

過敏性氣喘寒熱證型動物模型之建立

呂春美^{1,5} 黃曉薇² 賴銘淙³ 李明憲⁴ 許清祥^{6,7}

華濟醫院¹ 中醫部² 兒童醫學系³ 病理科⁴ 家庭醫學科

嘉義

中國醫藥學院⁵ 學士後中醫學系⁶ 中國醫學研究所

中國醫藥學院台中附設醫院⁷ 小兒科

台中

(2001年2月5日受理, 2001年8月17日收校訂稿, 2001年8月20日接受刊載)

辨證論治是我國傳統醫學診斷治療上的獨特理論, 中醫將哮喘證急性期區分為寒哮與熱哮, 為正確評估中醫藥平喘方劑的療效及研究其機轉, 本實驗建立過敏性氣喘之寒、熱證動物模型。本文利用寒性(黃芩、黃連、梔子)及熱性(肉桂、乾薑、附子)兩組藥性不同的中藥餵食小白鼠, 造成小白鼠體質的改變, 並用免疫方法誘發氣喘, 以建立有寒、熱證型之別的氣喘動物模型。實驗中以觀察實驗動物之外觀; 測量其生理的變化, 包括體重、體溫與心率; 以家塵抗原(Dermatophagoides pteronyssinus group 5 allergen)腹腔注射致敏小白鼠, 並由呼吸道吸入抗原誘發氣喘後, 觀察呼吸道病理組織切片; 以酵素連結免疫分析法(ELISA)測定血清中特異性抗體IgG、IgE及氣管肺泡沖洗液中細胞間白素-4和伽瑪干擾素的濃度變化來說明寒、熱證氣喘動物生理、病理及氣喘免疫反應的差異。

結果發現寒組、熱組及對照組小鼠外觀有顯著差異, 熱組動物活動力增加, 而寒組則下降; 寒組動物的心率下降(700±34次/min VS 600±103次/min, $p < 0.05$); 三組動物之病理組織切片有明顯差異, 熱組小鼠呼吸道炎症最為嚴重, 寒組最輕微, 對照組則介於兩者之間。血清中特異性抗體IgG、IgE三組顯著無差異, 而氣管肺泡沖洗液中細胞間白素-4和伽瑪干擾素以熱組較高。因此我們認為熱證型對過敏免疫發炎反應有加強的效果, 本實驗為初步探討氣喘寒、熱證型動物之生理、病理及氣喘過敏免疫反應, 但氣喘是相當複雜的疾病, 仍須進一步研究才能了解其全貌。

關鍵詞: 動物模式, 寒熱證型, 細胞間白素-4, 家塵 過敏原, 過敏性氣喘。

前言

辨證論治是我國傳統醫學診斷治療上的一大特色，前人在豐富的治療經驗與觀察中發現相同的疾病在不同個體中會有不同的表現，在遣方用藥時，必須考慮個體體質的不同，才能達到最高的療效。而當我們試圖以科學實驗的方法更客觀評估中藥療效，或了解其作用機轉時，往往必須借助於動物模型，用實驗動物再現人體生理與疾病的特徵。以往科學界所使用之動物模型，強調其一致性，而沒有個體體質差異的證型概念，與中醫用藥精神相左，使整個評估方法有所偏差，而無法獲得正確的結果¹。因此建立各種中醫證型的動物模式對中醫藥的研究而言實是刻不容緩。

支氣管哮喘是近年來罹病率增加十分迅速的疾病，以台灣兒童氣喘病為例，自1974年到1994年20年間增加6倍以上，同時患病的嚴重度和死亡率也有增加的趨勢^{2,3}。目前西藥以類固醇減輕發炎反應以控制氣喘，但其毒性和副作用很大，例如：庫辛氏症候群、腎上腺功能抑制及失調、體液及電解質失衡等，而我國傳統醫藥對哮喘有相當的療效，因而目前治療之趨勢轉向傳統中醫發展^{4,5}。中醫根據臨床表現的不同，將哮喘證急性期區分為寒哮與熱哮，分別擬以溫肺化痰、清熱化痰兩個方向迥異之治則，所用方藥也截然不同⁶。因此當我們要觀察中醫藥對哮喘證的療效或研究其藥物機轉時，就必須採用有寒熱證型之別的氣喘動物模型，才能合理的評估。

本實驗利用寒性及熱性兩種藥性不同的中藥餵食小白鼠，造成小白鼠體質的改變，並用免疫方法誘發氣喘，以建立有寒熱證型之別的氣喘動物模型⁷。實驗中以觀察實驗動物之外觀、生理的變化、病理組織切片，血清中特異性抗體 IgG、IgE 濃度及氣管肺泡沖洗液中細胞間白素-4 (interleukin-4) 和伽瑪干擾素 (interferon- γ) 的濃度變化來說明寒、熱證氣喘動物生理、病理及氣喘免疫反應的差異，以建立病與證相結合之動物模型，作為評估平喘方劑的療效及研究其機轉的工具。

