

综述与评论

我国腐植酸在医药方面的研究进展

袁中元

(北京同仁医院)

早在1599年前明朝李时珍的《本草纲目》中已记载了矿物类中药“乌金散具有治疗疮疡和妇女崩漏”的作用。国内化学家和医药学家们大量研究,已证实中药乌金散的有效成份就是腐植酸,这意味着腐植酸具有抗炎和止血的作用在明代已被发现了。

1978年以前,我国民间及一些医疗单位,应用腐植酸广泛治疗多种疾病,显示了较为满意的效果,为我国腐植酸在医药领域的研究奠定了实践的基础。由于科研工作落后于临床应用,难以说清治病有效的机理,也不能提供令人信服的科学论据,必然导致人们对腐植酸能否治疗疾病的种种疑虑和误解。

1979年国务院〔290〕号文件下达,在国家经委的直接领导下,卫生部科教司十分重视,明确指出腐植酸在医药方面的应用是处于研究阶段,应本着实事求是,对人民负责的精神,选有条件的医学院和医院为重点,逐步提高研究的深度和广度。现在,据不完全统计,北京医科大学、首都医学院、湛江医学院、河南医学院、山西医学院及北京海淀医院、北京同仁医院等29多个医学院校和医院,分别坚持研究腐植酸用于医药的毒理学、药理学和临床应用,其成果刊登在国内杂志上公开发表的论文已有百余篇,此外约有十余篇论文先后在国际泥炭学术会议、国际中药会议

国际自然医药会议、国际微循环会议上报告或书面交流,得到国外学者赞赏。各单位腐植酸医药方面的研究,有相当一部分获得省或市级的科技成果奖,反映我国的研究水平,在某些方面处于国际先进水平。由于医药和化学部门的密切配合,山西大同、河南巩县和云南昆明等地制药厂生产的腐植酸,已正式通过药品检定部门的审查,批准为合格的、无毒安全而有效的口服药或外用药,供临床使用。

一、腐植酸的药理学研究

1、抗炎作用。北医、湛医和海淀医院等单位,用小鼠、大鼠、家兔多次试验,已确定我国十多种腐植酸(包括总腐酸、黄腐酸)都具有明显的抗炎作用,因其产地不同,提取方法不同,抗炎作用的强弱有一些差别,一般认为总腐植酸比黄腐酸略优,抗炎作用最好的品种,可以近似于氢化考的松。抗炎作用的机理,正在深入研究,有人认为腐植酸抑制了与炎症渗出有密切关系的透明质酸酶,亦有研究表明,可能腐植酸调整了与炎症有关的微量元素,如锌、铜离子。从分子水平看炎症的化学过程是自由基的产生、利用和消除的过程,超氧化物歧化酶是含锌及铜的酶,此酶的活性如被腐植酸作用后加强,将促进超氧自由基的歧化,则有利于炎症的控制。总之,抗炎渗出的作用,几乎是腐植酸的共性,不

仅为临床医学治疗各种炎症提供理论依据,而且亦适用于兽医治疗动物的炎症疾病,预计有广阔的实用价值。

2、活血止血作用。同仁医院等单位的动物实验和临床应用,证明腐植酸对小血管破裂的出血和渗血,有明显的止血作用,其效果与中外著名的云南白药相同。用腐植酸静脉注射,使狗血栓弹力图明显改善。对于在血管内流动的血流,腐植酸又显示明确的活血作用,能使动物微循环障碍改善甚至恢复正常,保持全身终末的营养性微血管内血流正常,使各重要脏器得到正常的微循环灌注,才能维持他们的正常生理功能。随着微循环学研究的进展,目前认为,许多疾病都伴随微循环障碍,腐植酸的合理使用,将逆转异常的微循环灌注促进其恢复正常,必然有利于有病脏器病变的恢复。

3、对消化性溃疡的作用。北医三、港医、海淀、同仁等医院做了大量研究工作,一致肯定了实验用多种腐植酸对动物的实验性胃溃疡都有明显的抗溃疡形成和促使溃疡愈合的作用。多数学者科学地证实腐植酸具有直接抑制胃粘膜的壁细胞,使胃酸分泌减少而促使溃疡愈合;也有人发现腐植酸能刺激胃粘膜内前列腺素合成,前列腺素有保护胃粘膜的作用,我们还发现腐植酸能增加胃粘膜的血流量,这也是保护胃粘膜,预防溃疡形成和使之愈合的重要条件。

4、对免疫功能的影响。河南医科所、港医、北医、山西医学院和海淀医院的研究,表明腐植酸对动物免疫功能有明显影响,表现在有免疫功能的巨噬细胞功能被激活、胸腔重量显著增加等。对免疫的影响因腐植酸产地不同而有很大差异,亦取决于给药剂量的大小而得到相反的结果。如5mg/kg腐植酸腹腔注射,动物胸腺明显增大,显示对免疫器官有激活作用;上述剂量增大10倍,使胸腺重量减轻,这些很有意义的结果,吸

引着有关专家们正在继续深入地去探索其对免疫的作用规律。

5、对内分泌的作用。研究表明河南巩县黄腐酸钠对药物引起的甲状腺机能亢进和甲状腺低下大鼠都具有保护和调节作用,可能是通过对细胞水平的环核苷酸的调节而达到对甲状腺激素功能调整。

6、对肿瘤的作用。腐植酸是否有抗肿瘤作用?各家的研究结果还有较大分歧。一致的观点都说明腐植酸不能直接杀死肿瘤细胞,亦就是说,不具有细胞毒作用,由于该药能调整机体部份免疫功能,可能成为一种免疫性抗肿瘤药物以辅助肿瘤的综合治疗。

二、腐植酸临床应用概况

1、抗炎止血作用的临床应用。很多临床上的炎症性疾病,往往伴有渗出和因溃烂而引起出血,选用腐植酸治疗十分对路。浙江绍兴地区医院眼科用黄腐酸钠滴眼合并肌肉注射,对53例角膜溃疡有效率达94.2%;47例眼部出血,有效率为93.6%。上述100例眼病的疗效,体现黄腐酸消炎、止血和促进溃疡愈合的综合作用。北京海淀医院用黄腐酸钠保留灌肠,治疗慢性溃疡性结肠炎和慢性结肠炎95例,30次后复查纤维结肠镜,有效率为92.6%,北京同仁医院内科用黄腐酸钠口服加肌肉注射,治疗急性上消化道出血160例,止血有效率为95.6%。该院还用总腐酸钠浴疗,治疗溃疡病51例,有效率92.2%,海淀医院用总腐酸浴疗类风湿性关节炎,有效率为92%(海淀医院另文报告)。北京二龙路医院及云南昆明用总腐酸治疗痔疮数千例,效果显著,已成为临床常规用药。

2、对食道癌前病变及妇女外阴营养不良病变,也取得突出效果。薛宏基等用腐植酸水剂治疗27例食管癌前病变为期两年,无1例癌变而同种病人未经治疗的自然癌变率为26.6%。同仁医院姚德馨教授用腐植酸治疗

引文外阴营养不良病变已达1800多例，对这种中西医都感到十分棘手的疾病，有效率可达96.0%。

3、对甲状腺疾病的治疗，同仁医院用腐植酸治疗甲状腺机能亢进33例，6个月后近期疗效为90.9%，又和昌平防疫站地方病科合作，治疗三批先天性地方性神经型克汀病，每批疗程1年，使这些严重聋、哑、痴呆及痉挛的病人，有1/3患者病情缓和而能达到生活自理和承担部分劳动，以减轻家庭和社会负担。

总之，由于我国发挥了临床应用与基础研究紧密结合的优势，在有关领导部门的支持下，充分调动了从事腐植酸研究工作者的积极性，大家克服许多难以设想的困难，终于使腐植酸在医药方面的研究水平，在某些方面处于国际领先地位。在新加坡出版的《中药研究近代进展》和西德出版的《腐植酸》

专著中，都记载了我同学者研究成果，国外有些学者来信询问如何能得到这类药物。

为使腐植酸在医药方面的研究得到进一步发展今后仍应在改革，开放的前提下，加强横向联系，应继续做好如下几方面的工作：

(1) 药、医和化学部门继续合作，确保腐植酸类药品的质量控制标准以保证临床用药的安全有效，随时警惕假冒伪劣药品，败坏我们的名声。

(2) 在有关部门的支持下，有步骤地推广现有临床应用的成果，以造福于更多病人。

(3) 抓住几个有意义课题，组织多学科继续深入研究，以扩大成果的深度和广度。

(4) 坚持实事求是以点带面的科学态度，随时吸取国外研究中的先进经验，以丰富我们的思维和扩大视野，使我国的腐植酸医药研究工作扎扎实实地向前发展。

(来源：腐植酸，1988，4：6-8)

新疆黄腐酸钠镇痛作用的研究

姚发业

王寿桐

贺苏红

米克热木

余佳琳

程向阳

吕巡贤

(新疆八一农学院)

腐植酸系自风化煤褐煤或草炭中提炼出的一种高分子有机弱酸,为各种不同分子量的缩聚物,结构复杂迄今尚未研究清楚,由于其来源不同及提取方法的不同,因此各地腐植酸所含的成分亦不尽相同。例如北京同仁医院用河南巩县的黄腐酸钠有改善微循环的作用,而湛江产黄腐酸钠则无此作用^{1,2}、中药乌金散的有效成份为黄腐酸钠^{1,3}、《本草纲目》中亦有记载:乌金石主治“妇女气血痛及金疮出血”。乌金石在我国用于临床已有数百年的历史,然而直到五十年代才开始使用实验手段对腐植酸进行研究,尤其近廿年来腐植酸在临床应用上取得了良好的效果。近来国际上多次召开腐植酸研究学术会议,国外研究的重点⁴是腐植酸的成份,活性抑菌抗病毒抗肿瘤及药代动力学。国内在七十年代偏重临床应用的研究,自1982年全国第二次腐植酸学术讨论会以来,已将研究重点逐渐转移到理论研究方面,国内黄腐酸钠的研究主要在止血、消炎、抗肿瘤、镇咳平喘及急慢性中毒等方面报导较多,但在国内外尚未见到黄腐酸钠镇痛作用研究的报导,我们用新疆吐鲁番的黄腐酸钠做镇痛试验取得满意效果,无疑地将对黄腐酸钠在临床应用提供科学数据,对发展新疆的医药事业提供依据。

一、材料与方法

药品来源:本实验所用黄腐酸钠系吐鲁

收稿日期:1988年5月3日

番地区鄯善化工厂1983年10月提供的样品,纯度为98.48%,用灭菌生理盐水分别稀释为1%及1.5%、0.2%,盐酸吗啡注射剂为东北制药总厂的产品。

方法:镇痛作用采用小鼠醋酸扭体抑制试验法:

表一 黄腐酸钠对小鼠的镇痛试验

组别 序号	生理盐水组 A ₁	1%黄腐酸钠组 A ₂	1.5%黄腐酸钠组 A ₃	0.2%盐酸吗啡组 A ₄
1	154	49	0	0
2	128	28	0	0
3	84	47	0	0
4	124	12	0	0
5	80	9	12	0
6	142	12	5	0
7	122	1	0	0
8	70	7	0	0
9	157	1	0	0
10	82	10	0	0
Σ	1143	176	17	0
$\bar{X}$	114.3	17.6	1.7	0

1、取成年小鼠40只,随机分为四组,每组10只,雌雄各半。第一组为空白对照组,肌肉注射灭菌生理盐水0.1毫升/10克体重,第2—3组为实验组,分别肌肉注射1%及1.5%黄腐酸钠溶液0.1毫升/10克体重,第四组为标准对照组肌肉注射0.2%盐

酸吗啡0.1毫升/10克体重。

2、30分钟后各组分别腹腔注射0.7%冰醋酸溶液(用灭菌生理盐水稀释)0.1毫升/10克体重,注射后观察因腹痛而引起的扭体反应(腹部贴地收缩、伸展、臀部歪扭)连续观察40分钟,统计扭体次数,与空白及标准对照组比较。

表二 方差分析

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P(显著性)
组间	89149.0	3	29716.333	85.143	<0.01
组内	12564.636	36	349.0166		
总和	101713.639	39			

$$F_{0.05}(3,36) = 2.86$$

$$F_{0.01}(3,36) = 4.38$$

各组之间的差异极为显著 $P < 0.01$

表三 多重比较

处 理	$\bar{X}_i$	$\bar{X}_i - 0$	$\bar{X}_i - 1.7$	$\bar{X}_i - 17.6$
A ₁ 生理盐水组	114.3	114.3**	112.6**	96.7**
A ₂ 1%黄腐酸钠组	17.6	17.6	15.9	
A ₃ 1.5%黄腐酸钠组	1.7	1.7		
A ₄ 0.2%盐酸吗啡组	0			

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{Mse}{P}} = \sqrt{\frac{349.0166}{10}} = 5.9078$$

表四 新复极差法

SSR法	2	3	4
SSR _{0.05} (kdf)	2.89	3.04	3.14
SSR _{0.01} (kdf)	3.89	4.06	4.17
LSR _{0.05}	17.033	17.96	18.49
LSR _{0.01}	22.9813	23.986	24.63

二、结 果

检验结果表明:

生理盐水组与0.2%盐酸吗啡组;生理盐水组与1%黄腐酸钠组;生理盐水组与1.5%黄腐酸钠组差异极为显著。

黄腐酸钠各组与0.2%盐酸吗啡标准对照组及黄腐酸钠各组之间差异均不显著。

根据实践结果用单因素方差分析表明,1%、及1.5%的黄腐酸钠溶液均有明显的镇痛作用,镇痛效果十分明显,治疗组的P值均小于0.01差异极为显著。

用多重比较法及新复极差法分析表明:生理盐水空白对照与黄腐酸钠各实验组及0.2%盐酸吗啡标准对照组的差异极为显著,镇痛作用十分明显,而黄腐酸钠各种实验组与0.2%盐酸吗啡标准对照组之间均无明显差异。

根据实验结果表明:1%、1.5%黄腐酸钠均有镇痛作用,其镇痛作用的强弱与药物溶度成正相关。1.5%黄腐酸钠的镇痛作用与0.2%盐酸吗啡相似,镇痛效果良好。新疆腐植酸资源丰富,黄腐酸钠的提炼方法比较简便,价格低廉,毒性极小^[5],而且目前尚未发现有成瘾性,因此建议考虑用于临床并应继续研究黄腐酸钠的镇痛机理。

(上接第32页)

参考文献

1.中国科学院化学所:腐植酸技术资料汇编 1977年

2.袁申元等:全国第三次腐植酸学术讨论会文集 1984年P255

3.北京同仁医院腐植酸研究室:北医学报 1980年2: P61

4.朱之培:《江西腐植酸》 1984年3: P1—3

5.山西医学院 职业病教研室毒理组:《山西腐植酸》1982年 4: P10—12

(来源:腐植酸, 1988, 4: 31-32+20)

黄腐植酸钠的抗凝作用

浙江医科大学药物研究室 顾刚果 耿宝琴 雍定国

腐植酸是由植物残体经一系列分解而形成的一类复杂的有机高分子弱酸。根据溶解性质和颜色的不同分为三种：黑腐植酸、棕腐植酸和黄腐植酸，总称为总腐植酸。

腐植酸具有广泛的药理作用和临床应用价值^[1-3]。本实验应用绍兴市工业研究院从绍兴市上虞小越泥煤经碱提酸析提取的黄腐植酸钠水溶液，观察其抗凝血作用。

材料与方法

1. 玻片法 取体重18~22克小鼠22只，分为对照组和给药组，每组11只。给药组小鼠腹腔注射2%黄腐植酸钠0.3ml/10g，对照组腹腔注射同容积的生理盐水。半小时后各鼠断头取血，将血滴于玻片上，2分钟后每隔半分钟用针挑动血液一次，直至出现纤维蛋白为止。记录自血液流出至出现纤维蛋白丝的时间。大于30分钟则记为30分钟。

2. 试管法 取体重为18~20克小鼠。分腹腔给药和灌胃给药二组。腹腔注射组则以2%黄腐植酸钠0.3ml/10g腹腔注射。灌胃给药组以2%黄腐植酸钠0.3ml/10g灌胃。二组均设对照组以同容积生理盐水腹腔注射或灌胃。给药后半小时断头取血，将血滴于10毫米口径的试管内。2分钟后每隔半分钟倾倒试管一次，直到血液液面不动为止。记录各管的凝血时间，超过30分钟则按30分钟计算。

结 果

实验结果表明2%黄腐植酸钠给小鼠腹腔注射0.3ml/10g，玻片法和试管法的凝血时间均较对照组明显延长(见表1与2)。2%黄腐植酸钠0.3ml/10g小鼠灌胃给药，试管法凝血时间亦明显延长(见表2)。

表1 黄腐植酸钠对小鼠体内凝血时间的影响(玻片法)

	动物数	剂量、给药途径	凝血时间(秒) ($\bar{x} \pm SD$)	P 值
对照组(NS)	10	腹腔注射	264 $\pm$ 166	
给药组	10	0.3ml/10g腹腔注射	1187 $\pm$ 708	<0.01

表2 黄腐植酸钠对小鼠体内凝血时间的影响(试管法)

	动物数	剂量、给药途径	凝血时间(秒) ($\bar{x} \pm SD$)	P 值
对照组(NS)	9	腹腔注射	188.3 $\pm$ 39.2	
给药组	9	0.3ml/10g腹腔注射	1618.0 $\pm$ 54.3	<0.01
对照组(NS)	10	灌胃给药	227.0 $\pm$ 45.5	
给药组	10	0.3ml/10g灌胃给药	957.0 $\pm$ 384.0	<0.01

(上接第8页)

3. 讨 论

目前,国内外对腐植酸钠作了不少研究工作,认为腐植酸钠具有消炎、抑菌、抗病毒、抗肿瘤及抗溃疡病等作用^[1,2]。本实验表明黄腐植酸钠对小鼠无论是腹腔注射还是灌胃给药均使小鼠凝血时间显著延长($P < 0.01$),具有明显的抗凝作用。这一实验结果与李生琪^[3]等报道腐植酸钠对体外血栓形成有明显的抑止作用相一致。另据报道腐植酸钠还具有使血浆纤维蛋白元减少、血浆粘度下降、甲皱微循环加快的作用^[2,3]。黄腐植酸钠这一“活血化瘀”作用有待于临床验证。

近年来国内对于黄腐植酸钠研究认为黄腐植酸钠能缩短出、凝血时间,具有止血作用^[4,6]。我们的结果与之相反。这可能由于腐植酸钠是一混合物含有促凝血和抗凝血二种成份。腐植酸产地不同,提取的方法各异使得到的促凝血、抗凝血成份多少有关。

参 考 文 献

- [1] 秦万德, 江西腐植酸1982, (1):9。
- [2] 薛宏基, 江西腐植酸1982, (1):1。
- [3] 李生琪, 西医药杂志1987, (1):20。
- [4] 袁申元, 药学通报1982, (11):41。
- [5] 袁申元, 北京第二医学院学报1981, (1):57。
- [6] 刘耀辉, 药学通报1980, 15(9):1。

(来源:现代应用药学, 1988, 4: 8+41)

腐植酸水浴治疗类风湿性关节炎 疗效的初步观察

孟 秉 正

(天津塘沽盐场医院康复科)

类风湿性关节炎是一常见病多发病并常给病人带来周身不适关节疼痛肿胀,往往导致关节畸型、致残,但疗效各异,至今尚无特效疗法。

腐植酸的作用有抗炎、止血、抗肿瘤、调节免疫功能抗病毒等作用。

我院于1986年应用腐植酸水浴治疗类风湿性关节炎效果较好,现将治疗结果报道如下:

临床资料

(一)一般资料

例数	性 别		病 程 (年)		
	男	女	1~5	6~10	10年以上
31	5	26	18	11	2

31例均系住院患者,主要来自机关、工厂、学校,年龄最小者14岁,最大者66岁,以50岁以下发病者占77.42%,病程最短者6~8个月,最长者17年。

(二)诊断标准均参照美国风湿病学会ARA的1964年修订的诊断标准,本组住院患者均为符合其中五项者确立诊断的。

(三)浴疗方法

盆浴,以80克腐植酸粉置入100升温水中,使水温维持在38°C~40°C之间,全身浸泡20分钟,每天一次,30次为一疗程。

1.观察项目:

晨僵,关节疼痛,关节肿胀,血沉、抗链球菌“O”溶血素试验,类风湿因子。

2.疗效标准

(1)显效:发热及全身症状消失,关节肿胀消失,关节功能位活动恢复,各项化验基本正常,能恢复原职工作。

(2)有效:发热消失全身症状明显好转,关节红肿热疼症状基本消失,关节功能活动基本恢复,能恢复工作。

(3)好转:全身症状均有不同程度的改善。

(4)无效:风湿活动未得到控制,关节疼痛肿胀均无改善者。

(四)疗效观察

临床症状与体征水浴治疗前后对比

项 目	例数	病变人数	
		浴 前	浴 后
关节疼痛	31	31	4
关节肿胀	31	21	0
晨 僵	31	17	3

例	显 效	有 效	好 转	无 效
31	23	4	4	0

对31例患者采用此疗法后总有效率100%。显效74.2%,有效12.9%,好转12.9%。病1~5年的患者18例全部显效。

实验室检查

31例患者血沉均快,最高者为112mm/h(魏氏法),经腐植酸水浴治疗后血沉全部

下降, 18例恢复正常。抗链球菌“O”溶血素试验(免疫胶乳法), 经治疗由强阳性转阳性者8例, 阳性转阴性者6例。类风湿因子(免疫胶乳法试验), 治疗后有4例转阴。

典型病例一

徐×、女、35岁、天车工人, 住院号6121。于1986年8月11日入院, 因全身关节疼痛六年之久, 以肩腕指膝关节疼痛肿胀较重, 不能坚持高空作业, 虽经多方求医治疗但效果不明显。

实验室检查

血沉100mm/h, 抗链球菌“O”溶血素试验阴性, 类风湿因子, 阳性。

经腐植酸水浴治疗135天, 全身症状消失, 关节疼痛肿胀消失, 关节功能恢复, 未发现新病变, 恢复了原职工作。

实验室复查

血沉30mm/h, 抗链球菌“O”溶血素试验阴性, 类风湿因子, 阳性。

随访14个月身体一直健康自我感觉良好, 未用任何药物仍工作在高空作业线上。

典型病例二

马×, 女, 35岁, 打字员, 住院号6158。于1986年9月8日入院, 因全身关节疼痛一年半, 以腕指关节疼痛肿胀不能活动不能握拳, 发展至两踝关节疼痛肿胀造成两足不能平行落地, 似初缠足时行走那样困难, 因而不能坚持正常工作, 虽经多方求医治疗但疗效不明显。

实验室检查

血沉82mm/h, 抗链球菌“O”溶血素

试验强阳性, 类风湿因子, 阳性。

经腐植酸水浴治疗82天, 全身症状消失, 关节疼痛肿胀消失, 两手功能恢复, 能正常编织毛衣, 两踝关节疼痛肿胀消失, 踝足活动自如, 在联欢活动时患者难以抑制激动的心情, 高兴的手舞足蹈, 即兴表演了迪斯科舞片段, 恢复了原职工作。

实验室复查

血沉25mm/h, 抗链球菌“O”溶血素试验阳性, 类风湿因子, 阴性。

随访16个月身体健康自我感觉良好仍在原岗位上工作。

体会

病程与疗效的关系: 病程越短疗效越好, 因此应提倡早期诊断早期治疗。

本方法操作简单疗效明显, 值得推广。

类风湿性关节炎是一种难以治愈的慢性病, 给劳动者带来很大的痛苦, 此症比较复杂, 目前对于类风湿性关节炎的发病原因至今尚未完全明了, 以往认为有感染内分泌障碍和血管舒缩障碍等学说, 但均无肯定结论。近年来由于免疫学的进展对本疾病有了更进一步认识, 但是类风湿性关节炎的真正病因目前尚无定论。

因此我们采用了腐植酸水浴治疗方法, 凡进行水浴治疗者均停用有关口服药物, 经31例临床观察我们认为经腐植酸水浴后能缓解肌肉的痉挛, 改善周围血管神经的牵拉刺激, 松懈压迫消除炎症又疏通了经络气血, 并能使病变部位发生营养变动, 从而达到了“通则不痛”之目的, 使各种症状得到改善, 因而对机体起到了治疗作用。

本文承北京海淀医院苏秉文同志审阅, 特此致谢!

