

哮喘宁免疫药理研究

——抗III、IV型变态反应

浙江医学研究院药物研究所

钱伯初 陈 珏 臧星星 许衡钧 汤 蕾 范华芬

内容提要 由黄芩、丹皮、桂枝、甘草的乙醇及水提取物组成的哮喘宁,对III型变态反应模型家兔主动Arthus反应和大鼠被动Arthus反应有明显抑制作用,并能降低用卵白蛋白和弗氏完全佐剂多次免疫家兔的血清免疫复合物含量;对IV型变态反应模型小鼠DNCB接触性皮炎和小鼠SRBC足垫反应亦有显著抑制作用;对小鼠脾脏溶血空斑数和血清溶血素抗体未见影响。这些结果为哮喘宁的临床应用提供了实验依据。

哮喘宁(即原抗敏合剂)为中药黄芩、丹皮、桂枝和甘草组成的复方,临床试用证明对支气管哮喘、喘息型支气管炎有较好疗效,尤以小儿支气管哮喘疗效显著,且对组织胺所致患者的气道高反应性有明显保护作用^①。我们在1982年报道了哮喘宁的平喘作用和对I型速发型变态反应的抑制作用,并观察到能抑制过敏反应介质慢反应物质(SRS-A)的释放和拮抗它的作用^②。鉴于该组方的良好疗效,我们又观察了哮喘宁对III、IV型变态反应的作用及其对体液免疫的影响,以探讨其疗效机理。

材料与方 法

一、药物:黄芩、丹皮、桂枝、甘草(2:1.5:1.5:1)的乙醇和水提取物(哮喘宁)浸膏由宁波中药制药厂制备,用时稀释,剂量以生药g/kg计算。对照组给予等容积生理盐水。精制卵白蛋白由浙江医科大学药理研究室赠送。其它药品试剂均从市售购得。

二、动物:纯系615小鼠和NIH系小鼠,体重18~g,Wistar大鼠体重150~200g,家兔重2~3kg,均本院动物所供应。

三、家兔主动Arthus反应:按Koda等^③报道方法制备家兔主动Arthus反应模型。即将10mg卵白蛋白A溶于1ml Freund's完全佐剂内给家兔肌肉注射,周一,共4次。末次注射后10天,背部皮内注射%EA 0.2ml,共4点。测定抗原攻击后24小时内皮肤红肿反应的直径及程度,后者依红肿程度判得分数为0、1、2、3或4分,然后计算各组的均积分数。

四、大鼠被动Arthus反应:将上述经4次免疫的

家兔抗EA混合血清按0.5ml/150g体重给大鼠静脉注射,使之被动致敏,注射后30分钟,后足趾皮内注射EA0.025mg/0.1ml进行攻击,使引起Arthus反应,用容积法测量足掌肿胀程度,以抗原攻击前的足掌容积为100%,计算肿胀率^④。

五、家兔血清免疫复合物测定:按侯馨岳等^⑤报道用聚乙二醇(PEG)分光比色法测定上述家兔经4次免疫后第2、4、6、8、10天血清中循环的免疫复合物变化,被测血清经处理后在450nm测定对照管与测定管的光密度(OD)值。PEG沉淀指数(POD)=(测定管OD-对照管OD)×100。用PEG沉淀指数比较药物作用。

六、2,4-二硝基氯苯(DNCB)接触性皮炎反应:NIH小鼠背部皮下注射7%DNCB丙酮溶液0.02ml,使之致敏。10天后用1%DNCB甘油溶液0.03ml涂于右耳攻击之,左耳涂等量甘油溶液作对照,16小时后处死小鼠,沿耳廓线仔细剪下两耳,用精密扭力天平称重,求得两耳重量差,计算耳肿胀抑制率^⑥。

七、绵羊红细胞(SRBC)引起的小鼠迟发足垫反应:NIH小鼠颈部皮内注射5%SRBC 0.05ml,使之致敏,6天后右足垫皮内注射5%SRBC 0.02ml进行攻击,左足注射等量生理盐水作对照。24小时后从踝关节部位剪下两足称重,求出两足的重量差,计算足肿胀抑制率^⑦。

