

山海丹清除活性氧自由基的电子自旋共振研究

赵国欣¹ 宗建奇¹ 南柏松¹ 韩巧玲¹ 安荣姝² 陈惟昌²

摘要 本文以电子自旋共振法和自旋捕集技术,在体外以黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶体系产生超氧阴离子自由基、用 Fenton 反应产生羟自由基,观察山海丹对上述自由基的清除能力。结果表明:在与体内吸收后接近的浓度时,山海丹对超氧阴离子自由基的清除率为 94.83%,对羟自由基的清除率为 84.77%,提示山海丹具有清除活性氧自由基的能力,这可能是山海丹治疗冠心病的重要药理机制之一。

主题词 自由基去除剂 电子自旋共振 @ 山海丹

复方中药制剂山海丹治疗冠心病临床疗效显著,动物实验证实:山海丹能增加冠脉血流量,减少心肌耗氧量,改善血液循环^[1]。自由基医学认为当体内的活性氧自由基不能被及时消除时,可造成自由基过剩,后者是冠心病发生的重要因素之一^[2]。本文以电子自旋共振(ESR)方法和自旋捕集技术,在体外研究山海丹对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($OH^{\cdot}$)的清除能力,尝试从清除自由基的角度探讨山海丹治疗冠心病的机理,为临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

山海丹粉剂由二炮中医多学科研究所生产,按实验需要制成水混悬液。

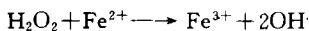
自旋捕集剂(DMPO)、黄嘌呤(Xanthine)、黄嘌呤氧化酶(Xanthineoxidase, XOD)、超氧化物歧化酶(Superoxidase, SOD)均购自美国 Sigma 公司。DMPO 使用前经活化处理,黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶均用 0.1M pH7.8 的磷酸盐缓冲液配制。

测试仪器为日本产 RE₁X 型电子自旋共振波谱仪。测试条件为 X 波段、常温、微波功率 8mW。

产生 $O_2^{\cdot-}$ 模型为黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶体系:



产生羟自由基的模型为 Fenton 反应:



对照组加 pH7.8 的磷酸缓冲液,实验组加用 pH7.

8 磷酸缓冲液稀释的山海丹混悬液,测 $O_2^{\cdot-}$ 时以 SOD 作为阳性对照,测 $OH^{\cdot}$ 时以 VitC 作为阳性对照,每组各测 10 个样品,结果作统计学处理。

2 结果

ESR 波谱分析时,信号波的面积与产生该信号的物质含量呈正比。本文以信号波的峰高分别近似的代表 $OH^{\cdot}$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 被捕集后的加合物 DMPO- OH 和 DMPO- OOH 浓度,并以下式计算药物对自由基的清除率 E:

$$E = (h_0 - h_x) / h_0 \times 100\%$$

式中 h_0 为对照组 ESR 第 2 个峰高均值, h_x 为实验组该峰高均值。

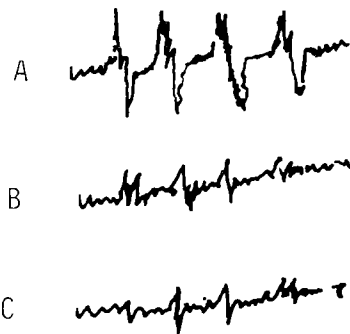


图 1 A 为黄嘌呤氧化酶体系产生的 $O_2^{\cdot-}$ 经捕集后形成的 DMPO- OOH 的 ESR 波谱(对照)
B 为加入阳性对照 SOD 后的 ESR 波谱
C 为加入山海丹 2.25mg/ml 后的 ESR 波谱

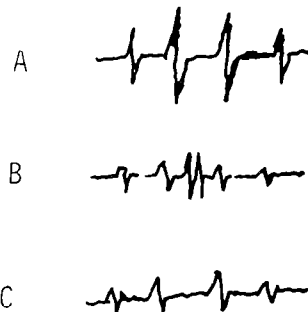


图 2 A 为 Fenton 反应产生的 $OH^{\cdot}$ 被捕集后的 DMPO- OH 的 ESR 波谱(对照)
B 为加入阳性对照 VitC 后的 ESR 波谱
C 为加入山海丹 2.25mg/ml 的 ESR 波谱

1 中国人民解放军第二炮兵中医多学科研究所,陕西省西安市西八路 88 号(710004)

2 中日友好医院临床医学研究所

收稿日期:1994-09-27

本实验共观察了山海丹3种不同的浓度,这3种浓度的确定按照山海丹临床应用有效剂量进入人体血液中被稀释的浓度,以及该制剂再被代谢至1/2、1/4时的浓度。如山海丹临床剂量为每次2.5g,成年人全身总血量以5000ml计,则人体血液中则含山海丹5mg/ml,故我们共测定4.5mg/ml、2.25mg/ml及1.125mg/ml 3个浓度分别对 $O_2^{\cdot-}$ 及OH $\cdot$ 的清除率。图1和图2分别示实验中加入山海丹(2.25mg/ml)后DMPO—OOH和DMPO—OH $\cdot$ 的ESR波谱的峰—峰值较对照组缩小,其中对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力以SOD作为阳性对照,对OH $\cdot$ 的清除能力以VitC对照。

附表示,山海丹对活性氧自由基的清除率与其浓度的对数呈正相关,其4.5mg/ml时的清除率已达94.83%,与SOD的清除率接近。

附表 山海丹不同浓度对活性氧自由基的清除率的影响

	浓度(mg/ml)	E $O_2^{\cdot-}$ (%)	E OH $\cdot$ (%)
山海丹	1.125	70.51	64.41
	2.25	82.05	74.82
	4.5	94.83	84.77
SOD	2.25	99.9	
VitC	2.25		90.72

