

• 实验研究 •

黄芪多糖对核糖核酸酶及其抑制因子平衡系统的保护作用

中国科学院上海药物研究所 王道范 张卫* 许帼英

内容提要 核糖核酸酶(RNase)与它的抑制因子(RI)结合,以潜伏形式存在于机体,其活力反映RI的水平。潜伏的RNase%依次为:肾>肝>肺>脾。黄芪多糖抑制游离的RNase活力的程度是:肾<肝<肺<脾。此结果应用平衡反应的相对增加速度来解释:黄芪多糖的作用在低RI组织表现显著。而它对正常动物的血、肾RNase活力无抑制作用。汞剂中毒时,血、肾RNase活力显著升高;预先给予黄芪多糖,能对抗汞剂的作用,使机体的核糖核酸酶及其抑制因子平衡系统维持正常,具有保护机体的作用。

核糖核酸酶 Ribonuclease(RNase)系专一水解核糖核酸的内切酶;在机体内除RNase之外,尚存在内源性抑制因子RNase inhibitor(RI),它与RNase形成复合物(RNase·RI),使该酶处于潜伏状态,当RI失活时可释放出具有活力的RNase,二者处于平衡状态。RNase-RNase·RI的平衡系统调节核酸的代谢,对蛋白质的合成有密切的关系⁽¹⁾。

黄芪多糖 Astragalus polysaccharide(APS)系我所植化室分离,其化学性质及药理作用已有报道^(2,3)。黄芪多糖调节核酸代谢,降低核糖核酸的分解,引起核糖核酸累积,导致其合成代谢下降⁽⁴⁾。实验证明:黄芪多糖具有增强RI作用致碱性RNase活力下降^(5,6)。其他补益中药如人参、三七和刺五加等的多糖皆有类似的作用。在不同脏器组织黄芪多糖抑制RNase程度不一致,脾脏最强,其次是肝脏;而对肾和血中RNase无抑制作用。本文从以下三方面进行探讨:(1)各组织中游离和潜伏RNase的比例关系。(2)以黄芪多糖为工具,观察各组织中RNase与RNase·RI平衡系统的变化。(3)应用汞剂破坏RNase-RNase·RI的平衡,观察黄芪多糖的保护性作用。

材料与方法

一、材料:实验采用纯系ICR小鼠,断奶后1~2周体重14~18g;也采用昆明种小鼠,体重19~21g,皆为雄性。

* 上海医科大学78届实习生

本文在1984年10月全国补益药中西医结合研究学术会上报告,会议论文汇编第86页。

黄芪多糖为类白色粉末,由黄芪多糖Ⅰ和黄芪多糖Ⅱ组成。黄芪多糖Ⅰ是杂多糖,由葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成;黄芪多糖Ⅱ为D-葡聚糖。前者分子量为36000,后者为12300。临用时加灭菌生理盐水配制。

核糖核酸系江苏如皋制药厂生产。

三羟甲基氨基甲烷(Tris),上海化工专科学校实验工厂生产。

对-氯汞苯甲酸 p-chloromercuribenzoic acid(PCMB)纯品,Kcek-light厂生产。

二、组织中碱性RNase活力测定:称取组织100mg加入0.25M(pH7.2)蔗糖液制备成10%匀浆。分别测定游离RNase活力。于反应管中加入0.1M三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(pH7.66)0.35ml,匀浆液50μl,核糖核酸0.5mg(5mg/ml),依照文献⁽⁵⁾的方法进行测定,每个样品皆有空白对照,酶的活力单位以ΔA(测定管A₂₈₀-空白管A₂₈₀)/min/g湿重表示之。在同样条件下,向反应管中加入1×10⁻⁴M对-氯汞苯甲酸与匀浆混合后,再测定RNase活力。组织中RI由于对-氯汞苯甲酸作用而失活,促使RNase·RI解离,释放出潜伏的RNase,所测得的结果为组织中总RNase活力。

结 果

一、组织中潜伏的RNase的释放率比较:将ICR小鼠处死后,立即取肝、脾、肾和肺组织,测定其总的和游离的RNase活力,潜伏的RNase=总RNase-游离RNase。

$$\text{潜伏}\% = \frac{\text{潜伏的RNase}}{\text{总RNase}} \times 100\%$$

组织中潜伏的RNase反映RI活力的强弱, 结果表明: 各组织的潜伏RNase%不同, 其中以肾最高(74%), 依次为肝、肺、脾。见表1(表内数据系 $M \pm SD$)。

