

黄腐酸钠抗炎作用的初步研究

白求恩医大基础医学院药理教研室 陈霞 李红 刘芬 杨世杰
东煤环保所 赵恒

提 要 观察黄腐酸钠 (Sodium Fulvic, SF) 对不同炎症模型的作用。结果表明, SF(0.5%, 1%、2%) 外用能明显抑制巴豆油所致的小鼠鼠耳肿胀, 显著减轻角叉菜胶所致的大鼠足跖肿胀程度, 对小鼠琼脂肉芽肿也有明显的抑制作用, 以上结果表明 SF 具有抗炎作用, 并经实验证明对皮肤不引起过敏反应。

关键词 黄腐酸钠 抗炎作用 角叉菜胶 琼脂

中图分类号 R965

近年来, 国内外关于腐植酸的实验研究及临床应用日趋深入, 尤其是对其抗炎作用的研究, 越来越引起人们的重视。其中, 研究较多的是江西腐植酸^[1,2]。据文献报道, 其抗炎有效成分为黄腐酸钠 (Sodium Fulvic, SF)^[2]。但从霍林河褐煤中提取的黄腐酸钠是否具有抗炎作用尚未见报道, 本实验对此进行了研究。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 体重为 18~ 22 g; Wistar 大鼠, 体重为 180~ 250 g; 豚鼠体重在 250~ 300 g, 以上动物均为雄性。

1.2 药品 黄腐酸钠, 为棕色粉末, 由东煤环保所提供, 纯度 > 90%, 实验时用凡士林按不同剂量配成软膏剂应用。醋酸去炎舒松 (Triamcinolone Acetonide, TAA) 软膏剂为沈阳制药厂产品。

1.3 实验分组 取小鼠或大鼠随机分为 5 组, 即对照软膏组、醋酸去炎舒松组及 SF 0.5%、1% 和 2% 组。皮肤过敏试验中则将 30 只豚鼠随机分为对照软膏组、阳性药组 (2,4-二硝基氯苯) 及 SF(2%) 组。

2 方法与结果

2.1 黄腐酸钠对巴豆油所致小鼠鼠耳肿胀的影响 取小鼠 50 只, 方法是每鼠左耳前后两面涂 2% 巴豆油 (约 0.1 ml), 右耳作为对照

30 min 后各组分别于小鼠左耳涂抹凡士林、醋酸去炎舒松和黄腐酸钠 (0.5%、1%、2%) 软膏。4 h 后处死小鼠, 沿耳廓基线剪下两耳, 用 9 mm 打孔器分别在同一部位打下圆耳片, 用扭力天平称重。结果显示, 给药组与对照组比较有显著差异, 见表 1。

Tab. 1 Effect of SF on swelling of ear caused by croton seed oil in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Weight difference of both ear (mg)		Inhibitory rate (%)
Control	11.50 ± 2.55		
TAA	8.30 ± 2.21**		28
SF (0.5%)	8.90 ± 2.13*		23
SF (1%)	8.60 ± 1.90*		25
SF (2%)	9.00 ± 1.70		22

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 黄腐酸钠对角叉菜胶所致大鼠足跖肿胀的影响 取大鼠 40 只, 实验方法是将 1% 角叉菜胶注入大鼠后肢足跖部皮下 (0.1 ml/只) 致炎, 10 min 后按照分组将不同软膏涂于致炎部位, 分别于致炎后 1 2 3 4 5 h 测量足跖肿胀程度, 各时间点时给药组与对照组比较有显著差异, 结果见表 2。

2.3 黄腐酸钠对小鼠琼脂肉芽肿的影响 取小鼠 50 只, 均于背部皮下注入 2% 灭菌琼脂 (0.2 ml/只), 然后按照分组分别涂抹不同软

Tab. 2 Effect of SF on swelling of hind paws induced by carrageenin in rat

($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	Swelling of hind paw (V/ml)				
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Control	1.29±0.08	1.69±0.16	1.85±0.25	2.08±0.17	2.29±0.24
TAA	0.97±0.12*	1.42±0.15*	1.5±0.10*	1.75±0.21*	2.00±0.25
SF (0.5%)	1.13±0.11*	1.50±0.13*	1.56±0.12*	1.83±0.19*	1.99±0.25
SF (1%)	0.99±0.20*	1.50±0.10*	1.54±0.13*	1.86±0.21*	1.96±0.21*
SF (2%)	1.11±0.19*	1.53±0.11*	1.56±0.13*	1.85±0.20*	2.20±0.26*

* $P < 0.01$; ** $P < 0.05$

膏,每日2次,连用15d后处死小鼠,取出肉芽肿块并称重。结果显示,给药组与对照组相比有显著差异,见表3。

Tab. 3 Effect of SF on agar granuloma in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Granuloma (m_B/g)	Inhibitory (%)
Control	0.023±0.004	
TAA	0.018±0.002*	22
SF (0.5%)	0.020±0.002	13
SF (1%)	0.018±0.002*	22
SF (2%)	0.019±0.002	17

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2.4 皮肤过敏试验 方法是试验前1d将试验动物背部脊柱两侧脱毛,范围为3cm×3cm。各组动物于试验第1,7,14天分别以相应软膏0.2mg涂于左侧脱毛区致敏,每次涂后6h,用温水纱布擦拭除掉药物。于末次致敏后14d,分别将试药0.2mg涂于各组动物右侧脱毛区进行激发,6h后用温水纱布擦拭除掉试药。即刻及用药后24h、48h及72h再次观察有无红斑、水肿形成。按评分标准进行评分。结果表明SF对皮肤不引起过敏反应。

3 讨论

SF为从霍林河褐煤中提取的有效成分,以往报道口服或注射对多种疾病有效,但其远期效果尚有争议^[4]。国外民间常用含腐植酸的泥浴或湖沼水浴治病(又称Salhumin浴),在欧洲已流行数十年。为此,本实验采用外用的给药方法,对SF的抗炎作用进行了初步观察。

小鼠鼠耳肿胀及大鼠足跖肿胀属非特异性炎症,是以肿胀、渗出为主要指标的急性炎症模型,SF外用可减少肿胀、抑制渗出,说明对急性炎症过程有明显的抑制作用。而小鼠琼脂肉芽肿模型是以肉芽组织增生为主的慢性炎症转归,SF对琼脂引起的炎症也具有抑制作用,进一步说明SF外用对急、慢性炎症均具有明显的抑制作用,但SF抗炎作用的机理尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 袁申元. 腐植酸, 1988, 4: 6
- 2 郭澄泓. 江西腐植酸, 1986, 4: 1
- 3 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学(第二版). 北京: 人民卫生出版社, 1994, 713
- 4 煤炭部综合利用局. 国外腐植酸类物质的研究和应用概况. 1979, 124 (1996-04-28收稿)

Studies on antiinflammatory effect of SF

Chen Xia, Zhao Heng*, Li Hong, et al

(Department of Pharmacology)

Abstract In the experiment, it was demonstrated that sodium fulvic (SF) had obvious anti-inflammatory effect. SF for external use showed remarkable inhibitory effect on the ear swelling caused by croton seed oil in mice, the swelling of hind paws induced by carrageenin in rats, and the granuloma caused by agar in mice. The allergic reaction on skin induced by SF was not found in the experiment.

Key words Sodium Fulvic Antiinflammatory effect Carrageenin Agar

(来源: 白求恩医科大学学报, 1997, 4: 2)

石炭青体外抗菌作用的实验研究

朱育凤 周琴妹 吴旭彤

(江苏省中医院药材料·南京 210029)

以石炭提取物为主要原料制成石炭膏(软膏)、用于临床治疗湿疹、皮炎、皮肤搔痒、痤疮等,临床使用效果颇好。石炭膏所用原料是从新疆哈密地区富含腐植酸的风化煤中提取精制而成的具有分子量小、活性大的黄腐酸钠的 25% 浓溶液。本实验以金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌为代表菌种,检测了石炭膏的抗菌效果。

1 实验材料 普通肉汤培养基,用前分装于试管中,每管 2ml,115℃ 灭菌 30min,培养基质量符合 1995 年版《中国药典》^[5] 标准的规定。药物,每克软膏相当于石炭提取物 0.04g,软膏由本院制剂室提供,依法^[6] 制成 1:10 供试液。菌种:金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003;绿脓杆菌 CMCC(B)10104;大肠杆菌 CMCC(B)44102;均由江苏省药品检验所提供。菌液:实验前,从保存菌种斜面上沾取少量菌苔接种于 10ml 普通肉汤培养基

中,于 37℃ 培养 24h,取出作原菌液,再用无菌生理盐水稀释原菌液至 10^{-6} ,备用。

2 实验方法 采用试管连续稀释法。取装有 2ml 普通肉汤培养基 12 管,排列于试管架上,编号。然后以无菌操作法在第一管中加入供试液 2ml,摇匀,吸取 2ml 加入第二管中,摇匀,同法稀释至第 10 支试管,弃去 2ml,余下 2ml;以上各管均加入备妥的 10^{-6} 菌液 0.1ml。第 11 管中只加入 0.1ml 菌液作阳性生长对照管;第 12 管加入 2ml 供试液后混匀,弃去 2ml,余下 2ml 不加菌液作阴性对照管,将各管置于 37℃ 培养 24h,观察结果,确定 MIC。经培养后无菌生长的各管,用灭菌接种环沾取少许抹于普通肉汤琼脂平板上,经 37℃ 培养 24h。观察结果,确定 MBC。

3 实验结果 见下表。

附表

石炭青体外抗菌试验结果

菌种	浓度(石炭提取物 g/ml)										阳性对照	阴性对照
	2.50×10^{-3}	1.00×10^{-3}	5.00×10^{-4}	2.50×10^{-4}	1.25×10^{-4}	6.25×10^{-5}	3.13×10^{-5}	1.56×10^{-5}	7.80×10^{-6}	3.90×10^{-6}		
金葡萄	-	-△	-	-	-	-*	+	+*	+	+	+	-
绿脓杆菌	-	-△	-	-	-	-*	+	+	+	+	+	-
大肠杆菌	-	-△	-	-	-	-*	+	+	+	+	+	-

+ 表示生长,“-”表示不生长;“△”表示该浓度为 MBC;“”表示该浓度为 MIC

4 结论

实验结果表明,该药对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和大肠杆菌均有较强的抑菌杀菌作用,其中对金黄色

葡萄球菌的抑杀作用强于绿脓杆菌和大肠杆菌。

(1997 年 1 月 5 日收稿)

(来源:中国中医药科技,1997,4:223)

黄腐酸钠前列腺内注射治疗慢性前列腺炎

祖林先 杨永申

(河南省巩义市人民医院 巩义市 451200)

慢性前列腺炎为男性成人的常见病,目前国内外尚无特效疗法,我院自1991年5月~1995年5月采用黄腐酸钠前列腺内注射治疗68例,疗效较好,现报告如下。

临床资料

一般资料 本组68例,年龄22~50岁,平均29岁;发病时间5月~8年,平均18月。临床以腰部酸痛、下腹胀、会阴痛、尿终不尽、头晕、乏力多见,部分病人有性功能减退。体检:前列腺有压痛。常规化验前列腺液:WBC>10个/HP。均经抗菌药治疗无效。

治疗方法 1%普鲁卡因2ml,0.25%黄腐酸钠6ml(巩义市制药厂出品)。注射前排空大便,患者取截石位,臀部垫高,常规局部消毒。在左食指直肠内引导下,以7号心内注射针于肛门前1.0cm处,局麻后直刺5~6cm,突感注药容易,则已进入前列腺包膜内,注入黄腐酸钠液6ml。每5天1次,6次为一疗程。但对全身及局部急性感染,普鲁卡因过敏者为禁忌。

疗效标准 治愈:症状基本消失,前列腺无压痛,前列腺液白细胞正常;有效:主要症状减轻,前列腺无压痛,前列腺液白细胞较治疗前明显下降;无效:症状减轻不明显,前列

腺液白细胞无明显变化。

治疗结果 本组治愈50例占73.5%、有效10例占14.7%、无效8例占11.8%,总有效率88.2%。部分患者注药后有会阴短暂困胀感,4例注射后有肉眼血尿,约1天后自行消失。