八、脾脏溶血空斑试验:纯系615小鼠腹腔注射用生理盐水洗涤三次,浓度为20%的SRBC 0.2ml,4天后股动脉放血处死,取脾,在冰浴上制备脾细胞悬液,经100目尼龙网过滤,调节细胞浓度为 10^6 /ml,按Jerne等报道的平皿法^⑧进行溶血空斑试验,计数

空斑形成细胞数(PFC数)。

九、血清溶血素抗体测定：用上述条件免疫的小鼠血清，按徐学瑛等报道的分光比色法⁽⁹⁾测定小鼠抗SRBC血清溶血素抗体。

结 果

一、对Arthus反应的影响

1. 对家兔主动Arthus反应：口服组(n=6)于抗原攻击前每天灌服哮喘宁20g/kg，共10天。腹腔组(n=6)则按每天2g/kg给药7天。如图1所示，肿胀和红斑等炎症反应于抗原攻击后2小时出现，于10小时达到最大。与对照组(n=8)相比，腹腔给药组的炎症反应，无论是反应直径或程度，在6小时内被明显抑制。

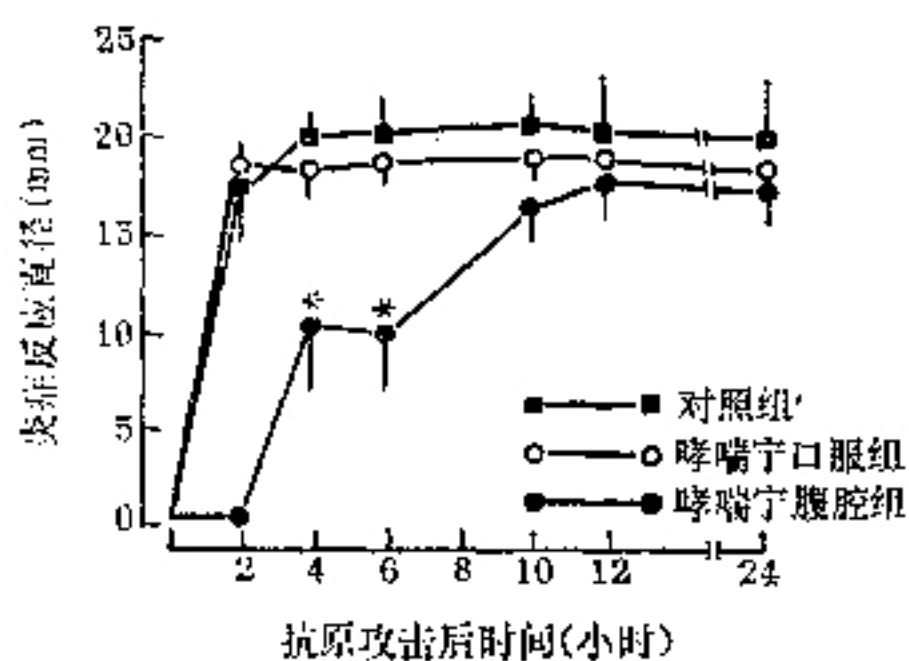
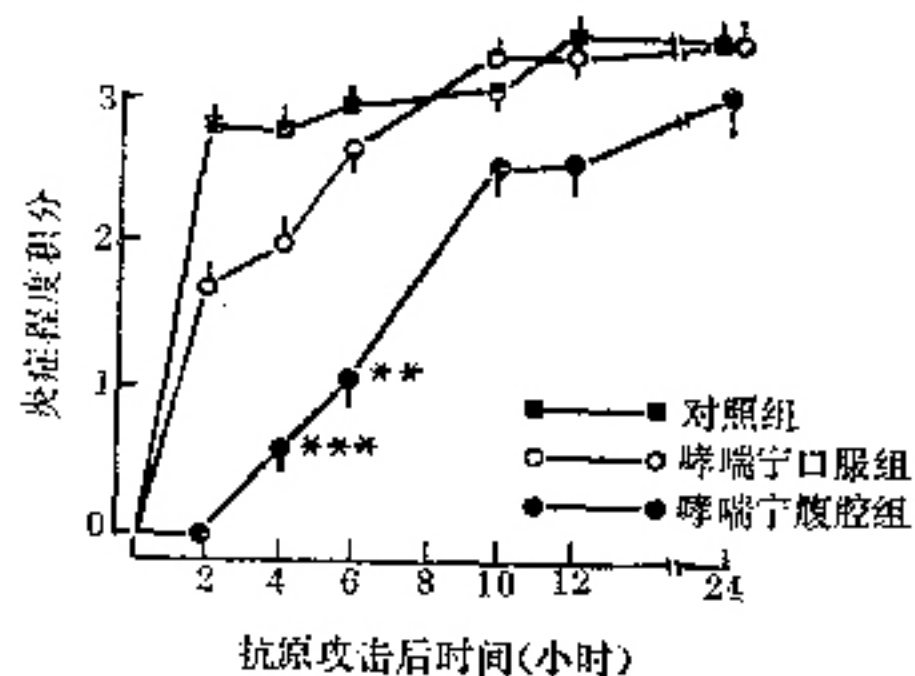


