver [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(2): 417-419
- [5] 吴晓宁, 熊耀康. 金耳多糖浸膏喷雾干燥工艺研究 [J]. 中国药业, 2008, 17(17): 37-38
- [6] Sating R E, Plymuder C G, Zaagsma J, *et al.* Relationships among allergen-induced early and late phase airway obstructions, bronchial hyperreactivity, and inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs [J]. *J Allerg Clin Immunol*, 1994, 93(6): 1021
- [7] Underwood S, Foster M, Raeburn D, *et al.* Time-course of antigen-induced airway inflammation in the guinea pig and its relationship to airway hyperresponsiveness [J]. *Eur Respir J*, 1995, 8(12): 2104-2113
- [8] 刘正南, 郑淑芳. 金耳的经济价值和开发利用状况 [J]. 中国食用菌, 1996, 14(1): 23-24
- [9] 陈莹, 谢强敏, 杨秋火, 等. 环孢素 A 气雾吸入对哮喘大鼠气道炎症的影响 [J]. 药理学, 2004, 39(7): 486-490
- [10] 汤慧芳, 陈季强, 谢强敏, 等. 隐孔菌多糖成分对致敏大鼠气道高反应性和炎症细胞的影响 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2003, 32(4): 287-291
- [11] 施长春, 王建英, 朱婉萍, 等. 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 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 99-101
- [12] 谢强敏, 卞如瀛, 吴康松, 等. 微卡对致敏小鼠气道炎症和 Th1/Th2 比例变化的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(8): 488-491

《药物流行病学杂志》2010 年征订启事

《药物流行病学杂志》由中国药学会主办,是此边缘学科在我国乃至亚洲第一公开发行的专业期刊。1992 年创刊,为科技部中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊,且为万方数据、中国期刊网等国内许多大型检索数据库和《国际药学文摘》收录,为医药科研、生产、经营、使用和管理等方面全面提供对药物有效性、安全性、经济性、适用性的评价信息。本刊设有“述评”“论著”“临床用药与药效评价”“药物警戒与合理用药”“药物利用与药物经济学”“综述·论坛”和“病例报道·病案分析”“资料·消息”等栏目。应广大读者、作者的要求,本刊自 2010 年起更改刊期为月刊,大 16 开,56 页。每期定价 8 元,全年 96 元。国内统一刊号: CN 42-1333/R, 邮发代号 38-187。欢迎广大读者到当地邮局订阅,漏订者可直接向编辑部补订。地址: 湖北省武汉市兰陵路 2 号药物流行病学杂志编辑部,电话: 027-82778580, 82835077。电子信箱: tg@cnjpe.org, ywlbxxz@periodicals.net.cn。网址: <http://www.cnjpe.org>, 作者在线投稿、查询网址: <http://tg.cnjpe.org>。

我们向广大作者承诺: 在您的帮助配合下,90 天内可获知稿件处理结果; 省、部级基金或重要成果的首发论文 60 天内刊登; 国家级基金首发论文 30 天内刊登。欢迎踊跃投稿。本刊已全面启用网上用户中心(<http://tg.cnjpe.org>), 读者、作者可通过该中心实现在线投稿、查询,会议注册,参加继续教育项目等,作者与编者的互动交流更方便、快捷。