

四种中药方剂对全血化学发光和活性氧的抑制作用*

龙盛京 朱春玲¹ 杨燕斌¹ (南宁 530021 广西医科大学化学教研室;¹ 广西中医学院药理学系 96 届毕业生)

摘要 目的:从抗氧化角度,研究中药方剂抗衰老的作用。方法:运用化学发光分析方法,测定了 4 种中药方剂体外对全血化学发光的影响,并研究了其对活性氧的抑制作用。结果:4 种中药方剂在体外能明显抑制白细胞吞噬氧化作用所引发的化学发光强度,可清除超氧阴离子自由基、羟基自由基、过氧化氢,且呈量效关系。结论:这 4 种中药方剂对活性氧具有清除作用,这些方剂抗衰老作用的机理可能与其具有抗氧化作用有关。

关键词 中药方剂;全血化学发光;活性氧;抗氧化作用

Inhibitory effects of the four nomenclature of recipes on chemiluminescence in whole blood and active oxygen

Long Shengjing (Long SJ), Zhu Chunling (Zhu CL), Yang Yanbin (Yang YB) (*Department of Chemistry, Guangxi Medical University, 530021*)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the function of nomenclature of recipes on antiaging from the respect of antioxidation. **METHODS:** The effects of the four nomenclature of recipes on chemiluminescence in whole blood in vitro were measured by chemiluminescence, and their inhibitory function on active oxygen were studied. **RESULTS:** The nomenclature of recipes inhibited the intensity of chemiluminescence from the phagocytic action of leukocytes in vitro obviously. They also scavenged superoxide anion radicals, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide with dose-effect relationship. **CONCLUSION:** The four nomenclatures of recipes have scavenging functions on active oxygen. The function may be related to their antioxidation.

KEY WORDS nomenclature of recipes, chemiluminescence in whole blood, active oxygen, antioxidant

衰老 (Senility) 是医学研究的焦点问题之一,延缓衰老,延长寿命是人类共同愿望,也是医学研究的最终目的^[1]。现代医学关于衰老的论述很多,其中自由基学说认为,随着机体衰老,体内自由基代谢紊乱,过多的自由基会通过多种作用使机体加快衰老^[2]。为了防御自由基的损害,可以向生物体内添加适量的抗氧化剂,从而达到抗老延寿的目的^[3]。中药方剂在这方面具有经济易得,已有长期使用经验和毒副作用小等独特优势,其效果值得深入研究。故在中药方剂中寻找和筛选具有良好的抗氧化作用的中药抗衰老方剂,这对探索开发新保健药品,指导临床古方今用及了解中药方剂抗衰老的作用机理等都有益处。本文采用化学发光分析方法,体外观察了一贯煎、八珍汤、十全大补汤和小建中汤这 4 种中药方剂对全血化学发光的影响,并对其抗氧化作用进行了研究。结果报道如下。

1 材料与仪器

1.1 药材

组方中药购于南宁市医药公司。

1.2 中药处方(单位:g)

(1) 一贯煎 (One Penetrating Decoction) 北沙参 10 麦冬 10 当归 10 生地黄 30 枸杞子 12 川楝子 5。

(2) 八珍汤 (Eight Ingredient Decoction for Tonifying Energy and Blood) 当归(酒拌) 10 川芎 5 白芍 8 熟地(酒拌) 15 人参 3 白术(炒) 10 茯苓 8 甘草(炙) 5。

(3) 十全大补汤 (Great Tonifying Decoction of Ten Drugs) 人参 8 肉桂 8 川芎 5 地黄(烧、酒蒸焙) 15 茯苓(烧) 8 白芍 8 白术(焙) 10 甘草(炙) 5 黄芪(去

* 国家自然科学基金资助项目 No.39060028

芦)15 川当归(洗,去芦)10。

(4) 小建中汤(Decoction of Small Strengthening Middle-jiao) 甘草(炙)6 大枣12枚 白芍18 桂枝9 生姜9 胶饴30。

以上(1)(4)中药处方来源于文献^[4], (2)(3)中药处方来源于文献^[5]。

1.3 试剂

鲁米诺(德国 Merck-Schuchrat 公司);酵母多糖(Sigma 公司);酵母浸出汁为生化试剂;双氧水、连苯三酚、碳酸钠、碳酸氢钠等为国产分析纯试剂;所用水均为双蒸水。

