

珍珠丸清除和抑制自由基的实验研究*

李宝山 巴根那 孙福祥 张昕原 乌日娜 王志民 赵忠孝

(内蒙古蒙医学院中心实验室 通辽 028041)

摘要 珍珠丸-2(Zhen-2)对 O_2^- 、 $\cdot OH$ 的抑制和清除作用大于Zhen-1。两者都对MDA生成有抑制作用和对氧合血红蛋白有保护作用。

关键词 珍珠丸 氧自由基 羟自由基 清除和抑制作用

Effect of Zhengzhu pill for Scavenging and Inhibiting Free Radicals

Li Baoshan, Bagenna, Sun Fuxiang, Zhang Xinhou, Wurina, Wang Zhimin, Zhao Zhongxiao

(The Center Laboratory of Inner Mongolia College of Traditional

Mongolian Medicine, Tongliao, 028041)

Abstract: Inhibiting and scavenging effect of Zhenzhu pill 2 on O_2^- and $\cdot OH$ were found to be more potent than those of Zhenzhu pill 1. Both of them were observed to inhibit the MDA production and protect oxidized hemoglobin action.

Key words: Zhenzhu pill, anion oxygen free radical, hydroxyl radical

珍珠丸又名如意至宝丸、额尔德尼乌日勒等。出自《秘诀增补篇》。全方有石膏、白蔻、草果仁、紫檀香、诃子、栀子、藏红花、沉香、白云香、白檀香、川楝子、海金沙、犀角(制)均15g;肉豆蔻、黑苣胜、肉桂、地锦草、苘麻子、木香、方海、白苣胜、萆拔、甘草、草决明、土木香、珍珠(制)、丁香均10g;牛黄、麝香2.5g,全方29味,重340g,制成水泛丸,朱砂包衣,

每10粒重2g,1日1~2次,一般治疗缺血性脑血管病7~15d为1疗程。

珍珠丸是蒙医名贵成药,主治白脉病(缺血性脑血管病)、黑脉病(心血管病)、中风、痛风,为脊髓受损、高血压病专用方^[1]。本研究以缺血性脑血管病为着眼点,进行了以下研究。

1 材料

1.1 Zhen-1和Zhen-2供试液的制备 珍珠丸1号(Zhen-1)和珍珠丸2号(Zhen-2)区

* 本课题受内蒙古卫生厅科研基金资助

别是用水牛角、人工牛黄代替了犀牛角和天然牛黄,并减少了麝香用量^[2]。将 Zhen-1 及 Zhen-2(内蒙古蒙药厂提供)剥去包衣层,加蒸馏水,浸泡,煮沸 2 次,离心,上清液浓缩至 Zhen-1 为 21.9mg/ml, Zhen-2 为 12.9mg/ml。固形物含量约 16%,冰箱保存待用。

1.2 1%红细胞(RBC)悬液制备 取正常人血肝素抗凝,离心除去血浆,用 PBS 洗 3 次,然后用 PBS 配成 1%悬液。

1.3 细胞色素 C (cytC)、硫代巴比妥(TBA)、四甲基丙烷(PET)为 Sigma 公司。抗坏血酸(VitC)、核黄素(VB₂)、蛋氨酸(Met)、四硝基唑蓝(NBT)、硫脲、硫酸铜(Copper)等均为国产分析纯。所用仪器为日立 557 型双波长双光道分光光度计、754 型分光光度计。

2 方法

2.1 Zhen-1 和 Zhen-2 对 H₂O₂ 引起溶血的抑制 取试管 6 支,每管加 1%RBC 0.8ml、PBS (pH=7.4) 1ml、Zhen-1 或 Zhen-2 加 1、2、3、4、5mg、0.05mol/L H₂O₂ 2ml,混合后 37℃ 保温 1h,4000rpm 离心 10min,上清液在 540nm 处读光密度(OD)、以不加 Zhen-1 或 Zhen-2 溶血度为 100%,计算溶血度。

2.2 Zhen-1 和 Zhen-2 对·OH 诱导血红蛋白氧化的抑制作用 0.15mol/L PBS 2.7ml,1mmol/L VitC 0.15ml,1mmol/L 硫酸铜 0.15ml,1%RBC 1ml,分别加 Zhen-1 或 Zhen-2 1、2、3、4、5mg,对照加硫脲 1mmol/L 的 10μl,37℃ 温育 5h,4000rpm 离心 10min,弃上清,沉淀红细胞加蒸馏水破溶,10000rpm 离心 30min,取上清液适当用蒸馏水稀释后在 500~700nm 处扫描。

