

补肾活血方抑制胶原蛋白交联、 透明质酸解聚和脂质过氧化作用的研究[△]

北京心肺血管医疗研究中心(100029) 金 鸣*

摘要 研究补肾活血方(简称补方)水煎液的体外抗氧化作用。细胞色素C氧化法证明,终浓度3.56~14.2g/L时,补方·OH清除率为21.8%~43.5%。TBA比色法观察到,补方终浓度6.1~195.2mg/L时,大鼠肝匀浆LPO抑制率为11.3%~89.5%;粘度测定法发现,补方终浓度5~40g/L时透明质酸解聚抑制率为19.1%~48.1%;SDS-PAGE分析结果表明,补方可显著抑制胶原蛋白交联。还比较了复方及各单味药抗氧化作用的强度。

关键词 补肾活血方 羟自由基 脂质过氧化 透明质酸 胶原蛋白

补肾活血方(简称补方)补肾活血,主治老年慢性瘀血,是北京中医学院老中医王玉川教授临床经验方,含干漆、肉桂、枸杞子、菟丝子、蛇床子、生地、肉苁蓉。·OH是体内最活泼的活性氧,可进攻生物大分子,导致脂质过氧化、透明质酸解聚、胶原蛋白交联等损伤,是老年期动脉硬化、心肌顺应性下降,动脉壁脂质沉积等现象的起因之一。血液循环障碍常与自由基损伤共存,为了探讨补方治疗老年慢性瘀血的机理,本文观察了其水煎液在离体条件下清除·OH、抑制大鼠肝匀浆脂质过氧化和抑制·OH诱发的透明质酸解聚与胶原蛋白交联的作用。

1 材料与方

动物:健康Wistar大鼠,雄性,体重200~250g(胶原蛋白实验)及120~180g(脂质过氧化实验),中国中医研究院动物房提供。

药材:药材饮片均购自北京同仁堂药店,经北京中医学院中药鉴定教研室李家实教授鉴定。干漆为漆树*Rhus vernicifera* De Candel树脂加工后的干燥品。枸杞子*Lycium barbarum* L.。肉苁蓉*Cistanche deserticola* Y.C.Ma。蛇床子*Cnidium monnieri* (L.) Cusson。生地*Rehmannia glutinosa* Libosch。肉桂*Cinnamomum cassia* Presl。菟丝子*Cuscuta chinensis* Lam。

试剂:双丙烯酰胺,甘露醇为国产化学纯,N,N,N,N-tetramethylenedimine(TEMED)为Koch Light Laboratory公司产品,硫代巴比妥酸(TBA)为国产化学纯经重结晶处理,甘氨酸为生物试剂,考马斯亮蓝为Fluka公司产品。透明质酸(Hyaluronic Acid, HA)、三羟甲基氨基甲烷为生化试剂,马心肌细胞色素C为BDH公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

仪器:岛津UV-120型紫外可见分光光度计日立20-PR-52D型冷冻离心机,毛细管粘度计,LKB电泳仪。

SDS-PAGE方法:参考Lacmml方法^[1],浓缩胶及分离胶均为5%。

中药水煎法:中药饮片以蒸馏水冷浸2h以上,第一煎40min,第二煎30min,合并两煎药液,3000r/min离心除去药渣,浓缩至每毫升药液含生药1g,过滤备用。

药物清除·OH方法:参考王成莲等比色测定·OH方法^[2],CuSO₄改为CuCl₂,·OH损伤管不加中药,保护管加定量中药液,每一中药浓度设一不加抗坏血酸管为比色空白,以无中

*Address: Jin Ming, Beijing Heart Lung and Blood Vessel Medical Center, Beijing

△本文工作为作者攻读博士学位研究生期间完成,导师为北京中医学院陈文为教授。

药, 无抗坏血酸管为对照, $\cdot\text{OH}$ 清除率计算公式:

$$d = 100\% - \left[\frac{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{保护}})}{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{保护}})} \right] \times 100\%$$

药物抑制大鼠肝匀浆脂质过氧化(Lipid Peroxidation, LPO)方法: 参考文献^[3]比色测定法, 损伤管不加中药液, 保护管加定量中药液, 每一组剂量相同的实验管设一比色空白。于脂质过氧化反应前加三氯醋酸。脂质过氧化抑制率计算公式:

$$d = \left[\frac{(\text{OD}_{\text{损伤}} - \text{OD}_{\text{保护}})}{\text{OD}_{\text{损伤}}} \right] \times 100\%$$

