

· 实验研究 ·

太子健 II 煎剂抗小儿哮喘复发作用机制的实验研究

厦门大学海外教育学院(361005) 赵育芳

浙江中医学院 周大兴 俞景茂

摘要】目的 观察太子健煎剂对反复诱发的哮喘豚鼠血和气道内嗜酸性粒细胞(EOS)浸润的影响,及血中嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)含量的影响。方法 将豚鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松组、太子健高剂量和低剂量组5组,后4组分别用卵蛋白致敏15d后,再用卵蛋白反复诱发,正常组用生理盐水代替,同时,正常组和模型组灌服生理盐水,其余3组分别灌服地塞米松、太子健高剂量和低剂量,予以治疗,连续15d。结果 太子健煎剂可减少血及气道内EOS浸润并降低EOS的活性,抑制其脱颗粒释放ECP等炎症介质,减轻EOS对气道上皮毒性作用。结论 太子健煎剂可以减轻气道慢性变应性炎症,具有一定的抗哮喘复发的作用。

关键词】哮喘; 儿童; 豚鼠; 太子健; 嗜酸细胞

Experimental study on mechanism of taizhijian in anti-recurring children asthma ZHAO Yu-fang*, ZHOU Da-xing, YU Jing-mao.* Overseas Education College, Xiamen University, Fujian 361005, China

Abstract】 Objective Investigating the influence of taizhijian on eosinophils in blood and airway and eosinophil cationic protein (ECP) in blood of asthmatic guinea pigs. **Methods** Forty guinea pigs were randomly divided into 5 groups. After having been sensitized with egg albumin, guinea pigs were induced to suffer asthmatic attack repeatedly with egg albumin in model group, dexamethasone (DXM) group, taizhijian large-dose group and small dose group. Guinea pigs were done with physiological saline in normal group. At the same time, guinea pigs were treated with physiological saline in normal group and model group, and those were treated respectively with DXM, taizhijian large dose and small dose in the other three groups for 15 days. **Results** Taizhijian can decrease ECP, inhibit eosinophil recruitment in airway and decrease its degranulated substances to relieve the airway lesions. **Conclusion** Taizhijian can relieve the chronic allergic airway inflammation and stop children's asthma recurrence.

Key words】 Asthma; Child; Guinea pigs; Taizhijian; Eosinophils

支气管哮喘是小儿第一位的非感染性疾病,临床常反复发作,缠绵难愈,严重影响小儿的生长发育和身心健康。所以如何在缓解期进行治疗,控制小儿哮喘的反复发作具有重要的意义。太子健以“和”法作为立方法则,从张仲景《伤寒论》的小柴胡汤化裁而来,由柴胡、黄芩、法半夏、丹参、太子参、菟丝子、浙贝母、蝉蜕、炙甘草等组成。临床用于小儿哮喘缓解期的治疗取得了显著疗效,本研究从实验角度探讨太子健抗小儿哮喘复发的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物:健康雄性DHP幼年豚鼠40只,体重(200±50)g。由浙江中医学院动物实验中心提供。

1.1.2 药品:太子健煎剂:处方药物组成:柴胡4.5g、黄芩6g、法半夏6g、丹参6g、太子参6g、菟丝子6g、浙贝母

6g、蝉蜕4.5g、炙甘草3g、大枣12g等。处方药物由浙江中医学院附属医院中药房提供。将所有药物加8倍水浸泡0.5h后,武火煎开,文火煎60min,滤出药汁;将药渣再加4倍水,煎30min,滤出药汁。将两煎药汁混合,以消毒纱布8层过滤3次,取滤后药汁浓缩(浓度1.5g生药量/L),将浓缩后的药汁分装入已消毒的瓶中,置冰箱保存备用。地塞米松磷酸钠注射液(DXM):5mg×1mL/支,由浙江中医学院附属医院西药房提供。生理盐水250mL/瓶,由浙江中医学院附属医院西药房提供。

1.1.3 主要试剂和材料:卵蛋白白片:由上海化学试剂站提供。嗜酸性粒细胞(ECP)化学发光法测定试剂盒:由天津德普公司提供。乙醇伊红稀释液:0.95L/L乙醇30mL、甘油10mL、碳酸钾1.0g、枸橼酸钠0.5g、20g/L伊红10mL,加蒸馏水至100mL,装瓶备用。

