

# 草血竭醇提物体外抗脂质过氧化作用 和对中性白细胞功能的影响

兰州医学院药理学教研室(730000)

李文广\*

兰州大学应用有机化学国家重点实验室

田 暄 钟惠民

**摘 要** 草血竭醇提物体外能明显抑制大鼠肝自发性及  $\text{Fe}^{2+}$ -Vit C 体系诱导的心、肝、肾丙二醛生成,并抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的红细胞溶血,ERS 法直接抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{Fe}^{2+}$  产生  $\text{OH}^\cdot$ ,能诱导并增强酵母多糖诱导中性白细胞释放  $\text{O}_2^-$ ,表明草血竭醇提物体外能清除  $\text{OH}^\cdot$  而提高白细胞功能。

**关键词** 草血竭 活性氧自由基 丙二醛 中性白细胞 ESR

草血竭 *Polygonum paleaceum* Wall 为蓼科植物草血竭的根茎,有散血止血,下气止痛之功效,民间用于治菌痢,止血等<sup>[1]</sup>,对其药理作用的研究尚未见报道,本实验研究其对活性氧自由基的影响。

## 1 实验材料

1.1 药物:草血竭采自云南省丽江县,由兰州大学生物系张国梁教授鉴定。经醇提干燥后得红色结晶,初步实验证实为多酚类物质。

1.2 试剂:硫代巴比妥酸(TBA)为上海试剂二厂产品,氯化硝基四氮唑蓝(NBT)为上海前进试剂厂产品,酵母多糖为 Sigma 产品,DMPO(5,5,-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide)为 Fluka 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 动物:Wistar 大鼠,雌雄兼用,由兰州医学院动物房提供。

## 2 方法与结果

2.1 对大鼠肝自发性丙二醛(MDA)生成的影响:大鼠断头放血处死,剖取肝脏,用 Tris-KCl 缓冲液(KCl 1 mmol/L,Tris 0.1 mol/L,pH7.4)制成 5%的肝组织匀浆,实验分空白组(加相应溶媒)和药物组(加相应浓度的药液),每组平行 5 管,每管 1 mL 组织匀浆,37℃温育 2 h,按硫代巴比妥酸法<sup>[2]</sup>测 MDA。

结果(表 1)草血竭醇提物对肝自发性 MDA 生成有明显的抑制作用,IC<sub>50</sub>为 8.63 μg/mL。

表 1 草血竭醇提物对大鼠肝自发性 MDA 生成的影响

药物剂量 μg/mL	MDA nmol/g 肝	抑制率 %
对照	94.54±4.64	—
50	21.55±1.16*	77.21
25	25.50±1.29*	73.03
12.5	30.91±1.76*	67.30
6.25	54.38±5.05*	42.48
3.125	71.36±4.75*	24.52
1.562	79.88±4.75*	15.51
0.781	87.77±5.87	7.16

和对照组比 \*  $P < 0.01$

2.2 对  $\text{Fe}^{2+}$ -Vit C 诱导的大鼠心、肝、肾 MDA 生成的影响:同前法制备 5%各组织匀浆,实验分空白组(加相应溶媒),对照组(加  $\text{FeSO}_4$  和抗坏血酸即  $\text{Fe}^{2+}$ -Vit C 各 50 μmol/L)和给药组(加  $\text{Fe}^{2+}$ -Vit C 和各浓度药液)。先在相应管中加入各浓度药液或溶媒,37℃水浴温育 10 min,再给相应管中加  $\text{Fe}^{2+}$ -Vit C,继续温育 30 min,测 MDA。结果(表 2)草血竭醇提物体外对  $\text{Fe}^{2+}$ -Vit C 诱导的大鼠心、肝、肾组织匀浆 MDA 生成均有明显抑制作用,IC<sub>50</sub>分别为 109.02、74.78、88.47 μg/mL。

2.3 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导红细胞溶血的影响<sup>[3]</sup>:取

\* Address:Li Wenguang,Department of Pharmacology,Lanzhou Medical College,Lanzhou

李文广 男,1991年在兰州医学院药理教研室获硕士学位并留校任教,现任讲师。主要从事自由基与肿瘤药理研究。近年来发表相关论文 20 余篇,主要科研成果有:氮氧自由基抗氧化作用研究;天然产物鬼臼毒类新化合物的合成和抗肿瘤活性的研究以及氮氧自由基对阿霉素的增效减毒作用。作为主要参加者合作完成了新药 NGF,rh·bFGF 等的临床前研究。

