

Fluo-3 [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264 8179-8184.

- [5] Evans D L, Dive C. Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferating hepatoma cells and nonproliferating immature thymocytes [J]. *Cancer Res*, 1993, 53 2133.

- [6] Ji Y B, Zhang H B, Liu Z H. Influence of *Sargassum fusiforme* polysaccharide on RBC immunity function of tumor-burdened mice [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 1995, 54(2): 10-14.

白藜芦醇和抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂Ⅰ和Ⅵ所致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用

金顺姬¹, 段 链¹, 黄 梅¹, 杨静玉¹, 于 海¹, 赵余庆², 吴春福^{1*}

(1. 沈阳药科大学 药理教研室, 辽宁 沈阳 110016; 2. 辽宁中医学院新药研究中心, 辽宁 沈阳 110000)

摘要: 目的 研究白藜芦醇和抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂Ⅰ和Ⅵ致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用。方法 采用单细胞凝胶电泳方法研究白藜芦醇和抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂Ⅰ和Ⅵ致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用。结果 白藜芦醇 (50, 100, 200 mg/kg× 3 d) 和抗坏血酸 (50, 100, 200 mg/kg× 3 d) 对方剂Ⅰ和Ⅵ (临床等效量× 3 d) 所致的小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤呈剂量依赖性的保护作用 ($P < 0.05$)。结论 白藜芦醇和抗坏血酸能够保护预防非典型肺炎方剂Ⅰ和Ⅵ对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 的损伤。

关键词: 白藜芦醇; 抗坏血酸; 预防非典型肺炎方剂; DNA 损伤; 单细胞凝胶电泳

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)12-1114-04

Protective effect of resveratrol and ascorbic acid on lymphocyte DNA damage in mice induced by prescriptions I and VI of Chinese materia medica against SARS

JIN Shun-ji¹, DU AN Lian¹, HUANG Mei¹, YANG Jing-yu¹, YU Hai¹, ZHAO Yu-qing², WU Chun-fu¹

(1. Department of Pharmacology, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Research Center of New Drug, Liaoning College of TCM, Shenyang 110000, China)

Abstract **Object** To evaluate the protective effect of resveratrol and ascorbic acid on lymphocyte DNA damage in mice induced by prescriptions I and VI of Chinese materia medica against SARS. **Methods** Resveratrol, ascorbic acid and two prescriptions against SARS were orally administered to the mice for three days. The effect on DNA damage was measured in mice lymphocytes by means of single cell gel electrophoresis assay (SCGE, or Comet assay). **Results** Resveratrol (50, 100, 200 mg/kg× 3 d) or ascorbic acid (50, 100, 200 mg/kg× 3 d) could dose-dependently restore the DNA damage induced by prescription I and VI (equivalent clinical dose× 3 d). **Conclusion** Resveratrol and ascorbic acid could protect the lymphocyte DNA damage in mice induced by prescriptions I and VI of Chinese materia medica against SARS.

Key words resveratrol; ascorbic acid; prescriptions against SARS; DNA damage; single-cell gel electrophoresis

为预防非典型肺炎在社会上进一步流行,经国家卫生部非典型肺炎防治领导小组审定,国家中医药管理局向社会推荐了 6 个预防非典型肺炎的中药方剂。这些方剂在社会上得到了较广泛的应用。前期研究发现上述方剂中方剂Ⅰ、Ⅴ、Ⅵ对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 具有明显的损伤作用^[1],提示健康人服用某些中药来预防非典型肺炎应慎重

多种因素可以引起 DNA 的损伤,其中脱氧核糖核酸的氧化是造成 DNA 损伤的重要因素之一。白藜芦醇和抗坏血酸具有显著的抗氧化活性。有文献报道,白藜芦醇和抗坏血酸对氧化造成的 DNA 损伤具有一定的保护作用^[2,3]。为此,本实验应用国际公认的单细胞凝胶电泳技术 (single cell gel electrophoresis assay, SCGE),又称彗星试验 (Comet

* 收稿日期: 2003-07-17

作者简介: 金顺姬 (1975-),女,吉林省通化市人,药理学硕士,主要从事中药药理研究

* 通讯作者: Tel, Fax: (024) 23843567 E-mail: wuc@sphu.edu.cn

assay) 考察了白藜芦醇和抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂I 和VI所致的小鼠外周血液淋巴细胞DNA 损伤的保护作用, 以期为因服用预防非典型肺炎方剂所致不良反应提供有效的防治药物或手段