材料與方法

一、實驗動物

本實驗之實驗動物為 BALB/c 雌性小白鼠，來源為成功大學動物中心。飼育於控制光線及溫度之動物房。

二、致敏原 Der p 5 (*Dermatophagoides pteronyssinus* group 5 allergen) 之純化

在大腸桿菌 (*E. coli*) 內利用 PGEX-2T 質體表現分子量約為 42KD 之 Der p 5-Glutathione S-transferase 融合蛋白質，以麩氨基硫 (Glutathione) 洋菜膠結合性管柱純化。首先以含抗生素 Ampicillin (100 μ g/ml) 的培養基篩選此菌種，選取單一菌株，置於含 Ampicillin 的 LB broth 中培養，誘發菌體表現融合型蛋白質後，離心收集菌體，丟棄上清液，菌體以 TBS (pH 7.5) 沖洗，收集在離心管中，加入 0.1M Phenylmethylsulfonyl Fluoride。之後分別加入 Dnase I、Tween 20、Lysozyme，並利用冷凍、解凍方式將菌體打破，加入 EDTA 到細胞的溶解液，離心去除殘渣後，得到含 Der p 5-Glutathione S-transferase 融合蛋白質之上清液。將上清液通過

再水化的 glutathione 洋菜膠吸附性管柱，Der p 5-GST 蛋白質會被吸附於管柱填充物上，在 4°C 下先以 TBS 緩衝液沖洗該管柱，再用還原型的 glutathione 在 Tris-base (pH 8.0) 下沖洗使融合蛋白質與管柱填充物分離。以 SDS-PAGE 確認其純度，並以吸光值定量其濃度。

三、中藥投與

將 75 mg 中藥製劑寒、熱組分別為黃芩、黃連、梔子 (編號 6210、6204、6122) 及肉桂、附子、乾薑 (編號 5907、6108、6103) 各以 1 : 1 : 1 比例混合。(順天堂科學中藥，臺北，臺灣)，以 180 μ l Tween 20 潤濕之後利用均質機 (DC-3S，新光精機工業股份有限公司) 將藥劑磨細，並加水使總體積為 2 ml (最終濃度為 32.5 mg/ml)。實驗小鼠以每 20 g 體重給予 0.4 ml 上述中藥溶液之劑量，以餵食器強迫給藥，二天給藥一次，共四次。每次給藥後紀錄小白鼠的體重、肛溫，並以心電圖測量其心跳，並觀察其毛色與活動情況。

四、致敏反應 (Sensitization)

家塵過敏原 Der p 5 與氫氧化鋁以 10 μ g 比 4mg 比例充分混合均勻後，注射至餵食過中藥劑四次後的小白鼠腹腔中以誘發過敏反應。首次抗原注射後二週再追加注射一次。第二次免疫後一週以噴霧機讓小白鼠吸入過敏原 Der p 5 (0.1%，30 分鐘)，誘發氣喘反應，18 小時後自小鼠心臟採血 500 μ l，所採得之血液置於室溫下 1 小時後離心，取其血清冰存於 -80°C，再進行酵素連結免疫分析法 (ELISA) 測定血清中特異抗體的效價。

五、病理檢查

將小白鼠麻醉，剪下靠近支氣管的一小段氣管；將胸骨及肋骨剪開，剪取右下肺葉；將剪下之肺葉與氣管置入福馬林中，固定四小時以上再進行組織切片。由病理科醫師依據支氣管黏膜下發炎細胞浸潤程度區分發炎反應為 1.無，2.輕微，3.嚴重。

六、呼吸道沖洗與細胞計數

噴霧刺激小白鼠後 18 小時，以生理食鹽水沖洗呼吸道 (500 μ l $\times$ 4 次)，收集沖洗液並離心 (500 g，10 分鐘)，上清液冰存 -80°C，用以分析 IL-4 和 IFN- γ 濃度，下層細胞溶於 1 ml 的 PBS 溶液，以離心方法使細胞附著於玻片，再以 Leu's stain 染色作血球分類計數。

七、酵素連結免疫分析法 (ELISA) 偵測 Der p 5 特異性 IgG 和 IgE 抗體濃度

將 Der p 5 溶於 pH9.6 的碳酸氫鈉緩衝溶液 (10 μ g/ml)，加 200 μ l 至每一格中；以膠膜封好，置於 4°C 中隔夜；次日用 PBS-Tween 20 沖洗每一格 3 次；然後每格加入 300 μ l 填充緩衝液 (blocking buffer, 3% BSA)，在室溫下搖動 2 小時，再用 PBS-Tween 20 沖洗每一格 3 次；取樣本 (IgG 添加 10 μ l 血清至 190 μ l 稀釋緩衝液 (diluent buffer, PBS 含 1% BSA)，IgE 添加 50 μ l 血清至 150 μ l 稀釋緩衝液) 加入每一格中，室溫下搖動 2 小時後，再加入 200 μ l Biotin-anti-mouse IgG (或 Biotin-anti-mouse IgE) (0.5 μ g/ml) 至每格中，室溫下搖動