(来源: 腐植酸, 1989, 1: 16-17)

综述与评论

近年来国外泥炭腐植酸医学应用的进展

唐 国 藩

(浙江省人民医院眼科)

腐植酸是一类天然有机物,它是植物腐败分解后形成的产物,广泛存在于土壤或低级煤炭中,结构复杂,是一种无定形的高分子化合物。

根据文献记载,国外腐植酸作为医药应用的研究,是从五十年代开始,以后成立了专门研究机构。国际泥炭学会第6委员会就是国际泥炭腐植酸医学应用研究的专门委员会。我国煤炭资源丰富,煤的储量居世界第三位,泥炭储量居第四位,是开展泥炭腐植酸医药应用的良好条件。其次褐煤腐植酸,风化煤腐植酸资源也很丰富。主要问题是基础研究工作正在开始,不能适应当前形势需要,与国外比较,还有一定差距。为了广泛开展腐植酸医学应用的研究,尽快赶上和超过国际水平,为亿万人民健康服务。作者谨将近年来国外泥炭腐植酸医学应用的研究情况,加以简要地综合叙述,以供参考。至于国内有关腐植酸的医学应用及研究情况暂不论列。

一、腐植酸简介

国外应用的腐植酸大多是从泥炭中提取的,也有部分来自褐煤和其他腐生物,由于这些产物都是从自然资源中获得,因此国外很

重视研究腐植酸的自然成因过程,包括原始植物类型,植物的分解或腐植化的程度,以及是高位或低位沼泽等。同时也研究采用各种不同的提取、分离、纯化方法,进而研究其生理活性组分。研究结果表明,腐植酸为阴离子多电解质。Chesire氏等(1967年)认为腐植酸是一种芳香族类的复合物,系由多醣类、蛋白质、比较简单的酚和金属元素结合而成,其分子量界于 >1000 和 $100000\sim 200000$ 之间(Klocking氏¹ 1972, Rochus氏1975)。化学结构比较复杂,尚未完全清楚。由于煤的产地不同,所提制的腐植酸的化学结构式也不尽相同。目前已知,腐植酸分子含有苯环,稠苯环和各种杂环,各苯环之间有桥键相连。苯环上有各种功能基团,主要是羧基、酚羧基、甲氧基、醚基等。由于羧基及酚羧基腐植酸呈弱酸性,可与碱成盐,并有离子交换能力,整合能力和缓冲能力。又因腐植酸呈微细的球形颗粒,有很大的空隙和内表面,故有较强的吸附力。Solovyeva氏²等(1981)证明,泥炭中含有各种不同的活性有机化合物,如维生素、类脂醇,抗菌素及矿物质等。

二、腐植酸的药理作用

(1) 抗病毒作用：腐植酸的抗病毒作用，首先是东德Klocking¹氏于1972年在一种哥萨克病毒/FL—细胞系统的实验时证实。目前已知，属于人类敏感的病毒，为人单纯疱疹病毒I型及II型，哥萨克病毒Ag型，流感病毒A及鼻病毒1B型。并且已经证实，一些病毒酶如Retroviren(一种RNA所依赖的DNA多聚酶)对腐植酸很敏感。并且已经发现，对单疱病毒特别有良好的作用是因为咖啡酸、龙胆酸、绿原酸及焦性没食子酸等聚合物的氧化产物。同时还证明300微克/毫升的腐植酸能抑制对人体胚胎成纤维细胞起破坏作用的单纯疱疹病毒I型的扩散，能完全抑制病毒对宿主细胞的吸附，并能部分地抑制其渗入和病毒的合成。他们用兔角膜使感染单疱病毒I型，然后用腐植酸铵治疗，证明在体内也有抗病毒作用。

(2) 消炎作用：东德Brong氏¹¹等(1981)研究证明，腐植酸在兔肾皮质均等质内能抑制前列腺素E合成，其作用超过乙酰柳酸；由于前列腺素是炎症及疼痛过程中的媒介物，因此证明腐植酸有止痛和消炎作用。东德M·kunert氏(1981)⁹报告，由于腐植酸的吸附作用及离子交换作用，因此在生活机体中具有消炎及收敛作用，并有毒性抑制作用。苏联Belkevitch氏等⁹(1981)报告，在泥炭蜡的树脂部分的乙烷浸出液中，具有苜蓿青霉素(Ostrogen)化合物；苯酚石炭酸以及15—17%植物脂醇(Phytosterine)，有消炎、抗过敏及止痒作用。Tangner氏⁷用大鼠作染料皮丘法渗出试验，证明腐植酸不但能抑制外源性透明质酸酶引起的炎性渗出，而且能抑制内源性透明质酸酶的活性。因为透明质酸是动物细胞间质的主要成分，起“粘合剂”的作用，透明质酸酶可水解透明质酸，使细胞间质粘度下降，通透性增加。一些细菌、癌细

胞都含有较多透明质酸酶，因而易于在体内扩散，因此腐植酸的消炎作用与抑制透明质酸酶活性有关。

(3) 抗菌作用：西德Ansorg氏等⁸(1978)从不同土壤用各种方法提制的天然腐植酸制剂和分别用氢醌(Hydroquinone)及焦性儿茶素(Pyrocatechin)氧化合成得到的人工腐植酸用微量系列稀释法技术，进行了对人有代表性的致病菌的生长抑制实验。结果表明，81种天然腐植酸中有57种和2种合成腐植酸显有不同光谱的抗菌作用。当浓度范围为<2500微克/毫升时，可抑制表皮葡萄球菌，金黄色葡萄球菌，酿脓链球菌、鼠伤寒杆菌、变形杆菌，Ent, Cloacae，绿脓杆菌及白色念珠菌等。但对粪链球菌及结肠阿米巴无抑制作用。天然腐植酸对试验细菌的敏感性，大部分为2500—1250微克/毫升，一部分为625—312微克/毫升，抗菌敏感性的不同与不同的材料来源和提取方式有关。

(4) 抗癌作用：苏联Belkevitch氏等⁹(1981)通过动物实验证明腐植酸对Ehrlich癌瘤，肉瘤S₃₇、S₄₅、S₁₈₀以及肺癌等都有效果，并且认为这是一种高效的抗肿瘤剂。特别值得注意的是在家鼠中可抑制那些不能治疗的肿瘤生长，如硬性Ehrlich癌肿，肉瘤180及肺癌。日本H·Takag氏等，用洗净的泥炭500克加8%氢氧化钠500毫升搅拌抽提，然后过滤，再抽提，最后用盐酸调整pH值到2，上清液用水透析48小时，再经过一系列柱层析，可得到7.1克纯白色粉末。经鉴定为高浓度的多醣物质。用此种制剂给患有肉瘤180的小鼠，每天由腹腔注射达一个月。日剂量分别为50毫克/公斤体重和100毫克/公斤体重。肿瘤的抑制率分别为80%和90%。

(5) 重金属解毒作用：西德Rochus⁹¹

氏从一个铅矿工人患铅中毒,后来应用腐植酸解毒而得到启发。从事腐植酸对铅、镉的解毒实验研究,已获得肯定结果。F. Ridwan (1978) 用大鼠做实验,发现腐植酸能吸附大量的铅和镉,并不为肠胃道所吸收,因而认为利用腐植酸的这种螯合能力可考虑作为重金属解毒剂。东德 M. Kuhnert 氏在和我们讨论中谈到,腐植酸本身毒副作用很小,可以利用其络合作用进行解毒。他还透露,腐植酸与其他解毒剂不同。其他解毒剂一旦毒物与解毒剂分离,毒物仍具有毒性,而腐植酸与毒物结合后,可以改变毒物的结构。即使分离,毒物也不再具有毒性。因而他认为这可能在将来防止化学武器中有重要意义。

美国加利福尼亚大学 Milanovich 氏等 (1975) 用腐植酸物质进行对铜 (Cu^{++}) 解毒作用研究。在大肠杆菌 E. Coli 1485 培养系统中,加入硫酸铜达 $6 \times 10^{-6} \text{M}$ 的中毒浓度,然后分别加入解毒剂柠檬酸钠, EDTA 和腐植酸,通过测定 E. Coli 的倍增时间确定其解毒效果。结果是 EDTA > 腐植酸 > 柠檬酸钠,因而认为可作为微生物生长对于金属离子解毒的调节剂。

(6) 提高免疫功能: 苏联 Solovyeva^[2] 氏等实验证明腐植酸类物质具有抗皮炎素 (Pyridoxinen) 成分。具有保护机体功能的作用,并有酶及免疫再生活性。可使白细胞的吞噬功能增加。

我国学者近年来在免疫功能方面的研究做了大量工作。已证明腐植酸在细胞免疫方面可使淋转率升高,有类似植物血凝素 (PHA) 的作用。体疫免疫方面发现腐植酸是象泰洛伦一样的免疫增加剂,国内已有报导,情况不详述。

(7) 影响酶的作用: 腐植酸能增加 ATP 酶 (82—84%), 使细胞中已糖激酶活性上升,加强体内凝血酶元的活性,催化生成凝血酶,增强胃肠内消化酶的活力,激

活碱性磷酸酶,抑制酸性磷酸酶。

(8) 影响内分泌: 腐植酸能活化垂体——肾上腺皮质功能,促进分泌 ACTH。增加雌激素分泌,刺激甲状腺的平衡调节作用。

(9) 代谢及吸收排泄过程: 东德 J. Koch 氏等^[10] 通过腐植酸类类似物放射性标记 ^{14}C 咖啡酸 (^{14}C —Kop) 进行腐植酸在体内代谢的研究。用 AB/Jena 白鼠在静脉内,腹腔内、肌肉内及经过口服,来查明其器官分布情况。 ^{14}C 咖啡酸的测定是在抽出血液中和组织检查中用液体闪烁测定法来查明。结果表明: 静脉注射后二小时血液中含有 ^{14}C 咖啡酸活性还有 8%, 在腹腔和肌肉注射后相同的时间内发现还有 20% 或者说血液内 2% 的剂量。从肠内给予的 ^{14}C 咖啡酸则没有再吸收。器官分布情况,在静脉给予后 24 小时,在肝、脾、淋巴结及肾脏内都显示有最高的特殊活性。在小肠、骨髓及肺也有分布;在心脏、骨骼肌组织内则量很少,而在脑内则证实几乎没有 ^{14}C 咖啡酸活性。

西德 W. Rochus 氏^[9] (1981) 用放射同位素 ^{110}Pb 及 ^{115}Pb 的醋酸盐作成腐植酸络合物。研究腐植酸在鼠的机体中的吸收、分布和排泄情况,结果表明,大部分比较快地经过粪便,一小部分则经尿继续排泄。

Visser 氏^[11] 动物实验让鼠口服含 C^{14} 标记的腐植酸的水。三天后,放射性分布情况如下: 粪便 62%, 尿 14%, 呼出 CO_2 11%, 肺 5%, 心脏 1%, 肾 1%。说明腐植酸口服后部分被胃肠道吸收,吸收后主要分布在消化道,肝和肺。对大鼠腹腔注射腐植酸 (C^{14}) 15 分钟后,血中即有 50% 腐植酸。4 小时后,大部分腐植酸 (65%) 被氧化分解成 CO_2 排出,约 20% 从胆管排入肠道,此时血中只有 1.4%, 肝为 2.8%, 尿中排出 4.6%。这说明腐植酸吸收后,在体内分解代 是很 的

(10) 腐植酸的毒性及副作用：国外国内试验都证明腐植酸的毒性很小。口服毒性试验，在可能的浓度及允许灌胃体积范围内，看不到中毒死亡现象。故国内外均以腹腔或静脉给药方式做毒性试验。小鼠静脉注射半致死量：国外试验为111—212毫克/公斤体重；国内为147—300毫克/公斤体重。但因资源与提取制备的方法不同，制剂的毒性也不相同。毒性试验数据表明，毒性大小与给药途径也有关，腹腔给药的毒性小于静脉给药，而口服又小于腹腔给药。并有报告强调，要减少腐植酸制剂毒性的前提，是将粗制品完全提纯，尽量除去其含有的某些有害部分，如重金属等，以保证用药安全。

腐植酸可能的副作用是使肝组织内脂肪物质增加33%，造成脂肪肝。也可促进脂肪沉积加快体胖，引起肥胖病。

四、国外腐植酸药用概况

现择主要的简述如下：

1. FiBS (菲伯斯) Torfot (托福特) (泥炭制品)²¹：苏联眼病及组织疗法研究所²²从泥炭中提取纯制的眼药水名叫FiBS，制成的眼膏名叫Tosfot，已投入市场，供临床应用，对治疗急性结膜炎和几种类型的角膜溃疡，疱疹性角膜炎等有良好效果。并在会议上宣称（注一），这已成为他们的专利品。

2. 腐植酸复合物²³：苏联报告，内含生理活性物质对生长和细胞繁殖有良好效果，可加速再生过程，对五羧色胺 (Serotonin) 引起的胃溃疡以及因苯基胍 (Phenylhydrazin) 损害引起的中毒性贫血等典型病例都有治疗和预防效果。

3. 乙烷浸出液提取的腐植酸制剂：苏联 Belkevitch 氏等²⁴报告由泥炭中用乙烷浸出液提制的一种药剂。有消炎，抗过敏及止痒作用，因而可用以治疗炎症性皮肤病，

也可作为治疗和预防性药物，用于因各种刺激引起的皮肤病及细菌性皮肤病。

4. 腐植酸胶溶液 Humisol¹¹⁰，具有消炎作用，并有生物原刺激素特性，无毒性。用法，每次1毫升，1天1—2毫升，肌肉注射，1周5—6毫升，总共10—30针为一疗程。适应症为：畸形性骨关节病、类风湿性关节炎、风湿性多发性关节炎、因植物神经性血管性营养不良所致的关节神经痛，支持组织及运动器外伤后情况，腰与髓的脊髓神经根炎及其他慢性炎症。在苏联广泛用以治疗慢性关节疾病。V. Sui 氏¹²报告应用此药治疗原发性畸形性骨关节病130例，其中并发继发滑膜炎67例，无此征象者63例。治疗结果：130例中38例显效，75例有效，17例无效。

5. 腐植酸铵¹¹³：东德报导了应用1%腐植酸铵治疗111例局部因单纯疱疹病毒感染疾病的疗效（其中包括口唇、面部和皮肤各种疱疹）。治疗结果，83例显效，18例有效，10例无效。因此，他们目前已将腐植酸配伍于化妆品中，作为预防保健药品，如腐植酸口红等。

6. Kalumin^{114, 115}：东德从褐煤中提取制成的腐植酸复合物。内含60%腐植酸，已通过鉴定，投入市场，为兽医用药。对治疗和预防兽类的 Metaphylaxe 等疾病有效。对治疗小牛及小猪的非特异性肠炎等疾病具有良好效果。此外尚有一种腐植酸制剂名 Sulumin¹¹⁶，功效及用途和 Kalmin 类似。

7. Salhumin 凝胶¹¹⁶，是西德制成的局部治疗剂。配方是腐植酸0.8克，水杨酸0.2克，水杨酸乙二醇单脂5.0克，烟酸苯脂1.0克，樟脑0.5克加凝胶基质至100克。有消肿、消炎和镇痛作用。用于风湿病，腰痛、神经痛、外伤、扭伤、静脉炎、骨软骨症、H—W 麻痹症及一些肌肉、韧带、关节和脊椎损害，效果良好，尤其是消除局部水肿和血肿很快。

8. 泥炭腐植酸组分制剂：波兰 W. Adamczak 氏把对动物有抑瘤作用的泥炭腐植酸组分应用于人体肿瘤。报告 13 例，包括 2 例直肠癌，贲门癌，恶性黑色素瘤和乳房癌，胃壁平滑肌肉瘤小脑桥脑角上神经纤维瘤，背部 Boreni 癌，卵巢囊性癌等各 1 例，都是中晚期病人，治疗结果，10 例取得满意疗效，3 例不满意。大部分患者治疗后疼痛减轻，一些患者的肿瘤缩小或完全消退，病人自觉症状明显改善。对于一些不能外科切除全部淋巴结转移灶的肿瘤病例，经治疗后，发现原发组织的肿瘤不再生长，相反逐渐缩小，病理组织呈现退行性变，病灶为结缔组织所包围。

9. 沼泽糊膏 (Moorpaste)：波兰 J. Timmler 氏^[15]用高沼泽地泥炭用一种胶体磨机加以粉碎，作成胶体的均匀的沼泽糊膏。治疗脊椎关节炎畸形，用法系在皮肤上涂布一层厚 3—5 毫米，温度 38°C。治疗终末后 2 小时，测量皮肤温度，在治疗中间和终末时进行血液检查。作者报告男性 23 例，女性 20 例，年龄均 40 岁左右，分成两组，另一组以沼泽糊浴或包裹作对照。治疗结果：①血清的蛋白含量明显的位移向最高蛋白含量范围。②糖蛋白质的含量提高，治疗休息两小时后，沼泽糊 (Moorhrei) 组皮肤温度升高 0.14—1.75°C，沼泽糊膏组皮肤温度升高 0.14—2.10°C，表明沼泽糊膏具有较好的离子交换及吸着能力。Walther^[17]氏 (1981) 报告应用沼泽糊膏治疗类风湿性关节炎患者 40 例，效果满意。

10. 泥浆疗法：苏联 B. Veinpalu 氏^[18]报告泥浆治疗在类风湿性关节炎综合治疗中的价值。收集了 1000 多例类风湿性关节炎患者在 15 年过程中的研究资料，结果证明，治疗泥浆疗法可使毛细血管的管径恢复正常，减少结缔组织的反应强度，刺激吞噬细胞，改变抗体的合成过程等，并认为对类风湿性关

节炎的神经内分泌性紊乱及免疫等过程异常具有恢复效果。

11. 泥炭浴：国外泥炭浴已有一百多年历史，目前在许多国家已把它作为一种治疗手段。仅东德一个国家泥炭浴点就有 81 个，遍布在所有的疗养地，每年接待十万人左右进行治疗，疗养者在疗养期间，用泥炭浴治疗一些慢性病，如风湿性或类风湿性关节炎、膝关节炎、关节强硬性脊椎炎，甚至一些心血管疾病均有一定疗效。作者在参观东德巴特埃尔斯特新国家疗养院时，亲眼看到一些患者进行浴疗的情况，泥炭浴大致有三种形式，一种是配制一定浓度泥炭液进行浴疗；一种是将泥炭糊剂局部涂布；一种是将泥炭包裹在一个布袋中加温到较高的温度（有时可达 90°C）热敷在病灶处。同时还看到各种浴疗设备，可以自动加热，并有微电极促进渗透等。除泥疗外，还有其他浴疗方式，如热蒸气浴疗，矿泉水浴疗，氡—CO₂ 水浴疗以及健身操锻炼等。据他们介绍，有些较顽固难治的慢性病，通过泥炭浴疗也不同程度地得到缓解。除东德外，西德、捷克、匈牙利、波兰、苏联等国也都有关于泥炭浴治疗的报告，其中有些是关于泥炭抗菌、消毒作用的研究，有些是关于泥炭浴治疗类风湿性关节炎、关节炎^[19]以及各种运动性障碍等疾病^[20]。对今后在我国开展泥炭浴很有参考价值。

注 1. 会议上宣称：指 1981 年 9 月 23 日在东德召开的“国际泥炭腐植酸医学应用会议”。当时芬兰代表就 FiBS 及 Torfot 二种药品所含腐植酸浓度及配制方法，请求回答，苏联代表则宣称是他们的专利品，避而不答。

参考文献 (略)

(来源：腐植酸，1989，1：3-7)

内蒙武川风化煤腐植酸钠对大鼠胃酸及肝胆汁分泌的影响

高桂英 厚华刚 张宏宇

(包头医学院生理教研室)

朱洪奎

王忠信

(解放军291医院)

(内蒙古石油化工研究所)

腐植酸能促进胃、十二指肠溃疡的愈合动物实验及临床观察均有报导^[1、2、3]。但是,疗效产生的机理尚难定论。而溃疡发病原因现在比较一致的看法是促使胃、肠粘膜发生溃疡的“攻击因子”与防止溃疡发生的“防御因子”之间平衡失调之故。而胃酸多和胆汁反流入胃都归“攻击因子”之例。关于腐植酸对胃酸分泌影响研究,北京医科大学王德民等报导,不同种类与地区的药液对胃酸都有抑制作用,但抑制程度不同^[4]。我室以前的工作观察过河南巩县与北京斋堂黄腐植酸对大鼠肝胆汁分泌有抑制作用^[5],未见他人报导。为探讨内蒙武川风化煤腐植酸钠促进胃、肠溃疡愈合的机理,本实验观察了它对大鼠胃酸及肝胆汁分泌的影响。

材料和方法

(一) 动物选择与药品

选用包头医学院动物室提供的,体重为180~220克的健康大鼠,雌雄各半,随机分配至各组。

药物由解放军291医院和内蒙石油化工研究所提供的内蒙武川风化煤腐植酸钠粉剂,我室根据291医院药剂室配制法制成pH=7.3的黄腐酸钠液。

(二) 实验方法

1. 对胃酸分泌的影响实验

实验前动物禁食24小时,自由饮用水和盐、糖水。手术在乙醚轻度麻醉下,根据Shay法^[6]行幽门结扎,在缝合腹壁后2~3分钟动物即清醒。实验组腹腔注射黄腐酸钠50mg/kg,对照组,注射同剂量(ml)生理盐水。4小时后处死动物,收集胃液、测定胃液量及总酸度,以此计算总酸排出量。

胃液中总酸度是用1/40当量的氢氧化钠溶液以酚红作指示剂滴定,并以每升胃液所含盐酸的毫克当量(meq/l)表示。总酸排出量用总酸度乘以该时间内胃液的升数,以meq/4小时表示。

2. 对肝胆汁分泌的影响实验

用0.8g/kg乌拉坦液腹腔注射麻醉后大鼠于上腹部剪毛、消毒,正中切口约2~3厘米,在近肝部胆管处剪口插入直径为0.6~0.8mm硬塑料管引流出肝胆汁。随后计数1小时胆汁分泌的小滴数(48小滴=1ml)。在此基础上,将动物随机分为由股静脉分别注入10mg/kg和15mg/kg药液的两个剂量的实验组和同法注入等容量生理盐水的对照组。注射后2分钟再开始记数1小时内胆汁分泌的小滴数。

实验结果

(一) 腹腔注射内蒙黄腐酸钠液对大鼠胃酸分泌的影响

观察与记录结果该药对幽门结扎大鼠胃酸分泌有明显抑制作用, 见表1。

表1 腐植酸钠液对大鼠胃酸分泌的影响

	实验组 n=10	对照组 n=8	对比指标		实验组被抑制 百分数	P值
			对 照	实 验		
胃液分泌量 (ml/4小时) $\bar{X} \pm SE$	5.2 $\pm$ 0.03	2.4 $\pm$ 0.01	100	46	54	<0.01
总酸排出量(meq/4小时) $\bar{X} \pm SE$	0.39 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.02	100	43	57	<0.01

(二) 静脉注射内蒙黄腐酸钠液对大鼠肝胆汁分泌的影响

10mg/kg和15mg/kg后均对肝胆汁分泌有显著抑制作用, 见表2。

实验结果, 该药液给大鼠静脉注射

表2 腐植酸钠液对大鼠肝胆汁分泌的影响(小滴数/1小时) $\bar{X} \pm SE$

组 别	给药剂量 (mg/kg)	给药前分泌量	给药后分泌量	给药后被抑制 百分数	给药前后分泌量差	P 值
实验组 n=10	10	19.66 $\pm$ 2.59	15.22 $\pm$ 2.36	22.60%	4.55 $\pm$ 1.01	<0.01
	15	25.22 $\pm$ 4.71	19.11 $\pm$ 5.57	24.30%	6.11 $\pm$ 2.19	<0.01
对照组 n=10	同 容 量 生理盐水	18.17 $\pm$ 3.19	19.03 $\pm$ 3.73	-4.5%	-1 $\pm$ 1.16	>0.05

讨 论

(一) 通过表1实验结果证明内蒙武川风化煤提取的黄腐酸钠液有明显的抑制大鼠胃酸分泌的作用。这与王德民等报导的北京、吐鲁番和巩县不同产地与提取方法的六种腐植酸对大鼠胃酸的分泌都有抑制作用相一致。

通过表2实验结果表明内蒙武川风化煤黄腐酸钠液能抑制大鼠肝胆汁分泌, 而且与我们以前工作相比, 其抑制作用还强于北京斋堂黄腐植酸, 更强于河南巩县黄腐酸钠液。

综上所述, 内蒙黄腐植酸钠液既可抑制胃酸排出量又能抑制肝胆汁分泌, 这能明显的降低了胃、肠溃疡病发生的“攻击力”。因此, 为临床用于抗消化性溃疡提供了一定的实验参考依据。

(二) 在生理情况下, 胃酸与肝胆汁分泌

受神经和体液因素调节。目前公认的是, 迷走神经兴奋促进其分泌; 交感神经则抑制分泌。乙酰胆碱、胃泌素等体液性因素也有促进其分泌的作用^[7]。Brode^[8]曾指出, 结扎大鼠幽门所引起的胃酸持续性分泌是由于刺激了胃窦粘膜的压力感受器而引起的迷走神经反射的作用。王德民等实验认为腐植酸可能含有抗胆碱能成分, 但我们以抗胆碱药物阿托品与腐植酸同时给动物注入, 未见腐植酸作用减弱。按本实验方法, 说明它不能抑制迷走神经, 也不是乙酰胆碱的拮抗剂。实验结果与邢莲影等同志报导相一致^[9]。而用酚妥拉明同时注入有使腐植酸作用降低表现, 所以腐植酸抗胃腺壁细胞泌酸与肝细胞分泌胆汁的作用是否由于它提高交感神经的兴奋性, 相对的迷走神经活动有降低。另外, 也可以考虑它对分泌细胞的直接刺激作用或是它为体内促进胃酸及肝胆汁分泌的其它激素与化学物质的拮抗 (下转第13页)

(上接第15页)