图1 哮喘宁对家兔主动Arthus反应的影响

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

2. 对大鼠被动Arthus反应：哮喘宁组于实验前每天腹腔注入哮喘宁2g/kg共10天，色甘酸钠组于攻击前30分钟腹腔给药一次0.2g/kg。结果见图2。哮喘宁组在抗原攻击后3小时内与6小时时的足肿胀率明显低于对照组，色甘酸钠组未见作用。

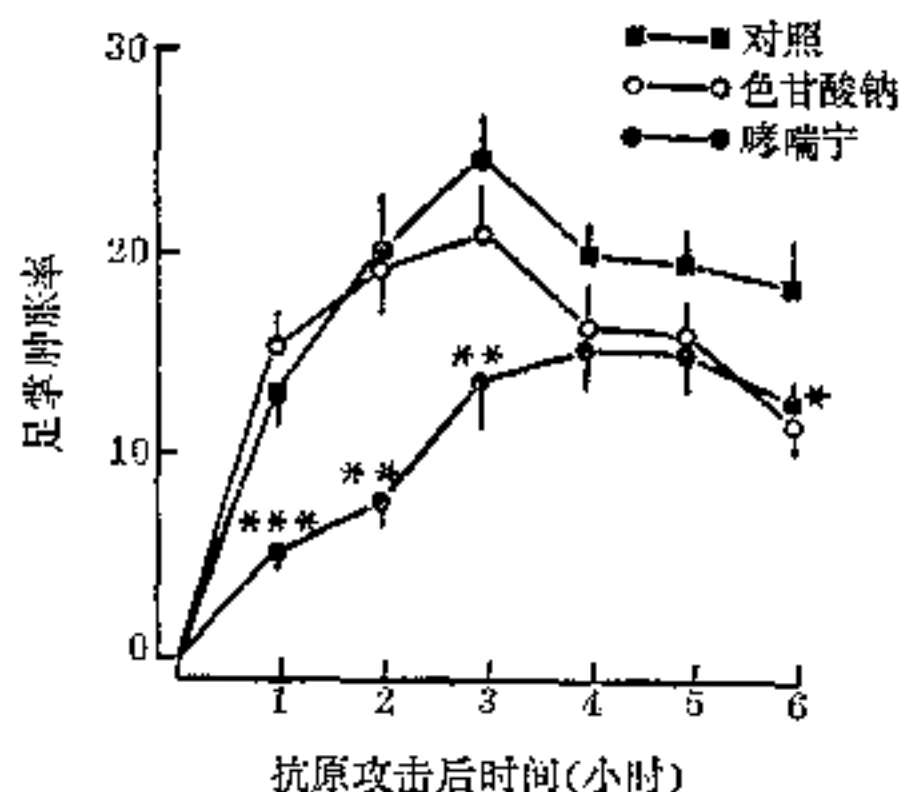


图2 哮喘宁对大鼠被动Arthus反应的影响

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 n=10

二、对家兔血清免疫复合物的影响

上述Arthus反应造型家兔末次免疫后与攻击前的用药期间，隔天取血测定免疫复合物。结果显示腹腔组给药后第3、5天及口服组给药后第6天的血清免疫复合物显著低于对照组(见表1)。