2 小時；然後用 PBS-Tween 20 沖洗每一格 5 次；加入 200 μ l Streptavidin-alkaline phosphatase (1 : 1000) 至每格中，室溫下搖動 1 小時；用 PBS-Tween 20 沖洗每一格 6 次，最後加入 200 μ l pNPP (p-Nitrophenylphosphate, di-sodium, Sigma N-2770, USA)至每格中呈色，呈色結果以 OD405 值減 OD650 值後表示。

八、酵素連結免疫分析法 (ELISA) 偵測氣管肺泡沖洗液中 IFN- γ 及 IL-4 濃度

取 anti-mouse IFN- γ 30 μ l (Cat. No18181D, PharMingen, USA) 或 anti-mouse IL-4 20 μ l (Cat. No19181D, PharMingen, USA) (0.5 mg/ml) 溶於 10ml 包覆緩衝液 (coating buffer, 0.1M Na₂HPO₄, pH 9.0), 加 100 μ l 至每一格中；以膠膜封好，置於 4°C 中隔夜；次日用洗滌緩衝液 (washing buffer, 0.05% Tween 20 溶於 PBS) 沖洗每一格 3 次；然後每格加入 300 μ l 填充緩衝液 (blocking buffer, 1% BSA 溶於 PBS), 在室溫下搖動 2 小時，再用洗滌緩衝液沖洗每一格 3 次；取樣本 150 μ l 加入每一格中，於 4°C 放置隔夜；隔天用洗滌緩衝液沖洗每一格 5 次，再分別加入 100 μ l Biotin-anti-mouse INF- γ (Cat No18112D, PharMingen, USA) 和 Biotin-anti-mouse IL-4 (Cat. No18042D, PharMingen, USA) (0.5 μ g/ml) 至每格中，室溫下搖動 1 小時；然後用洗滌緩衝液沖洗每一格 6 次；加入 100 μ l Streptavidin-alkaline phosphatase (1 : 1000) 至每格中，室溫下搖動 1 小時；洗滌緩衝液沖洗每一格 8 次，最後加入 100 μ l pNPP (p-Nitrophenylphosphate, di-sodium , Sigma N-2770) 至每格中呈色，呈色結果以 OD405 值減 OD650 值後表示。

九、統計方法

餵藥前後生理變化值以 Wilcoxon match pair test 加以檢驗，若 P 值 < 0.05，則表示餵藥前後有生理差異。Der p 5 特異性 IgG 和 IgE 抗體濃度與氣管肺泡沖洗液中 IFN- γ 及 IL-4 濃度等數據以 ANOVA 方法加以檢驗，若 P 值 < 0.05，則視為各組實驗結果有統計上之意義。

結 果

一、小白鼠餵食中藥後外觀與生理值的變化

各組動物在餵食中藥 4 次後，寒組小白鼠毛色明顯變的晦暗，皮膚濕冷，活動力下降，瑟縮在鼠籠中；熱組小白鼠毛色依然光亮，且活動力增加，不停在鼠籠中移動。生理值的變化方面，以 Wilcoxon match pair test 統計 (表 1)，各組老鼠體重都減輕，寒組餵藥前為 23.7 $\pm$ 3.0 g，餵藥後為 21.4 $\pm$ 3.0 g；熱組餵藥前為 25.0 $\pm$ 2.60 g，餵藥後為 21.7 $\pm$ 3.2 g；對照組餵藥前為 21.7 $\pm$ 0.3 g，餵藥後為 20.7 $\pm$ 0.3 g，三組之間並無統計上之差異。體溫寒組餵藥前 36.8 $\pm$ 0.8°C，為餵藥後為 33.0 $\pm$ 1.3°C；熱組餵藥前為 35.7 $\pm$ 1.5°C，餵藥後為 33.0 $\pm$ 0.6°C；對照組餵藥前 34.6 $\pm$ 0.1°C，為餵藥後為 36.3 $\pm$ 3.8°C，三組餵藥前後並無統計上之差異。心跳寒組餵藥前為 700 $\pm$ 34 次/min，餵藥後為 600 $\pm$ 103 次/min；熱組餵藥前為 615 $\pm$ 30 次/min 餵藥後為 652 $\pm$ 15 次/min；對照組餵藥前為 615 $\pm$ 148 次/min，餵藥後為 690 $\pm$ 42 次/min，寒組心跳在餵藥後心跳減緩，具有統計上的意義，其他兩組的改變並無統計上之差異。

