

化瘀汤清除自由基的临床及实验研究

北京友谊医院儿科(北京 100050) 宗平平 阎田玉 龚明敏

北京中医学院中心实验室 张家俊

内容提要 应用化瘀汤治疗小儿肺炎 49 例, 于肺炎极期、恢复期分别测定红细胞超氧化物歧化酶活性, 并与同龄健康儿对比, 肺炎极期小儿超氧化物歧化酶活性降低, 且与恢复期及健康儿有显著差异。通过化瘀汤对臭氧诱导自由基反应模型小鼠实验及体外抗氧化实验, 显示活血化痰中药有清除自由基的作用。

关键词 化瘀汤 消除自由基 小儿肺炎 超氧化物歧化酶

1991 年 10 月~1992 年 1 月我们观察了化瘀汤治疗小儿肺炎前后红细胞超氧化物歧化酶(ESOD)活性的变化, 并对组成化瘀汤的单味药做了清除自由基和抑制自由基反应的实验研究, 以进一步了解活血化瘀中药治疗小儿肺炎的综合作用机理。

临床观察

一、一般资料 观察组: 49 例, 男 23 例, 女 26 例; 年龄 1~3 岁; 入院时病程 1~7 天, 平均为 2.8 ± 1.6 天。对照组: 健康儿童 30 例; 男 13 例, 女 17 例; 年龄 1~3 岁。

二、临床表现 患儿全部表现咳嗽、发热(体温 $37.6 \sim 41.0^{\circ}\text{C}$), 其中体温高于 39°C 34 例(69.4%), $38 \sim 39^{\circ}\text{C}$ 10 例(20.4%); 伴有喘憋者 35 例(71.4%); 肺内均可闻及中小水泡音, 其中中度以上者 32 例(65.3%)。49 例中并发心功能不全 11 例(22.4%), 肝功能异常 4 例(8.2%), 败血症 2 例(4.1%)。伴有佝偻病 18 例(36.7%), 贫血 3 例(6.1%), 先天性心脏病 1 例(2.0%)。

三、实验室检查 本组患儿末梢血白细胞计数 $3.5 \sim 14.4 \times 10^9/\text{L}$, $< 4 \times 10^9/\text{L}$ 者 3 例(6.1%), $> 10 \times 10^9/\text{L}$ 者 9 例(18.4%); 病程极期作血气分析 37 例, 其中血氧分压降低 34 例(91.9%), 伴有酸碱平衡紊乱者 10 例(27.0%); 胸部 X 线摄片表现大片阴影 4 例

(8.2%), 小片、点状阴影 29 例(59.2%), 肺纹理粗重 13 例(26.5%), 未见异常 3 例(6.1%); 49 例中有 26 例患儿做病毒病原学检查, 其中呼吸道合胞病毒感染 6 例(23.0%, IPA 法)。

四、治疗方法 患儿均服用化瘀汤(由当归、白芍、川芎、鸡血藤、水蛭、虻虫、丹皮、黄芪等药物组成), 每剂煎 30 ml(由本院儿科中药房提供), 每次 10 ml, 每日 3 次, 7~10 天为 1 疗程。根据病情给予吸氧、强心、补液、退热等对症治疗及必要的支持疗法, 合并败血症者加用抗生素。

五、结果

1. 疗效判定 临床痊愈: 症状体征消失, 胸部 X 线摄片炎症吸收或好转; 好转: 症状体征好转, 胸部 X 线摄片炎症好转或无变化。

2. 疗效分析 患儿退热时间为 6.9 ± 5.7 天; 肺内罗音消失时间 10.4 ± 4.5 天; 喘憋缓解时间 3.7 ± 1.4 天; 恢复期复查胸片 30 例, 吸收好转者 22 例(73.3%)。综合患儿情况判断临床痊愈 46 例(93.9%), 好转 3 例(6.1%)。

六、检测红细胞超氧化物歧化酶(Erythrocyte Superoxide Dismutase, ESOD) 极期、恢复期分别取末梢血 20 μl , 以生理盐水洗涤 3 次后将红细胞溶血, 乙醇氯仿提取, 记录上层液体积并测量, 具体方法见文献^[1]。

