

齐墩果醇酸对过敏性休克的对抗作用¹

张莉蓉, 马统勋 (河南医科大学临床药理教研室, 郑州 450052, 中国)

Antagonistic effect of oleanolic acid on anaphylactic shock¹

ZHANG Li-Rong, MA Tong-Xun (*Department of Clinical Pharmacology, He-nan Medical University, Zhengzhou 450052, China*)

AIM: To study the antagonistic effect of oleanolic acid (OA) on anaphylactic shock in guinea-pigs sensitized with 6-aminopenicillanic acid (APA)-protein. **METHODS:** The anaphylactic shock was achieved by ip of APA-protein in guinea pigs. The serum antibody titers of guinea pigs were measured with the passive cutaneous anaphylaxis test, and the pulmonary histamine by the method of fluorometric determination. The degranulation of mast cells was examined by rat calvarian periosteum method. **RESULTS:** In guinea pigs sensitized with APA-protein, OA 25, 50, 100 mg · kg⁻¹ reduced anaphylactic shock rates from 100 % (sensitized control group) to 70 %, 18 %, and 15 % (OA pretreated group), and death rates from 100 % to 70 %, 18 %, and 0 %, respectively. OA had an inhibitory effect on the antibody formation and reduced the histamine contents in the lung tissues in the sensitized guinea pigs. In addition, the homologous passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and the degranulation of mast cells of calvarial periosteum in rats were prevented by OA 25, 50, and 100 mg · kg⁻¹. **CONCLUSION:** The antagonistic effect of OA on anaphylactic shock was related to the inhibition of antibody formation and the

reduction of histamine contents.

KEY WORDS oleanolic acid; 6-aminopenicillanic acid; histamine; anaphylaxis; passive cutaneous anaphylaxis

A 目的: 研究齐墩果醇酸(oleanolic acid, OA)对6-氨基青霉烷酸 APA-蛋白致敏豚鼠过敏性休克的对抗作用。 **方法:** 采用腹腔注射抗原建立豚鼠过敏休克模型, 同种被动皮肤过敏反应(PCA)测定致敏豚鼠血清抗体滴度, 荧光测定致敏豚鼠肺组胺含量, 大鼠颅骨骨膜法测定肥大细胞脱粒率。 **结果:** OA 可明显降低 APA-蛋白致敏豚鼠过敏性休克的发生率和死亡率, 抑制致敏豚鼠血清抗 APA-抗体生成; 降低肺组胺含量; 抑制豚鼠 PCA 反应及大鼠颅骨骨膜肥大细胞脱颗粒。 **结论:** OA 对抗过敏性休克作用机制与其抑制血清抗 APA 抗体生成, 并降低组胺含量有关。

关键词 齐墩果醇酸; 6-氨基青霉烷酸; 组胺; 过敏症; 被动皮肤过敏性

6-氨基青霉烷酸(6-aminopenicillanic acid, APA)为青霉素的母核结构和半合成青霉素类的原料, 也为青霉素类过敏的次要抗原决定簇, 本室曾证明 APA-BSA 致敏豚鼠(中国药理通讯1984; 1: 217-8)、小鼠可诱发过敏性休克的发生^[1]。肾上腺素(epinephrine, Epi)虽为目前治疗青霉素过敏性休克的首选药, 但不能用于预防过敏性休克发生, 齐墩果醇酸(oleanolic acid, OA)可抑制大鼠、小鼠同种动物天花粉被动皮肤过敏反应及大鼠颅骨骨膜肥大细胞脱颗粒^[2]。但对青霉素类过敏性休克的对抗作用未见报道, 为此, 本文研究 OA 对

¹ Project supported by Science Foundation of He-nan Province, No 894021600.