表1 ICR小鼠组织中潜伏RNase %

	动物数	RNase活力 ($\Delta A/\text{min/g wt}$) 总	游离	潜伏%
脾	8	25 $\pm$ 4	23 $\pm$ 3	8
肺	8	21 $\pm$ 4	15 $\pm$ 3	28.5
肝	10	17.8 $\pm$ 2.7	7.1 $\pm$ 2.8	60
肾	5	17.4 $\pm$ 1.4	4.5 $\pm$ 1.8	74

注 A代表光密度, $\Delta A = (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}})$

二、黄芪多糖对各组织碱性RNase活力影响的比较: 将ICR小鼠分为二组, 一组每日腹腔注射黄芪多糖200mg/kg, 另一组腹腔注射等量的生理盐水(NS), 给药3天, 于第5天解剖, 测定各组织总的碱性RNase活力。黄芪多糖组与对照组比较, 仅脾脏的抑制率为24% ($P < 0.05$), 而黄芪多糖对肺、肝、肾无显著性抑制。同时测定游离碱性RNase活力, 黄芪多糖的抑制作用以脾、肺为最强, 其次为肝, 抑制率分别为59.1、50.7和37.7, 而对肾无影响。见表2。

表2 黄芪多糖对ICR小鼠组织中碱性RNase的影响

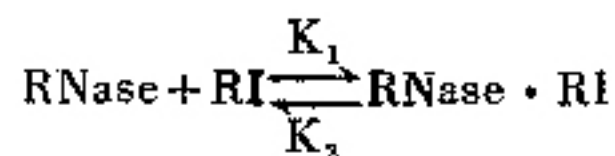
	碱性RNase活力 ($\Delta A/\text{min/g wt}$)					
	总			游离		
	对照组	APS组	抑制%	对照组	APS组	抑制%
脾	25 $\pm$ 4 (8)	18.9 $\pm$ 2* (4)	24	23 $\pm$ 3 (8)	9.4 $\pm$ 1.8*** (4)	59.1
肺	21 $\pm$ 4 (8)	18 $\pm$ 5 (5)	13	15 $\pm$ 3 (8)	7.0 $\pm$ 4** (5)	50.7
肝	17.8 $\pm$ 2.7 (10)	14.6 $\pm$ 3 (5)	17	7.1 $\pm$ 2.8 (10)	4.4 $\pm$ 2.3* (5)	37.7
肾	17.4 $\pm$ 1.4 (5)	16 $\pm$ 1.7 (4)	8	4.5 $\pm$ 1.8 (5)	4.7 $\pm$ 2 (4)	-2.9

()内为动物数

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 以下表中通用

比较上述结果, 看到组织中潜伏RNase%依次为脾<肺<肝<肾。而黄芪多糖对游离RNase抑制作用强度依次为脾>肺>肝>肾, 二者之间存在着负相关, 由于黄芪多糖具有增强RI的作用, 当组织中潜伏RNase百分率低时RI活力弱, 黄芪多糖抑制RNase作用就强。二者的相关性说明, 在组织中RNase和RI维持着平衡关系。

三、黄芪多糖作用规律的演证: 上述情况可设想由平衡系统的反应速度解释之。在体内相对稳定情况下RNase主要受RI调控, 其方程如下:



在机体正常条件下其合成反应速度=分解反应速度。为: $V_{\text{正}} = V_{\text{负}}$

增加RI浓度以 $\Delta[I]$ 代表之(I 代表RI, R 代表RNase)

$$V_{\text{正}} = K_1[R][I + \Delta[I]]$$

$$= K_1[R]I + K_1[R]\Delta[I]$$

$$\text{相对增加速度: } \frac{\Delta V_{\text{正}}}{V_{\text{正}}} = \frac{K_1[R]\Delta[I]}{K_1[R]I} = \frac{\Delta[I]}{[I]}$$