肝素抗凝大鼠全血,用生理盐水 2000 r/min, 5 min 离心洗涤 3 次,制成 0.5% 的红细胞悬浮液,分组同 2.2,将红细胞悬浮液加药液后与 100 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37℃ 温育 1 h,稀释 5 倍后离心,取上清液在 415 nm 处测吸光度

(OD),判断溶血程度,空白管不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,结果(表 3)草血竭醇提物体外对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的红细胞溶血有明显的抑制作用,量效关系明显,IC<sub>50</sub> 为 48.71 μg/mL。

表 2 草血竭醇提物对 Fe<sup>2+</sup>-Vit C 诱导的大鼠肝、心、肾 MDA 生成的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

药物剂量 μg/mL	MDA(nmol/g)/抑制率(%)					
	肝 (%)		心 (%)		肾 (%)	
空白管	74.35±3.79*	—	108.45±1.25*	—	115.92±2.37*	—
对照管	268.63±7.76	—	341.28±15.45	—	347.35±8.09	—
100	128.73±17.91*	72.0	218.73±23.24*	52.6	209.56±2.50*	59.5
50	230.72±10.76*	19.5	303.63±12.30*	16.2	299.40±10.79*	20.7
25	262.76±11.27	3.0	315.62±7.45*	11.0	309.97±7.23*	16.2

和对照组比 \* P<0.01

表 3 草血竭醇提物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的大鼠红细胞溶血的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

药物剂量 μg/mL	溶血度 OD <sub>415</sub>	抑制率 %
空白管	0.045±0.005*	—
对照管	0.648±0.038	—
100	0.221±0.019*	70.88
50	0.315±0.015*	55.25
25	0.489±0.058*	26.40

和对照组比 \* P<0.01

2.4 自旋捕集 ESR 技术测定 OH·:参照文献<sup>[4]</sup>用 ER200D 型顺磁波谱仪(Bruker 产品)测定,微波功率 28 mW,调制频率 100 kHz,调制幅度 4 G,扫描速度 25 G/min,时间常数 200 s,测定体系为 1.25% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 mol/L DMPO, 2.0×10<sup>-4</sup> mol/L 硫酸亚铁铵, 0.125 mol/L PBS(pH 7.4),各浓度药液各 50 μL 混匀后 5 min 测 ESR 谱,以 DMPO-OH 谱的第 2 个峰的高度计算 OH· 的生成量和药物的抑制率。结果(图 1)草血竭醇提物体外对 OH· 的生成有明显抑制作用,100 μg/mL 的抑制率为 30%。



图 1 草血竭醇提物对 OH· 生成的影响

A-对照 B-100 μg/mL C-50 μg/mL

2.5 对酵母多糖诱导大鼠中性白细胞释放

O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的影响:酵母多糖 50 mg 加新鲜大鼠血清 0.5 mL, 37℃ 水浴振荡温育 30 min, 4 000 r/min, 4℃ 离心 20 min, 弃上清, 沉淀加 1 mL 磷酸缓冲液(PBS pH7.0)洗 1 次后用 2 mL PBS 悬浮备用<sup>[5]</sup>;大鼠中性白细胞的制备<sup>[6]</sup>,用 Wistar 大鼠 ip 液体石蜡 10 mL, 18 h 时断头处死,用 100 mL 冰浴中预冷的 Hanks 液分两次洗出腹腔渗出液, 500 r/min, 4℃ 离心 10 min, 取沉淀细胞再用 Hanks 洗一次后制成细胞悬液,冰浴中保存备用。实验分组同 2.2,测定系统含 0.01 mol/L KCN 0.1 mL, 0.1% NBT 0.4 mL, 细胞悬液(1×10<sup>7</sup>/mL) 0.4 mL, 药液 50 μL(空白和对照管含 DMSO 2.5 μL/mL), 2.5 mg/mL 酵母多糖 0.1 mL(空白管不加), 37℃ 温育 35 min 后按 NBT 法<sup>[6]</sup>测定,结果(表 4)草血竭醇提物体外对酵母多糖诱导的中性白细胞释放 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 有明显增强作用。

表 4 草血竭醇提物对酵母多糖诱导的大鼠中性白细胞释放 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的增强作用( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

药物剂量 μg/mL	还原型 NBT OD <sub>515</sub>	变化率 %
空白管	0.088±0.013*	—
对照管	0.228±0.017	160.0
100	0.333±0.014*	280.0
50	0.320±0.008*	265.7
25	0.278±0.012*	217.1

和对照组比 \* P<0.01

2.6 对大鼠中性白细胞释放 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的影响:测定系统同 2.5,实验分对照组(加溶媒)和给药组。结果(表 5)草血竭醇提物体外对中性白

