

四逆汤的抗氧化作用研究

张玉萍¹, 李 锦¹, 时 一兵²⁽²⁰⁾

(1. 天津中医学院 中药系, 天津 300193 2 天津市口腔医院, 天津 300041)

中图分类号: R286.75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)10-0922-02

从天然单味药中筛选出具有较好抗氧化性能的药物是国内外广泛重视的课题,但关于中药复方有效抗脂质过氧化及清除自由基方面的研究报道甚少,鉴于四逆汤之组方中三味药均对氧自由基有不同程度的清除作用,为进一步探讨其作用机制及各单味药间协调或拮抗作用,及探索开发新药,指导老药临床新用,我们采用碱性二甲基亚砷-鲁米诺化学发光法^[1,2]研究了四逆汤提取液及各单味药提取液清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)作用的体外实验。

1 材料与方法

1.1 试剂与药品: 附子、干姜、甘草购自天津药材公司,并经作者鉴定。鲁米诺(Luminol)为德国 Merck-Schuchrat 公司产品,二甲基亚砷(DMSO)、磷酸二氢钠、二乙三胺五乙酸(DTPA)、无水乙醇、丙酮均为国产分析纯试剂;乙酸豆蔻佛波醇(PMA)为 Sigma 公司产品,所用水均为双蒸水。DMSO 使用前需经活性炭处理, PMA 用丙酮溶解, -20°C 保存, 用前以磷酸缓冲液(PBS pH 7.4)稀释到所需浓度。

1.2 仪器: LKB-1210 液体闪烁计数器, 瑞典产。

1.3 人多形核白细胞(PMN)的分离提纯^[3]: 正常人新鲜抗凝血购于天津血研所。将全血与 6% 葡萄糖按 2:1 比例混匀后,静置 1 h,取上层富含白细胞的悬液离心($100\times g$, 12 min),得白细胞,经冰水低渗法除去残留的红细胞后($160\times g$, 离心 4 min),回收白细胞。用 Ficoll 淋巴细胞分离液经离心($250\times g$, 20 min)后得 PMN,将 PMN 重悬于 Hank 液中并调 PMN 到 $5\times 10^{10}/\text{L}$ 备用。经台酚蓝活力检查活细胞占 95% 以上。

1.4 四逆汤提取液对 PMN 释放的活性氧自由基的影响^[5]: 将已预温(37°C) 45 min 的 PMN ($3\times 10^8/\text{L}$),与 4 种提取液(对照品用含 1/60 DMSO 的 PBS 代替)混匀,加 PMA ($42\mu\text{g}/\text{L}$) 并立刻计时,用计数器测定 4, 8, 12, 16 和 20 min 时的化学发光峰值,强度用 cpm 表示。

1.5 四逆汤及 3 味药提取液对 $O_2^{\cdot-}$ 的影响

1.5.1 四逆汤及组方中 3 味中药供试液的制备: 四逆汤按中国药典 2000 年版取附子 10 g 干姜 6.67 g 甘草 10 g 细粉混合均匀,放入 250 mL 平底烧瓶中;另取附子、干姜、甘草细粉各 20 g,分别放入 3 个 250 mL 平底烧瓶中,各用 80% 乙醇溶液 150 mL 冷浸,回流提取,蒸馏浓缩,分别进行除菌抽滤,定容,得供试液母液,用时定量移取并稀释到所需浓度。

1.5.2 清除 $O_2^{\cdot-}$ 的测定: 将供试液 (0.05~0.5 mL) 定量加入测定专用瓶内,依次加入鲁米诺液 ($3\times 10^{-4}\text{ mol}/\text{L}$) 2 mL,供试液加入量 0.5 mL 和 PBS (pH 8.6) 液补足,在 55°C 水浴箱中混匀,临测定时,快速向测定管中加入 55°C 的碱性 DMSO 溶液 0.5 mL,快速混匀,10 s 时立刻计数,记录 1 min 内的单光子发光率,以脉冲值 cpm 表示,每种样品平行配制,测定 3 次,取其平均值。

2 结果

2.1 测量条件的优化选择及结果: 系统测定了氢氧化钠、鲁米诺、碱性二甲基亚砷的浓度及测量时间、温度及溶剂对发光强度的影响。从相应曲线上确定最佳测定条件是: 5 mmol/L NaOH 配制的 DMSO 溶液 0.5 mL, 0.3 mmol/L 鲁米诺, PBS 的 pH 8.6 为最佳。测定时机 的确立直接影响实验结果的准确性,从启动反应到 20 s 内信号衰减较慢,而在 30 s 后衰减速度逐渐加快,数分钟后 cpm 值接近本底。每次测定应在 10 s 时开始,数据采集 1 min,必须在 70 s 内完成测定,以保证结果准确,重现性好(图 1)。

采用 55°C 恒温水浴中处理样品, cpm 值可比文献值提高一个数量级,且重现性好。溶剂的选择只影响 DMSO 溶解度,对 cpm 值基本无影响。

2.2 系统稳定性实验: 以甘草供试液为测定对象,平行测定 5 次,其抑制率为 50% 时的浓度 (IC_{50})