1 材料

1.1 方剂组成与煎煮方法: 方剂I : 生黄芪 10 g 败酱草 15 g 薏苡仁 15 g 桔梗 6 g 生甘草 3 g 方剂VI: 生黄芪 10 g 白术 6 g 防风 10 g 苍术 6 g 藿香 10 g, 沙参 10 g 金银花 10 g 贯众 6 g 上述中药饮片均购自沈阳市药材公司。药材的植物基源由沈阳药科大学药用植物教研室孙启石教授鉴定^[1]。按照卫生部防治非典型肺炎领导小组公布的方法将上述方剂用水煎煮、浓缩至 3 倍临床等效量, 临用前用生理盐水稀释至临床等效量。

1.2 主要试剂: 淋巴细胞分离液 (991103) 购于上海恒信化学试剂有限公司; 低熔点琼脂糖 (BI0153)、正常熔点琼脂糖 (051363)、溴化乙啶 (BS0606) 均购于华美生物工程公司。

1.3 仪器: DYY-6B 型稳压稳流电泳仪 (北京市六一仪器厂) DYC-38B 型水平电泳槽 (北京市六一仪器厂) VANOX 型 OLYMPUS 荧光显微镜 (Japan) LUCIA 彗星实验分析软件系统 (捷克)

1.4 动物: 昆明种小鼠, 雄性, 体重 18~22 g, 沈阳药科大学实验动物中心提供, 动物合格证号: 辽实合字 047 号。

2 方法

2.1 给药方案: 将小鼠分为生理盐水 (NS) 组和给药组, 每组 4 只。给药组每天 ig 预防非典型肺炎方剂I (6.5 g/kg) 或 VI (12.4 g/kg), 30 min 后 ig 白藜芦醇 (50, 100, 200 mg/kg) 或抗坏血酸 (50, 100, 200 mg/kg), 生理盐水组 ig 等量生理盐水, 连续 3 d。末次 ig 白藜芦醇或抗坏血酸后 30 min 取

血, 进行单细胞凝胶电泳实验。

2.2 单细胞凝胶电泳实验: 参照文献^[4]方法加以改进, 末次给予预防非典型肺炎方剂后 1 h 取血, 分离外周血液淋巴细胞, 制片, 裂解 2 h, 解旋 40 min, 电泳 30 min, 中和染色, 阅片。每个样本随机观察 40 个细胞, 使用 LUCIA 软件分析。

2.3 统计学处理: 以 NS 组的各测定指标为 100%, 计算给药组各指标的变化百分率。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两因素方差分析 (ANOVA) 判断总体差异显著性, 组间资料采用 Fisher's least-significant difference (FLSD) 分析统计学差异。

3 结果

3.1 白藜芦醇对预防非典型肺炎方剂I 和VI所致小鼠外周血液淋巴细胞DNA 损伤的保护作用: 见表 1 和表 2 结果表明, 单独给予白藜芦醇 (50, 100, 200 mg/kg) 对小鼠外周血液淋巴细胞DNA 没有明显影响。单独给予方剂I (6.5 g/kg) 或方剂VI (12.4 g/kg) 均可致小鼠外周血液淋巴细胞DNA 损伤。而白藜芦醇对预防非典型肺炎方剂I 和VI引起的外周血液淋巴细胞DNA 含量、尾长、尾矩、椭圆矩及尾面积的改变有显著改善作用, 并呈一定量效关系, 提示白藜芦醇对预防非典型肺炎方剂I 和VI致小鼠外周血液淋巴细胞DNA 损伤有明显的保护作用。

3.2 抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂I 和VI所致小鼠外周血液淋巴细胞DNA 损伤的保护作用: 见表 3 和表 4 结果表明, 单独给予抗坏血酸 (50 mg/kg) 对小鼠外周血液淋巴细胞DNA 没有明显影响, 而单独给予抗坏血酸 (100, 200 mg/kg) 能不同程度地降低小鼠外周血液淋巴细胞尾DNA 含量、尾长、尾矩、椭圆矩及尾面积, 提示抗坏血酸能够降低自发的细胞DNA 损伤。单独给予方剂I (6.5