2.3 VB₂-Met-NBT 体系产生氧自由基^[3]

利用 VB₂ 在光照后产生氧使 NBT 变色的原理。取 Met-NBT 溶液 3.8ml,加 VB₂ 溶液 0.1ml,不同体积的 Zhen-1 或 Zhen-2,混合在 40W 日光灯下,距离 35cm,光照 30min,立即在 754 型分光光度计上,于 560nm 处读

取 OD 值。同法制备未经光照的空白调零点,超氧化物歧化酶做为对照,用静态法测定清除率(S%),用动态法测定抑制率(I%),并计算 S% 达 50% 时药物浓度(SC₅₀),I% 达 50% 时药物浓度(IC₅₀)^[4]。

2.4 VitC-copper-CytC 体系产生羟自由基^[5] 利用 VitC 和 CuSO₄ 作用产生羟自由基,使 CytC 氧化的原理。总体积 1.5ml,其中 0.15mol/L PB 1.15ml, 1mmol/L VitC 0.15ml,1mmol/L CuSO₄ 0.15ml,不同体积的 Zhen-1 或 Zhen-2,对照加 0.5mmol/L 硫脲 10μl,25℃ 保温 25min,于 550nm 处读取 OD 值。由 VitC、PB、CytC 组成体系的 OD 值为 CytC 量(A₁),在上述体系中加入 CuSO₄ 的 OD 值为生成·OH 氧化后剩余 CytC 的量(A₂)。A₁-A₂ 为被·OH 氧化掉 CytC,可称为·OH 生成量(C₁)。上述体系中加入 Zhen-1 或 Zhen-2 后 OD 值为 A₃,A₁-A₃ 为经 Zhen-1 或 Zhen-2 处理后的·OH 生成量(C₂),C₁-C₂/C₁×100% 为清除率,有关 I%、SC₅₀、IC₅₀ 计算同 2.3 项。

2.5 脂质过氧化物(LPO)的生成^[6] 采用 Fenton 反应的原理,Fe²⁺/H₂O₂ 体系,产生的·OH 自由基,诱导血浆产生 LPO,用 TBA 显色,PET 作标准,加入 Zhen-1 或 Zhen-2 后观察 MDA 的生成量。

3 结果

3.1 Zhen-1 或 Zhen-2 对 H₂O₂ 引起溶血的抑制作用 实验中加 Zhen-1 或 Zhen-2,1~5mg,Zhen-1 的溶血度(%)为 68.0、43.0、21.0、13.0、8.0,Zhen-2 为 68.0、16.0、13.0、10.0、9.0,说明珍珠丸对 H₂O₂ 引起的溶血有抑制作用。且随着珍珠丸剂量增加,溶血度下降。

3.2 Zhen-1 和 Zhen-2 对氧合血红蛋白的保护作用 外源性 H₂O₂ 对血红蛋白氧化作用见图 1、2。当加入不同剂量的 Zhen-1 或 Zhen-2 时 540nm 和 577nm 处 OD 值随着珍珠丸加入量增加而升高(D~H),呈剂量依赖

性。

3.3 Zhen-1 和 Zhen-2 对氧自由基的清除和抑制作用 在 VB₂-Met-NBT 体系中, Zhen-1 和 Zhen-2 对 O₂⁻ 的清除和抑制作用非常显著。Zhen-2 的作用大于 Zhen-1(表 1)。

3.4 Zhen-1 和 Zhen-2 对羟自由基的清除和抑制作用 在 VitC-Copper-CytC 体系中, Zhen-1 和 Zhen-2 对羟自由基均有清除和抑制作用。从表 2 中看出 Zhen-2 作用大于 Zhen-1。

表 1 Zhen-1 和 Zhen-2 在 VB₂-Met-NBT 体系产生 O₂⁻ 的清除和抑制作用

Zhen-1			Zhen-2		
μg/ml	I%	S%	μg/ml	I%	S%
25.6	16.5	16.8	8.5	22.4	15.0
76.8	31.4	34.2	33.8	43.1	33.0
102.5	58.0	59.0	67.7	48.3	51.5
152.7	67.7	68.8	102.0	58.6	57.5
205.0	75.0	75.7	130.0	84.5	70.0
230.0	84.6	84.7			

Zhen-1 的 IC₅₀ = 115.7 μg/ml, SC₅₀ = 111.5 μg/ml;

