

川芎嗪对人血多形核白细胞呼吸暴发与氧自由基的抑制作用

黄建邦 刘雪芬 陈树元

内容提要 本研究用化学发光法测定: (1)人血多形核白细胞(PMN)受佛波醇(PMA)刺激发生呼吸暴发产生的活性氧。(2)黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基(O_2^-)。(3)维生素C-铜-酵母多糖体系产生的羟自由基($\cdot OH$)。(4)过氧化氢(H_2O_2)释放反应。同时也观察了川芎嗪对上述体系产生的自由基的影响。结果提示, 川芎嗪对 PMN 细胞呼吸暴发的全过程均有抑制作用, 对 O_2^- 有清除作用, 而对 $\cdot OH$ 则无作用。

关键词 川芎嗪 多形核白细胞 化学发光 氧自由基

Effect of Tetramethylpyrazine in Inhibiting Respiratory Burst of Polymorphonuclears and Scavenging Oxygen Free Radicals Huang Jian-bang, Liu Xue-fen, Chen Shu-yuan. *Nanfang Hospital, Guangzhou (510515)*

Chemiluminescence method was used to measure (1) Active oxygen production induced by respiratory burst of polymorphonuclears (PMN) from human blood stimulated with phorbol myristate acetate (PMA); (2) Superoxide (O_2^-) induced by xanthine-xanthine oxidase system; (3) Hydroxyl radicals ($\cdot OH$) produced by Vit C-Cu²⁺-zymosan; and (4) The release of hydrogen peroxide (H_2O_2). Effects of tetramethylpyrazine on these active oxygen species were observed. The results showed respiratory burst of PMN was inhibited by tetramethylpyrazine, superoxide and hydrogen peroxide were scavenged by tetramethylpyrazine and their median inhibition concentration (IC_{50} , $\mu mol \cdot L^{-1}$) were 5.6 and 7.1 respectively.

Key words tetramethylpyrazine, chemiluminescence, polymorphonuclear leucocytes, oxygen free radicals

川芎嗪又名四甲基吡嗪(Tetramethylpyrazine), 是中药川芎中的一种生物碱, 临床上广泛用于治疗心脑血管疾病, 该药被阐明有钙拮抗作用, 被用于心肌缺血再灌注损伤的治疗时, 发现有提高超氧化物歧化酶(SOD)活性, 有抗心肌脂质过氧化的作用^①, 该药与氧自由基之间的关系尚不清楚, 为此, 本研究用化学发光法检测多形核白细胞(PMN)呼吸暴发产生的活性氧以及非细胞体系产生的超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2), 同时观察了川芎嗪对其的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 药品与试剂 盐酸川芎嗪(无锡制药厂生产, 批号 900611), 新鲜健康成人血液(广州中心血站提供), 胎牛血清(杭州四季青生物工程研究所提供, 第一军医大学南方医院药理室(广州 510515)

供), 黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶、鲁米诺、佛波醇(PMA)、酵母多糖均为 Sigma 产品, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器 FT-662 型生物化学发光光度仪(北京核仪器厂生产), Z 360 K 型高速低温离心机(Hermle, Ger.)

2 方法

2.1 PMN 细胞制备 按 Ginsberg 方法^②略加改进, 分离出的 PMN 细胞悬液置碎冰中保存, 光镜下计数, 台盼蓝染色, PMN 细胞数 > 95%, 活细胞数 > 98%。

2.2 采用化学发光法测定 PMN 细胞呼吸暴发^③, PMN 细胞悬液($1 \times 10^6 \cdot ml^{-1}$) 0.5 ml, 10^{-4} mol/L 鲁米诺 0.9 ml, Hank's 平衡盐溶液 0.1 ml, 轻摇混匀, 上机测本底后加入 $1.25 \mu g \cdot ml^{-1}$ PMA 50 μl 启动反应, 反应温度控制在 37°C, 连续测定 20 min, 积分 1 s, 发光强度以 mV 表示(下同)。