1.1.4 主要仪器:402超声雾化器(上海四菱医疗器械厂),全自动化学发光免疫检测仪(天津德普公司)。

1.2 方法

1.2.1 过敏性哮喘豚鼠模型的建立: 参照文献, 75% 酒精消毒局部皮肤后, 给模型组及中药组每只豚鼠腹腔注射 10% 卵白蛋白生理盐水溶液 1 mL 致敏, 第 15 天将致敏豚鼠置于 4 L 的玻璃钟罩内, 给予超声雾化吸入 1% 卵白蛋白生理盐水溶液激发, 每次雾化 15 s, 并在雾室中放置至豚鼠出现点头呼吸或痉挛性腹式呼吸时, 即为造模成功。隔天雾化 1 次, 共 5 次。正常对照组用生理盐水 1 mL 代替抗原液腹腔注射, 致敏第 15 天起隔天予以超声雾化吸入等容积的生理盐水。

1.2.2 分组及给药: 将豚鼠随机分成 5 组, 正常对照组, 哮喘模型组(简称模型组), 中药高剂量组, 中药低剂量组, 地塞米松组(DXM 组), 每组 8 只。致敏第 8 天起, 正常对照组和模型组予以生理盐水 2 mL 灌胃, 地塞米松组予以地塞米松 1 mg/kg 灌胃, 每日 1 次, 连续 15 d; 中药高剂量组予以太子健 30 g 生药/kg 灌胃, 中药低剂量组予以太子健 13 g 生药/kg 灌胃, 每日 1 次, 连续给药 15 d。

1.2.3 操作过程及观察指标: ①血液及支气管肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞(EOS)计数: 末次抗原激发后, 以 20% 乌拉坦 1.5 g/kg 的剂量腹腔注射麻醉豚鼠, 剪开胸腔, 摘眼球采血约 3 mL 置于空白试管中, 然后分离出气管, 结扎左主支气管后, 剪开气管, 经气管插管用 0.9% 生理盐水 5 mL 缓慢注入肺内, 保留 30 s 后回抽, 反复抽洗 3 次, 将所得的肺泡灌洗液置于试管中。取乙醇-伊红稀释液 0.38 mL 于小试管内, 分别加入血及 BALF 20 μ L, 充分混匀充入双侧计数池内, 静置 3~5 min。低倍镜下计数 10 个大放格(两侧计数池的中央和四角的大方格)内 EOS 数, 再根据公式: 10 个大方格内 EOS 数 \times 20 \times 106 = 嗜酸性粒细胞计数(个/L)。②血清中 ECP 的检测: 取 2 mL 血液置于试管中, 1 800 r/min, 4 离心 15 min, 吸取上清液, 置于 -70 冰箱保存备用。检测时将备用血清取出融化, 采用全自动化学发光免疫检测法检测。③肺组织病理学检查: 光镜切片制备: 剪取每只豚鼠左肺下叶组织, 浸泡于 10% 甲醛液中固定, 常规脱水, 石蜡包埋切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 用于常规光镜检查。光镜下在支气管肺组织区域内随机选取 4 个高倍镜视野, 计数嗜酸性粒细胞数。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料多组间均数两两比较用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性标准。使用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 太子健对哮喘豚鼠血液及 BALF 中 EOS 计数的影响: 见表 1。结果表明: 与正常组相比, 模型组血中 EOS 计数显著升高($P < 0.01$); 与模型组相比, 各治疗组血中 EOS 计数均明显降低, DXM 组、高剂量组差异均有非常显著性($P < 0.01$), 低剂量组差异有显著性($P < 0.05$); 与正常组相比, 模型组 BALF 中 EOS 计数显著升高($P < 0.001$); 与模型组相比, 各治疗组血中 EOS 计数均明显降低, DXM 组差异有非常显著性($P < 0.001$), 高剂量组、低剂量组差异