结果:肺炎患儿治疗前ESOD活性为 $818.61 \pm 334.70 (\bar{x} \pm S, \text{下同})$,与健康儿对照组(1124.70 ± 289.94)相比,差异非常显著($P < 0.001$);治疗后ESOD活性(1265.13 ± 437.98)与对照组相比,无显著性差异($P > 0.05$)。治疗前后ESOD活性经统计学处理, $P < 0.001$,有非常显著性差异,说明肺炎患儿ESOD活性降低,经化癍汤治疗,随肺炎恢复,ESOD活性恢复正常。

实验研究

一、材料

1. 化癍汤方剂和单味药由本院儿科中药房提供实验用药。化癍汤及各单味药制成20% (w/v)水提取液。实验用药先经3000 rpm,离心10 min,取上清液贮存冰箱备用。

2. 动物 选用中国中医研究院动物室提供的NIH种雄性小鼠30只,体重17~22 g,自由进食和饮水。

3. 试剂 还原型辅酶I(NADH),黄嘌呤氧化酶(XOD)为西德Boehringer Mannheim厂出品;吩嗪硫酸甲酯(PMS),硝基四唑蓝(NBT)购自Sigma公司;次黄嘌呤为瑞士Fluka出品;透明质酸(HA)为上海生物化学研究所产品;其他试剂均为国产分析纯级。

二、方法及结果

1. 体外抗氧化实验

(1) 中药对超氧自由基(O_2^-)清除作用 参照Ponti^[2]等方法,以NADH/PMS/NBT系统诱导 O_2^- ,终浓度各为NADH为 $73 \mu\text{M}$,PMS为 $3 \mu\text{M}$,NBT为 $50 \mu\text{M}$, 0.016 M ,pH 8.0,Tris-HCL缓冲液,反应终体积3 ml。

$$O_2^- \text{清除率} = \frac{\bar{x}_0 - \bar{x}_1}{\bar{x}_0} \times 100\%$$

中药提取液对 O_2^- 的清除作用显示,化癍汤的各单味药都有不同程度的清除 O_2^- 的作用,见表1,并且不同药量的化癍汤对 O_2^- 清除作用呈量效关系,见表2。可证明化癍汤及

其各单味药是有通过清除 O_2^- 增强机体清除或抑制自由基反应的作用。

(2) 中药对鼠肝匀浆(体外)生成脂质过氧化物(LPO)的影响 鼠肝匀浆制备:选用健康Wistar大白鼠,雌雄兼用,体重约200~250 g,迅速处死大鼠,立即取出大鼠肝脏,按常规方法制备5% (g/w)大鼠肝匀浆。其脂质过氧化物测定方法参照文献^[3]。

抑制鼠肝匀浆脂质过氧化物实验显示,除水蛭外其他药物均具有保护膜结构及功能的作用。其中尤以鸡血藤、丹皮、白芍作用较强。

表1 单味药的抗氧化作用 (% , $\bar{x} \pm S$)

	O_2^- 清除率*	LPO抑制率**	O_2^- 诱导 解聚抑制率**
鸡血藤	100.79 ± 0.69	100.11 ± 0.09	88.23 ± 2.92
丹皮	97.12 ± 0.34	100.16 ± 0.33	82.56 ± 4.11
白芍	93.82 ± 0.50	106.47 ± 8.42	84.43 ± 0.23
虻虫	76.29 ± 3.49	39.91 ± 4.86	80.07 ± 1.73
当归	68.43 ± 2.82	86.95 ± 0.92	90.78 ± 6.22
川芎	65.67 ± 4.50	98.60 ± 0.25	79.91 ± 4.05
水蛭	47.66 ± 6.76	-31.87 ± 5.75	84.43 ± 6.22
黄芪	40.05 ± 0.50	39.21 ± 8.09	82.43 ± 1.71

注: *中药浓度3.3 mg/ml反应液, **中药浓度5 mg/ml反应液

表2 不同浓度的化癍汤的抗氧化作用 (% , $\bar{x} \pm S$)

药物浓度(mg生 药/ml反应液)	O_2^- 清除率	LPO抑制率	O_2^- 诱导HA 解聚抑制率
5.0	—	99.79 ± 2.25	—
3.3	96.74 ± 0.28	—	83.87 ± 1.85
0.8	73.91 ± 0.90	—	—
0.63	—	99.00 ± 1.18	—
0.2	17.34 ± 6.07	—	77.46 ± 3.0
0.16	—	65.24 ± 4.11	—
0.1	—	—	72.35 ± 1.07
0.08	—	38.59 ± 1.74	—
0.05	12.25 ± 3.46	—	61.95 ± 5.01
0.04	—	27.22 ± 2.42	—
0.025	10.50 ± 1.43	—	—

