

小青龙汤药物血清对致敏大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒以及组织胺释放的影响*

李仪奎 吴健宇 吴晓芬 符胜光

内容提要 目的:研究小青龙汤抗过敏作用的机理。方法:分别用形态法和荧光法观察了小青龙汤药物血清冻干粉对致敏大鼠腹腔肥大细胞(PMC)脱颗粒和组织胺释放的影响。结果:给药 15min、给药 2h 后制备的药物血清冻干粉对 PMC 脱颗粒和组织胺释放有明显的抑制作用,且二者的时效关系基本一致。结论:小青龙汤抗过敏作用与抑制 PMC 释放过敏介质——组织胺有关。

关键词 小青龙汤 血清冻干粉 形态法 荧光法 腹腔肥大细胞脱颗粒 组织胺释放

Effect of Xiaoqinglong Decoction Drug-Serum on Degranulation and Histamine Releasing of Peritoneal Mastocyte in Sensitized Rats LI Yikui, WU Jianyu, WU Xiaofen, et al *Research Center of Pharmacology and Toxicology of Chinese Drugs, Shanghai TCM University, Shanghai (200032)*

Objective: To study the mechanism of anti-allergic effect of Xiaoqinglong Decoction (XQLD). **Methods:** The influence of XQLD drug-serum frozen powder on degranulation and histamine releasing of peritoneal mastocyte in sensitized rats was examined by morphologic and fluorimetric method. **Results:** The drug-serum prepared by serum obtained 2 hours after medication for 15 min has obvious inhibitory effect on degranulation and histamine releasing of peritoneal mastocyte which showed a basically unified time-effect relationship. **Conclusion:** The anti-allergic effect of XQLD is related with the allergic medium (histamine) inhibition of releasing of peritoneal mastocyte.

Key words Xiaoqinglong Decoction, serum frozen powder, morphology, fluorimetric method, degranulation of peritoneal mastocyte, histamine releasing

小青龙汤出自张仲景著《伤寒论》一书,由芍药、生姜、五味子、麻黄、甘草、细辛、半夏、桂枝等 8 味药组成。此方有温肺化饮、平喘止咳之功效,临床常用于治疗支气管哮喘^[1]。以往实验报道多集中于该方能够缓解气管平滑肌痉挛^[2,3],但该方是否具有抗过敏作用文献报道尚少。本实验采用血清药理实验方法观察了小青龙汤药物血清冻干粉对致敏 PMC 脱颗粒以及组织胺释放的影响,为该方在抗过敏等方面的应用提供部分实验数据与解释,并对血清冻干粉在血清药理实验中的应用作一尝试。

材料和方法

1 动物 SD 大鼠 50 只,雄性,体重(250±10)g,SD 大鼠 40 只,雄性,体重(350±50)g,由上海中医药大学动物实验中心提供,批号:02—49—2,自由进食。

2 药物与试剂 芍药、生姜、五味子、麻黄、甘草、

细辛、法半夏、桂枝,购自上海中医药大学众益达国药号,水煎过滤,备用;邻苯二甲醛(OPT,上海五联化工厂,批号:980117),组织胺标准品(中国药品生物制品检定所产品),中性红(上海试剂三厂,批号:970109),卵蛋白(上海丽珠生物技术有限公司,批号:9707117),氢氧化铝凝胶(本校中药学院提供),其他试剂均为国产分析纯。

3 仪器 光学显微镜(OLYMPUS XW-80H),荧光分光光度计(日立,F-4500 型号)。

4 实验方法

4.1 小青龙汤药物血清及空白血清冻干粉的制备 小青龙汤用药剂量参考 95 版《药典》,用药量相当于临床等效剂量(根据人和动物按表面积折算的等效剂量比率表^[4]计算),制备成浓度为 0.48g/ml 的水煎液。选用(350±50)g 雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为 8 组,即空白对照组和不同采血点给药组,每组 5 只,禁食 12h,分别灌服生理盐水和小青龙汤水煎液,灌胃量为 1ml/100g,给药组分别于给药后 15min、0.5h、1h、2h、4h、8h、16h 后采血分离血清。空白血清为给动物

