

蚯蚓总蛋白对豚鼠哮喘模型肺功能的影响

王茵¹, 冯怡^{1*}, 徐德生², 房泽海¹, 谢强敏³ (1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203; 3. 浙江大学国家食品药品监督管理局浙江呼吸药物研究实验室, 杭州 310031)

摘要:目的 研究蚯蚓总蛋白 (Eisenia foetida protein, EP) 对豚鼠哮喘模型支气管平滑肌收缩功能的影响, 初步分析其作用机制。方法 以新鲜赤子爱胜蚓为原料, 经硫酸铵沉淀得到 EP。采用经典的肺阻力 (R_L) 和动态肺顺应性 (C_{dyn}) 指标评价 EP 对致敏豚鼠抗原攻击前后的肺功能变化; 采用体外试验观察 EP 对豚鼠的离体气管平滑肌静息张力以及拮抗组胺、氨甲酰胆碱和白三烯引起的收缩反应。结果 在整体试验中, EP $10\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (生药量, po) 或 EP $5\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (生药量, im) 预处理能明显抑制致敏豚鼠抗原攻击后引起的 R_L 增加和 C_{dyn} 下降; 在离体试验中, EP 对离体豚鼠气管平滑肌静息张力无显著影响, 对组胺或氨甲酰胆碱引起的气管平滑肌收缩反应无明显拮抗作用, 但对白三烯 D_4 引起的收缩反应呈现非常显著的拮抗作用 ($P < 0.01$)。结论 EP 抑制豚鼠哮喘模型肺功能下降可能与抗白三烯作用有关。

关键词: 总蛋白; 肺功能; 哮喘; 豚鼠; 气管平滑肌

中图分类号: R977.6; R965.1; R974.3

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2008)02-0087-04

Effect of Total Proteins from Eisenia Foetida on Pulmonary Function in Asthmatic Model of Guinea Pigs

WANG Yin¹, FENG Yi¹, XU De-sheng², FANG Ze-hai¹, XIE Qiang-min³ (1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Zhejiang University, State Food and Drug Administration, Hangzhou 310031, China)

基金项目: 上海市教委重点学科资助项目 (J5030); 上海市中药现代化专项基金资助项目 (06ZD19722)

作者简介: 王茵, 女, 博士, 助理研究员 * 通讯作者: 冯怡, 女, 研究员, 博士生导师

Tel: (021) 51322493

E-mail: fyi@vip.sina.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate effect of total proteins from *Eisenia foetida* (EP) on bronchoconstriction in asthmatic model of guinea pigs, and to study its mechanism of action initially. **METHODS** EP from fresh *Eisenia foetida* was extracted and isolated by phosphate buffer and ammonium sulfate precipitate. The parameters of lung resistance (R_L) and dynamic lung compliance (C_{dyn}) were used to evaluate the effect of EP on pulmonary function in the sensitized guinea pigs before and after antigen challenge in vivo. We observed the effect of EP on the resting tension of the isolated tracheal smooth muscle of guinea pigs in vitro and the contractile responses induced by histamine, carbachol and leukotriene (LT) D_4 . **RESULTS** EP the pretreatment ($10\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (p.o) or $5\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (i.m)) significantly inhibited the increase of R_L and decrease of C_{dyn} in the sensitized guinea pigs in vivo, which were treated by antigen. EP had no effect on the resting tension and the contractile responses induced by histamine or carbachol in the isolated tracheal smooth muscle of guinea pigs, but could inhibit the contractile response induced by $LT D_4$ ($P < 0.01$) highly significantly. **CONCLUSION** EP can inhibit the decrease of pulmonary function in asthmatic model of guinea pigs. It might be related with leukotriene.

KEY WORDS: total protein; lung function; asthma; guinea pigs; tracheal smooth muscle