1.4 仪器

DG3030 发光光度计(南京华东电子管厂)。

2 方法

2.1 试液的制备

按各方剂的处方剂量减半称量,各味中药置于烧杯中,再按各方总重量的5倍加入双蒸水,电炉上煮沸30min,棉花过滤,滤渣同上法再处理2次,每次加入3倍量的双蒸水,各煮沸20和10min,合并3次滤液。滤液70~80℃水浴中浓缩至0.5g/ml(每ml试液相当于0.5g中药剂量),冰箱放置待用,取上部液体作为供试液,临用前,再依情况稀释。

2.2 中药方剂水提液中固体物质含量的测定

准确量取供试液各2.00ml,置于经洗净、干燥至恒重的称量瓶中,于120℃电热恒温干燥箱中干燥3.5h,冷后称量,平行做2次,取平均值,以每毫升试液中含提取固体物克数(g/ml)表示。

2.3 测定方法

2.3.1 中药方剂对全血化学发光的影响的测定方法参考文献^[6]的方法改进。选用 Wistar 大鼠,后脚注射1%角叉菜胶(致炎剂)0.1ml,12h后,双脚水肿,眼球取血,肝素抗凝。抗凝血用 Hanks 液1:8稀释,4℃冰箱保存备用,用时取0.9ml稀血,加入不同剂量的供试液(空白不加)和50 μ l 鲁米诺后,37℃恒温水浴箱中保温10min,然后加入5mg/ml的酵母多糖100 μ l,计时,混匀,置于37℃恒温水浴箱中保温至10min后,置发光仪中,测定60s内发光强度的总值。样品平行测定3次,取平均值,按下式计算抑制率。

$$\text{发光抑制率}(\%) = \frac{\text{空白对照值} - \text{样品值}}{\text{空白对照值}} \times 100\%$$

2.3.2 样品清除 H₂O₂ 的测定方法参考文献^[7]的方法略加改进。在测定管中加入500 μ l pH=10.77 0.2mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液,100 μ l 10mmol/L H₂O₂,加入不同量的试液(空白不加),混匀,置发光仪中,于

37℃加入500 μ l 15mmol/L 鲁米诺(用上述缓冲液配)与6mmol/L 溴代十六烷基三甲胺(CTMAB)1:1的混合液,启动反应,测定10s内发光强度的平均值。每样品平行测定3次,取平均值,按下式计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{\text{空白对照值} - \text{样品值}}{\text{空白对照值}} \times 100\%$$

2.3.3 样品清除由碱性连苯三酚产生 O₂⁻ 的非酶体系测定方法按文献^[8]的方法。

2.3.4 样品清除羟自由基(:OH)测定方法参照文献^[9]的方法略加改进。1.8mmol/L 维生素C用50mmol/L pH=6.2 磷酸钠缓冲液配制,其余试剂都改用二蒸水配制。使用时试剂均放于37℃恒温水浴中。在测定管中加入1.8mmol/L 维生素C 0.2ml,1.8mmol/L CuSO₄ 0.4ml,500mg/ml 酵母浸出汁 0.2ml,0.2mol/L pH=6.2 磷酸钠缓冲液 0.6ml,加入不同量的试液(空白不加),混匀,置发光仪中,于37℃加入60mmol/L H₂O₂ 0.6ml。启动反应,测定10s内发光强度的总值,每样品平行测定3次,取平均值,按上式计算清除率。

3 结果

3.1 中药方剂对全血化学发光的影响

这4种中药方剂水提液都能抑制全血化学发光,并且具量效关系(见表1),但抑制能力大小不同,如果单从量效曲线回归方程所推出的原液 CI₅₀(当抑制率为50%时,所需提取液用量的体积量)或固体量 CI₅₀(当抑制率为50%时,所需水提液中固体量)来比较抑制能力的大小,由于缺乏比较的共同基础,往往有些情况不好比较,为了便于统一比较,现以生物体内公认的抗氧化剂维生素C做为比较标准,按下式计算中药方剂的抗氧化值—AOV。

$$\text{AOV} = \frac{\text{SL 测} - \text{SL 标}}{\text{SL 标}}$$

注:SL 测=原液 CI₅₀ × 固体 CI₅₀;SL 标=维生素C原液 CI₅₀ × 维生素C固体 CI₅₀。

规定维生素C的AOV为零。当AOV<0时,该中药方剂全血化学发光抑制能力大于维生素C,反之亦然。与维生素C相比,正值越大,抑制能力就越小。从AOV值可以看出,小建中汤抑制全血发光的能力相对最强,但这4种中药方剂在这个指标中的AOV值相差不大,均有较强的抑制全血发光能力。