表 1 各組動物餵食藥物前後心率體溫和體重的變化

項目		寒組	熱組	對照組
心率 (次/min)	造型前	700 $\pm$ 35	615 $\pm$ 30	615 $\pm$ 105
	造型後	600 $\pm$ 103*	652 $\pm$ 15	690 $\pm$ 30
體溫 ($^{\circ}\text{C}$)	造型前	36.7 $\pm$ 0.8	35.7 $\pm$ 1.5	34.6 $\pm$ 0.1
	造型後	33.0 $\pm$ 1.3	33.0 $\pm$ 0.6	36.3 $\pm$ 3.8
體重 (g)	造型前	23.7 $\pm$ 3.0	25.0 $\pm$ 2.6	21.7 $\pm$ 0.3
	造型後	21.3 $\pm$ 2.9	21.7 $\pm$ 3.2	20.7 $\pm$ 0.3

*以 Wilcoxon match pair test 方法統計， $P < 0.05$

二、肺部病理檢查

各組動物在餵食中藥四次後，以 Der p 5 抗原腹腔注射，二週後再追加注射一次。第二次免疫後一週，經呼吸道吸入 Der p 5 抗原後，作肺部及氣管之病理切片加以觀察 (Fig. 1)。寒組動物之氣管組織切片發現氣管黏膜下層有輕微水腫，無發炎細胞浸潤，黏膜層完整；肺葉切片肺泡完整無分泌物堆積，肺間質無增厚，支氣管血管周圍只有少量發炎細胞浸潤，發炎情形輕微。而熱組動物氣管黏膜下層水腫嚴重，有大量發炎細胞浸潤，以巨噬細胞及淋巴球為主，也可以發現多型核白血球，其中有嗜伊紅球，黏膜及平滑肌有增厚現象，腺體也有增生；肺葉切片肺泡內分泌物堆積，肺間質增厚，支氣管、血管周圍有大量發炎細胞浸潤，肺葉內有充血情形，可見大量巨噬細胞吞噬紅血球，發炎情形很嚴重。對照組動物之氣管組織切片發現氣管黏膜下層有輕微水腫，少許發炎細胞浸潤，黏膜層完整；肺葉切片肺泡完整無分泌物堆積，肺間質稍增厚，細支氣管、血管周圍有發炎細胞浸潤，同時出現淋巴組織，發炎情形介於寒組與熱組之間。

氣管肺泡沖洗液中血球分類計數，以單核球及淋巴球為主，急性發炎期的多型核白血球較少。多型核白血球所佔比例如下：寒組 $2.0 \pm 0.1\%$ ，熱組 $4.3 \pm 0.1\%$ ，對照組 $6.25 \pm 0.5\%$ ，三組數據經 ANOVA 方法統計，並無明顯差異。本實驗氣管肺泡沖洗液中血球分類計數有 1-2% 的嗜伊紅性白血球，然而各研究組別間並無差別。

三、小白鼠血清中 Der p 5 特異性 IgG 和 IgE 的濃度

各組動物在餵食中藥並經呼吸道吸入 Der p 5 後，取血清以酵素連結免疫分析法偵測其 Der p 5 特異性 IgG 和 IgE 的濃度，並以光學密度值 (OD value) 來表示其濃度，所得結果如 (Fig. 2) 所示：寒組所測得 IgG 為 1.81 ± 0.07 ，熱組所測得 IgG 為 0.57 ± 0.11 ，對照組所測得 IgG 為 0.16 ± 0.03 ；寒組所測得 IgE 為 1.43 ± 0.24 ，熱組所測得 IgE 為 0.47 ± 0.07 ，對照組所測得 IgE 為 0.77 ± 0.23 。各組數據以 ANOVA 之統計方法檢驗之後，並無統計上的差異。

四、小白鼠呼吸道內細胞激素 (cytokine) IFN- γ 和 IL-4 的濃度

各組動物在餵食中藥並經呼吸道吸入 Der p 5 後，取氣管肺泡沖洗液以酵素連結免疫分析法偵測其呼吸道內細胞激素 IFN- γ 和 IL-4 的濃度，並以光學密度值 (OD value) 來表示其濃度，所得結果如 (Fig. 3) 所示：寒組所測得 IL-4 為 1.35 ± 0.05 ，熱組所測得 IL-4 為 1.44 ± 0.12 ，對照組所測得 IL-4 為 0.77 ± 0.08 ；寒組所測得 IFN- γ 為 1.20 ± 0.08 ，熱組所測得 IFN- γ 為 1.55 ± 0.07 ，對照組所測得 IFN- γ 為 0.76 ± 0.13 。各組數據以 ANOVA 之統計方法檢驗之後，其 P 值皆小於 0.05，具有統計上的意義。