支气管哮喘(哮喘)是多种细胞和细胞成分参与的气道慢性炎症性疾病。肥大细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞等释放的炎症介质、前炎性细胞因子是引起支气管收缩和气道炎症的主要活性物质,而白三烯和组胺是最主要的气道平滑肌收缩剂^[1],白三烯受体拮抗剂已经开发上市成为治疗哮喘、鼻炎等变态反应性疾病的有效药物^[2],因此从中药中寻找白三烯受体拮抗剂具有实际意义。蚯蚓又名地龙,在我国入药已有四千余年的历史,具有清热定惊、通络、平喘、利尿之功效,是一种常用动物药材。国内外对蚯蚓平喘作用的研究报道仅限于小分子成分,早在20世纪30年代,赵承谔等^[3]发现地龙中一种含氮的有效成分,对经组胺或毛果芸香碱处理的白鼠肺及家兔肺有显著的扩张支气管作用,认为是次黄嘌呤;20世纪70年代研究^[4]认为地龙中所含的琥珀酸、L(+)氨基酸具有明显的抗组胺作用,舒张支气管平滑肌,达到平喘作用。近期的临床文献资料显示^[5-7],采用生化方法提取的新鲜地龙液有即刻平喘作用,起效快,缓解亦速,不良反应少见,但其作用靶点尚不清楚。新鲜地龙液的临床应用给我们提示,地龙中平喘的有效部位可能是蛋白类成分。笔者以新鲜赤子爱胜蚓为原料,经磷酸盐缓冲液抽提得到蚯蚓组织粗提物,经硫酸铵盐析得到蚯蚓总蛋白(*Eisenia foetida* protein, EP),采用经典的整体动物模型——致敏豚鼠抗原攻击引起的哮喘模型对EP进行了评价,并通过离体气管平滑肌对其平喘机制进行初步探讨。

1 材料

1.1 药品与试剂

药品 EP的制备:赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)采集于南昌顺发蚯蚓养殖场;新鲜蚯蚓放入水中反复清洗,排尽其消化道污物,洗净,称重,加入磷酸盐缓冲液,组织捣碎机中捣碎,制成匀浆,室温抽提数小时,4℃离心,取上清液,4℃缓慢加入研磨好的硫酸铵固体,边加边搅拌,使硫酸铵的饱和度达到80%,静置数小时,4℃离心,取沉淀;将沉淀用磷酸盐缓冲液悬浮,透析除盐,4℃离心,上清液冷冻干燥得到EP。(其中100g新鲜蚯蚓制备1.96g EP,1g EP含6.4mg蛋白)。

试剂:硫酸铵(分析纯),中国医药集团上海化学试剂公司;透析袋,华美生物工程公司上海分公司;卵白蛋白(albu-

min, egg II grade,批号:120K1201)、组胺(批号:Lot21K1128)、氨甲酰胆碱(批号:Lot11K1729)、白三烯 D_4 (批号:Lot70K3852)均购于美国Sigma chemical Co.;硫酸沙丁胺醇(salbutamol),金坛制药厂;乌拉坦(urethane),中国医药公司上海化学试剂公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

DS200高速组织捣碎机,上海标本模型厂;AvantiTMJ-25I型连续流离心机,贝克曼公司;冷冻干燥机,LABCONCO公司;体积描记器、JZ-100张力换能器、HX-200差压换能器,新航机电设备有限公司;压缩吸入机,PARI MASTER公司;MedLab生物信号采集处理系统(V5.0),南京美易公司。麦氏浴槽、循环水浴箱,Fisher scientific公司。

1.3 动物

Hartley品系豚鼠,体重250~300g,雌雄各半;购于浙江大学医学院实验动物中心,合格证书:医动字第220010014。豚鼠饲养于浙江大学医学院实验动物中心,喂食标准的无过敏原草粉颗粒,室温20~25℃,湿度78%,12h明/12h暗。所有动物实验均获得浙江省动物管理委员会允许。

2 方法

2.1 致敏豚鼠、分组和给药方式

将卵白蛋白(grade II)溶于生理盐水,配成5%卵白蛋白生理盐水溶液。每只豚鼠两后腿部各im 0.5 mL,再ip 1 mL。4周后将这些致敏豚鼠按体重随机分为4组,每组6只,即模型组给生理盐水 $4.0\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,EP po组给 $10.0\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生药,EP im组给 $5.0\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生药,硫酸沙丁胺醇 po组给硫酸沙丁胺醇 $5.0\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,均于抗原攻击前1h给药1次。

2.2 肺功能测定 按文献报道的方法^[8]测定肺阻力(lung resistance, R_L)和动态肺顺应性(dynamic lung compliance, C_{dyn})。将致敏豚鼠经乌拉坦 $1\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p麻醉,切开颈部皮肤,分离气管,行气管插管。 R_L 和 C_{dyn} 测定步骤:①将手术后的豚鼠置于1.5 L豚鼠体描记器内,接通气管插管,引伸于体积描记器外。同时于体积描记器的侧孔接上压力换能器和MedLab生物信号采集处理系统。将所有待测的导管接通完毕,盖上体描记器的盖子,并使其完全密闭,即可描记随动物呼吸而引起密闭的体描记器内容积的变化,即为潮气量