剂,这有待进一步研究。

参考文献

1.王德民等:泥炭腐植酸对大鼠慢性实验性胃溃疡愈合的影响,北京医学院学报 1982; 14(2): 83

2.邢莲影等:腐植酸抗消化性溃疡作用的研究,1982年全国腐植酸医药应用科研协作会议资料汇编,北京医学院编印 1982; 47~48

3.易安民:腐植酸钠治疗消化性溃疡的疗效观察,《江西腐植酸》1984; 2: 49~51

4.王德民等:腐植酸对大鼠胃酸分泌及胃泌素释放的影响,生理科学1983; 3(1) 48

5.高桂英等:腐植酸对胆汁分泌的影响,包头医药 1984; 1: 34~36

6. Shay H, et al: Gastroenterology 5(1): 43, 1945

7.湖南医学院编生理学, 225~226页 人民卫生出版社, 1979

8. Brodie DA: Am J Dig Dis 11(1): 231, 1966

9.邢莲影等:康江腐植酸抗消化性溃疡作用机制初步探讨,《江西腐植酸》1985; 2: 28~31

(来源:腐植酸, 1989, 1: 14-16)

北京风化煤黄腐酸钠抗炎作用的研究 (II)

袁盛榕 杨东旭 罗慧英*

(首都医学院药理教研室)

摘要: 北京风化煤黄腐酸钠 (FA-Na) 增高大鼠血浆肾上腺皮质酮含量, 给药后 2 小时最为明显。并可显著减少炎症局部组织中前列腺素E的含量。其抗炎作用机制可能与激活垂体肾上腺系统及抑制炎症局部组织中PGE的合成或释放有关。

关键词: 黄腐酸钠 抗炎作用 肾上腺皮质酮 前列腺素

国内曾报道北京风化煤黄腐酸钠在抗炎作用的同时, 可明显降低正常大鼠肾上腺中维生素C的含量。间接证明了北京风化煤黄腐酸钠的抗炎作用与促进肾上腺皮质激素的合成有关。我们曾发现本品有明显抑制某些致炎介质所致的大鼠血管渗出、白细胞游走及肉芽组织增生等作用。在双侧摘除肾上腺后, 本药对角叉菜胶性足趾肿胀的抑制作用明显弱于正常大鼠^[1]。提示本品的抗炎作用与垂体肾上腺系统有关, 但不完全依赖之。又根据文献报道^[2]道角叉菜胶所致炎症模型可分为三个时相, 其中第1时相主要与释放组胺、5-HT有关, 第2时相与释放缓激肽有关, 第3时相为释放PGE所致, 此时炎症反应强烈, 持续时间也较长, 约为致炎后2.5~6小时。我们过去的实验发现, 北京风化煤黄腐酸钠给药后4~6小时^[1]时出现抗炎作用高峰期提示本药的抗炎作用机制可能与影响PGE的合成与释放有关。本文拟进一步分析其抗炎作用机制。

实验材料

药品 北京风化煤黄腐酸: 由北京第二制药厂提供, 批号820422-1。实验时配制成黄腐酸钠 (FA-Na) 水溶液 (pH=7.0); 角叉菜胶: 辽宁省药物所提供; 肾上腺皮质酮药箱: 上海内分泌研究所提供。军事医学科学院动物室提供Wistar种大鼠。

方法与结果

一、FA-Na对大鼠血浆肾上腺皮质酮含量的影响:

大鼠40只, 体重150~200克, 雌雄不限, 随机分为2组。分别肌内注射FA-Na (25 mg/kg) 或等容量生理盐水。于注药后1、2、4、6、8小时分别取4只鼠由股静脉取血, 用放射免疫测定法测定血浆中肾上腺皮质酮的含量^[3] (表1)。

表1 FA-Na对大鼠血浆肾上腺皮质酮含量 ($\mu\text{g}/100\text{ml } \bar{X} \pm \text{SD}$) 的影响

给药后时间 (小时)	对照组 (n=4)	FA-Na组 (n=4)
1	33.70 $\pm$ 1.90	36.38 $\pm$ 0.75
2	33.25 $\pm$ 4.50	46.25 $\pm$ 4.79**
4	37.50 $\pm$ 7.29	42.75 $\pm$ 5.67
6	44.13 $\pm$ 4.09	52.73 $\pm$ 18.71
8	51.50 $\pm$ 8.73	60.02 $\pm$ 14.54

** 与对照组相比 $F < 0.01$

* 中国医药开发中心

结果表明: FA-Na可升高大鼠血浆肾上腺皮质酮含量, 与生理盐水组比较, 经方差分析发现以用药后2小时血浆肾上腺皮质酮含量升高最明显。

二、FA-Na对炎症局部组织中前列腺素E (PGE) 含量的影响

大鼠14只, 体重140~160克、雌雄不限, 随机分为两组。每鼠先分别肌内注射 FA-Na 100mg/kg或等容量生理盐水。30分钟后, 给每鼠左右足趾皮下注射1%角叉菜胶0.05ml致炎, 5小时后处死动物, 将致炎爪自无毛界线明显处剪下, 剥皮浸于5ml生理盐水中。浸泡40分钟后取出鼠爪, 离心浸液。取其上清液0.3ml, 加0.5N KOH 甲醇溶液2ml, 于50°C水浴中异构化20分钟。然后向各试管中加入5ml甲醇, 用751型可见紫外分光光度计测定吸收峰($\lambda=278\text{nm}$), 然后计算每克组织中PGE的含量^[4], 比较给药组和对照组的结

果。结果表明, 给药组显著低于对照组, 分别为 142.14 ± 47.92 ($n=7$) 及 226.84 ± 33.11 $\mu\text{g/g}$ 组织 ($P<0.01$)

讨 论

北京风化煤黄腐酸钠的抗炎作用与垂体肾上腺系统有关, 但不完全依赖之^[1]。本次实验结果首先表明FA-Na可明显提高正常大鼠血浆中肾上腺皮质酮含量。综合两结果, 充分证明了FA-Na确实可激活垂体肾上腺系统功能, 从而起到抗炎作用。但其激活作用是在垂体还是直接作用于肾上腺, 有待进一步研究。

近些年来认为, 炎症急性期的局部组织水肿或过敏反应的粘膜水肿, 其主要内源性介质是PGs与补体C5a协同作用所致。实验结果表明角叉菜胶致炎组织的渗出液PGE的含量明显高于FA-Na抗炎组。证明了FA-Na确实能抑制PGE的合成或释放, 或许是FA-Na的抗炎作用机制之一。

综合本组的实验结果初步证明了北京风化煤FA-Na抗炎作用显著。而其作用机制较为复杂。可能是通过多种途径来完成。就目前的研究结果而论, 可以认为北京FA-Na的抗炎作用是通过激活垂体-肾上腺系统之活性与直接抑制外周炎症组织中PGE的合成或释放途径实现的。

参 考 文 献

1. 袁盛榕, 等。生理科学 1987; 7 (4): 234
2. Madon B R, et al. Ind J Physiol Pharmacol 1979, 23 (1): 11
3. 丁霖, 等。中华医学检验杂志 1981; 4 (1): 20
4. 周重楚, 等。药学报 1985; 20 (4): 257

(来源: 生理科学, 1989, 1: 46-47+45)

蚕砂腐植酸的化学特性和药理试验

罗贤安 钱迎春

(上海技术师范学院)

裴仁华

(上海生物制品研究所)

蚕砂是昆虫家蚕的粪便, 医书^[1]记载具有祛风除湿, 和胃化湿浊之功效, 与防风、荆芥同用治风湿痹痛、皮肤瘙痒等症; 与木瓜、黄连同用可治霍乱吐痢。我们估计其中含有腐植物质, 即以0.1N NaOH提取之, 并经电析纯化, 用IR、¹H—NMR、ESR谱等测试确证属于腐植物质。将提取物进行动物试验其抗炎、止血作用明显。急性毒性试验确定其半致死剂量远大于煤炭腐植酸的有关数据, 认为可以试用于临床以考验其药效。

材料与方法

1. 将蚕砂挑去杂质, 磨细, 以0.1N NaOH提取腐植物质, 分为二部分, 一部分加硫酸沉淀, 将沉淀物再以碱溶解, 酸沉淀一次, 再以0.02N NaOH溶解, 经电透析至无酚酞反应, <45°C低温浓缩至干, 磨细供化学表征用。2. 另一部分提取液以H₂型732树脂调整酸度至pH7, 在<50°C水浴干燥之作药理试验用, 是为总腐酸。

2. 动物试验用棕HA及FA的提取:

2.1) 将蚕砂与五倍量的732树脂混合, 加水使上层液有2cm厚, 振摇4小时, 过滤后以1N NaOH调节酸度到pH6, 在50°C水浴蒸干即得FA(黄腐酸)干粉。

2.2) 将蚕砂磨细, 加95%乙醇, 在水浴上加热回流2小时, 过滤, 将滤液回收乙

醇后蒸干即为棕腐酸。

3. ¹H—NMR谱: 将样品溶于氘代DMSO中在Bruker AM-400超导核磁共振仪上扫描。

4. ESR谱: 在E-112顺磁共振仪上用固体样测定。

5. 抗炎试验: 将蚕砂总HA, 棕HA及FA分别按要求浓度溶解。取18—20克体重健康小鼠, 雌雄皆有, 随机分为对照组与试验组, 对照组每只小鼠腹腔注射0.2ml生理盐水, 试验组每只注射5mg腐植酸/0.2ml, 以二甲苯滴左耳至炎^[2], 15分钟后, 取一定面积的左右耳称重计量其炎症肿胀度及腐植物质的抑制率。

6. 止血试验: 用大白鼠作断尾止血试验^[3], 对照仍用生理盐水, 试验组按大鼠体重分别注射250mg/kg的三种蚕砂腐植酸液, 30分钟后注射3%戊巴比妥钠液麻醉之, 断尾计其出血量与出血时间。

7. 急性毒性试验: 配3%浓度的总腐酸和棕腐酸, 注射不同剂量于小白鼠腹腔, 以72小时内的总死亡率计算这二种HA的半致死剂量。

结果与讨论

(一) 蚕砂腐植酸的化学表征

将蚕砂HA电析纯样进行了元素分析、功能团含量测定以及IR、¹H—NMR、ESR

收稿日期: 1989年5月1日

• 元素分析由中科院化学所、¹H—NMR谱由中科院上海药物研究所、ESR谱由有机化学研究所完成, 特此致谢。

表1

蚕砂腐植酸的元素分析及功能团测定表

	C%	H%	N%	O%	C/H	总酸 meq/g	酚羟基 meq/g	羧基 meq/g
蚕砂HA	49.33	4.99	4.96	35.25	9.89	6.76	2.40	4.36

谱的检测, 结果见表1; 图1、2。

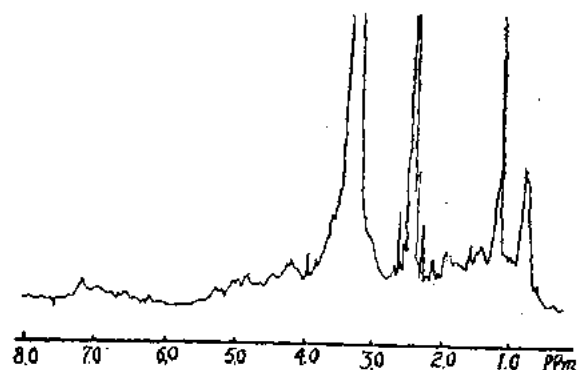
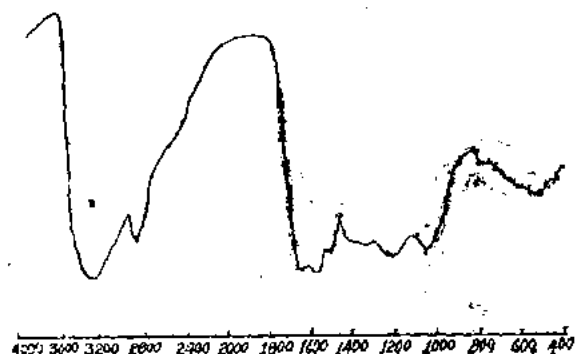
图1 蚕砂HA的¹H-NMR谱

图2

IR谱得到的印象是具有很强 的2920—2330 cm^{-1} 脂族烃基的伸缩振动, 与¹H-NMR谱中 δ 0.83ppm的脂族甲基, δ 1.19ppm的脂族亚甲基质子的明显信号相呼应, δ 3.88—5.29是甲氧基及连氧质子的贡献但信号较弱, 在 $\delta > 6\text{ppm}$ 处信号很少, 表现

表2

蚕砂腐植酸的炎症抑制作用

组别	动物数	用药剂量	炎症肿胀度	抑制率 %	t 检验
生理盐水	15	0.2ml/(只)	17.20 $\pm$ 6.74		
总腐酸	15	5mg(0.2ml)/只	8.67 $\pm$ 4.72	49.59	P<0.01
黄腐酸	15	5mg(0.2ml)/只	12.80 $\pm$ 5.85	25.58	P>0.05
棕腐酸	15	5mg(0.2ml)/只	10.27 $\pm$ 4.71	40.29	P<0.01

出芳香族质子在分子中比例不大。ESR谱为没有超精细结构的简单对称线谱, 线宽为5.21G, g值=2.0031, 从上述谱图结合元素分析、功能团等数据我们认为蚕砂提取物属于腐植酸类物质。

(二) 蚕砂腐植酸的抗炎作用

在二甲苯致炎左耳与另侧右耳上各以9mm打孔器打下同等面积的肉块称重, 计算其炎症肿胀百分率, 炎症抑制率是以对照组平均肿胀度与腐植酸组平均肿胀度计算求得。由表一可见三种腐植酸均有一定抗炎作用, 尤以总腐酸的效果为好, 有近50%的抑制果。

(三) 蚕砂腐植酸的止血效果

由表3可见蚕砂腐植酸可使大白鼠断尾部分出血时间缩短、出血量减少。其中尤以总腐酸效果显著, 出血时间由对照组的57.44 $\pm$ 16.30分钟减少到21.33 $\pm$ 8.15分钟, 出血量由对照组的2.94 $\pm$ 2.31毫升减少到0.25 $\pm$ 0.12毫升。棕腐酸效果也很好, 二者统计学处理均属差异显著。黄腐酸组虽出血量(1.41 $\pm$ 2.05毫升)比对照组减少50%, 但统计分析差异不显著(P>0.05)。

(四) 蚕砂腐植酸的急性毒性试验

山西医学院^[4]以3%风化煤黄腐酸钠注射小鼠所作急性毒性试验得出半致死量为

表3

蚕砂腐植酸的止血作用

组别	动物数	出血时间(分钟)		出血量(毫升)	
		$\bar{X} \pm S$	t 检验	$\bar{X} \pm S$	t 检验
生理盐水	9	57.44 ± 16.30		2.94 ± 2.31	
总腐酸	9	21.33 ± 8.15	$P < 0.01$	0.25 ± 0.12	$P < 0.01$
棕腐酸	9	31.40 ± 14.28	$P < 0.01$	0.84 ± 1.07	$P < 0.01$
黄腐酸	9	48.22 ± 20.44	$P > 0.05$	1.41 ± 2.05	$P > 0.05$

表4

蚕砂棕腐酸的半致死剂量测定

每只小鼠注射3% HA液ml数	每组注射量的对数(x)	每组动物数(只)	72小时死亡动物数(只)	死亡率(%)	机率单位(y)	权重系数(wc)	权重(w)
(1) 0.66	-0.18	6	0	0	2.76	0.085	1.44
(2) 0.81	-0.09	6	1	16.67	4.03	0.450	2.70
(3) 1.00	0	6	2	33.33	4.57	0.60	3.60
(4) 1.23	0.09	6	5	83.33	5.96	0.452	2.70
(5) 1.51	0.18	6	5	83.33	5.96	0.452	2.70
(6) 1.86	0.27	6	6	100.00	7.24	0.088	1.44

计算组

注: 试验小鼠体重均在24—26克间, 以25克/只计算。

513mg/kg, 95%可信限为378—699mg/kg。我们以蚕砂总腐酸与棕腐酸按蛇毒毒性测定半致死量 LD_{50} 结果如表4、5。

取(2) — (5)四个剂量计算: $i = 0.09$ $\bar{y} = 5.13, \bar{w} = 2.925, y_{50} = 5,$

$$\text{Log}LD_{50} = \frac{10i(y_{50} - \bar{y})}{3(y_4 - y_1) + (y_3 - y_2)}$$

$$+ \frac{3i}{2} + x_1 = 0.025$$

$$LD_{50} = 1.059\text{ml} = 31.77\text{mg/ml}$$

以每公斤动物体重计 $LD_{50} = 1271\text{mg/kg}$

$$S_{y_{50}} = \frac{5i}{\sqrt{80(y_{50} - \bar{y})^2 + [3(y_4 - y_1) + (y_3 - y_2)]^2}} \cdot \frac{1}{4w}$$

表5

蚕砂总腐酸的半致死量测定

每只小鼠注射3%总腐酸ml数	每组注射量的对数(x)	每组动物数(只)	72小时内死亡动物数(只)	死亡率(%)	机率单位(y)	权重系数(wc)	权重(w)
(1) 1.15	0.06	6	0	0	2.76	0.090	1.44
(2) 1.40	0.14	6	3	50	5.00	0.637	3.82
(3) 1.67	0.22	6	5	83.33	5.96	0.440	2.64
(4) 2.00	0.30	6	6	100	7.24	0.090	1.44
(5) 2.40	0.38	6	6	100	7.24	0.090	1.44

注: 本实验用18克—20克小鼠, 以均值19克/只计算。

$= 0.023\text{ml}$

95%的平均可信限 $= LD_{50} \pm 4.5 S_x \cdot LD_{50}$
 $= 1.059 \pm 0.11\text{ml} = 1271 \pm 132\text{mg/kg}$

用(1) — (4)四个剂量计算:

$i = 0.08, \quad \bar{y} = 2.54 \quad \bar{w} = 2.335$ 用上棕腐酸
同样公式得 $\log LD_{50} = 0.17 \quad LD_{50} = 1.479$
 $\text{ml} = 44.37\text{mg/ml}$ 总腐酸

计算到对小鼠的半致死量为 2335.26mg/kg

$Sx_{50} = 0.044\text{ml}$

95%的平均可信限 $= LD_{50} \pm 4.5 S_x \cdot LD_{50}$
 $= (1.479 \pm 0.293) \text{ml} = 2335.26 \pm 462 \text{mg}$

从上述二试验得到蚕砂棕腐酸的半致死量为 $1271 \pm 132\text{mg/kg}$, 比风化煤黄腐酸大一倍多, 蚕砂总腐酸的半致死量更大为 $2335 \pm 462\text{mg/kg}$, 说明蚕砂腐植酸毒性极低, 明显低于风化煤腐植酸类药物, 这是由于蚕

砂的生物起源所决定的, 也应是它的最大优点。

由以上几组试验看出蚕砂腐植酸具有较明显的抗炎、止血等药理作用, 毒性极低, 看来可以通过进一步的临床试验, 确定其药效大小进而开发利用, 为人民的健康服务。

参考文献

1. 上海医学院编: 中草药学。
2. 刘志仁等: 黄腐酸钠抗炎作用初步探讨。山西腐植酸 1982, 4.
3. 姚发业等: 新疆黄腐酸的止血凝血及缩血管作用, 全国第三次腐植酸化学学术讨论会论文集, 1984.
4. 山西医学院: 黄腐酸钠的急性毒性试验, 山西腐植酸, 1982, 4.

(来源: 腐植酸, 1989, 3: 23-26)

黄腐酸钠治疗角膜溃疡疗效观察

唐国藩

(浙江省人民医院眼科)

黄腐酸钠 (Sodium Fulvate) 是一种多功能药物, 不但有抗菌、消炎及促进溃疡愈合作用, 且有改善微循环作用^[1]。作者从1978年起开始应用黄腐酸钠治疗几种眼病, 进行疗效观察。应用情况已多次做过总结, 曾在国内外有关会议报告和发表^[2、3、4]。从1981年3月到86年8月止, 继续应用黄腐酸钠治疗角膜溃疡32例。为了观察疗效, 进行对比, 并随机抽取相似病例18例应用其他药物治疗, 作为对照组。现将情况报道于下。

一、病例情况

黄腐酸钠组; 以下简称腐钠组。共32例。

1. 性别与年龄: 32例中男性22例, 女性10例。年龄自6~77岁, 而以21~40岁为最多, 有21例。

2. 眼病情况: 各种类型的角膜溃疡或角膜炎32例。包括匍行性4例。外伤性(包括石灰、碱及热等灼伤引起的角膜溃疡)13例(其中石灰烧伤6例, 铁水烧伤4例, 炉渣烧伤1例, 氨水引起的2例)。病毒性角膜炎5例, 霉菌性角膜炎1例。单纯性角膜溃疡6例, 绿脓杆菌性角膜溃疡1例。暴露性角膜溃疡1例, 干燥性角膜炎1例。

对照组: 18例。

1. 性别与年龄: 男性11例, 女性7例。年龄最小者16个月, 最大者72岁。而以21~

40岁为最多, 18例中有11例。

2. 眼病情况: 在18例几种类型的角膜溃疡或角膜炎中, 包括匍行性角膜溃疡6例。外伤性(包括石灰、氨水灼伤引起的角膜溃疡)3例(其中石灰烧伤2例、氨水引起的1例), 病毒性角膜炎6例, 单纯性角膜溃疡3例。

二、治疗方法

1. 腐钠组: 黄腐酸钠系用绍兴地区泥煤提制, 经过化学检验, 质量符合全国腐植酸座谈会制定的标准。分子量小于500, 对铍(Be)络合力较强。无放射性物质。制成品有两种: 一种是0.5%黄腐酸钠10毫升一瓶, 专供点眼用。一种是0.5%黄腐酸钠溶液2毫升一安瓿, 供肌肉注射用, 也可用以球结膜下注射, 或加于10%葡萄糖溶液中静脉滴注。

多数病例均用局部点眼一天4次, 或每2小时一次。少数病例加用0.5%黄腐酸钠2毫升, 肌肉注射, 一天两次。

无论点眼或注射, 在开始应用的同时, 除需点阿托品散瞳者外, 多停用其他药物。

2. 对照组: 根据病情不同, 应用其他药物治疗。一般都并用多种药物或综合疗法。如匍行性溃疡, 除局部应用氯霉素溶液及金霉素眼膏外, 还肌注青霉素或庆大霉素, 有时还加用局部碘酒烧灼或前房穿刺。大多数病例均用庆大霉素球结膜下注射, 少数病例并用红、氯霉素静脉滴注。病毒性者多用泡

疹净，环孢苷或阿糖胞苷等抗病毒药物，外伤性者如系石灰灼伤引起，除用酸性药物中和外，还加用维生素C球结膜下注射等。

为了观察效果，无论腐钠组或对照组病例，用药前都进行视力和外眼等检查，用药后每天或隔天复查，进行观察与比较。

三、疗效标准

1.显效：自觉症状消失，充血消退，溃疡愈合，荧光素染色阴性。裂隙灯切面锐利，病灶瘢痕化，厚度正常，混浊范围缩小，浓度变淡，视力有明显进步者。

2.有效：自觉症状减轻或消失，溃疡愈合或基本愈合，荧光素染色阴性或弱阳性，裂隙灯切面仅角膜基质层尚轻微增厚，视力

稍有进步者。

3.无效：自觉症状及他觉检查均无明显改善。

四、治疗结果

1.腐钠组：应用上述治疗方法，治疗几种类型的角膜溃疡或角膜炎32例，治疗结果见表一。

从表一可以看出，腐钠组32例中，显效7例（21.8%），有效21例（65.6%），总有效率为87.5%。

2.对照组：按照上述综合治疗方法，应用多种药物治疗几种类型的角膜溃疡或角膜炎18例，治疗结果见表二。

表1 腐钠组对几种角膜溃疡的治疗效果

疾病分类	例数	治 疗 效 果			
		显效	有效	无效	总有效率
匍行性角膜溃疡	4		2	2	
*外伤性角膜溃疡	13	3	8	2	
病毒性角膜炎	5	1	4		
霉菌性角膜溃疡	1		1		
单纯性角膜溃疡	6	3	3		
绿脓杆菌性角膜溃疡	1		1		
暴露性角膜溃疡	1		1		
干燥性角膜炎	1		1		
合 计	32	7 (21.8%)	21 (65.6%)	4 (12.5%)	87.5%

外伤性溃疡系指铁水、炉渣等高热灼伤及石灰、氨水等引起的溃疡。

从表二可以看出，对照组18例中，显效1例（5.55%），有效14例（77.8%），总有效率为83.3%。

两组有效率比较，腐钠组尚较对照组稍高。但经统计学处理， $P > 0.05$ ，表明这两组治疗有效率，在统计学上无显著性差异。因而经过比较可以证明，多种抗菌素综合治疗的效果，并不优于单用黄腐酸钠的治疗效

果。

用药天数：用药天数表示用药后角膜溃疡治愈的时间，试将两组加以比较。

1.腐钠组：32例用药天数见表三。

2.对照组：18例用药天数见表四。

从表三、表四两组的用药天数加以比较，经统计学处理， $P > 0.05$ ，在统计学上两组差别无显著性。因而可以证明：黄腐酸

表2 对照组 对几种角膜溃疡的治疗效果

疾病分类	例数	治 疗 效 果			
		显效	有效	无效	总有效率
匍行性角膜溃疡	6		5	1	
外伤性角膜溃疡	3		2	1	
病毒性角膜炎	6	1	4	1	
单纯性角膜溃疡	3		3		
合 计	18	1 (5.55%)	14 (77.8%)	3 (16.6%)	83.3%