表 1 白藜芦醇对预防非典型肺炎方剂I 所致小鼠外周血液淋巴细胞DNA 损伤的保护作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 1 Protective effect of resveratrol on lymphocyte DNA damage in mice

induced by prescription I against SARS ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	尾DNA含量/%	尾长/%	尾矩/%	椭圆矩/%	尾面积/%
NS	-	100.00±14.80	100.00±6.41	100.00±19.09	100.00±20.20	100.00±13.31
白藜芦醇	0.050	111.06±23.37	116.36±21.87	149.65±52.93	119.09±35.67	110.05±18.47
	0.100	119.49±6.71	98.95±6.94	130.31±3.18	120.87±4.85	109.22±4.50
	0.200	108.21±9.15	89.45±8.76	104.96±13.70	110.03±12.94	114.84±10.23
方剂I	6.5	809.64±86.02**	213.98±3.03***	682.98±172.67**	886.89±124.67**	574.51±55.87**
白藜芦醇+方剂I	0.050+6.5	312.85±46.85***	177.44±6.94**	571.28±86.83**	321.84±63.48**	247.62±50.90**
	0.100+6.5	256.10±25.15***	127.66±10.51***	338.30±27.86***	257.28±17.73***	240.20±25.75**
	0.200+6.5	151.61±30.87***	113.04±7.14***	176.06±34.04***	140.29±17.82***	137.69±23.92***

与生理盐水组比较: *** $P < 0.001$; 与方剂I 组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs NS group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs prescription group I

表 2 白藜芦醇对预防非典型肺炎方剂Ⅵ所致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用 ($\bar{x}\pm s, n= 4$)

Table 2 Protective effect of resveratrol on lymphocyte DNA damage in mice induced by prescription Ⅵ against SARS ($\bar{x}\pm s, n= 4$)

组 别	剂量 /($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	尾 DNA 含量 %	尾长 %	尾矩 %	椭圆矩 %	尾面积 %
NS	—	100.00± 10.90	100.00± 11.78	100.00± 12.88	100.00± 7.25	100.00± 4.30
白藜芦醇	0.050	81.3± 6.15	75.30± 20.23	64.70± 21.89	78.43± 13.30	71.70± 22.16
	0.100	65.30± 12.50	72.06± 2.06	46.57± 12.20	55.88± 11.81	47.40± 11.12
	0.200	60.16± 3.49	69.15± 5.42	43.14± 5.83	60.78± 6.79	68.00± 10.90
	12.4	484.19± 29.96 ^{**}	230.7± 11.28 ^{**}	1010.78± 92.49 ^{**}	553.92± 47.51 ^{**}	403.75± 44.88 ^{**}
白藜芦醇+ 方剂Ⅵ	0.050+ 12.4	361.8± 67.75 ^{##}	189.49± 9.50 ^{##}	644.12± 141.72 ^{##}	413.72± 87.38 ^{##}	319.59± 52.76 ^{##}
	0.100+ 12.4	194.66± 24.42 ^{##}	140.62± 13.35 ^{##}	264.22± 16.84 ^{##}	186.76± 16.49 ^{##}	165.7± 10.35 ^{##}
	0.200+ 12.4	85.0± 4.14 ^{###}	109.64± 12.24 ^{###}	90.20± 10.28 ^{###}	84.80± 5.27 ^{###}	83.63± 8.26 ^{###}

与生理盐水组比较: ^{***} $P < 0.001$; 与方剂Ⅵ组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$

^{***} $P < 0.001$ vs NS group; ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs prescription group Ⅵ

表 3 抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂Ⅰ所致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用 ($\bar{x}\pm s, n= 4$)

Table 3 Protective effect of ascorbic acid on lymphocyte DNA damage in mice induced by prescription Ⅰ against SARS ($\bar{x}\pm s, n= 4$)

