

# 太子健 II 缓解期防治小儿哮喘 作用机理的实验研究

赵育芳<sup>1</sup>, 俞景茂<sup>2</sup>, 周大兴<sup>2</sup>

(1. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361005; 2. 浙江中医学院, 浙江 杭州 310053)

**摘要:** 运用鸡卵蛋白致敏和反复诱喘的哮喘豚鼠模型, 将豚鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松组、高剂量和低剂量组 5 组, 观察太子健 II 对其血及气道内嗜酸细胞浸润和血中白介素-5 (IL-5)、嗜酸粒细胞阳离子蛋白 (ECP) 含量的影响。结果表明太子健 II 可减少哮喘豚鼠血及气道内 EOS 浸润, 降低血中白介素-5 (IL-5) 和 ECP 的水平, 说明太子健 II 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:** 小儿哮喘; 太子健 II 嗜酸细胞; 白细胞介素 5; 嗜酸粒细胞阳离子蛋白

中图分类号: R 272

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)04-0589-04

支气管哮喘是小儿常见的慢性肺部疾病, 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。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。在这方面中医药的辨证治疗相对于西医药而言具有依从性好、毒副作用小等优点, 值得探讨。

浙江省名老中医俞景茂先生的经验方太子健 II 就是依据小儿生理病理特点进行辨证论治, 临床用于小儿哮喘缓解期的预防治疗, 可有效减少发作次数甚至达到长期缓解。本次实验主要从抗哮喘豚鼠气道慢性变应性炎症的角度探讨太子健 II 防治小儿哮喘的作用机理。

## 1 材 料

### 1.1 动 物

健康雄性 DHP 幼年豚鼠 40 只, 体质量  $200 \pm 50$  g 由浙江中医学院动物实验中心提供。

### 1.2 药 品

太子健 II 煎剂: 处方药物组成: 柴胡 4.5 g, 黄芩 6 g, 法半夏 6 g, 丹参 6 g, 太子参 6 g, 菟丝子 6 g, 象贝母 6 g, 蝉衣 4.5 g, 炙甘草 3 g, 红枣 12 g 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 30 min 后, 武火煎开, 文火煎 60 min 滤出药汁; 将药渣再加 4 倍水, 煎 30 min 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

(1.5 g 生药量 / mL), 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) [5 mg × 1 mL/支 (批号: 20001223)] 和生理盐水 [250 mL/瓶 (批号: 20010116)] 均由浙江省中医学院附属医院西药房提供。

### 1.3 主要试剂和材料

卵白蛋白片: 由上海化学试剂站提供, 批号 F981130

IL-5 ELISA 试剂盒: 由深圳晶美生物工程有限公司提供, 美国公司产品, 批号 20010801

ECP 化学发光法测定试剂盒: 由天津德普公司提供, 批号 20010623

乙醇伊红稀释液: 0.95 L/L 乙醇 30 mL, 甘油 10 mL, 碳酸钾 1.0 g, 枸橼酸钠 0.5 g, 20 g/L 伊红 10 mL, 加蒸馏水至 100 mL, 装瓶备用。

### 1.4 主要仪器

402 超声雾化器: 上海四菱医疗器械厂; Model 550 酶标仪: 美国 BIO-RAD 公司; 全自动化学发光免疫检测仪 (天津德普公司)。

## 2 方 法

### 2.1 过敏性哮喘豚鼠模型的建立

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。

收稿日期: 2004-12-10

作者简介: 赵育芳 (1977-), 女, 硕士研究生。

正常对照组用等量生理盐水 1 mL 代替抗原液.

## 2.2 分组及给药

将豚鼠随机分成五组, 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, 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/d 灌胃, 中药高、低剂量组分别予以太子健 II 30 g 生药/kg/d 和 13 g 生药/kg/d 灌胃, 均每日一次, 连续给药 15 d.