表3 腐 钠 组 用 药 天 数

疾病分类	例数	用 药 天 数							
		6—10	11—15	16—20	21—25	26—30	31—40	41—50	
匍行性角膜溃疡	4		3	1					
外伤性角膜溃疡	13	1	4	1	2	2	2	1	
病毒性角膜炎	5		2	1	1	1			
霉菌性角膜溃疡	1			1					
单纯性角膜溃疡	6	3	1	2					
绿脓杆菌性角膜溃疡	1					1			
暴露性角膜溃疡	1				1				
干燥性角膜炎	1						1		
合 计	32	4	10	6	4	4	3	1	

表4 对 照 组 用 药 天 数

疾病分类	例数	用 药 天 数								
		6—10	11—15	16—20	21—25	26—30	31—40	41—50	51—60	
匍行性角膜溃疡	6		4			2				
外伤性角膜溃疡	3				1		1	1		
病毒性角膜炎	6	2	1		1		1		1	
单纯性角膜溃疡	3	1	2							
合 计	18	3	7		2	2	2	1	1	

钠用以治疗角膜溃疡，其功效并不亚于多种抗菌素。而黄腐酸钠无任何副作用，此为一些抗菌素所不及。加以来源丰富，价格便宜，符合增产节约原则。如从经济效益来

讲，更有其独特的优点，因而值得进一步研究与推广。

五、讨论

兹仅就黄腐酸钠的抗菌、消炎及促进溃

疡愈合作用, 根据文献记载, 略加讨论。

就抗菌作用来说: 目前已知腐植酸分子含有苯环、稠苯环等, 苯环上有各种功能基团, 主要是羧基、酚羟基、甲氧基、醌基等。苯环上含羧基或羟基的小分子有机化合物, 都有很明显的杀菌和抑菌作用⁵。Ansorg等⁶实验证明, 81种天然腐植酸中有57种具有不同的抗菌作用。当浓度为 ≤ 2500 微克/毫升时, 可抑制表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、酯胺链球菌、变形杆菌、绿脓杆菌及白色念珠菌等。Klocking⁷证明腐植酸有抗病毒作用。并且已经证实, 一些病毒酶如逆转录酶(Retroviren)(一种RNA所依赖的DNA多聚酶)对腐植酸很敏感。Schiller等⁸应用1%腐植酸铵局部治疗单纯疱疹病毒感染的几种疾病, 78例中有70例获得良好效果。

本文报告应用黄腐酸钠治疗匍行性角膜溃疡及病毒性角膜炎等病, 结果表明, 黄腐酸钠具有抗菌和抗病毒作用。一例霉菌性角膜溃疡, 溃疡面坏死组织涂片检查, 找到霉菌菌丝, 试用黄腐酸钠治疗, 也有效果。

就消炎作用来说: Breng等⁹实验证明, 腐植酸在兔肾皮质均等质内能抑制前列腺素E合成, 其作用超过乙酰柳酸。由于前列腺素是炎症及疼痛过程中的媒介物, 因此证明, 腐植酸有止痛和消炎作用。Kühnert¹⁰报告, 由于腐植酸的吸附作用及离子交换作用, 因此具有消炎及收敛作用。王宗锐等¹¹实验证明, 腐植酸可抑制毛细血管渗出, 抑制白细胞游走及肉芽组织生长, 因而认为腐植酸是大分子量的非甾体抗炎药。

本文试用黄腐酸钠治疗铁水、氨水等引起的角膜溃疡, 用药后不但炎症征象逐渐减轻, 眼睑肿胀等症状也迅速消退。尤其是石灰引起的角膜溃疡, 由于黄腐酸钠可螯合钙离子使其失去作用, 效果较为理想。

从促进溃疡愈合来说: Solovyeva等

¹²实验证明, 腐植酸含有吡哆醇(Pyridoxinen)具有保护肌体功能的作用, 并有酶及免疫再生活性, 对生长细胞的繁殖有良好效果。可加速再生过程, 试用以治疗胃溃疡等病, 也证明有效。我国有关黄腐酸钠治疗实验性溃疡病的研究及临床应用也屡有报导, 都证明黄腐酸钠确有促进溃疡愈合作用。

本文在临床治疗观察中看到, 由于黄腐酸钠具有螯合作用, 用药后即粘附于溃疡面, 将溃疡复盖, 不但可使溃疡逐渐愈合, 范围缩小, 且形成的瘢痕较小, 因而对视力恢复较为理想。

参考文献

1. 袁中元等: 黄腐酸钠治疗高血压病甲皱循环的变化, 医用腐植酸论文集, 北京同仁医院。1980; 1: 46。
2. 唐国藩: 腐植酸治疗眼病100例(10⁸₆眼)的疗效观察, 《江西腐植酸》1982; 1: 2
3. Tang Guo-fan: Klinische Studie über Die Behandlung Von 33 Patienten mit Augenverletzung mit Huminsäuren. Torf in der Medizin. 1981; 3: 245.DDR.
4. Tang Guo-fan: Die Beobachtung der Wirkung der Huminsäure in der Behandlung des Korneaukulus und der Augenblutung. Wirkungsmechanismen der Moorthérapie. 1985; 1: 65.BRD.
5. 同仁医院等: 黄腐酸钠治疗上消化道出血及初步实验研究 医用腐植酸学报。1979; 3: 7。
6. R. Ansorg und W. Rochus, Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von natürlichen Huminsäuren. Arzneim-Forsch/Drug. 1975 28(2), 12 (下转第29页)

7. R. Klocking: Antiviral wirksame Huminsäuren und huminsäureähnliche polymere . Torf in der Medizin D.D.R.1981; 7.

8. Schiller u.a. Ergebnisse einer Klinischen Prüfung Von Ammoniumhumat zur Lokaltehandlung von Herpes- Virus-hominis Infektionen. Dermatol Monatssch. 165; 505,509.

9. Breng R.u.a. Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Wasserlösliche Huminstoffe in vitro. Torf

in der Medizin. DDR.1981; 8.

10. Kuhnert M: Biochemische und pharmakologischtoxicologische untersuchungen. Mit isolierten Huminsäure und ihre medizinische Bewertung Torf in der Medizin. DDR.1981; 3

11. 王宗锐等: 腐植酸抗炎作用研究, 《江西腐植酸》, 1982; 1: 31

12. Soloveyeva. V.P (唐国藩译): 泥炭制成的治疗制剂, 《江西腐植酸》 1982; 1: 50

(来源: 腐植酸, 1989, 4: 42-45+29)

雅尔康疗效护肤霜

治疗皮肤病 125 例临床观察

何雅强

陆文德 徐广坤

(广东省佛山市第一人民医院皮肤科)

(中山医科大学第三附属医院皮肤科)

林 泽

(暨南大学医学院皮肤科)

雅尔康疗效护肤霜是由广东省佛山市石油化工产品技术开发公司出品,由北京海淀医院鉴制,内含黄腐酸等多种有效药物及营养成分,经科学方法研制而成的一种新型疗效护肤用品。

我们三间医院同时于1989年2至3月间应用上述雅尔康疗效护肤霜治疗皮肤病125例,进行临床观察,取得较好的效果。

一、临床病例资料

(一) 病历来源

应用雅尔康疗效护肤霜进行临床治疗本组125例,为我们三间医院皮肤科门诊确诊,作为观察对象。其中广东省佛山市第一人民医院皮肤科40例,中山医科大学第三附属医院皮肤科65例,暨南大学医学院皮肤科20例。

(二) 性别

男性42例,女性83例。

(三) 年龄

10岁以下	11例;	11~19岁	27例;
20~29岁	38例;	30~39岁	20例;
40~49岁	7例;	50~59岁	16例;
60~69岁	5例;	70岁以上	1例。

其中年龄最小者为36天,最大者为70岁。

(四) 职业

干部	25例;	工人	30例;
农民	3例;	学生	27例;
医护	26例;	售货员	2例;
退休	2例;	家务	1例;
小孩	9例。		

(五) 治疗病种, 病期与例数

治疗病种有湿疹、接触性皮炎、痤疮、脂溢性皮炎、手足皲裂、冬季皮炎、冻疮、鱼鳞癣等常见皮肤病共21种,其中病期最长者有40多年,最短者2天(表1)。

(六) 治疗方法

本报告的病例选定后,全部病例在门诊将雅尔康疗效护肤霜交给病人,并指导其使用方法,一般每日薄搽2~3次,同时还嘱其定期来门诊复诊。

本报告各病例均由各医院皮肤科核定,专人负责追踪观察及审定其疗效。

二、疗效判断标准

本报告病例的疗效判断标准

痊愈:自觉痒、痛全部消失,或皮损基

表一

雅尔康疗效护肤霜治疗皮肤病病种及其病期与例数

病 种	病例数	病期及每期之病例数							
		10天内	11~30天	1~2个月	3~6个月	7~12个月	1~2年	2~3年	3年以上
湿 疹	4	1	1	1					1
婴儿湿疹	3		1	1			1		
尿布性皮炎	2	1	1						
接触性皮炎	7	6			1				
神经性皮炎	2			1			1		
痤疮	17			2	3	4	6		2
脂溢性皮炎	11		1		2		6	2	
手足皲裂	7	3	2	1	1				
鱼 鳞 癣	6								6
冬季皮炎	9	5	2	2					
局部瘙痒症	2							1	1
冻 疮	38	35	3						
雀 斑	2								2
黄 褐 斑	2			1					1
进行性指掌角皮症	3								3
丘疹性荨麻疹	4	1	2	1					
口角皮炎	2				2				
多形红斑	1			1					
皮肤划痕症	1				1				
阴囊皮炎	1				1				
臀 癣	1				1				
合 计	125	52	13	11	12	4	14	3	16

本消退；

· 显效：痒、痛明显减轻、或皮损消退50%；

有效：痒、痛有所减轻，或皮损消退50%以下；

无效：自觉症状无改善，皮损无变化。

三、疗效观察结果（表2）

四、结语

（一）本文报告应用广东省佛山市石油化工产品技术开发公司出品的雅尔康疗效护

肤霜治疗21种常见皮肤病共125例，结果：痊愈55例（44%）；显效31例（24.8%）；有效33例（26.4%）；无效6例（4.8%）；总有效共119例，总有效率为95.2%，疗效是满意的。

（二）本报告全部病例在使用本品治疗期间，未发现不良副作用，无过敏或刺激等不良反应。

（三）观察证明本品具有抗炎、止痒、保护、润泽等作用，而且润而不腻、气味芳

表二

雅尔康疗效护肤霜治疗皮肤病125例疗效观察结果

病 种	病例数	疗 效 审 定			
		痊 愈	显 效	有 效	无 效
湿 疹	4	1	1	1	1
婴儿湿疹	3		1	2	
尿布性皮炎	2			1	1
接触性皮炎	7	5	2		
神经性皮炎	2			2	
座 疮	17	1	9	7	
脂溢性皮炎	11	6	2	2	1
手足皲裂	7	3	3	1	
鱼 鳞 癣	6		3	3	
冬季皮炎	9	7	2		
局部瘙痒症	2		2		
冻 疮	38	30	1	6	1
雀 斑	2			2	
黄 褐 斑	2			2	
进行性指掌角皮症	3			2	1
丘疹性荨麻疹	4	1	2	1	
口角皮炎	2	1	1		
多形红斑	1			1	
皮肤划痕症	1				1
阴囊皮炎	1		1		
臀 癣	1		1		
合 计	125	55	31	33	6
%	100%	44%	24.8%	26.4%	4.8%

香，颇受群众欢迎，既可作为日常生活中较好的护肤品，对某些常见的皮肤病也有不等

程度的疗效，我们认为本品是一种较理想的疗效护肤霜，建议推广使用。

(来源：腐植酸，1989，4：46-48)

自由基在大骨节病病理过程中的作用

I. 活性氧自由基和大骨节病病区腐植酸对II型胶原蛋白造成的损伤*

北京医科大学药学院 王春霞 许善锦
天然药物及仿生药物实验室 王 爱

【摘要】 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 和病区 FA 可以使猪软骨 II 型胶原蛋白中羟脯氨酸、脯氨酸含量下降，而谷氨酸含量增加；且 $\text{O}_2\cdot^-$ 和 FA 浓度越大，羟脯氨酸含量下降越多。 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 和 FA 损伤的胶原蛋白的凝胶化程度和速度降低；CD 谱表明其构象发生变化， α -螺旋结构含量下降；SDS-PAGE 结果表明，胶原蛋白在 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 作用下发生降解生成分子量较小的肽段，而在 FA 作用下未见明显降解。推测 FA 作为自由基源在大骨节病的发生中起作用。

关键词 大骨节病 胶原蛋白 自由基 腐植酸

对大骨节病进行的长期的地方病学研究虽然提出了一些病因假说，但迄今仍无确定的结论。从医化学观点来分析，现在主要的三个病因说（饮水中的有毒有机物或粮食中的镰刀菌毒素中毒以及环境中低硒和某些微量元素欠缺）提示自由基造成的氧化性损伤可能是本病的触发因子。从大骨节病患者血浆谷胱甘肽过氧化物酶活力降低和脂质过氧化水平增高可以得到旁证。彭安等发现病区饮水中腐植酸有 ESR 信号并能引起脂质过氧化。在此基础上，他们提出大骨节病的综合病因说⁽¹⁾。另外，由于本病的病理表现包括软骨细胞坏死、软骨组织老化、早期化骨和骨化程度降低，可以设想自由基直接或间接地造成软骨基质异常，而在这种异常基质中进行的矿化反应在热力学和动力学方面发生异常，从而导致磷灰石结晶的异常。为证明我们的设想，用化学方法产生活性氧自由基，观察它们对 II 型胶原蛋白组成、结构及性质的影响，并与由大骨节病病区饮水中提取的黄腐酸 (FA) 的作用比较，以期获得自由基和病区 FA 对胶原蛋白损伤的直接信息。

实验部分

试剂：除黄嘌呤 (99~100%) 及黄嘌呤氧化酶购自 Sigma 外，其他试剂均为分析纯，购自北京化工厂。水为去离子水。黄腐酸由甘肃天水高家窑饮水中用彭安方法⁽²⁾提取。II 型胶原蛋白用 1 岁猪肋软骨及肩胛软骨参考 Trels-lad⁽³⁾ 法分离、纯化。用凝胶电泳、羧甲基纤维素柱层析、氨基酸组成分析及羟脯氨酸含量测定，确证其为单一的 II 型胶原蛋白。

仪器：UV-260 及 UV-120-02 分光光度计 (岛津)，J20C 旋光分光光度计 (Jasco)，835-50 氨基酸分析仪 (日立)。

方法及结果：本工作用 $\text{FeSO}_4/\text{EDTA}$ (1:1 摩尔比) 体系产生羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 用黄嘌呤 (X) / 黄嘌呤氧化酶 (XOD) 体系产生超氧自由基 ($\text{O}_2\cdot^-$)。用这两种溶液及病区黄腐酸溶液处理 II 型胶原蛋白溶液，以不同方法研究胶原蛋白的变化。

1. 氨基酸组成，pH 为 7.40 的 (0.05 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl) 4 mg/ml 胶原

蛋白溶液用 10mmol/L Fe^{2+} +EDTA、10mmol/LX+800 mU/mlXDD 或 400 ppmFA 在 4°C 下作用 10h, 0.1% HAc 在 4°C 透析, 至透析液无 Cl^- 后冷冻干燥。用氨基酸自动分析仪经 6 mol/L HCl 110°C 水解后测氨基酸组成。结果见表 1。

表 1 损伤前后 II 型胶原蛋白的氨基酸组成

氨基酸	对照	Fe^{2+} +EDTA (10 mmol/L)	XOD (800mU/ml)	FA (400ppm)
Asp	31	35	22	43
Thr	22	14	38	22
Ser	23	19	28	27
Glu	12	44	33	66
Gly	308	339	316	315
Ala	100	118	122	112
Cys	6	4	3	3
Val	16	21	36	21
Met	9	8	13	10
Leu	17	27	36	27
Ile	6	9	15	9
Tyr	0	0	3	4
Phe	19	15	12	14
Lys	30	20	35	18
His	5	4	4	4
Arg	87	62	61	58
Hyp	133	106	69	95
Pro	175	157	157	153

可见三种处理都使脯氨酸和羟脯氨酸含量下降, 而谷氨酸含量增高。变动趋势相同。

2. 羟脯氨酸含量, 为确定自由基及黄腐酸确为造成氨基酸组成变化的原因, 并且探索氨基酸组成是否与自由基浓度有关, 测定不同浓度 O_2^- 、 $\cdot\text{OH}$ 及 FA 与羟脯氨酸含量关系。

胶原蛋白在 pH7.40 0.05mol/L Tris-HCl ($I=0.1$, NaCl) 中的溶液 (1mg/ml) 各 1ml 分装安瓿中, 分别加入不同浓度的 Fe^{2+} /EDTA、X/XOD 及 FA, 室温下作用 1 小时后, 各加 1 ml 浓 HCl, 充氮、封口, 在 110°C 水解 20 小时后, 以对二甲氨基苯甲醛显色法测定羟脯氨酸含量。同时以不经处理的胶原蛋白作对照。结果见表 2 (4 次平行实验平均值)。

可以看出, 羟脯氨酸含量随自由基浓度增加而降低。因此, 胶原蛋白的氨基酸组成确可因自由基作用发生变化, 黄腐酸也有类似作

表 2 不同浓度 Fe^{2+} +EDTA、X+XOD 及 FA 对羟脯氨酸含量影响

吸光度	对照	Fe^{2+} +EDTA (mmol/L)		FA (ppm)		X (3mmol/L)	
		2	4	150	300	200mU/ mlXOD	300mU/ mlXOD
1	0.537	0.419	0.344	0.468	0.346	0.403	0.355
2	0.495	0.432	0.342	0.447	0.354	0.394	0.328
3	0.490	0.427	0.355	0.463	0.363	0.385	0.365
4	0.544	0.434	0.347	0.430	0.346	0.407	0.330
平均	0.517	0.428	0.347	0.452	0.352	0.397	0.345
CHyp μg/ml	4.13	3.38	2.72	3.59	2.76	3.13	2.70

用。

3. 用圆二色散 (CD) 谱研究胶原蛋白构象的变化, 用 2mol/L HCl 将经 10mmol/L Fe^{2+} +EDTA 或 400ppmFA 处理过的胶原蛋白溶解, 用 NaOH 调至中性, 以 0.05mol/L Tris-HCl pH 7.40 缓冲溶液稀释至蛋白含量为 44μg/ml 的溶液, 测定 CD 谱, 同时以未处理的胶原蛋白做对照。在 CD 谱 Cotton 效应区均见 221nm 正峰, 只是自由基和黄腐酸处理后正峰下降。由其峰面积计算出损伤后 α -螺旋结构的相对含量 (以对照蛋白的 α -螺旋含量为 100%), 结果见表 3。

表 3 $\cdot\text{OH}$ 及 FA 处理对胶原蛋白 α -螺旋含量的影响

	对照	Fe^{2+} +EDTA (10 mmol/L)	FA (400ppm)
Cotton 正峰面积 (mm^2)	971.5	338.0	845.0
α -螺旋 %	100	34.8	87.2

用同法研究不同浓度 FA 不同作用时间处理后胶原蛋白 α -螺旋含量变化, 结果见表 4。

结果表明 FA 与 $\cdot\text{OH}$ 有同样的作用, 使胶原蛋白构象改变, α -螺旋含量降低。此变化是个比较慢的过程。

4. 降解: 用 SDS-PAGE 研究了经 $\cdot\text{OH}$ O_2^- 及 FA 处理的胶原蛋白的降解产物。样品溶液为 4mg/ml。对照及 FA 处理的样品溶液上样 10μl, $\cdot\text{HO}$ 和 O_2^- 处理的上样 20μl。结果见图 1。

表 4 不同作用时间及不同浓度的FA
对胶原蛋白 α -螺旋含量的影响

	作用时间 (min)					
	(对照)	2*	20*	30*	20 [△]	70 [△]
Cotton正峰 面积(mm ²)	1280	1216	960	798	750	546
α -螺旋%	100	95.0	75.0	62.3	58.6	42.7

*FA浓度20ppm; [△]FA浓度40ppm.

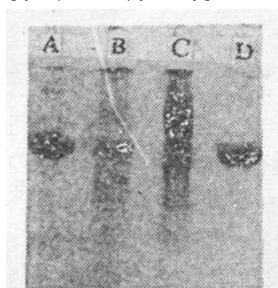


图 1 经 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 及FA处理的II型胶原蛋白的SDS凝胶电泳图
A, 对照; B, 10mmol/L Fe^{2+} +EDTA;
C, 18mmol/LX/1U/molXOD; D, 400
ppmFA

显然, $\cdot\text{OH}$ 及 O_2^- 能使胶原蛋白降解形成比 α -链短的肽段, 但FA不能。

5. 凝胶化曲线的测定: 胶原蛋白溶于10 mmol/L HCl 成3mg/ml 溶液, 分别在室温用不同的 Fe^{2+} +EDTA、X/XOD 及FA处理1小时, 恒温在37°C, 测定500nm 吸光度随时间的变化, 得胶原蛋白的凝胶化曲线(图2)⁽⁴⁾。由曲线可算出凝胶形成期吸光度增长率(吸光度/分)及凝胶化完全时的最高吸光度 A_{max} 。以表5 Fe^{2+} +EDTA 的作用 为例示出所得之结果, 其余类似。

表 5 不同浓度 Fe^{2+} /EDTA对胶原蛋白
凝胶化的影响

	Fe^{2+} +EDTA (mmol/L)				
	对 照	0.2	0.5	1	2
dA/dt	0.0590	0.0375	0.0200	0.0075	—
A_{max}	3.0100	2.9100	2.8900	2.8200	2.6200

可见, $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 及FA都明显地降低凝胶化速度和凝胶化程度。图2三组曲线还表明

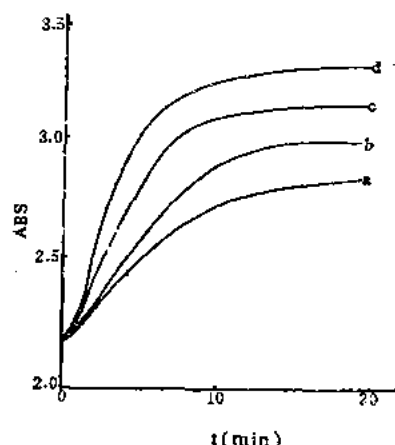
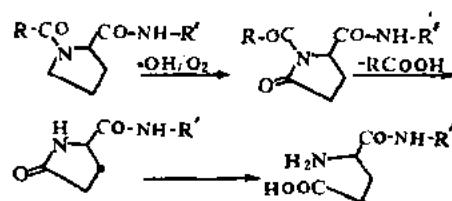


图 2 胶原蛋白的凝胶化曲线
a, Fe^{2+} /EDTA; b, X/XOD; c, FA; d,
对照。

FA影响凝胶化的方式与 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 的相似。

讨 论

本文所报告的结果表明, 活性氧自由基对自软骨分离出的II型胶原蛋白有损伤作用。这种损伤以其脯氨酸和羟脯氨酸含量的降低和谷氨酸含量增加为特征。Levitzki等⁽⁵⁾曾报道胶原蛋白容易在 $\cdot\text{OH}$ 引发下发生氧化性降解, 氧化敏感部位在脯氨酸吡咯环, 首先去氢加氧生成吡咯酮衍生物, 后者水解生成焦谷氨酸衍生物再进一步水解生成一个新约N末端谷氨酸,



这种损伤可以导致一定程度的降解, 因此在凝胶电泳图上出现较多的肽段。而且脯氨酸和羟脯氨酸残基在胶原蛋白分子中的大量重复出现是决定它的螺旋结构的基础, 因此上述氧化裂解必然导致 α -螺旋结构含量降低, 并影响其凝胶化, 上述作用与我们用 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 所得的实验结果一致。黄腐酸对胶原蛋白的损伤与 $\cdot\text{OH}$ 及 O_2^- 各方面都相似, 也能造成脯氨酸和羟脯氨酸含量下降和谷氨酸含量增加, 并且

α -螺旋含量降低。FA 在浓度较高时才能显示作用，是由于黄腐酸含半醌结构，相对稳定，只有进入生物体内通过单电子氧化还原产生 O_2^- 及 $\cdot OH$ ，因此把黄腐酸当做自由基源造成 II 型胶原蛋白的损伤是有一定依据的。

参 考 文 献

1. 彭安. 大骨节病三种病因说间的关系初探. 中国地方病防

治杂志 1987; 2(3), 151.

2. 彭安等. 水体腐植酸及其络合物. 环境科学学报 1981, 1(2), 126.

3. Trelstad R L. Osteogenesis Imperfecta Congenita. Lab Invest 1977; 36(5), 501.

4. Evans C H. The promotion of Collagen polymerization by Lanthanide and Calcium ions. J Biochem 1983; 213, 751.

5. Levitzki A, et al. Modification of the Radiolytic Oxidation of Ribonuclease Induced by Bound Copper. JACS 1967; 89, 4185.