表1 哮喘宁对家兔血清免疫复合物的影响

组别	剂量(g/kg)	兔数	用药后不同天数的PEG沉淀指数(M±SD)				
			2	4	6	8	10(天)
对照	0	6	2.43 ±1.30	2.48 ±0.72	2.16 ±0.72	1.24 ±0.73	1.27 ±1.05
腹腔△	2	6	—	—	0.58 ±0.21**	0.25 ±0.18**	0.58 ±0.44
口服	20	8	2.46 ±0.45	1.82 ±0.88	1.00 ±0.76*	0.76 ±0.69	0.90 ±0.82

△用药后第3、5、7天的测定值 *P<0.05 **P<0.01

三、对细胞免疫反应的影响

1. 对DNFB细胞免疫反应：由表2可见DNFB攻击前灌服哮喘宁20天，可明显抑制DNFB引起的小鼠耳部免疫反应。

表2 哮喘宁对DNFB所致细胞免疫反应的影响

组别	剂量(g/kg)	鼠数	耳重增加(mg) (M±SD)	抑制率(%)
对照	0	10	5.43±3.89	
服药	20	10	2.13±1.94*	60.8
	40	10	1.78±1.44*	67.2

*P<0.05

2. 对SRBC细胞免疫反应：由表3可见SRBC致敏前灌服哮喘宁10天至致敏后继续服药5天，对小鼠足垫反应有明显的抑制作用。

表3 哮喘宁对SRBC所致细胞免疫反应的影响

组别	剂量 (g/kg)	鼠数	足重增加 (mg) (M±SD)	抑制率 (%)
对照	0	18	23.33±8.04	
服药	20	16	11.25±7.85**	51.8
	40	15	12.66±8.83*	45.7

*P<0.01 **P<0.001

四、对体液免疫反应的影响

1. 对小鼠脾脏抗体形成细胞的影响: 哮喘宁按每天20g/kg和40g/kg灌胃14天, 对脾脏PFC数无明显影响(表4)。

表4 哮喘宁对小鼠脾脏PFC数的影响

实验组别	剂量 (g/kg)	鼠数	PFC/10 ⁶ 细胞 (M±SD)	PFC×10 ² /全脾细胞 (M±SD)
对照	0	5	182±65	546±196
I	20	6	252±95	758±285
	服药 40	5	168±71	524±194
II	对照 0	6	576±231	1701±695
	20	5	419±79	1257±234
	服药 40	5	394±144	1180±433

2. 对小鼠血清溶血素抗体的影响: 哮喘宁按每天20g/kg和40g/kg灌胃7天或14天, 对血清抗SRBC溶血素抗体无明显影响(表5)。

表5 哮喘宁对小鼠血清溶血素抗体的影响

服药天数	组别	剂量 (g/kg)	鼠数	半数溶血值HC ₅₀ (M±SD)
7	对照	0	10	663±17
	服药	20	10	654±7
		40	10	618±77
14	对照	0	8	172±90
	服药	20	8	206±66
		40	8	138±79

讨 论

支气管哮喘为一过敏性疾病, 可分为特应性(过敏性、外源性)、感染性与混合性哮喘三型。目前认为其发病除与I型变态反应密切有关外, 还可能与II、IV变态反应有关⁽¹⁰⁾。I型反应主要参与特应性哮喘, II、IV型与感染性和混合性哮喘有关。目前已发现了较多的抗I型变态反应的中西药物⁽¹¹⁾, 而兼有抗II、IV型变态反应的药物尚不多见。我们的研究表明哮喘宁除具有平喘作用外⁽²⁾, 还具有明显的抗过敏作用。