均有显著性($P < 0.01$)。

表 1 太子健对哮喘豚鼠血液及 BALF 中

组别	动物只数	EOS 计数的影响($\bar{x} \pm s$)	
		血液	BALF
正常组	8	0.76 \pm 0.19 ²⁾	0.38 \pm 0.10 ³⁾
模型组	8	1.53 \pm 0.58 ⁴⁾	1.32 \pm 0.40 ⁵⁾
DXM 组	8	0.78 \pm 0.22 ²⁾	0.42 \pm 0.17 ³⁾
低剂量组	8	0.94 \pm 0.46 ¹⁾	0.44 \pm 0.19 ²⁾
高剂量组	8	0.83 \pm 0.18 ²⁾	0.42 \pm 0.07 ²⁾

- 1) 与模型组相比 $P < 0.05$ 。
- 2) 与模型组相比 $P < 0.01$ 。
- 3) 与模型组相比 $P < 0.001$ 。
- 4) 与正常组相比 $P < 0.01$ 。
- 5) 与正常组相比 $P < 0.001$ 。

2.2 太子健对哮喘豚鼠血清中 ECP 含量的影响: 正常组 7 只, ECP(0.50 \pm 0.03) μ g/L; 模型组 8 只, ECP(0.73 \pm 0.18) μ g/L; DXM 8 只, ECP(0.53 \pm 0.06) μ g/L。结果表明: 与正常组相比, 模型组血清 ECP 含量明显升高($P < 0.01$), 与低剂量组比较差异有非常显著性($P < 0.01$), DXM 组、高剂量组差异均没有显著性($P > 0.05$)。与模型组相比, 治疗各组血清 ECP 含量均降低, DXM 组差异有非常显著性($P < 0.01$), 高剂量组差异有显著性($P < 0.05$), 低剂量组差异没有显著性($P > 0.05$)。与 DXM 组相比, 低剂量组差异有显著性($P < 0.05$), 高剂量组差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 太子健对哮喘豚鼠肺组织 EOS 浸润的影响: 模型组 8 只, EOS 计数(29 \pm 17) 个/4 个 HP; DXM 组 8 只, EOS 计数(1.8 \pm 1.2) 个/4 个 HP; 低剂量组 8 只, EOS 计数(14 \pm 11) 个/4 个 HP; 高剂量组 8 只, EOS 计数(5 \pm 5) 个/4 个 HP。结果表明: 光镜下观察支气管肺组织 EOS 浸润情况: 模型组有明显增多的 EOS 浸润, 与模型组比较, DXM 组、高剂量组 EOS 计数均明显减少($P < 0.01$), 低剂量组 EOS 计数有减少趋势, 但差异无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

支气管哮喘是一种由免疫缺陷导致的慢性变态反应性的疾病, 以嗜酸性粒细胞为主、多种炎性细胞参与及炎症介质相互作用的气道慢性变应性炎症是哮喘反复发作的主要病理学基础。气道的慢性炎症是迟发相哮喘反应(LAR)和气道高反应性(BHR)发生的基础, 迟发相哮喘反应所导致的以嗜酸性粒细胞浸润为主的型超敏反应性炎症(AI)反映了哮喘慢性气道炎症等病理生理学改变和慢性哮喘的临床特征。气道变应性炎症形成过程中的重要步骤即是循环血中的炎症细胞(EOS 为主)在黏附分子的作用下趋化和转移至气道, 活化并释放细胞因子和炎症介质, 介导局部的慢性炎症反应。

EOS 是引起气道炎症、BHR、LAR 的关键细胞,是哮喘发病中的主要效应细胞^[1]。研究已证实,外周血和痰液中的 EOS 数目增多是支气管哮喘的主要特征。EOS 数与气道反应性呈正相关,支气管肺泡灌洗液中 EOS 数目增加后,气道高反应性也随之出现^[2]。在哮喘气道炎症形成过程中,在黏附分子的黏附作用下,血中的 EOS 附壁、附内皮滚动和跨血管内皮转移至气道内,在气道内募集、活化,并释放白三烯(LST)、血小板激活因子(PAE)、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)和主要碱性蛋白质(MBP)等细胞因子和炎性介质,这些细胞因子和炎性介质直接损伤气道上皮,引发和加重炎症,导致支气管收缩和气道高反应性。因此,能否减少哮喘时气道血及 BALF 中 EOS 数目增多对评价药物的抗炎作用非常有意义^[3]。