THE ROLE OF FREE RADICALS IN THE PATHOLOGICAL PROCESS OF KASHIN-BECK DISEASE 1. THE DAMAGES TO TYPE II COLLAGEN CAUSED BY ACTIVE OXYGEN RADICALS AND FULVIC ACID FROM EPIDEMIC DISTRICT OF KBD

Department of Inorganic Chemistry Wang Chunxia, Xu Shanjin
Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs Wang Kui

The features of oxidative damages of type II collagen from pig cartilage induced by $\cdot OH$, O_2^- and fulvic acid from epidemic district of KBD were studied in vitro. The results of amino acid analysis of the damaged collagen are characterized with the decreasing of hydroxyproline and proline contents and the increasing of glutamic acid content. The changes are $\cdot OH$ and FA concentration dependent. This may be interpreted with oxidative cleavage of the proline ring giving a new N terminal glutamate residue. In addition, the rate of gel formation and the degree of gelation of the damaged collagen decrease both. These may be related to the degradation and the conformational change. The latter is supported by the helix contents determined by means of CD spectroscopic method. The α -helix contents decrease significantly after incubation of collagen with free radical and FA. SDS-PAGE results indicate degradation in the cases of $\cdot OH$ and O_2^- , but not in FA. The action of FA may be similar with that of $\cdot OH$ and O_2^- , but weaker. It is postulated that the FA or other toxic xenobiotics induce the generation of free radicals, which play the role of the trigger of KBD development.

Key words Kashin-Beck disease Collagen Free radicals Fulvic acid

(来源: 北京医科大学学报, 1989, 4: 307-310)

自由基在大骨节病病理过程中的作用

II. 在活性氧自由基及大骨节病病区黄腐酸损伤的II型胶原蛋白中羟基磷灰石结晶生长的动力学研究*

北京医科大学药学院 王春霞 许善锦
天然药物及仿生药物实验室 王 爱

〔提要〕 研究了在 $\cdot\text{OH}$ 与病区饮水中黄腐酸(FA)造成损伤的猪软骨 II 型胶原蛋白中羟基磷灰石(HAP)成长的动力学,并与未损伤的胶原蛋白比较。结果表明,正常情况下的 II 型胶原蛋白抑制 HAP 成长,而氧化性降解损伤的 II 型胶原蛋白促进 HAP 成长,但反应均为二级。X 射线分析及扫描电镜观察发现,损伤的 II 型胶原蛋白使 HAP 成长初期结晶性差,最终所得结晶聚合度大。提示软骨组织中的 II 型胶原蛋白因氧化降解后表现了促矿化的性质,这与大骨节病的发生发展可能有重要联系。

关键词 胶原蛋白 羟基磷灰石 大骨节病 自由基 黄腐酸

为研究自由基造成的软骨基质损伤在大骨节病发生发展过程中所起的作用,我们研究了超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)和大骨节病病区饮水中黄腐酸对猪软骨 II 型胶原蛋白的直接损伤。结果表明,在它们作用下,胶原蛋白在脯氨酸吡咯环处发生氧化性降解,从而改变胶原蛋白的有序结构⁽¹⁾。显然,大骨节病发展过程中,随着基质损伤而发生的第二个事件就可能是矿化反应的热力学和动力学的异常以及晶体堆积异常,后者可能就是大骨节病患者早期化骨、骨化程度降低以及变形的原因。本工作研究在用 $\cdot\text{OH}$ 或 FA 的直接作用下损伤了的 II 型胶原蛋白中,羟基磷灰石晶种成长的动力学以及形成的结晶性质。

实验部分

一、仪器及试剂:

ZP 2 型自动电位滴定仪(上海第二分析仪器厂),UV-120-02 分光光度计(岛津),WFX-16 原子吸收分光光度计(北京第二光学分析仪器厂),S-450 扫描电子显微镜(日立),Y-2 型

X 射线衍射仪(丹东仪器厂)。

II 型胶原蛋白按前文方法自猪软骨分离纯制,并确定其纯度,再经自由基和 FA 处理(方法见后),

HAP 晶种按 Nancollas⁽²⁾方法制备,用红外光谱表征,测定 Ca/P 摩尔比为 1.67, X 射线衍射分析确定为结晶度很好的 HAP。筛取 140~200 目间的结晶做晶种。

其他试剂均为分析纯。氯化钙(分析纯)经重结晶。氧化铜纯度 99.9%。

黄腐酸为由大骨节病区饮水中分离并纯制(见前文⁽¹⁾)。

二、方法:

1. 损伤的 II 型胶原蛋白的制备:

溶解 II 型胶原蛋白于 10mmol/L 盐酸配制成 4mg/ml 的溶液。用 0.1mol/L NaCl/0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.40)在 4℃透析至透析袋内外 pH 相等,分为两份,一份加 $\text{FeSO}_4/\text{ED-FA}$ (摩尔比 1:1)至 10mmol/L,另一份加 FA

* 本工作为“七五”攻关项目 75-62-03-07 01 专题。

至 400ppm, 在 4°C 冷室中放置 10 小时后, 转入透析袋, 用 0.1% 醋酸透析至无 Cl⁻, 冷冻干燥。

2. HAP 结晶生长动力学研究:

用恒 pH 法测定在含 II 型胶原蛋白的对 HAP 过饱和的溶液中加入 HAP 晶种时, Ca²⁺ 和 PO₄³⁻ 等磷酸根物种总浓度以及为维持 pH=7.40 所需加入碱量, 根据这三项指标与时间的关系了解矿化过程⁽³⁾。

过饱和溶液由 25.00ml Na₂HPO₄ ($8.0264 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 或 $1.5907 \times 10^{-2} \text{mol/L}$)、25.00ml 1.5mol/L NaCl、25.00ml (或 50.00ml) $1.6560 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ CaCl₂ 溶液混合, 稀释至 250.0ml, 用 NaOH 调 pH7.40。在通氮、恒温 ($37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$)、电磁搅拌下使反应进行。以 pH 自动滴定仪通过加入酸碱调 pH 恒定在 7.40 后, 加入 HAP 晶种。在不同时间吸取 3.50ml 溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 测定滤液中的钙和磷酸物种浓度, 并读取加入 NaOH 溶液量。在研究胶原蛋白影响时, 每份溶液中加入 15 或 20mg 胶原蛋白(先用稀盐酸溶解)。

钙用原子吸收法测定, 磷用钼蓝比色法测定。

用 Ca²⁺、磷及加入的 NaOH 体积对反应时间作图, 可了解矿化过程。对动力学数据进行处理, 得速度常数与晶体表面积的乘积 $k \cdot s$ 和矿化反应的动力学级数。

3. 固相分析:

将不同反应时间取出的带有结晶的矿化液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 水洗两次后, 自然晾干, 用扫描电镜观察结晶形态。另用同法取矿化最终产物, 在硅胶干燥器中干燥, 用 X 射线衍射仪进行物相分析, 以测定产物的组成、结晶度高低以及所属晶系和晶胞参数。

三、结果:

考虑到过饱和度、胶原蛋白浓度以及晶种量都可能使动力学结果和晶体结构与形态有所不同, 所以进行了两组实验, 每组包括加入未处理的和用羟自由基或 FA 处理的胶原蛋白的

实验, 并以不加胶原蛋白的实验结果为对照, 两组实验条件为: 原始钙浓度 T_{Ca} : $1.656 \times 10^{-2} \text{mol/L}$, 原始磷浓度 T_P : $8.026 \times 10^{-4} \text{mol/L}$; 胶原蛋白 15mg, HAP 20mg; 另一组相应为: $3.312 \times 10^{-2} \text{mol/L}$, $1.597 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, 20mg, 10mg, Ca/P 摩尔比分别为 2.06 和 2.10。

以维持恒定 pH 所加氢氧化钠溶液体积、溶液中总磷酸根浓度 C_P 及总钙浓度 C_{Ca} 随时间的变化表示的实验结果见图 1~3 (第二组有相似的情形, 略)。

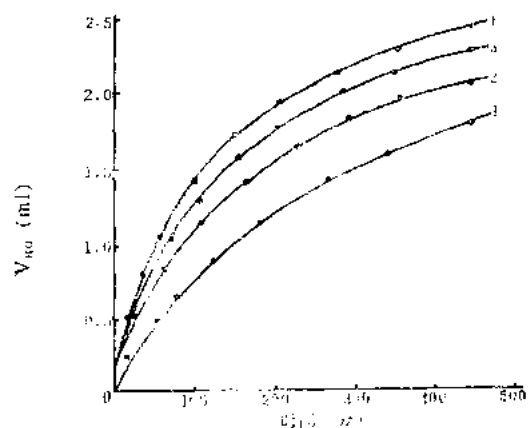


图 1 矿化过程耗碱量变化

Ca²⁺: $1.656 \times 10^{-2} \text{mol/L}$
PO₄³⁻: $8.026 \times 10^{-4} \text{mol/L}$
15mg 胶原蛋白
20mg HAP 晶种
1. 对照 2. FA 处理
3. OH 处理 4. 无胶原

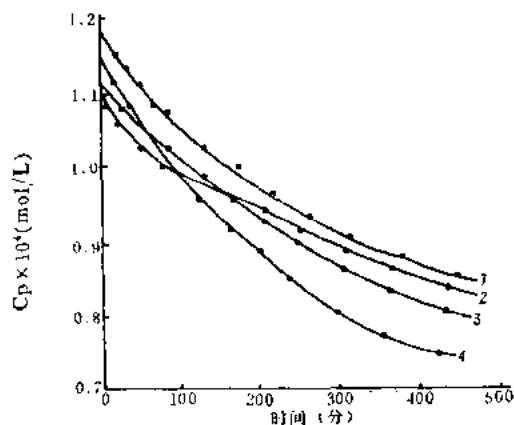


图 2 矿化过程磷酸根浓度变化
条件同图 1。

由于结晶过程可能包含聚集, 故采用 Bloomen 方法⁽⁴⁾处理数据。羟基磷灰石晶体成长

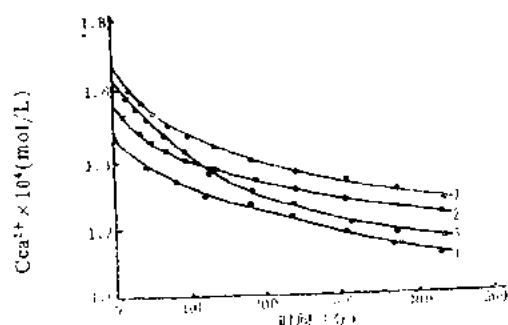


图3 矿化过程钙离子浓度变化
条件同图2。

速度方程为,

$$R = ks(AP_1^{1/n} - AP_\infty^{1/n})^n$$

其中, R 为晶体成长速度, AP_1 及 AP_∞ 分别为在时间 t 及外推到无穷时溶液中 HAP 的活度积, k 为速度常数, s 为固相表面积, n 为反应级数。

另有
$$R = AP_0^{1/n} \frac{U_\infty - U_t}{t_m + t}$$

其中
$$U_t = \frac{AP_0^{1/n} - AP_\infty^{1/n}}{AP_0^{1/n} - AP_\infty^{1/n}}$$

U_∞ 为无限时间的 U_t , t_m 为 $U_t = \frac{1}{2} U_\infty$ 所需的时间由实验数据可得 AP_1 及 AP_∞ , 将 $\lg R$ 与 $\lg(AP_1^{1/n} - AP_\infty^{1/n})$ 对画, 可得一条直线, 由截距可得 ks , 由斜率可求得反应级数 n , 并按下式得 U_∞ 及 t_m :

$$\frac{t}{U_t} = \frac{t}{U_\infty} + \frac{t_m}{U_\infty}$$

结果见表。(第二组有相似情形, 略)。

表 第1组动力学数据处理结果

胶原蛋白	AP_∞ ($\times 10^{-7}$)	U_∞	t_m (min)	$k \cdot s$ ($\times 10^4$)	n
无	1.71	0.292	178.1	1.22	1.93
未处理蛋白	1.73	0.299	251.1	0.565	1.98
·OH 处理蛋白	1.73	0.242	177.1	1.82	1.90
FA 处理蛋白	1.91	0.185	91.2	5.31	1.88

由固相的扫描电镜图可知, 在任何情况下都只有 HAP 晶体而无其他磷酸钙盐, 只是聚集程度有些不同。初期品种成长明显, 但聚集度不高; 在后期聚集成较大晶粒, 用·OH 和 FA

处理的胶原蛋白使聚集度稍大。初期晶形较差, 后期好转。过饱和度低时, 晶体形状较好, 过饱和度高时, 需较长时间晶形可转好。

矿化产物的 X 射线物相分析结果表明, 在任何情况下, 生长 3、5 和 7 小时的晶体都是 HAP, 与胶原蛋白存在与否和损伤与否无关, 但结晶度与溶液的过饱和度、胶原蛋白损伤和矿化时间有关, 可将结果归纳如下:

结晶度好:

1. HAP 品种。

2. 低过饱和度: (1) 无胶原蛋白, (2) 加未损伤胶原蛋白, (3) 加·OH 或 FA 处理胶原蛋白矿化 7 小时。

结晶度中:

1. 低过饱和度: 加·OH 或 FA 处理胶原蛋白矿化 3 小时

2. 高过饱和度: 不加胶原蛋白矿化 7 小时

结晶度差:

高过饱和度: (1) 无胶原蛋白矿化 5 小时, (2) 加未处理胶原蛋白矿化 5 小时, (3) 加·OH 或 FA 处理胶原蛋白矿化 5 和 7 小时。

产物均系 $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH))$ 六方晶系, 晶胞参数及 α 值与 ASTM 比较, 误差都小于一般要求。

以上结果表明, 低过饱和度下结晶度均好, 而损伤胶原蛋白和短矿化时间使结晶度降低。即使有·OH 或 FA 损伤胶原蛋白存在, 延长矿化时间到 7 小时, 也可得到好结晶度。高过饱和度矿化 5 小时, 无论胶原蛋白损伤与否结晶度均差。

讨 论

前文报道活性氧自由基可对 II 型胶原蛋白造成氧化性降解损伤, 大骨节病病区黄醌有类似作用, 但未见有明显降解作用。

在软骨基质中, 胶原蛋白即是成核成长的载体, 又是控制结晶形态和大小的模板。因此, 胶原蛋白的氧化性降解不可避免地要影响矿化。而且在大骨节病表现过程中也见到自由

基引起膜和大分子变化的证据⁽²⁾。这表明临床所见的硬组织异常可能与上述异常胶原蛋白有关。

本工作结果提供了直接证据,说明·OH和黄腐酸自由基处理过的胶原蛋白不影响矿化产物的组成,但损伤过的胶原蛋白明显地加快结晶成长速度。本来 II 型胶原蛋白对 HAP 生长表现抑制,但处理后都对矿化促进,伴随生长速度加快,结晶度也略为下降。大骨节病病人的骨关节异常可能与之有关。

参考文献

1. 王春霞等,自由基在大骨节病理过程中的作用, I 活性氧自由基和大骨节病病区腐植酸对 II 型胶原蛋白的损伤. 北京医科大学学报 1989; 21(4): 307
2. Naneollas GH, et al. The Growth of Hydroxyapatite Crystals, Archs. Oral Biol 1970; 15: 731.
3. Chen Chan-Chany, et al. Mechanisms of Proteoglycan Inhibition of Hydroxyapatite Growth. Calcif Tissue Int 1985; 37:395.
4. Blomenl. Growth and Agglomeration of Calcium - Oxalate Monohydrate Crystals, 荷兰 Leiden 大学博士论文 1982:10-17.
5. 李芳生等, 患儿红细胞膜膜构成的改变及其发病学意义. 1979~1982 永寿大骨节病科学考察文集, 1984:338-341. (中国科学院生态环境中心林国珍同志帮助测定固相 X 射线衍射, 谨此致谢。)

THE ROLE OF FREE RADICALS IN PATHOLOGICAL PROCESS OF KASCHIN-BECK'S DISEASE

II. Kinetic Studies on Growth of Hydroxyapatite Crystals in the Presence of Type II Collagen Damaged by Active Oxygen Radicals and Fulvic Acid in Epidemic Region of Kaschin-Beck's Disease

School of Pharmaceutical Sciences Wang Chunxia, Xu Shanjin

Research Laboratories of Natural and Biomimetic drugs Wang Kui

To clarify the effects of free radical damaged Type II collagen on the mineralization process in cartilage, the kinetics of crystal growth of hydroxyapatite in presence of collagen II from pig cartilage, intact and damaged by ·OH and fulvic acid from potable water in epidemic region. The experimental results show that the normal Type II collagen inhibits the crystal growth, which is characterized by a lower k_s value relative to that obtained in the absence of collagen. In case of the damaged collagens, the crystal growth is accelerated. Nevertheless, all the reactions are of second order. The X-ray diffraction analysis and SEM show that in all cases, the solid phases are attributed to hydroxyapatite, but the damaged Type II collagen causes the apatite of lower crystallinity and higher agglomeration. These results indicate that the abnormal biomineralization in abnormal cartilage matrix might be an important clue in pathological process in Kaschin-Beck disease.

Key words free radical Fulvic acid Collagen Mineralization Hydroxyapatite

(来源: 北京医科大学学报, 1989, 5: 393-396)

自由基在大骨节病病理过程中的作用

III. 自由基及黄腐酸对软骨细胞的损伤

北京医科大学药学院 张法浩 许善锦
天然药物及仿生药物实验室 王 斐

[摘要] 本文利用软骨细胞的体外培养技术研究了活性氧自由基及黄腐酸对软骨细胞的损伤效应。结果表明:在一定浓度的自由基和黄腐酸作用下,软骨细胞的生长受到了抑制,细胞形态及其合成分泌基质的能力也发生了明显的变化。本文对黄腐酸的自由基性质及大骨节病与软骨细胞损伤的关系进行了探讨。

关键词 自由基 黄腐酸 软骨细胞 大骨节病

大骨节病系以四肢关节软骨和骺板软骨病变为主的骨关节疾病,多发生在低硒,饮水中黄腐酸含量偏高的地区。近年来的研究报告^(1,2)提示自由基可能是大骨节病的致病因子。依据是大骨节病患者血液中GSH-Px活力和维生素E含量降低,而脂质过氧化产物含量升高。前文⁽³⁾工作提出了实验事实说明自由基对II型胶原蛋白造成了氧化性损伤,导致了氨基酸含量及胶原蛋白构象改变,并且用大骨节病区饮水中分离出的黄腐酸处理胶原蛋白时,也有类似的结果。

软骨细胞在软骨组织中具有重要的生理功能,软骨基质是由软骨细胞合成分泌的,因此软骨基质的正常的生理功能首先依赖于软骨细胞。但以前有关的工作很少涉及软骨细胞。本工作利用了软骨细胞的体外培养技术,研究了自由基及大骨节病区黄腐酸对软骨细胞的损伤效应,以进一步探讨大骨节病与自由基损伤的关系。

方 法

1. 试剂:HamF-10培养基(Cibco.Lab.),黄嘌呤氧化酶(XOD, Sigma),胰蛋白酶(上海生化试剂站),病区饮水中黄腐酸(来源及分离方法见前报⁽³⁾)。其它试剂皆为分析纯。

2. 软骨细胞的分离和培养:新鲜的受精来亨鸡蛋在38°C下孵化12天后,取出鸡胚,由长肢骨经胰蛋白酶消化后,分离出软骨细胞,以 40×10^4 个细胞/ml接种于培养瓶内。方法详见文献报道⁽⁴⁾。

在细胞培养24小时后,镜检各培养瓶软骨细胞生长状况,选择生长良好者随意分组,以后每二日换液一次。实验共分五组,计有:(1)正常对照组;(2)羟自由基组·OH(由 $\text{FeSO}_4 + \text{EDTA}$ 产生,各0.5 mmol/L);(3)超氧自由基组· O_2^- (由XOD+HX产生,XOD 0.1×10^{-3} 单位/ml, HX 0.1×10^{-3} mol/L);(4)黄腐酸组FA(15 ppm);(5)黄腐酸加羟自由基组FA+·OH(FA 15 ppm,·OH 0.5 mmol/L)。

3. 软骨细胞生长曲线测定及形态观察:

在倒置光学显微镜下观察软骨细胞的形态,主要从细胞群体的增长速度,单层细胞的形成情况和细胞大小,形状及细胞碎裂情况观察。然后弃去培养液,用缓冲液(Simms)轻轻洗涤一次,再用0.02%EDTA溶液消化20分钟,倾出EDTA溶液后加入1.0 ml Simms溶液,轻轻吹打细胞使其分散。用红血球计数板计数。

4. 基质中硫酸软骨素蛋白多糖(CSPG)

含量测定：从培养瓶中取出盖片，用甲苯胺兰异染 CSPG，比较各组细胞合成蛋白多糖的能力。

5. 培养液中胶原蛋白含量的测定：每次换液时，分别收集各组培养液，离心除去不溶物(1500 r/min)后，用 Bojkind 方法⁽⁵⁾测定其胶原蛋白含量。

结 果

1. 细胞生长速度：

图 1 是对照组和各实验组软骨细胞的生长曲线。可以看出，正常对照组软骨细胞生长 8 天时达到峰值，此时细胞密度为 0.9×10^6 细胞/ml，而生长液中加入氧自由基及黄腐酸后，一般在 10~12 天细胞生长才达峰值，并且密度也只有 $0.5 \sim 0.7 \times 10^6$ 细胞/ml。这说明了氧自由基和黄腐酸都明显地抑制了软骨细胞的生长和分裂。

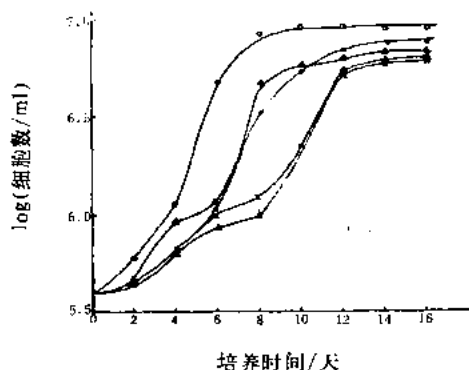


图 1 各组软骨细胞的生长曲线
 ○—○ 正常对照组
 △—△ 生长液中加入 XOD
 ×—× 生长液中加入 Fe-EDTA
 ●—● 生长液中加入 15 ppm FA
 ▲—▲ 生长液中加入 FA, Fe-EDTA

由图 1 还可见，与正常情况下的生长曲线相比，加入氧自由基和黄腐酸后，软骨细胞的生长似乎包含两个过程，首先表现出明显的抑制，至 6~8 天后又出现细胞生长的飞跃过程。这可能与软骨细胞对自由基损伤的适应性修复有关。

2. 软骨细胞形态及基质中 CSPG 含量变化(图略)。

正常对照组软骨细胞多呈圆形，大小均匀，24 小时后即可贴壁生长，在培养过程中细胞常聚集成团，散在细胞可呈短梭状伸突，核不清，三天前后可见到核和核仁位于细胞中央。三天后细胞迅速生长，胞体增大明显并饱满，大多形成团块，一周后基本形成单层，细胞形态以圆形或类圆形为主。基质经甲苯胺兰异染后，异染的程度很强，并且异染面积较大，说明正常对照组软骨细胞具有明显的合成分泌 CSPG 的能力。

各实验组软骨细胞生长缓慢，细胞间空隙增大，不聚集成团，圆形细胞减少，大多为梭形伸突和不整形细胞。除 FA 组外其它三组还发现有少量细胞解体。另外基质中甲苯胺兰异染程度较轻，特别 FA + ·OH 组基本未见异染。说明在自由基及黄腐酸作用之下，软骨细胞有明显的损伤，并且其合成分泌 CSPG 的能力也明显下降。

3. 软骨细胞合成胶原蛋白能力的变化：

图 2 表示了各组软骨细胞在实验条件下合成胶原蛋白的速度。由图 2 可见，软骨细胞在氧自由基和黄腐酸的作用下，其合成分泌胶原蛋白的能力明显高于正常对照组。由于胶原蛋白是基质中的一个主要成份，因此必然影响到基质的性质。

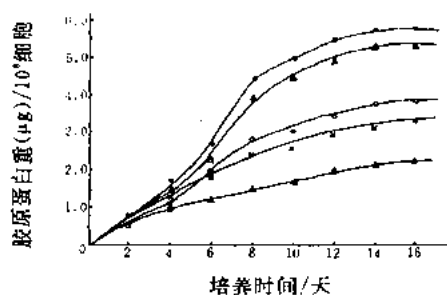


图 2 胶原蛋白的合成速度
 ▲—▲ 正常对照组
 ○—○ FA 组
 ●—● Fe-EDTA 组
 ×—× FA + Fe-EDTA 组
 △—△ $O_2\cdot^-$ 组

讨 论

在大骨节病的病因研究过程中，曾有报告

病区粮食和饮水中黄腐酸都可给出ESR信号⁽⁶⁾,提示了可能与自由基有关。本文报道的结果表明:病区饮水中黄腐酸对于软骨细胞形态,生长状况以及基质中胶原蛋白和CSPG含量的影响是与氧自由基的作用结果相同的或相似的,只是表现在程度上的差异。因此本文的结果支持了自由基作用的观点。

自由基对软骨细胞的作用首先表现在细胞形态和生长状况的改变,另外更重要的是表现在细胞功能的变化。软骨细胞在自由基作用下其合成分泌蛋白多糖和胶原蛋白的能力有了明显的变化,由于胶原蛋白和蛋白多糖是软骨基质中的两个主要成份,骨的强度,关节软骨的弹性,防止软骨内过早的HAP结晶生长,保证正常的有序的化骨,胶原蛋白和蛋白多糖都起着重要的作用。因此,基质中这两种主要成

份含量的改变,必然引起软骨基质生理功能的变化并导致软骨疾病的发生和发展。大骨节病人的软骨系统老化和过早化骨可能就与基质中蛋白多糖的含量下降有密切的关系。

参 考 文 献

1. 侯少范等,我国大骨节病区人群硒营养状态的研究,中国地方病学杂志 1982; 1:84.
2. 彭安,大骨节病三种病因说间的关系初探,中国地方病学杂志 1986; 2(3):151.
3. 王春霞等,活性氧自由基和大骨节病区腐植酸对II型胶原蛋白造成的损伤,北京医科大学学报 1989;21(4):307
4. 王维哲等,胎鸡肢长骨软骨细胞培养方法的研究,中国地方病学杂志 1982; 1:271.
5. Bojkind M, et al. A Quick and Specific Assay for Hyaloxypolin. Analytical Biochemistry 1973; 55:288.
6. 王文华等,大骨节病区水和土中腐植酸的研究,第三次全国腐植酸学术讨论会文集 1984; 290.

