维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0288－04

金银花水提物对卵清蛋白致敏小鼠的抗过敏作用研究

李 斐，黎海芪

(重庆医科大学儿科学院儿童保健科，重庆 400014)

【摘 要】目的：观察金银花水提物对卵清蛋白致敏小鼠Ⅰ型变态反应的影响，为临床用于治疗儿童食物过敏症提供药理学依据。方法：观察金银花对卵清蛋白介导的热不稳定性及热稳定性小鼠被动皮肤过敏反应(PCA)的影响，及对致敏小鼠小肠 HE 染色，甲苯胺兰染色，小肠组织胺含量的影响。结果：高、中浓度组金银花水提物连续灌胃给药 10 天，可抑制卵清蛋白介导的小鼠同种热不稳定性 PCA 反应($P<0.01$)，不抑制热稳定性同种 PCA 反应($P>0.05$)。同时缓解过敏小鼠小肠炎症及肥大细胞聚集和脱颗粒现象，提高小肠固有层完整肥大细胞的百分率($P<0.01$)，使过敏小鼠小肠组织胺的含量升高($P<0.01$)，且高浓度组高于中浓度组($P<0.01$)。结论：金银花水提物对卵清蛋白致敏的小鼠Ⅰ型变态反应具有一定治疗作用。

【关键词】金银花；食物过敏；Ⅰ型变态反应；卵清蛋白

【中国图书分类法分类号】R282.705；R976 【文献标识码】 【收稿日期】2003－09－10

The study of Lonicera extract from water solution on ovalbumin－induced allergic mice model

LI Fei, et al

(*Department of Child Primary Care, College of Pediatric Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of the Lonicera on immediate hypersensitiviy, and to provide pharmacological clues for the further clinical practice. *Methods*: The effects of Lonicera on both the heat－unstable PCA and the heat－stable PCA experiments of the mice were observed, and the changes of the histamine levels in the ovalbumin－induced allergic mouse's intestines after administrating the Lonicera were detected by observing the histopathologic changes with either HE stain or toludine blue stain and measuring the levels of histamine in the intestines with a fluorescent method. *Results*: The high and the middle coneatracions of the Lonicera could inhibit the heat－unstable PCA activity in the mice($P<0.01$)instead of the heat－stable PCA activity ($P>0.05$). The high and middle concentracions of the Lonicera were significantly effective, in increasing the percentage of the intact intestinal mast cells($P<0.01$)by mitigating the inflammation of the intestine in HE stain and reducing the releasing of granule and aggregation of the mast cells in the toludine blue stain(<0.01). The high concentracion was significantly different from the middle ($P<0.01$). *Conclusion*: The Lonicera might have a potential to treat the ovalbumin－induced immediate hypersensitivity in a murine model.

【Key words】Lonicera; Food allergy; Immediate hypersensitivity; Ovalbumin

儿童食物过敏的世界发病率为 5%～10%，有逐年上升的趋势。食物过敏严重影响儿童尤其是婴幼儿的身心健康。但本病尚无有效治疗手段，避免接触食物致敏原是目前防止本病唯一有效的方法。然而，在临床中难以避免所有的食物致敏原，所以儿童食物过敏的治疗仍是各国探讨的内容之一。传统中医药作为食物过敏的补充和替代疗法，已逐渐受到国内外学者的重视。中药金银花是传统的清热解毒药，具有杀菌、抑制病毒等多种药理活性[1]，但金银花在治疗食物过敏症方面的药理研究尚未见报道。基于食物过敏症的发病机理与Ⅰ型变态反应有密切关系，本研究观察卵清蛋白(OVA)所致的 BALB/c 小鼠Ⅰ型变态反应的影响，以期为临床食物过敏的治疗提供一定临床依据。

1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂

药物来源：金银花原产地贵州，经重庆医科大学药学系鉴定为黄褐毛忍冬属。

水提物的制备：按照传统中药煎剂制备方法取药 100g，

作者介绍：李 斐(1976－)，女，博士生，
主要研究方向：儿童营养及儿童食物过敏。

维普资讯 http://www.cqvip.com

加入双蒸水 500ml,浸泡 20min 后,加热煎煮至 150ml 后,用纱布滤去药渣,再用文火将该煎剂浓缩为 100ml 的浸膏,分装于无菌小瓶,-20℃保存备用,2 周内有效。100g 生药制成 100ml 定为 100% 浓度,经预实验药物用药浓度分为高(100%)、(50%)、低(25%)3 个浓度。

