

· 博士之窗 ·

平喘合剂对实验性哮喘豚鼠嗜酸细胞阳离子蛋白、白细胞介素-5 等的影响

方向明[△] 曹世宏

摘要 目的:观察平喘合剂对哮喘豚鼠血浆嗜酸细胞阳离子蛋白(ECP)、支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素-5(IL-5)水平及炎症细胞计数变化的影响。方法:采用常规计数法测 BALF 中嗜酸粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞计数,运用 ELISA 法测 IL-5,放免法测 ECP。结果:治疗后平喘合剂、地塞米松组嗜酸粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数量、ECP、IL-5 水平比治疗前明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),平喘合剂、氨茶碱、地塞米松、定喘止咳片各组间比较,差异均无显著性。结论:平喘合剂可降低炎症细胞计数、ECP、IL-5 而治疗哮喘。

关键词 哮喘 炎症细胞计数 嗜酸细胞阳离子蛋白 白细胞介素-5

Effect of Pingchuan Mixture on Eosinophil Cation Protein and Interleukin-5 in Experimental Guinea Pigs with Asthma FANG Xiang-ming, CAO Shi-hong *Anhui TCM College, Hefei (230038)*

Objective: To observe the effect of Pingchuan Mixture (PCM) on plasma eosinophil cation protein (ECP), interleukin-5 in bronchial alveolar lavage fluid (BALF) and inflammatory cell count in experimental guinea pigs with asthma. **Methods:** The eosinophil, neutrophil, lymphocyte count were conducted by conventional method, IL-5 was detected by ELISA and ECP determined by RIA. **Results:** Levels of eosinophil, neutrophil, lymphocyte, ECP and IL-5 after treatment were significantly lower than those before treatment, the difference between groups treated respectively by PCM, aminophylline, dexamethasone and Dingchuan Zhike Tablet was insignificant. **Conclusion:** PCM could treat asthma by reducing the inflammatory cell count, ECP and IL-5.

Key words asthma, inflammatory cell count, eosinophil cation protein, interleukin-5

目前普遍认为,哮喘是一种气道慢性非特异性炎症性疾病,有多种炎症细胞、炎性介质和细胞因子参与其炎症过程,如肥大细胞、嗜碱粒细胞、嗜酸粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞以及中性粒细胞等,上述炎症细胞能合成和释放多种炎性介质,如白三烯(LTS)、血小板活化因子(PAF)、组织胺(H)、前列腺素(PGS)等,可引起气道炎症,上皮细胞损伤,微血管渗漏及植物神经功能紊乱^[1]。本实验观察平喘合剂对哮喘豚鼠血浆嗜酸细胞阳离子蛋白(ECP)及支气管肺泡灌洗液(BALF)中白介素-5(IL-5)水平变化的影响,现报告如下。

材料与方 法

1 动物 健康雄性豚鼠 60 只,体重 300~400g,南京中医药大学实验动物中心提供。

2 药物 平喘合剂(由麻黄 9g、细辛 3g、苏子 6g、杏仁 9g、陈皮 6g、半夏 9g、黄芪 9g、太子参 12g、防风 6g、地龙 6g、蝉衣 6g、浙贝母 9g、五味子 5g,制成糖浆,每 100ml 糖浆含生药 105g);地塞米松片,每片 0.75mg,浙江仙居制药厂生产,批号 990201;氨茶碱片,每片 0.1g,南京制药厂生产,批号 981004;定喘止咳片,南京第五制药厂生产,每片 0.4g,批号 20000506。

3 试剂及仪器 试剂:卵蛋白(中国医药集团上海化学试剂站,批号 F981130);生理盐水;25% 乌拉坦(曹杨第三中学化工厂,批号 950927);IL-5 ELISA 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司提供);ECP 测定试剂盒(瑞典 Pharmacin 公司)。仪器:医用超声雾化器(北京亚都集团);液体闪烁计数仪(Beckman, LS 5000CE);自动酶标仪(日本 HITACHI 公司)。

4 实验方法

4.1 哮喘模型的建立 豚鼠腹腔注射含 10% 卵蛋白的生理盐水 1ml 致敏,自注射第 14 天起,每天上、

江苏省中医院(南京 210029)

通讯作者:方向明, Tel: 0551-2821006, E-mail: fxm. bsh@163. com

[△] 博士研究生, 现在安徽中医学院(合肥 230038)

下午各 1 次将豚鼠置于气雾缸内,用 1% 卵蛋白溶液超声雾化,任动物自行吸入 20min,至哮喘发作,出现咳嗽、呼吸困难和喘息,连续 7 天,末次处理后收集 BALF (方法参照文献^[1])及颈动脉取血后处死动物^[2]。