这种抗过敏作用不仅显示对I型变态反应的抑制⁽²⁾, 进而还证实对II型变态反应家兔主动Arthus反应和大鼠被动Arthus反应有明显抑制作用, 同时显著降低了介导II型变态反应的循环免疫复合物(CIC)。II型变态反应是由于抗原抗体复合物在补体参与下, 激活激肽系统同时引起过敏反应, 进而发生血小板聚集, 导致细胞和组织受损。近来证明, 过敏性疾病如支气管哮喘有补体和免疫复合物参与发病过程, 体内CIC升高。CIC升高提示机体清除抗原的能力减弱⁽¹²⁾。因此, 哮喘宁抑制II型变态反应和降低CIC可能是其疗效机理之一。

IV型变态反应是由于被抗原致敏的T淋巴细胞再次与同一抗原接触后释放化学传递物质淋巴激活素而引起的迟发超敏反应。IV型变态反应大致可分为两个时相: (1)诱导期: 包括巨噬细胞吞噬抗原, 效应T细胞分化和增殖, 最后完成致敏; (2)效应期: 效应T细胞和抗原发生反应, 产生并释放各种淋巴激活素, 引起典型的炎症反应。以显著的巨噬细胞浸润及它们的激活为特征⁽¹³⁾。哮喘宁对于DNFB接触性皮炎或SRBC足垫反应均呈现明显的抑制作用, 表明其对IV型变态反应的抑制作用无明显的抗原特异性, 提示对不同抗原所致IV型变态反应可能均有抑制作用。然而哮喘宁究竟作用于IV型变态反应的何期则有待研究。综上所述哮喘宁对几个类型变态反应的抑制作用可能是其疗效较好的原因。

本文经溶血空斑试验和血清溶血素测定这两项特异性体液免疫试验表明哮喘宁虽经较长时间的用药, 对正常体液免疫功能并无影响, 提示哮喘宁可能较专一地抑制异常的变态反应即病理性免疫反应。有资料报道, 平喘药异丙肾上腺素和舒喘灵(Salbutamol)可抑制抗体形成⁽¹⁴⁾和体液免疫反应⁽¹⁵⁾。所以哮喘宁并不抑制正常免疫功能可能是一优点。

参 考 文 献

1. 周宏奎, 等. 中药抗敏合剂防治支气管哮喘. 中药通报 1981; 6(6): 36.
2. 陈 珏, 等. 抗敏合剂的药理研究. 中药通报 1982; 7(2): 34.
3. Koda A, et al. Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, N(3',4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5'). J Allergy Clin Immunol 1976; 57(5): 396.
4. 寺泽道夫, 他. Traxanox sodium のI—IV型アレルギー反応に対する作用——抗アレルギー薬に関する研究(第Ⅶ報). 日本薬理学杂志1982; 80(6): 417.
5. 侯馨岳, 等. 低浓度PEG沉淀法检测循环中免疫复合

- 物的临床价值。上海免疫学杂志 1983; 3(5): 307.
6. 周金黄主编。药理学进展(1982)抗炎免疫药理分册。第1版。北京: 人民卫生出版社, 1983: 205.
7. Langrange PH, et al. Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T cells. J Exp Med 1974; 139(3): 528.
8. Jerne NK, et al. Plaque formation in agar by single antibodyproducing cells. Science 1963; 140(3565): 405.
9. 徐学琰, 等。一个改进的体液免疫测定方法——溶血素测定法。药学报 1979; 14(7): 443.
10. Rocklin RE, et al. Cell-mediated immune response of ragweed-sensitive patients to ragweed antigen E in vitro lymphocytes transformation and elaboration of lymphocytes mediators. J Clin Invest 1974; 53(3): 735.
11. 张宝恒。影响过敏介质释放的中草药。药学通报 1979; 14(5): 224.
12. 朱贵卿主编。呼吸内科学。第1版。北京: 人民卫生出版社, 1984: 258-274.
13. Nishiyori T, et al. Effect of Chinese blended medicine, saibokuto, on type IV allergic reaction. Jpn J Allergol 1983; 32(6): 317.
14. Berkenbosch F, et al. Beta-adrenergic stimulation induces an increase of the plasma levels of immunoreactive α -MSH, β -endorphin, ACTH and corticosterone. Life Sci 1981; 29: 2249.
15. Ovcharov R, et al. Effect of Beta-adrenergic drugs on some factors of humoral immune response. Chemical Abstracts 1980; 92(17): 140525.