试剂:卵清蛋白(ovalbumin OVA)(Grade V sigma 公司);$AL(OH)_3$(sigma 公司);伊文思兰(Evans blue)(上海化学试剂采购供应站进口分装);甲苯胺兰(toluidine blue)(sigma 公司);邻苯二甲醛(0-phthaladehyde OPT)(Fluka 公司);磷酸组织胺(中科院生物化学所)。

动物:无鸡蛋喂养的 6 周雌性 BALB/c 纯系小鼠(重庆医科大学动物实验中心)。

1.2 实验方法

1.2.1 金银花水提物作用的小鼠被动皮肤过敏反应实验(PCA)

1.2.1.1 抗血清制备[2]:

取 BALB/c 小鼠 10 只,第 1 天使用 10μgOVA 及 1mg$AL(OH)_3$ 的无菌生理盐水(NS)0.5ml 腹腔注射进行基础致敏,第 15 天使用含有 10μgOVA 的无菌生理盐水 0.5ml 腹腔注射进行强化致敏。第 20 天摘除小鼠眼球取血,离心后收集并分装抗血清,血清不进行加热处理的为 A 管,血清放置于 56℃水浴箱内加热处理 3h 的为 B 管。A、B 两管血清均置-20℃冰箱保存备用。

1.2.1.2 小鼠热不稳定 PCA 反应检测[3](heat-unstable PCA activity)

随机选取小鼠 32 只,按照灌服不同浓度的金银花水提物分为高、中、低三个浓度组,每日每只小鼠灌服 0.3ml/g 体重,2 次/日,共 10 天,对照组给予等量的生理盐水(NS)。给药第 8 天于小鼠两耳廓分别皮内注射 A 管抗血清各 20μl;于实验末次灌胃给药后 1h 小鼠尾静脉注射含 1%OVA 的 0.5% Evans blue 1ml/(kg·只),1h 后断颈处死小鼠。剪碎双耳,置丙酮:生理盐水 5ml 中浸泡过夜。次日离心,取上清。于 610nm 处测定光吸收度(OD 值)。

1.2.1.3 小鼠热稳定 PCA 反应检测[4](heat-stable PCA activity)

另选小鼠 32 只,如上分组并灌胃给药。于实验末次给药后 1h 于小鼠两耳廓分别皮内注射 B 管抗血管各 20μl,2h 后小鼠尾静脉注射上述含 1%OVA 的 0.5% Evans blue 混合液 1ml/(kg·只),1h 后颈处死小鼠。剪碎双耳,处理同上,测定 OD 值。

1.2.2 金银花水提物对 OVA 致敏小鼠局部肠道的影响

1.2.2.1 动物分组及模型建立:

分组:取 BALB/c 小鼠 40 只[2],按照肠道激发后灌服不同浓度的金银花水提物分为高(H 100%)、中(M 50%)、低(L 25%)剂量组,激发后不给药组(Ch),以及正常小鼠对照组 CNS。

OVA 致敏小鼠模型建立及金银花干预:按前述 1.2.1.1 的方法,于第 1 日和第 15 日对 H、M、L、Ch 组小鼠进行基础致敏和强化致敏,正常对照组(C)小鼠腹腔注射无菌生理盐水 0.5ml。各组小鼠经基础致敏和强化致敏后第 5 日、9 日、13 日、15 日以 OVA 生理盐水溶液 0.5ml(OVA 浓度为 1mg/ml)灌胃对 Ch、H、M、L 组小鼠进行首次激发,正常对照组(C)同时以等量生理盐水灌胃。第一次灌服 OVA 后 4h 各组小鼠灌服相应浓度的金银花水提物,给药剂量及时间同 1.2.1.2。Ch 组、C 组小鼠灌服等量生理盐水。