2.3 超氧阴离子自由基(O_2^-)的测定⁽⁴⁾ 0.2 mmol/L 黄嘌呤 0.8 ml, 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.8) 0.1 ml, 10^{-4} mol/L 鲁米诺 50 μ l, 混匀后加入 $7.5 \text{ u} \cdot \text{ml}^{-1}$ 黄嘌呤氧化酶液 50 μ l, 启动反应, 记录最大发光值, 积分时间 6 s。

2.4 羟自由基($\cdot\text{OH}$)的测定⁽⁵⁾ 1.8 mmol/L 抗坏血酸 0.2 ml, 1.8 mmol/L CuSO_4 0.4 ml, $7.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 酵母多糖 0.2 ml, 50 mmol/L PBS 0.6 ml, 混匀, 加入 33.3 mmol/L H_2O_2 0.6 ml, 启动反应, 记录最大发光值, 积分 6 s。

2.5 过氧化氢(H_2O_2)释放反应的测定⁽⁶⁾

0.18% H_2O_2 0.1 ml, pH 8.0, PBS 液 0.3 ml, 温育 3 min 后测本底后加入 2 mmol/L 鲁米诺 0.1 ml, 启动发光反应, 记录最大发光值, 积分 6 s。

2.6 统计学处理 所有数据统计学处理, 用 t 检验, 经回归分析求出半数抑制系数(IC_{50})。

结 果

1 川芎嗪对人血 PMN 细胞呼吸暴发的作用 见表 1。川芎嗪对 PMN 细胞受 PMA 刺激后产生的呼吸暴发有明显的抑制作用, 呈剂量依赖性。

2 川芎嗪对 O_2^- 的清除作用 见表 2。川芎嗪对

表 1 川芎嗪对 PMN 细胞呼吸暴发的抑制作用 ($\bar{x} \pm S$)

组别	发光强度(mV)				
	4	6	8	12	20(min)
空白对照	114 $\pm$ 17	240 $\pm$ 30	264 $\pm$ 28	134 $\pm$ 12	24 $\pm$ 3
SOD 酶 Δ	34 $\pm$ 6*	136 $\pm$ 18*	98 $\pm$ 10*	45 $\pm$ 8*	12 $\pm$ 3*
川芎嗪 Δ					
14.6	20 $\pm$ 3*	42 $\pm$ 6*	74 $\pm$ 8*	36 $\pm$ 6*	—
7.3	45 $\pm$ 12*	112 $\pm$ 12*	126 $\pm$ 11*	87 $\pm$ 3*	19 $\pm$ 2*
3.7	82 $\pm$ 16*	173 $\pm$ 23*	205 $\pm$ 23*	96 $\pm$ 10*	21 $\pm$ 3
1.9	99 $\pm$ 12	208 $\pm$ 18	258 $\pm$ 19	131 $\pm$ 13	28 $\pm$ 4

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 每组均为 6 个样品; Δ SOD 酶单位为 $100 \text{ u} \cdot \text{ml}^{-1}$, Δ 川芎嗪单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 下表同

由黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系释放的 O_2^- 所引起的化学发光呈明显的抑制作用, 呈剂量依赖性, 其半数抑制系数(IC_{50})为 $5.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明川芎嗪与 SOD 一样对 O_2^- 有直接的清除作用。

表 2 川芎嗪对 O_2^- , $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 作用的比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	发光强度(mV)		
	O_2^-	H_2O_2 Δ	$\cdot\text{OH}$
空白对照	116 $\pm$ 6	136 $\pm$ 9	76 $\pm$ 8
SOD 酶	43 $\pm$ 5(62.9)*	36 $\pm$ 2(73.5)*	—
川芎嗪			
14.6	30 $\pm$ 2(74.1)*	37 $\pm$ 7(72.8)*	67 $\pm$ 3(11.8)
7.3	57 $\pm$ 8(50.9)*	62 $\pm$ 10(54.4)*	69 $\pm$ 4(9.2)
3.7	80 $\pm$ 10(31.0)*	90 $\pm$ 8(33.8)*	75 $\pm$ 5(—)
1.9	103 $\pm$ 12(11.2)	122 $\pm$ 11(10.3)	72 $\pm$ 1(—)

