

地肤子 70 % 醇提物抑制速发型及迟发型变态反应

戴 岳 夏玉凤 陈海标 松田秀秋¹ 久保道德¹ (南京 210038 中国药科大学中药药理教研室;¹ 日本 近畿大学药学部)

摘要 目的:研究地肤子 70 % 醇提物对速发型变态反应及迟发型变态反应(DTH)早期相和后期相的抑制作用,探讨其可能的作用机制。方法:体外试验中,分别将地肤子醇提物与大鼠腹腔肥大细胞或离体豚鼠回肠预温孵,观察其对 compound 48/80 诱导肥大细胞释放组胺(荧光法)及 5-HT 诱导豚鼠回肠收缩的影响;在 SRBC 和 PC 诱发的小鼠 DTH 模型,将地肤子醇提物及其总皂苷于抗原攻击后给药,观察其对 DTH 效应相早期和后期反应的作用。结果:地肤子醇提物浓度依赖性抑制大鼠腹腔肥大细胞释放组胺,对 5-HT 所致豚鼠回肠收缩亦具有一定的抑制作用;地肤子醇提物及其总皂苷均能抑制 DTH 效应相的早期和后期反应,且对早期反应的作用强于对后期反应。结论:地肤子可能主要通过稳定肥大细胞膜,减少组胺、5-HT 等过敏介质的释放抑制速发型变态反应及 DTH 效应相的早期反应,其对 DTH 后期反应的抑制作用则可能与抗炎作用有关,地肤子皂苷为其抑制 DTH 的有效成分。

关键词 地肤子;速发型变态反应;迟发型变态反应;5-羟色胺;肥大细胞

Inhibition of Immediate and delayed type hypersensitivity by the 70 % ethanolic extract from Fructus Kochiae Scopariae

Dai Yue(Dai Y), Xia Yufeng(Xia YF), Chen Haibiao(Chen HB), et al(Dept. of Pharmacology of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the inhibitory activities of the 70 % ethanolic extract from Fructus Kochiae Scopariae (FKS) on the immediate and the early and late phases of delayed type hypersensitivity (DTH), and explore its mechanisms of action. **METHOD:** In vitro, FKS was pre-incubated with rat peritoneal mast cells and isolated guinea pig ileum, respectively. Its effects on histamine release elicited by compound 48/80 and ileum constriction by 5-HT were observed. In mouse DTH models upon challenge with SRBC or PC, the effects of FKS and total saponin isolated from it on the early and late phases were studied by oral administration after antigen challenge. **RESULTS:** FKS produced a concentration-dependent reduction of histamine release from rat peritoneal mast cells and showed an inhibitory tendency on the guinea pig ileum constriction. Furthermore, FKS and its saponin significantly suppressed the two phases of DTH in mice, which were stronger on the early phase than on the late one. **CONCLUSION:** These findings indicated that FKS inhibited immediate hypersensitivity and the early phase of DTH mainly due to its stabilization of mast cell membrane and reduction of release of histamine, 5-HT and other anaphylactic mediators, and inhibited the late phase of DTH maybe due to its anti-inflammatory activity. Saponin was the active component of FKS responsible for its inhibition on DTH.

KEY WORDS Fructus Kochiae Scopariae, immediate type hypersensitivity, delayed type hypersensitivity, 5-HT, mast cell

地肤子为藜科植物地肤 *Kochia scoparia* (L.) *schard* 的果实,具有清热利湿、止痒、利尿等功效。地肤子及以其为主的复方用于治疗瘙痒、湿疹等变态反应性皮肤病^[1],其水提物降低小鼠单核巨噬系统的吞噬功能^[2],70 % 醇提物抑制炎症和 I、III、IV 型变态反应,并对 compound 48/80 诱导的小鼠搔抓反应呈现显著的抑制作用,所含皂苷成分为其止痒、抗炎及抑制 I 型变态反应的有效成分^[3~5]。本文进一步研究地肤子醇提物对速发型和迟发型变态反应的抑制作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