3.2 中药方剂清除 H₂O₂ 的作用

这4种中药方剂水提液对 H₂O₂ 都具有一定的清除作用,并且具有量效关系(见表2)。但清除能力大小不同,从中药方剂对 H₂O₂ 的抗氧化值—AOV来比较其抗氧化能力可以看出,小建中汤相对较强,八珍汤、十全大补汤次之,一贯煎相对较弱。

表 1 中药方剂对全血化学发光的抑制作用

组 别	颜 色	供试液中固体 含量/g·ml ⁻¹	抑制率/ %			CI ₅₀		AOV
			1μl (0.5g/ml 中药方剂水提液)	3μl	5μl	原液/ μl	固体/ mg	
一贯煎	黑褐	0.1948	8.85	32.16	63.55	4.72	0.92	5.85
八珍汤	黑褐	0.1585	8.86	34.25	81.30	3.92	0.62	2.84
十全大补汤	黑褐	0.1740	5.10	32.01	89.40	3.79	0.66	2.95
小建中汤	棕黄	0.1319	20.11	51.97	78.74	2.60	0.34	0.40
阳性对照用量			1μl	5μl	10μl			
5%维生素 C		0.050	26.52	53.73	74.55	3.52	0.18	0.00

表 2 中药方剂对 H₂O₂ 的清除作用

组 别	清除率/ %			CI ₅₀		AOV
	1μl (0.5g/ml 中药方剂水提液)	3μl	5μl	原液 / μl	固体 / mg	
一贯煎	15.49	36.79	52.03	4.67	0.18	37.38
八珍汤	17.97	38.37	53.54	4.50	0.14	27.77
十全大补汤	12.41	39.48	53.84	4.39	0.15	29.07
小建中汤	14.31	38.67	65.30	3.83	0.10	16.49
0.5%维生素 C	38.99	57.20	77.00	2.19	0.01	0.00

表 3 中药方剂对非酶体系产生的 O₂^{·-} 清除作用

组 别	清除率/ %			CI ₅₀		AOV
	1μl (0.5g/ml 中药方剂水提液)	5μl	10μl	原液 / μl	固体 / mg	
一贯煎	13.07	44.81	74.99	6.17	1.20	119.98
八珍汤	34.56	66.21	85.47	2.11	0.33	10.38
十全大补汤	24.89	62.73	88.86	2.66	0.46	18.99
小建中汤	7.81	40.15	67.55	7.08	0.93	106.59
5%维生素 C	15.74	62.73	89.12	3.06	0.02	0.00

3.3 中药方剂清除由碱性连苯三酚产生的 O₂^{·-} 作用

这 4 种中药方剂水提取液对非酶体系产生的 O₂^{·-} 均具有不同程度的清除作用,并且具有量效关系(见表 3)。从抗氧化值 AOV 来看,八珍汤、十全大补汤在清除 O₂^{·-} 方面显示了明显优势。结果表明,八珍汤、十全大补汤有很强的清除 O₂^{·-} 作用,一贯煎、小建中汤的清除能力较弱。

表 4 中药方剂清除羟基自由基(·OH)的作用

组 别	清除率/ %				CI ₅₀		AOV	
	50μl	100μl	150μl (0.5g/ml 中药方剂水提取液)	300μl	500μl	原液/ μl		固体/ mg
一贯煎		37.69		59.62	70.98	183.33	35.71	84.31
八珍汤	28.60		56.98	69.40		121.94	19.33	29.72
十全大补汤	39.08		67.82		79.69	152.52	26.54	51.75
小建中汤	23.33		39.91	52.57		264.72	34.92	119.46
0.5%维生素 C		46.25		65.25	71.88	123.77	0.62	0.00

3.5 把各中药方剂的 AOV 值进行加合,结果见表 5。

表 5 中药方剂各 AOV 值的加合值

中药方剂	AOV				ΣAOV
	全血体系	H ₂ O ₂ 体系	非酶体系	·OH 体系	
一贯煎	5.85	37.38	119.98	84.31	247.52
八珍汤	2.84	27.77	10.38	29.72	70.71
十全大补汤	2.95	29.07	18.99	51.75	102.76
小建中汤	0.40	16.49	106.59	119.46	242.94

3.4 中药方剂清除羟自由基(·OH)的作用 在·OH 产生系统中加入不同量的中药方剂水提液,结果表明,中药方剂具有清除·OH 的作用,并具有量效关系(见表 4)。但不同的中药方剂对·OH 自由基的清除能力不同,八珍汤、十全大补汤相对较强,一贯煎次之,小建中汤相对较弱。这提示,中药方剂清除·OH 自由基作用可能与处方药物有关。