注: 表内数据为发光强度; () 内为发光抑制率(%); 发光抑制率(%) = $(1 - \frac{\text{抑制剂发光值}}{\text{空白对照发光值}}) \times 100$; 与空白对照组比, * $P < 0.05$

3 川芎嗪对 H_2O_2 释放反应的抑制作用 见表 2。川芎嗪对 H_2O_2 温育后经鲁米诺增强化学发光呈明显的抑制作用, 呈剂量依赖性, 其 IC_{50} 为 $7.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 川芎嗪对 $\cdot\text{OH}$ 的作用 见表 2。川芎嗪对维生素 C-铜-酵母多糖体系释放的 $\cdot\text{OH}$ 所引起的化学发光无明显的抑制作用。

讨 论

Allan 报道⁽⁷⁾ 细胞受抗原刺激时消耗氧, 发生“呼吸暴发”, 同时产生大量的活性氧(O_2^- , $\cdot\text{OH}$, H_2O_2), 这些活性氧自由基可以通过鲁米诺依赖性化学发光来检测。我们观察到川芎嗪对人血 PMN 细胞受 PMA 刺激产生的呼吸暴发的整个过程均有抑制作用。由于 PMN 细胞是炎症反应的主要细胞, 这可以解释川芎嗪可以降低炎症反应时所引起的 LPO 水平及增高 SOD 酶活性⁽⁸⁾。川芎嗪对 PMN 细胞的抑制作用, 其机理尚不清楚, 可能是阻断了 PMN 细胞呼吸暴发时的钙内流, 使细胞内钙离子浓度不能迅速提高, 导致活性氧产生不足, 也可能川芎嗪有直接清除氧自由基的作用, 为此, 我们建立的非细胞氧自由基产生体系结果表明, 川芎嗪可直接清除由黄嘌呤氧化酶体系产生的 O_2^- , 并可抑制 H_2O_2 的释放反应, 而对酵母多糖体系产生的 $\cdot\text{OH}$ 无清除作用。

参 考 文 献

1. 戴顺龄, 薛全福, 原 琪, 等. 山莨菪碱与川芎嗪预防肺水肿时大鼠血气及红细胞超氧化物歧化酶的变化. 中国病理生理杂志 1992; 8(2): 113.
2. Gingsberg I, Boronski R, Malamud D. Chemiluminescence and superoxide generation by leukocytes stimulated by polyarginine, role of histone, polysin cytochalsins and inflammatory exudates as modulators of the oxygen burst. Inflammation 1985; 9: 245.
3. Wymann MP, Tschanner VV, Deranlean DA. Chemiluminescence detection for OH produced by human neutrophils during the respiratory burst. Anal Biochem 1987; 165: 371.
4. Gingsberg I, Boronski R, Sadvonic M, et al. Polyhistidine a potent stimulator of superoxide generation in human blood leukocytes. Inflammation 1987; 11: 253.
5. Rowley DA, Halliwell B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction? Arch Biochem Biophys 1983; 225: 279.
6. 胡天喜, 陈季武, 许建营. 云芝糖肽和灵芝多糖清除活性氧的作用. 生物化学与生物物理学报 1992; 24: 465.
7. Allan PC, Loose LD. Phagocytic activation of luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophage. Biochem Biophys Res Commun 1978; 69: 245.
8. 王兴鹏, 徐家裕, 袁耀宗, 等. 川芎嗪对急性出血坏死性胰腺炎大鼠肺损伤的作用及机制研究. 中国中西医结合杂志 1993; 13(10): 610.