讨论

《本草纲目》中记载:石炭,亦名乌金石,即现代风化煤。黄腐酸钠是从风化煤中提取的有效成份,辛温、味甘。国外研究表明它具有消炎、抗病毒作用。北京同仁医院经实验证明黄腐酸钠可使甲皱微循环血流速度增快,心肌血流量增加,具有活血化瘀作用。亦有报告黄腐酸钠有调节内分泌,调整免疫功能,影响代谢及酶活性等作用。并且对体液免疫有明显的增强作用,提高清除和消灭病原体的能力^[1],促进疾病的痊愈。我们用黄腐酸钠治疗慢性前列腺炎,就是利用其消炎、活血化瘀、调整机体免疫功能,疗效显著,为治疗慢性前列腺炎提供了一种新方法。

参考文献

- 1 严培荣.慢性前列腺炎药物治疗的若干问题.中华泌尿外科杂志,1982;2(3):153

收稿:1996-06-28

(来源:河南医药信息,1997,5:45)

姜汁轻组分对 FA 引发软骨细胞产生过氧化氢的抑制作用^{*}

郭平^{**} 许君辉 许善锦 王夔
(北京医科大学药学院 北京 100083)

摘要 为探讨生姜成分对大骨节病的治疗作用,采用生姜挥发油对黄腐酸刺激软骨细胞产生活性氧进行清除抑制,发现微量(0.16ml/L)生姜挥发油即能够抑制 FA 刺激软骨细胞产生的过氧化氢。

关键词 生姜挥发油 黄腐酸 软骨细胞 过氧化氢

作用曾报道生姜原汁具有清除超氧阴离子及羟自由基的作用^[1],为探讨生姜成分对软骨细胞产生活性氧的清除作用及对大骨节病的治疗作用,我们研究了生姜石油醚提取轻组分对黄腐酸刺激体外培养软骨细胞产生活性氧的清除作用。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基(GIBCO),胎牛血清(天津生化制品厂),Con A、过氧化氢酶、胶原酶(II型)、胰蛋白酶、DCF 均购自 SIGMA 公司;大骨节病区黄腐酸(FA)由甘肃天水大骨节病区饮水中提取(中国科学院生态环境中心提供),DCFH-DA 由北京医科大学药学院有机教研室按 Richard Brandt^[2]方法合成,生姜挥发油(GVO)由北京医科大学药学院药剂教研室提供,其他试剂均为分析纯。苯航(Leghom)鸡胚胎由北京兽医生物制药厂提供。

1.2 方法

1.2.1 软骨细胞分离、培养

软骨细胞分离、培养按 Patrizio Castagnotta^[3]方法稍加改进,即:在无菌条件下,取孵化12天的鸡胚胫骨和股骨,仔细剥离肌肉及骨膜,用0.25%胰蛋白酶消化液消化15min(37℃);取骺板软骨,用胶原酶消化3h(37℃)。得到分散均匀的单个细胞后,每瓶按 1.5×10^5 /ml接种至含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置37℃细胞培养箱内,贴壁培养,隔日更换含10%胎牛血清的DMEM培养基,培养至细

胞长满单层(7天)进行实验。

1.2.2 DCFH-DA 的配制

取适量 DCFH-DA 先用少量无水乙醇溶解(乙醇在被测液中不可超过0.1%),充氮气密封,置-20℃冰箱备用,临用前用 PBS 将原液稀释,终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 。

1.2.3 细胞加载 DCFH-DA

长满单层的软骨细胞用0.05%胰蛋白酶消化液消化,在显微镜下观察,见细胞开始圆缩,用吸管吹打分散,分散均匀后,用 PBS 洗2次(800r/min, 5min),计数细胞,调至 $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ /ml,加 DCFH-DA 稀释液至细胞悬液中,在 THZ-82 型恒温振荡器(上海跃进医疗器械厂)37℃振摇温育15min,使 DCFH-DA 加载入细胞内。

1.2.4 过氧化氢产生及抑制试验

已加载 DCFH-DA 的软骨细胞悬液,用台盼蓝染色,计数活细胞超过90%,分组加入 FA, Con A(有文献报道 Con A 能使软骨细胞产生过氧化氢^[4],我们采用 Con A 为对照),37℃温育30min(90次/min, 37℃恒温振荡器振摇温育);过氧化氢酶在细胞与 DCFH-DA 共同温育前15min加入,终浓度为600U/ml。经过过氧化氢酶抑制试验确定软骨细胞产生过氧化氢后,分组进行生姜挥发油对 FA 刺激软骨细胞产生过氧化氢的抑制试验:生姜挥发油加入后,在

^{*}国家“八五”科技攻关项目(85-917-01-04 资助)

^{**}华北煤炭医学院 唐山 063000

90 次/min 恒温振荡器(37℃)振摇温育。

1.2.5 过氧化氢的流式细胞计分析

经 FA, Con A 作用 30min 后, 或加入生姜挥发油后, 再加入 FA 作用 30min, 在电脑控制的 FACSCAN 型流式细胞计(美国 B-D 公司)上, 激发波长 488nm, 检测发射波长 525nm 处的绿色荧光(前向角光散射系数小于 2), 检测数据由 LYSYS II 软件分析处理。

2 结果与讨论

2.1 FA 刺激软骨细胞产生过氧化氢

DCFH-DA 是一种稳定的无荧光非极性化合物, 可扩散通过细胞膜, 在胞内酶作用下脱去乙酰基成为无荧光的 DCFH, H₂O₂ 可将其迅速氧化成高荧光的 DCF, 其荧光强度与细胞产生 H₂O₂ 量成正比。而反映在 FLCM 谱图中为整体细胞群效应, 即可反映平均每个细胞的过氧化氢产量。软骨细胞处在静止状态的呼吸代谢也可使很少量 DCFH 氧化成 DCF, 在 FLCM 谱图中可见加载 DCFH-DA 后的细胞发出很低的荧光(为本底)(图 1B)。经外源性物质: FA, Con A 刺激后, 软骨细胞内 DCF 明显增多(图 1D, C), 当过氧化氢酶存在时, 完全抑制了过氧化氢的产生(表 1); 与 Con A 比较, FA 对软骨细胞的作用不仅与 Con A 相似, 且刺激作用程度要高于 Con A(表 1), 从而证明 FA 确实可引发软骨细胞产生过氧化氢。图 2 表示三次平行实验中, 随着 FA 浓度增加, 胞内 DCF 的荧光强度增大, 当 FA 浓度为 100mg/L 时达到最大, 其后不再增加。软骨细胞内 DCF 的产生对 FA 浓度的依赖关系也说明 FA 引发软骨细胞产生过氧化氢与 FA 浓度相关。

表 1 过氧化氢酶对软骨细胞产生 H₂O₂ 的抑制作用

刺激物 mg/L	过氧化氢酶 U·ml ⁻¹	荧光强度
FA 200		17.42
200	600	11.31
50		17.01
50	600	11.94
Con A 100		14.07
100	600	11.23

表 2 GVO 温育 0.5h 对软骨细胞产生 H₂O₂ 的抑制作用

FA mg/L	空白	GVO ml/L			
		0.16	0.33	0.33 ¹⁾	0.99
200	17.42	10.10	10.58	17.38	10.07
100	17.51	10.15	10.97	17.50	
50	17.01	9.94	10.37	16.98	10.12
25	16.20	10.05	10.35	16.23	

注: GVO 和 FA 自荧光为 0¹⁾ 为静止温育

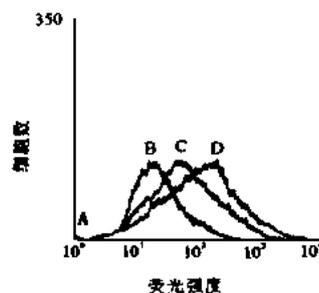


图 1 软骨细胞产生 H₂O₂ 的比较

A. FA 荧光 B. 软骨细胞呼吸代谢产生的 H₂O₂ C. 50mg/L FA 刺激软骨细胞产生的 H₂O₂ D. 100mg/L Con A 刺激软骨细胞产生的 H₂O₂

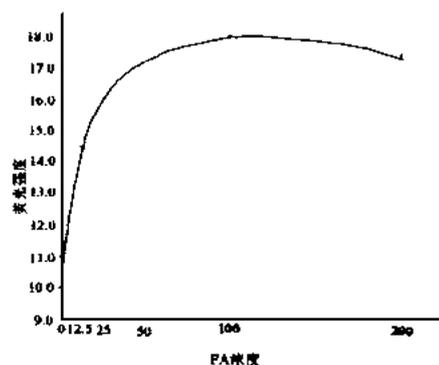


图 2 FA 刺激软骨细胞产生 H₂O₂ 与 FA 浓度相关

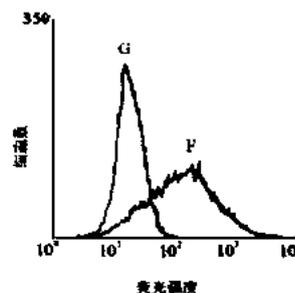


图 3 生姜挥发油对 FA 刺激软骨细胞产生 H₂O₂ 的清除
F. 50mg/L FA 刺激软骨细胞产生 H₂O₂ G. 生姜挥发油对 FA 刺激软骨细胞产生 H₂O₂ 的清除

2.2 生姜挥发油对 FA 引发软骨细胞产生

H₂O₂ 的抑制作用

实验结果发现生姜挥发油在很低浓度对 FA 引发软骨细胞产生 H₂O₂ 具有抑制作用, 见图 3, 表 2 表明在生姜挥发油为 0.16ml/L 时(与细胞共同孵育 0.5h 后)无论 FA 浓度从 25mg/L 增加到 200mg/L, 胞内 DCF 产量并不增加。生姜挥发油、FA(天水)在测定波长处均无荧光(未加载 DCFH-DA 时), 对测定无影响。较高剂量生姜挥发油(0.99ml/L)作用下与低浓度(0.16ml/L), 作用效果相似(表 2)。表明 FA 作用于体外培养的鸡胚软骨细胞引发软骨细胞产生的 H₂O₂ 可被生姜汁轻组分抑制。生姜挥发油为脂溶性, 在与细胞膜接触进入胞内而起作用, 在表 2 中我们看到加入生姜挥发油后, 37℃ 静止温育组荧光值几乎与空白对照相同。

许多研究发现 FA 能够对体外培养的软骨细胞及胞外基质造成损伤, 并且与外源性活性氧自由基造成的损伤有相似的结果^[5,6]。大骨节病区 FA 对软骨组织的损伤作用, 很可能是由于 FA 刺激软骨细胞产生 H₂O₂ 及其他活性氧自由基而导致软骨细胞或胞外基质异常及损伤, 导致功能异常。我们的实验表明生姜挥发

油能够清除、抑制软骨细胞受 FA 刺激而产生的 H₂O₂, 生姜挥发油中含有多种有效成分及还原性物质, 诸如姜酚、姜酮和姜烯酚等分子均含有酚羟基结构, 抗氧化能力可能与这些成分有关, 可能从多种途径清除抑制 FA 刺激软骨细胞产生活性氧, 但何种成分起作用及其作用机理应待进一步研究。这种常用食品的抗氧化效能能在抑制 FA 刺激软骨细胞产生活性氧方面是有价值的, 对从日常饮食中寻找防治大骨节病等疾病的食疗药物有指导意义。

3 参考文献

- 1 曹兆丰等. 中国中药杂志, 1993; 18(12): 750
- 2 Richard Brandt et al. Keston, 1965; 11; 6
- 3 Patrizio Castagnola et al. The Journal of Cell Biology, 1986; 102: 2310
- 4 Moti L et al. The Journal of Immunology, 1990; 145(2): 690
- 5 王春霞等. 北京医科大学学报, 1989; 21(4): 307
- 6 李宏强等. 科学通报, 1994; 39(4): 369

致谢 药学院有机化学教研室施羽翎同志为本研究合成、鉴定 DCFH-DA; 程天蓉博士为该研究做了探索性工作; 药学院药剂教研室强远杏同志提供生姜挥发油。

1996—10—04 收稿

(来源: 中国中药杂志, 1997, 9: 559-561)

腐植酸矿泉浴治疗类风湿性关节炎疗效分析

杨克 杨延青

腐植酸为天然有机高分子化合物,弱酸性。化学结构复杂,含有脂肪链、芳香环、羧基、酚羟基、甲氧基、醌基等,因此具有较广泛的生理活性和药理作用。国内外基础和临床研究及动物实验也证实,腐植酸有显著的抗炎、消肿、镇痛和收敛作用、调节机体免疫功能作用、影响内分泌和细胞代谢作用^[1]等。腐植酸矿泉浴治疗 RA 效果明显,方法简便,无不良反应,值得推广。