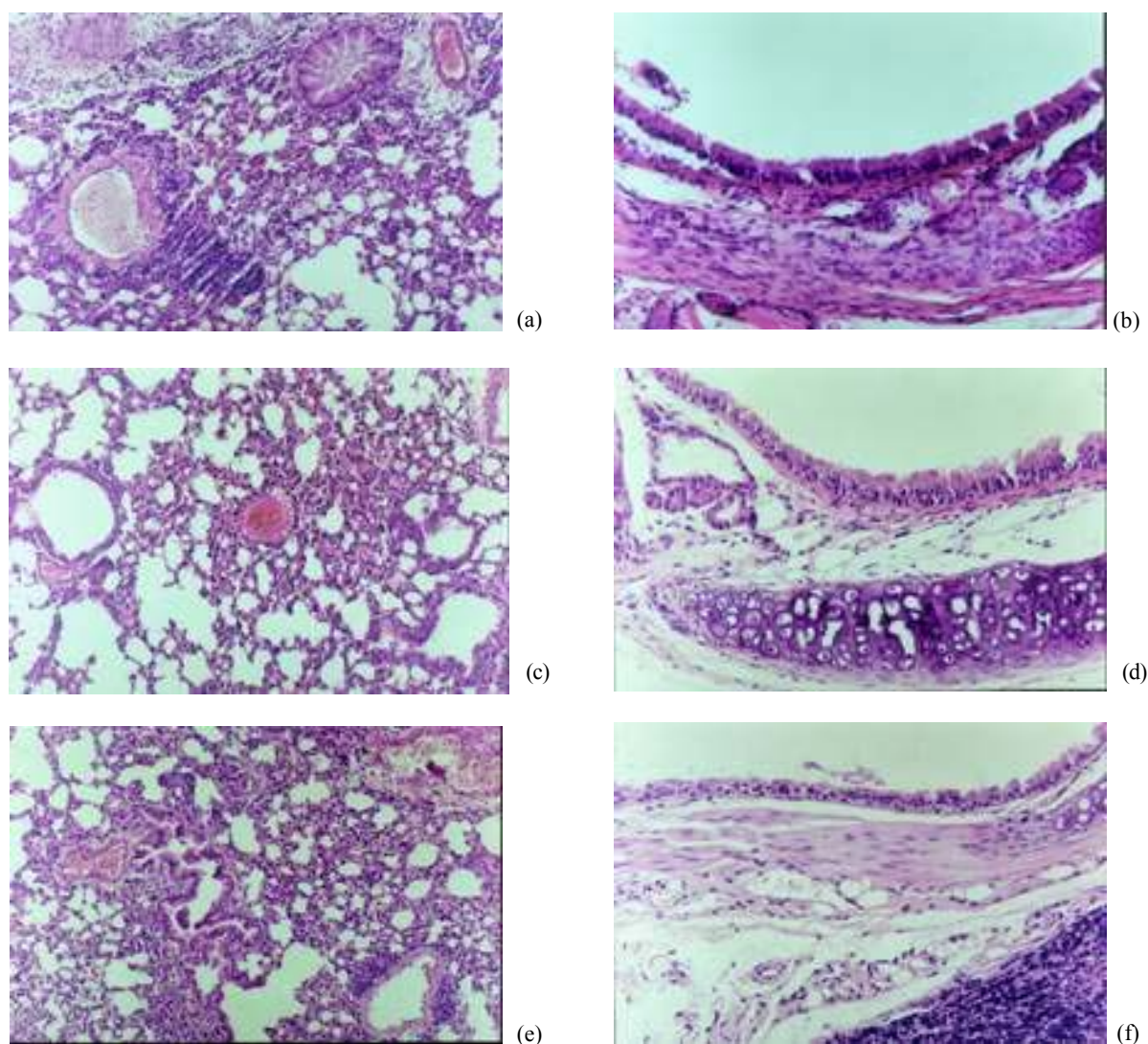


Fig. 1. The histopathological section of lung ($\times 100$) and trachea ($\times 200$)

(a) Lung of the heat “Zheng” animal. The septa are infiltrated with massive inflammatory cells (lymphocytes, macrophages and also some eosinophiles) especially around the bronchioles and capillaries. The space of alveoli are filled of mucous secretion. (b) The submucosa of heat “Zheng” animal’s trachea has severe edema and is infiltrated with inflammatory cells. The mucosa and muscle layer thicken. The inflammation of the cold “Zheng” animal’s lung (c) and the trachea (d) are milder. Some inflammatory cells infiltrate around the bronchioles and capillaries. The septa do not thicken and the space of alveoli are clear. The submucosa of trachea has mild edema without inflammatory cells infiltration. The mucosa remains single layer and complete. The inflammation of the control animal’s lung (e) and trachea (f) are moderate when compared with the other groups.

