DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.03.012

雷公藤甲素对哮喘动物模型气道反应性的作用及机理

王长征 郭先健 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所)重庆,630037

提 要 用卵白蛋白致敏和激发豚鼠,形成哮喘动物模型(哮喘组)。用雷公藤甲素(简称"雷公藤组")处理哮喘模型后,测定以上二组和正常对照组豚鼠对组织胺的气道反应性、支气管肺泡灌洗液(BALF)中的嗜酸性粒细胞(Eos)绝对计数、低密度Eos(HEos)百分比以及BALF中的嗜酸性粒细胞活力增强活性(EVEA)。发现哮喘组气道反应性非常显著高于正常组($P<0.001$)、雷公藤组($P<0.01$),雷公藤组显著高于正常组($P<0.05$)。而且,哮喘组Eos绝对计数和HEos%均与气道反应值(PC_{20}值)显著相关($r=-0.76$和-0.88,$P<0.05$和0.01)。雷公藤甲素处理不能抑制哮喘模型肺内的Eos聚集,但却降低HEos%至正常组水平。哮喘组BALF EVEA显著高于对照组、雷公藤组。哮喘组BALF EVEA与HEos%呈显著的正相关($r=0.75$,$P<0.05$)。以上结果表明,雷公藤甲素具有降低哮喘动物模型气道反应性的作用,其机理可能与减少"活化"的HEos有关。雷公藤甲素可能有潜在的临床应用价值。

关键词 哮喘;动物疾病模型;嗜酸性粒细胞;雷公藤

中图法分类号 R562.2505

雷公藤属卫矛科植物,作为一种免疫抑制剂,已被用于多种疾病的治疗,如肾病综合征、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等。支气管哮喘有明显的免疫功能失调,包括CD4/CD8 T细胞比例升高,Th_2细胞活化,Th_2样的细胞因子,即IL-4、IL-5、IL-3和GM-CSF产生增多。这些细胞因子具有促进嗜酸性粒细胞(Eos)分化、成熟和活化的作用,是哮喘气道炎症和气道高反应性(BHR)的重要原因。雷公藤甲素能抑制T细胞的增殖和CD25表达[1]。国内也有用雷公藤治疗哮喘的报道[2]。但雷公藤是否影响哮喘气道反应性尚不清楚。本文就雷公藤甲素对哮喘动物模型气道反应性的作用及机理做初步研究,报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物处理

选健康豚鼠27只(重量400~500 g),雌雄不拘,随机分为以下几组:

1.1.1 哮喘组(AG) 在第1天和第8天,将1%卵白蛋白(OA,溶于生理盐水,上海化学试剂采购站进口分装)10 ml加入402型超声雾化器(上海合力医用器械厂),给豚鼠用简易面罩吸入10 min(约0.8 ml/min)。在第16~18天,将豚鼠置密闭容器内,用2%OA气雾进行激发,使动物暴露在OA气雾中15~30 min直至出现哮喘样发作为止。激发前45~60 min给予苯海拉明10 mg/kg kw ip,预防OA激发导致动物死亡。第19、20天用1%OA激发,不用苯海拉明。在第21天测定气道反应性。

1.1.2 对照组(CG) 按哮喘组的方法,用生理盐水代替OA处理动物。

1.1.3 雷公藤甲素组(以下简称"雷公藤组")(TG) 按哮喘组方法处理动物。从第14天开始,用胃管给动物灌服雷公藤甲素8 μg/(kg·d)处理,连续一周。同时,按哮喘组的方法用OA激发动物,在第21天测定气道反应性。

1.2 测定气道反应性

按文献[3]的方法测定。

1.3 支气管肺泡灌洗

经颈总动脉放血处死动物后,立即用冰冷Hanks液灌洗8次,每次5 ml。前两次灌洗的支气管肺泡灌洗液(BALF)回收后,用于计细胞总数、Eos绝对计数和细胞分类。将回收全部BALF 400×g 4℃离心10 min收集沉淀的细胞,重悬于比重1.070的perecoll液(含10%小牛血清)1 ml。

1.4 BALF Eos密度分布分析

在10 ml离心管中依次加入比重为1.100、1.095、1.090、1.085、1.080的perecoll液(瑞典Pharmacia产品)各1.5 ml,最后加入上述细胞悬液。用960×g 20℃离心20 min。离心完毕用细塑料管插入离心管分别回收不同比重交界面的细胞层。用Eos稀释液进行Eos绝对计数。

1.5 BALF Eos活力增强活性(EVEA)测定

按文献[4]的方法,从经多粘菌素B处理的豚鼠腹腔渗出液中分离Eos,用RPMI 1640液(含10%的小牛血清)调浓度为1.5×10^6/ml。取75 μl Eos悬液和75 μl无菌的BALF加至96孔细胞培养板中。对照加入75 μl 1640液置37℃、5%CO_2孵箱培养48 h后,用台盼蓝检查Eos活力。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39470326