ICR 小鼠,18 ~ 22g(南京中医药大学实验动物中心);SD

大鼠,180 ~ 200g(中国药科大学实验动物中心)。

1.2 药品与试剂

地肤子(Fructus Kochiae Scopariae, 南京市药材公司) 经 10 倍量 70 % 乙醇提取两次,合并滤液,回收乙醇后水浴中浓缩蒸干,研成粉末,收率为 13.6 %;总皂苷的提取方法参见文献^[2],收率为 3.33 %;绵羊红细胞(sheep red blood cell, SRBC, 江苏省江宁县卫生防疫站);醋酸泼尼松(prednisone, 江苏淮阴制药厂);氯化钾(picryl chloride, PC, 日本东京化成工业株式会社);赛庚啶(cyproheptadine, 江苏第四制药厂);5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT, compound 48/80(sigma 产品);葡聚糖(ficoll), 组胺(histamine)(日本 nacalai tesque);色甘酸二钠(disodium cromoglycate, 日本 funakoshi 药品会社)。

中国现代应用药学杂志 2001 年 2 月第 18 卷第 1 期

1.3 仪器

650-10S 荧光分光光度计(日立公司)。

2 方法与结果

2.1 对 compound 48/80 所致大鼠腹腔肥大细胞释放组胺的影响

雄性 SD 大鼠,按文献^[6]的方法制备腹腔肥大细胞悬液,浓度为 2.9×10^6 细胞/ml,甲苯胺蓝染色鉴定细胞存活率高于 90 %。取该细胞悬液 1.8 ml,37℃ 预温孵 10 min,加入以 pH 7.0 磷酸缓冲液(PBS)溶解的受试药物 0.1 ml,37℃ 温孵 10 min,再加入 compound 48/80 0.1 ml(终浓度为 10μg/ml),37℃ 温孵 10 min,冰水浴冷却终止反应,在 5℃ 下 2000rpm 离心 5 min,上清液中组胺的量按荧光法^[6]测定。另在沉淀中加入 PBS 2 ml,冰冻及超声波融化反复 3 次,再经离心测上清液中组胺的量,按下式计算肥大细胞中组胺的释放率。组胺释放率(%)=(释放量-自发释放量)/(释放量+残留量)×100 %。

由表 1 可见,地肤子醇提取物 200,500 和 1000μg/ml 浓度依赖性抑制组胺的释放,阳性对照药色甘酸二钠亦呈现显著的抑制作用。

表 1 地肤子醇提取物对 compound 48/80 诱导大鼠腹腔肥大细胞释放组胺的影响/ $\bar{x} \pm s, n=3$

组别	终浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	释放率/%	抑制率/%
对照组	-	79.5±5.6	
醇提取物	200	70.6±8.1	11.2
	500	51.3±5.5 [*]	35.5
	1000	36.2±7.2 [*]	54.5
色甘酸二钠	500	61.4±4.8 [*]	22.8

注:与对照组比较,^{*} $P<0.01$

2.2 对 5-HT 所致豚鼠回肠收缩的影响

常规方法制作豚鼠回肠标本,悬挂于充满台氏液的双层浴槽中,32℃ 恒温并通气,肠管上端通过肌力换能器与台式平衡记录仪连接,稳定 20 min 后,加入 5-HT,终浓度为 12μM,观察最大收缩反应(100 %)。洗去 5-HT 后,加入不同浓度的地肤子醇提取物或赛庚啶,并在每次加药 10 s 后,重新加入 5-HT,测定其收缩高度,计算收缩百分率。

由表 2 可见,地肤子醇提取物 50~200μg/ml 浓度依赖性抑制 5-HT 所致豚鼠回肠收缩,但当浓度增至 500μg/ml 时,抑制作用反见减弱,阳性药赛庚啶 5μg/ml 呈现显著的抑制作用。表 2 地肤子醇提取物对 5-HT 诱导豚鼠回肠收缩的影响/ $\bar{x} \pm s, n=4 \sim 5$