资料与方法

1.1 检查对象 来我院疗养经确诊的 RA 患者 147 例。其中男 49 例,女 98 例;年龄 28~56 岁;患病最短时间 1 年,最长时间 13 年。

1.2 矿泉浴方法 于 100L 矿泉水中加入总腐植酸钠 100g,搅拌溶解后嘱患者全身浸浴,浴温 38~40℃。1 次/日,20 分钟/次,连续 30 次为一疗程。浸浴期间让病人做轻微的患关节运动,疗程期间不用其它药物,不做其它理疗。

1.3 矿泉理化特性

矿泉水来自我院 1995 年底新打温泉井,主要指标:偏

硼酸 45.8mg/L,偏硅酸 33.8mg/L,氟 5.20mg/L,碘 1.72mg/L,矿化度 2506mg/L, T 56℃, pH 8.15, Rn 39.34±2.67Bq/L。

1.4 标本采集 疗程前后各抽血一次,进行实验室检查。

1.5 实验检查方法 RF、ESR 测定按文献^[2],红细胞免疫测定(红细胞 C3b 受体花环率 RC3bRR,红细胞免疫复合物花环率 RICR)按文献^[3]操作。

1.6 RA 诊断标准及功能分级沿用美国风湿病学会的诊断标准及关节功能分级。本受检对象按关节功能分级,II级占 92%。

结果

结果见附表 1、2。

表 1 147 例 RA 患者腐植酸浴疗前后临床症状体征比较(例)

	晨僵	关节肿胀	关节疼痛	晚痛	关节功能障碍
浴疗前	76	98	124	23	101
浴疗后	22(16)*	19(17)	28(21)	5(4)	36(33)

*()中为浴疗后患者症状虽未消除但有明显减轻的例数

表 2 147 例 RA 患者腐植酸浴疗前后实验室检查结果

	RF(+, n)	ESR(> 20mm/h, n)	RC3bRR(%)	RICR(%)
浴疗前	49(1:80)***	26(66±23)***	14.03±4.31	9.90±3.27
浴疗后	34(1:40)	9(48±21)	16.36±4.12	7.86±3.10

()中为平均滴度,*()中为 $\bar{x} \pm s$

* 由附表可见,腐植酸矿泉浴后绝大多数患者晨僵、肿胀、关节疼痛减轻或消失,关节功能不同程度恢复;实验检查 RF 滴度下降或转阴,ESR 下降或恢复正常,红细胞免疫功

* 邮政编码:710600

中国煤矿工人临潼疗养院

能增强, RC3bRR 和 RICR 浴疗前与浴疗后比较均有显著性差异($P < 0.05$)。

讨 论

3.1 矿泉浸浴对 RA 有治疗作用,除与温度的热效应有关外,主要是矿泉水中化学物质、气体、放射性及微量元素等多种治疗因子综合作用的结果^[4]。矿泉水中加入腐植酸则能显著提高疗效,增强协同作用。因为腐植酸本身可扩张微动脉、微静脉及毛细血管,提高微血管内血流速度,起活血化瘀作用^[5],从而改善病变局部血液循环,纠正缺血缺氧,促进代谢产物及致病因子的排除,使肿胀和疼痛减轻或消失,关节功能得到恢复。

3.2 类风湿性关节炎是一种以小关节炎症为主的自身免疫性疾病,表现为以滑膜增生为特点的慢性炎症,患者存在明显的细胞免疫功能紊乱^[6]。类风湿疾病时与 IgG 改变有关的自由能导致 IgA 和 IgM 类风湿因子抗体免疫复合物的形成,这些复合物能转而激活细胞生成各种能独立或协同降解软骨和侵蚀骨骼的氧自由基及蛋白酶等生物活性因子^[7],炎性滑膜释放的一些细胞因子也可刺激破骨细胞释放酸性蛋白水解酶,导致骨吸收和软骨钙化增加^[8],引起组织损伤。而腐植酸可以调节机体免疫功能,对抗原、抗体所致的炎症反应有抑制作用^[9],能促进巨噬细胞的吞噬,对抗皮质激素对巨噬细胞吞噬功能的抑制,增强红细胞免疫功能,有利于免疫复合物的清除,提高机体防御能力和抗病能力。

3.3 已有的研究证实,腐植酸有抑制透明质酸酶活性的作用;腐植酸对肾上腺皮质有活化作用,能促使肾上腺皮质激素的分泌;另外,腐植酸还具有与非甾体类抗炎药类似的作用,这对清除自由基也是很有意义的,所有这些都增强了抗炎效果。再者,腐植酸能通过激活或双向调节细胞水

平 CAMP 和 CGMP 含量,使之平衡以维持细胞正常代谢,达到阴阳平衡^[10]。

3.4 从浴疗过程可见,病程短,病情较轻者效果明显,病程长,病情较重者恢复缓慢,应适当延长疗程。如果配合其它一些理疗或系统性功能训练,对病情较重者同时辅助必要的药物治疗可能效果会更好,这有待于今后进一步的研究。部分较重患者 RF 阴性,可能为 IgG-RF 或 IgA-RF,有报导这种类型的病人预后较差^[11]。

参考文献

- 1 陈祥银等. 黄腐酸钠对角叉菜胶致胸膜炎作用的实验研究. 生理科学. 1988, 8(1): 42
- 2 叶应妮等主编. 全国临床检验操作规程. 南京:东南大学出版社. 1991, 10, 325
- 3 杨克等. 矿泉浴对人体红细胞免疫功能的影响. 中国疗养医学. 1996, 5(2): 1
- 4 周汝翔等主编. 实用疗养学. 第一版. 沈阳:辽宁人民出版社. 1987, 79~102
- 5 袁申元等. 黄腐酸钠对微循环作用的研究. 江西腐植酸. 1985, (3): 28
- 6 黄烽等. 类风湿关节炎患者细胞免疫功能研究. 解放军医学杂志. 1991, 16(3): 172
- 7 Lunec J Ann Clin Biochem. 1990, 27: 173
- 8 Einhorn TA, Majeska RJ. Neutral proteases in regenerating bone. Clin Orthop. 1991, 262: 286
- 9 秦万德编. 腐植酸对疾病的治疗作用. 中国煤炭学会科普委员会. 1986, 1: 6
- 10 关德华. 黄腐酸钠对婴儿肝炎综合症的治疗研究. 中级医刊. 1994, (2): 2
- 11 武建国. 风湿病的实验室检查. 临床检验杂志. 1996, 14(6): 328

(收稿: 1997-10-27)

(来源: 中国疗养医学, 1998, 1: 2)

生化黄腐酸对免疫系统的影响初探

薄 芯 李京霞 何立千

(北京联合大学职业技术师范学院, 北京 100011)

[摘 要] 以免疫器官指数、迟发性超敏反应、溶血素量和腹腔巨噬细胞吞噬率为指标,以矿源黄腐酸为对照,对生化黄腐酸对动物免疫系统的影响作了初步研究。结果表明:生化黄腐酸在免疫过程中各阶段均有促进作用,且剂量适合时作用极显著;而矿源黄腐酸则随试验条件不同分别表现为促进或抑制作用,二者之间有较明显的差异。

[关键词] 生化黄腐酸;免疫器官指数;迟发性超敏反应;溶血素;巨噬细胞吞噬率

[分类号] Q 5-33

腐植酸(humic acid, HA)在医药中主要用于治疗风湿、胃肠道疾病、炎症和溃疡等疾病^[1~3]。不同产地的 HA 因煤化程度和提取方法不同而药效各异^[4,5]。黄腐酸(fulvatum acid, FA)是 HA 中分子量最小、溶解度最高、生物活性最强、吸收效果最佳的部分,故药用中以 FA 为主。目前我国主要药用的 FA 为巩义等地出产的从煤炭中所提取的矿源黄腐酸(mineral fulvatum acid, MFA),有关其药效药理研究已有较多报道。而生化黄腐酸(biochemical fulvatum acid, BFA)是近年来我国河北深州首创的专利技术,是人工模拟自然条件利用发酵法形成的,因问世时间尚短,有关的研究报道极为少见。但根据我们在多方面所作的研究,认为其有良好的生物活性和药用价值。因此我们针对其特点以免疫器官指数、迟发性超敏反应(delayed-type hypersensitivity, DTH)、溶血素(hemolysin)和腹腔巨噬细胞(M ϕ)吞噬率(percentage of phagocytosis)为指标就 MFA 和 BFA 对动物免疫系统的影响进行了初步对比研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

BFA 为河北省深州特种化工厂提供。MFA 为巩义制药厂提供。环磷酰胺(cyclophosphamidum, CPA)针剂为上海第十二制药厂生产。5%鸡红细胞(CRBC),10%豚鼠血清。试验动物为 NIH 雄性小鼠,体重 18~22 g,北京生物制品研究所提供。

1.2 方 法

1) 对免疫器官的影响。取小鼠随机分 8 组,具体分组及给药剂量见表 1。CPA 为腹腔注射给药,FA 均为灌胃给药,阴性对照和阳性对照组相应给生理盐水(NS),每日给药一次,连续 7 d。第 8 天称重后断颈处死,精密称量胸腺和脾,计算胸腺指数和脾指数。

表1 FA对小鼠免疫器官的影响

组别	动物个数	FA 剂量 (mg/kg)	CPA 剂量 (mg/kg)	胸腺指数(%) ($\bar{x} \pm SD$)	脾指数(%) ($\bar{x} \pm SD$)
阴性对照组	10			0.246±0.067	0.681±0.171
阳性对照组	10		50	0.047±0.011	0.244±0.086
BFA 对照组	10	25		0.224±0.066	0.678±0.105
MFA 对照组	10	25		0.214±0.033	0.661±0.143
低 BFA+CPA 组	10	15	50	0.068±0.026	0.292±0.061
中 BFA+CPA 组	10	25	50	0.071±0.024 *	0.323±0.085
高 BFA+CPA 组	10	50	50	0.082±0.024 *	0.389±0.084 **
MFA+CPA 组	10	25	50	0.059±0.022	0.299±0.071

检验为用 FA 各组与阳性对照组之间。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2) 对迟发性超敏反应(DTH)的影响。取小鼠随机分3组,具体分组及给药剂量见表2,给药方法及时间同上,用张世玲方法测小鼠DTH值^[6]。

表2 FA对小鼠迟发超敏反应的影响

组别	动物个数	FA 剂量 (mg/kg)	肿胀度/mm ($\bar{x} \pm SD$)
阴性对照组	10		0.25±0.1088
BFA 对照组	10	25	0.42±0.1145 **
MFA 对照组	10	25	0.37±0.1189 *

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3) 对溶血素影响。取小鼠随机分7组,分组及给药剂量见表3,给药方法及时间同上,用张亚利所用比色法测小鼠血清溶血素^[7]。

表3 FA对小鼠溶血素的影响

组别	动物个数	FA 剂量(mg/kg)	CPA 剂量(mg/kg)	溶血素(OD)($\bar{x} \pm SD$)
阴性对照组	10			0.0734±0.0253
阳性对照组	10		50	0.0443±0.0174 *
BFA 对照组	10	25		0.3620±0.1204 ***
MFA 对照组	10	25		0.3079±0.0999 ***
高 BFA+CPA 组	10	25	50	0.3390±0.0173 ***
低 BFA+CPA 组	10	15	50	0.1216±0.0402 ***
MFA+CPA 组	10	25	50	0.1283±0.0529 ***

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

4) 对M ϕ 吞噬率的影响。小鼠随机分为7组,各组给药剂量见表4。给药方法及时间同上,于第5天至第7天腹腔注射2%淀粉溶液0.5 mL共4次(各间隔12 h)。第8天腹腔注射5%CRBC 0.2 mL/只,6 h后断颈处死。常规方法推片染色。光镜下每只小鼠计200个M ϕ 。根据其吞噬CRBC情况计吞噬率及吞噬指数^[8]。

表 4 FA 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬作用的影响

组 别	动物 个数	FA 剂量 (mg/kg)	CPA 剂量 (mg/kg)	吞噬率(%) ($\bar{x} \pm SD$)	吞噬指数(个 ⁻¹) ($\bar{x} \pm SD$)
阴性对照组	10			34.50±12.500	0.444±0.1634
阳性对照组	10		50	16.23±7.3772	0.235±0.1076
BFA 对照组	10	25		27.65±6.7330	0.387±0.0803
MFA 对照组	10	25		23.90±5.1640	0.340±0.0461
低 BFA+CPA 组	10	25	50	26.33±7.2742**	0.375±0.1090**
高 BFA+CPA 组	10	50	50	23.17±2.9963*	0.358±0.1292*
MFA+CPA 组	10	25	50	20.75±4.6752	0.292±0.0710