(tidal volume, V_T),以定容器定标。②取 Fisher管与气管插管接通,测气流速率 (airway flow, V),连接上压力换能器——PCLAB生物信号采集处理系统描记,用流量计定标。③用一钝头、头端带有 2~3 小孔的金属管直接插入胸膜腔内,连着导管与差压换能器——MedLab 生物信号采集处理系统联接,差压换能器的另一头与口腔插管连接(测口腔压),即可测得跨肺压 (transpulmonary pressure, P_p),用水检压计定标。所有这些外科手术和连接完成后让豚鼠在体描记器内平稳 5 min 后作抗原攻击的指标测定,然后进行抗原攻击。抗原攻击用 PARI MASTER 压缩吸入机气雾 1% 卵白蛋白 (grade II) 生理盐水溶液,通过气管插管连接令致敏豚鼠吸入 1 min,然后移开气雾吸入机,连接 Fisher 管,描记吸入后 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min 的 V_T , V 和 P_p 变化。计算公式: $R_L (\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}) = P_p / V$, $C_{\text{dyn}} (\text{mL} \cdot \text{cm}^{-1} \text{H}_2\text{O}) = V_T / P_p$ 。抗原吸入前后的 R_L 增加 % 公式: $R_L \text{ 增加 \%} = [(\text{抗原攻击后 } R_L - \text{抗原攻击前 } R_L) / \text{抗原攻击前 } R_L] \times 100\%$ 。抗原吸入前后的 C_{dyn} 减少 % 公式: $C_{\text{dyn}} \text{ 减少 \%} = [(\text{抗原攻击前 } C_{\text{dyn}} - \text{抗原攻击后 } C_{\text{dyn}}) / \text{抗原攻击前 } C_{\text{dyn}}] \times 100\%$ 。

2.3 离体气管平滑肌试验

2.3.1 离体气管平滑肌制备 参照方法^[8],击昏豚鼠,股动脉放血致死,立即分离并取出气管,置含氧的 Krebs-Henseleit 液中,制备成气管片。然后将标本置 Krebs-Henseleit 液 37℃ 恒温浴槽内,通 95% 氧气和 5% CO_2 ,气管平滑肌初始张力为 1.0 g。张力变化通过张力换能器输入 MedLab 生物信号采集处理系统。气管平滑肌标本在浴槽内稳定至少 30 min 后开始实验。

2.3.2 对气管平滑肌静息张力的影响 用 PBS 溶解后的 EP 溶液,按累积加药法分别加入 EP 或溶媒对照液,分别以 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 60 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (生药) 终浓度将 EP 加入浴槽中,溶媒对照液以等容量加入到浴槽中,在最后一个浓度加入后 5 min 再加入 $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨甲酰胆碱 (CCH),使其达到最大收缩反应。反应幅度的计算公式: 受试药物反应 % = $[(\text{CCH 反应幅度} - \text{受试药物反应幅度}) / \text{CCH 反应幅度}] \times 100\%$ 。

2.3.3 对组胺、氨甲酰胆碱 (CCH) 和白三烯 (LT) D_4 收缩反应的影响 气管平滑肌标本在浴槽内稳定 30 min 后,先加入终浓度为 EP 60 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (生药) 或溶媒对照液,与气管平滑肌孵育 10~15 min 后,再分别以累积剂量加药法加入组胺 $10^{-8} \sim 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 或 CCH $10^{-10} \sim 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 或单剂量加入 LTD₄ $10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 最后加入 CCH $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。计算时以 CCH $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的收缩反应幅度为 100%。计算公式: $[(\text{CCH 反应幅度} - \text{受试药物反应幅度}) / \text{CCH 反应幅度}] \times 100\%$ 。

2.4 数据处理

用计算机和 Sigma Stat 软件包统计,均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组间比较采用 Mann-Whitney Test 或 Student's *t*-test。

3 结果

3.1 EP 对致敏豚鼠抗原攻击后肺功能的影响

模型组在抗原攻击后 1~5 min 内 R_L 明显增高, C_{dyn} 值明显下降, 抗击后 1 min 达到最高峰, R_L 值与攻击前基线值比较增加 (92 ± 56) %, C_{dyn} 值与攻击前基线值比较下降 (49 ± 20) %。1~5 min (5 个测定点的值) 的平均值,与攻击前基线值比较 R_L 值增加 (80 ± 9) %, C_{dyn} 值下降 (47 ± 3) %。po EP 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能明显抑制 R_L 增高和 C_{dyn} 下降, 抗原攻击后 1 min R_L 峰值与攻击前基线值比较增加 (35 ± 8) %, C_{dyn} 值下降 (28 ± 17) %, 与模型组比较分别抑制 62% 和 43%。EP 5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ im 也能明显抑制 R_L 增高和 C_{dyn} 下降, 抗原攻击后 1 min R_L 峰值与攻击前基线值比较增加 (26 ± 4) %, C_{dyn} 值下降 (26 ± 4) %; 与模型组比较分别抑制 73% 和 47%。阳性对照药沙丁胺醇 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 完全抑制 R_L 增高和 C_{dyn} 下降, 与模型组比较差异非常显著。