组别	终浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	释放率/%	抑制率/%
对照组	-	100	
醇提取物	50	73.5±18.5	26.5
	100	62.8±18.8	37.2
	200	61.1±17.8	38.9
	500	73.4±14.5	26.6
赛庚啶	5	18.6±12.3	82.4

2.3 对 SRBC 所致小鼠迟发型足跖肿胀的影响

参见文献^[7]方法,雄性 ICR 小鼠,于 SRBC 攻击同时及其后 16 h,两次 ig 地肤子醇提取物或总皂苷,阳性对照组 ig 泼尼松,空白对照组 ig 等容量蒸馏水。由表 3 可见,地肤子醇提取物 200 和 500 mg/kg,总皂苷 50,100 和 200 mg/kg 及泼尼松 50 mg/kg 均明显抑制 SRBC 诱导的小鼠迟发型足跖肿胀。

表 3 地肤子醇提取物及总皂苷对 SRBC 所致小鼠迟发型足跖肿胀的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	足跖肿胀度/ $\times 10^{-1} \text{mm}$	抑制率/%
对照组	-	10	46.6±12.7	
醇提取物	100	10	39.0±11.2	16.3
	200	9	30.0±14.1 ^{*1}	35.6
	500	8	27.0±13.5 ^{*1}	42.1
总皂苷	50	10	34.5±12.1 ^{*2}	26.0
	100	10	34.3±13.2 ^{*2}	26.4
	200	10	29.2±17.6 ^{*2}	37.3
泼尼松	50	10	12.6±6.5 ^{*1}	73.0

注:与对照组比较,^{*1} $P<0.01$,^{*2} $P<0.05$

2.4 对 PC 所致小鼠耳廓接触性皮炎的影响

参见文献^[7,8]方法,雄性 ICR 小鼠,腹部刮毛 24 h 后,以 5 % PC 无水乙醇液 150μl 涂于腹部及四肢,4 d 后以 1 % PC 橄榄油溶液 20μl 涂于小鼠右耳廓两面攻击,分别于其后 2 和 24 h,测量左、右耳廓厚度差。试验组小鼠于 PC 攻击同时及其后 16 h 两次 ig 地肤子醇提取物或总皂苷,阳性对照组 ig 泼尼松或赛庚啶,空白对照组 ig 等容量蒸馏水。

由表 4 可见,地肤子醇提取物 100,200 和 500 mg/kg,总皂苷 200 mg/kg 及赛庚啶 20 mg/kg 均明显抑制早期相反应(2 h),而泼尼松 50 mg/kg 无显著作用;地肤子醇提取物 500 mg/kg,总皂苷 200 mg/kg 及泼尼松 50 mg/kg 明显抑制后期相反应(24 h),而赛庚啶无显著作用,表明地肤子醇提取物、总皂苷及赛庚啶对早期相的抑制作用强于对后期相,而泼尼松则相反。

表 4 地肤子醇提取物及总皂苷对 PC 所致小鼠接触性皮炎的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	耳廓肿胀度/ $\times 10^{-2} \text{mm}$	
			2h	24h
对照组	-	8	4.5±1.1	8.5±2.5
醇提取物	100	8	2.9±1.1 ^{*1}	6.8±1.9
	200	8	2.6±1.0 ^{*2}	6.7±4.3
	500	8	1.9±0.6 ^{*2}	6.0±1.6 ^{*1}
泼尼松	50	8	5.2±2.4	5.1±2.8 ^{*2}
对照组	-	14	2.2±1.5	6.8±1.9
总皂苷	50	14	1.9±1.4	5.5±2.2
	100	14	1.4±1.5	6.6±2.9
	200	13	1.0±0.9 ^{*1}	4.9±1.9 ^{*1}
赛庚啶	20	9	1.0±0.7 ^{*1}	5.7±1.8