黄连液浸浴治疗指(趾)部化脓性感染

湖北襄樊市中心医院外科 黄友熊 施建英

我们对76例指(趾)部化脓性感染患者, 随机分两组进行黄连液浸浴及常规换药对照治疗, 现报告如下。

临床资料 76例均为指(趾)非骨髓炎化脓性感染。其中男33例, 女43例。年龄3~58岁, 平均32.4岁。黄连浸浴组(下称浸浴组)37例, 其中甲沟炎、外伤感染及非外伤感染分别为17、9及11例; 对照组39例, 甲沟炎、外伤及非外伤感染分别为22、10及7例。

处理方法 (1)浸浴组: 黄连液制备、质量和使用方法同指骨骨髓炎(见本刊1985; 5(10): 604——编者), 浸浴3小时后拭干, 以黄连纱条换药, 每日一次, 直至痊愈。(2)对照组: 按常规方法, 选用不同纱条换药, 每日一次。炎症由渗出转为增生后, 隔日换药一次。(3)甲沟炎肉芽形成, 均先以硝酸银棒烧灼(不拔甲、不刮除), 使肉芽萎缩呈灰白色, 以无菌纱布包扎, 次日按各组规定操作方法, 分别处理。

结果 创面附近软组织肿胀消退, 创面无溢液, 并为新生上皮或疤痕组织代替, 症状体征消失为痊愈。浸浴组痊愈最快的2天, 最慢15天, 5~10天者23例(64%)。对照组痊愈最快的6天, 最慢的35天, 15~25天者24例(62%)。两组对比有极显著差异($P<0.01$), 见附表。

附表 两组平均治愈天数比较 ($M\pm SE$)

	甲沟炎	外伤感染	非外伤感染
浸浴组	7.82 ± 0.89	8.56 ± 1.28	5.64 ± 0.78
对照组	19.95 ± 1.62	19.20 ± 2.59	16.29 ± 2.15
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

体会 有人曾使用10%黄连软膏及10~20%黄连溶液治疗局部化脓性炎症(中华外科杂志 1958; 6(3): 306), 获得好效果。认为黄连液在偏酸性环境中制菌力减弱, 而我院所用之黄连液 pH 值5.8, 疗效尚佳。

本文治疗结果表明, 不论甲沟炎、外伤性感染或非外伤性感染, 均以浸浴组疗效为好(P 值均 <0.01)。黄连液浸浴后, 创面肉芽颜色新鲜, 甚至可见创底之肉芽颗粒迅速向上生长, 被周围上皮所复盖。大部分病人经1~2次浸浴后, 创面疼痛显著减轻或消失, 红肿隐退而痊愈。本法无痛苦, 疗程短, 疗效好, 虽浸浴费时, 而病人乐于接受。不论浸浴组或对照组, 凡年龄大, 体质弱者, 疗程均较长。此类病人在治疗过程中, 宜加强营养, 注意增强体质, 以加速痊愈。

Preliminary Observation on the Effect of Wureunchun (五仁醇) for Prolonging Cardiac Tissue Allograft Survival Time in Mice

Zhuang Hongming (庄红明), Qin Zelian (秦泽莲), Wang Hui (王慧), et al

Research Center of Plastic and Reconstructive Surgery, 3rd Hospital of Beijing Medical University, Beijing