组 别	剂量 /($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	尾 DNA 含量 %	尾长 %	尾矩 %	椭圆矩 %	尾面积 %
NS	—	100.00± 18.08	100.00± 17.32	100.00± 28.32	100.00± 20.22	100.00± 18.17
抗坏血酸	0.050	99.50± 14.08	97.96± 9.99	87.89± 14.52	96.48± 18.89	86.90± 10.86
	0.100	62.38± 11.11	67.13± 4.48	36.64± 6.46	58.98± 10.60	74.24± 12.95
	0.200	38.78± 12.24	49.29± 2.33	15.53± 4.10	30.86± 7.98	32.36± 3.74
	6.5	283.17± 46.50	176.55± 4.07 [*]	416.46± 68.24 [*]	303.52± 51.16	278.29± 41.22 [*]
抗坏血酸+ 方剂Ⅰ	0.050+ 6.5	133.50± 35.32	120.10± 11.38 [#]	147.52± 44.89 [#]	123.44± 31.23 [#]	131.86± 27.63 [#]
	0.100+ 6.5	39.44± 7.77 [#]	78.73± 8.86 ^{##}	31.05± 8.38 ^{##}	41.80± 8.66 ^{##}	52.58± 9.77 ^{##}
	0.200+ 6.5	26.90± 5.12 [#]	50.49± 2.95 ^{##}	11.49± 1.55 [#]	22.66± 3.75 [#]	26.88± 3.17 ^{##}

与生理盐水组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与方剂Ⅰ组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs NS group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs prescription group Ⅰ

表 4 抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂Ⅵ所致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用 ($\bar{x}\pm s, n= 4$)

Table 4 Protective effect of ascorbic acid on lymphocyte DNA damage in mice induced by prescription Ⅵ against SARS in mice ($\bar{x}\pm s, n= 4$)

组 别	剂量 /($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	尾 DNA 含量 %	尾长 %	尾矩 %	椭圆矩 %	尾面积 %
NS	—	100.00± 5.31	100.00± 4.11	100.00± 5.89	100.00± 4.53	100.00± 5.87
抗坏血酸	0.050	84.44± 21.24	86.10± 6.36	77.12± 22.93	77.90± 22.27	84.3± 19.14
	0.100	60.19± 13.91 [†]	75.09± 7.13 [‡]	50.67± 14.82 [‡]	58.87± 14.74 [‡]	70.1± 18.99
	0.200	84.83± 12.27	77.08± 7.77	71.62± 11.03	83.24± 13.87	94.8± 15.79
	12.4	231.30± 49.11 [†]	119.49± 9.98	291.23± 82.24 [†]	221.52± 52.31 [†]	233.37± 29.05 [*]
抗坏血酸+ 方剂Ⅵ	0.050+ 12.4	109.85± 23.79	108.79± 15.29	134.03± 35.46 [†]	110.67± 24.37	117.3± 22.00 [†]
	0.100+ 12.4	53.20± 6.81 [†]	77.22± 8.14 [‡]	43.39± 4.44 [‡]	54.10± 6.13 [‡]	61.53± 9.58 ^{##}
	0.200+ 12.4	69.56± 9.97 [†]	65.86± 6.54 [#]	49.03± 9.26 [†]	54.48± 6.93 [‡]	63.87± 12.92 ^{##}

与生理盐水组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与方剂Ⅵ组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs NS group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ prescription group Ⅵ

g/kg) 或方剂Ⅵ (12.4 g/kg) 均可致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤,而给予方剂后再给予抗坏血酸,小鼠外周血液淋巴细胞尾 DNA 含量、尾长、尾矩、椭圆矩及尾面积与单独给予方剂Ⅰ和Ⅵ组相比有显著性改善,并呈一定的量效关系,提示抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂Ⅰ和Ⅵ致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤有明显的保护作用。

4 讨论

前期研究结果表明,预防非典型肺炎方剂Ⅰ和

Ⅵ(临床等效量× 3 d)有明显的致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的作用,提示预防非典型肺炎方剂Ⅰ、Ⅵ可能具有遗传毒性^[1]。 本研究发现,在给予上述方剂的同时给予白藜芦醇或抗坏血酸 (50, 100, 200 mg/kg× 3 d) 能够明显地剂量依赖性地减轻由方剂Ⅰ和Ⅵ造成的小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤,说明抗氧化剂能够减轻预防非典型肺炎方剂Ⅰ和Ⅵ造成的遗传毒性。文献报道,白藜芦醇具有非常强大的自由基的捕获能力,其作用与经典

的抗氧化剂,如抗坏血酸或生育酚类似^[5,6]。这些抗氧化剂能够保护 DNA 免受氧化造成的损伤^[2,3]。因此,本实验结果提示,预防非典型肺炎方剂 I 和 VI 中的某些成分在体内可能引发或促进了氧化反应,从而造成了机体细胞 DNA 的损伤。