* 国家自然科学基金重点资助课题(No. 39630360)

上海中医药大学中药药理毒理研究中心(上海 200032)

腹膜生理盐水所制备的血清。-70℃ 冷冻干粉。实验时将 1.5ml 血清的冻干粉溶解于 0.75ml 的蒸馏水中。

4.2 大白鼠主动肥大细胞脱颗粒 用形态法, 选用(250±10)g 雄性 SD 大鼠 50 只, 分为正常对照组和致敏组 2 组, 正常组 5 只, 致敏组 45 只, 其中致敏组又分模型组、空白血清组、15min、0.5h、1h、2h、4h、8h、16h 等 9 组, 卵蛋白 30μg, 4% Al(OH)₃ 凝胶 10μg, 混匀后腹腔注射⁽⁵⁾。正常对照组注射等量生理盐水, 致敏 13 天, 股动脉放血处死动物, 分离并制备 PMC 悬液⁽⁶⁾。各组每只标本加入 0.5ml PMC 悬液, 正常组加入 1ml Hank 氏液, 模型组加入 0.75ml Hank 氏液, 空白血清组 and 不同采血点药物血清组分别加入 0.75ml 空白血清、药物血清干粉复溶液, 摇匀后放置 5min, 除正常组外每组均加入抗原 0.25ml(卵蛋白生理盐水溶液 60μg/ml), 摇匀。每个样本反应总体积均为 1.5ml。置 37℃ 水浴 5min, 以 1500r/min 离心 5min, 吸取上清液 1ml 留作测组织胺用。吸取试管底部 PMC, 滴 1、2 滴于中性红染色的载玻片上, 加盖玻片, 37℃ 温箱中孵育 3min, 高倍镜下观察肥大细胞脱颗粒的情况。每个样本做复片, 每张片子查看 60 个细胞。正常肥大细胞为圆形, 核不着色, 细胞内有均匀分布的石榴红色颗粒。若颗粒自细胞膜内向外流出, 颗粒褪色和出现空泡者为阳性, 60 个细胞中 1/3 有此变化为(+), 1/3~2/3 有上述变化者为(++), 2/3 以上者为(+++), 此为等级资料, 按等级序值法测定其等级序值⁽⁷⁾。

4.3 肥大细胞上清液组织胺含量的测定 用荧光法测定组织胺含量⁽⁸⁾, 经测试组织胺浓度在 0.05~0.2μg/ml 之间, 荧光强度与浓度成正比。样品稀释 25 倍后均在此范围。另外制备 5 只未致敏的 SD 大鼠 PMC 悬液(容积与试管体积相同), 置 100℃ 水浴 15min, 离心, 取上清液, 稀释 40 倍, 其上清液组织胺含量平均值即为组胺总量。

组织胺释放率 = $\frac{\text{样品组织胺含量} - \text{样品空白组织胺含量}}{\text{组织胺总量} - \text{样品空白组织胺含量}} \times 100\%$

5 统计学方法 等级资料用等级序值分析法, 各组均与模型组比较, 数值越高表示病变的严重程度越重, 即 PMC 脱颗粒的数量越多。计量资料用 *t* 检验。

结 果

1 小青龙汤药物血清抑制大鼠 PMC 脱颗粒的时效关系 实验结果表明, 正常组 PMC 也有部分细胞自发脱颗粒, 模型组与空白血清组 PMC 脱颗粒数显著上升, 说明本实验成功的建立了模型, 且二者无显著性差异, 说明空白血清对模型无显著的影响, 不同采

血点的药物血清抑制大鼠 PMC 脱颗粒的程度不同, 15min 组和 2h 组的药物血清能够明显抑制 PMC 脱颗粒, 结果见表 1。

表 1 小青龙汤药物血清抑制致敏大鼠 PMC 脱颗粒的时效关系

组 别	n	PMC 脱颗粒数			等级序值
		+	++	+++	
正 常	5	5	0	0	1**
模 型	5	0	5	0	6
空白血清	5	0	4	1	7
药物血清 15min	5	4	1	0	2*
0.5h	5	1	4	0	5
1h	5	0	5	0	6
2h	5	5	0	0	1**
4h	5	3	2	0	3
8h	5	0	4	1	7
16h	5	0	4	1	7

