

阿魏酸钠拮抗豚鼠哮喘的药理机制研究

孙 云 徐 峰 张洪泉

摘要 目的 研究阿魏酸钠对豚鼠哮喘的作用及其机制。**方法** 致敏豚鼠给予 25、50、100mg/kg 3 种不同浓度的阿魏酸钠,并用卵白蛋白引喘豚鼠,检测引喘后 8 天豚鼠血清与肺组织中的内皮素-1(ET)、一氧化氮(NO)以及血液、肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞(EOS)的变化情况。**结果** 阿魏酸钠可明显降低血清和肺组织中的 ET 含量($P<0.05$, $P<0.01$),升高血清和肺组织中 NO 浓度($P<0.05$, $P<0.01$),减少血液和肺泡灌洗液中 EOS 的数量($P<0.05$, $P<0.01$);高剂量组作用较强。**结论** 阿魏酸钠可增加体内 NO 浓度,降低 ET 含量、减轻 EOS 浸润,拮抗豚鼠哮喘。

关键词 阿魏酸钠;哮喘;内皮素;一氧化氮;嗜酸性粒细胞

Study on the Pharmacological Mechanism of Sodium Ferulate for Anti-asthmatic Effect in Guinea Pigs SUN Yun, XU Feng, ZHANG Hong-quan *Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu (225001)*

Objective To study the anti-asthmatic effect of sodium ferulate (SF) and its mechanism in guinea pig asthmatic model. **Methods** Guinea pigs were sensitized with ovalbumin as animal asthmatic model and treated with 3 different concentration of SF for 8 days. Levels of endothelin (ET) and nitric oxide (NO) in blood and lung tissue, and eosinophil (EOS) in blood and bronchoalveolar lavage fluid (BLAF) was counted at the end of trial. **Results** SF could significantly lower the ET content and increase the NO concentration in serum and lung tissue, reduce the number of EOS in blood and BLAF ($P<0.05$, $P<0.01$). Stronger effect was showed in the high dose group. **Conclusion** Mechanism of anti-asthmatic action of SF might be to increase NO concentration, lower ET content, alleviate EOS infiltration.

Key words sodium ferulate; asthma; endothelin; nitric oxide; eosinophil

支气管哮喘是以肺部可逆性气流阻塞、气道黏膜炎症和气道高反应性为特征的呼吸系统疾病^[1],其发病机理与变态反应有关,当过敏原作用于机体后,体内产生特异性 IgE, IgE 结合于肥大细胞、嗜碱性粒细胞等炎症细胞表面,当抗原再次进入体内,可与结合的 IgE 交联,使炎症细胞合成并释放多种炎症介质,如组织胺、白三烯、各种细胞趋化因子等,引发炎症反应。阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)是中药当归中抗血小板的有效成分之一,本室以往的研究已证实 SF 通过抑制血小板活化因子诱发的气道高反应性、抑制嗜酸性粒细胞向肺内募集可治疗过敏性哮喘,其作用与抑制血小板功能有关^[2]。本实验通过豚鼠哮喘模型,进一步深入研究阿魏酸钠在调节免疫、抑制炎症方面拮抗豚鼠哮喘的相关机制。

材料与方法

1 动物及分组 Hartly 豚鼠 40 只,体重 200~250 g,雌雄各半,扬州大学实验动物中心提供。随机分为 5 组:模型组,正常对照组及阿魏酸钠 25、50、100 mg/kg 3 个剂量组,每组 8 只。

2 药物 阿魏酸钠(白色结晶粉末,广州利民制药厂提供,批号:001209),实验时用生理盐水溶解,配成低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)。

3 试剂及仪器 卵白蛋白,购自上海伯奥生物科技有限公司;内皮素(ET)及一氧化氮(NO)试剂盒由南京聚力生物医学工程研究所提供;402 型超声雾化器,上海四菱医疗器械厂生产;高速冷冻离心机,型号:TGLL-18G,太仓市医疗器械厂制造;UV755B 型紫外分光光度计:上海分析仪器总厂制造;ELX800 型酶标比色计,美国基因公司产品。