## 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  $\mu$ L, 充分混匀充入双侧计数池内, 静置 3~5 min, 低倍镜下计数 EOS 数 (个/L).

2) 血浆中 IL-5 的检测: 采血约 4 mL 置于加有 EDTA-Na<sub>2</sub> 抗凝剂的试管中, 3 000 r/min, 4°C 离心 5~10 min 吸取上清, 置于 -70°C 冰箱保存备用. 检测时将备用血浆取出融化后待测, 采用 ELISA 法检测.

3) 血清中 ECP 的检测: 采血约 2 mL 血液置于试管中, 1 800 r/min, 4°C 离心 15 min 吸取上清液, 置于 -70°C 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.

4) 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% 福尔马林液中固定, 常规脱水, 石蜡包埋切片, 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四个高倍镜视野, 计数嗜酸性粒细胞数.

## 3 统计方法

1) 统计描述: 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示.

2) 统计推断: 计量资料多组间均数两两比较用方差分析. 以  $p < 0.05$  为差异显著的标准. 使用 SPSS10.0 软件进行统计处理.

## 4 结果

1) 太子健 II 对哮喘豚鼠血液及 BALF 中 EOS 计数、血浆中 IL-5 和血清中 ECP 含量的影响 (表 1). 结果表明: 与正常组相比, 模型组中 EOS 计数、血 IL-5 和 ECP 含量显著升高; 与模型组相比, 各治疗组血中 EOS 计数均明显降低, DXM 组、高剂量组均有非常显著性差异 ( $p < 0.01$ ), 低剂量组有明显差异 ( $p < 0.05$ ), 各治疗组 BALF 中 EOS 计数均明显降低, DXM 组有非常显著性差异 ( $p < 0.001$ ), 高剂量组、低剂量组均有显著性差异 ( $p < 0.01$ ), 各治疗组血中 IL-5 含量均显著降低, DXM 组、低剂量组、高剂量组均差异非常显著 ( $p < 0.001$ ); 各治疗组血清 ECP 含量均降低, DXM 组有非常显著性差异 ( $p < 0.01$ ), 高剂量组有明显差异 ( $p < 0.05$ ), 低剂量组没有明显差异 ( $p > 0.05$ ).

2) 太子健 II 对哮喘豚鼠肺组织 EOS 浸润的影响 (表 2): 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, 但无明显差异 ( $p > 0.05$ ).

## 5 讨论

中医认为, 导致小儿哮喘反复发作的原因和机理是多方面的, 肺、脾、肾三脏不足 (虚), 痰饮久伏 (痰) 是

表 1 豚鼠血液及 BALF 中 EOS 计数、血浆中 IL-5 和血清中 ECP 的含量

Tah 1 EC in blood and airway ECP and IL-5 in blood of guinea pigs

组别	动物数 (n)	EC 血液 ( $\times 10^6$ 个 /mL)	EC (BALF) ( $\times 10^6$ 个 /mL)	IL-5 (pg/mL)	ECP ( $\mu$ g/L)
正常组	8	0.76 $\pm$ 0.19 *	0.38 $\pm$ 0.10 ***	13.70 $\pm$ 0.64 ***	0.50 $\pm$ 0.03 **
模型组	8	1.53 $\pm$ 0.58 ##	1.32 $\pm$ 0.40 ###	45.97 $\pm$ 5.73 ###	0.73 $\pm$ 0.18 ##
DXM 组	8	0.78 $\pm$ 0.22 *	0.42 $\pm$ 0.17 **	14.49 $\pm$ 1.13 **	0.53 $\pm$ 0.06 **
低剂量组	8	0.94 $\pm$ 0.46 #	0.44 $\pm$ 0.19 **	15.17 $\pm$ 1.56 *** #	0.59 $\pm$ 0.05 ##
高剂量组	8	0.83 $\pm$ 0.18 *	0.42 $\pm$ 0.07 *	14.44 $\pm$ 1.71 ***	0.54 $\pm$ 0.06 #

注: 与模型组相比 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  与正常组相比 #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$

表 2 光镜下观察支气管肺组织 EOS 浸润情况

Tab 2 EC in lung tissues of guinea pigs under optical microscope

组别	动物数	EOS 计数(个/4个 HP)
模型组	8	29 ± 16.57
DXM 组	8	1.83 ± 1.22*
低剂量组	8	14.33 ± 10.67
高剂量组	8	4.67 ± 4.67*

注:正常组未见明显 EOS 浸润,与模型组相比\* \*  $p < 0.01$ .