Wureunchun is an alcohol extract of the fruit of Chinese magnoliavine (*schizandra chinensis*). Experiments showed that at the dose of 70 mg/kg per day for 14 days, Wureunchun prolonged the survival time of cardiac tissue allograft in mice from 11.7 days in control group to 14.7 days. When the dosage of Wureunchun was reduced to 35 mg/kg per day for 14 days, no significant difference in graft survival time was noted between the Wureunchun and control groups. When 70 mg/kg per day was administered in combination with azathioprine (15 mg/kg per day) and prednisone acetate (15 mg/kg per day) all for 14 days, the survival time of the allograft exceeded 19 days, and in certain mice beyond 30 days. The prolongation of survival time was significant, partly because the allograft survived for a certain period of time following the discontinuation of medication, partly because of the reduction of the amount of concomitantly administered conventional immunosuppressive drugs, hence their toxic effect was reduced correspondingly. While Wureunchun has been proved to be almost free from major toxic effect. The experiments indicated that the immunosuppressive effect of a suitable dose of Wureunchun combined with low-dosage conventional immunosuppressive drugs is better than that of either one used alone in mice cardiac tissue allografting model. (Original article on page 33)

An Animal Model for Heart Deficiency Syndrome Induced by Sleep Deprivation

Sun Fuli (孙福立), Li Deming (李德明)*

Institute of Biophysics and Institute of Psychology*, Academia Sinica, Beijing.

This paper reports that a model of heart deficiency syndrome was induced by a small platform method for sleep deprivation which can imitate "frightened" and "overfatigue" pathogenic factors of TCM theory. 20 rats of 200~250 g were divided into two groups: a sleep deprived group and a controlled one. Sleep deprivation was carried out on a small platform (d=4.5 cm, W/A>6.40) surrounded by water. The controlled animals were placed on a large platform (d=13.5 cm, W/A<1.73) in the same environment. Then the blood pressure and the ECG were measured and recorded respectively at the time of 24, 48, 72 and 96 hours. The heart rate variability (HRV) was analyzed with the spectral method. The results showed that the sleep deprivation could bring about some effects on heart deficiency in the experimental animals, e. g. the blood pressure was decreased, the mean heart rate increased and the HRV power spectrum in lower frequencies was also increased. Therefore, it indicated that the model for deficiency of heart Yin (阴), of heart Qi (气) and deficiency of both heart Qi and Yin could be induced selectively by controlling the duration of sleep deprivation. (Original article on page 35)

Effects of Xiao Chuan Ning (哮喘宁) on Types III and IV of Allergic Reaction

Qian Bochu (钱伯初), et al

Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medicine, Hangzhou

Xiao Chuan Ning (XCN) is composed of alcoholic and aqueous extracts of medicinal herbs, *Scutellaria baicalensis*, *Paeonia suffruticosa*, *Cinnamomum cassia* and *Glycyrrhiza uralensis*. The present study was undertaken to observe the effects of XCN on types III and IV of allergic reactions and humoral immunity.

XCN was given intraperitoneally in a dose of 2 g/kg per day for 7 or 10 consecutive days prior to the challenge with antigen in rabbits and rats. As compared with the control, it was shown that an inhibitory effect on active Arthus reaction in pretreated rabbits 2 to 6 hrs after the challenge and passive Arthus reaction in pretreated rats 1 to 3 hrs after the challenge. The increase of serum immune complex in rabbits induced by repeated injections of egg albumin and complete Freund's adjuvant was inhibited significantly by given XCN either orally 20 g/kg per day for 6 days or intraperitoneally 2 g/kg per day for 3 days.

XCN (20 and 40/kg per day, orally for 20 days) inhibited contact dermatitis on ears of mice caused by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), their inhibition rate were 60.8% and 67.2% respectively. The same doses were given orally for 15 consecutive days in mice, their delayed footpad reaction induced by sheep red blood cells (SRBC) were inhibited, the inhibition rate were 51.8% and 45.7% respectively. As comparing with control, the differences were significant statistically ($P<0.05\sim0.001$).

On the humoral immune response to SRBC in mice, XCN affected neither the number of plaque forming cells of spleen nor the level of serum hemolysin.

From these results, XCN displays the inhibition of types III and IV of allergic reactions and no effect on the humoral immune response. These actions of XCN may be helpful for use in the treatment of asthma.

(Original article on page 38)