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 气道反应性测定

哮喘组－log PC_{20}值(1.50±1.80)非常显著低于正常组(0.54±0.80，$P<0.001$)和雷公藤组(0.70±0.92，$P<0.01$)。雷公藤组显著低于正常组($P<0.05$)。

2.2 BALF 的细胞成分分析

BALF 细胞成分分析表明哮喘组的细胞总数、Eos 的比例和绝对计数均非常显著地高于正常对照组($P<0.001$)。而雷公藤组显著高于正常组($P<0.001$)，与哮喘组差异不明显($P>0.05$)。结果见表 1。

表 1　哮喘组、正常组和治疗组 BALF 的细胞成分比较

Tab 1　The cell profile in broncho-alveolar lavage fluid

Group	n	Eos count (10^5)	Total cell (10^6)	Catalogue (%)			
				AM	Eos	Lym	Neu
CG	11	0.51±1.90	0.56±1.52	85.4±2.7	6.0±1.8	2.6±0.9	5.9±1.0
TG	8	2.01±0.72※※	1.15±0.19※※	78.1±5.7※	16.2±6.3※※	1.1±0.6	4.3±1.1
AG	8	2.06±1.16※※	1.12±0.19※※	72.7±4.6※	18.9±5.9※※	2.2±1.1	6.5±2.0

AM：alveolar macrophages；Lym：lymphocytes；Neu：neutrophils；※：$P<0.05$ *vs* CG；※※：$P<0.001$ *vs* CG

2.3 BALF HEos

本文定义 Eos 比重≥1.095 为正常密度 Eos(NEos)，小于此比重为低密度 HEos。哮喘组 BALF HEos%显著高于正常组、雷公藤组($P<0.001$)。正常组和雷公藤组之间差异显著($P<0.05$)。结果见图 1。

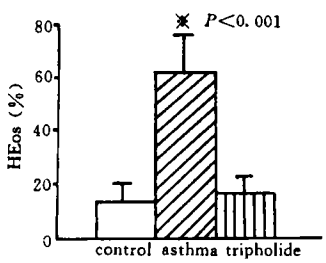


图 1　支气管肺泡灌洗液中低密度嗜酸性粒细胞(%)

Fig 1　The percentage of hypodense eosinophils in BALF

2.4 BALF Eos、HEos 与气道反应性的相关性

哮喘组 BALF 中 Eos 绝对计数和 HEos 的比例均与气道反应性 PC_{20}值呈显著负相关($r=-0.76$ 和 -0.88，$P<0.05$ 和 <0.01)。正常组和雷公藤组 BALF 中 Eos 计数及 HEos 比例均与 PC_{20}值无显著的相关性。结果见表 2。

表 2　BALF Eos 和 HEos 与 PC_{20}的相关系数(r)

Tab 2　The correlation coefficient of PC_{20} with the number of eosinophils and the percentage of hypodense eosinophils in BALF