胞释放  $O_2^-$  有明显增强作用, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  与酵母多糖 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的作用相当。

**表 5 草血竭醇提物对大鼠中性白细胞  $O_2^-$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )**

药物剂量 $\mu\text{g}/\text{mL}$	还原型 NBT $\text{OD}_{615}$	变化率 %
空白管	0.212 $\pm$ 0.020	—
100	0.620 $\pm$ 0.018*	192.45
50	0.532 $\pm$ 0.036*	150.94
25	0.447 $\pm$ 0.009*	110.85

和空白组比 \*  $P < 0.01$

### 3 讨论

$\text{Fe}^{2+}$ -Vit C,  $\text{H}_2\text{O}_2$  可通过 Fentons 反应产生  $\text{OH}^\cdot$  [7], 继而引发脂质过氧化产生 MDA, 正常组织代谢过程中也可产生脂质过氧化损伤, 引起衰老等很多病理变化。草血竭醇提物能明显抑制自发性或  $\text{Fe}^{2+}$ -Vit C 诱发的 MDA 生成, 并抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱发的红细胞溶血, ESR 检测能直接清除  $\text{OH}^\cdot$ , 说明草血竭醇提

物能清除  $\text{OH}^\cdot$ , 有抗脂质过氧化作用 [8], 白细胞受酵母多糖等刺激可引发呼吸暴发, 释放  $O_2^-$ , 参与杀菌及抗肿瘤等作用 [8], 草血竭醇提物能诱导并增强酵母多糖诱发的中性白细胞释放  $O_2^-$ , 这可能是其药理作用的基础。说明草血竭对活性氧自由基的影响是复杂的, 有关草血竭的其它药理作用, 正在进行深入研究。

### 参考文献

- 1 江苏新医学院编. 中药大辞典. 下册. 上海: 上海科技出版社, 1984. 1581
- 2 陈顺志, 等. 临床检验杂志, 1984, 2: 8
- 3 冯立明, 等. 中国药理学通报, 1990, 6: 26
- 4 陈雨亭, 等. 生物物理学报, 1989, 5: 235
- 5 杨庆利, 等. 兰州医学院学报, 1992, 8: 152
- 6 Banehner R, et al. New Engl J Med, 1968, 278: 971
- 7 路雪雅. 生物化学和生物物理进展, 1989, 16: 372
- 8 田昌孝. 蛋白質核酸化學(日), 1988, 33: 3024

(1996-06-03 收稿)

## 芝牌乙肝宁颗粒剂(冲剂)有奖征文揭晓

长沙九芝堂(集团)有限公司与湖南省中医药研究院共同研究开发的芝牌乙肝宁颗粒剂(冲剂)具有调气健脾, 利胆清热, 活血化痰的效果, 被卫生部确定为治疗慢性乙型肝炎的首选药, 并被引入《全国医院用基本中成药目录》。颗粒剂服用方便, 深受医生及患者的赞许。为了进一步更科学地检验乙肝宁的临床效果, 长沙九芝堂(集团)有限公司和《中草药》杂志联合举办了芝牌乙肝宁颗粒剂(冲剂)的有奖征文活动, 半年来共收到论文 40 余篇, 经过以天津市传染病医院张迈峯主任医师为首的专家评审组的严格评选, 以下 9 篇论文被评为优秀论文:

- 张小平. 乙肝宁颗粒剂治疗慢性乙型肝炎疗效观察;
- 李 嘉, 卢诚震. 不同剂量乙肝宁颗粒剂治疗慢性乙型肝炎 80 例疗效观察;
- 陈丽艳, 曹铁公, 等. 乙肝宁颗粒剂治疗慢性肝炎 54 例疗效观察;
- 王津生, 刘宏元, 等. 乙肝宁颗粒剂治疗慢性乙型肝炎的疗效观察;
- 徐立新. 乙肝宁冲剂治疗慢性乙型肝炎及 T 细胞亚群变化;
- 丁晶莉, 曹铁公, 等. 乙肝宁冲剂对慢性肝炎的治疗作用;
- 陈 评. 乙肝宁冲剂治疗慢性乙型肝炎的分析;
- 吴志敏, 吴 巧, 等. 乙肝宁颗粒(冲剂)治疗慢性乙型肝炎的疗效观察;
- 杨恭友. 乙肝宁颗粒剂治疗慢性肝炎 68 例疗效分析。

以上 9 篇论文与乙肝宁药效学、毒理学基础研究资料已汇编成册, 并将陆续在 1998 年内《中草药》杂志上刊出。

欢 迎 投 稿                      欢 迎 征 订