其根本,气机失常(气)、瘀血内阻(瘀)是其发生发展过程中的主要病机,同时又有风邪(风)等易感邪气为其主要的诱发因素。如此虚实相因、表里俱病、寒热夹杂,构成小儿哮喘反复发作的主要病机。针对此病机特点,治疗宜采用“和”法综合缓调,补益肺肾、健脾化痰、祛风理气、活血化瘀,才能从总体上起到抗哮喘复发的作用。太子健 II 即是以“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、象贝母、蝉衣、炙甘草等组成,方中柴胡、黄芩性寒味苦,柴胡主升以解表和里,黄芩主降以清里;半夏性温味苦,化痰饮、降逆气;太子参、甘草性平味甘,健脾益气以扶正。在此基础上,加入象贝化痰止咳,丹参活血化瘀,蝉衣祛风散邪,菟丝子温肾纳气。综观全方,诸药合用,风、气、痰、虚、瘀兼顾,与小儿哮喘反复发作的病机特点相符。多年临床实践也证实,太子健 II 用于小儿哮喘缓解期的防治,疗效满意,临床统计 60 例三年总有效率达 62%。

现代医学研究认识到,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 I 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。EOS 是哮喘发病中的主要效应细胞,EOS 的聚集、活化和释放反应是引起气道炎症和气道高反应性的主要原因。在哮喘气道炎症形成过程中,血中的 EOS 在黏附分子的作用下,趋化至气道内,活化并释放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。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<sup>[1]</sup>。外周血和痰液中 EOS 的数目和血清 ECP 的浓度均与气道慢性变应性炎症和气道高反应性呈正相关<sup>[2]</sup>,但 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。迟发相哮喘反应(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,并较快的与促泌素反应,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。IL-5 主要由 TH<sub>2</sub> 细胞分泌,是支气管哮喘发病调节中主要的促炎因子之一,它一方面通过促进 B 淋巴细胞分化和增殖来协同 IL-4 合成 IgE,导致体内 IgE 升高;另一方面,它又是引起气道变应性炎症中 EOS 增多和活性增强的主要细胞因子,在气道炎症细胞黏附机制中起主要调节作用。大量的实验研究证实,IL-5 是 EOS 必需的生长因子<sup>[3]</sup>,它可刺激骨髓原始造血细胞,诱导 EOS 分化成熟,并且通过抑制细胞凋亡延长 EOS 的存活时间,选择性的趋化 EOS 激活并使 EOS 脱颗粒,增强 EOS 对气道上皮的细胞毒性作用。此外,活化的 EOS 也可分泌 IL-5,二者在炎症形成过程中相互作用,引发和加重气道炎症。研究已证实,哮喘患儿外周血中的 IL-5 含量、EOS 计数和血清 ECP 水平呈正相关,且无论在发作期还是缓解期均高于正常儿,所以,它们有可能成为反映气道慢性变应性炎症的重要指标<sup>[4]</sup>,因此能否减少血及 BALF 中 EOS 数目<sup>[5]</sup>、降低血中 IL-5、ECP 水平对评价药物的抗气道慢性变应性炎症作用具有一定的意义。