注: 实验均重复3次, 3管/次

(3) 中药对 O_2^- 诱导的HA粘度变化的影响 参照王伟等^[4]方法,粘度计配有电子计时

装置,应用 NADH/PMS 系统产生 O_2^- 诱发高粘度的 HA 解聚,粘度下降。加入药物后,观察药物的保护作用。反应系统终浓度 NADH 为 $500 \mu M$, PMS 为 $27 \mu M$, 解聚程度用相对粘度“秒”(流速)计算。

抑制 O_2^- 诱导的 HA 解聚作用实验结果显示:不同单味药对 O_2^- 诱导 HA 解聚的抑制作用及不同浓度的化癥汤成量效关系,其作用较强的单味药为当归、鸡血藤、白芍及水蛭。说明这类中药可通过抑制 O_2^- 对氨基多糖的损伤反应,对结缔组织成分起到保护作用,这对治疗疾病或延缓该组织老化都是有益的。

2. 化癥汤对臭氧诱导自由基反应模型小鼠实验 动物随机分为三组,(1)模型治疗组:臭氧(O_3) + 化癥汤灌胃;(2)模型对照组:吸入 O_3 + 生理盐水(NS)灌胃;(3)正常对照组:不作处理。模型组小鼠于 O_3 环境中(O_3 浓度 $0.9 ppm$, 24 h 连续吸入)⁽⁵⁾ 连续吸入 28 天,治疗组每天以 20% 化癥汤按 $0.2 ml/10 g$ 体重灌喂 1 次,处死前 1 天增加灌喂 1 次;对照组依相同剂量、时间灌喂 NS,正常组为正常喂养。

小鼠眼眶取血后,颈椎脱臼处死,立即取出肺组织,按常规制成 20% 肺匀浆;肺匀浆以超声波粉碎仪将线粒体振破,离心后取上清液测定肺组织 SOD 活性,方法同 ESOD。参照大石诚子方法测定血浆 LPO⁽⁶⁾。

化癥汤对 O_3 诱导自由基反应模型实验结果,见表 3。模型组肺 SOD 活性均降低;血浆 LPO 升高,但模型治疗组 LPO 量又显著低于模型对照组,体现了化癥汤的抗氧化作用。ESOD 在三组之间未观察到明显变化。

讨 论

目前,自由基学说对阐明衰老和某些疾病

表 3 化癥汤对臭氧诱导自由基反应模型影响
($\bar{x} \pm S$)

组别	动物数	肺 SOD (u/g 组织)	血浆 LPO (nmol/ml)	ESOD (Nu/ml)
模型治疗	10	$320.00 \pm 67.62^*$	$7.96 \pm 3.09^*$	2771.83 ± 316.39
模型对照	10	$344.16 \pm 64.91^*$	$10.38 \pm 5.01^{**}$	2708.73 ± 298.15
正常对照	10	545.95 ± 41.11	6.28 ± 1.62	2716.10 ± 168.23

注:与对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

发生发展的过程及治疗作用的机理已成为人们感兴趣的课题。许多学者通过探索多种途径以期减少或缓解自由基对机体的损害反应,达到保护机体、增强体质、改进治疗措施的目的。

本组临床观察显示化癥汤应用于小儿肺炎,有一定的清除或抑制 O_2^- 作用;据以往文献报道及本研究结果,可了解到清除自由基及抑制自由基反应也参与了“活血化瘀”作用;在小儿肺炎时及早应用活血化瘀中药,通过对全身综合作用,减少机体各种病理变化,最终达到治疗疾病的目的。

(本文承北京中医学院陈文为教授指导,谨谢)

参 考 文 献

1. Yoshihiko Oyanagui. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Analytical Biochemistry 1984; 142: 290.
2. Ponti V, et al. Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. Chem-biol Interact 1978; 23: 281.
3. 陈文为,等.补肾益脾方剂清除自由基的实验.中国医药学报 1986; 1(2): 25.
4. 王伟,等.从抗氧化反应探讨“药食同源”的含义.中西医结合杂志 1991; 11(3): 159.
5. 郭肇铮,等.白首乌抗自由基损伤的研究.中西医结合杂志 1988; 8(5): 282.
6. 大石诚子.过氧化脂质的测定方法.最新医学 1978; 33(4): 660.