检验为用 FA 各组与阳性对照组之间。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2 结果

2.1 FA 对免疫器官指数的影响

结果见表 1。数据表明:BFA 和 MFA 对正常小鼠的免疫器官无毒副作用。MFA 不能使受 CPA 抑制的免疫器官恢复。而低剂量 BFA 即可使给 CPA 的小鼠免疫器官指数回升(但不明显);而中、高剂量 BFA 分别使给 CPA 的小鼠免疫器官指数回升显著和极显著,说明 BFA 对免疫低下的小鼠有促进免疫器官上升作用,且作用效应与用药量有一定正向量效关系。

2.2 FA 对 DTH 影响

结果见表 2。数据表明:BFA 可极显著增强小鼠 DTH, MFA 可显著增强小鼠 DTH, 二组间未见显著差异。表明 BFA 和 MFA 均可增强动物的细胞免疫功能,而 BFA 作用可能更强。

2.3 FA 对溶血素的影响

结果见表 3。数据表明:BFA 和 MFA 均可极显著增加正常小鼠的溶血素量,说明二者均可提高小鼠的体液免疫机能。给 CPA 同时给 FA 的小鼠溶血素水平均明显回升,并超过正常小鼠溶血素水平。表明其不仅可缓解 CPA 引起的体液免疫功能下降,而且可再度增强小鼠体液免疫机能。试验中 BFA 与 MFA 在相同剂量时,BFA 作用极显著强于 MFA。BFA 不同剂量组之间差异极显著,表明 BFA 作用与剂量间在试验的用量范围内有明显的正向量效关系。

2.4 FA 对 M ϕ 吞噬率的影响

结果见表 4。数据表明:BFA 对正常小鼠 M ϕ 无影响,而 MFA 可导致正常小鼠 M ϕ 功能有一定下降($P < 0.10$)。在给 CPA 后,低剂量 BFA 即极显著回升 M ϕ 功能,高剂量组可显著回升 M ϕ 功能。二剂量组之间作用无显著差异。同剂量 BFA 与 MFA 之间作用无显著差异,但 BFA 作用有强于 MFA 的趋势($P < 0.10$)。还可见 50 mg/kg BFA 组的作用弱于 25 mg/kg 组,可能因 FA 有双向调节作用所致,需对 BFA 的最佳用药剂量进一步研究。MFA 对正常小鼠有抑制 M ϕ 功能,而对免疫低下小鼠则有一定的恢复 M ϕ 功能作用,其机理有待进一步探讨。

3 讨论

FA 在医药界早有应用,但文献中关于 HA 对动物免疫系统的作用报道不一,差异极大。一

般认为分子量较小的 FA 可有一定的免疫增强作用,而分子量较大的棕、黑腐酸则常有免疫抑制作用^[4,5,9]。BFA 系在人工控制条件下生产,生成周期短,主要经过微生物分解阶段而未进入再缩合,故缩合程度低,且因生产中未经高温、高压和强酸、强碱处理,除产物分子更小,水溶性更好,所带活性基团更多以外,还保留了大量多种氨基酸、多肽、多糖、核酸和微量元素等对生物体有益的成分。本文试验结果表明 BFA 生物活性更高,对免疫系统影响更明显。可初步肯定 BFA 为免疫增强剂,在免疫过程中各阶段似均有促进作用。而 MFA 对免疫系统的作用则随试验条件各异在不同免疫途径中分别表现出促进或抑制作用,具体作用机理尚有待进一步探讨。本文试验数据还说明二种 FA 的作用之间确有较明显的差异,在医药上完全将其视为一种物质是不够妥当的。作为免疫增强药物 BFA 可能有良好的发展前景。

参加此试验的还有本校李鸿玉老师和曹小荣、刘忱益同学,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 易安民,彭庆东,易春兰. 腐植酸钠治疗消化性溃疡的疗效观察. 江西腐植酸, 1984, (2): 49~50
- 2 苏秉文. 黄腐酸钠治疗溃疡性结肠炎疗效及对免疫系统的影响. 腐植酸, 1994, (3): 43~45
- 3 姚发业,王寿桐,贺苏红等. 新疆黄腐酸钠抗炎作用研究. 腐植酸, 1988, (2): 37~38
- 4 曾达之,孟昭光,刘泳泉. 泥炭腐植酸钠对巨噬细胞功能的影响及其毒性. 江西腐植酸, 1983, (3): 43~44
- 5 吴铁,郭澄泓. 北京腐植酸对小鼠免疫功能的影响. 江西腐植酸, 1984 (3): 43~45
- 6 张世玲. 噪声和咖啡因配合作用对小鼠免疫功能的影响. 山东医药工业, 1993, 12(1): 18~19
- 7 张亚利,彭松峰. 眼镜蛇毒对实验动物免疫功能的影响. 广州医药, 1994 (4): 52~53
- 8 陈奇. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 315~317
- 9 丁桂凤,邓玉兰,尚红生. 黄腐酸对免疫细胞功能的影响. 腐植酸, 1988, (4): 28~30

A Study on Immunity Effected By Biochemical Fulvatum Acid

Bo Xin Li Jingxia He Liqian

(Normal College of Vocational and Technical Training of BUU, Beijing 100011)

[Abstract] The purpose to this study was to compare the effects of biochemical fulvatum acid (BFA) and mineral fulvatum acid (MFA) on immunity. It was measured innume organ index, delayed-type hypersensitivity (DTH), serum hemolysin and abdominal cavity macrophage phagocytosis in mice. The results showed that BFA and MFA displayed different actions on immunity. BFA was immunoenhancement in every immune phases and its action was remarkable in right amount. Whereas MFA showed immunodepression or immunoenhancement in the same experiments. they can't be used as the same substance in medicine.

[Key words] biochemical fulvatum acid (BFA); innume organ index; delayed-type hypersensitivity (DTH); hemolysin; abdominal cavity macrophage phagocytosis

(来源: 北京联合大学学报, 1998, 2: 4)

桦川药用泥炭腐植酸的性质特征

祝亚勤 郭立山 王洪杰

徐传志

(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040) (黑龙江省腐植酸办公室 哈尔滨 150001)

黑龙江省桦川泥炭是质量优良, 储量丰富的绿色矿物资源。经物理方法提取, 精制得分子量在 400 单位以下的黄腐酸 (Fulvic acid) 可达 2% 以上。经化学及物理和物理化学分析知其组合化合物结构中具有表面活性及含多种有药用价值的生物活性基团, 且含有氨基酸及铁、锌、锰、钴等十几种人体所必需的微量元素。经初步疗效观察, 其对消炎、止疼、抗风湿、抗真菌、改善微循环、增加机体免疫功能均有良好的效果。其整合作用可以作为重金属解毒剂的药用依据。如将浓度为 0.1—15mg/L 的 Na-FA 给小鼠洗浴 (浴温 40℃, 每两天一次, 每次 15min) 40 天后, 发现小鼠的皮肤呼吸明显增加, 肝脏和肾脏含氧

量增加 50% 以上。如将 0.4g 左右的腐钠胶囊按每日早晚各两粒服用, 并配合每日以 2% 左右的腐钠浴敷患处, 30 天后发现 10 例风湿和类风湿患者均好转。以 95 版药典重金属限量规定检查, 不含砷、铅等对人体有害的元素, 也不含有放射性的物质。

最近笔者在 LC-4A 高效液相色谱仪上, 用 20cm 长的 ODS 柱, 以甲醇—水作流动相, 梯度洗脱, 将 FA 分离出 5—6 个色谱峰, 从而说明了随着新型固定相的不断出现, 检测器的不断更新, 再经过光谱法的综合解析以及计算机的模拟鉴定, 腐植酸的结构有可能被证实。

一、性质特征

表1 桦川泥炭的一般概况

深度 cm	颜色	水份 (%)	粗蜡 (%)	总酸 (%)	FA (%)	HYA (%)	交换量 (mg/g)	总酸基 (%)	羧基 (%)	羰基 (%)	酚羟基 (%)
25—45	棕	13.45	3.42	40.11	12.93	13.46	0.81	3.45	0.81	9.84	2.64
45—85	棕	13.82	3.67	40.88	12.26	18.69	0.71	4.32	0.77	9.74	3.55
85—155	棕	13.80	3.61	41.56	14.45	18.94	0.60	3.07	0.80	9.73	2.27

表2 FA、HYA的元素组成

元素名称	碳(C)	氢(H)	氧(O)	氮(N)
含量(%)	67.5	3.80	24.56	1.60

VS-UV 光谱图见图 1、2, 从 0—4 Der 紫外—可见光谱可知, λ_{max} : 214nm 是零阶导数光谱的吸收带, 有极强的吸收, 是由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁而产生的 K 吸收带, 由于 K 带非常强, 在 0 阶光谱上把 B 带和 R 带淹没了。此现象说明了黄腐酸的组合体系中含有链状烯或

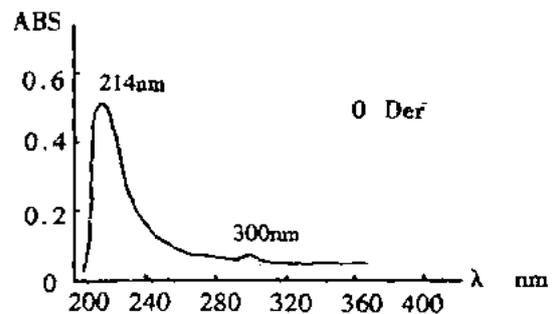


图1 200nm—400nm 0 阶导数的 UV 光谱图

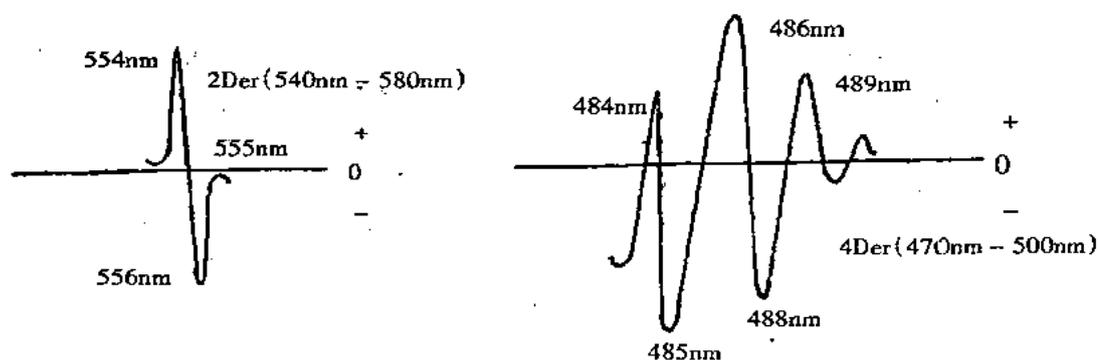


图2 2Der 540nm—580nm的VS光谱图及4Der 470nm—500nm的VS光谱图

表3 分子量及性状

腐植酸类别	黄腐酸	棕腐酸	黑腐酸	总腐酸
平均分子量	398.86	980.60	1827.45	1068.97
性状	黄色粉状	棕色粉状	黑色粉状	黑色粉状
气味	酸	酸	酸	酸
碱性液中	溶	溶	溶	溶
酸性液中 (pH = 1)	溶	溶	不	—
水中 (pH = 7)	溶	溶	不	—
乙醇中 (95%)	溶	不	不	—
乙醇中 (75%)	溶	溶	不	—
铅 (Pb) %	无	无	无	无
砷 (As) %	无	无	无	无

表4 药用黄腐植酸钠特性

纯度 %	E_{465}/E_{665}	计量点 (pH)	小鼠腹进 (800mg/kg)	本底脉冲数 (放射性)	螯合比 (CuSO ₄ /FA)	微量元素
> 90	18	7.6	无死亡	无增加	2.23 μg/1mg	Ca, Zn, Fe, Co, Mn, Mg Cu, P, Ti, K, Cr, V, Al