注: 与空白血清组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2 小青龙汤药物血清抑制致敏大鼠 PMC 释放组织胺的时效关系 实验结果表明, 正常组大鼠也能释放一定量的组织胺, 模型组与空白对照组组织胺释放明显增加。15min 组和 2h 组的药物血清能够明显的抑制 PMC 释放组织胺, 结果见表 2。

表 2 小青龙汤药物血清对致敏大鼠 PMC 释放组织胺的失效关系 (% , $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	组织胺的释放率
正 常	5	5.464 ± 2.971
模 型	5	12.166 ± 2.906**
空白血清	5	11.195 ± 3.788*
药物血清 15min	5	4.245 ± 3.234 [△]
0.5h	5	8.402 ± 3.367
1h	5	15.108 ± 6.297
2h	5	2.771 ± 2.549 ^{△△}
4h	5	9.628 ± 4.711
8h	5	11.523 ± 10.038
16h	5	10.802 ± 4.920

注: 与正常组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 与空白血清组比较, [△] *P* < 0.05, ^{△△} *P* < 0.01

讨 论

我们研究了小青龙汤对机体在致敏原的作用下对过敏介质释放的影响。实验结果表明, 这种作用是肯定的, 在含小青龙汤药物血清存在的情况下, PMC 脱颗粒数和组织胺的释放率受到明显的抑制, 在时效关系上可以见到在给药后出现两个药效高峰, 一个在 0.5h 处, 另一个在 2h 处, 且脱颗粒数和组织胺的释放率两个指标药效的高峰时间完全一致, 表明实验结果是可信的, 双峰现象的机理尚待研究, 理论上有几种可能: (1) 小青龙汤内两种药效成分的分别作用; (2) 一种

成分的肝肠循环;(3)一种药物成分的有效代谢产物。

在实验方法上,我们用血清干冻粉方法保持了体外实验系统中的药物浓度与体内药物浓度的一致,克服了采用血清药理实验方法时含药血清在体外培养系中被稀释而出现的假阴性结果的缺点。从而保证了实验结果的更加可信,采用血清干冻粉法进行血清药理学实验在国内尚属首次。

选用适当的抗原和佐剂刺激大鼠产生高效价的 IgE,这种亲细胞抗体吸附在 PMC 表面,使这些细胞致敏。当致敏 PMC 在体外再次接触抗原后则会产生脱颗粒反应,释放致敏介质,组织胺是其释放的主要致敏介质。本实验观察结果表明,给药后 15min 和给药后 2h 制备的药物血清均能显著抑制 PMC 脱颗粒以及组织胺释放,因而推测小青龙汤具有抗过敏的药物成分,并且该成分口服吸收有效,其抗过敏的机理之一可能与其稳定肥大细胞细胞膜,抑制其脱颗粒和释放过敏介质有关。两个指标的时效关系曲线基本吻合说明了小青龙汤抑制 PMC 脱颗粒以及抑制组织胺释放可能是同一种有效成分发挥作用,同时也说明实验结果以及血清药理实验方法评价药效的可靠性。另外本实验还观察到小青龙汤抗过敏的药理作用出现了双峰现象,说明该方可能存在着多种有效成分,各种有效成分在血中达到顾此失彼时间不同,或是一种有效成分

及其代谢产物发挥作用的结果。给药后 15min 制备的药物血清出现了药理效应可能是由于该有效成分在胃中经胃粘膜毛细血管直接吸收入血,迅速进入血液循环而发挥作用的结果,在 2h 后药理作用逐渐减弱,说明小青龙汤抗过敏的有效成分在血中无蓄积作用,至于是何种有效成分尚有待于进一步的研究。