4.1 自从 Allen^[10]在 1972 年观察到吞噬细胞(PC)在呼吸爆发时出现发光现象以来,很多研究证实,这种发光现象是由于 PC 在吞噬时出现呼吸爆发,产生多种活性氧物质,包括 O₂^{·-}、H₂O₂、·OH 等,它们与细胞内某些可激发物质发生反应,产生化学发光。但这种发光十分微弱,若在细胞吞噬的反应体系中加入发光增强剂——鲁米诺,可使发光增强。随后 Kato^[11]建立的以全血为材料检测 PC 化学发光的方法中已证明了发光强度与细胞的吞噬氧化功能成正比。而 PC 在吞噬时产生的活性氧是一类内源性毒物,是引起许多疾病以及

4 讨 论

衰老过程的重要原因。人体进入老年期后机体抗氧化能力减退,清除自由基功能下降,生成过氧化脂质(LPO)增多,加速了衰老。体外试验表明,本文研究的4种中药方剂对全血化学发光有抑制作用。其原因可能是中药方剂清除部分由PC在吞噬过程中产生的活性氧,使鲁米诺被活性氧化程度减小,全血化学发光强度下降。

4.2 人们已认识到在正常生理状况下,活性氧的形成与消除处于动态平衡,但在一些病理过程中,活性氧的产生明显增多,可引起许多生物大分子的过氧化反应,导致细胞结构与功能的改变,造成疾病,同时,由于机体内自由基积累过多也会促进衰老^[12]。本文研究的4种中药方剂对 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 均有清除作用,尤以八珍汤、十全大补汤清除作用特别强。提示这些中药方剂对体内活性氧可能具有相应的清除作用,并可能具有保护细胞膜的正常功能和结构,达到抗细胞老化和防治与自由基相关的疾病。说明这4种中药方剂延年益寿的作用机理可能与具有抗氧化作用有关。

4.3 从表5的 ΣAOV 值,可以看出八珍汤、十全大补汤清除作用特别强。这可能与它们含有对活性氧清除作用较强的药物成分有关。八珍汤、十全大补汤的药物组成类同,十全大补汤仅比八珍汤多了黄芪、肉桂,而它们处方中的人参、川芎、黄芪等已是国内外公认的抗衰老药物,对防止机体损伤,防止机体衰老有一定作用^[13]。小建中汤不含人参之类的药物,但它抑制全血发光和清除 H_2O_2 的作用却是最强(见表5)。前者的原因可能是处方中的大枣、生姜直接对白细胞吞噬功能产生影响,致使白细胞吞噬能力下降,而使全血化学发光减弱;后者的原因可能是大枣、生姜含有很强的抗 H_2O_2 成分,这有待进一步研究。而一贯煎清除氧自由基能力相对最弱,提示它的抗氧化作用较小。

参考文献

- 1 李秀才. 中医中药抗衰老作用的研究进展. 现代诊断与治疗, 1996, 7(3): 132.
- 2 曹锡清. 脂质过氧化对细胞与机体的作用. 生物化学与生物物理进展, 1986, (2): 17.
- 3 许士凯. 抗衰老药物的药理与应用. 上海中医学院出版社, 1987: 77.
- 4 黄泰康, 施诚主编. 中药方剂现代研究大典. 北京科学出版社, 1996; 1: 115.
- 5 白刚, 肖洪彬主编. 中药方剂研究与应用大全. 北京: 中国科学技术出版社, 1995: 9; 35.
- 6 徐孝仪, 程松高. 人全血化学发光技术及其临床应用. 中国免疫学杂志, 1986, 2(1): 34.
- 7 龙盛京, 覃爱娟, 李毅. 化学发光分析法研究广西茶叶水提物抗活性氧的作用. 广西医学院学报, 1992, 9(3): 1.
- 8 龙盛京, 覃爱娟, 李毅. 食用豆匀浆液抗活性氧研究. 食品科学, 1994, (9): 50.
- 9 陈季武, 胡天喜. 测定OH产生与清除的化学发光体系. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(2): 136.
- 10 Allen PC, Loose LD. Phagocytic activation of Luminol dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophage. Biochembiophys Res Commun, 1978, 69: 245.
- 11 Kato T, Wokalek H, Schopf E. Measurement of chemiluminescence in freshly drawn human blood. I Role of granulocytes, platelets, and plasma factors in zymosan induced chemiluminescence. Klim Wochenschr, 1981, Mar 2, 59(5): 203.
- 12 丁长海, 陈敏珠, 魏伟, 等. 抗氧自由基药物研究进展. 中国药理学通报, 1992, 8(5): 321.
- 13 张福玲. 抗衰老中药化学成分的研究概况. 中医药信息, 1986, (5): 40.