药物抑制 $\cdot\text{OH}$ 所致HA解聚方法: 反应液总体积2ml, 内含pH7.4, 50mmol/L磷酸盐缓冲液, HA 1g/L, CuCl_2 0.01mmol/L, 抗坏血酸1mmol/L, 预热5min后加抗坏血酸, 37℃反应30min, 加0.1mol/L EDTA 0.05ml终止反应, 37℃测定反应液相对粘度 η 。损伤管不加中药液, 每一中药浓度设一不加抗坏血酸的空白管, HA解聚抑制率计算公式:

$$d = \left[\frac{(\eta_{\text{空白}} - \eta_{\text{保护}})}{(\eta_{\text{空白}} - \eta_{\text{损伤}})} \right] \times 100\%$$

胶原蛋白(Collagen, Col)制备方法: 取大鼠尾部肌腱, 冰浴中去除肌肉及残血, 剪碎, 加20~30倍量0.5mol/L HAc匀浆, 匀浆液置4℃冰箱, 经常振摇, 2d后4℃5000r/min离心30min, 取上清液, 加2~3倍量冷丙酮, 4℃放置10~12h, 4℃5000r/min离心60min, 取沉淀真空干燥即得。此胶原蛋白的SDS-PAGE图谱与文献^[4]结果一致。

药物抑制 $\cdot\text{OH}$ 所致Col交联方法: 参考Yuko Kano的方法诱导Col交联作为损伤模型, 反应体系中加入药液0.01ml进行保护, 观察保护前后Col-SDS-PAGE行为的变化, 以双缩脲法测定反应体系中Col含量为5g/L。

除特别注明外, 本文数据均为3个平行测定管的均值。

2 结果

2.1 补方水煎液清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用: CuCl_2 /抗坏血酸体系可通过Fenton反应产生 $\cdot\text{OH}$, 氧化还原型细胞色素C, 使其吸收光谱改变。当补方水煎液终浓度为3.56~14.2g/L时, $\cdot\text{OH}$ 清除率逐步上升, 为 $21.8 \pm 0.6\%$ 至 $43.5 \pm 6.5\%$, 呈明显的剂量效应关系(图1)。

2.2 补方及肉桂水煎液抑制大鼠肝匀浆LPO的作用: 大鼠肝匀浆中脂质受自由基进攻, 生成丙二醛等物质, 与TBA反应后532nm吸光度升高。补方及其壮阳主药肉桂水煎液终浓度各为6.1~195.2mg/L时, 离体条件下大鼠肝匀浆LPO抑制率为 $11.3 \pm 1.9\%$ 至 $89.5 \pm 5.1\%$ 和 $18.1 \pm 5.8\%$ 至 $84.5 \pm 0.4\%$ (图2), 呈明显的量效关系。从图2可见, 补方的作用较肉桂略强。

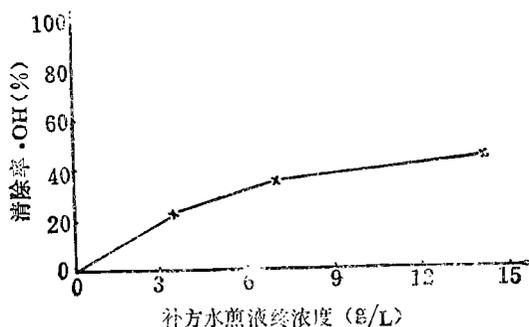


图1 补方煎液清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用

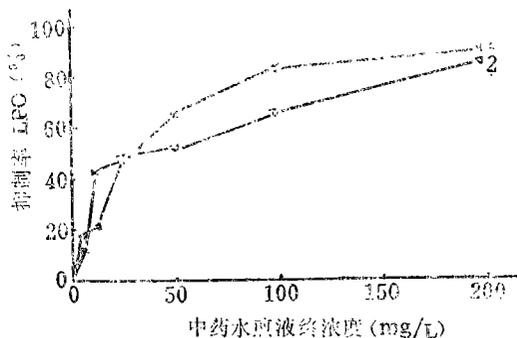


图2 补方及肉桂水煎液抑制大鼠肝匀浆LPO的作用

1—补方 2—肉桂

2.3 补方及肉桂水煎液抑制 $\cdot\text{OH}$ 诱导HA解聚的作用: HA是一氨基多糖, 被自由基裂解为小分子量片段后, 其溶液粘度下降。本实验条件下, CuCl_2 终浓度0.1mmol/L, 抗坏血酸