因此在同样作用条件下, 即是 $\Delta[I]$ 不变时, 相对的增加速度与 $[I]$ 成负相关。用它解释黄芪多糖作用的规律: 在同样条件下, 低 $[RI]$ 组织其 $\frac{\Delta[I]}{[I]}$ 值大, 表现作用强; 高 $[RI]$ 组织其 $\frac{\Delta[I]}{[I]}$ 值小, 表现作用弱。反之亦说明组织中RNase与RNase·RI维持平衡系统。黄芪多糖的作用使平衡向右移。

四、对-氯汞苯甲酸对小鼠各组织中RNase的影响: 选用昆明种雄性小鼠, 体重20 $\pm$ 1g, 皮下注射对-氯汞苯甲酸40mg/kg, 18小时后, 解剖取血、脾、肺、肝、肾和淋巴结。测定组织中游离的RNase活力与生理盐水对照组比较, 脾、肺、肝的RNase活力无显著变化; 肾、血浆、淋巴结RNase活力均有显著性升高。见表3。

表3 对-氯汞苯甲酸对小鼠游离RNase的影响

	RNase ($\Delta A/\text{min/g wt}$)	
	正常组	PCMB组
脾	6 $\pm$ 1.9 (8)	7.1 $\pm$ 2 (7)
肺	4.1 $\pm$ 2.8 (7)	3.8 $\pm$ 2.5 (8)
肝	1.8 $\pm$ 0.7 (8)	1.6 $\pm$ 0.6 (8)
肾	2.8 $\pm$ 0.6 (9)	6.8 $\pm$ 2.0*** (10)
淋巴结	1.4 $\pm$ 1.1 (9)	6.4 $\pm$ 3.7*** (9)
血	1.09 $\pm$ 0.24 (19)	1.7 $\pm$ 0.48** (18)

PCMB皮下注射40mg/kg $\times$ 1, 18h后解剖

五、黄芪多糖Ⅰ对抗对-氯汞苯甲酸的作用: 将雄性昆明种小鼠随机分为三组, 一组每日腹腔注射黄芪多糖Ⅰ200mg/kg, 另二组为等量生理盐水, 给药三天, 第4天中毒时保留一组正常对照; 其他二组皮下注射对-氯汞苯甲酸40mg/kg, 18小时后, 取血和肾测定游离碱性RNase活力。结果见表4。

表4 黄芪多糖对汞中毒小鼠 RNase 活力的影响

	RNase ($\Delta A/\text{min/g}$ 或 ml)	
	血	肾
NS	1.04 ± 0.24 (19) $P > 0.05 \Delta$	2.8 ± 0.6 (9) $P > 0.05 \Delta$
APS+PCMB	1.07 ± 0.38 (8) $P < 0.01 \Delta\Delta$	4.0 ± 1.6 (8) $P < 0.01 \Delta\Delta$
NS+PCMB	1.70 ± 0.48 (18)	6.8 ± 2.0 (10)

注 Δ NS组与APS+PCMB组比较, $\Delta\Delta$ APS+PCMB组与NS+PCMB组比较(APS腹腔注射200mg/kg $\times$ 3;PCMB皮下注射40mg/kg)

在对照组,血浆游离的碱性RNase活力为 1.04 ± 0.24 ,对-氯汞苯甲酸组上升为 1.70 ± 0.48 ,黄芪多糖Ⅰ加对-氯汞苯甲酸组为 1.07 ± 0.38 ,三组比较,方差分析,结果对-氯汞苯甲酸组与对照组和黄芪多糖Ⅰ加对-氯汞苯甲酸组之差均有显著性意义,而黄芪多糖Ⅱ加对-氯汞苯甲酸组与对照组无显著性差异。肾匀浆酶活力测定的结果与血浆趋势一致,黄芪多糖Ⅰ加对-氯汞苯甲酸组活力比对照组稍有上升,但无显著性意义,与对-氯汞苯甲酸组比较差异非常显著。

上述结果说明,肾脏存在高活力的RI,受到汞的作用较大。血浆RNase来源比较复杂,但能反映整体的代谢状况,预先给予黄芪多糖,能有效地保护RI,对抗汞的毒性作用。

讨 论

体外测定组织中总RNase时,经过比较求得对-氯汞苯甲酸的最佳浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 。肝、脾、肺和肾中总RNase皆在同一浓度的条件下进行比较。给小鼠皮下注射对-氯汞苯甲酸时,经吸收、分布、排泄过程,各组织中对氯汞苯甲酸的浓度不一,只有血、淋巴结和肾表现出显著反应,不同于体外实验结果。