Received 1994-07-25

Accepted 1995-04-20

APA-BSA 致敏豚鼠过敏休克的对抗作用。

MATERIALS AND METHODS

APA 为上海第四制药厂制；牛血清白蛋白(BSA)为美国 Sigma 公司制；人血清白蛋白(HSA)为北京生物制品研究所制；邻苯二甲醛(OPT)为瑞士 Fluka 制；磷酸组胺为中国科学院上海生物化学研究所制；APA-蛋白结合物，参照青霉素抗原合成法^[3,4]合成；齐墩果醇酸(OA)为贵阳制药厂制，纯度98.26%，用时以2% Tween-80配成2.5%混悬液；盐酸肾上腺素注射液为武汉制药厂制，批号92053；荧光分光光度计为日立 MPF-4型；冷冻干燥机为英国 Edwards 制。

豚鼠($n=194$)，体重 $242 \pm s 38$ g，♂、♀兼用，PCA 实验用白色豚鼠，其他不限。Wistar 大鼠(♂， $n=35$)，体重 $180 \pm s 25$ g，取自本校动物繁殖中心。

豚鼠过敏休克^[5] 豚鼠20只，♂、♀兼用，随机均分为致敏组和对照组，于d 1, d 3, d 5分别ip 0.2% APA-BSA 0.5 mL，最后一次致敏后间歇14 d，经耳缘iv 0.2% APA-HSA 1 mL 进行攻击，观察休克率及死亡率。另取豚鼠64只，随机分为5组。给药组豚鼠于致敏前3 d 开始至攻击前当天分别sc OA 25, 50, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹×23，阳性对照组sc Epi 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹×23。

豚鼠血清抗 APA 抗体测定 豚鼠25只，随机分为5组，豚鼠致敏方法及 OA、Epi 给药剂量和方式同上。于第一次致敏后d 9, d 14, d 20, d 27, d 34, d 41, d 47心脏取血，共7次，制备豚鼠抗 APA 抗血清，-20℃保存备用，采用同种动物被动皮肤过敏反应(PCA)测定血清抗 APA 抗体效价。

肺组胺含量测定 豚鼠25只，随机分5组，致敏方法及 OA、Epi 给药剂量和方式同上。于第一次致敏后d 20取豚鼠肺脏，经处理后，用荧光法^[6,7]，测其组胺含量。

豚鼠同种被动皮肤过敏反应 豚鼠致敏方法同上，于第一次致敏后d 20将豚鼠处死放血，制备抗血清，-20℃保存备用。另取豚鼠25只，随机分为5组，给药组sc OA 25, 50, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹×5，阳性对照组sc Epi 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹×5，于给药d 4以1:64稀释的抗血清于每只豚鼠背部皮内注射4点，每点0.1 mL，24 h后，豚鼠耳缘iv溶于1% Evans 蓝的0.2% APA-HSA 1 mL 攻击，攻击前1 h sc OA，30 min后处死豚鼠，翻转背部皮肤，测皮下蓝斑直径，同时将蓝斑点剪下，剪碎后置丙酮-生理盐水(7:3)混合液5 mL 中，放至次日，取上清液于721-分光光度计610 nm 处测定吸收率。

被动致敏大鼠颅骨骨膜肥大细胞脱粒

参照肥大细胞脱粒法^[8]，取♂ Wistar 大鼠35只，随机分5组，每组7只，OA 及 Epi 的给药剂量及方式同上，给药d 2后，各鼠颅顶sc以生理盐水1:64稀释的抗血清0.1 mL，24 h后各鼠股iv溶于1% Evans 蓝的0.2% APA-HSA 1 mL，攻击前1 h sc OA，30 min后断头处死，制片镜检观察肥大细胞形态变化，计算肥大细胞脱粒率。

数据处理 各组豚鼠休克率和死亡率差异的比较，采用 χ^2 检验；其他数据采用 t 检验显著性。

RESULTS

致敏豚鼠经iv抗原攻击后，均立即出现阵咳、搔鼻、耳静脉充血、呼吸困难、四肢抽搐、翻滚、张口呼吸、小便失禁等过敏休克症状，所有豚鼠均在4 min内死亡。两肺呈严重肺气肿，心脏停止于舒张期；心肺血管和肝中央静脉扩张充血，肺水肿；休克发生率和死亡率均为100% (10/10)。对照组豚鼠抗原攻击后均无任何反应。

豚鼠经耳缘iv抗原攻击后，OA 可明显降低豚鼠过敏休克发生率和死亡率，并呈剂量依

赖关系 (Tab 1).