机体在某些疾病状态时存在着较明显的氧化应激现象,诸如抗氧化酶活性的降低,氧自由基的增多等。在治疗这些疾病的同时往往辅以抗氧化剂以增强机体的抵抗能力。其中抗坏血酸就是一种常用的抗氧化剂。本研究发现某些预防非典型肺炎方剂能够引起细胞 DNA 损伤,但尚无法确定这种毒性作用是否与其治疗作用直接相关,因而也无法确定抗氧化剂,如白藜芦醇和抗坏血酸,对抗这些方剂的毒性作用的同时是否也会降低方剂的疗效,还有待进一步深入研究。

总之,本研究结果表明白藜芦醇或抗坏血酸与预防非典型肺炎方剂 I 和 VI 合用能降低方剂对细胞 DNA 的损伤,为临床上提高服用预防非典型肺炎方剂的安全性提供了一种可选择的思路。

致谢: 沈阳药科大学 2003 届毕业生吴波峰、王大方参加部分工作。

References

- [1] Jin S J, Duan L, Huang M, *et al.* Effect of Chinese Materia medica prescriptions against SARS on lymphocyte DNA damage in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(8): 733-735.
- [2] Lopez-Burillo S, Tan D X, Mayo J C, *et al.* Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and alpha-lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions [J]. *J Pineal Res*, 2003, 34(4): 269-277.
- [3] Yen G C, Duh P D, Lin C W. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes [J]. *Free Radic Res*, 2003, 37(5): 509-514.
- [4] An W L, Li L, Piao J H, *et al.* Analysis of H₂O₂-induced peripheral lymphocyte DNA damage in rats by single-cell gel electrophoresis [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2000, 20(5): 296-299.
- [5] Bagchi D, Garg A, Krohn R L, *et al.* Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro* [J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1997, 95(2): 179-189.
- [6] Bagchi M, Balmoori J, Bagchi D, *et al.* Smokeless tobacco, oxidative stress, apoptosis, and antioxidants in human oral keratinocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(7-8): 992-1000.

夏天无胶囊剂及口服液与夏天无片剂镇痛作用比较

张慧灵, 顾振纶, 曹奕, 张煜*

(苏州大学医学院药理教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007)

摘要: 目的 观察夏天无胶囊剂及口服液的镇痛作用, 并与夏天无片剂进行比较。方法 采用小鼠热板法及扭体法, 观察夏天无胶囊剂、口服液及夏天无片剂的镇痛作用。结果 与对照组比较, 夏天无胶囊剂、口服液及夏天无片剂均能显著延长小鼠热板反应痛阈值 ($P < 0.05, 0.01$), 其作用于 ig 后 30~60 min 达高峰, 维持 120 min; ig 后 30 min 镇痛的 ED₅₀ 分别为 18.85 (13.98~20.94) mg/kg, 19.98 (11.45~25.58) mg/kg 及 54.61 (41.71~71.50) mg/kg。与对照组比较, 夏天无胶囊剂、口服液及夏天无片剂亦能明显抑制小鼠扭体反应 ($P < 0.01$), ig 后 30~40 min 镇痛的 ED₅₀ 分别为 13.99 (7.60~19.27) mg/kg, 15.53 (7.30~20.08) mg/kg 及 44.05 (25.32~76.65) mg/kg。结论 夏天无胶囊剂及口服液具有与夏天无片剂相似的镇痛作用, 且镇痛作用强于夏天无片剂。

关键词: 夏天无; 镇痛; 热板法; 扭体法

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)12-1117-03

Analgesic effects of Xiatianwu Capsule and Oral Liquid in comparison with its Tablet

ZHANG Hui-ling, GU Zhen-lun, CAO Yi, ZHANG Yu

(Institute of Chinese Materia Medica, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China)

Key words Xiatianwu; analgesia; hot plate method; writhing method

夏天无为罂粟科紫堇属植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的块茎, 是一种常

用民间草药, 具有通络、活血祛瘀、行气止痛的功效。夏天无中有效成分为生物碱, 目前夏天无已制成多

* 收稿日期: 2003-03-09

作者简介: 张慧灵 (1965-), 女, 内蒙古人, 硕士, 副教授, 苏州大学药理学专业在读博士, 主要从事药理学教学及精神神经药理学的工作, 发表论著 30 余篇。Tel (0512) 65190599