1.2.2.2 小肠苏木素—伊红(HE)染色及甲苯胺兰(toluidine blue)染色

于末次激发后 1h,断颈处死小鼠,取空肠 0.5cm 固定,采用常规 HE 染色及甲苯胺兰染色方法处理标本。

1.2.2.3 小肠组织中组织胺含量测定

于末次激发后 1h,断颈处死小鼠,取小鼠 Treitz 韧带以下 5cm 小肠,小肠组织中组织胺含量测定参照文献[2,5]。

1.3 统计学处理

采用 SAS6.12 统计软件包处理。各组数据经方差齐性检验提示方差不同。组间均数比较采用 SNK 检验,$P<0.05$ 提示数据间差异有显著性。

2 结 果

2.1 小鼠同种 PCA 反应检测

各组小鼠热不稳定同种 PCA 反应检测显示,高(0.275±0.033)、中(0.294±0.08)浓度组金银花水提物耳廓浸液的吸光度(OD)值低于对照组(0.588±0.050)和低剂量组(0.553±0.138)($P<0.01$),其余各组间 OD 值无统计学差异($P>0.050$);小鼠热稳定 PCA 反应检测显示,各组间小鼠耳廓浸液 OD 值均无统计学差异(高 0.085±0.026,中 0.094±0.018,低 0.092±0.009),对照 0.085±0.025)($P>0.05$)。

2.2 小肠组织形态学观察

小鼠小肠 HE 染色显示,激发组小肠绒毛上皮细胞出现明显坏死、脱落等炎症改变;金银花高、中浓度组示小肠炎症改善,小肠上皮脱落、坏死减少;金银花低浓度组小鼠小肠炎症较激发组无改善,提示低浓度金银花水提物对小肠过敏炎症无明显缓解作用。正常对照组小鼠小肠组织形态结构完整,无明显炎症改变(图 1、2)。

同时,甲苯胺兰染色显示激发组和金银花低剂量组的小鼠小肠肥大细胞聚集,多数肥大细胞胞膜破裂,轮廓不清,并向外排除颗粒;金银花水提物高、中浓度组小鼠小肠固有层肥大细胞聚集及脱颗粒现

维普资讯 http://www.cqvip.com

象缓解;未激发组小鼠小肠固有层肥大细胞胞膜完整,轮廓清晰,大部分不脱颗粒,少见聚集现象(图3、4)。同时各组小鼠 10×100 倍镜下每只小鼠随机计数 100 个视野,每组均观察 8 张小鼠切片,计算完整肥大细胞的百分率,提示金银花高(79.25% ± 5.34%)、中(78.50% ± 4.17%)浓度组对致敏小鼠小肠肥大细胞脱颗粒有抑制作用(激发组 21.13 ± 5.99%,正常对照组 89.25 ± 5.25%)($P<0.01$),低浓度组(22.88 ± 7.25%)抑制作用不明显($P>0.05$)。