3 讨论

在测定自由基的各种方法中,ESR是大家普遍推崇的直接测量方法。活性氧自由基很不稳定且寿命很短,如OH $\cdot$ 的寿命大约为 10^{-6} 秒,常规的ESR技术无法测量,为了克服这一不足,我们采用了一种对活性氧自由基捕集效率很高的自旋捕集物—DMPO,使其与自由基反应后产生一种寿命较长的适用ESR检测的物质—自旋加合物。图1、2波谱的峰值与相应的活

性氧自由基有良好的正相关性。因此,可以用该波的峰值反映相应的自由基浓度^[3]。

体内自由基产生过多或清除不及时,可造成机体内自由基过剩,后者可与体内多种生命物质如核酸、蛋白质、脂质、多糖等发生反应,造成机体损伤,而导致各种病理状态。自由基的大量产生,是造成血管内皮损伤、心肌再灌注损伤、再灌注心律失常的重要原因^[4]。

山海丹由人参、黄芪、川芎、丹参、山羊血、三七等16味中药组成,治疗冠心病疗效显著。动物实验证实:山海丹能增加冠脉血流量,减少心肌耗氧量,改善血液循环。研究表明:在体外,当山海丹取与体内吸收后1个半衰期、2个半衰期接近的浓度时,对活性氧自由基具有强的清除能力,且清除率与山海丹浓度的对数呈正相关关系,提示山海丹对活性氧自由基的清除,可能是其治疗冠心病的重要机制之一。本实验中,黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶体系所产生的超氧阴离子浓度及Fenton反应产生的羟自由基浓度远远大于生物体内可能存在的自由基浓度,因此,我们推测山海丹在体内的实际清除率可能还大于实验得到的清除率,但是,由于本实验是在体外模型中进行的,与高度复杂的体内环境不同,如pH值、电解质浓度、温度以及各种酶的存在等等,因此,要了解山海丹在体内对自由基的确切清除情况,尚需进一步研究。

4 参考文献

- 赵国欣,等. 山海丹治疗冠心病的临床及实验研究. 首届国际中医心病学术会议论文集(北京), 1992: 43.
- Pryor WA. Free radicals in biology. Academic Press, New York, 1980.
- 韩家康,等. 刺五加注射液清除活性氧能力. 中日友好医院学报 1992;6(suppl): 247.
- 王爱玲,等. 冠心病与脂质过氧化关系的研究. 中华心血管病杂志 1991;19(3): 164.

北京科苑达技术开发公司经销下列医疗针灸器械

- 华佗环球牌针灸针 0.5~3寸 19元/百支 4~6寸 30元/百支
- 无菌针灸针 24元/百支
- 纯艾条 4.5元/10支
- 药艾条 5.8元/10支
- 微烟艾条 4元/盒
- 针灸器械小包 21元/个 中包 36元/个 大包 62元/个
- 双头梅花皮肤针 8元/支
- 灸架 10元/个
- 微烟灸疗器 19.8元/个
- 医用镀金磁珠 30元/1000粒
- 医用耳穴治疗板 12元/块
- 膈穴查尺 35元/只
- 医用磁疗真空拔火罐带图 72元/套
- 808理疗拔火罐 54元/套
- 竹火罐 10元/套
- 月球车磁疗按摩器(保健型) 58.8元/只
- 月球车磁疗按摩器(治疗型) 73.8元/只
- 纯牛角刮痧板 16元/只
- 远红外经络通 2.5元/付
- 标准穴位人体模型(50cm) 58元/只
- 标准穴位耳模型(22cm) 36元/只 (10cm) 16元/只 (6cm) 9元/付
- 医作保健康保牙刷 6.5元/只
- 五星磁吸针 120元/套
- 撒针、皮内针 1元/包
- 家庭万用神针灸器 98元/台
- 青岛 G6805—1 综合针灸治疗仪 175元/台
- 上海 G6805—2A 探穴综合针灸治疗仪 330元/台
- WQ1002 韩氏针灸治疗仪 260元/台
- WSZ173 型轻便脚踏吸引器 250元/台
- 路德鼻炎自动导药治疗仪 168元/台
- 路德眼全息穴位治疗仪 138元/台
- 路德微波温控药物导入治疗仪 350元/台
- XZ—90B 福康胆石治疗仪 660元/台
- QZT—1 速效自动止痛仪 72元/台
- QZT—8 多功能自动选穴治疗仪 148元/台
- QZT—100 多功能选穴按摩治疗仪 198元/台
- KX—1 风湿关节治疗仪 186元/台
- 91A 海粒探穴针灸按摩治疗仪 395元/台
- XN—3 心脑检查治疗仪 2230元/台
- DJS 胆结石治疗仪 1910元/台
- CZ—3 骨质增生药物电泳治疗仪 2080元/台
- 小天使舒筋活络仪 298元/台

邮购方法: (1) 以上商品凡购 50 元以上均办邮购, 另加 10% 邮费。邮局、银行汇款均可, 请注明品种数量。(2) 本公司信誉, 货到 5 日内必发货。
地址: 北京东城区景山东大街 13 号, 邮编: 100009, 电话: 4043358, 联系人: 董明华, 开户行: 北京沙滩城市信用社, 帐号: 03851—28。
交通: 乘汽车 58 路、101 路, 电车 103 路、109 路、111 路, 景山公园站下车, 到公园东大门即到。