ECP 是 EOS 释放的毒性最强的蛋白颗粒之一,是 EOS 激活的重要标志^[4]。ECP 水平的变化比 EOS 数目更能准确和直接地反映哮喘气道炎症的情况。血清 ECP 的浓度也与气道高反应性程度呈正相关^[5]。LAR 的发生不仅取决于肺组织中 EOS 的浸润数,更取决于循环中是否有足够数量激活的 EOS 被趋化到肺脏,并较快地与促泌素反应,从而脱颗粒分泌 ECP 等毒性蛋白。血清 ECP 浓度显著高于正常值者,易于受某些激发因子的刺激而导致哮喘发作。

实验结果表明,哮喘豚鼠体内 EOS 数和 ECP 水平均明显高于正常,且 EOS 数和 ECP 含量有一定的相关性。太子健不仅可以明显降低血及气道内的 EOS 数,抑制气道局部 EOS 的浸润,而且还可能通过抑制 EOS 活化并释放细胞因子和炎性介质降低血清 ECP 含量,减轻 EOS 对气道上皮的细胞毒作用,从而减轻气道慢性炎症,防止 LAR 的发生,降低 BHR,达到抗哮喘复发的目的。

参考文献

- 1 陈树宝,主编.儿科新理论与新技术.上海:上海科技教育出版社,1996.11.
- 2 李明华,殷凯生,朱栓立,主编.哮喘病学.北京:人民卫生出版社,1998.3.
- 3 Bryan SA, O Connor BJ, Matti S, et al. Effect of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyperresponsiveness, and the late-asthmatic-response. Lancet, 2000, 356 (9248): 2149-2153.
- 4 Rak S, Bjornson A, Hakonson LP, et al. The effect of immunotherapy on eosinophil subjects with asthma during natural pollen exposure. J Allergy Clin Immunol, 1991, 88(6): 878.
- 5 钟南山,徐军.哮喘发病机制及诊断新进展.中华结核和呼吸杂志,1995,18(3):136-139.

(收稿日期:2004-03-04)

作者简介:赵育芳,女,1977年6月生,助教,厦门大学海外教育学院,361005

· 病例报告 ·

宫内外复合妊娠一例

朔州市人民医院(036002) 刘丽英

患者:24岁。因停经70d,下腹痛1d,加重3h伴阴道出血,于2003年3月10日入院。患者平素月经规律,末次月经:2003年1月1日,停经40d,有恶心、呕吐、胃部不适等早孕反应,入院前1d下腹阵发性疼痛伴呕吐,继出现阴道出血,以“先兆流产”收住院。查体:血压100/60mmHg,呼吸120次/min,精神差,面色正常,无结膜苍白,腹软,下腹部压痛,移动性浊音(-)。妇科检查:外阴已婚式,阴道有少量血迹,宫颈光滑,宫口可纳一指尖,宫体大小约孕70d,触痛(+);入院前B超提示:宫内早孕。予对症、保胎治疗,观察。因病情不见好转,腹痛加重并弥漫全腹,右侧附件区压痛明显,并可触及一约6cm×7cm的包块,复查B超提示:右下腹不均质包块,腹腔积液,宫内孕;腹穿获不凝血性液体,考虑为宫内孕并妊娠黄体破裂?宫外孕?遂行剖腹探查,见腹腔有陈旧血性液体,子宫大小与停经月份相符,右侧输卵管峡部有一约3cm长的破口并活动性出血,周围有大量凝血块,

右侧卵巢有一约0.5cm的破口,行右侧输卵管切除,右侧卵巢修补,术后行支持、抗感染治疗,8d后痊愈出院。输卵管病理检查可见绒毛样组织。1个月后随访胎儿发育正常。

讨论:宫内外复合妊娠病例少见且容易误诊,文献已有报道,并提出输卵管炎症及促排卵药是其高危因素^[1]。

本病例以“先兆流产”入院,后又考虑“妊娠黄体破裂”,幸未造成不良后果。因此,在临床工作中一定要提高对本病的认识,做到早诊断、早治疗、勤观察。早孕B超时要检查双侧附件,以防误诊。

参考文献

- 1 段金良.宫内外复合妊娠4例分析.中国实用妇科与产科杂志,2000,16(7):422.

(收稿日期:2003-05-07)

作者简介:刘丽英,女,1964年10月生,主治医师,朔州市人民医院,036002