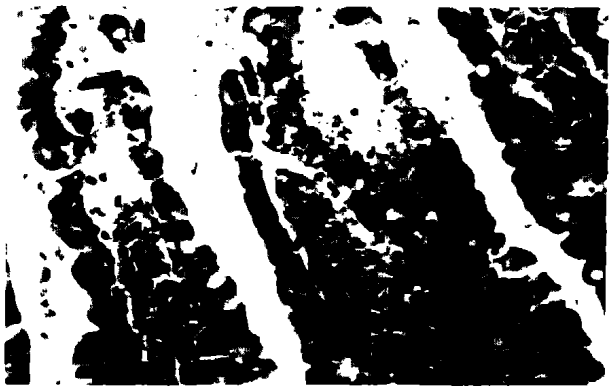


图 1 OVA 过敏小鼠肠道激发组小肠 HE 染色(10×40)
可见小肠绒毛上皮细胞坏死、脱落明显,炎症反应明显



图 2 正常对照组小肠 HE 染色(10×40)
小肠上皮细胞完好,未见明显炎症反应

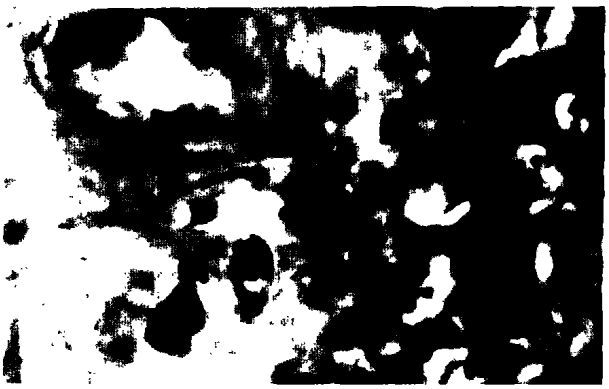


图 3 OVA 过敏小鼠肠道激发组 甲苯胺兰染色(10×100)
可见小肠固有层肥大细胞积聚,肥大细胞表面欠光滑,多数肥大细胞脱颗粒



图 4 正常对照组 甲苯胺兰染色(10×100)
小肠固有层罕见肥大细胞积聚及肥大细胞脱颗粒现象

2.3 过敏小鼠小肠组织中的组织胺测定

金银花水提物高(148.47 ± 8.39ng/0.1g 组织)、中(128.68 ± 8.61ng/0.1g 组织)浓度组每 0.1g 小鼠小肠组织中组织胺的含量高于激发组(89.78 ± 9.33ng/0.1g 组织)($P<0.05$),但均低于未激发组(168.46 ± 9.18ng/0.1g 组织)($P>0.05$),且高、中、低(95.22 ± 9.46ng/0.1g 组织)浓度组间小鼠小肠组织胺含量的差异均有统计学意义($P<0.05$),提示金银花水提物高、中浓度组对过敏小鼠小肠肥大细胞组织胺的释放有抑制作用,且这种抑制作用呈剂量依赖性。

3 讨 论

3.1 金银花水提物对 OVA 特异性 IgE、IgG1 的影响

食物过敏症是婴幼儿期的常见病,主要以Ⅰ型变态反应为主。研究表明,抗原特异性的 IgE、IgG1 均可介导小鼠皮肤被动致敏反应[4,6]。食物致敏原进入体内后主要通过血清中游离 IgE 抗体与肥大细胞的 FcεRI 受体结合,导致肠道中肥大细胞脱颗粒,释放组织胺,介导小肠炎症;此外,血清中的 IgG1 抗体通过与肥大细胞的 FcγRⅢ受体结合,也可导致肥大细胞脱颗粒,部分参与Ⅰ型变态反应对靶器官的损伤作用。且在加热状态下,游离 IgE 会失去与肥大细胞 FcεRI 受体结合的功能,此时,只有 IgG1 参与Ⅰ型变态反应[3]。PCA 试验是验证Ⅰ型变态反应的经典药理学试验。被动注射了抗原特异性 IgE 或 IgG_1 的小鼠,当再次受到抗原攻击时,抗原特异性的 IgE 或 IgG_1 可与肥大细胞结合,导致小鼠皮肤血管通透性增高,从而可使注入小鼠体内的 Evans blue 染料漏出。通过测量染料的光吸收度值即

维普资讯 http://www.cqvip.com

可间接反映致敏小鼠体内抗原特异性 IgE、IgG1 的含量。本研究结果显示在热不稳定 PCA 反应中，采用 OVA 致敏小鼠可使 OVA 特异性 IgE 升高，高、中浓度金银花水提物组小鼠耳廓注入同种抗血清后，其耳廓浸液的 OD 值低于对照组，提示金银花可能通过降低特异性 IgE 而有抗过敏作用，但低浓度组无明显抗过敏作用。在热稳定 PCA 反应中各组 OD 值均无明显改变，即金银花水提物对特异性 IgG1 无明显影响。热不稳定和热稳定 PCA 实验，提示金银花水提物可能通过减少抗 OVA 特异性 IgE 抗体的产生从而对抗Ⅰ型变态反应。

