

黄连和小檗碱对大鼠红细胞氧化性溶血 及其抗氧化系统的影响

刘春芳, 乔利, 王艳伟, 林娜*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:观察黄连和小檗碱对大鼠红细胞氧化性溶血及其抗氧化系统的影响。方法:采用乙酰苯肼(APH)诱导大鼠红细胞氧化性溶血模型,以伯氨喹啉为对照药,观察不同浓度的黄连和小檗碱对血浆游离血红蛋白、血清间接胆红素、全血网织红细胞以及红细胞内抗氧化系统相关酶和蛋白的影响。结果:150 mg·kg⁻¹APH能引起正常大鼠血浆游离血红蛋白和血清间接胆红素含量及外周血网织红细胞数量显著升高,红细胞6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量明显降低;15 mg·kg⁻¹伯氨喹啉能明显加重APH所引起的红细胞氧化性溶血;67~600 mg·kg⁻¹黄连和10.8~97.5 mg·kg⁻¹小檗碱对APH所引起的红细胞氧化性溶血没有明显影响,但600 mg·kg⁻¹黄连和97.5 mg·kg⁻¹小檗碱均能显著增强溶血大鼠红细胞G6PD活力并提高GSH含量,前者尚能增强GSH-Px活力。结论:黄连和小檗碱对APH诱导的大鼠红细胞氧化性溶血没有明显影响。稍高剂量的黄连和小檗碱能通过阻碍APH对G6PD的干扰、维护GSH-Px正常活力和增加GSH含量而发挥一定的红细胞抗氧化保护作用。

[关键词] 黄连;小檗碱;大鼠;红细胞氧化性溶血

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0156-04

新加坡学者认为黄连等含小檗碱的药物与氧化型药物伯氨喹啉的作用相似,可以引起新生儿氧化性溶血甚至核黄疸^[1],这与我国传统对黄连的认识不一致。为了给黄连的临床合理应用提供科学依据,该文以乙酰苯肼(APH)为造模剂、伯氨喹啉为对照物,观察黄连和小檗碱对大鼠红细胞氧化性溶血及其抗氧化系统的影响。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,90只,雄性,体重200~230 g,由中国科学院遗传与发育生物学研究所动物中心提供,合格证号SEXK(京)2002 0006。

1.2 药品与试剂 黄连(*Coptis chinensis* Franch),产于四川开县,制成黄连水煎液;盐酸小檗碱,含量98%;APH(批号971015)北京化学试剂公司;伯氨喹啉(批号05607BD),ALDRICH公司;灿烂甲酚蓝(批号F20040709),北京化学试剂公司;高纯氮,北京东方医用气体有限公司,纯度99.999%;四唑氮蓝(NBT),上海前进化学试剂厂;葡糖六磷酸钠(批

号1126405),Fluka公司,纯度≥98.0%;氧化型辅酶Ⅱ(批号004669),Roche公司;直接胆红素试剂盒(批号060713)和总胆红素试剂盒(批号060721),北京北化康泰临床试剂有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 KQ-100DE型医用数控超声波清洗器,江苏省昆山市超声仪器有限公司;LAC-214型1/万电子天平,常熟市衡器厂;SORVALL Super T21型低温高速离心机,美国科峻仪器公司;Humanlyzer2000半自动生化分析仪,德国Chem-Labs公司;Olympus PM-6型光学显微镜。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药^[2-3] 大鼠按体重随机分9组,每组10只,即:正常组、模型组、阳性对照药伯氨喹啉组(15 mg·kg⁻¹)、黄连高、中、低剂量组(600,200,67 mg·kg⁻¹)、小檗碱高、中、低剂量组(97.5,32.5,10.8 mg·kg⁻¹)。除正常组外,其余各组大鼠ip APH 150 mg·kg⁻¹,诱导红细胞氧化性溶血模型。各给药组自造模后立即ig给药,1次/d,连续3 d,正常组和模型组ig等容积的生理盐水。

2.2 对大鼠血浆游离血红蛋白和血清间接胆红素

[收稿日期] 2009-12-04

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30371785)

[通讯作者] *林娜, Tel: (010) 64014411-2869, Fax: (010) 64011692, E-mail: linna888@163.com

含量以及外周血网织红细胞数的影响 经 2.1 处理过的大鼠眼球后静脉丛抗凝或不抗凝取血,全血测定网织红细胞计数^[4],血浆测定游离血红蛋白含量^[5],血清测定间接胆红素含量^[6-8]。

2.3 对大鼠红细胞抗氧化系统相关酶和蛋白的影响 动物处理同 2.1。取红细胞依试剂盒的方法进行检测,分别采用 5,5-二硫代硝基苯甲酸法检测 GSH-Px 活性、钼酸铵比色法检测 CAT 和黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活性,根据文献^[9-10]采用 NBT 定量法检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)活性,依试剂盒采用比色法测定 GSH 含量。