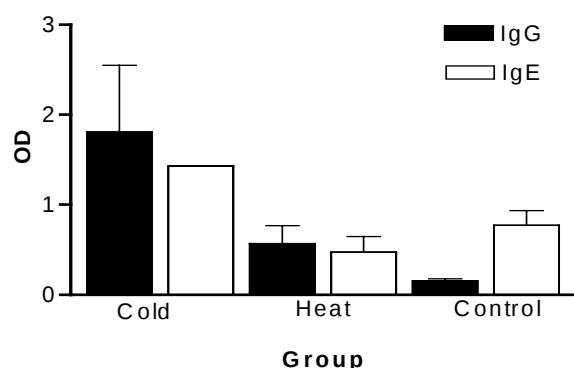


Fig. 2. ELISA of Der p 5-specific IgG & IgE antibody after Der p 5 inhalational challenge.

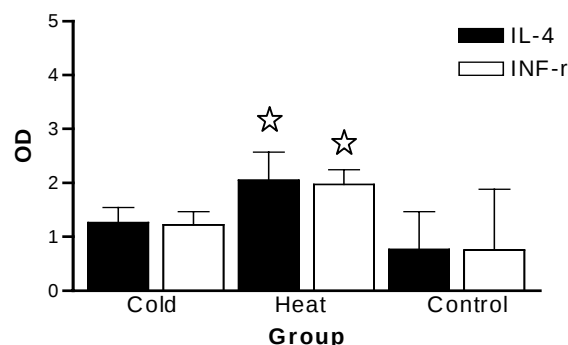


Fig. 3. ELISA of IL-4 & INF-γ in the bronchoalveolar lavage fluid after Der p 5 inhalational challenge. The concentrations of IL-4 & INF-γ among the three groups has significant difference after analyzed by ANOVA. ($p < 0.05$)

討 論

我國傳統醫學的證型分類主要是根據臨床上對病人外在表現的觀察，以“有諸內，形諸外”的立論推測人體內部的生理變化，因此本實驗將對實驗動物的外表觀察作為區別寒熱證型的重要指標。古人對寒證的描述有面色蒼白、惡寒肢冷、喜暖、口不渴、大便溏薄、小溲清長、舌淡苔白潤及脈遲等，對熱證則有發熱惡寒、面色紅赤、煩躁不寧、渴喜冷飲、大便秘結、小溲短赤、舌紅苔乾黃及脈數等敘述。本實驗發現熱組小白鼠毛色光亮，且活動力增加，不停在鼠籠中移動，寒組小白鼠毛色明顯變的晦暗，皮膚濕冷，活動力下降，蜷縮在鼠籠中，從外觀上即可分辨出兩組動物的不同。測量其心率結果發現寒組動物心率下降具有統計上的意義，而體溫與體重各組餵藥前後並無明顯改變。寒性與熱性中藥影響動物生理的機轉，曾有研究報告指出可能與垂體及交感神經 - 腎上腺系統機能下降有關^{8,9}，本實驗造成寒熱證動物是否為同一機轉，仍須進一步研究。

本實驗採用以家塵 抗原經腹腔注射誘發其過敏免疫反應，並用呼吸道吸入抗原的方式造成急性發作之小白鼠氣喘模型¹⁰⁻¹²，從病理組織切片中發現對照組動物之氣管組織切片黏膜層完整，氣管黏膜下層有輕微水腫，少量發炎細胞浸潤，以淋巴球為主；肺葉組織切片肺泡完整無分泌物堆積，肺間質稍增厚，細支氣管、血管周圍有發炎細胞浸潤，同時出現淋巴組織，目前研究認為氣喘為呼吸道的慢性發炎反應，主要病理變化為氣管黏膜下層水腫，發炎細胞浸潤，本動物模式符合上述要點，確實出現呼吸道炎症之氣喘急性期反應。而熱組動物氣管黏膜下層水腫嚴重，有大量發炎細胞浸潤，以巨噬細胞及淋巴球為主，也可以發現多型核白血球，其中有嗜中性球與嗜伊紅球，黏膜及平滑肌有增厚現象，腺體也有增生；肺葉組織切片肺泡內分泌物堆積，肺間質增厚，支氣管、血管周圍有大量發炎細胞浸潤，肺葉內有充血情形，可見大量巨噬細胞吞噬紅血球形成的巨大細胞，發炎情形很嚴重，其神經組織也較為發達，與氣喘造成之呼吸道敏感有關。與中醫對