4 实验方法

4.1 模型制备及给药方法 除正常对照组外,分别于模型组及阿魏酸钠低、中、高剂量组的豚鼠两后肢

基金项目:江苏省科学委员会基金项目(No. BK98135313)

作者单位:扬州大学医学院(江苏 225001)

通讯作者:孙 云, Tel: 0514-7978877, E-mail: jgz7718@sina.com

肌肉注射 5% 卵白蛋白溶液各 0.4 ml,腹腔注射 0.5 ml,致敏 2 周后,用 0.2% 的卵白蛋白溶液雾化吸入引喘豚鼠,正常对照组使用相同容积的 PBS 溶液代替卵白蛋白。

4.2 给药方法 阿魏酸钠低、中、高剂量组分别静脉注射 25、50、100 mg/kg 阿魏酸钠,10 min 后,用卵白蛋白引喘;模型组用等容量生理盐水溶液代替阿魏酸钠静脉注射,亦用卵白蛋白引喘;正常对照组用等容量 PBS 溶液代替卵白蛋白雾化吸入,每天 1 次,共 8 次。

4.3 标本采集 最后一次引喘后豚鼠切开颈部皮肤,钝性分离出颈总动脉,结扎远端,从近侧颈总动脉取血 2 ml,以 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清-20℃ 保存备用。分离气管,剪一 Y 切口,插入外径 2.5 mm 的塑料管结扎固定,以 10 ml PBS 分 5 次灌洗支气管肺泡,收集支气管肺泡灌洗液,经双层纱布过滤备用,灌洗液回收率>90%。打开胸腔,分离肺组织,用冰 PBS 溶液洗去肺组织表面的血迹,称取洗净后肺组织(湿重)0.5 g 左右,加入冰 PBS 溶液,用玻璃匀浆器研磨、制成 10% 的肺组织匀浆,4℃ 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液-20℃ 保存。

4.4 观察项目与检测方法

4.4.1 嗜酸性粒细胞(EOS)计数 取 20μl 新鲜血液及支气管肺泡灌洗液,分别加入 0.38ml 嗜酸性粒细胞计数液(20g/L 伊红溶液 5ml,丙酮 5ml 加蒸馏水 90ml)中,静置 30min,于细胞计数板计数嗜酸性粒细胞,1h 内完成^[3]。

4.4.2 NO 和 ET 测定 取制备好的血清与肺组织匀浆,测定 ET 及 NO 浓度,ET 采用放射免疫法测定,NO 采用硝酸还原酶法测定,严格按说明书操作。

5 统计学方法 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Excel 统计分析,两组样本均数用 *t* 检验,比较组间差异的显著性。

结 果

1 阿魏酸钠对哮喘豚鼠血清、肺组织中 ET 的影响 见表 1。与正常对照组比较,模型组豚鼠血清和

肺组织中 ET 含量升高,差异有显著性($P<0.05$);除阿魏酸钠高剂量组肺组织中 ET 含量升高不明显,差异无显著性外,低、中剂量组豚鼠血清和肺组织中 ET 含量差异均有显著性($P<0.05$)。与模型组比较,除阿魏酸钠低剂量组肺组织中 ET 含量降低不明显,差异无显著性外,中、高剂量组豚鼠血清和肺组织中 ET 含量差异均有显著性($P<0.05, P<0.01$)。阿魏酸钠对血清中 ET 的抑制作用与剂量呈正相关($r=0.987, P<0.05$);对肺组织 ET 的抑制作用与剂量亦呈正相关($r=0.971, P<0.05$)。