表5 VS - UV Spectrometry of humic acid

λnm	$d^2A/d\lambda^2 - \lambda$		
	n = 0	n = 2	n = 4
214	$E_{max} > 10^4$ (极强吸收)	$E_{min} < 10^2$ (极小值)	$E_{max} < 10^2$ (极大值)
300	$E_{max} < 10^2$ (极大值)	极小值	极小值
484	拐点	极大值	极小值
486	极大值	极小值	$E_{max} < 10^2$ (极大吸收)
488	拐点	极大值	极小值
554	拐点	$E_{max} < 10^2$ (极大值)	极小值
556	极大值	$E_{min} < 10^2$ (极小值)	极大值

α 、 β -不饱和醛、酮、酸、酯；而 λ_{\max} : 300nm 是体系中羰基的 $n \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁而产生的吸收带，在 0 阶紫外光谱图上是一个极弱的小峰，其吸收度 $A = 0.1742$ ，只是 214nmK 带的 $0.1742/0.5405$ 倍，这就进一步说明了，组合化合物中含有羰基，且量也较大。在 470nm - 500nm 的 4Der 扫描中，得到了较为理想的 484、485、486、488、489、490nm 的吸收峰；在

540nm - 580nm 的 2Der 扫描中，得到了 554nm、556nm 的吸收峰，是由于 Na - FA 溶液呈浅黄色，有色溶液分子中价电子跃迁吸收了可见光而产生的吸收峰。0 - 4Der 的可见紫外导数光谱为腐植酸的药用提供了结构信息，同时也为应用吸收光度法作腐植酸的含量测定提供了理论依据。

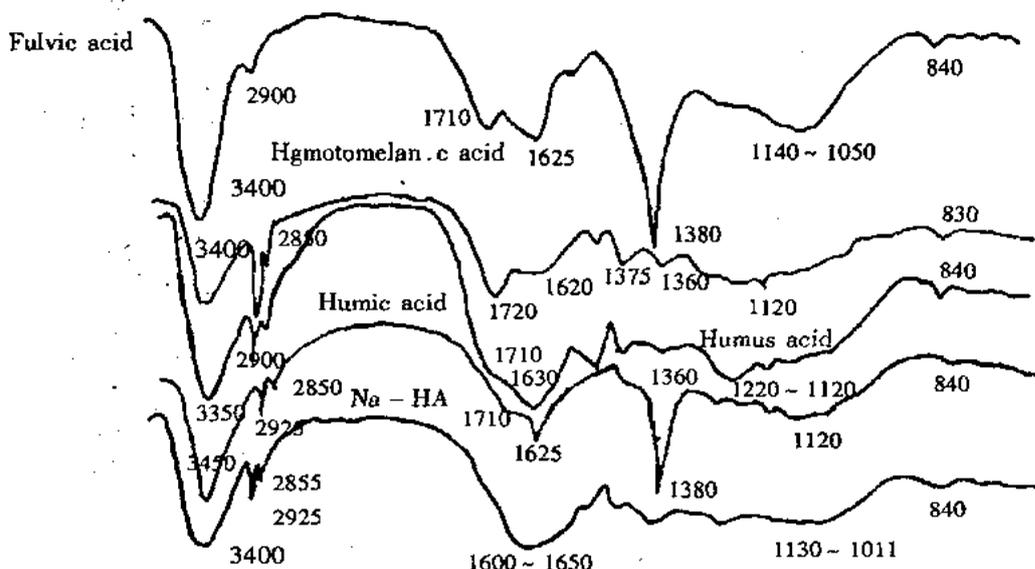


图 3 腐植酸 IR 光谱图

图 3 是将腐植酸(钠)在红外灯下用光谱纯溴化钾 (KBr) 制片后，于 IR 红外分光光度计上作 $4000 \sim 650 \text{cm}^{-1}$ 扫描后而得，纵坐标为透光率 T，横坐标为波数 cm^{-1} 。(其解析数据列于表 6 中)

从 IR 光谱解析可知桦川泥炭腐植酸独特之处在于 Fulvic acid, Humic acid 有

1380cm^{-1} $\sigma - \text{CH}_3$ 吸收峰，峰形锐且强，相同条件下 Na - FA 的 $\sigma - \text{CH}_3$ 变得矮小，说明桦川泥炭腐植酸在 1380cm^{-1} 处，有可能是个甲氧基，这是一个具有生理活性的有药用价值的基团；桦川泥炭药用腐植酸另一独特之处在于 1625cm^{-1} 的吸收峰，这是由于苯环骨架振动共轭双链振动吸收而产生的 $\text{Ve}-\text{c}$ 吸收

表 6 IR Spectrometry of humic acid

sample	functionlgroup						
	游离缔合 V - OH	饱和 VCH	羰基 VC = O	共轭烯 VC = C	饱和 σCH_3	甲氧基醇醚 $\sigma \text{C} - \text{O}$	共轭烯 2H $\sigma \text{C} = \text{CH}$
Fulvic acid	3400	2900	1710	1625	1380	1140 - 1050	840
llymatome lanic acid	3400	2900 2850	1720	1620	1375 1360	1120	830
Humus acid	3350	2900 2855	1710	1630	1360	1220 - 1120	840
Humic acid	3450	2925 2850	1710	1625	1380	1120	840
Na - HA	3400	2925 2855	—	1600 1650	—	1130 - 1011	840

峰, Fulvic acid 中相对含量要高一些, 这是第二个具有药用活性的官能团; 桦川泥炭腐植酸的第三个特点是皆会有 840cm^{-1} 的吸收峰, 从结构分析可知, 这是由 2H 的 $\text{rC}=\text{CH}$, 即面外弯曲振动而产生的吸收峰, 说明组合化合物结构中含有  的结构部分, 这同样也是一个活性基团; 桦川泥炭腐植酸的第

四个独特之处是对热的稳定性, 将棕、黄腐植酸钠从常温升温到 100°C , 在同一光谱条件下, 作常温、 60°C 、 80°C 、 100°C 的 IR 光谱图, 无任何变化, 但如果将其常温下的黄腐植酸钠用 Co^{60} 照射时, 其 840cm^{-1} 的 $\text{C}=\text{CH}$ 裂分成 865cm^{-1} 和 825cm^{-1} 两个吸收峰, 说明有可能是组合化合物中的某结构发生了变化 (参

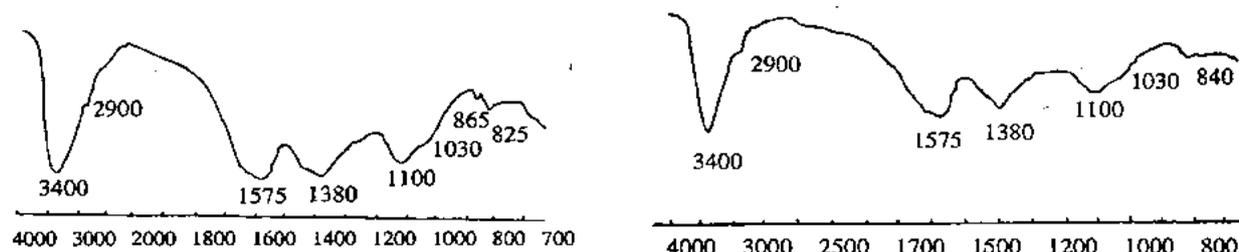


图 4 Co^{60} 照射前后的黄腐植酸钠 IR 光谱图

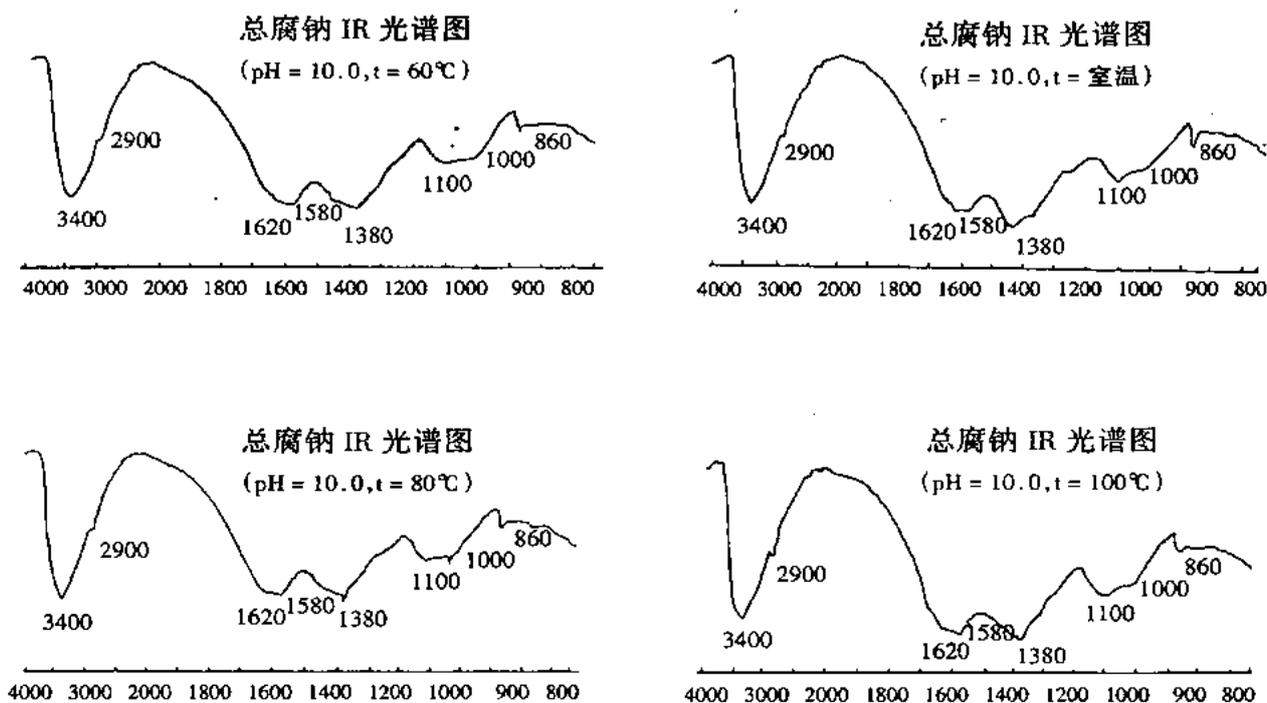


图 5 同一 pH 值, 不同温度下的总腐植钠 IR 光谱图

看图 4.5), 究竟如何有待探讨。从 IR 光谱所得到的结构信息看, 桦川泥炭腐植酸的药用价值是很大的, 而且提取温度不需要控制在 80℃ 以下, 可以提高到 100℃。

二、结束语

1、桦川泥炭腐植酸(Humic acid), 虽然其化学结构尚未完全清楚, 但据我们的研究可以说明, 它是以芳香环、稠苯环为骨架, 且在骨架上连有甲氧基、羧基、氨基等一类有药用价值的活性基团而组成的天然有机化合物。

2、桦川泥炭腐植酸的分子量小, 各项理化指标极佳。光密度比值为 18, 它是表征腐植酸组成结构的重要指标之一, 是腐植酸分子量和芳香缩合程度的特征函数, 与分子量呈负性相关性, 比值越大, 分子量越小, 从 E_4/E_6 的比就能看出桦川泥炭腐植酸分子量是很小的, 从分子量的测定也证明了这一点 ($MFA = 398.86$)。分子量是腐植酸能否在药物上应用的重要指标, 这对研究腐植酸对机体的作用及作用原理, 即药效学 (Pharmacodynamics), 以及腐植酸在机体内的吸收、分布、生物转化及排泄等代谢过程即药动学 (Pharmacokinetics) 的研究是非常有价值的。

的。

3、桦川药用泥炭腐植酸的研究还刚刚开始, 今后准备多方面扩大临床病例, 在药效学, 药动学方面多作些深层次的实验, 同时也想为腐植酸的结构研究进一步作些努力。

参考文献

1. 祝亚勤等, 黑龙江省桦川泥炭提取药用腐植酸的初步研究, 腐植酸, 1994; 4: 7-9
2. 祝亚勤等, 用 ICP 同时测定泥炭腐植酸中必需元素的研究, 腐植酸, 1995; 1: 32-35
3. 王洪杰等, 草炭黄腐植酸钠对风湿性和类风湿性关节炎的临床疗效观察, 中医药学报, 1996; 3: 23
4. R. W. winner, The toxicity and bioaccumulation of caesium and copper as affected by humic acid, Aquat. Toxicol. (N. Y.), 5(1984); 267-274.
5. N. Lange, S. Golbs and M. Kunnert, Grundlagenuntersuchungen zu immunologischen Reaktionen an der Laboratoriumsratte unter dem Einfluss von Huminsauren, Arch. Exp. Veterinaer - med. 41(1987), 140-146.