熱哮症狀之描述，痰多黃稠、喘鳴氣粗相符。寒組動物之病理組織切片發現其發炎情形比熱組及對照組來得輕微，由此可知寒、熱證動物在氣喘急性發作時，嚴重程度有明顯的差異。

我們試圖從分子層面觀察寒、熱證氣喘動物的差異。由於 T 淋巴細胞在發炎反應中扮演識別抗原、啟動炎症反應、調節免疫作用的關鍵角色，其中輔助型的 CD4 陽性 T 淋巴球可分為二型，Th1 型 T 淋巴球會分泌 IFN- γ ，Th2 型 T 淋巴球則分泌 IL-4，IL-4 會刺激 B 淋巴細胞分泌大量 IgE，IgE 會附著於肥大細胞與嗜鹼細胞上誘發組織胺、前列腺素和白細胞三烯等發炎物質的釋出，造成呼吸道的過度收縮，氣喘病患的免疫反應多偏向 Th2 型 T 淋巴球的徑路¹³。過敏性氣喘的免疫反應可分為兩期-急性期與遲發期。急性期是屬於第一型過敏反應，會在接觸到過敏原後的 30 分鐘內發生，其免疫反應由 IgE 媒介引起肥大細胞及嗜鹼細胞釋出 histamine。遲發期是屬於第四型過敏免疫反應，是由 T 細胞媒介，T 細胞透過細胞激素的分泌，引起呼吸道發炎細胞的聚集，此反應會在接觸到過敏原後的 8-24 小時發生。本實驗室曾經作過 IL-4、IFN- γ 在激發後 8、12、18、24 及 72 小時之濃度變化，以 18 及 24 小時之濃度最高。氣喘的產生主要是因為慢性炎症而引起呼吸道的過度敏感，因此本實驗希望探討遲發期的免疫反應，故選在第 18 小時分析氣管肺泡沖洗液，測定此時呼吸道中細胞激素 IFN- γ 、IL-4 的分泌量及血清中特異性 IgG、IgE，以了解發炎細胞聚集的情形。結果顯示血清中特異性 IgG、IgE 各組動物間無明顯差異，而熱組動物的 IL-4、IFN- γ 的增加皆有統計意義，明顯高於寒組與對照組，而寒組與對照組間無顯著差異，這可能是熱組動物氣喘發作劇烈的原因，然而細胞激素對氣喘免疫反應的調控形成相當複雜的網絡，只檢測此二種細胞激素仍無法窺見整體免疫反應的全貌，仍有待進一步的研究。

本實驗採取先以寒涼藥與溫熱藥造成寒熱證型動物後，再經腹腔注射抗原誘發氣喘，期間經歷 3 週並未給予任何維持劑量 (maintain dose) 的藥物，實驗動物在外觀上雖然失去寒、熱證的特徵，然而在病理反應上仍有極大的差異，這樣的結果可能可以避免將來用於評估其他方劑療效時產生干擾。目前寒熱證動物模型的造型有許多不同的方法，如溫度控制法¹⁴、自然體質法¹⁵等，然而仍需進一步研究以了解這些動物模型的穩定性。

中醫動物模型建立迄今已有三十餘年的歷史，目前研究最多的是建立各種“證”的動物模型，如臟象學說中的腎虛^{16,17}、脾虛^{18,19}、氣虛²⁰等動物模型，傷寒論中的太陰病動物模型，溫病中的暑厥證²¹模型等，但較少疾病與證候相結合的動物模型，因此臨床實用性上較為不足，實際應用於藥物研究的情形並不多見。本實驗建立氣喘的寒熱證型動物模式，並從生理、病理組織切片、免疫反應的變化闡述其特徵，希望日後能應用於中醫平喘方劑的療效評估及其作用機轉的研究，對於建立中醫實驗科學體系能有所助益。中醫動物模型建立至今仍有諸多問題尚未解決，亦未獲得公認，然而寒熱辨證是中醫診斷中的重要精神，但是對其本質研究之論文仍然匱乏，需要更多中醫界的先進、同好共同努力，設計更多實驗以釐清相關問題，以解開寒熱本質的真相。