4.2 分组给药 随机分成正常组、模型组、平喘合剂组、氨茶碱组、地塞米松组、定喘止咳片组,每组 10 只。除正常组外,各组按照前面所述的造模方法进行,正常组按造模组方法,用生理盐水代替卵蛋白雾化吸入与做腹腔注射;平喘合剂组:自造模第 1 天起,每天灌服平喘合剂(按正常人体剂量 0.031 折算),每天 1 次,每次 2ml,氨茶碱组:自造模第 1 天起灌服氨茶碱,剂量为 0.08g/(kg·d),地塞米松组:自造模第 1 天起灌服地塞米松,剂量为 0.4mg/(kg·d),定喘止咳片组:自造模第 1 天起灌服定喘止咳片,剂量为 0.4 片/(kg·d),各组均连续用药 7 天。造模及相应处理完成后 25% 乌拉坦腹腔注射麻醉,气管插管,收集 BALF,待测细胞计数及 IL-5,并从颈动脉取血 2ml,用于测 ECP。

4.3 观察指标与检测方法 采用常规计数法测 BALF 中嗜酸粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞计数,运用 ELISA 法测 IL-5,用放免法测 ECP。

5 统计学处理 采用 SPSS 8.0 for windows 统计软件进行统计分析,多组间比较用方差分析,两组间比较用 *t* 检验。

结 果

1 各组 BALF 中细胞计数 见表 1。平喘合剂、地塞米松组与模型组比较,BALF 中细胞计数明显降低,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。平喘合剂、氨茶碱、地塞米松、定喘止咳片组各组间比较,差异无显著性。

2 各组 BALF 中 IL-5 比较 见表 2。平喘合剂组与氨茶碱组、地塞米松组、定喘止咳片组 IL-5 水平相当,平喘合剂组及地塞米松组均能显著降低 IL-5 ($P < 0.01$),地塞米松组降低 IL-5 能力最强。

3 各组外周血 ECP 比较 见表 2。平喘合剂组

表 2 各组 BALF 中 IL-5 及外周血 ECP 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-5 (pg/L)	ECP ($\mu\text{g/L}$)
正常	10	22.31 ± 5.75	0.54 ± 0.11
模型	10	49.52 ± 8.76	0.97 ± 0.29
平喘合剂	10	34.67 ± 10.08**	0.61 ± 0.32*
氨茶碱	10	36.49 ± 9.98	0.62 ± 0.36
地塞米松	10	31.46 ± 9.32**	0.60 ± 0.30*
定喘止咳片	10	35.93 ± 7.61	0.63 ± 0.41

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

及地塞米松组与模型组比较,ECP 显著降低($P < 0.05$);平喘合剂、氨茶碱、地塞米松、定喘止咳片组各组间比较,差异无显著性。

讨 论

过敏性哮喘是一种同遗传和特异性密切相关的疾病,其 HLA 相关性免疫调节异常,使人们出生后在首次接触抗原时优先表现了 IgE 抗体反应,抗原再次进入机体通过接触 IgE 激发支气管部位的肥大细胞脱颗粒,释放各种介质,成为哮喘发生的第一级机制(速发反应)。支气管部位肥大细胞数量或活性增加,或 IgE 介导的肥大细胞脱颗粒,可产生多种细胞因子,包括 IL-5、嗜酸粒细胞趋化因子肽类(ECF-A)、血小板活化因子(PAF)等,ECF-A、PAF 等都能导致嗜酸粒细胞在支气管粘膜聚集。IL-5 不仅能选择性增加嗜酸粒细胞对人血管内皮细胞的高粘附性,还能通过受体诱导嗜酸粒细胞的分化,从而使大量嗜酸粒细胞在支气管粘膜部位聚集和成熟。同时 IL-5 还刺激气道粘膜淋巴细胞分泌过多的 SIgA,这些 SIgA 与嗜酸粒细胞表面的 FC₂ 受体^[3]结合,诱发大量嗜酸粒细胞脱颗粒,释放多种颗粒源和膜源介质,引起的支气管上皮损伤,平滑肌收缩、粘液分泌等为主的病理损害,形成哮喘发作的第二级机制(迟发反应),第二级机制中释放的介质,如主要碱性蛋白(MBP)、嗜酸粒细胞过氧化物酶(EPO)等又可诱导肥大细胞释放组织胺等速发反应介质,加重哮喘发作,IL-5 是嗜酸粒细胞成熟、分化、趋化及活化不可缺少细胞因子^[4],而嗜酸粒细胞是哮喘的主要效应细胞之一。平喘合剂具有益气、化痰、平