2.4 统计学方法 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS13.0 软件中单因素方差分析进行多组间比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

3 结果

3.1 黄连和小檗碱对大鼠红细胞溶血的影响 如表 1 所示,150 mg·kg⁻¹ APH 能引起正常大鼠血浆游离血红蛋白和血清间接胆红素含量以及外周血网织红细胞数明显升高;15 mg·kg⁻¹ 伯氨喹啉能明显加重 APH 所引起的上述红细胞溶血指标;67 ~ 600 mg·kg⁻¹ 黄连和 10.8 ~ 97.5 mg·kg⁻¹ 小檗碱对 APH 引起的大鼠红细胞溶血均没有明显影响。

表 1 黄连和小檗碱对大鼠血浆游离血红蛋白和血清间接胆红素含量以及外周血网织红细胞数量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	游离血红蛋白 /mg·L ⁻¹	网织红细胞数 /%	间接胆红素 /mg·L ⁻¹
正常	—	205.65 ± 18.50 ²⁾	1.88 ± 0.26 ¹⁾	3.4 ± 1.0 ¹⁾
APH	—	324.61 ± 28.82	3.46 ± 1.05	5.6 ± 1.5
APH + 伯氨喹啉	15	428.83 ± 46.29 ²⁾	5.57 ± 1.36 ¹⁾	8.7 ± 1.6 ¹⁾
APH + 黄连	600	307.94 ± 14.72	3.20 ± 1.07	4.7 ± 1.7
	200	320.14 ± 36.29	3.32 ± 1.14	5.2 ± 1.7
	67	332.48 ± 27.73	3.47 ± 1.27	5.4 ± 1.4
APH + 小檗碱	97.5	306.92 ± 17.34	3.46 ± 1.10	5.0 ± 1.9
	32.5	318.72 ± 33.54	3.57 ± 1.15	4.7 ± 1.5
	10.8	328.53 ± 21.36	3.50 ± 1.26	5.0 ± 1.6

注:除正常组外其余各组 ip APH 150 mg·kg⁻¹。与 APH 组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$ (下同)。

3.2 对大鼠红细胞 G6PD 活力的影响 如表 2 所示,150 mg·kg⁻¹ APH 能引起正常大鼠红细胞 G6PD 活力显著降低;15 mg·kg⁻¹ 伯氨喹啉有加重 APH 引起的大鼠红细胞 G6PD 活力降低的趋势。相反,67 ~ 600 mg·kg⁻¹ 黄连和 10.8 ~ 97.5 mg·kg⁻¹ 小檗碱均有不同程度改善 APH 致大鼠红细胞 G6PD 活力降低的作用,其中,600 mg·kg⁻¹ 黄连和 97.5 mg·kg⁻¹ 小檗碱具统计学意义。

3.3 对大鼠红细胞 GSH 含量、GSH-Px、CAT 和 SOD 活力的影响 如表 3 显示,150 mg·kg⁻¹ APH 能明显降低正常大鼠红细胞 GSH 含量、GSH-Px、CAT 和 SOD 活力;15 mg·kg⁻¹ 伯氨喹啉能加重 APH 引起的大鼠红细胞 GSH-Px、CAT 和 SOD 活力降低,且具统计学意义;200 ~ 600 mg·kg⁻¹ 的黄连和 32.5 ~ 97.5 mg·kg⁻¹ 的小檗碱则显著升高 APH 引起的大鼠红细胞 GSH 含量降低,前者尚能明显增强 GSH-Px 活力,

各剂量的黄连和小檗碱对 CAT 和 SOD 的活力均没有明显影响。

表 2 黄连和小檗碱对大鼠红细胞 G6PD 活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	G6PD 活力 /NBT 单位
正常	—	11.63 ± 1.27 ²⁾
APH	—	4.80 ± 0.59
APH + 伯氨喹啉	15	4.32 ± 0.78
APH + 黄连	600	6.20 ± 0.93 ¹⁾
	200	6.10 ± 0.95
	67	6.01 ± 0.46
APH + 小檗碱	97.5	6.12 ± 0.32 ¹⁾
	32.5	5.79 ± 0.75
	10.8	5.59 ± 0.80