(来源: 腐植酸, 1998, 2: 12-16)

榆林大骨节病区水中黄腐酸对培养软骨细胞作用的观察*

西安医科大学地方性骨病研究所 曹峻岭 黄辰[△] 郭雄
毕华银 张关远 莫东旭

摘要 目的:本实验观察黄腐酸(FA)对软骨细胞结构、生长、代谢和功能的影响。方法:用大骨节病病区水中FA,以不同浓度(5mg/L、10mg/L、20mg/L)作用于体外培养的兔关节软骨细胞,检测结果作F检验进行统计学处理。结果:显示实验组织细胞膜功能、蛋白质、DNA、蛋白聚糖等不低于对照组或高于对照组。结论:FA对培养软骨细胞的DNA合成、分裂增殖和细胞结构等没有影响。

关键词 黄腐酸 软骨细胞培养 大骨节病

水中有机质中毒学说是大骨节病(KBD)重要病因学说之一^[1],有报道从饮用水源旁的土壤提取腐植物质(浓度自6.25至100mg/L)作用于体外培养的软骨细胞和组织,观察到对细胞有一定的影响^[2,3]。目前认为,引起KBD的水中有机物主要是FA^[4]。本实验用从KBD病区新发户饮用水井底泥中提取的FA作用于体外单层培养的软骨细胞,观察其对软骨细胞生长、代谢和结构的影响。

1 材料和方法

病区FA是从陕西省榆林市芹河乡莽坑村KBD新发户王桥家的水井底泥中提取,非病区FA从北京密云水库底泥中提取。实验用FA由中国科学院生态环境研究中心环境水化学国家重点实验室检测、分离、提取。幼兔关节软骨细胞的原代分离和传代培养方法以及所用材料试剂同以往报道^[5]。

将经原代培养后消化分离的单个软骨细胞按40万个/瓶,接种于5cm×5cm×3cm的方形培养瓶内培养,备作细胞DNA、蛋白质、细胞膜功能和基质葡萄糖醛酸(GlcUA)分析;以20万个/瓶,种植于装有盖玻片的青霉素小瓶内培养,备作细胞形态结构观察。待细胞贴壁后(20h±)随机分为7组:1.对照;2.病区FA 5mg/L;3.病区FA 10mg/L;4.病区FA 20mg/L;5.非病区FA 5mg/L;6.非病区FA 10mg/L;7.非病区FA 20mg/L;分别换入相应的各组培养液培养6d,培养中每2d换液1次,每日倒置显微镜下观察细胞生长情况。终止培养时收获方瓶内细胞,用荧光偏振方法测定细胞膜流动性,了解细胞膜功能;用考马斯兰法测定细胞蛋白质,用二苯胺

显色方法测定各瓶细胞DNA量,了解细胞生长增殖情况;另外,收集细胞周围基质,用咪唑硫酸法测定葡萄糖醛酸含量,以了解基质代谢情况;各组取出带有细胞的盖片1张,用Hanks液清洗,吸干液体后放入10%甲醛中固定,HE染色,进行形态观察;各组另取出带有细胞的盖1张,用Hanks液清洗,吸干液体后立即放入2.5%的戊二醛溶液中前固定,1%锇酸后固定,逐级乙醇脱水,环氧树脂812包埋,LKB超薄切片机切片,铅铀染色后,用JEM 100SX透射电子显微镜观察细胞超微结构。

2 结果

2.1 细胞膜功能测定

各组间P和η值的差异统计学上没有显著性,但P、η值均为7组<4组<1组(0.221<0.243<0.278和2.02<2.31<3.18)见表1,说明不论病区或非病区FA 20mg/L作用于培养软骨细胞之后,细胞膜流动性均好于对照组。

表1 细胞膜流动性测定($\bar{x} \pm S$)

分组	FA	mg/L	n	P*	η*
1		0.0	8	0.278±0.029	3.18±0.92
2	病区	5.0	8	0.275±0.045	3.25±1.16
3	病区	10.0	8	0.266±0.057	3.25±1.74
4	病区	20.0	8	0.243±0.025	2.31±0.51
5	非病区	5.0	8	0.229±0.067	2.39±1.45
6	非病区	10.0	8	0.217±0.080	2.24±1.44
7	非病区	20.0	8	0.221±0.045	2.02±0.91
显著性检验				P>0.05	P>0.05

* P=荧光偏振度 η=微粘度 P、η越大,膜流动性越小,膜功能越差

* 本实验为“八五”国家科技攻关 85-917-01-02 项目内容

* * 西安医科大学生物学、遗传学教研室

2.2 细胞蛋白质、DNA、基质葡萄糖醛酸(GlcUA)量测定

FA 作用各组的蛋白质、DNA、葡萄糖醛酸

(GlcUA)基本都高于对照组,而且随 FA 作用浓度升高而增加,特别是第 7 组的 GlcUA 与其它各组间有非常显著的差异,见表 2。

表 2 蛋白质、DNA、GlcUA 测定值 ($\mu\text{g}/\text{瓶} \bar{x} \pm S$)

分组	FA	mg/L	n	蛋白质	DNA	GlcUA
1		0.0	8	588.26±84.34	23.98±2.30	72.58±8.96
2	病区	5.0	8	660.00±110.72	25.08±2.88	73.56±9.21
3	病区	10.0	8	669.57±109.89	24.42±2.12	72.33±3.35
4	病区	20.0	8	523.70±89.19	25.81±2.33	58.78±8.69
5	非病区	5.0	8	650.00±115.87	28.53±2.33	70.54±13.98
6	非病区	10.0	8	600.22±87.11	27.13±3.57	71.98±7.23
7	非病区	20.0	8	616.96±117.05	28.83±2.18	91.44±14.73
显著性检验				$P < 0.05$	$P < 0.01$ 1:7 3:7 1:5 3:5 $P < 0.05$	$P < 0.01$ 各组:7 $P < 0.01$

2.3 生长状态的细胞涂片

普通光镜下见各组细胞均生长良好,细胞膜完整,胞质丰满,各组均未见固缩、坏死细胞,第 4 组细胞光镜下可见到较多正在分裂中的细胞(图 1、图 2)。

2.4 透射电镜观察

各组细胞膜、核膜完整;其它细胞器亦结构完整;线粒体丰满,嵴排列整齐,内质网充盈,表明病区 FA 作用于培养的软骨细胞,并不引起后者超微结构的改变(图 3、图 4)。

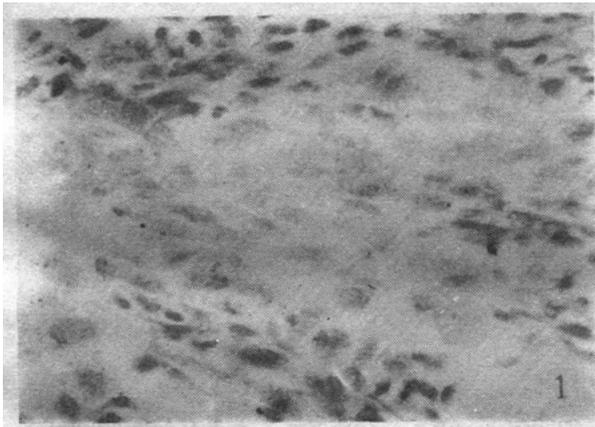


图 1 培养 7d 的软骨细胞 ×200



图 3 培养 7d 的对照软骨细胞 ×8000

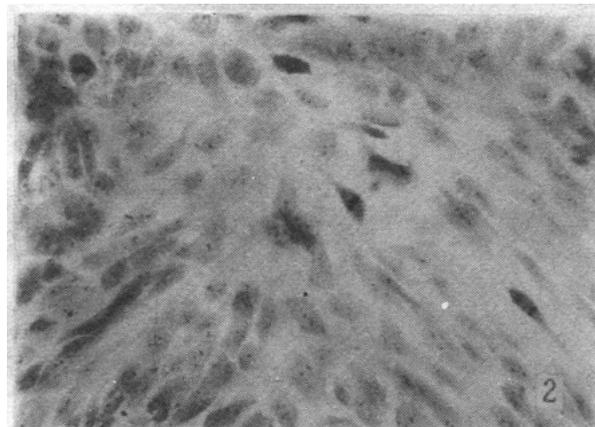


图 2 软骨细胞传代培养 1d, 20mg/L 病区 FA 作用培养 6d, 软骨细胞生长良好, 可见较多细胞分裂相 ×200

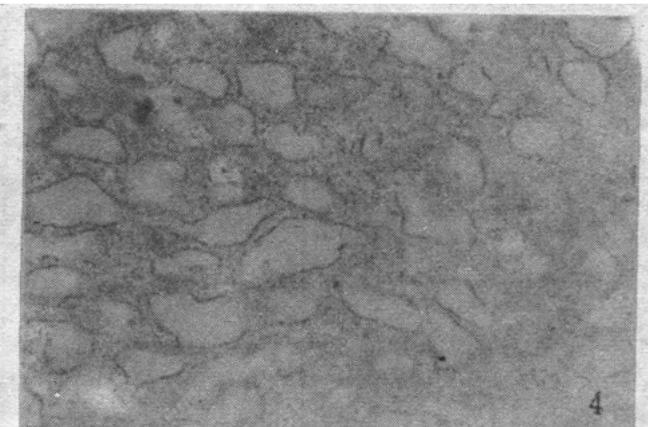


图 4 软骨细胞传代培养 1d, 20mg/L 病区 FA 作用培养 6d, 细胞线粒体丰富, 内质网合成旺盛 ×15000

3 讨论

榆林重病区 KBD 新发户 E 桥家井水的 FA 含量为 0.0666mg/L,以体重 20kg 的 6 岁儿童每天饮用水 3L 计算,每天进入体内的 FA 为 0.2mg,即使是进入体内的 FA 全部蓄积体内,持续 1 个月的蓄积总量为 6mg,体内每 kg 组织内的 FA 平均量仅为 0.3mg。事实上,FA 在体内的分布并无组织选择性(软骨组织的 FA 量并不高于全身各组织的平均含量),且无蓄积现象。本实验所用病区 FA 5.0mg/L、10.0mg/L 和 20.0mg/L 的浓度,在病区患者软骨组织内也是绝对达不到的。作者认为:如再增加实验剂量,则偏离病区实际太远,即便有阳性结果,对病因学研究似乎参考价值也不大。

从生化检测结果看到,各 FA 组(包括病区和非病区)细胞膜功能、蛋白质、DNA 和糖醛酸量、细胞分裂增殖数亦高于对照组或持平。从细胞的形态结构看,各 FA 组细胞完好无损。以上结果显示,FA 并不抑制软骨细胞的生长。甚或在一定程度上有刺激

软骨细胞生长和代谢的作用。因而以 FA 作为 KBD 的病因还需结合临床流行病学另作探讨。

4 参考文献

- 1 永寿大骨节病科学考察文集(1979~1982)。北京:人民卫生出版社,1984,55,115。
- 2 王维哲,乔有江,陈炳南,等。腐植物质对软骨细胞结构和功能的影响。中国地方病学杂志,1985,4(4):349。
- 3 王子健,马梅,彭安。大骨节病区黄腐酸对体外培养鸡胚软骨组织糖氨多糖代谢及脂质过氧化的影响。中国地方病防治杂志,1993,8(6):339。
- 4 中国科学院生态环境研究中心,等。《微生物毒素及其它有机物致大骨节病作用的研究》总结报告(1986~1990)。“七五”国家医学重点科技攻关项目 75-62 03-07(1)专题。
- 5 魏西葵,曹峻岭,熊咏民。兔软骨细胞培养方法研究。中国地方病学杂志,1987,6(2):89。

(1997-07-21 收稿·1997-10-15 修回)

[编辑 张桂兰]

青海省德令哈市北山地区动物鼠疫流行病学调查

青海省地方病防治研究所 焦巴太 吴驾淞 道尔吉 王兆芬
青海省海西州地方病防治研究所 齐多杰 于贤安 卫东 叶培力
青海省海西州卫生局 安秀美 热尕 李吉英 赵启军 李国昌