终浓度1mmol/L时, HA粘度下降 $20.2 \pm 2.5\%$ ($P < 0.05$), 表现出明显的损伤效应。补方及肉桂水煎液终浓度各为5~40g/L时, HA解聚抑制率逐步增加, 各为 $19.1 \pm 0.9\%$ 至 $48.1 \pm 0.6\%$ 和 $43.4 \pm 2.3\%$ 至 $52.4 \pm 1.1\%$, 呈现明显的量效关系。随着药物剂量的增加, 两药HA解聚抑制率之差逐步缩小(图3)。

2.4 补方各单味药水煎液抗氧化作用的比较: 补方各单味药及复方水煎液有不同程度的清除·OH(各药终浓度均为14.2g/L)、抑制大鼠肝匀浆LPO(各药终浓度均为195.1mg/L)和抑制·OH诱导HA解聚(各药终浓度均为40g/L)的作用。其中, 复方肉苁蓉、肉桂的抗氧化作用较强, 其LPO抑制率约为90%, ·OH清除率和HA解聚抑制率约为40%~60%; 菟丝子、生地、蛇床子作用居中, 其LPO抑制率约为40%, 清除·OH和抑制HA解聚的作用有强有弱; 干漆及枸杞子作用较弱。见表。

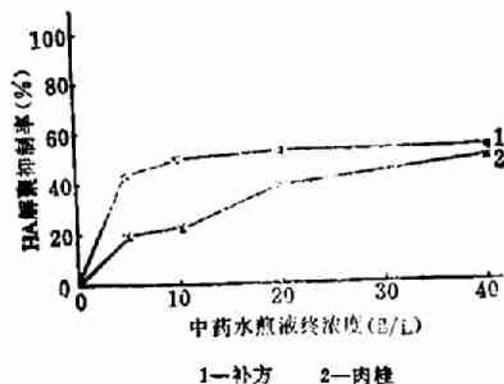


图3 补方和肉桂水煎液抑制·OH诱导HA解聚的作用

表 补方及其各单味药水煎液抗氧化作用的比较*(%)

| 药物 | OH清除率** | LPO抑制率 | HA解聚抑制率 |
|-----|---------|----------------|-----------------|
| 干漆 | 0 | 2.4 ± 0.7 | 21.7 ± 3.3 |
| 枸杞子 | 43.5 | 20.4 ± 1.8 | 50.5 ± 1.3 |
| 蛇床子 | 54.5 | 42.4 ± 1.5 | 30.8 ± 0.5 |
| 生地 | 24.7 | 43.3 ± 4.0 | 71.7 ± 2.3 |
| 菟丝子 | 22.7 | 45.4 ± 2.5 | — |
| 肉桂 | 53.9 | 89.5 ± 4.3 | 45.5 ± 2.6 |
| 肉苁蓉 | 59.7 | 94.2 ± 3.0 | 65.7 ± 4.4 |
| 补方 | 42.9 | 90.2 ± 3.7 | 49.1 ± 17.1 |

*菟丝子水煎液因粘度过大, 无准确数据

**此列数据为2个平行测定管的均值

2.5 补方水煎液抑制·OH诱导Col交联的作用: 正常胶原蛋白SDS-PAGE图谱有5条色带, 自上而下依次为 γ 、 β_{11} 、 β_{12} 、 α_1 、 α_2 带(图4中样品1), ·OH诱导Col交联后, 各带颜色变浅以至消失(图4中样品2)。这与文献(4)的结果一致。补方水煎液加入后, 终浓度为0.16g/L时各色带略有恢复, 终浓度逐步增至10.24g/L时, 各带颜色逐步恢复至未损伤样品的水平(图4样品3-6)。这与·OH清除剂10mmol/L甘露醇的作用趋势一致。说明补方水煎液在该浓度下有抑制·OH诱导胶原蛋白交联的作用(图4)。同样条件下, 未见肉桂水煎液有明显的抑制·OH诱导胶原蛋白交联的作用。