表 3 黄连和小檗碱对大鼠红细胞 GSH 含量、GSH-Px、CAT 和 SOD 活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	GSH 含量 /μmol·g ⁻¹	GSH-Px 活力 /GPx 活力单位	CAT 活力 /U·mg ⁻¹	SOD 活力 /U·g ⁻¹
正常	—	27.11 ± 2.21	538.86 ± 19.91 ³⁾	0.510 8 ± 0.102 8 ²⁾	30 673.73 ± 4 366.87 ²⁾
APH	—	24.58 ± 1.12 ²⁾	444.33 ± 26.15	0.205 4 ± 0.011 3	22 506.11 ± 2 897.91
APH + 伯氨喹啉	15	22.94 ± 1.07	383.86 ± 35.28 ¹⁾	0.110 4 ± 0.031 8 ²⁾	18 797.29 ± 3 548.77 ²⁾
APH + 黄连	600	27.06 ± 1.05 ²⁾	509.16 ± 14.43 ³⁾	0.222 4 ± 0.016 6	23 696.98 ± 2 203.98
	200	26.56 ± 0.66 ²⁾	500.53 ± 29.87 ¹⁾	0.208 7 ± 0.037 8	23 375.16 ± 2 360.97
	67	24.20 ± 1.66	469.79 ± 26.15	0.206 9 ± 0.021 5	23 164.54 ± 2 328.72
APH + 小檗碱	97.5	27.07 ± 0.82 ²⁾	475.65 ± 46.37	0.225 9 ± 0.016 0	23 866.98 ± 1 840.81
	32.5	26.96 ± 0.88 ²⁾	429.38 ± 34.46	0.208 5 ± 0.012 0	23 720.26 ± 2 249.78
	10.8	24.31 ± 1.63	396.42 ± 29.79 ²⁾	0.201 9 ± 0.011 6	23 770.54 ± 1 792.78

4 讨论

黄连是一味常用中药,《神农本草经》列为上品,其性味苦寒,具有清热燥湿、泻火解毒的功效。1978 年,新加坡卫生部宣布禁用黄连及含小檗碱的药物,认为黄连和小檗碱与伯氨喹啉一样能导致急性红细胞溶血,引起了国际争论^[1]。国内外学者曾就这个问题进行了相关的临床和实验研究,但至今仍未达成共识^[3,11-15]。

已知红细胞的生存和功能依赖抗氧化保护系统的完整性。一旦遭受氧化损伤,红细胞就破裂、破坏,血浆游离血红蛋白、血清间接胆红素和外周血网织红细胞的计数明显增加,呈现溶血现象^[16]。红细胞抗氧化保护系统由 G6PD, GSH, GSH-Px 和 CAT 等组成。正常情况下, G6PD 参与红细胞磷酸戊糖代谢途径,活化 GSH,同时为 GSH-Px 清除体内的 H₂O₂ 提供必要条件^[17-20]。此外, CAT 也能催化 H₂O₂ 分解, SOD 则能把 O²⁻ 自由基歧化成 H₂O₂ 和氧气,降低细胞毒性,抑制脂质过氧化,保护细胞膜。

APH 是一种强氧化剂,除了可在体内产生苯二嗪自由基、引起膜脂质过氧化反应外,还能在红细胞膜代谢过程中破坏抗氧化保护系统,从而诱导红细胞氧化性溶血^[17,21]。本实验条件下, 150 mg·kg⁻¹ 的 APH 能引起正常大鼠血浆游离血红蛋白、血清间接胆红素含量和外周血网织红细胞数量显著升高,并且使红细胞 G6PD, GSH-Px, CAT, SOD 活力和 GSH 含量明显下降,与前述研究报道相符。

伯氨喹啉分子结构中包含有异喹啉结构,小檗碱分子结构中也包含着类似结构,这可能是新加坡学者推断黄连或小檗碱会引起红细胞溶血的主要根据^[22]。本研究结果显示, 15 mg·kg⁻¹ 的伯氨喹啉能

明显加重 APH 所引起的红细胞氧化性溶血及抗氧化系统的破坏,但 67 ~ 600 mg·kg⁻¹ 的黄连和 10.8 ~ 97.5 mg·kg⁻¹ 的小檗碱却对 APH 所引起的红细胞氧化性溶血没有明显影响,而且, 600 mg·kg⁻¹ 黄连和 97.5 mg·kg⁻¹ 小檗碱还能显著增强溶血大鼠红细胞 G6PD 活力并提高 GSH 含量和 GSH-Px 活力。说明黄连和小檗碱对抗氧化系统的影响作用跟氧化剂伯氨喹啉明显不同:黄连和小檗碱可能通过阻碍 APH 对 G6PD 的干扰,维护 GSH-Px 的正常活力和 GSH 的含量,缓解膜脂蛋白的氧化和血红蛋白的变性进程,从而发挥一定的红细胞抗氧化保护作用,而伯氨喹啉则严重破坏红细胞抗氧化保护系统。先前文献报道过不同炮制品黄连具有清除自由基和抗氧化作用^[23], 120 ~ 360 mg·kg⁻¹ 的黄连总生物碱和 100 mg·kg⁻¹ 的小檗碱(等效于 120 mg·kg⁻¹ 黄连总生物碱)对乙醇致胃黏膜损伤大鼠也有一定的抗氧化作用^[24]。2005 年版《中国药典》记载黄连临床成人常用量为每天 2 ~ 5 g,盐酸小檗碱片说明书显示临床常用量为成人每天 0.3 ~ 0.9 g。本研究所采用的黄连高剂量(600 mg·kg⁻¹)和小檗碱高剂量(97.5 mg·kg⁻¹)分别等效于成人每天临床用量的 5.8 g 和 0.936 g,提示正常或略高于临床常用剂量的黄连和小檗碱使用是安全的,不会引起红细胞氧化性溶血。