德令哈市郭里木乡塔日格达乌地区既往史无鼠疫流行记载,70 年代中期曾先后判定喜马拉雅旱獭(简称旱獭)疫点 5 处,以后未再开展工作。1995 年 8 月 28 日宗务隆乡白水河村村民李××在北山陶斯图西沟,由于剥旱獭皮被感染鼠疫,就地隔离治疗,从患者淋巴结穿刺液中分离出鼠疫菌 1 株,证实为腺型鼠疫。经治疗痊愈出院。

1996 年 7 月 18 日在北山地区本布太沟发现 4 匹自毙旱獭,其中 1 匹分离出鼠疫菌 1 株。后又发现自毙其它动物 1 只,仅取回残存碎骨,RIHA 阳性(滴度 1:2560),4 日后从另 1 只自毙动物体内分离出鼠疫菌 1 株。此后陆续从自毙旱獭体内又分离出鼠疫菌 5 株,还从自毙旱獭体外媒介动物体内分离出鼠疫菌 11 株。

共检验各种动物材料 163 份。自毙旱獭 28 只,检出鼠疫菌 6 株,检出率 21.4%。其它自毙动物 1 只,检出鼠疫菌 1 株。检验活旱獭 34 只,子午沙土鼠 60 只,长尾仓鼠 40 只,结果阴性。共检验蚤 161 匹,

草原硬蜱 4 匹,旱獭体虱 4 匹。检出鼠疫菌 11 株,其中蚤检出 7 株,草原硬蜱 2 株,旱獭体虱 2 株。共分离鼠疫菌 18 株。

用 IHA 检验各种血清 341 份。其中旱獭血清 276 份,阳性 20 份,阳性率为 7.25%;牧犬血清 27 份,阳性 2 份,阳性率 7.41%。RIHA 仅从 1 只自毙动物的残存碎骨中获得阳性结果。此次北山地区鼠间鼠疫流行病学调查共分离鼠疫菌 18 株,旱獭阳性血清 20 份,牧犬阳性血清 2 份,其它动物 RIHA 阳性 1 份。鼠疫流行强度、流行范围及时间,在海西州地区是极少见的。今年判定新的鼠间疫点 3 处(宗务隆乡的柯克宝格其,郭里木乡的本布太和雅玛图)。

2 个乡同属德令哈市北边的宗务隆山脉,新发现的鼠间疫点向东扩展约 20km,说明疫源地的面积在增大。今后应对该地加强调查监测,防止鼠间鼠疫向人间扩散。

(1997-05-25 收稿·1997-08-10 修回)

[编辑 宝建喜]

(来源:中国地方病防治杂志,1998,2:70-72+127)

黄腐酸钠对大鼠重症胰腺炎 胰腺微循环障碍的防治研究

原标 陈佛来 文武 龚家镇 袁申元 杨光燃 陈瑞芬

【摘要】 目的 明确黄腐酸钠是否对大鼠重症胰腺炎胰腺微循环紊乱有防治效果。方法 采用胰腺被膜下注射5%牛磺胆酸钠液制备大鼠重症胰腺炎模型。结果 除正常组外,各组胰腺组织光镜病变程度随观察时间延长呈加重趋势,模型组胰腺病变程度明显重于同期黄腐酸钠治疗组($P < 0.05$)。空肠微循环改变结果近似上述胰腺微循环变化。黄腐酸钠治疗组同期血浆内皮素水平显著低于模型组($P < 0.05$)。上述结果提示各组胰腺微血流改变与其胰组织病理改变、血浆内皮素水平变化有相关性。结论 ①黄腐酸钠可明显改善重症胰腺炎微循环,并有控制病情发展的作用。②血浆内皮素变化是作为观察重症胰腺炎病变预后的客观指标之一。

【关键词】 重症胰腺炎 胰腺微循环 内皮素 黄腐酸钠 大鼠

Study on prevention and treatment of microcirculation disorder of pancreas in severe pancreatitis by sodium fulvate Yuan Biao, Cheng Folai, Wen Wu, et al. Department of Surgery, Tongren Hospital of Beijing, Beijing 100730

【Abstract】 Objective To study the effect of sodium fulvate on prevention and treatment of microcirculation disorder of pancreas. Method A rat severe pancreatitis model was used. Result Compared with rats of the control model group, histopathologic changes in pancreas of rats in the treatment group were significantly alleviated ($P < 0.05$). The microcirculation value of the tail of pancreas was remarkably higher in the treatment group than that in either the parallel control model group or the group treated with dextran ($P < 0.05$). The plasma level of endothelin was evidently lower in the sodium fulvate treated group than that in the control model group ($P < 0.05$). Conclusion ①Sodium fulvate can significantly improve pancreatic microcirculation in severe pancreatitis and limits progress of the later; ②Change in plasma level of endothelin is one of objective indexes for predicting prognosis of severe pancreatitis.

【Key words】 Severe pancreatitis Pancreatic microcirculation Endothelin Sodium fulvate Rats

对于不同程度急性胰腺炎(AP)的发生,尤其重症胰腺炎病变发展中,胰腺微循环障碍引起的缺血可能起重要作用,行改善胰腺微循环的治疗可限制该病的组织坏死进展。结合黄腐酸钠(Sodium Fulvate, SF)具有较强的改善心、脑及胃等脏器微循环障碍的药理作用,本研究拟观察该药是否可以改善大鼠重症胰腺炎模型的胰腺微循环,从而缓解该病的病变发展及降低血浆内皮素(Endothelin, ET)达到治疗该病和预测该病预后的目的。并初步探讨其可能作用机理。

作者单位:100730 首都医科大学北京同仁医院外科(陈佛来、文武、龚家镇);100020 北京市红十字朝阳医院普外科(原标);100730 北京市同仁医院内科微循环室(袁申元、杨光燃);100050 北京、首都医大病理教研室(陈瑞芬)

材料和方法

1. 重型急性胰腺炎模型的制备和实验分组:120只健康雄性wistar大鼠,体重250~350g,平均300g。实验前均禁食12h,可自由饮水,室温要求 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 。以1%戊巴比妥钠49mg/kg腹腔麻醉。所有实验动物在麻醉后经右颈静脉插管接微量泵。以乳酸林格氏液每小时8ml/kg恒速持续滴注。参照薛氏法胰被膜下注入5%牛磺胆酸钠液1.0ml制成AP模型^[1]。将实验动物随机分为4组,即正常组(A组)、胰腺炎模型组(B组)、给予0.5%SF组(C组)、给予6.0%低分子右旋糖酐组(D组)每组大鼠30只,各组动物按模型制备后第1、6h二个不同观察时点随机分为I、II组。

2. 胰腺及空肠微循环测定: 各实验组分别在 1h、6h 观察时点各取 15 只动物, 分别在胰腺尾部、距屈氏韧带 1cm 和 5cm 的空肠用激光多普勒血流计(PF-II 型, 瑞典产)探头轻触上述组织表面, 以该仪器显示操作正确为标准, 测定各观察位置 30s 微循环改变, 以起始数据为基数, 计算各测定点的均数作为结果值。

3. 血浆内皮素的测定: 将各组分别于 1、6h 经心脏穿刺抽血处死 15 只大鼠, 将各动物血标本 2ml 放置于预先备有 10% EDTA-Na 30 ul 和 4000KIU/ml 40ul 抑肽酶的试管内, 全血离心, 分离血浆后直接用特异性放免法测定内皮素浓度。

4. 胰腺组织病理学检查: 各组分别于 1、6h 处死 15 只大鼠, 将完整胰腺、脾脏、十二指肠一起取出, 置于冷冻生理盐水, 洗去血迹, 滤纸吸干表面积水, 随后在胰腺尾部取 $2\text{cm} \times 1.5\text{cm}^2$ 组织常规固定, 石蜡包埋、切片、HE 染色, 参照 Rao 等的胰腺组织病理半定量评分标准, 由专人观察, 记录评分结果, 确定病理等级。

5. 统计学处理: 利用 spss for windows 6.0 统计软件对各微循环测定值行单因素方差分析, 其数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 利用 SYSTAT 统计软件对胰腺组织光镜病理结果行四格表的确切概率法统计处理。

结 果

1. 胰腺尾部及空肠微循环变化: 正常组(A 组)随观察时间延长胰腺微循环量无显著变化, C 组分别与 B 组、D 组胰腺尾部微循环血流比较显著升高 ($P < 0.05$) (图 1)。

2. 血浆内皮素水平的变化:

由表 1 可知: 与正常组比较, 胰腺炎模型组的血浆内皮素水平明显增高 ($P < 0.05$); 尽管 6% 低分子右旋糖酐治疗 1h 后测定的血浆内皮素水平较 B 组有明显的降低 ($P < 0.05$), 但 6h 以后血浆内皮素水平明显高于 1h 组; SF 治疗组内皮素水平均低于同期模型组 ($P < 0.05$)。

3. 胰腺组织光镜检查:

由表 2、3 显示, 每组胰腺出血坏死程度随观察时间延长均呈加重趋势, 其中 B 组: 胰腺组织主要呈现大片凝固性坏死, 其周围大量炎性细胞浸润, 间质血管坏死, 并有明显出血 (图 2)。C 组: 胰腺坏死组织主要局限在 1~2 小叶内, 伴少量出血。胰腺组

织病理半定量评分示 1、6h AP 组胰腺病变程度均明显重于 SF 治疗组 ($P < 0.05$) (图 3)。

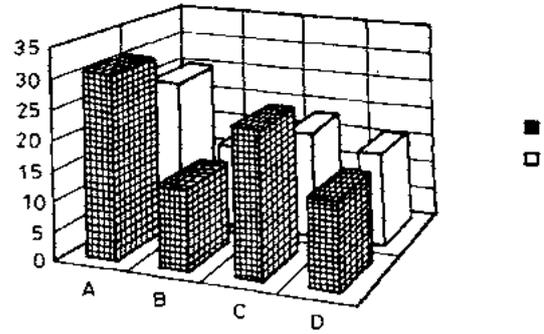


图 1 胰腺尾部与空肠微循环变化比较(单位: 伏特)

表 1 血浆内皮素水平变化(PG/ml)

时间(h)	A 组	B 组	C 组	D 组
1h	161.26 ± 11.57	265.40 ± 52.74	141.31 ± 15.31	151.00 ± 10.99
6h	164.57 ± 15.25	271.67 ± 29.54	158.75 ± 17.50	201.71 ± 27.98

表 2 大鼠 1h 胰腺组织病理半量评分定级结果

组别	出血坏死性胰腺炎(III)	局限坏死性胰腺炎(II)	水肿性胰腺炎(I)	合计
B I	10	5	0	15
C I	2	13	0	15
D I	6	9	0	15

表 3 大鼠 6h 胰腺组织病理半量评分定级结果

组别	出血坏死性胰腺炎(III)	局限坏死性胰腺炎(II)	水肿性胰腺炎(I)	合计
B II	14	1	0	15
C II	4	11	0	15
D II	8	7	0	15

讨 论

一、重症胰腺炎实验动物模型的建立

本研究采用胰腺被膜下均匀注射 5% 牛磺胆酸钠建立重症胰腺炎大鼠模型的方法成功率达 98%, 模型组大鼠胰腺组织光镜病理检查结果与薛氏方法结果一致, 符合人类重症胰腺炎病理改变特点。是可用和可靠模型的方法。

二、AP 发病中胰腺微循环障碍

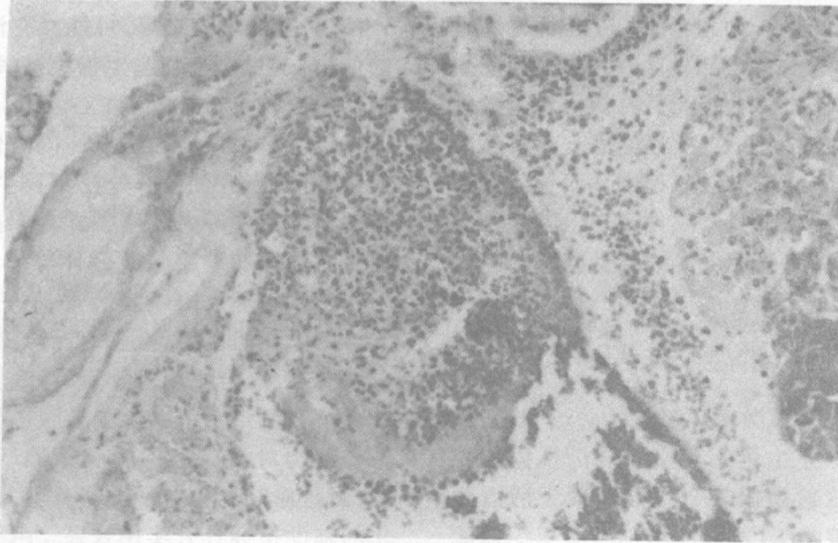


图2 6h胰腺炎模型组胰腺病理切片(HE×400倍)