图4 补方水煎液抑制·OH诱导Col交联的作用

1-正常Col 2-Col·OH损伤 3-Col·OH损伤+0.16g/L补方液 4-Col·OH损伤+0.64g/L补方液
5-Col·OH损伤+2.56g/L补方液 6-Col·OH损伤+10.24g/L补方液 7-Col·OH损伤+10mmol/L甘露醇
8-试剂空白

3 讨论

本文结果表明,补方水煎液可清除·OH,抑制大鼠肝匀浆脂质过氧化,缓解·OH诱发的透明质酸解聚和胶原蛋白交联。

自由基损伤是衰老的重要起因之一,它引发胶原蛋白交联、脂质过氧化等改变是老年期心肌顺应性下降,血管硬化,动脉壁脂质沉积等现象的起因之一。透明质酸解聚是自由基损伤造成老年期结缔组织弹性下降的重要机理。这些变化均可加剧血液循环障碍。补方主治老年慢性瘀血,从本文结果分析,其抗氧化效应可能对缓解老年期血液循环障碍有所帮助。

自由基损伤反应的特异性表现在疾病发展的特定阶段,特定的组织及生物大分子受损所产生的特殊效应,离体实验模型不易体现这种特异性。口服中药成分透过体内多重屏障,被种种代谢酶作用,到达靶组织后还能否保持原有的结构很多尚属未知。因此,虽然本文许多药物有较明显的抗氧化作用,但这些结论还有待于整个实验的证实。

体内自由基损伤反应是导致血液循环障碍及产生继发损伤重要因素之一,活血化瘀药物的抗自由基损伤作用与其活血效应可能有关。探讨中药活血化瘀与抗自由基损伤的关系,对进一步阐明活血化瘀治则的实质,探索抗衰老的新途径,有重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Laemmli U K, et al. Nature, 1970, 227 (15): 680
- 2 王成莲,等.生物化学与生物物理进展, 1989, 16(6): 473
- 3 陈文为,等.中国医药学报, 1986, 1(2): 25
- 4 Kano Y, et al. J Biochem, 1987(102): 839

(1992-11-06收稿)

(上接第69页)

4.2 稳定性实验:依上法操作,每隔一定时间测定斑点的积分值,结果在1h内稳定性良好。

4.3 样品溶液的制备及测定:精密吸取抗病毒口服液50ml,加盐酸5ml,置水浴水解2h,放至室温,滤过,容器及滤渣多次加少量水洗涤,至滤液无色。滤渣置烘箱中100℃干燥1h后,置索氏提取器中用石油醚(30~60℃)回流提取3h。提取液回收石油醚至干,用石油醚转移至具塞试管中,挥干石油醚。精密吸取1ml氯仿-乙醇(1:1)混合液溶解残渣,得样品溶液。精密吸取供试品液20μl,对照品溶液2、4μl分别点于同一薄层板上,按标准曲线项操作。由测定的峰面积积分值得出抗病毒口服液按菝葜皂甙元计算其含量,结果见表。

5 加样回收率试验

取抗病毒口服液制成的样品20μl,加入对照品溶液5μl(含菝葜皂甙元5μg),并用对照品及样品溶液随行点样层析。按样品测定项下操作,计算含量结果,平均回收率为102.8%,CV=3.70%(n=6)。

表 各厂家生产的抗病毒口服液含量测定结果

| 厂家 | 批号 | 含量(μg/ml) | 平均 CV% |
|----|--------|----------------------|-------------|
| 本溪 | 921001 | 1.0901 1.0531 1.2029 | 1.154 5.71 |
| 广州 | 920803 | 2.2379 2.2470 2.2837 | 2.2562 1.01 |

6 结果

6.1 本法测定抗病毒口服液中菝葜皂甙元的含量,方法简便,结果稳定,重现性好,可作为质量检验的一个定量方法。

6.2 从不同厂家生产的抗病毒口服液中菝葜皂甙元的含量结果看出,本溪生产的口服液含量要比广州生产的低些。

致谢:本实验的数据承蒙沈阳药学院测试中心孙秀艳老师测试部分工作。

(1993-03-11收稿)