ICR小鼠与昆明种小鼠的同一正常组织中RNase活力有差异,可能是品系不同所致。

当应用黄芪水煎剂口服时,曾观察到核糖核酸合成下降的作用,但不及黄芪多糖腹腔注射时的作用强。机理研究选用黄芪多糖比黄芪水煎剂更为优越。

中医临床实践说明,在机体虚弱时,接受扶正固本药物后,具明显增强体质作用。本文观察到,黄芪多糖对正常生理状况下的血浆和肾匀浆RNase活力无作用。汞剂中毒引起多种酶活力变化,并引起肾小管坏死而致肾功能衰竭⁽⁷⁾。当注射对-氯汞苯甲酸时,出现血和肾RNase活力上升,致平衡反应左移。预先

给予黄芪多糖能有效地保护RI,对抗对-氯汞苯甲酸诱导平衡的破坏,从而维持正常平衡状态,具有保护作用。

扶正固体与RNase-RI平衡系统有什么内在联系呢?首先需了解RI生理活性,RI系含有巯基糖蛋白,具有保护m核糖核酸的作用,能提高转录和翻译效率^(1,8),对r核糖核酸也有保护性作用,能延长聚核糖体的半衰期,因此RI活力增强,有利于蛋白质合成。例如:切除大鼠部分肝后,48小时测出RI活性显著升高,RNase活力下降,有利于肝细胞再生⁽¹⁰⁾,当淋巴细胞被PHA激活后,亦观察到RNase活力下降,核糖核酸累积m核糖核酸稳定性增加,蛋白质含量增加⁽¹¹⁾。在孕鼠肝脏也检测到RI活性的增强⁽⁹⁾。因此RI与蛋白质合成密切相关,从而影响到机体的多种生物功能,具普遍性意义。反之,RI受到损害时,RNase活力上升,体质受损,已有的报道观察到吸烟、镉中毒、肾损伤、肌肉损伤、肿瘤等皆有血清RNase活力升高现象^(12~14)。

黄芪多糖系扶正固本药物,黄芪多糖具有多方面的生物活性。黄芪多糖对抗汞中毒时的作用,使生物体RNase-RNase·RI平衡系统在不利条件下处于稳定状态,从而提高机体的自稳性,达到扶正固本的目的,因此可以将扶正固本的概念与RNase-RNase·RI系统的平衡联系起来,做为扶正固本的生化基础之一,是否恰当?有待于继续研究。

参 考 文 献

1. Hiranyavasit W, et al. The effect of ribonuclease inhibitor from human placenta on the in vitro synthesis of human placental proteins. FEBS Lett 1983; 152(1):35.
2. 方圣丁,等. 中药黄芪有效成份的研究 I 多糖体的分离性质及其生理活性. 有机化学 1982; 1:26.
3. 中国科学院上海药物研究所,等. 黄芪的免疫促进作用. 科学通报 1979; 24:764.
4. 王道苑,等. 黄芪多糖对核酸代谢的影响. 生物化学与生物物理学报 1980; 12(4):343.
5. 王道苑,等. 黄芪多糖对小鼠肝脾细胞核酸代谢的影响. 中国药理学报 1982; 3(3):204.
6. 王道苑,等. 黄芪多糖对RNase和RNase抑制因子的作用. 生物化学与生物物理学报 1984; 16(3):285.
7. Verity MA, et al. Hg induced kidney necrosis in Daniel JW, et al. Mercury poisoning: II. MSS information corporation N. Y. 1973:68.
8. Farkas WR. Protection of the integrity of polyribosomes against rabbit serum ribonuclease. Int J Biochem 1979; 10(2):159.

9. Goodlad GAI, et al. Ribosomal RNA turnover and the level of ribonuclease activity in the liver of the pregnant rat. *Biochem Biophys Acta* 1975; 378 (2):221.
10. Shortman K. Studies on cellular inhibitor of ribonuclease. *Biochem Biophys Acta* 1962; 61:50.
11. Green RC. Changes in acid ribonuclease and other acid hydrolase during lymphocyte stimulation. *Exp Cell Res* 1977; 110(1):215.
12. Rabinovitch M, et al. plasma ribonuclease activity in human uremia. *J Lab & Clin Med* 1959; 54(4): 563.
13. Rabinovitch M, et al. Increase in serum ribonuclease activity after bilateral nephrectomy. *Am J Physiol* 1956; 187:525.
14. Reddi KK. Serum ribonuclease of normal persons and patients with renal impairment. *Clin Biochem* 1978; 11(4):133.