參考資料

1. 陳小野，實用中醫證型動物模型學，第一版，北京，北京醫科大學中國協和醫科大學聯合出版社，1993。

2. Hsieh KH, Shen JJ. Prevalence of childhood asthma in Taipei, Taiwan, and other Asian Pacific countries. *J Asthma* 25:73-82, 1998.
3. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 351:1225-1232, 1998.
4. Cook C, Baisden D. Ancillary use of folk medicine by patients in primary care clinics in southwestern West Virginia. *South Med J* 79:1098-1101, 1989.
5. Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Rompay MV, Kessler RC. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997 *JAMA* 280:1569-1575, 1998.
6. 武維平，氣喘論治淺述，*北京中醫學院學報* 9:23-25，1996。
7. 許清祥、徐昀耀、李明憲，中醫平喘方劑對於過敏原特異性呼吸道發炎反應的作用機轉評估，*中醫藥雜誌* 11(3)：111-121，2000。
8. 梁月華，寒涼藥與溫熱藥對交感神經-腎上腺及代謝機能的影響，*北京醫科大學學報* 19(1)：54，1987。
9. 梁月華，中醫寒熱本質的初步研究，*中醫藥雜誌* 59(12)：705，1979。
10. Roundtress S, Cogswell JJ, Platts-Mills TAE, Mitchell EB. Development of IgG antibodies to foods and inhalant allergens in children at risk of allergic disease. *Arch Dis Child* 60:727-735, 1985.
11. Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Huang SK, Hsieh KH. Inhibition of specific IgE response in vivo by allergen-gene transfer. *Int. Immunol.* 9:1405，1996.
12. Renz H, Lack G, Saloga J, Schwinzer R, Bradley K, Loader J, Kupfer A, Larsen GL, Gelfand EW. Inhibition of IgE production and normalization of airways responsiveness by sensitized CD8 T cells in mouse model of allergen-induced sensitization. *J Immunol* 152:351, 1994.
13. Hsu CH, Chua KY, Huang SK, Ciang IP, Hsieh KH. Glutathione-D-transferase induces murine dermatitis that resembles human atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 26:1329, 1996.
14. 張偉榮，寒體熱體的實驗研究 (I)，*中西醫結合雜誌* 11(8)：477，1991。
15. 丁鏞發，寒體熱體的實驗研究 (II)，*中西醫結合雜誌* 11(9)：550，1991。
16. 朱傳義，腎虛動物模型初報，*中醫藥理與臨床* 3(3)：51，1987。
17. 陳小野，脾虛與腎虛動物模型的研制思路，*中醫藥學報* 3(1)：64，1988。
18. 北京師範大學生物系消化生理理科研組，中醫脾虛証動物的造型，*中華醫藥學雜誌* 60(2)：83，1980。
19. 謝仰洲，用過勞和飲食失節法塑造大白鼠脾氣虛証模型的研究，*中醫雜誌* 28(5)：57，1987。
20. 宋更原、徐秋萍，氣虛動物模與補氣藥實驗，*中藥藥理實驗* p.202，1988。
21. 馬驍，關於厥脫証動物模型的討論，*南京中醫藥學報* (2)：46，1990。

J Chin Med 12(3): 155-164, 2001

ALLERGIC ASTHMA ANIMAL MODEL WITH COLD AND HOT “ZHENG”

Chun-Mei Lu ^{1,5}, Hsiao-Wei Huang ², Ming-Tsung Lai ³, Ming-Hsein Li ⁴,
and Ching-Hsaing Hsu^{6,7}

¹Department of Chinese Medicine, ²Pediatric Department, ³Pathological Department,

⁴Department of Family Medicine, God's Help Hospital,
Chia Yi, Taiwan

⁵Post-Baccalaureate School of Chinese Medicine, ⁶Institute of Chinese Medicine, China Medical College,

⁷Pediatric Department, China Medical College Hospital
Taichung, Taiwan

(Received 5th February 2001, revised Ms received 17th August 2001, accepted 20th August 2001)

“Zheng” is the unique theory of diagnosis and treatment in Traditional Chinese Medicine (TCM). According to this theory, the acute phase of asthma is divided into cold “Zheng” and hot “Zheng”. The aim of this study was to establish an asthma murine model with cold “Zheng” and hot “Zheng” to evaluate the efficacy of TCM for the treatment of bronchial asthma and to study the mechanisms.

First, we fed *Scutellariae Coptis Gardeniae* and *Aconitum Cinnamomum Zingiber* separately to BALB/c mice to change their nature to cold and hot. In this experiment, the animals' appearances and changes of physical states, including body weight, body temperature, and heart rate were observed and recorded to estimate the effects of the Chinese herbal medicine. Then, we sensitized the mice using intraperitoneal injection of dust mite allergens (*Dermatophagodes pteronyssinus* group 5, Der p 5) and induced the allergen-specific airway hyperreactivity using inhalational challenges. Results of the pathological studies of the lung and trachea were observed to determine the severity of inflammation. The concentration of Der p 5-specific IgG and IgE antibodies in serum and cytokines IL-4 and INF- γ in bronchoalveolar lavage fluid were assessed using ELISA to clarify the differences of allergic immunoresponses between the animals with cold and hot “Zheng”.

We found that the animals with cold “Zheng” and hot “Zheng” were very different in appearance. The animals with hot “Zheng” were much more active than the animals with cold “Zheng”. According to the results of pathological examinations, the animals with hot “Zheng” had the most severe airway inflammation as shown by the concentrations of both interleukin-4 and interferon- γ which were the highest among the three groups. Therefore, we suggest that the physiology and immunoresponses are quite different between the mice with cold “Zheng” and hot “Zheng”, and the production of IL-4 may play a role in the differences.

Key words: Animal model, Cold “Zheng” and hot “Zheng”, Interleukin-4, Dust mite Allergen, allergic asthma.

Correspondence to: Ching-Hsaing Hsu, China Medical College Hospital, No.2 Yuh-Der Rd., Taichung, Taiwan.
TEL: (04)22062121 ext 1690, FAX: (04)22032798, E-mail: hsumd736@ms67.hinet.net