2 阿魏酸钠对哮喘豚鼠血清与肺组织中 NO 的影响 见表 1。与正常对照组比较,模型组豚鼠血清及肺组织中的 NO 浓度均较低,差异有显著性($P<0.01$);除阿魏酸钠高剂量组肺组织中 NO 含量降低不明显外,低、中剂量组血清和肺组织中 NO 浓度差异均有显著性($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,阿魏酸钠中、高剂量组血清和肺组织中 NO 浓度差异均有显著性($P<0.05, P<0.01$)。

3 阿魏酸钠对哮喘豚鼠血清及肺泡灌洗液中 EOS 数量的影响 见表 2。与正常对照组比较,模型组及阿魏酸钠低、中剂量组血清及肺泡灌洗液中的 EOS 数量明显增高,差异均有显著性($P<0.01$)。阿魏酸钠高剂量组血液及肺泡液中 EOS 数量差异无显著性。与模型组比较,阿魏酸钠低、中剂量组血清中 EOS 数量虽呈减少趋势,但差异无显著性($P>0.05$),肺泡灌洗液中 EOS 数量差异有显著性($P<0.05, P<0.01$),高剂量组血清及肺泡灌洗液中的 EOS 数量均有显著性($P<0.01$)。

表 2 阿魏酸钠对哮喘豚鼠血液及肺泡灌洗液中 EOS 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	EOS($\times 10^8$ /L)	
		血清	肺泡灌洗液
正常对照	8	1.76 $\pm$ 0.39	0.28 $\pm$ 0.14
模型	8	2.78 $\pm$ 0.57**	2.75 $\pm$ 1.07**
阿魏酸钠低剂量	8	2.61 $\pm$ 0.58**	2.05 $\pm$ 0.53** Δ
中剂量	8	2.34 $\pm$ 0.51**	1.80 $\pm$ 0.64** $\Delta\Delta$
高剂量	8	1.92 $\pm$ 0.43 $\Delta\Delta$	0.54 $\pm$ 0.28 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$

表 1 阿魏酸钠对哮喘豚鼠血清及肺组织中 ET 和 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ET(pg/ml)		NO(μ mol/L·g)	
		血清	肺组织	血清	肺组织
正常对照	8	95.7 $\pm$ 8.9	7.83 $\pm$ 1.24	163.8 $\pm$ 12.1	1.37 $\pm$ 0.26
模型	8	178.7 $\pm$ 13.4**	13.60 $\pm$ 2.21**	105.6 $\pm$ 14.7**	0.92 $\pm$ 0.12**
阿魏酸钠低剂量	8	165.4 $\pm$ 10.2* Δ	11.82 $\pm$ 1.84*	112.5 $\pm$ 21.5**	0.98 $\pm$ 0.09**
中剂量	8	147.2 $\pm$ 14.6* $\Delta\Delta$	9.51 $\pm$ 1.23* $\Delta\Delta$	129.2 $\pm$ 16.7** $\Delta\Delta$	1.06 $\pm$ 0.14** Δ
高剂量	8	129.8 $\pm$ 12.8* $\Delta\Delta$	8.45 $\pm$ 0.92 $\Delta\Delta$	144.5 $\pm$ 19.2* $\Delta\Delta$	1.26 $\pm$ 0.18 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$

讨 论

内皮素是强烈的支气管收缩因子,ET 合成、释放过多,既可通过释放多种炎症介质,促进白细胞黏附和平滑肌增生,引起气道炎症,又可引起支气管平滑肌痉挛。

NO 具有舒张血管、抑制血管平滑肌增殖和血小板黏附等作用,参与机体的许多生理活动及病理过程。作为信号传递分子,参与了哮喘的病理过程,一氧化氮合成酶(NOS)存在于气道上皮细胞、平滑肌细胞及内皮细胞。NO 主要由诱导型一氧化氮合成酶(i-NOS)大量合成。NO 可抑制由多种支气管收缩因子所引起的气道阻塞^[4]。