· 消息 ·

为了适应浙江中西医结合工作发展新形势,浙江省中西医结合学会、浙江省杭州中西医结合医院创办的《中西医结合临床杂志》在连续试刊 3 年基础上,经国家科委正式批准为《浙江中西医结合杂志》。该刊设有医学论著、临床报道、学术讲座、信息介绍、实验研究、经验交流、专题讨论、基层园地等栏目,面向基层,注重实用,是浙江省唯一的中西医结合综合性期刊,将于 1993 年第 4 季度在全国公开发行。

Abstract of Original Articles

Clinical and Experimental Study on Effect of Jin-Qi-Jiang-Tang-Pian (金芪降糖片) on Qi-Yin Deficiency and Hyperactivity of Fire Type of Diabetes Mellitus

Liang Xiao-chun (梁晓春), Xie Ming-zhi (谢明智)*, Guo Sai-shan (郭赛珊), et al
Peking Union Medical College Hospital, Beijing (100730)
* *Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*

The purpose of this study was to verify the effect of Jin-Qi-Jiang-Tang-Pian (JQJTP) on fasting blood glucose (FBG), postcibal blood glucose (PBG), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), acetylcholine esterase (AChE), insulin, RBC-superoxide dismutase (RBC-SOD) and malondealdehyde (MDA). Efficacy was observed in 40 cases of diabetes mellitus, 20 cases administered with Yu-Quan Pian (玉泉片 YQP) were taken as control. Each group took drugs for two months. After treatment with Jin-Pi-Jiang-Tang-Pian, FBG, PBG, AChE were apparently dropped and RBC-SOD increased, as compared with patients of the YQP group ($P < 0.05 - 0.01$), and major symptoms of diabetes were improved. In experimental study, model rats suffering from diabetes induced by alloxan were observed, the rats' blood sugar level above 11.1 mmol/L were chosen for observation. These rats were divided into JQJTP group, YQP group and control group. It was found that JQJTP was able to lower blood sugar, TG and MDA ($P < 0.05 - 0.001$) significantly, with a increase of the SOD/MDA, as compared with those of patients of the control groups.

Key words Ji-Qi-Jiang-Tang-Pian, blood sugar, diabetes mellitus

(Original article on Page 587)

Clinical and Experimental Studies of Effects of Huayu Decoction (化瘀汤) on Scavenging Free Radicals

Zong Ping-ping (宗平平), Yan Tian-yu (阎田玉), Gong Ming-min (龚明敏), et al
The Beijing Friendship Hospital, Beijing (100050)

Infantile pneumonia has been treated successfully with Huayu decoction (HYD) in our department for more than ten years. According to the principles of Huoxue Huayu of TCM, the composition of Huayu decoction is as follows: *Angelica sinensis*, *Paeonia lactiflora*, *Ligusticum wallichii*, *Spatholobus suberectus*, *Hirudo nipponica*, *Tabanus bivittatus*, *Paeonia suffruticosa*, *Astragalus membranaceus*. 49 cases of infantile pneumonia were treated with HYD. The activity of erythrocyte superoxide dismutases (ESOD) was measured in these patients. The results showed that the activity of ESOD reduced in the acute stage and returned to normal in convalescence. There was significant statistical difference in activity of ESOD between the patient's group. In experimental studies, the producing of free radicals was induced by inhaling ozone in mice. It was found that HYD had the effect of scavenging free radicals in these animal models. The action of anti-oxidate of HYD was also detected in vitro. The mechanism of HYD in treating infantile pneumonia might be elucidated in some respects by these clinical and experimental studies.

Key words Huayu Decoction, infantile pneumonia

(Original article on page 591)

Effects of the Jianpi Yiqi Prescription (健脾益气方) in Treating Infantile Repetitive Respiratory Infection

Li Jun-fang (李君芳), Zou Zhi-wen (邹治文)*
Capital Institute of Pediatrics, Beijing (100020)
* *Guangannmen Hospital, China Academy of TCM, Beijing*

A clinical and experimental study to evaluate effects of the Jianpi Yiqi (JPYQ, Invigorate the spleen and supplement the Qi) prescription was conducted, in contrast to 51 cases treated with transfer factor. The results showed that there were statistically significant differences between two groups for therapeutical effects ($P < 0.005$). In the experimental group, the effective rate and the total