参杞阿胶丸治疗病态窦房结综合征30例疗效观察

上海第二医科大学附属第九人民医院内科 杨菊贤 徐济民 丁学屏 戈 戎*

临床资料 本组30例病态窦房结综合征患者, 男性16例, 女性14例, 平均年龄 49.2 ± 11.53 岁。治疗前心率 <50 次/分12例, $50 \sim 59$ 次/分16例, ≥ 60 次/分2例, 平均心率 51.63 ± 7.15 次/分。治疗前28例作过2mg阿托品试验, 均为阳性(注射后最大心率 <90 次/分)。有6例进行经食管左心房调搏, 测定窦房结功能。6例的平均窦房结恢复时间(SNRT)为 1536.67 ± 132.90 ms (正常 ≤ 1400 ms), 平均校正窦房结恢复时间(cSNRT)为 593.33 ± 142.96 ms (正常 ≤ 525 ms), 平均窦房传导时间(SACT)为 222.50 ± 104.45 ms (正常 ≤ 152 ms), 平均窦房结恢复时间指数(ISNRT)为 1.71 ± 0.21 (正常1.61)。病窦诊断标准按Chung氏标准。本组心电图表现: 窦缓25例; II°窦房阻滞3例, 窦性停搏4例, I°; II°、III°房室阻滞各1例(以上三种情况部分与窦缓复合存在)。中医辨证计心气虚14例, 心气阳虚4例, 心气阴两虚12例。心气虚或心气阳虚的脉象以迟细濡为主, 舌象以淡胖为主; 心气阴两虚的脉象以迟细弦为主, 部分伴结代脉, 舌象以质红或边尖红为主。

治疗方法 在诊断明确后, 停用其他药物。每日分次服用9粒山西榆社县阿胶厂生产的参杞阿胶丸, 该药由党参、黄芪、阿胶、枸杞子四药组成(审批文号: (83)晋卫药健字31—001), 疗程一个月。疗程结束后, 复查中医辨证、心电图、阿托品试验, 已测窦房结电生理功能者也予以复查。

* 进修医师

结果 (1)症状缓解情况: 主要症状胸闷、心悸、头晕、乏力、气促、失眠、纳呆, 服用后症状缓解的有效率为71.2~100%。(2)心率改变: 30例的平均心率由治疗前 51.63 ± 7.15 次/分上升至 63.4 ± 6.26 次/分, 其中无1例 <50 次/分, $50 \sim 59$ 次/分者7例, ≥ 60 次/分者23例, 心率 ≥ 60 次/分的有效率76.67%。(3)心电图改变: 窦缓25例治疗后恢复正常心电图的20例; 窦性停搏4例, 治疗后未曾发现; 窦房阻滞3例中治疗后仅存1例; 房室阻滞3例治疗后无改变。心电图有效率73.3%。(4)阿托品试验改善情况: 治疗前28例阿托品2mg试验阳性, 治疗后仅9例阳性, 有效率68.96%。(5)窦房结电生理测定改变: 治疗后6例平均SNRT为 1383.33 ± 194.49 ms; 平均cSNRT为 490 ± 73.76 ms; 平均SACT为 162.67 ± 81.43 ms; 平均ISNRT为 1.58 ± 0.13 。治疗后测定有5例好转, 其中平均SNRT、cSNRT、ISNRT均已恢复至正常范围。(6)中医辨证: 治疗后脉象与舌象有好转者20例, 占66.6%。治疗后症状、心率、心电图、阿托品试验、窦房结功能测定及中医辨证等一致好转的有5例, 部分项目好转的有17例, 总有效率73.33%。

讨论 本药对病窦患者的症状缓解与增加心率的疗效显著, 从阿托品试验及部分窦房结功能的测定发现有一定的改善窦房结功能的作用, 但对房室传导阻滞患者的疗效不佳。本药在治疗过程中未发现副作用。