综上,作者认为:正常情况下黄连和小檗碱对 APH 诱导的大鼠红细胞氧化性溶血没有明显影响,稍大剂量时可能通过阻碍 APH 对 G6PD 的干扰、维护 GSH-Px 正常活力和提高 GSH 的含量而发挥一定的红细胞抗氧化保护作用。相关机制尚待进一步研究阐明。

[参考文献]

- [1] Wong Hock Boon. Singapore Kernicterus. Singapore Medical Journal, 1980, 21(3): 556.
- [2] 杨守业, 林娜, 冯卫红, 等. 黄连和小檗碱对小鼠红细胞 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PD) 活性的影响 [J]. 中国学术期刊文摘 (科技快报), 1998, 4(8): 364.
- [3] 林娜, 高晓山. 黄连和小檗碱对实验性 G6PD 缺陷大鼠红细胞渗透脆性的影响 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(9): 562.
- [4] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1249.
- [5] 程梅, 王毓三. 血浆血红蛋白的分光光度法直接测定 [J]. 临床检验杂志, 1997, 15(5): 286.
- [6] Doumas B T, Poon P K C, Perry B W, *et al.* Candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: Development and Validation [J]. Clin Chem, 1985, 31: 1799.
- [7] W B Saunders, Tietz N W (ed). Textbook of Clinical Chemistry [M]. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986, 1386.
- [8] 张建新, 石南宁, 张印斗. 分光光度法测定血清间接胆红素 [J]. 南京铁道医学院学报, 1994, 13(3): 184.
- [9] 李家增, 王鸿利, 韩忠朝. 血液实验学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 183.
- [10] 杜传书. 红细胞 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性的四氮唑兰定量测定法 [J]. 中华医学院学报, 1980, 1(3): 277.
- [11] 廖昌立, 乐俊仁, 刘森, 等. 茵陈蒿汤与单味黄连对中国新生儿生理性黄疸 (胎黄、胎疸) 之初步观察 [J]. 私立中国医药学院研究年报 (台湾), 1982, (13): 1.
- [12] Yeung C Y. Influence of some Chinese traditional practices on child health [J]. Acta Pead Sin, 1988, 29 (Suppl B): 33B.
- [13] Fok T F. Neonatal jaundice-traditional Chinese medicine approach [J]. J Perinatol, 2001, 21 Suppl 1: S98.
- [14] 杨守业, 冯卫红, 王旭华, 等. 黄连和小檗碱诱发新生儿黄疸的实验研究总结报告 [J]. 中国学术期刊文摘 (科技快报), 1996, 2(12): 12.
- [15] 高晓山, 陈馥馨, 杨守业, 等. 黄连致溶血性黄疸毒性及其防治研究综合报告 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(1): 70, 74.
- [16] 钱林生. 急性溶血的诊断及鉴别 [J]. 中国实用内科杂志, 1996, 16(9): 515.
- [17] 方允中, 陈能乾. 医学酶学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 223, 348.
- [18] 赵克然, 杨毅军, 曹道俊. 氧自由基与临床 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 235.
- [19] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 559.
- [20] 张之南, 李蓉生. 红细胞疾病基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 39, 178.
- [21] 方允中, 李文杰. 自由基与酶基础理论及其在生物学和医学中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1989: 133, 208.
- [22] 高晓山. 黄连有毒问题的来龙去脉及引起的思考 [G]. 北京中医药学会·中医药面临新挑战及其对策研讨会资料. 1994.
- [23] 杨澄, 仇熙, 孔令东. 黄连炮制品清除氧自由基和抗脂质过氧化作用 [J]. 南京大学学报, 2001, 37(5): 659.
- [24] 李备, 刘华蓉, 潘永全, 等. 黄连总生物碱对乙醇致大鼠胃黏膜损伤的保护作用及其机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 51.

[责任编辑 何伟]