参 考 文 献

1. 高桂根. 小青龙汤的临证应用. 实用中医内科杂志 1995;9(1):19.
2. 黄 坚, 金若敏, 陈长勋. 用血清实验法观察小青龙汤对豚鼠气管平滑肌的作用. 中药药理与临床 1995;6:12—14.
3. 李仪奎, 胡 馨, 赵 蓉. 采用正交设计法对小青龙汤平喘作用的研究. 中成药研究 1986;4:23—25.
4. 李仪奎主编. 中药药理实验方法学. 上海: 上海科学技术出版社, 1991:562.
5. 黄钦田, 徐 华, 孙爱民. 致敏大鼠腹腔及肺泡肥大细胞 5-HT 释放率. 南京医科大学学报 1995;15(4):746—748.
6. 徐叔云主编. 药理实验方法学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994:1203.
7. 孙瑞元主编. 定量药理学. 北京: 人民卫生出版社, 1987:84—85.
8. 窦淑筠, 符云锋. 血及组织中组织胺的荧光测定法. 中华医学检验杂志 1981;4:101—102.

(收稿:1998-10-07 修回:1999-09-20)

中药对特发性真性性早熟女孩骨龄的影响

陈智清 顾再研

本院自 1996 年 4 月—1999 年 6 月采用中药治疗女孩特发性真性性早熟(简称 CPP),取得了良好的疗效,现将其中 45 例 CPP 患儿在治疗 1 年以后的骨龄变化情况作一总结。

临床资料 所有患儿均为本院性早熟门诊随诊患儿,共 45 例,年龄(CA)为 4~10 岁,平均为 7.23 岁,就诊原因:乳房发育 39 例(其中发育 1 年以上 6 例,1~6 月 12 例,≤1 月 21 例),月经来潮 5 例,阴毛生长 1 例。

所有患儿初诊时均进行乳房发育评级,内分泌系统 B 超,血清激素测定,骨龄测定,部分患儿查头颅 CT,结果符合以下诊断标准:(1)8 岁以前出现乳房增大,阴毛、腋毛生长等一项或多项第二性征,或月经初潮在 10 岁以前;(2)B 超显示:子宫或卵巢增大,出现滤泡,其中子宫长径 > 25mm,卵巢最大径 > 20mm,滤泡直径 > 4mm;(3)血清激素测定:雌激素(E₂) > 75pmol/L 或促卵泡生成素(FSH)/促黄体激素(LH) > 3.4;(4)长骨骨龄大于实际年龄 1 年以上;(5)排除其他疾病引起的性早熟。

治疗方法 本组以中药治疗为主,采用滋阴泻火利湿的中

药龟版 12g 龙胆草 7~12g 玄参 10g 生地 10g 知母 10g 泽泻 10g 黄柏 10g 郁金 10~15g 大黄 2~6g 等煎服,每日 1 剂,分 3 次服,对有月经来潮者,合用甲地孕酮控制症状,除此外停用一切影响生长发育的药物。

结 果 在治疗 1 年前后分别以 TW2 评分法测骨龄(BA),并进行对比,结果治疗前平均骨龄为(岁, $\bar{x} \pm s$) 8.6 ± 1.5 ,治疗后平均骨龄为 9.4 ± 1.5 ,治疗前后 BA/CA 比值有显著性差异($P < 0.05$)。

讨 论 性早熟对患儿的危害主要是影响成年身高,因此能否早期有效控制骨龄快速增长成为治疗的关键,近年来研制成功的促性腺激素释放激素类似物(LHRH-A)虽能有效控制骨龄增长,但该药价格昂贵,故未能广泛运用。中医学认为, CPP 儿童的发病机理有阴虚火旺,脾肾两虚,更有痰湿凝滞或瘀滞脉络,既有先天不足,又有后天失调,因此通过活血通络,滋补肝肾,化痰散结等调理,使机体保持阴阳平衡,从临床的角度看,就是保持骨生长的平衡。总之,中药对儿童 CPP 有着明显的疗效,且国内资源丰富,是值得推广的治疗方法。

(收稿:1999-05-09 修回:1999-09-01)