更 正

本刊1986年第10期第614页, “药枕治疗原发性高血压病100例疗效观察”的结果, 显效应为59例。

本刊1986年第三期第768页简讯栏内, 山东省中西医结合医院应更正为山东青岛中西医结合医院。

Protective Effect of Astragalus Polysaccharide on Ribonuclease and Ribonuclease Inhibitor System

Wang Daoyuan (王道苑), Zhang Wei (张卫), Xu Guoying (许帼英)

Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai

Astragalus Polysaccharide (APS) is a mixture isolated from *Astragalus mongolicus*, which has two polysaccharides as its major components. APS enhanced the activity of the ribonuclease inhibitor (RI) and regulated RNA metabolism and thereby affected protein biosynthesis. For ribonuclease (RNase), there existed two states, a free form and a latent form which was a compound complexed with the RI. Tissue homogenates were incubated in the medium containing p-chloromercuribenzoic acid (PCMB), 1×10^{-4} M, its activity of RI was lost and thus the latent RNase which was formerly complexed with the RI was released. The latent RNase activity reflected the RI level. The RI level was different among various tissues, kidney > liver > lung > spleen. APS-2, ip 200 mg/kg per day in ICR mice for three days did not cause a significant change in total activity of RNase (latent+free) except spleen. It showed that the RI activity was enhanced by APS-2, hence the activity of free RNase decreased. The order of the inhibition rate of RNase activity by APS-2, from high to low, was spleen, lung, liver and kidney. PCMB was subcutaneously given to mice 40 mg/kg, the RNase activity increased significantly in kidney, serum and lymph node 18h later. After the medication of APS-2 ip 200mg/kg $\times$ 3, the same dosage of PCMB did not cause the increase of free RNase activity in both plasma and kidney, there existed no significant difference with the control group. Therefore, the effect of APS-2 was to counteract PCMB. The results indicated that APS may play an important role in maintaining balance between RNase and RNase-RI system.

(Original article on page 93)

Effect of Long Kui (龙葵) Injection Co. on Hepatoma H₂₂ Ascites Tumour Cells in Mice

Lü Guizhi (吕桂芝), Wang Kunren (汪夔仁), et al

Dept. of Cell Biology, Beijing Cancer Research Institute, Beijing

This experiment was carried out in adult mice. Hepatoma H₂₂ ascites tumour cells was injected intraperitoneally to produce a hepatoma H₂₂ ascites tumour model. On the 2nd day after inoculation, these animals were divided into two groups. Group 1 was injected intraperitoneally with 0.2 ml Long Kui injection co. every day for 8 days, which contained *Solanum nigrum*, *Solanum lyratum*, *Duchesnea Indica*, *Angelica Sinensis*, *Curcuma aromatica* and *Salvia miltiorrhiza*. Group 2 received same dose of saline as control. Results showed that this injection inhibited markedly the proliferation of hepatoma H₂₂ ascites tumour cells. The inhibitory rate was 87%, $P < 0.001$. At the same time, the cAMP-phosphodiesterase and (Na⁺-K⁺)-ATPase activity on the cell membrane surface was decreased and the microvilli showed marked regression. These results indicated that the Long Kui injection co. was a potent anti-cancer drug, and it may increase intracellular cAMP level by inhibiting 3',5'-cAMP-PDE and (Na⁺-K⁺)-ATPase activity to modulate the proliferation and the differentiation of the cancer cells.

(Original article on page 97)

Effect of Tonifying Recipes on Platelet Aggregation

Yu Shizeng (于世增), Wang Yonghong (王永红)

Beijing Institute of TCM, Beijing

The effect following injection of Sijunzi Decoction (四君子汤, a Qi tonic), Siwu Decoction (四物汤, a Blood tonic) and Bazhen Decoction (八珍汤, a mixture of Qi tonic and Blood tonic) was estimated by measuring degrees of inhibition of rabbit platelet aggregation induced by ADP. The result of this study are as follows: The platelet aggregation was inhibited with Sijunzi Decoction, Siwu Decoction and Bazhen Decoction ($P < 0.01$), with the last being more effective. This is due to the combined prescription of Qi tonics and Blood tonics, which generates inter-related pharmacologic action. The result indicates that the tonifying recipes may be effective in the clinical treatment with anti-platelet aggregation.

(Original article on page 100)