表 1 各组 BALF 中细胞计数 ($\times 10^6/\text{L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	总细胞数	嗜酸粒细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
正常	10	7.4 ± 2.1	0.53 ± 0.21	0.71 ± 0.30	0.13 ± 0.09
模型	10	18.2 ± 1.8	7.90 ± 2.70	2.80 ± 1.10	1.47 ± 0.51
平喘合剂	10	9.6 ± 2.3**	2.15 ± 0.89**	1.64 ± 0.65*	0.20 ± 0.13**
氨茶碱	10	10.3 ± 1.9	2.26 ± 0.98	1.70 ± 0.63	0.21 ± 0.15
地塞米松	10	9.3 ± 2.1**	1.68 ± 0.77**	1.52 ± 0.67**	0.18 ± 0.11**
定喘止咳片	10	10.1 ± 2.0	2.25 ± 0.93	1.72 ± 0.70	0.22 ± 0.14

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

喘、止咳之功效。从本实验可以看出,哮喘发作时,IL-5 明显升高,而经平喘合剂、氨茶碱、地塞米松、定喘止咳片治疗后,明显下降,且平喘合剂、氨茶碱、地塞米松、定喘止咳片组差异无显著性,说明此几种药物均可降低 IL-5,抑制嗜酸细胞的分化、活化,治疗哮喘。

气道炎症是哮喘的重要特征,其病理组织学的表现是嗜酸粒细胞数量增多。被激活的嗜酸粒细胞可合成和释放白三烯(LTS)、PAF 等介质以及毒性颗粒蛋白如嗜酸粒细胞阳离子蛋白(ECP)、EPO,嗜酸性粒细胞衍生神经毒性蛋白(ENP)和 MBP 等,这些介质和毒性颗粒蛋白直接损伤气道上皮,引发和加重炎症,导致支气管收缩及气道高反应性,而以 ECP 为最重要,嗜酸粒细胞浸润于气道的数量与 ECP 相关,它具有明显的异质性,低密度嗜酸性粒细胞有明显的脱颗粒表现,细胞毒性强,存活时间长,产生更多的 LTS、ECP 等介质。ECP 可以作为反映哮喘气道炎症发生、发展的重要指标,测定血清、痰液、肺泡灌洗液中的 ECP 水平的变化,可以直接监测和指导哮喘的抗炎治疗,并可判断哮喘的严重性及其预后。ECP 与气道高反应性、通气功能均存在一定相关性,是嗜酸性粒细胞激活标志^[5]。本实验发现,哮喘模型组 ECP 含量比正常对照组显著升高,而经平喘合剂、氨茶碱、地塞米松、定喘止

咳片治疗后, ECP 含量显著下降,且给药组间比较,差异无显著性。

上述实验研究表明,平喘合剂可能通过降低 IL-5,抑制嗜酸细胞的激活和活化,从而抑制嗜酸细胞释放 ECP,减轻气道炎症及降低气道高反应性而治疗哮喘。有关平喘合剂治疗哮喘的机理有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 刘宏,赵鸣武,耿秋明,等. 博莱霉素致肺纤维化大鼠支气管肺泡灌洗液磷脂组分变化. 中华结核与呼吸杂志 1993; (4):197—201.
- 2 郭鹞. 人类疾病的动物模型(第 1 辑). 北京:人民卫生出版社,1982:235—236.
- 3 Moteiro RC. Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. J EXP Med 1990;171(3):597.
- 4 Busse WW, Calhoun WF, Sedgwick JD, et al. Mechanism of airway inflammation in asthma. Am Rev Respir Dis 1993;147:20—24.
- 5 Djukanovic R, Roche WR, Willson JW, et al. Nasal inflammation. Am Rev Respir Dis 1990;142:434—457.

(收稿 2002-05-22 修回 2002-12-20)

《中国中西医结合杂志》第六届编委会名单

名誉总编	季钟朴										
总编辑	陈可冀										
副总编辑	沈自尹	肖培根	陈维养(常务)								
顾问	吴咸中	辛育龄	关幼波	邓铁涛	尚天裕	王永炎	侯 灿				
编辑委员	马必生	王一涛	王书臣	王今达	王宁生	王 阶	王学美	王 佩	王宝恩		
	王硕仁	王雪苔	尹光耀	史大卓	史载祥	刘干中	刘建勋	刘耕陶	刘猷枋		
	危北海	匡调元	朱 兵	吕爱平	吕维柏	齐清会	孙 燕	李 恩	李乃卿		
	李大金	李玉光	李连达	李廷谦	李国贤	李国栋	李鸣真	李顺成	李恩宽		
	杨任民	杨秀伟	时毓民	陈士奎	陈小野	陈冬燕	陈香美	吴伟康	陆付耳		
	张大钊	张之南	张永祥	张伯礼	张国玺	张亭栋	张荣华	张家庆	张梓荆		
	林求诚	林志彬	林瑞超	郁仁存	周文泉	周 俊	周霭祥	金益强	赵伟康		
	唐由之	顾振纶	郭赛珊	徐治鸿	梁晓春	黄晓愚	曹小定	葛秦生	谢宗万		
	谢竹藩	董福慧	曾晓春	雷 燕	蔡定芳	裴正学	黎磊石	廖家桢	廖福龙		
	戴瑞鸿										