THE ROLE OF FREE RADICAL IN PATHOLOGICAL PROCESS OF KASCHIN-BECK'S DISEASE III. THE DAMAGES TO CHONDROCYTES BY FREE RADICALS AND FULVIC ACID

School of Pharmaceutical Sciences Zhang Fahao, et al

We have cultivated chicken embryo chondrocyte in vitro and studied the damaging effects of free radicals and fulvic acid on chondrocytes. The results indicated that under the action of free radicals and fulvic acid the growth rate of chondrocyte was inhibited, also the morphology of chondrocyte and the capability of matrix synthesis have been changed. We also discussed the nature of free radical about fulvic acid and the relationship between the damage of chondrocyte and Kaschin-Beck's disease.

Key words Free Radical Fulvic acid Chondrocyte Kaschin-Beck's Disease

(来源:北京医科大学学报,1989,6:493-495)

腐植酸钠治疗兔传染性口炎

内蒙古畜牧科学院兽医院 梁升跃

呼和浩特市兽医工作站 白永贵

兔传染性口炎是一种病毒性传染病，主要发生于1—3月龄仔兔和幼兔，死亡率很高。例如呼市某医院动物室1980年自繁仔兔66只，发病45只，发病率为68.18%；病兔45只全部死亡。我们应用腐植酸钠治疗病兔的效果满意。

一、临床症状：病初患兔口腔粘膜充血发炎，流少量口水，食欲减少，尔后口腔粘膜出现白色伪膜，脱落后形成溃疡，口腔疼痛，流多量粘涎，食欲明显减少或废绝，最后发生下痢，体质极度衰弱，一般在5—10天内死亡。

二、治疗方法：1.应用3%腐植酸钠液冲洗口腔，每天上、下午各一次。2.对拉稀患兔灌服3%腐植酸钠液5—10毫升，每天

两次。3.对患兔进行隔离，饲喂柔软草料。应用腐植酸钠治疗病兔28只，治愈26只。死亡2只，治愈为92.86%。一般经3—5天可治愈。

（来源：中国兽医杂志，1989，12：37-38）

自由基在大骨节病病理过程中的作用

IV. 在自由基及黄腐酸作用下软骨细胞合成的异常胶原蛋白

北京医科大学药学院 张法浩 许善锦
天然药物及仿生药物实验室 王 蒙

〔提要〕 本文利用 CMC 柱层析和氨基酸分析的方法,研究了体外培养的软骨细胞合成分泌的胶原蛋白的特征。结果表明,自由基和黄腐酸损伤的软骨细胞趋于合成 I 型胶原蛋白,以代替软骨正常基质中的 II 型胶原蛋白,并且由损伤的软骨细胞合成的胶原蛋白其氨基酸组成也不同于正常的胶原蛋白。

关键词 自由基 黄腐酸 软骨细胞 胶原蛋白

前文⁽¹⁾工作提出的实验事实说明,自由基和黄腐酸可引起软骨细胞的损伤,其合成分泌基质的能力也发生了明显的改变。细胞外基质的这些量的改变固然可影响软骨组织的功能,但更重要的是基质的结构和性质是否有改变?近年来有文献报道⁽²⁾在患骨关节疾病或关节软骨受到损伤时,关节软骨的变性表现为软骨细胞由合成软骨组织特异的 II 型胶原蛋白转化为合成 I 型胶原蛋白,同时 CSPG 的代谢停止。大骨节病人的软骨是否也有类似的变化?至今未见报道。本工作提取了用病区饮水中黄腐酸和自由基损伤的软骨细胞合成的胶原蛋白,并用 CMC 柱层析和氨基酸分析的方法对提取的胶原蛋白进行了组成分析和分型,得出了有价值的结果。

方 法

一、试剂:HamF-10 培养基(Cibco Lab.),黄嘌呤氧化酶(XOD Sigma),I 型和 II 型胶原蛋白(由小牛腱提取, Sigma),病区饮水中黄腐酸(来源及分离方法见前报⁽³⁾),其它试剂皆为分析纯。

二、仪器:UV-120 紫外-可见分光光度计(岛津),835-50 型氨基酸自动分析仪(H立)。

三、胶原蛋白的分离提取:在大量收集的软骨细胞培养液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至浓度为 25%, 4°C 下放置 24 小时, 10,000 r/min 离心 30 分钟,将沉淀溶于 0.5 mol/L HAc (含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 胃蛋白酶)中, 4°C 放置 48 小时, 2000 r/min 离心除去不溶物,加 NaCl 于上清液中至 2 mol/L, 4°C 放置 24 小时, 20,000 r/min 离心 30 分钟,沉淀溶于 0.5 mol/L HAc 中,透析,冷冻干燥,得胶原蛋白。

四、胶原蛋白的 CMC 柱层析和氨基酸分析:

将 5 mg 胶原蛋白溶于 5.0 ml pH 为 4.8 的缓冲液中,在 42°C 下予热 30 分钟后,将此溶液滴加在 CMC 层析柱上(柱高 12 cm,直径 1.2 cm,柱温 42°C),开始梯度洗脱(30 ml/小时, 3.4 ml/份),洗脱液由紫外分光光度计检测 230 nm 处光吸收值。详细方法见文献⁽⁴⁾。

0.5 mg 胶原蛋白溶于 0.5 ml 6 mol/L HCl 中,通氮气并封口,在 110°C 下加热水解 10 小时,溶液慢慢蒸干,将残渣溶于 0.02 mol/L HCl 中,用自动氨基酸分析仪进行氨基酸分析。

结 果

一、胶原蛋白的分型变化:

胶原蛋白具有多种类型,但皆是有三条 α 链(亚基)组成的,其类型的不同表现在其 α 链的组成不同。II型胶原蛋白三条 α 链组成相同,其结构表示为 $[3\alpha_1(\text{II})]$,而I型胶原蛋白分子中含有两种 α 链(α_1 和 α_2),其组成为 $[2\alpha_1(\text{I})\alpha_2(\text{I})]$ 。因此,在变性解聚的条件下(42°C ,加热30分钟),I型和II型胶原蛋白应有不同的CMC柱层析洗脱峰图。本文首先作了标准胶原蛋白的CMC柱层析(图1),由图1可见,I型胶原蛋白为二个洗脱液吸收峰,分别对应于 α_1 和 α_2 亚基,而II型胶原蛋白只有一个吸收峰,对应于 α_1 亚基。在相同的条件下,本文做了由软骨细胞培养液中提取分离的胶原蛋白的CMC柱层析(图2),结果表明,

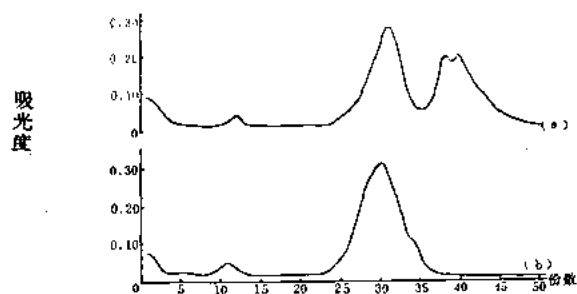


图1 标准胶原蛋白的CMC柱层析图
(a) I型胶原蛋白 (b) II型胶原蛋白

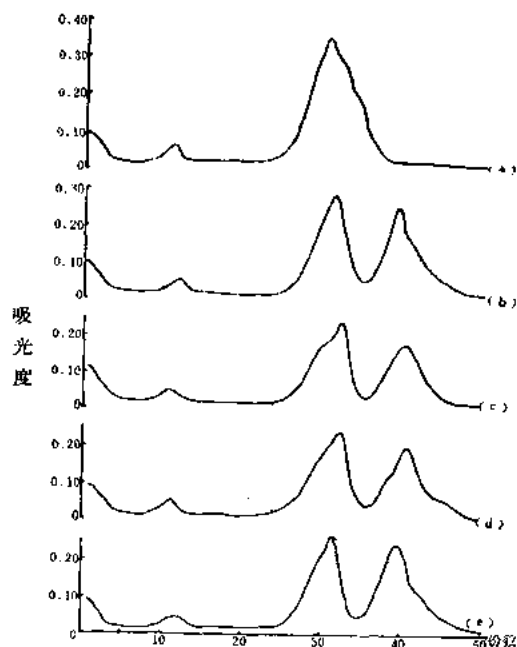


图2 由细胞培养液中提取胶原蛋白的CMC柱层析图

(a) 对照组 (b) FA损伤组
(c) $\cdot\text{OH}$ 损伤组 (d) $\cdot\text{O}_2$ 损伤组
(e) $\text{Fe} + \cdot\text{OH}^-$ 损伤组

在自由基($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2$)和黄腐酸(FA)作用下,受损伤的软骨细胞合成的胶原蛋白中含有相当多的I型胶原蛋白。

二、胶原蛋白氨基酸组成变化;测得结果

表 各种胶原蛋白的氨基酸组成(残基数/1000个总残基)

氨基酸	对照组	Fe-EDTA组	XOD组	FA组	FA/Fe-EDTA组	I型胶原	II型胶原
Asp	48.8	46.6	50.6	50.7	47.2	45.7	36.0
Thr	20.9	20.5	20.7	20.7	18.8	18.0	24.0
Ser	32.0	39.6	40.4	41.3	38.9	33.0	21.0
Glu	102	72.2	85.8	87.8	82.0	74.5	87.0
Gly	281	279	272	268	274	330	335
Ala	114	126	122	122	123	114	101
Val	20.0	26.9	28.3	27.6	26.4	24.3	18.0
Met	7.9	4.4	4.4	3.2	2.0	5.1	9.0
Ile	8.9	10.2	10.0	9.6	9.2	10.8	10.0
Leu	25.9	24.1	25.6	25.2	23.4	24.3	26.0
Tyr	4.6	6.0	6.0	5.7	4.3	2.5	3.0
Phe	12.2	13.3	11.9	12.3	14.0	12.4	12.0
Lys	15.6	27.8	28.3	27.7	29.5	24.7	19.0
His	3.8	5.4	6.0	6.1	5.5	6.0	4.0
Arg	53.0	52.5	52.0	51.5	53.2	49.7	52.0
HyPro	81.0	84.2	83.8	85.1	88.8	112	98.0
Pro	163	156	150	150	155	116	126

见表。

为了便于比较,表中列入了我们在相同条件下测定的标准I型和II型胶原蛋白的氨基酸组成。由表中数据可见,与对照组比较在自由基和黄腐酸作用下,软骨细胞合成的胶原蛋白其氨基酸组成发生了明显的变化,各实验组的变化趋势是相同或相似的,并且由标准胶原蛋白的氨基酸组成可见,这种变化的趋势与胶原蛋白的转型变化是一致的。

讨 论

本文结果表明,黄腐酸和 $\cdot\text{OH}$ 及 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基均能造成鸡胚软骨细胞损伤。由如此损伤的软骨细胞分泌出的胶原蛋白是异常的。异常主要表现为含有很多的I型胶原蛋白,不只CMC柱层析图证明了这一结果,氨基酸组成的变化,也支持有I型胶原蛋白形成的结论。应当指出,在含自由基源(包括FA)的培养液中培养软骨细胞时(相当于软骨细胞在体内受到细胞外自由基进攻时),除去因软骨细胞损伤

导致基质蛋白异常外,也应或多或少地有自由基直接损伤蛋白质的效果。但从氨基酸组成看,并与前文⁽³⁾比较,可见氧化性降解不是造成损伤的主要原因。显然,这种胶原蛋白的异常是细胞介导的。另外,I型和II型胶原蛋白在胶原纤维的组成方式、结构和性质上有着较大的差异⁽⁵⁾,当软骨细胞分泌出较多含量的异常的I型胶原蛋白时,必然引起软骨组织的性质和功能的变化,导致软骨疾病的发生。

参 考 文 献

1. 张法浩等. 自由基及黄腐酸对软骨细胞的损伤. 北京医科大学学报 1989; 21(6):493.
2. Nimni M, et al. Differences in collagen Metabolism between Normal and osteoarthritic Human Articular Cartilage. Science 1973; 181:751.
3. 王春霞等. 活性氧自由基和大骨节病区腐植酸对II型胶原蛋白造成的损伤. 北京医科大学学报 1989; 21(4):307.
4. Piez K A, et al. The chromatographic separation and amino acid composition of the subunits of several collagens. Biochemistry 1963; 2(1):58.
5. Linsenmayer T F. Collagen. In cell Biology of Extracellular matrix. Elizabeth, D. Hay eds., Plenum. Press New York. 1981:5.

THE ROLE OF FREE RADICALS IN PATHOLOGICAL PROCESS OF KASCHIN-BECK'S DISEASE IV. THE ABNORMAL COLLAGEN SYNTHESIZED BY CHONDROCYTES UNDER THE ACTION OF FREE RADICALS AND FULVIC ACID

School of Pharmaceutical Sciences Zhang Fahao, et al

By means of CMC chromatography and amino acid analysis we have studied the characteristics of collagens synthesized and secreted by the cultivated chondrocytes. The results indicated that the free radicals and fulvic acid damaged chondrocytes tend to synthesis Type I collagen instead of Type II, which is secreted by the intact chondrocytes. The amino acid composition of the collagen synthesized by damaged chondrocytes are different from the normal collagen.

Key words Free radical Fulvic acid Chondrocyte Collagen

(来源: 北京医科大学学报, 1990, 1: 59-61)

大骨节病病区环境中有机物的生物效应研究

王维哲 由胜志 王晓颖 董 瑶

(辽宁省基础医学研究所)

提要 用甘肃省天水大骨节病区粮和100ppm FA水喂养SD种大鼠幼鼠4个月,动物血液和心肝、肌肉的GSH-Px活力十分显著降低;血液和肝、心的SOD活力显著升高,肌肉没有改变;肝、心的LPO量显著增多,心肌减少。饮水中加0.1ppmSe,血液和各组织GSH-Px活力明显升高,LPO量也趋向正常,但极少改变已升高的SOD活力。无机硒的效应优于有机硒。

关键词 大骨节病 富里酸(FA) 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 超氧化物歧化酶(SOD) 脂质过氧化物(LPO)

在大骨节病研究中,“膜损伤”理论^[1]已由环境中的主要有机质腐植酸组分引起培养人胚软骨细胞损伤,同时伴有GSH-Px活力低下,合成基质减少所证实^[2,3]。这些损伤效应可由补适量硒加以阻止^[4]。这就从实验医学进一步确定了大骨节病的病因是环境中的有机物质,其病理机制是过氧化损伤,但有机物的过氧化损伤效应,其始动机制究竟是自由基还是有氧功能团,二者间的关系尚不清楚。本文用病区粮、腐植酸水制备疾病模型,对病因和上述问题做了进一步探讨。

实验方法

1. 主要检品和试剂 病区粮是1986年甘肃省天水地区产,玉米/小麦为1/4,磨成粉,再加入芝麻2%,NaCl 1%,混匀,制成块料食用。非病区粮为辽宁省北镇县产,按同法制成块料作对照食用。根据国际会议规定程序提取富里酸(FA),溶于蒸馏水成100ppm,供饮用。

2. 实验过程 体重50±5g的SD种大鼠幼鼠48只,雌雄各半,分6组进行饲养,①非病区组饲北镇粮,FA水;②病区组,饲天

水粮FA水;③病区水组,饲天水FA水,北镇粮;④病区粮组,饲天水粮、北镇FA水;⑤和⑥为补硒组,分别在病区组的FA水内加入无机硒(Na_2SeO_3)和有机硒(硒-硫酸软骨素,由中科院生态中心提供)0.1ppm。经4个月,断头杀死大鼠,取血液和心、肝、腓肠肌组织,用中国医科院修改的Halem an法检测GSH-Px活力,邻苯三酚自氧化学检测SOD活力,巴比妥酸荧光法(TBA)测定LPO量。

实验结果

(一) 血液的酶活力比较

与非病区相比,病区组大鼠血液SOD活力升高、GSH-Px降低都十分显著。主要由病区粮引起,100ppmFA水的效应不显。(见表1)。

表1 病区粮、FA水对血液酶活力的影响(U/ml)

组别	SOD		GSH-Px	
	M±SE	P	M±SE	P
非病区组	372.5±21.2		19.92±1.04	
病区组	459.2±12.6	<0.001	5.06±0.39	<0.001
病区水组	401.9±26.7	>0.05	20.66±0.79	>0.05
病区粮组	438.2±25.7	>0.05	13.21±7.01	<0.05

(二) 各组织的酶活力比较

相比较, 病区组动物的心肌、肝SOD活力显著升高、GSH-Px活力十分显著降低。

但肌肉只见有GSH-Px活力显著降低,SOD

没有变化,LPO量则是心肌减少, 肝增多, 肌肉增多更为显著。上述改变, 病区粮的效应明显大于100ppmFA水(见表2)

(三) 硒对病区组动物酶活力的影响

表2 病区粮、FA水对组织酶活力和LPO量的影响

组织与组别	SOD(U/g)		GSH-Px(U/g)		LPO(nmol/g)	
	M±SE	P	M±SE	P	M±SE	P
心肌						
非病区组	415.3±5.6		901.3±67.2		6038±494	
病区组	453.6±14.0	<0.05	355.1±17.9	<0.001	3473±334	<0.001
病区水组	406.2±8.3	>0.05	922.8±45.5	>0.05	5498±895	>0.05
病区粮组	459.0±43.0	≈0.05	441.8±129.0	<0.05	2547±1183	<0.05
肝						
非病区组	1636±37		384.3±17.0		2314±436	
病区组	1854±41	<0.01	111.2±14.0	<0.001	4434±572	<0.05
病区水组	1534±32	>0.05	409.3±55.3	>0.05	2331±388	>0.05
病区粮组	1443±69	<0.05	96.8±6.8	<0.001	3748±1980	>0.05
肌肉						
非病区组	223.8±10.1		146.6±23.9		1096±140	
病区组	232.1±19.6	>0.05	59.5±4.6	<0.01	1932±149	<0.01
病区水组	262.8±23.1	>0.05	184.8±50.3	>0.05	1426±336	>0.05
病区粮组	183.5±23.8	>0.05	48.0±10.5	<0.05	1608±102	>0.05

饮水中加入0.1ppm硒, 对病区组动物的影响如表3所示; 血液SOD活力回降; 但组织SOD活力仍然升高。对LPO量有调节作用,

心肌LPO量增多, 肌肉和肝的LPO量减少, 近于非病区组值, 但硒十分显著增加GSH-Px活力, 甚至超过非病区组值。

表3 硒对病区组动物酶活力和LPO量的影响

组织与组别	SOD		GSH-Px		LPO	
	M±SE	P	M±SE	P	M±SE	P
血液						
病区组	459.2±12.6		5.06±0.39			
无机硒组	380.6±20.1	<0.01	33.26±1.22	<0.001		
有机硒组	416.8±14.1	≈0.05	20.89±1.41	<0.001		
心肌						
病区组	453.6±14.0		355.1±17.9		2473±334	
无机硒组	448.5±6.2	>0.05	915.2±14.4	<0.001	7777±295	<0.001
有机硒组	447.5±27.7	>0.05	820.7±67.5	<0.001	3374±348	>0.005
肝						
病区组	1854±41		111.2±14.0		4434±572	
无机硒组	1726±15	>0.05	568.6±85.7	<0.001	3768±718	>0.05
无机硒组	1670±78	<0.05	411.5±53.4	<0.001	3133±516	>0.05
肌肉						
病区组	232.1±19.6		59.5±4.6		1932±149	
无机硒组	274.4±10.3	>0.05	294.3±26.8	<0.001	1551±360	>0.05
有机硒组	218.7±12.9	>0.05	67.3±26.0	>0.05	1212±28	<0.01

讨 论

在生物各组织的有氧代谢中, 自由基和它引起的连锁反应是生命活动所必需的, 通过单电子转移, O_2 不断产生, $O_2^{\cdot -}$ 继续生成 H_2O_2 和其它氧自由基, 由它们氧化有机大分子(主要是膜的不饱和脂肪酸)生成超量过氧化物可引起细胞“膜损伤”^[6]。现已证明老化、肿瘤、氧中毒、辐射损伤及心血管、肺、肾等许多疾病的发生与自由基催化的过氧化损伤有关^[6, 7]。

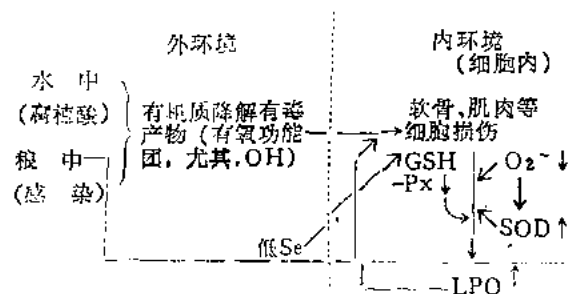
SOD和GSH-Px是机体发展起来的抗氧化防卫机制中的两种主要酶类。SOD是专一清除 $O_2^{\cdot -}$ 阻止 $\cdot OH$ 和 O_2 生成的酶。而GSH-Px的主要作用是清除脂质过氧化物和 H_2O_2 ^[5]。动物喂养病区粮, FA水4个月, 血液和肝、心肌的SOD活力升高表明机体 $O_2^{\cdot -}$ 增多, 自由基反应增强。血液和各组织的GSH-Px活力十分显著低下, 势必影响组织清除过氧化物能力, 为病区粮、FA的病因而的持续作用创造条件。适量补硒能阻止GSH-Px活力下降。已证实腐植酸引起软骨细胞损伤同时, 伴有GSH-Px活力降低^[8, 9]; 因此, 病区粮的GSH-Px下降既可由缺硒(天水粮为 $8.1 \pm 1.1 \mu g/kg$, 北镇粮为 $46.8 \pm 1.5 \mu g/kg$, GSH-Px是含硒酶)引起, 也可能是粮食感染微生物(尤其霉菌)后产生的有毒降解产物^[8]中毒的结果。这样, 本研究就从动物实验方面进一步证明了大骨节病的有机质中毒说及其过氧化损伤机制。

一般在 $O_2^{\cdot -}$ 生成增多情况下, SOD活力也相应地升高。^[8]它可能是一种防卫性代偿反应表现。这种自由基反应增强, 是外源性有机质固有的还是在有机质进入机体后续发产生的, 还不十分清楚。但它无疑地会发动组织细胞的脂质过氧化反应, 加重病理过程。和GSH-Px活力降低比较, SOD升高不稳

定, 自由基反应增强的病理作用可能是次要的。而主要是有机质中有氧功能团(尤其是 $-OH$)作用的结果^[2, 3], 将病区腐植酸乙酰化, 封闭 $-OH$ 后, 其所有上述影响消失尚未发表), 使我们更加确信上述结论是正确的。

应当指出, 肌肉的SOD和GSH-Px活力都明显低于其它组织, 在病区粮、FA水的作用下, GSH-Px活力显著降低, SOD活力不升高, LPO量显著增多, 可能是它易遭受有机质有毒降解产物损伤的原由。这与大骨节病经常发生肌肉萎缩一致。

综合以上, 归纳有机质致大骨节病发生示意图如下:



1. 大骨节病是由病区粮和水中有有机质降解有毒产物引起的“膜损伤疾病”。

2. 有氧功能团(尤其是 $-OH$)致软骨、肌肉等细胞损伤, GSH-Px降低起主要作用。缺硒使GSH-Px活力下降可为这种损伤创造必要条件。

3. 自由基反应增强可加强这一病理过程。它的影响大小取决于SOD活力。

参 考 文 献

1. 李芳生, 等。患儿软骨病变的分子生物学特征和病因探讨永寿大骨节病科学考察文集北京: 人民卫生出版社, 1984: 338~344。
2. 王维哲, 等。水中有有机质致大骨节病的实验研究。环境科学 1987; 8(5):27。1989; 10(1):16
3. 王维哲。大骨节病的有机物病因及其作用机理。中国环境科学 1989; 9(3):191。

4. 王维哲,等. 硒和维生素E在富里酸损伤软骨细胞中的作用. 中国地方病学杂志 1987; 6(4):199.
5. Leibovitz BE and siegel BV1 Aspects of free radical reactions in biological system Aging J Geront. 1980;35(1):45.
6. 周玫,等. 自由基的产生及其在某些疾病发生中的作用. 中国病理生理杂志 1987; 3(3):176.
7. 中华医学杂志编委会. 脂质过氧化与疾病专题座谈会纪要. 中华医学杂志 1987;67(13):611.
8. Seitr LM Alterneria metabolitis sce Betina V. Mycotoxins Prodaction, Isolation separation and Parification Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam 1984;443-455.
9. Fridovich I Biological effects of the superoxide radical Arch Biochem Biophys.1986;247(1):1.