Zhen-2 的 IC₅₀ = 66.0 μg/ml, SC₅₀ = 82.4 μg/ml

表 2 Zhen-1 和 Zhen-2 在 VitC-copper-CytC 产生 ·OH 的清除和抑制作用

Zhen-1			Zhen-2		
μg/ml	I%	S%	μg/ml	I%	S%
218	17.7	25.0	128	18.4	18.9
437	31.8	32.4	257	28.0	36.2
656	42.6	41.2	385		41.4
875	57.6	45.6	514	39.3	44.4
1094	72.3	50.0	643		51.2
1313	—	54.4	771	54.7	53.5
1532	—	58.8	900		58.6
1750	—	64.7	1028	72.8	67.2
1969	—	70.6	1574	—	74.1
2188	—	78.0			

Zhen-1 的 IC₅₀ = 747 μg/ml, SC₅₀ = 1121 μg/ml;

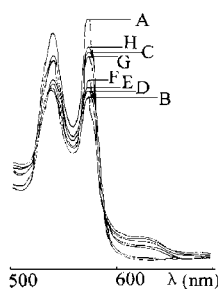
Zhen-2 的 IC₅₀ = 666 μg/ml, SC₅₀ = 652 μg/ml

3.5 Zhen-1 和 Zhen-2 对 LPO 生成的抑制作用 在反应体系中加入 Zhen-1 或 Zhen-2, 20、40、60、80、100 μl 时对 MDA 生成 I%, Zhen-1 是 6.0、10.0、15.0、25.0、36.0; Zhen-2 是 8.0、12.0、20.0、31.0、38.0, 说明珍珠丸

对脂质过氧化物生成有一定的抑制作用, 两者区别无显著性。

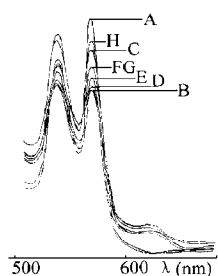
4 讨论

珍珠丸水提液在体外均可清除和抑制 H₂O₂、O₂⁻、·OH 自由基, 当 H₂O₂ 作用于红细胞膜时, 产生溶血; 而珍珠丸有清除自由基, 保护氧合血红蛋白不被氧化的作用(图 1、2)。



A: RBC 未加 ·OH 生成剂;
B: RBC + ·OH 生成剂; C:
RBC + ·OH 生成剂 + 硫脲;
D~H: RBC + ·OH 生成剂
+ Zhen-1 (1-5mg)

图 1 Zhen-1 对血红蛋白的影响



A: RBC 未加 ·OH 生成剂;
B: RBC + ·OH 生成剂; C:
RBC + ·OH 生成剂 + 硫脲;
D~H: RBC + ·OH 生成剂
+ Zhen-2 (1-5mg)

图 2 Zhen-2 对血红蛋白的影响

在 VB₂-Met-NBT 体系中, 珍珠丸对 O₂⁻ 的生成有明显的抑制和清除作用。在 VitC-Copper-CytC 体系中珍珠丸可有效的抑制和清除 ·OH 自由基。

从上述结果看, Zhen-2 对 O₂⁻、·OH 的抑制和清除作用大于 Zhen-1。Zhen-2 不但降低了成本, 清除自由基能力也强。LPO 是自由基损伤组织的指标, Zhen-1 和 Zhen-2 均可抑制 LPO 的终产物 MDA 的生成。

珍珠丸是蒙医治疗缺血性心脑血管病的首选药, 疗效显著, 结合作者的工作, 珍珠丸很可能是通过抑制和清除自由基, 从而抑制 Oxe-LOL 生成, 达到治疗效果。其机制有待进一步研究。

参考文献

1 中国医学百科全书·蒙医学·上海: 上海科技出版社, 1992. 277

- 2 内蒙古卫生厅编. 内蒙古蒙成药标准. 内蒙古科技出版社, 1984. 349
- 3 陈奇. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 953
- 4 鲁纯素. 异喹啉生物碱类化合物对羟自由基的清除作用. 北京医科大学学报, 1988, 20(6): 45
- 5 王莲成, 刘莉. 比色法测定抗坏血酸体系产生的 $\cdot\text{OH}$ 自由基. 生物化学与生物物理学进展, 1989, 16(6): 473
- 6 Ahmad Agil, Cindy J. Fuller and Ishwarlal Jialal. Susceptibility of plasma to Ferrrous Iron/Hydrogen peroxide-Mediated oxidation: Demonstration of a possible Fenton Reaction. CLINCHEM, 1995, 41(2): 220

(收稿: 1997-01-13)