实验结果表明,哮喘豚鼠体内 EOS 数、IL-5 和 ECP 水平均高于正常,且三者有一定的相关性。太子健 II 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,而且还可能通过降低 IL-5 含量抑制 EOS 活化,降低血清 ECP 含量,减轻 EOS 对气道上皮的细胞毒作用。所以太子健 II 可以减轻气道慢性变应性炎症,降低气道高反应性(BHR),防止迟发相哮喘反应(LAR)的发生,达到缓解期抗哮喘复发的目的。

## 参考文献:

- [1] Rak S, Björnson A, Hakonson L P, et al The effect of immunotherapy on eosinophil subjects with asthma during natural pollen exposure[J]. *Allergy Clin Immunol* 1991, 88(6): 878
- [2] 李明华,殷凯生,朱栓立,主编.哮喘病学(第1版)[M].北京:人民卫生出版社,1998
- [3] Humbert M, Ying S, Corrigan C, et al Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines EANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and nonatopic cytokines interleukin(IL)-5, granulocyte macrophage colony-stimulating factor and IL-3[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 16: 1-8

[4] 檀卫平, 黄绍良, 麦贤弟, 等. 哮喘患儿体内 IL-5、ECP水平的变化及意义 [J]. 实用医学杂志, 2002 18( 2): 150-152

[5] Bryan SA, O' Connor B, Matti S et al Effect of recombi-

nant human interleukin-12 on eosinophils airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response [ J]. Lancet 2000, 356(9248): 2 149- 2 153.

## Experimental Study on Mechanism of Taizijian II in Anti-recurrence of Children Asthma

ZHAO Yur-fang<sup>1</sup>, YU Jing-mao<sup>2</sup>, ZHOU Da-xing<sup>2</sup>

( 1. Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China

2 TCM College of Zhejiang Province, Hangzhou 310053, China)

**Abstract** Using asthmatic model on guinea pigs in the experiment forty guinea pigs were divided randomly into 5 groups as follows normal group, model group, Taizijian II large dose group, Taizijian II small dose group and dexamethasone (DXM) group. The guinea pigs of the latter 4 groups were sensitized and induced asthmatic attack repeatedly every other day for 5 times with Egg Albumin and those of normal group were done with physiological saline. At the same time, the former 2 groups were treated with physiological saline and the latter 3 groups were treated respectively with Taizijian II in large dose, Taizijian II in small dose and DXM. And then we investigated the influence of Taizijian II on Eosinophils count (EC) in blood and airway Eosinophil Cationic Protein (ECP) and Interleukin-5 in blood of asthmatic guinea pigs. The result was that Taizijian II could decrease EC, inhibit eosinophil recruitment in airway and decrease Interleukin-5 and ECP in blood to relieve the airway lesions. So Taizijian II could relieve the chronic allergic airway inflammation in asthmatic guinea pigs and stop asthma recurrence.

**Key words** children asthma, Taizijian II, eosinophils, interleukin-5, eosinophil cationic protein

• 简 讯 •

### 厦门大学 2003年度被 SCIE、EI、ISTP三大检索系统 收入论文一览表

单 位	SCIE 篇数	EI 篇数	ISTP 篇数	总 篇数	SC收入论文按“影响因子”分类								
					Y < 1	1 ≤ Y < 2	2 ≤ Y < 3	3 ≤ Y < 4	4 ≤ Y < 5	5 ≤ Y < 6	7 ≤ Y < 8	8 ≤ Y < 9	
海洋与环境学院	22	9	4	35	19	1	2						
化学化工学院	228	74	13	315	122	45	36	12	8	4		1	
信息科学与技术学院	5	15	6	24	2	3							
生命科学学院	35	6	1	42	13	6	5	9	1	1			
数学科学学院	16	6		22	13	2	1						
物理与机电学院	37	31	10	78	12	16	9						
软件学院		1		1									
管理学院		2		2									
医学院	1			1	1								
合 计	344	144	34	520	182	73	53	21	9	5		1	

注: (1)本表中的“Y”表示“影响因子”, (2)没有“影响因子”的, 将其“影响因子”认为 < 1.0

厦门大学科技处