本研究结果显示,哮喘模型血清和肺组织中 ET 明显升高,NO 浓度比正常对照组降低。表明在哮喘发生发展过程中,气道炎症促使血管内皮细胞和气道上皮细胞 ET 过多合成并释放,进一步加重了气道的炎症反应和组织损伤;NO 减少,使其舒张支气管和血管平滑肌的因素减弱,导致哮喘的发作。阿魏酸钠可使血清和肺组织 ET 浓度降低,高剂量下可抑制 ET 促多种炎症介质释放的作用并减轻 ET 引起的支气管平滑肌痉挛。研究结果表明:阿魏酸钠可明显提高血清和肺组织中 NO 的含量,尤以高剂量组的作用为显著。

哮喘的另一个明显特征即气道的炎症反应,各种炎症细胞在气道内浸润、聚集,释放出多种炎性介质,使支气管黏膜分泌增多,平滑肌收缩,上皮细胞损伤,基底膜增厚。嗜酸性粒细胞在哮喘中发挥重要作用,其释放毒性蛋白和脂质代谢产物,引起气道上皮损伤和气道阻塞^[5],有资料表明:NO 通过直接抑制肥大细胞释放组胺,从而抑制白细胞迁移,并且内源性 NO 可抑制 PAF-诱导的白细胞和内皮细胞相互作用^[6]。我们的研究证明,哮喘豚鼠的血液和肺泡灌洗液中 EOS 计数增加,阿魏酸钠可明显抑制 EOS 增多,在哮喘的发生和发展过程中发挥重要作用^[7]。

我们以前的研究已经证明阿魏酸钠对抗原诱发的

豚鼠气道速发型变态反应有明显抑制作用,说明阿魏酸钠具有抗过敏性哮喘的作用。本研究表明哮喘豚鼠血液和肺组织合成或释放 ET 增多,因此加重气道炎症反应和组织损伤。NO 合成不足和 EOS 浸润,对哮喘的形成和发展具有重要影响作用。阿魏酸钠通过改变机体内的 NO 和 ET 含量,减轻 EOS 浸润,减轻哮喘症状或控制哮喘发作,从而达到治疗哮喘的目的。

参 考 文 献

- 1 谢强敏,方理本,张洪泉,主编.药理学前沿——哮喘和 COPD 的新概念及新药.北京:科学出版社,2003:3—9.
Xie QM, Fang LB, Zhang HQ, editors. Pharmacology foreground—asthma and new concept and new medicine of COPD. Beijing: Science Press, 2003:3—9.
- 2 孙云,林安平,张洪泉,等.血小板活化因子诱发豚鼠气道高反应性及阿魏酸钠对其的影响.中国药理学通报 1996;12(6):518—520.
Sun Y, Lin AP, Zhang HQ, et al. PAF-induced airway hyper-responsiveness and effects of sodium ferulate in guinea pigs. Chin Pharm Bull 1996;12(6):518—520.
- 3 叶应妩,王毓三.全国临床检验操作规程.第 2 版.南京:东南大学出版社,1997:11.
Ye YW, Wang YS. Operation regulation of national clinical examination. 2nd ed. Nanjing: Publishing Company of Southeast University, 1997:11.
- 4 Yang Q, Laporte J, Battistini B, et al. Effects of dexamethasone on the basal and cytokine-stimulated release of endothelin-1 from guinea-pig cultured tracheal epithelial cells. Can J Physiol Pharmacol 1997;75(6):576—581.
- 5 ten Hacken NH, Timens W, Van der Mark TW, et al. Nitric oxide and asthma. Ned Tijdschr Geneesk 1999;143(31):1606—1611.
- 6 Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. Clin Exp Allergy 2000;30(Suppl 1):22—27.
- 7 蒋波,楚正绪.一氧化氮与炎症.国外医学生理病理科学与临床分册 1998;18:44—47.
Jiang B, Chu ZX. Nitric oxide and inflammation. For Med Sci: Pathophysiol Clin Med 1998;18:44—47.

(收稿:2004-08-08 修回:2004-10-08)