Tab 1. Antagonistic effects of oleanolic acid (OA) and epinephrine (Epi) (sc for 23 d) on anaphylactic shock in guinea pigs sensitized with APA-protein. n = number of experiments. *P > 0.05, °P < 0.01 vs Tween-80.

Drug/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	Anaphylactic shock/%	Death/%
Tween-80	200	20	100
OA	25	10	70*
	50	11	18°
	100	13	0°
Epi	0.1	10	100*

PCA 实验中, 致敏对照组 d 9 未测出抗体, d 20 达高峰, 均值为 97, 而后逐渐下降; OA 50, 和 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组, d 20 抗体效价均值分别为 4 和 0, 与对照组有显著差异 (P < 0.01), 而 OA 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 和 Epi 组对抗体产生无明显影响 (Fig 1).

OA 明显降低致敏豚鼠肺组胺含量, 显著抑制豚鼠同种 PCA, 明显抑制肥大细胞脱颗粒, 并呈剂量依赖关系 (Tab 2).

DISCUSSION

本文研究证明, OA 对 APA-BSA 致敏豚鼠过敏休克有明显对抗作用, 可降低豚鼠过敏休克发生率, 表明过敏反应强度与血清抗体

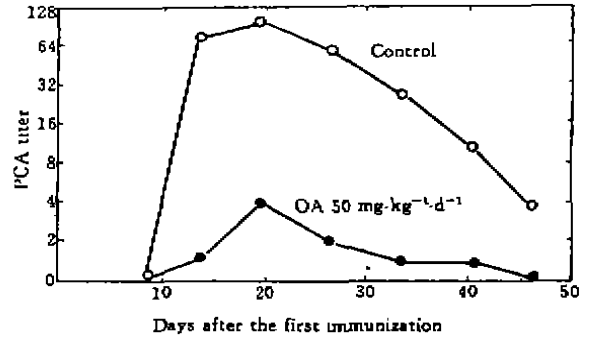


Fig 1. Production of anti-APA antibodies in guinea pigs sensitized with APA-protein. n = 5, $\bar{x} \pm s$.

含量及抗体效价之间呈明显相关性^[9]. OA 可明显抑制致敏豚鼠抗 APA 抗体产生, 这系 OA 对抗过敏休克的作用机制之一.

本文证明 OA 可明显降低肺组胺含量, 组胺为速发型变态反应的重要介质, 与过敏休克反应关系密切. 青霉素过敏反应中致敏豚鼠肺组织、离体回肠及大鼠腹腔肥大细胞组胺释放量均明显增加^[10]. 本文 OA 降低组胺含量对预防过敏休克的发生可能有重要作用, 而 Epi 对预防过敏休克的发生无明显作用.

本文还进一步证明, OA 对豚鼠 PCA 及被动致敏大鼠颅骨骨膜肥大细胞脱颗粒有明显抑制作用, 从而减少过敏介质的释放, 这与文献结果^[11]相符.

综上所述, OA 对 APA-BSA 致敏豚鼠过

Tab 2. Effects of OA and Epi on histamine concentration in lung in the sensitized guinea pigs (sc for 23 d), homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in guinea pigs (sc for 5 d) and degranulation of mast cells of calvarial periosteum in rats (sc for 3 d). n = 5-7 samples, $\bar{x} \pm s$, *P > 0.05, °P < 0.05, °°P < 0.01 vs Tween-80.