(20) 收稿日期: 2001-04-07

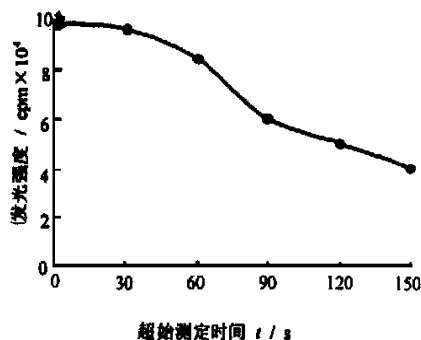


图 1 起始测定时间对发光强度的影响

81.6 mg/L, 复管重复测定 $RSD=7.5\%$, 表明该测定体系比较稳定

2.3 溶剂对发光抑制程度的影响: 本实验测定了甘草水提液及 80% 乙醇提取液在不同浓度下发光抑制程度曲线, 结果发现两反应曲线基本重合。证明该体系受溶剂影响不大

2.4 4 种供试液清除 O_2^- 效能测定: 以抑制发光强度为纵坐标, 中药浓度 (mg/L) 为横坐标做图, 可得到提取液的效能曲线, 找出每组内抑制率为 25%, 50%, 75%, 90% 时相应浓度值, 见表 1。结果显示, 4 种提取液均对 O_2^- 有较强的清除能力, 且浓度与发光抑制率均呈显著剂量依赖性关系, 在一定浓度范围基本呈线性关系。3 种单味药比较, 干姜清除作用最强 (同等浓度下), 甘草、附子作用相似, 且清除率均超过 90%。单味药组方四逆汤后, 3 种单味药清除作用保留, 共同发挥。在 75%~90% 抑制范围, 清除效力随浓度变化而平稳改变, 更象一种缓冲液, 使药效得以有效持续、平稳发挥, 体现出组方比单味药更优越的药理作用。且组方后附子有效成分乌头碱毒性大大降低。为评价其抗氧化效力, 以公认抗氧化剂 Vit E 为阳性对照, 在相同条件下测定它对 O_2^- 的清除作用, 可以看出, 干姜提取液清除 75% O_2^- 所需试剂量低于 Vit E, 显示干姜有较强的抗 O_2^- 活性, 甘草、附子次之。

表 1 四逆汤清除自由基效能比较 (mg/L)

发光抑制率 (%)	四逆汤	干姜	甘草	附子	Vit E
5	7.462	18.2	58.0	—	53.3
50	90.2	21.3	81.6	—	67.9
75	156	38.6	272	117	123
90	503	103	683	336	328

2.5 四逆汤提取液对 PMN 产生化学发光的作用: PM A 作用于 PMN 膜上的蛋白激酶 C 并使之激活引起呼吸爆发, 释放大量的 O_2^- , PMN 是人体内产生活性氧自由基的重要来源, 图 2 显示四逆汤浓度为 90 mg/L 时的化学发光值随时间变化情况, 从而证

明四逆汤对刺激呼吸爆发释放的 O_2^- 有明显清除作用, 且发光强度随时间增加而逐渐增强, 12~20 min 达到高峰, 而后渐渐降低, 但法定量性较差。

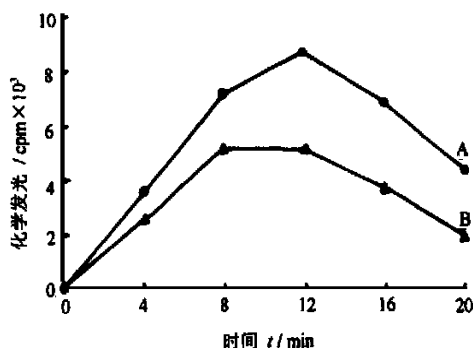


图 2 四逆汤对 PMA 刺激的多形核白细胞产生化学发光过程的影响

3 讨论

生物体在需氧代谢过程中的氧化还原反应伴有 O_2^- 、 H_2O_2 及 OH 等生成, O_2^- 和 OH 可以引发生物膜多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 损伤膜结构及其功能, 产生一系列毒性反应, 导致某些疾病的发生。体内存在酶及非酶类清除自由基的完整体系, 当自由基代谢失衡时, 则需要补充外援性抗氧化剂辅助或治疗。而现代药理研究证明, 四逆汤除具有回阳救逆之效外, 还有抗休克、强心、增加冠状动脉血流量等功效, 常通过加味或剂型改革而用于心血管等疾病的治疗。其三味药及配伍后均对 O_2^- 有较强的清除作用, 保护了血管内皮细胞及生物膜免受自由基损坏。本研究为其药理机制提供了新证据, 为扩大该药应用提供了依据。

本测定体系灵敏, 使分析单个细胞成为可能, 特异性强, 检测速度快, 在活细胞及溶液体系有一致的清除自由基作用, 而其在体内的作用机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 张玉萍, 何锡文. 利用化学发光法研究生脉饮的自由基清除作用 [J]. 天津中医, 2000, 17(5): 40-41.
- [2] 赵琢道, 黎 鳌, 杨宗城, 等. 一种测定 SOD 活力的新方法——碱性二甲基亚砷/鲁米诺化学发光法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1987, 23(6): 55-57.
- [3] Markert M, Andrews P C, Babior B M. Measurement of O_2^- production by human neutrophils. In: Packer L, ed. Oxygen Radicals in Biological System, Methods in Enzymology [M]. vol 105. 1st. Academic Press, 1984: 358-365.
- [4] 许申鸿, 杭 珊. 天竺花清除自由基作用的研究 [J]. 中国野生植物资源, 1999, 19(2): 4-6.
- [5] 句海松, 李小洁, 赵保路, 等. 沙棘总黄酮对活性氧自由基的清除作用 [J]. 中国药理学通报, 1990, 6(2): 97-100.