3.2 EP 对豚鼠离体气管平滑肌静息张力的影响

EP 0.625~60 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度对豚鼠离体气管平滑肌无直接收缩或松弛作用, 与对照组相比均无明显的差异 ($P > 0.05$)。样本数为 8 个豚鼠。

3.3 EP 对组胺、CCH 和 LTD₄ 引起的豚鼠离体气管平滑肌收缩反应的影响

EP 60 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对组胺或 CCH 引起的离体豚鼠气管平滑肌收缩反应均无明显抑制作用, 而相同浓度的 EP 却能明显抑制 LTD₄ 引起的豚鼠离体气管平滑肌收缩反应, 抑制率为 40.3%, 与溶媒对照组比较有非常显著的差异 ($P < 0.01$)。每组的样本数均为 8 个豚鼠。

4 讨论

本试验在参照临床应用的基础上, 以赤子爱胜蚓为实验材料, 通过硫酸铵沉淀初步分离了一组蛋白活性成分 (EP), 其中总蛋白含量为 50% 左右。哮喘豚鼠整体实验表明 EP 在抗原攻击前预先口吞吞服或肌肉注射给药, 能明显预防抗原攻击后引起的 R_L 增高和 C_{dyn} 下降, 但作用强度不及沙丁胺醇组。后者为 β_2 受体激动药, 与 β_2 受体结合后能激活 G 蛋白分子, G 蛋白活化腺苷酸环化酶催化亚基, 催化 ATP 生成 cAMP, 后者作为重要的第二信使, 所产生的主要效应是支气管平滑肌松弛^[9]。初步分析其作用机制表明, EP 不能直接松弛豚鼠离体气管平滑肌, 因此它不是一个 β_2 受体激动药; EP 也不能对抗组胺和 CCH 引起的气管平滑肌收缩反应, 因此它也不是一个组胺拮抗剂和胆碱能受体阻断药; 但 EP 能明显对抗 LTD₄ 引起的气管平滑肌收缩反应, 提示 EP 对豚鼠哮喘模型的平喘作用至少部分是通过拮抗白三烯的作用机制。由于哮喘的病理生理学机制十分复杂, 涉及面很广, 因此 EP 的平喘作用机制以及 EP 分离纯化工作还有待于进一步的深入。

REFERENCES

- [1] BOCHNER B S, BUSSE W W. Allergy and asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(5): 953.
- [2] CORLESS J A, PARACHA M. The use of leukotriene modifying drugs in asthma and other respiratory diseases[J]. Curr Drug

Targets Inflamm Allergy, 2002, 1(3): 271.

- [3] ZHAO C G. Dilating bronchus compounds isolated from earthworm [J]. Chin Med J(中华医学杂志), 1937, 23(5): 531.
- [4] Hunan Institute of Pharmaceutical Industry. Primary studies on antiasthmatic constituents from *Pheretima aspergillum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs Com(中草药通讯), 1974, 6(1): 16.
- [5] CHEN X H, WANG Y M, HUANG J G. Treatment experience of *Lumbricus* on Bronchial tube asthma [J]. J Tradit Chin Med Literature(中医文献杂志), 1999; 17(1): 38.
- [6] FU J, HUANG J G, LI W, et al. Clinical and experimental studies on instant antiasthmatic effect of *Lumbricus* [J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 1991, 25(4): 24.
- [7] WANG Z. Clinical observation on treatment of Bronchial tube asthma by *Lumbricus* extract [J]. J Emerg Tradit Chin Med(中国中医急症), 1996, 5(1): 3.
- [8] XIE Q M, ZENG L H, ZHENG Y X, et al. Bronchodilating effects of bambuterol on bronchocontraction in guinea pigs [J]. Acta Pharmacol Sin(中国药理学报), 1999, 20(7): 651.
- [9] SEARS M R, LOTVALL J. Past. Present and future - beta2-adrenoceptor agonists in asthma management [J]. Respir Med, 2005, 99(2): 152.

收稿日期: 2007-04-13