〔编辑 张桂兰〕

STUDY ON BIOLOGICAL EFFECTS OF ORGANIC SUBSTANCES IN THE KBD REGION ENVIRONMENT

Wang Weizhe et al

ABSTRACT

The young rats of wistar strain fed four months with KBD region grains and fulvic acid (FA, 100 ppm in drinking water), then we measured SOD and GSH-Px activities and LPO amount in the blood, heart, liver and muscle. In comparison with the control group, they caused significantly decrease of GSH-Px activity and increase of LPO amount, but, the SOD activities, except muscle, are much higher than those of control group. Above-effects apart from the changes of SOD activity should be prevented by added 0.1 ppm Se into water.

In discussion on KBD pathogenesis, we have concluded that the decrease of GSH-Px activity in tissues exert essentially important effects, but the increase of SOD activity may be a compensatory reaction due to superoxide anion radical(O_2^-).

(来源: 中国地方病防治杂志, 1990, 1: 15-18)

自由基引发的软骨细胞异常基质异常矿化异常

——大骨节病病理化学过程初探

王夔 许善锦 张法浩 王春霞 程天蓉 常淑云

吴 兰 章净霞 杨正红 苏雅娟

(北京医科大学药学院)

张健英

(沈阳药学院)

提要 本文研究了自由基和黄腐酸对软骨细胞的损伤效应。结果表明自由基和黄腐酸可引起软骨细胞损伤。这种损伤的软骨细胞分泌异常基质,在异常基质中,羟基磷灰石的矿化异常,并在此基础上,提出了一个大骨节病的病理化学过程。

关键词 软骨细胞 胶原蛋白 矿化

大骨节病病因学研究目前集中于三种假说:环境低硒、水中有机物中毒和粮食镰刀菌污染。由于主要依据为地方病调查结果,没有从机理上解释因果关系,特别是从分子水平描述病理过程,因而不能做出深入而概括的论证。我们以为大骨节病病理过程包括以下几步:

1. 外源性自由基源(腐植酸、霉菌毒素等)引发软骨细胞异常;
2. 异常软骨细胞合成并分泌异常细胞外基质;
3. 在异常基质中发生异常生物矿化;
4. 异常生物矿化造成骨骼异常;
5. 自由基同时导致软骨细胞坏死。

本报告将概括我们近年来为探索与以上假设有关的实验结果,这些结果从各个角度支持上述病理过程,而这一过程能够把现有各种病因说概况为一个统一模型。

实验结果及有关结论

(一)人工自由基源黄腐酸对鸡软骨细胞的作用

对软骨细胞造成影响的自由基可以是环境中固有的(如腐植酸),也可以是外源性物质体内代谢时产生的,往往先形成活性氧自由基($\cdot\text{OH}$ 及 $\cdot\text{O}_2^-$ 等),再产生有机自由基。我们用 $\text{FeSO}_4 + \text{EDTA}$ 产生 $\cdot\text{OH}$,用黄嘌呤氧化酶(XOD)+次黄嘌呤(HX)产生 $\cdot\text{O}_2^-$,并从病区(高家窑)饮水中用离子交换法提取黄腐酸,该黄腐酸测得有ESR信号。在鸡胚软骨细胞培养液中加入上述自由基源,观察软骨细胞的变化,可见:^{〔1〕}

1. 所有情况均见细胞损伤、死亡以及退化的梭状和伸突状变化。形态学变化相似。

2. 测定了在有自由基 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ 或黄腐酸存在下软骨细胞生长曲线。均表现为开始的强抑制而后又恢复的双时相过程,黄腐酸表现较弱。

3. 与抑制细胞生长的同时,用测定水解后羟脯氨酸的分光光度法测定培养液中的胶原蛋白含量,结果表明 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ 及黄腐酸均促进胶原蛋白的合成,而且也表现

双相过程,而且与细胞生长抑制变化相关。

4. 用甲苯胺蓝染色法估计细胞外基质中的硫酸软骨素蛋白多糖含量,所有自由基源均使蛋白多糖量减少。

5. 进一步研究剂量效应关系时,用黑龙江绥棱病区饮水黄腐酸不同量加入培养液,测定软骨细胞及基质的 ^{35}S -Chs掺入率, ^{35}S -Chs转换率和Chs量,用以衡量细胞功能。结果表明黄腐酸使软骨细胞三项指标均降低,而且抑制程度随黄腐酸浓度增加而增加。基质中 ^{35}S -Chs掺入率及转换率有些增加,Chs总量降低。与之比较, $\cdot\text{OH}$ 处理使软骨细胞及基质中的 ^{35}S -Chs掺入率及 ^{35}S -Chs转换率均大幅度降低。

6. 用亚油酸法和卵磷脂脂质体法测定脂质过氧化程度时,病区(高家窑)黄腐酸不能引起脂质过氧化。但能使细胞膜和线粒体膜脂质过氧化。提示细胞系统与黄腐酸协同作用产生活性氧引起脂质过氧化的可能。用黄腐酸+ $\cdot\text{O}_2^-$ 处理脂质体或亚油酸,可见更大程度的脂质过氧化,提示黄腐酸使活性氧增殖的可能。

7. ^{45}Ca 掺入实验结果表明 $\cdot\text{OH}$ 使 Ca^{2+} 流入大大增加,提示脂损伤,但15ppm黄腐酸未见明显差异。

现在正在用非病区腐植酸及各种真菌毒素研究对细胞影响。初步结果提示毒素影响较明显,病区和非病区腐植酸的作用似无差异而某些毒素的损伤性更为显著。

(二) 在自由基及黄腐酸影响上培养的异常软骨细胞所合成的异常胶原蛋白^[2]

用上述方法,在 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 或高家窑饮水黄腐酸存在下,培养鸡胚软骨细胞。按Кленчер法^[3]从培养液中分离胶原蛋白。纯制后,进行其组成分析。其主要结果有以下两点。

1. 用cMe层析法分离纯制后的胶原蛋白,在 $\text{PH}4.8\text{NaAc}$ -尿素缓冲体系中, NaCl 梯度洗脱。柱温 42°C 。分光光度法检测230nm吸光度。同时做I型及II型胶原蛋白的标准洗脱曲线。结果表明,在所有情况下,软骨细胞合成的胶原蛋白由II型变成I型,至少大部分如此。

2. 对分离出的胶原蛋白水解后用自动氨基酸分析仪进行氨基酸组成分析。可见氨基酸组成变化,其中最突出的是Lys、Ala、Ser、Val、His等的增加,Glu、Met等的降低,支持合成的胶原蛋白由II型转为I型。

用凝胶电泳法可以代替以下分型判断方法,而且可以定量的表示胶原蛋白中I/II型之比。因此,可以认为自由基及黄腐酸使软骨细胞退化,而退化的细胞合成I型胶原蛋白。

(三) 自由基和黄腐酸可以直接损伤胶原蛋白^[4,5]

由于自由基源由细胞外进攻软骨细胞时,它们有可能同时对已经形成的基质造成损伤。为此,我们分别从猪肋及肩胛软骨和兔皮分离纯制II型及I型胶原蛋白,然后用前述 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 及高家窑饮水黄腐酸处理后,进行一系列测定,得到以下结果:

1. 氨基酸组成发生变化,突出特点是羟脯氨酸含量明显下降,而Glu明显增加。提示发生氧化性降解,主要是羟脯氨酸(或脯氨酸)发生氧化性开环,产生末端Glu。

2. 在 $\text{PH}7.40$ (Tris)、 0.1M 介质中测定未经和经 $\cdot\text{OH}$ 自由基和黄腐酸处理的胶原蛋白(I型)溶液的圆二色散谱,并据此计算 α 螺旋含量。结果表明各处理均使 α 螺旋减少,即有序性降低,且有剂量依赖关系。

3. 同上用 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 或黄腐酸处理的胶原蛋白的溶解曲线(分光光度法测

定)特征及溶解温度未变,但吸光度却比对照小。

4. 测定各种处理后的胶原蛋白的凝胶化曲线,并测定了凝胶化速度和程度。结果表明 $\cdot\text{OH}^-$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 及黄腐酸都有抑制凝胶化作用,与剂量有关。

5. SDS—PAGE研究结果提示 $\cdot\text{O}_2^-$ 及 $\cdot\text{OH}$ 使胶原蛋白降解,而黄腐酸作用不明显。自兔皮提取的Ⅰ型胶原蛋白有类似损伤。

总结以上各点说明人工自由基、腐植酸使软骨细胞损伤,死亡和退化。这些异常细胞合成Ⅰ型胶原蛋白,而自由基又通过直接作用使基质氧化,最后构成一个以富Ⅰ型胶原蛋白、低蛋白多糖、分子量分布低的异常基质。

(四) 异常基质蛋白对矿化的影响^[5-7]

用恒PH (PH=7.4) 通过监测羟基磷灰石晶种在含 Ca^{2+} 及 PO_4^{3-} 过饱和溶液成长过程中的 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 浓度变化,由矿化曲线可以计算反应级数,反应速度常数等反映矿化速度的动力学参数。对形成的固相可经X粉末衍射鉴定其组成和结晶性。通过逆向扩散凝胶结晶形成法可以观察结晶形成速度和成长速度。采用上述方法研究Ⅰ型和Ⅱ型正常和异常胶原蛋白存在下的矿化过程,得以下结果。

1. 未损伤的Ⅰ型胶原蛋白使矿化速度减慢,外推的极限固相形成量减少(无限时间活度积变大)。而未损伤的Ⅰ型胶原蛋白促进矿化。这是软骨与骨形成与维持的基本原因之一。无论Ⅰ型和Ⅱ型胶原蛋白的加入都不改变反应级数($n=2$),也不改变固相组成。

2. 自由基及黄腐酸直接损伤的Ⅰ型胶原蛋白的抑制矿化作用大大减小,接近未加胶原蛋白时的速度。直接损伤的Ⅰ型胶原蛋白的促进矿化作用比正常状态更强。反应级

数仍无改变。

3. 用逆流扩散法观察及Canter计数器测定粒度,可知在自由基损伤的Ⅰ型胶原蛋白介质中形成的晶粒变小,但聚集增加。SEM也支持这一点。

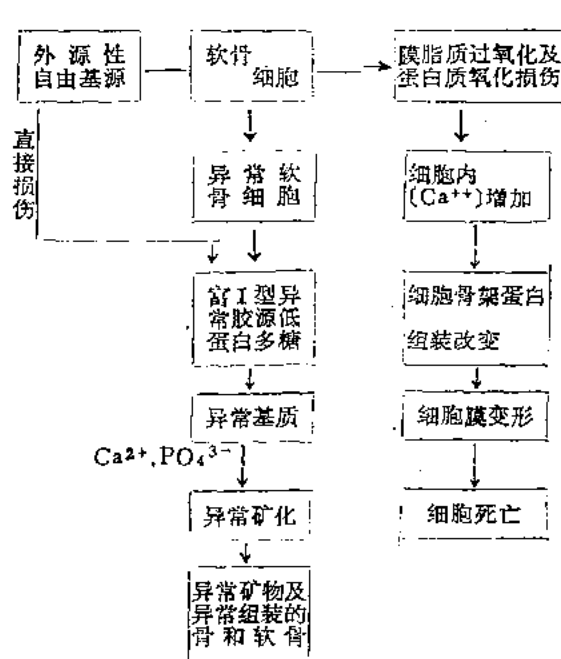
4. 固相的SEM及X射线粉末物相分析表明直接损伤的Ⅰ型胶原蛋白使结晶度降低,但随时间延长可有一定程度改善。

5. 从自由基或黄腐酸影响下生长异常细胞的培养液中分离出异常胶原蛋白。这种蛋白表现促进矿化作用。酸黄腐存在下的矿化曲线呈台阶形。SEM可见有聚集成片的结晶,说明晶体向非紧密聚集方面转化。

以上结果说明,异常基质造成异常矿化,特点是:矿化快,粒度小而聚集度高,结晶度低。这或与早期化骨、关节变形有关。

(五) 动物实验结果支持上述论点

为把体外各种实验与体内各种过程联系起来,本项目组联合在辽宁基础所进行了一次动物实验,包括用天水(病区)粮和水与沈阳北镇(非病区)粮和水饲养小鼠,观察软骨及骨的变化。本实验组负责从软骨分离



基质胶原蛋白,测定I/II型比。用电泳法测得结果表明病区粮和水的加入确实使I/II比增加,而且加入 Na_2SeO_3 及有机硒后,又使I/II比减小。另外,生态环境中心与我们一起用顺磁共振法测出病区粮水使骨及软骨ESR信号增强,而加硒能抑制。结果还都说明粮的影响大于水(当然与有害物的质和量以及粮和水中的共存物有关)。

用真菌毒素做的实验正在进行中,初步结果显示类似。

把上述结果综合起来,我们提出以上病理化学过程。

参 考 文 献

1. 张法浩,等.北京医科大学学报 1988;24(6):507
2. 张法浩,等.北京医科大学学报 1989;25(1):90
3. K.E.KNeHNer et al J cell Biol 1982;93:751—57.
4. 王春霞,等.北京医科大学学报 1988;24(4):307
5. 张健英,等.北京医科大学学报 1989;25(3):287
6. 王春霞,等.北京医科大学学报 1988;24(5):405
7. 张法浩,等.北京医科大学学报 1989;25(2):103

[编辑 张桂兰]

ABNORMAL CHONDROCYTE, MATRIX AND ABNORMAL MINERALIZATION INDUCED BY FREE RADICAL

Wang Kui et al.

ABSTRACT

In this paper, the effects of free radical and FA on chondrocyte have been studied. The result shows that free radicals and FA can damage chondrocytes and the damaged chondrocyte secretes abnormal matrix. In the abnormal matrix, the mineralization of hydroxyapatite is also abnormal. Based on these results, authors have pointed out a chemical process of KBD pathology.

(来源:中国地方病防治杂志, 1990, 1: 5-8)

不同来源黄腐酸对大鼠组织细胞 脂质过氧化的影响

曾述之 张穗芳 相 阳 张 岩 刘泳泉

(北京海淀医院)

彭 安 李 虎 王 文 华

(中国科学院生态环境研究中心)

关于腐植酸对机体的影响,国内外已有一些报道。一般都认为有抗炎作用。还有抗肿瘤作用的报道^[1]。我们发现北京风化煤黄腐酸钠具有明确的抗炎作用,且能提高巨噬细胞的吞噬功能^[2],促进创伤愈合^[3]。长期大剂量注射黄腐酸钠,对大鼠血象及肝实质细胞未见明显损伤作用^[4]。近来有报道认为大骨节病区土壤腐植酸钠可使细胞膜脂质过氧化而起损伤作用^[5]。这与上述腐植酸钠的药理作用很矛盾。因为诱导脂质过氧化的物质常有致炎作用。脂质过氧化与溶血、致癌、致突变等病理机制相关。亦损害心血管及肝脏。所以,腐植酸钠对脂质过氧化的影响为人们所关注。杨春林的体外实验发现大骨节病区土壤黄腐酸钠因增强黄嘌呤氧化酶活性而促进黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶系中的超氧离子(O_2^-)的生成。北京风化煤黄腐酸钠及河南巩县风化煤黄腐酸钠则明显抑制黄嘌呤氧化酶活性及超氧离子的产生^[6]。这说明不同来源的黄腐酸钠,其生物学效应有所不同。为此,我们观察北京风化煤黄腐酸钠及大骨节病区黄腐酸钠对大鼠组织细胞脂质过氧化的影响。

实验材料及方法

黄腐酸钠:北京斋堂低钙镁风化煤黄腐酸钠(C-SF)为北京海淀医院基础室提取并精制。河北省丰宁土壤黄腐酸钠(S-SF)为中国科学院生态环境研究中心提取并精制。

仪器:双光束分光光度计UV-150-02,日本岛津。

实验一:昆明种雄性大鼠,体重350~390克(8~9月龄)。共5组,每组6只。组1为正常对照,每日腹腔注射生理盐水(NS)1ml。组2于实验第1日皮下注射脂质过氧化诱导剂乙酰苯肼(APH)^[7]200mg/kg,第4及7日注射100mg/kg。作为脂质过氧化阳性对照。组3除如上注射APH外,并每日腹腔注射C-SF50mg/kg。组4腹腔注射C-SF50mg/kg/日。组5腹腔注射S-SF100mg/kg/日。连续10日。为明显易见,将实验条件列于表1。

实验二:用同种大鼠,体重140~170克(3~4月龄),共6组,每组6只。前5组安排如实验一。但APH第1日注射剂量为100mg/kg,第4及7日为50mg/kg。第6组腹腔注射S-SF50mg/kg,连续10日。如表2。

实验末动物被摘眼放血,取肝、脾、胸

表1

实验一的动物试验条件

组号	大鼠数	药物	剂 量	注射途径	备 注
1	6	NS	每日1ml/只	ip	
2	6	APH	第1日200mg/kg	sc	第4、7日用半量各注1次
3	6	APH + C-SF	第1日200mg/kg 每日50mg/kg	sc ip	第4、7日用半量各注1次
4	6	C-SF	每日50mg/kg	ip	
5	6	S-SF	每日100mg/kg	ip	

表2

实验二的动物试验条件

组号	大鼠数	动物	剂 量	注射途径	备 注
1	6	NS	每日1ml/只	ip	
2	6	APH	第1日100mg/kg	sc	第4、7日减半
3	6	APH + C-SF	第1日100mg/kg 每日50mg/kg	sc ip	第4、7日减半
4	6	C-SF	每日50mg/kg	ip	
5	6	S-SF	每日100mg/kg	ip	
6	6	S-SF	每日50mg/kg	ip	

腺称重。其肝以NS制成10%肝匀浆。检测的参数如下:

一、血红蛋白(Hb)测定

用氰化高铁血红蛋白法^[8]。20 μl抗凝血,加至5ml Drabkins溶液中,摇匀后于540nm读OD。 $Hb(g/dl) = 36.769 \times OD$ 。

二、网织红细胞计数^[9]

抗凝加等量 Methylene blue N 溶液,摇匀,放10min。推片,油镜下计网织红细胞百分率。

三、红细胞过氧化脂质(MDA)测定

10:

抗凝血、离心、去血浆及灰皮。其红细胞(Rbc)以5倍血量的NS洗2次。调Rbc悬

液的Hb=1.5%。取此稀释的Rbc悬液3ml,加TCA—Arsenite(三氯乙酸—亚砷酸盐)溶液2ml,摇匀。2500rpm离心10min。取上清液3.6ml,加1%TBA(硫代巴比妥酸)溶液1.2ml,摇匀。加塞,沸水浴15min。用自来水冷却后,于532nm及600nm处读OD。 $MDA(nmol/g.Hb) = (OD_{532} - OD_{600}) \times 900$

四、Rbc及肝匀浆谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力测定^[11]

酶反应体系是:0.4ml 1m MGS(用含Na₂HPO₄磷酸缓冲液配制, pH=7.0),加Rbc悬液(Hb=0.15%)0.4ml(或10%肝匀浆0.4ml),于37°C水浴5min后,再加预温至37°C的1.4m MH₂O₂0.2ml。准确反

应5min, 加偏磷酸沉淀液4ml终止反应。非酶反应体系以H₂O代Rbc悬液, 其余同上。各反应混合物于3000rpm离心10min。取上清液2ml, 加0.32 M NaH₂PO₄ 2.5 ml, DTNB试剂0.5ml。摇匀, 5min内于412nm读OD, 以试剂空白调零。活力单位按下式计算:

$$\text{GSH-PX活力单位 (u)} = \frac{\text{非酶反应logGSH} - \text{酶反应logGSH}}{5 \times 4 / 1000}$$

50log $\frac{\text{非酶OD}}{\text{样品OD}}$ 即每0.15g.Hb的Rbc(或0.1g肝)每分钟使logOD数值降低为1时, 计1个活力单位。

五、肝匀浆超氧化物歧化酶(SOD)活力测定

用Pyrogallol法^[12]。于比色杯中依次加55mM Triscacodylic acid缓冲液(pH 8.2, 内含1mM DTPA) 2ml, 0.25%肝匀浆50 μ l(非酶反应体系以生理盐水代), H₂O 0.1ml, 1.76mM Pyrogallol溶液50ml, 搅匀后, 于320nm读OD。共3min。计Pyrogallol氧化速率。即 $V = \Delta A_{320} / \text{min}$ 。结果以对其自氧化的抑制率表示:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{非酶反应}V - \text{酶反应}V}{\text{非酶反应}V} \times 100\%$$

六、肝匀浆过氧化脂质(MDA)测定^[13]

10%肝匀浆0.5ml, 加1% 磷酸 3ml,

0.0%TBA 1ml。摇匀加塞。于95°C水浴45min。自末水冷却后, 加正丁醇4ml, 振摇。3000rpm离心10min。取有机相, 于535nm及520nm处读OD。各反应混合物中MDA相对量以两OD值之差表示。

结 果

实验一, 注射APH的两组动物, 于第2日即可见其唇与足垫苍白发青, 精神不振, 毛亦蓬松。组二, APH组动物在第2次注射后的2~3日内全部死亡。而注射APH的组三, 动物因每日注射C-SF 50mg/kg, 坚持至实验结束, 未出现死亡。显示C-SF有保护作用。单纯注射C-SF的动物在实验过程中无明显异常体征。注射S-SF组的动物, 实验数日后, 唇及足垫亦显苍白发青, 精神不振, 但无死亡。各组动物实验前后的体重变化及其它各项参数如表3、4。

注射C-SF组动物体重减3%, 与对照组比, 经t检验, $P < 0.01$, 差别有显著性。其它各项参数, 与对照组比, 均无明显差异。C-SF+APH组动物的体重显著下降, 减11.45%; 脾脏增大, 为对照组的四倍; 血液中网织红细胞增至55.4%; 红细胞MDA量提高, 为对照组7倍; 肝组织MDA量提高至对照组的1.7倍。全血GSH-PX活性降低42.5%。这些参数的变化与对照组比, 经t检验, P值均小于0.001, 有显著性。

S-SF组动物体重减13.95%; 脾脏增

表3

各组动物体重增减率及脏器重量($\bar{X} \pm SD$)

组 别	大鼠数	体重增减率 (%)	肝重 (g/100gbw)	脾重 (mg/100gbw)
Control	6	1.10 ± 1.60	3.35 ± 0.38	183.33 ± 27.79
C-SF+APH	6	$-11.45 \pm 2.61^{***}$	3.32 ± 0.20	$795.00 \pm 98.40^{***}$
C-SF	6	$-3.10 \pm 2.20^{**}$	3.69 ± 0.19	203.16 ± 31.61
S-SF	6	$-13.95 \pm 4.76^{***}$	$4.14 \pm 0.50^*$	$663.20 \pm 41.72^{***}$

注: 与对照组比 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

表4 由各组动物血液及肝匀浆检测的参数 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	大鼠数	网织红细胞 (%)	Rbc-GSH-PX (u)	Rbc-MDA (nmol/g.Hb)	肝-MDA (OD值)
Control	6	5.2±1.9	76.47±7.47	6.63±1.48	0.225±0.036
C-SF+APH	6	55.4±7.2***	43.96±3.90***	47.25±9.75***	0.390±0.065***
C-SF	6	4.5±1.0	80.33±5.04	5.47±1.00	0.200±0.051
S-SF	6	41.0±9.6***	47.93±15.93***	26.12±5.80***	0.420±0.027***

注: 与对照组比 ***P<0.001

大, 3.6倍于对照组; 血液网织红细胞增至41.0%; 红细胞MDA量增加, 为对照组的3.9倍; 肝组织MDA量为对照组的1.86倍; 红细胞GSH-PX活性则降低37.3%。上述参数与对照组比, 经t检验, P值均小于0.001。差别有显著性意义。此外, 肝脏亦略增重, 与对照组比, $P < 0.05$, 有显著

性。

实验二, 用3~4月龄大鼠。注射APH后的体征表现如实验一。APH组于第2次注药后死1只。其余动物均坚持至实验结束。其它各组动物均无死亡。S-SF 50mg/kg及100mg/kg组与C-SF组动物未出现明显异常体征。各项实验参数如表5、6、7。

表5 各组动物脏器重量 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	大鼠数	肝 重 (g/100g.bw)	脾 重 (mg/100g.bw)	胸 腺 重 (mg/100g.bw)
Control	5	5.36±0.28	262.05±30.46	244.22±35.99
APH	5	5.44±0.51	783.56±89.56***	210.17±20.74
APH+C-SF	6	5.68±0.30	993.38±90.38***	224.12±26.75
C-SF	6	5.42±0.49	260.28±46.42	245.58±32.11
S-SF50mg/kg	6	4.94±0.98	298.91±26.70	227.87±67.73
S-SF100mg/kg	6	5.53±0.42	337.03±50.43**	187.38±22.96*