3.2 金银花水提物对过敏小鼠小肠肥大细胞组织胺释放及炎症的影响

组织胺储存于肥大细胞、嗜碱性粒细胞等效应细胞里，是Ⅰ型变态反应时导致组织损伤的重要炎症介质之一。食物过敏时，过敏机体的小肠肥大细胞脱颗粒，释放组织胺介导小肠炎症，且肥大细胞组织胺释放量与炎症严重程度密切相关。本研究结果显示金银花高、中浓度组对过敏小鼠小肠炎症有明显缓解作用(小肠 HE 染色)，对 OVA 介导的小肠肥大细胞脱颗粒和聚集现象也有缓解(甲苯胺兰染色)，提示抑制肥大细胞的组织胺释放可能是金银花水提物的抗炎机制之一。采用组织胺荧光测定法测定不同处理组间小肠中组织胺的含量，进一步明确金银花水提物对过敏小鼠小肠肥大细胞的组织胺释放有抑制作用，且这种抑制呈现剂量依赖性。说明抑制过敏小鼠小肠效应部位的肥大细胞组织胺释放，缓解组织胺所致小肠炎症可能是金银花水提物抗 OVA 所致食物过敏的又一作用途径，但是金银花是否还通过其他途径发挥抗炎作用尚需进一步研究。

中医理论认为食物过敏涉及“湿症”、“风症”、“湿热”范畴，用药多以清热解毒、疏风燥湿为主。中药金银花是传统的清热解毒药，具有潜在的抗过敏作用。本文研究证实一定浓度的金银花水提物可用于治疗抗过敏，其作用机制有待深入研究。

参 考 文 献

[1] 骆和生，罗鼎辉. 免疫中药学——中药免疫药理与临床[M]. 北京：协和医科大学、北京医科大学联合出版社，2000：182－185.

[2] Halteren AGS, Cammen MJF, Biewenga J. IgE and mast cell responses on intestinal allergen exposure: A murine model to study the onset of food allergy[J]. J Allergy Clin Immunol, 1997;99:94－99.

[3] 寇俊萍，庄书斐，唐新娟. 丝瓜藤醇提物抗炎和抗过敏作用的研究[J]. 中国药科大学学报，2001;32(4):293－295.

[4] Mauro ELF, Coffman RL, Abrahamsohn IA. Cutting edage: mouse IgG1antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL－4 and IL－12[J]. J Immunol, 1999;163:3572－3576.

[5] 窦淑筠，符云峰. 血及组织中组织胺的荧光测定法[J]. 中华医学检验杂志，1981;4(2)100－102.

[6] 胡学军，骆和生，吴 谦. 去风清肺口服液抗Ⅰ型变态反应的实验研究[J]. 广州中医药大学学报，1999;16(1):45－48.

(上接第 265 页)糖 3.4mmol/L，氯化物 118.6mmol/L。

入院后当天便给予静脉内免疫球蛋白治疗(0.4g/kg/d×5d)。治疗后第 2 天，患者即感双足趾可活动；第 5 天双足跖屈肌力 IV 级，可走平路，感觉平面由 T8 降至 T10；第 7 天感觉平面至 T11。

2 讨 论

目前，根据国内外的报道，吉兰－巴雷综合征的变异型有：Fisher 综合征，咽－颈－臂无力型，截瘫型，睑下垂型，颅神经型，急性自主神经病，轴突型，共济失调型及急性背痛型等，其中以 Fisher 综合征最常见，其它变异型均很少见。

本文报道的该患者表现为双下肢无力，双上肢肌力正常，四肢腱反射消失。大小便正常。存在传导束型感觉障碍，但脊髓 MRI 正常。周围神经电生理有神经传导速度减慢，F 波及 H 反射异常。脑脊液存在蛋白细胞分离。再根据其病程演变，临床诊断截瘫型吉兰－巴雷综合征成立。

根据国外的报道，截瘫型吉兰－巴雷综合征的临床特点为：双下肢无力，腱反射消失；可伴有下肢深浅感觉障碍，但无感觉障碍平面。上肢、面肌及呼吸肌不受影响，大小便正常。下肢神经电生理异常。脑脊液存在蛋白细胞分离。该病例除存在传导束型感觉障碍平面外，其余符合其描述的临床特点。我们认为，该患者存在传导束型感觉障碍平面提示合并有部分脊髓损害。

吉兰－巴雷综合征可能为自身免疫发病机制，其病变主要侵犯脊神经根、脊神经及颅神经，但病理发现有时也可累及脊膜、脊髓及脑部。因此，临床上出现部分或轻度脊髓损害表现完全是可以的。