Group	BALF Eos	BALF HEos
CG	0.33	−0.47
TG	−0.45	−0.56
AG	−0.76※	−0.88※※

Test for correlation coefficient，※：$P<0.05$；※※：$P<0.01$

2.5 哮喘组、对照组和雷公藤组 BALF EVEA 比较

2.5.1　哮喘组 BALF EVEA 显著高于对照组和雷公藤组($P<0.05$)。结果见图 2。

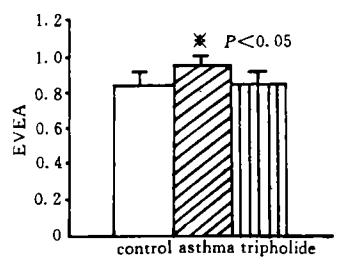


图 2　支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞活力增强活性

Fig 2　The eosinophil viability enbancing activity in BALF

2.5.2　哮喘组 BALF EVEA 与 HEos%呈显著的正相关($r=0.75$，$P<0.05$)。

3 讨论

气道高反应性是支气管哮喘的重要病理生理特征。气道炎症可造成气道反应性升高，是哮喘难治的重要原因。激素是目前有效的治疗药物，但因其副作用而不宜长期使用。近年国外用免疫抑制剂，如环胞素 A、氨甲喋啶治疗哮喘，尤其是难治性哮喘取得一定的疗效。但这些药物有效剂量大，副作用多，使用受限。国内来茶云等[2]用雷公藤治疗哮喘可明显改善中－重度哮喘患者的症状和最大呼气流速(PEFR)。雷公藤甲素是从雷公藤中提取的三环二萜类雷公藤内酯，具有抑制淋巴细胞增殖和 IL-2 受体表达的作用[1]。本研究表明，雷公藤甲素显著地降低豚鼠哮喘模型的气道反应性，为雷公藤治疗哮喘提供了理论依据。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Eos是哮喘气道炎症的关键效应细胞，但Eos与气道反应性相关性尚有争议。Ishida等[5]发现，用血小板活化因子拮抗剂处理哮喘模型可显著降低气道反应性，却不能清除肺内的Eos增多。同样，本研究表明雷公藤甲素能降低哮喘气道反应性，但不能抑制肺内Eos聚集。虽然雷公藤组BALF Eos绝对计数与哮喘组差异不显著，但HEos百分比却显著低于哮喘组，与正常组差异不显著。提示雷公藤甲素减少HEos的产生，可能是降低气道反应性的重要机理。

HEos是沉淀密度低于正常Eos的一组细胞亚群。HEos在代谢、功能上比NEos有更明显的活化倾向[6]。一般认为HEos是"活化"状态的Eos。在体内IL-5、IL-3、GM-CSF等细胞因子是Eos的活化剂，能刺激NEos转变为HEos。哮喘组BALF中EVEA显著高于对照组和雷公藤组。哮喘BALF的EVEA主要成分是IL-5[7]。哮喘组BALF EVEA与BALF HEos%呈显著正相关，提示EVEA是HEos产生的重要原因。实验动物用IL-5处理，能显著升高气道反应性，而致敏豚鼠用抗IL-5抗体处理后可显著降低气道反应性[8]，表明IL-5是参与气道反应性形成的重要细胞因子。雷公藤组的HEos和BALF EVEA均有显著降低，提示雷藤组甲素可能通过抑制"IL-5样"的活性和Eos的活化，降低气道反应性。

本实验为临床防治哮喘提供了一条新的可能途径。临床使用的疗效仍有待实践的检验。

参考文献

1 杨四旬，谢蜀生，胡国俊等. 雷公藤甲素对人扁桃体淋巴细胞表面IL-2受体表达的抑制作用. 中国免疫学杂志，1993；9：189

2 来茶云，杨朝喜，黄　彤等. 雷公藤多甙治疗重型，偏重型小儿支气管哮喘的临床疗效观察. 实用儿科杂志，1987；2：28

3 王长征，王顺朝，郭先健. 豚鼠哮喘模型的气道反应性测定. 第三军医大学学报，1994；16(4)：277

4 王长征，王顺朝，郭先健. 哮喘患者血清嗜酸性细胞趋化活性测定. 上海免疫学杂志，1993；13(6)：349

5 Ishida K, Thomson RJ, Beattie LL *et al*. Inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, but not acute hypoxia nor airway eosinophilia by an antagonist of platelet-activating factor. J Immunol，1990；144：3907

6 王长征. 低密度嗜酸性细胞(综述). 国外医学：免疫学分册，1995；18(1)：14

7 Ohnishi Sur S, Collins DS. Eosinophil survival activity identifiied as interleukin-5 is associate with eosinophil recruitment and degranulation and lung injury twenty-fours after segmental antigen lung challenge. J Allergy Clin Immunol，1993；92：607

8 Van Osterhout AJM, Ladenius ARC, Sarelkoul HFJ *et al*. Effect of anti-IL-5 and IL-5 on airway hyperreactivity and eosinophils in guinea pigs. Am Rev Respir Dis，1993；147：548

(收稿：1995-11-07；修回：1996-05-10)

(编辑　沈锡庚、王　红)

Effects of tripholide on airway responsiveness in asthma in guinea pigs

Wang Changzheng, Guo Xianjian (Research Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract Guinea pig model of asthma was established with the sensitization of the animals with aerosolized ovalbumin. A group of asthmatic guinea pigs were treated with tripholide. It was found that the airway responsiveness to histamine was markedly higher in the asthmatic group than in the control. The total cell count, absolute eosinophil count, percentage of hypodense eosinophils and the level of eosinophil viability enhancing activity in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were significantly higher in the asthmatic group than in the control. The percentage of hypodense eosinophils and absolute eosinophil count were in close correlation of airway responsiveness ($r=-0.76$ and -0.88, $P<0.05$ and 0.01 respectively). Treatment of the asthmatic guinea pigs with tripholide (8 μg/kg, given orally for 7 days) significantly reduced the airway responsiveness and decreased the percentage of hypodense eosinophils and the level of eosinophil viability enhancing activity but eosinophilia in BALF was not affected. It was concluded that tripholide exercises its effects to decrease airway responsiveness in asthma through its action to reduce active hypodense eosinophils.

Key words asthma; eosinophil; tripholide; guinea pig

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net