注: 与对照比 *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

此实验中, APH组动物脾脏增大约为对照组的3倍; Hb明显降低; 网织红细胞增至64.6%; 红细胞及肝组织中的MDA量均显著增加; GSH-PX活力降低17%。这些参数与对照组比, 经t检验, P值小于0.001或0.05, 差别有显著性。脾脏重量, APH+C-SF组大于APH组, 两组相比, 经t检验, $P < 0.05$, 差别不能认为无显著性。

C-SF组大鼠的肝、脾、胸腺重量与对照组比, 无明显差异。Hb量、网织红细胞百

分率、红细胞及肝组织的MDA量亦与对照组近似。S-SF100mg/kg组, 虽Hb量略小于对照组, 但无统计学意义。网织红细胞百分率大于对照组, 经t检验, $P < 0.001$, 有显著性意义。红细胞及肝组织的MDA量明显大于对照组, 经t检验, $P < 0.05$ 或0.001, 差别有显著性。脾亦肿大, 为对照组的128.6%, 经t检验, $P < 0.01$, 差别有显著性。S-SF50mg/kg组主要表现在GSH-PX活性较对照组低; Rbc中的MDA量则较

表6

由各组大鼠血液检测之参数的变化 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	大鼠数	Hb (%)	网织红细胞 (%)	红细胞MDA (nmol/g.Hb)
Control	5	15.18 $\pm$ 1.00	2.54 $\pm$ 1.27	0.00
APH	5	10.26 $\pm$ 2.20**	64.6 $\pm$ 8.26***	92.70 $\pm$ 21.42***
APH+C-SF	6	13.30 $\pm$ 0.70	42.5 $\pm$ 8.09***	71.01 $\pm$ 9.11***
C-SF 50mg/kg	6	15.10 $\pm$ 1.24	2.66 $\pm$ 0.98	0.00
S-SF 50mg/kg	6	14.08 $\pm$ 1.04	3.00 $\pm$ 0.71	9.20 $\pm$ 0.79***
S-SF 100mg/kg	6	13.95 $\pm$ 2.19	5.92 $\pm$ 1.24***	19.63 $\pm$ 3.58***

注: 与对照组比 **P<0.01 ***P<0.001

表7

各组大鼠肝脏生化参数的变化 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	大鼠数	MDA (OD值)	GSH-PX (u)	SOD抑制率 (%)
Control	5	0.205 $\pm$ 0.075	79.65 $\pm$ 4.68	77.0 $\pm$ 6.0
APH	5	0.596 $\pm$ 0.160**	66.00 $\pm$ 8.84*	85.2 $\pm$ 2.2*
APH+C-SF	6	0.375 $\pm$ 0.160*	69.74 $\pm$ 8.24*	84.3 $\pm$ 4.6
C-SF 50mg/kg	6	0.190 $\pm$ 0.090	—	84.3 $\pm$ 3.8
S-SF 50mg/kg	6	0.270 $\pm$ 0.075	61.65 $\pm$ 2.65**	83.4 $\pm$ 3.7*
S-SF 100mg/kg	6	0.354 $\pm$ 0.075*	57.77 $\pm$ 5.75**	80.2 $\pm$ 5.9

注: 与对照组比 *P<0.05 **P<0.01

高。经t检验, $P<0.01$ 或 <0.001 , 有显著性。Hb略低于对照组。肝匀浆中的MDA量略高于对照组。但均无统计学意义。其它参数无明显差别。

各实验组动物当中, 胸腺重量只有S-SF100mg/kg组明显小于对照组。经t检验, $P<0.05$, 有显著性。SOD活性在APH及C-SF组均略高于对照组。经t检验, $P<0.05$, 可以认为有显著性。

讨 论

实验一的结果表明, 脂质过氧化诱导剂APH于1、4日两次皮下注射后, 动物唇及足垫苍白发青, 并迅速死亡。如同时每日腹腔注射C-SF50mg/kg, 虽1、4、7日三次

注射APH, 至10日动物仍全部存活。似乎C-SF起了保护作用。在表3、4中, APH+C-SF组大鼠的红细胞MDA含量、血液网织红细胞百分率及脾重较对照组均有显著增加。而C-SF组动物除体重略减之外, 其它各项参数均近似于对照组。说明因APH使红细胞膜脂质过氧化而溶血或被脾细胞识别摄取, 造成贫血。故有唇及足垫苍白发青、脾脏肿大, 幼稚红细胞提前进入血液循环。如文献报道^[14], 肝组织的MDA含量亦显著增加。10天中动物体重减11.45%。这显示APH诱导脂质过氧化所致的损害及过氧化脂质的毒性是APH组动物未能完成实验过程而中途死亡的原因。C-SF无此有害作用。

从另一实验(表6、7)可见注射APH的动物,如每日注射C-SF,其Hb量高于APH组。血液网织红细胞、红细胞及肝组织的MDA含量均低于APH组。表明C-SF抑制了APH诱导的脂质过氧化。至于APH+C-SF组动物脾脏大于APH组,可能是由于C-SF活化网状内皮系统^[2]所致。

由表4可见S-SF100mg/kg使大鼠红细胞及肝组织的MDA含量增加、血液网织红细胞百分率提高、脾脏肿大(表3)、体重减少13.95%。显示有类似于APH诱导脂质过氧化的作用。重复试验结果如表5、6、7。S-SF100mg/kg组,动物红细胞及肝组织的MDA含量、网织红细胞百分率增高,脾脏肿大,基本类似于实验一。但这些参数变化的程度较小,可能与实验动物年龄的差异有关。前者年长,后者年青。

S-SF50mg/kg组,红细胞的MDA含量高于对照组。Hb量、网织红细胞百分率、肝脏MDA含量及脾脏重量的改变与对照组比,虽无统计学意义,但似乎存在着受损伤的趋势。肝组织GSH-PX活性显然受到抑制(表7)。总之,上述实验结果可以看到S-SF类似于脂质过氧化诱导剂APH的作用。而给动物注射C-SF,检测各项参数的结果均类似于对照组。如C-SF与APH合用,则可见到它抑制APH诱导的脂质过氧化而起到保护作用。

限制和防止自由基引起脂质过氧化的酶主要有SOD及GSH-PX。因为SOD催化 $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ 反应。GSH-PX催化 $2GSH + 2H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ 反应。本实验发现S-SF对SOD无明显影响(表7),而对红细胞及肝组织的GSH-PX活性有显著的抑制作用(表4、7)。

C-SF对SOD活性似有刺激作用(表7),对GSH-PX无影响(表4)。这可能是S-SF与C-SF对脂质过氧化影响不一致的机制之一。

此外,S-SF100mg/kg组大鼠免疫中枢器官的胸腺明显受到抑制(表5),肝脏增大(表3)亦是值得注意的。

参 考 文 献

1. Adamek W Proc. 5th Int Peat Congr 1976, 1: 436
2. 曾述之等 药学通报 1981, (12): 36
3. 曾述之 余济华 药学通报 1984, (5): 29
4. 曾述之等 江西腐植酸 1987, (3): 38
5. 王维哲等 第四次腐植酸化学学术论
文摘要 1987, P117
6. 杨春林等 待发表
7. Jain, S.K and Subrahmanyam D
Biochem. Biophys Res Commun 1978,
82: 1320
8. Bauer, J.D Methods of meas-
uring Hb Concentration in Clinic lab
Methods 8ed. 7th C.V. Mosby Com-
pany. Saint louis 1974, P97
9. ibid P152
10. Stocks J. et al Brit. J. Haema-
tol 1972, 23: 713
11. Hafemen D.G et al J Nutr
1974, 104: 580
12. Prohask, J.R J. Nutr 1983,
113: 2048
13. Uchiyama, M and Mihara, M
Anal. Biochem 1978, 86: 271
14. 张颖等 中国医药学报 1987,
(4) 25

(来源: 腐植酸, 1990, 2: 9-14)

译文和文摘

泥沼浴在妇科的应用

原著者：医学博士Erich Hohage 张超昧 译 唐国藩 校

德国妇科医生Karl Kaspar Van Siebold (1736—1807) 约于180年前，曾说过浴疗对妇女疾病有治疗作用。Carl J. Gauss 也自180年前开始应用。

按照妇科的原则，将之分为：

(1) 保守的药物——内分泌素区，

(2) 手术区，

(3) 日见重要和自然治疗力最好利用的治疗区

泥沼浴治疗的作用机制，是热物理，基于吸收能力，离子交换和内分泌素影响的机械和化学等因素的总和，由沥青、化学纤维素、雌性激素、类脂醇、微量元素等引起，特别是腐植酸。

其机制是：

(1) 增强充血，对子宫肌肉发生直接作用 = 内脏—下腹区充血，称此为皮肤内脏反射。

(2) 增强充血，对卵巢发生作用，因而对存在卵巢中的滤泡——相当于原始卵子，作直接的生长刺激，随之增多雌性激素，称此为物理性热因素。

(3) 泥沼对卵巢和子宫有刺激作用，因而产生雌性激素；该命题由Hosemann氏等以阉割的大白鼠除去脑下垂体腺作试验证实。

(4) 对间脑—脑下垂体腺—肾上腺皮质系统发生兴奋作用。

(5) 由于过热浴发生体温过高化。

适应泥沼浴治疗的妇科病症：

卵巢机能不足，尤其有子宫发育不全和内分泌所致的月经不调，近几年来，用泥沼浴治疗达到高峰，现代生活的肉体和精神紧张在一定程度上有共同促进作用，生殖器官发育不全，持续服用避孕丸，更有抑制作用，生殖器以泥沼浴疗程，刺激生长，调整内分泌素欠缺以及月经不调，按照有关文献的报告，认为明确有效。

生殖区慢性炎症：凡内外生殖器和骨盆韧带等疾病的慢性期都是适应症，而其急性期和亚急性期都属于临床治疗或妇科治疗。开始使用泥沼浴治疗，尽可能在急性炎症现象渐减后半期，还应通过相应的化验室检查来确定。

不育而希望有孩子：形成原因—排除男方生殖能力障碍后—首先是卵巢内分泌素虚弱，和输卵管及其周围炎症后遗留的变异和粘连，子宫内膜组织异位成为不育原因，并不稀罕。子宫内膜通过输卵管或血液、淋巴等途径，在不寻常部位中定居，例如也在卵巢或膀胱中，也在该处发生月经周期，以肿胀和出血作反应，当然是泥沼浴治疗的禁忌。

症，因为这只会促使异位粘膜的生长。

习惯性流产，即指不能怀满孕。成年期生殖器发育障碍及抑制，例如年青姑娘的继发性停经，常伴发幼稚型子宫发育不全。

痛经：严重型经期疼痛。

炎症性阴道和子宫白带，尤其是发生复发时。

老年性萎缩，阴道前庭发痒刺激具有或无明显的皮肤变异和由于内分泌素缺乏的变态反应疾病。

妇科中的矫形外科疾病，首先是因髋关节变异，骨一关节病以及腹壁或骨盆底肌肉等过度膨胀具有初发的下降痛苦及膀胱，直肠倾向成穹窿形和下降所致的腰痛。

更年期：首先是初起的更年期，适合于泥沼浴治疗。妇女在该生命阶段的各类型的内分泌素缺乏症状，对泥沼浴的热波反应良好。但是妇女停经已在一年以上，就不能期待泥沼浴有成功的希望，相反，泥沼浴对植物性神经系统更易损害，应使用盐水浴治疗。

手术后粘连疼痛治疗和绝育手术后粘连预防：在此范畴内，特别适应的是以除去输卵管妊娠障碍为目标的输卵管手术后治疗，其主要目的是防止新生粘连及粘合形成，并改善供卵子向子宫方向输送所需的运动能力，最好的病例，甚至完全恢复。

性欲功能及性欲高潮障碍，最好疗效是泥沼浴和碳酸泉水气阴道灌注联合使用。

现在应当谈谈泥沼浴的禁忌症，俾能完善意义深长的泥沼浴疗法全貌。

禁止使用泥沼浴治疗的是：

所有急性和几乎所有亚急性炎症，因为泥沼浴对此不能治愈和改善，而且相反可导致感染复发，当然和达到目的——完全恢复，健全功能背道而驰。

上述的子宫内膜组织异位，属于绝对的禁忌症，所谓年青姑娘的年青出血，月经不

规则，数量增多，经期延长，间歇期缩短，和妇女在更年期中由于同样的内分泌素不稳定的更年期出血，都是禁忌症。

妇女妊娠，当然不能用泥沼浴治疗。不过根据许多泥沼浴治疗师的经验，对妊娠的首先四周直至六周，也就是直至最后确实证明妊娠的时刻，不必过份太害怕，因为罕有早期流产的危险。

所有类型的生殖器官结核病，禁止使用泥沼浴。

月经出血增多、延长或经期之间出血，尤其是该出血和子宫肌瘤（肌瘤病）有关，不允许泥沼浴治疗。

良性卵巢肿瘤，即囊肿，约大于李子，用泥沼浴治疗无效；对小囊肿，小心控制，使用泥沼浴治疗，往往会有良好作用。

恶性肿瘤在生殖区或乳腺，在术前或术后或结合放射治疗，都是严格的禁忌。

小骨盆区内的植物性神经障碍，多数为通血障碍和因此所致的痉挛和郁血，都是禁忌症。

最后扼要叙述妇女病用泥沼浴治疗的技术方法。

治疗的标准方式是泥沼浆半身浴，泥沼浆平面应达脐上2厘米，有严重的内病（例如严重的心脏及循环衰弱），可改用坐浴或垫包。泥沼浆的正确密度，可用Quentin氏文字试验检查，用手指书写在泥沼表面的名字，持续显示1分钟。

一个泥沼浴疗程，至少持续四周，最高五周至六周，浴数为12次，最多14次至16次，开始时是12分钟，按忍受性持续上升，直至最高为25分钟，最高温度可达46°C，比正常的水浴温度要高些，会感觉愉快，其原因在于泥沼浴有均匀性，泥沼浆以均匀性围绕人体，和在于皮下脂肪组织导热减少，温度不易下降。

泥沼浴后，现在不用以前的水笔橡皮管

结合起来，才能达到完全的预防，如为治疗而治疗，则违背了工效学的原理而付出不必要的代价。在诸多的工作中，首先是防止近亲交配，注意诸系的记载，于生产母羊配种前一个月，抓好放牧，敦促增膘，冬春干草期注意适当补饲配合饲料（玉米或豆粉、麸皮、胡萝卜、食盐、苜蓿）注射适量的维生素E，添加定量的饲料添加剂。产羔前，维修好羔圈，做好羔羊、母羊等消毒工作，定期清扫羔圈和运动场，这样羔稀病肯定会大为减少。反之，羔圈长期不扫，母羊缺草，处于半饥饿状态，不注意矿物质和维生素的供给，这样势必人为促使羔稀病的猛增。

腐钠之所以能治病，中外学者各抒己见，研究推理凡多。以我们粗见，腐钠之所

以对羔稀病疗效较好，主要是它为高分子络合物，并含生物碱，故对于肠道炎性物和有毒物质有较大的吸附力，同时对肠胃道黏膜具有收敛作用。由于腐钠结构中含各种活性基团，从而能收缩血管，降低毛细血管渗透性，起到消炎止血的作用。但最重要的是，腐钠有增强抗体免疫的能力。

但是，对于拉痢的弱羔，顽固性下痢，单用腐钠治疗，疗效不显著，必须配合其它药物治疗。考虑到大群用药的方便，建议将腐钠压成片剂和制成注射剂应用。

在连续两年对羔羊的试治工作中，我们认为配成5%的溶液口服是适宜的，通过观察，在所治疗的羔羊中，没有出现任何不良反应。

（来源：腐植酸，1990，2：46-47+41）

推广应用

腐植酸(棕、黄)合剂对胃溃疡 113例疗效分析

苏秉文

(北京市海淀医院)

一、前言

溃疡病是一种发病率很高的慢性病,有人统计约有10%的人,在一生中曾患过本病。国内外对本病的治疗用药多种,虽然有一定的疗效,但因病程长,反复就诊,痛苦大,合并症严重,费用亦多,对人民的健康和生产劳动均有较大影响。

为了提高对溃疡病的防治效果,我院自一九八〇年以来,应用腐植酸钠(棕、黄)合剂(以下简称HA),治疗慢性胃溃疡113例,其疗效分析如下:

二、资料来源

(一) 病例来源:

本观察病例均为门诊确诊收住内科纳入治疗对象的,治疗组与对照组均根据临床症状、体征、X线钡餐造影或纤维胃镜综合确诊。HA组共113例,其中男性37例,女性76例,男女之比约为1:1.4,年龄最小者16岁,最大者62岁。职业多种,以脑力劳动者及工作性质紧张者患病率较高,如表1。

通过表1看出,患病率:性别,HA组男性占49.6%,胃乐组占63%;职业:HA组中年男性占49.6%,胃乐组占63.3%;年龄:

HA组占59.2%,胃乐组为56.7%;病程两组多以5年内占多数,即胃溃疡患病为多以中年男性,脑力劳动为主,患病病程5年以内为多数。

(二) 药物来源及用法:

本治疗组所用药物,为北京斋堂地区风化煤总腐植酸钠粉剂,经统一工艺流程纯化提取的棕、黄两种腐植酸钠混合成口服溶液。其灰分在0.2%以下, pH值为7.5,高压灭菌溶液。

药用方法:1.治疗组——0.2%HA溶液10毫升,一日三次口服,三十天为一疗程,依病程需要,可连服二个疗程,观察期间不加用其它有关治疗药物。

2.对照组——以北京第三制药厂生产的胃乐片剂口服,一日三次,每次4片,三十天为一疗程,可连服二个疗程,本组对腹痛明显者加服普鲁苯辛药物一至三天。

三、诊断标准

(1) 在临床征象(慢性病程,周期性发作,上腹痛的节律性特征,半夜疼痛,和清晨不痛)的基础下均做X线钡餐造影或纤维胃镜检查。

2. X线钡餐造影:有溃疡龛影。

表1

两组性别、年龄、职业、病程分布比较

组别	总例数	性别		年龄 (岁)			职业			病程 (年)		
		男	女	(16—30)	(31—50)	(51岁以上)	脑力	体力	无业	(1—5)	(6—10)	(10年以上)
HA组	113	67	46	38	56	19	65	40	8	67	35	11
胃乐组	60	37	23	12	38	10	32	24	4	34	21	5
合计	173	104	69	50	94	29	97	64	12	101	56	16

3. 纤维胃镜检查: 胃粘膜形成溃疡面, 粘膜有炎性渗出物覆盖, 组织病理检查可见到糜烂和溃疡, 边缘有细胞浸润, 以淋巴细胞与浆细胞为主, 惟在急性发作期或有继发感染时, 则可见到大量中性粒细胞。

四、疗效标准

治愈——凡临床症状和体征消失, X线钡餐造影或纤维胃镜检查, 溃疡面消失者。

好转——凡临床症状和体征消失, X线钡餐造影或纤维胃镜检查, 溃疡面缩小至 $\frac{1}{2}$ 或 $\frac{1}{3}$ 以上者。

无效——凡经过临床一至二个疗程治疗

后, 症状和体征无缓解, X线钡餐造影或纤维胃镜检查, 溃疡面无改善者。

五、疗效分析

(一) 治疗组: 用HA观察者共113例, 治愈27例占23.6%; 有效72例占63.7%, 无效14例占12.3%, 总有效率为87.6%。

(二) 对照组: 用胃乐观察者共60例, 治疗13例占21.6%, 有效40例占66.6%, 无效7例占11.6%。总有效率为79.6%。经统计学处理差异无显著性 $X^2 = 1.325, P > 0.05$, 即HA组与胃乐组疗效相当如表2。

表2

两组疗效比较

组别	例数	治愈		好转		无效		总有效率
		例数	%	例数	%	例数	%	
HA组	113	27	23.7	72	63.7	14	12.4	87.6
胃乐组	60	13	21.6	40	66.6	7	11.6	79.6

$$X^2 = 1.325$$

$$P > 0.05$$

在HA治疗组中, 合并溃疡出血者21例中, 大便潜血(+)——(+++), (+)为轻度, 血色素在9克以上; (++)为中度, 血色素在8克以上; (+++)为重度, 血色素在6克以上。这些病例均以HA口服溶液一日三次, 每次10毫升, 在少渣半流饮食配合下治疗, 不加用其它止血药物。经观察, 大便潜血阴转天数, 短者一天半, 长者

十二天, 平均为4.9天潜血消失, 除一例无效外, 20例全部达到止血效果。与胃乐片组并加口服止血粉组(0.5克, 一日三次), 同治疗组饮食条件一致比较下, 两组疗效相近, 如表3。

通过表3看出, HA组与胃乐加止血粉组比较, 潜血消失的效果, 经统计学处理, 差异无显著性, 即两组药物止血疗效相近,

表3 两组止血疗效比较

组 别	例 数	治 愈	好 转	无 效	总有效率 %
		例数 %	例数 %	例数 %	
HA组	21	17 82.9	3 14.3	1 4.0	95.3
胃乐加止血粉	17	13 76.5	2 11.8	2 11.8	88.3

表4 两组一周止血效果比较

组 别	观察例数	止血例数	止血率 (%)
HA组	21	19	90.5
胃乐+止血粉组	17	6	35.2

$P > 0.05$ 。

HA组与胃乐加止血粉组一周内止血效果比较如表4。

通过表4看出，一周止血效果，HA组为90.5%，胃乐加止血粉组为35.2%，上述两组一周止血效果经统计学处理，差异有极显著性，即HA组在一周内止血作用比胃乐加止血粉组快的多，结合表3、表4分析，两组都有止血作用，只是HA止血时间来的更快。

六、典型病例介绍

〔例一〕史×，男性，49岁，海淀菜园农工。自述上腹部隐痛和心窝部烧灼感。年复一年症状加重，伴有反酸暖气，不规律饥饿时上腹痛阵发性加剧。1978年突然解黑便，经X线钡餐造影确诊为胃溃疡合并出血，住院两周，症状缓解出院。1980年秋二次解黑便，经纤维胃镜检查确诊胃溃疡合并出血又住院，在半流食配膳下，口服HA溶液10毫升（2%），每日三次，连服4天，大便潜血阴转，（由+++→-），三十天复查胃镜，溃疡面消失，治愈出院，随访一年未见复发。

〔例二〕李××，男，24岁，外语学院学生，1981年，因饮酒过量，当夜上腹剧痛，伴有呕吐咖啡样物及食物残渣，腹拒按，X线钡餐造影胃近窦部有二个黄豆大小龛影，经住院确诊为胃溃疡，口服胃乐片加止血粉，十三天时大便潜血由+++→-，腹痛减轻，进食半流食心窝部疼痛无减轻。经住院46天，复查X线钡餐造影，尚存一绿豆大小龛影，潜血阴转出院。门诊继续观察随访一年后尚未痊愈。

通过上述二例病历介绍，看出HA对溃疡病的止痛，促进溃疡愈合，止血效果都优于胃乐加止血粉的疗效。通过本观察病历全部统计也符合该情况。

七、小结

（一）本观察病例，HA组113例和胃乐加止血粉组60例，均为消化病专业门诊按统一标准，统一观察指标进行的，两组疗效相当，都有止血效果，但HA组止血时间比对照组快，HA组一周止血效果为90.5%，胃乐加止血粉组为35.2%。

（二）HA制剂治疗人体疾病，国内外
（下转第30页）

(上接第36页)

均有不少报道,尽管本观察病例二组疗效相近,但腐植酸钠药源广、药性平和、价廉易取,无毒付反应、值得推广与研究。

(三)HA对胃溃疡合并出血病例,有较满意的止血效果。其止血作用,根据腐植酸类制剂能缩短剪断小鼠尾巴的出血时间,并能增加实验动物血小板的数量,这种促进出血部位血管收缩止血还是通过其它凝血因子的作用而促进止血尚有待进一步探讨。

(四)HA抗溃疡机制,通过HA对实验性大鼠胃溃疡病理形态学观察,发现它可使肌层、粘膜层的断端生长较快,腺体增生速度亦较对照组快,可见HA有去腐生肌作用。又根据腐植酸的结构与理化性能,它含有多种活性基团,它有宽扩的内表面积及胶

体性能,故对溃疡面有保护作用。通过胃镜发现,溃疡面周围吸收的HA明显集聚,从而起到表面保护膜作用。又根据HA有抑制胃酸分泌的作用是它直接作用到壁细胞抑制胃酸分泌的。

(五)HA的止痛作用,可能是HA有较强的吸附和络合、螯合能力,从而吸附了病损部位的有害物质和收歛中和、抑制胃酸分泌等有关;有人研究HA能抑制前列腺素E的合成,前列腺素正是疼痛的媒介,抑制了它即中断了疼痛,又因HA是一种缓冲剂起到了解痉的良好作用,该项工作有待继续研究。

通过临床观察所获,HA治疗慢性胃溃疡病近期疗效较好,远期效果有待追踪。

(来源:腐植酸,1990,3:34-36+30)