注:与对照组比较,^{*1} $P<0.05$,^{*2} $P<0.01$

3 讨论

地肤子 70 %醇提取物抑制 IgE 抗体介导的大鼠同种被动

皮肤过敏反应(PCA)及IgG抗体介导的小鼠异种PCA,而对IgE抗体形成无显著影响,大剂量尚能抑制组胺5-HT及缓激肽所致的小鼠足跖炎症反应^[4,5]。本研究发现地肤子醇提物明显减少compound 48/80诱导的大鼠腹腔肥大细胞的组胺释放,并对5-HT所致的离体豚鼠回肠收缩具有一定的抑制作用,量效曲线呈钟罩型,最大抑制率低于40%。提示地肤子抑制速发型变态反应的主要作用机制为稳定肥大细胞膜、减少组胺5-HT及白三烯等过敏介质的释放,同时亦可能包括其对过敏介质致炎作用的抑制。

迟发型变态反应(DTH)的效应相中,存在着双相反应,其中早期反应发生于抗原攻击后0~4h,峰值时间为2h,主要由抗原特异性结合因子致敏的局部组织肥大细胞在再次接触抗原后,释放5-HT等血管活性胺所引起,而后期反应的峰值时间为攻击后24h,由T淋巴细胞释放的淋巴因子所介导^[8,9]。地肤子醇提物及总皂苷明显抑制SRBC诱导的小鼠迟发型足跖肿胀及PC诱导的小鼠耳廓接触性皮炎,且其对PC-DTH早期反应的作用强于对后期反应,5-HT受体阻断剂赛庚啶亦显著抑制早期反应,但对后期反应却无明显作用。表明地肤子抑制DTH早期反应的作用机制类似于其对速发型变态反应的作用,即稳定肥大细胞膜,减少5-HT等活性胺的释放,而对后期反应的抑制作用可能并非抑制早期反应的继发结果,可能与其抗炎作用有关。皂苷为地肤子抑制速发型变态反应及DTH的有效成分^[5]。

参考文献

1 孙振楷,谢慧芬,郭汉琴,等.中药地肤子复方治疗某些皮肤病及

哮喘的疗效观察.南通医学院学报,1982,(2):45.

- 2 戴岳,黄罗生,冯国雄,等.地肤子对单核巨噬系统及迟发型超敏反应的抑制作用.中国药科大学学报,1994,25(1):44.
- 3 久保道德,松田秀秋,戴岳,他.汉药·地肤子研究(第1报)地肤子の70%エタノール抽出エキスの抗搔痒作用と有効成分の探索.药学杂志,1997,117(4):193.
- 4 Matsuda H, Dai Y, Ido Y, et al. Studies on Kochiae Fructus. III. Antinociceptive and antiinflammatory effects of 70% ethanol extract and its component, momordin Ic from dried fruits of *Kochia scoparia* L. Biol Pharm Bull, 1997, 20(10): 1086.
- 5 Matsuda H, Dai Y, Ido Y, et al. Studies on Kochiae Fructus. IV. Anti-allergic effects of 70% ethanol extract and its component, momordin Ic from dried fruits of *Kochia scoparia* L. Biol Pharm Bull, 1997, 20(10): 1165.
- 6 Kubo M, Matsuda H, Tokuoka K, et al. Anti-inflammatory activities of methanolic extract and alkaloidal components from *Corydalis Tuber*. Biol Pharm Bull, 1994, 17(2): 262.
- 7 戴岳,于得志,禹志领,等.醋氯芬酸抑制大鼠佐剂关节炎及小鼠迟发型超敏反应.中国现代应用药学杂志,1999,16(1):12.
- 8 Meade R, Askenase P W, Geba G P, et al. Transforming growth factor inhibits murine immediate and delayed type hypersensitivity. J Immunol, 1992, 149(2): 521.
- 9 Loveren H V, Meade R, Askenase P W. An early component of delayed-type hypersensitivity mediated by T cells and mast cells. J Exp Med, 1983, 157: 1604.

收稿日期:1999-08-03