(收稿: 1994-02-14 修回: 1994-06-14)

通腑解毒汤直肠内缓慢滴注治疗溃疡病单纯穿孔 50 例

李志锐 李永清

溃疡病单纯穿孔一般采用手术治疗。近 10 年我们收治的溃疡病单纯穿孔 50 例, 采用直肠滴注中药治疗, 取得满意效果。

临床资料 50 例患者中男 42 例, 女 8 例; 年龄 24~65 岁, 平均 37.8 岁; 从穿孔至入院时间: <6 h 者 32 例, 6~12 h 者 15 例, >12 h 者 3 例; 有典型溃疡病病史者 42 例; 体温 38℃ 左右者 22 例, 39℃~40℃ 5 例; X 线腹透膈下有游离气体者 41 例。临床表现均有剧烈腹痛, 开始上腹突然发生刀割样剧痛, 继之腹痛遍及全腹。全腹压痛、反跳痛、肌紧张, 肠鸣音减弱或消失及肺肝浊音界消失。

治疗方法 患者入院后给胃肠减压、禁食水、输液纠正水电解质紊乱。体温 >39℃ 者酌情给抗生素 1~2 天, 体温下降至 39℃ 以下则停用。同时给自拟通腑解毒汤: 生大黄 25 g(后下) 赤芍 15 g 川厚朴 15 g 桃仁 12 g 红花 10 g 枳实 15 g 银花 30 g 败酱草 30 g 生甘草 6 g, 浓煎 150~200 ml, 待温后倒入灌肠器内, 肛管插入肛门内 10~15 cm 接灌肠器管, 于 30 min 左右缓慢滴入, 每日 1 剂, 直至腹膜炎体征消失, 也可在拔除胃管后口服。

结 果 在直肠滴注中药后当晚或次晨即排气排便, 继之腹痛减轻, 体温下降。腹膜炎体征消失时间 3~7 天, 平均 4.1 天; 体温恢复时间 1~5 天, 平均 2.9 天。腹膜炎体征消失 1 周后, 常规做上消化道造影(38 例)或胃镜检查(9 例)。结果: 十二指肠球部溃疡 29 例, 胃溃疡 16 例, 2 例病变部位不明确, 可能

穿孔直径小, 组织修复快之故。

本组患者临床治愈 47 例(临床症状、体征消失, 体温正常, 肠鸣音恢复, 膈下游离气体吸收), 占 94%; 无效 3 例(临床症状、体征无减轻或反加重者), 占 6%, 均中转手术(其中 1 例从穿孔至入院时间为 11 h, 2 例达 13 h)。

体 会 对本病非手术治疗原则: 空腹穿孔, 穿孔时间不超过 12 h, 生命体征稳定。本法不受胃肠减压限制, 患者入院后即可给药。应严格掌握中转手术指征, 若排气排便后腹痛不减, 体温不降反升高者, 或直肠滴药后 6~12 h 体征不减轻者(本组 3 例中转手术患者均因穿孔时间长, 腹腔积液多, 穿孔直径均 >1.2 cm)。直肠滴药切忌速度过快, 否则药物在肠内停留时间过短而排出, 达不到治疗目的。

本病的病机主要为中焦气机突然闭塞不通, 瘀热互结, 阳明腑实。用理气通腑、活血解毒是治疗本病成功的关键。方中川厚朴、枳实、大黄理气通腑泻下, 芍药、甘草解痉止痛; 桃仁、红花活血化瘀; 银花、败酱草清热解毒。据现代药理研究表明: 川厚朴、枳实、大黄可使胃肠蠕动增强, 逼迫胃肠内气体、粪便排出, 有利于穿孔闭合; 芍药、甘草对溃疡有促进愈合作用; 桃仁、红花有兴奋血管、肠管作用, 对穿孔闭合有协助之效; 大黄、川厚朴、芍药、甘草、银花、败酱草对多种细菌有抑制和杀灭作用, 对穿孔所致腹膜炎有较强的消炎作用。

(收稿: 1994-02-21 修回: 1994-06-25)