Drug/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	Histamine/ng·g ⁻¹ (n=5)	Diameter of blue area/mm (n=5)	Absorbance	Degranulation/% (n=7)	Inhibition/%
Tween-80	200	57.2 ± 3.7	17.7 ± 1.3	62 ± 5	94 ± 4	
OA	25	57.0 ± 3.2*	13.3 ± 3.0 ^b	83 ± 6°	72 ± 3 ^b	23
	50	32.1 ± 4.5°	10.5 ± 4.0°	93 ± 5°	56 ± 2°	40
	100	24.5 ± 6.5°	8.0 ± 3.4°	96 ± 3°	40 ± 3°	57
Epi	0.1	57.1 ± 4.3*	11.7 ± 2.1°	85 ± 9°	69 ± 5°	27

敏休克的对抗作用机理与抑制致敏豚鼠抗APA抗体的产生及降低组胺含量有关,我们预测OA对临床青霉素过敏反应尤其是高敏病人过敏休克的防治可能具有重要作用,可补救脱敏疗法或肾上腺素治疗的不足,但这尚需进一步临床验证。

REFERENCES

- 1 Ma TX, Duan MJ, Zhang QT, Pei SY. Studies of mechanism on anaphylactic shock of penicillins IV. Further observation of immunological of conjugate of 6-aminopenicillanic acid (6-APA) with protein. *Chin J Antibiot* 1986; **11**: 446-8.
- 2 Dai Y, Hang BQ, Li PZ, Tan LW. Effects of oleanolic acid on immune system and type I allergic reaction. *Acta Pharmacol Sin* 1989; **10**: 381-4.
- 3 De Weck AL, Schneider CH. Immune and non-immune responses to monovalent low molecular weight penicilloyl-polylysines and penicilloyl-bacitracin in rabbits and guinea-pigs. *Immunology* 1968; **14**: 457-73.
- 4 Batchelor FR, Dewdney JM, Weston RD, Wheeler AW. The immunogenicity of cephalosporin derivatives and their cross-reaction with penicillin. *Immunology* 1966; **10**: 21-33.
- 5 Ma TX, Bao MZ, Duan MJ, Zhang QT, Yue JL, Pei SY. Experimental study of the effect of sodium fulvate on the immediate hypersensitivity of penicillin. *J Henan Med Univ* 1986; **21**: 93-7.
- 6 Xiang JJ, Cheng HC. Modified method of fluorometric determination of blood histamine. *Acta Acad Med Sin* 1981; **3**: 183-7.
- 7 Rönnerberg AL, Hakanson K. A simplified procedure for the fluorometric determination of histamine in rat stomach. *Agents Actions* 1984; **14**: 195-9.
- 8 Xie QM, Bian RL. A new method for screening inhibitors of mediator releasing in anaphylaxis - rat calvarian periosteum method. *J Zhejiang Med Univ* 1981; **10**: 87-9.
- 9 Watanabe N, Ovary Z. Antigen and antibody detection by *in vivo* methods; a reevaluation of passive cutaneous anaphylactic reactions. *J Immunol Methods* 1977; **14**: 381-90.
- 10 Zhao ZJ, Ma TX. Changes in degranulation and histamine release from mast cells in rats sensitized by penicilloyl-protein. *Acta Pharmacol Sin* 1989; **10**: 78-81.
- 11 Ren J, Wang ZG. Effects of oleanolic acid on prostaglandins and cyclic nucleotide. *Chin Pharmacol Bull* 1991; **7**: 179-81.

《药理学学报》1996年征订启事

《药理学学报》由中国药学会主办,国内外公开发行。本刊内容包括药理学、天然药物化学、合成药物化学、药物分析、药剂、生药学与抗生素等方面的研究论文、研究、简报、学术动态、综述与述评等。

本刊为月刊,每期80页,每期定价6元(全年72元)。国内读者请到当地邮局订阅,也可直接汇款寄本刊编辑部。国内期刊代号:2-233;国外读者请向中国国际图书贸易公司(中国国际书店,北京399信箱)订阅。国外期刊代号:M105。