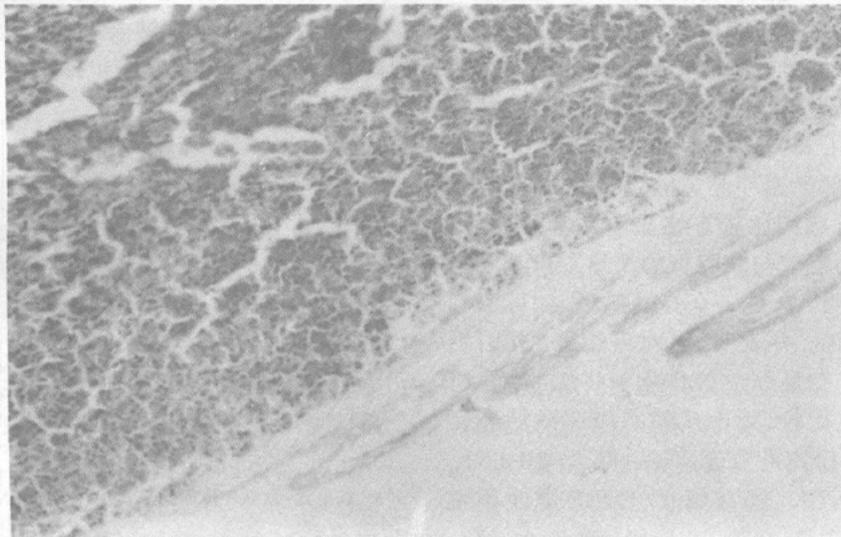


图3 6h黄原酸钠治疗组胰腺病理切片(HE×200倍)

学者研究证明,胰腺炎早期即可出现明显的胰腺微循环障碍;其程度与胰腺炎的病变程度一致^[2]。本研究大鼠胰腺光镜病理结果与胰尾部微循环的改变与上述结论相同。有关学者进一步强调:轻、重AP的主要区别在于坏死的发生,其原因是胰腺有效灌注下降及胰腺微循环障碍所致,并提出胰腺微循环改变是重症胰腺炎所特有。当然由于AP发病的确切始动因素尚不清楚,且微循环障碍可存在于疾病的不同阶段,Knoefe等认为,还不能确切地把胰腺微循环障碍作为AP坏死的主要原

因,他强调酶和/或其他因素是造成胰组织损害的根源,而伴发继发性微循环损害是可能的。

由于重症胰腺炎微循环障碍的可能机制十分复杂,涉及体液因子、细胞因子、第二信使的调节作用,血浆内皮素是原因之一。内皮素是血管内皮细胞分泌和释放的最强的缩血管多肽,可引起全身的循环变化及组织的微循环障碍^[3]。目前已证实其在缺血、缺氧和缺血再灌注损伤等许多具有微循环障碍和缺血表现的疾病过程中,具有重要的发病学意义。迄今为止尚未在重症胰腺炎发病中系统阐明。本研

究发现胰腺炎与血浆 ET 水平密切相关,模型组血浆 ET 水平明显升高($P < 0.05$),并与本研究病理结果一致,提示 ET 也许是导致 AP 进一步发展的主要环节。其原因在于血浆 ET 水平的变化作为血管内皮细胞变化的继发结果,在一定程度上可以反映出微循环障碍及组织细胞损伤的程度。而导致血浆 ET 在胰腺炎的发病过程中分泌增高的因素:胰腺炎时,胰腺组织受损,使血管内皮细胞受到刺激与破坏;胰蛋白酶对血管壁的直接损伤等^[4,5]。但本研究提示:其浓度改变也许是过程中一个极为重要标志物之一。

三、重症胰腺炎胰腺微循环障碍的防治

本研究采用 SF 是由河南巩义制药厂从风化煤中提取,能有效地改善微循环^[6]。该药属于活血化瘀类中药,不仅改善胰腺微循环,增加胰腺组织血流灌注,也可提高胰腺组织细胞对缺氧的耐受能力,防止或减轻胰腺分泌细胞损伤,同时,兼有活血止血双重功效。但目前, SF 尚未应用于 AP 的研治报道。

实验结果表明, SF 对重症胰腺炎的胰腺微循环障碍确有明显改善作用,并由此导致 AP 出血坏死程度得以有效控制,即 SF 治疗组的胰腺组织光镜病理结果,胰腺尾部微循环测定值、血浆 ET 值与模型组在同一观察时点相比较存在显著差异,且提示胰腺微血流障碍的程度与胰腺炎的严重程度有一定相关性,进一步证明 AP 是一全身性疾患,如可引起空肠微循环明显紊乱,并表明 SF 对可能由 AP 引发的脏器微循环障碍有显著改善作用。将 SF 治疗组与右旋糖酐治疗组比较,无论从胰腺尾部微循环变化,空肠微循环变化均存在显著差异($P < 0.05$), ET 值改变幅度亦较大,表明 SF 改善 AP 微循环障

碍效果优于低分子右旋糖酐。

SF 上述观察结果,可能具有清除氧衍生自由基的能力,通过防止细胞生物膜被氧化,减少花生四烯酸代谢产物释放,稳定 TXA_2/PGI_2 平衡,抑制溶酶体释放,减轻自身消化过程,同时使血管内皮细胞免受进一步损伤,使 ET 分泌下降并改善微循环血管内的血液粘度等血流变学异常。打断胰酶对胰腺及血管的破坏加重胰腺微循环障碍的恶性循环,从而防止了胰腺坏死继续发展并促进胰腺组织的恢复。其详细作用机制有待进一步研究证实。

总之,结合国内外学者研究显示:应用激光多普勒血流计测定重症胰腺炎胰腺微循环改变作为判定某种药物对该疾病的胰腺微循环改善效应尚属可行;而且血浆 ET 水平测定作为反映该病微循环变化的辅助指标具有实用效果。由于黄腐酸钠可以明显降低重症胰腺炎的血浆 ET 水平,改善胰腺微循环障碍,减轻胰腺组织损害程度。我们认为该药作为 AHNP 综合治疗的一部分是十分有益的。当然,具体治疗方案尚须进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 薛建国,王宇,许元弟.建立大鼠急性出血坏死性胰腺炎模型方法的改进.中华实验外科杂志,1994,11:313.
- 2 刘全芳,王本茂,唐岩,等.牛磺胆酸钠致急性胰腺炎时大鼠微循环的变化.第二军医大学学报,1994,15:106.
- 3 Bassi D, Kollias N, Castillo CF, et al. Impairment of pancreatic microcirculation correlates with the severity of acute experimental pancreatitis. J Am Coll Surg. 1994, 179:257.
- 4 Yangisawa M, Kuniyama H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature. 1988, 322:411.
- 5 Eaton S, Tsay HM, Yost F, et al. Assays for plasma complement activation by X-ray contrast media. Invest Radiol. 1990, 25:789.
- 6 袁申元.微循环障碍的药物治疗.微循环杂志.1994,4:6.

(收稿:1997-07-28)

(来源:中华肝胆外科杂志,1998,2:95-98)

榆林病区水黄腐酸对大鼠的急性毒性实验报告*

毕华银 庞伟 吕旌乔 张富军

(西安医科大学地方性骨病研究所,西安 710061)

摘要 报告了榆林大骨节病新发户水黄腐酸(FA)对大鼠急性毒性实验结果。以 $400\text{mg}^\circ \text{FA}/\text{kg BW}$ 一天灌胃于组III的4只鼠观察7天,以 $300\text{mg}^\circ \text{FA}/\text{kg BW}^\circ \text{d}$ 灌胃于组II的5只鼠,其中1只连续3天,1只4天,1只6天,余2只连续7天。全部动物于实验第8天取材处死。实验结果:未见两组大鼠FA致死的鼠。未见两组大鼠主要生命器官和软骨病理形态变化。组III鼠摄FA量是病区儿童每公斤体重等效剂量的6800倍,组II鼠7天摄入量达 $2100\text{mg}/\text{kg BW}$,是病区儿童98年的量。实验证明如此大剂量病区FA经消化道接触大鼠并未导致后者有可察觉的毒性损害表现。

关键词 黄腐酸;急性毒性实验;大骨节病;大鼠

分类号 R684.1; R996 R-332

有关水中有机物,或其中黄腐酸(Fulvic acid, FA)作为大骨节病(KBD)致病因子的假说仍多看法分歧。鉴于本专题以病区FA拟复制KBD动物模型实验皆为阴性的结果^[1],有必要再试FA对大鼠急性毒性实验。实验的前题假设是:KBD新发户井水中FA是KBD的病因,其水中浓度达 $0.0642\text{mg}/\text{L}$ (长期饮用)是有毒的,大剂量经消化道接触有机体会导致后者的损害甚或死亡。

1 材料和方法

1.1 实验用FA水溶液由中国科学院生态环境研究中心(1995)王文华副研究员等从陕西榆林重点KBD新发户的水井底泥中制备提供。

1.2 出生后6个月的SD大鼠13只,雌雄各半,体重 $20\pm 16\text{g}$,来所适应4天后进入实验。实验分组及处理因素见表1。

表1 实验分组及其处理因素

组别	动物数	投 予 FA			饮水	饲料
		剂量 ($\text{mg}/200\text{gBW}^\circ \text{d}$)	天数	总量 (mg)		
I	4	-	-	-	单蒸水	低硒饲料***
II	5	60*	7	420*	单蒸水	低硒饲料***
III	4	80*	1	80*	单蒸水	低硒饲料***

* : 等于 $300\text{mg}^\circ \text{FA}/\text{kg BW}^\circ \text{d}$, 7天总量 $2100\text{mg}/\text{kg BW}^\circ 7\text{d}$

** : 等于 $400\text{mg}^\circ \text{FA}/\text{kg BW}$

*** : 低硒饲料的百分组成同文献[1] 本实验中饲料低硒与否无大意义,特说明。

1.3 染“毒”途径采用灌胃法。前一日晚10时至次日灌胃期禁食,晨8时开始每小时1次灌入FA 20mg (水溶液 10ml),第II组3次/日,共7天;第III组于实

验第1天给予4次(共 80mg , 40ml)观察7天。实验期自由饮水进食。全部大鼠于实验第8天取材处死。

1.4 每3天测体重1次,每天观察动物的精神状

* 收稿: 1998-05-19

“八·五”国家科技攻关项目(85-917-01-02)资助

作者简介: 毕华银,男,1933年生,65岁,教授

态、活动量、进食量对刺激的反应及消化道症状等；对死亡大鼠进行病理解剖及组织学检查。

1.5 实验结束时,在乙醚麻醉下取心、肝、肾、胃及右股骨下部、右胫骨上部等做病理解剖及组织学观察;取左股骨按文献^[1]处理后在体视显微镜下观察骨外形和颜色等。

2 结果

2.1 第III组大鼠在灌胃的当天下午,精神萎靡、静卧少动、拒食、对刺激反应迟顿或逃避、皮肤温度低、小便多(可能因灌入 10~12℃含“毒”凉水);晚 8 时后渐活动、少量进食,对刺激出现轻微攻击反应,未见流涎、腹泻或便血;次日晨起渐恢复正常;第 3 天后一切表现与对照组无明显差别。无死亡例。第III组

表 2 经历实验全程的大鼠体重及心、肝、肾重量(g, \bar{x})

组别	例数	体 重			心	肝	双肾
		实验前	实验后	净增数			
I	4	197.00	214.75	17.75	1.20	10.75	1.58
II	2	216.00	221.00	5.00	1.25	10.75	1.63
III	4	197.75	207.75	10.00	1.03	9.30	1.58

各组例数较少,表 2 的各组参数未经统计学处理。摄入 FA 总量达 420mg(2 100mg/kg BW^o·7d)的组II 鼠,其体重增长虽少于其它组,但也净增 5.0g,心、肝、肾的重量则与对照组的接近或相等。

2.3 组I (4只)各骨随机与组II (5只)或组III (4只)各骨配对同时在体视显微镜下观察骨的外形、骨表面颜色、光泽度、透明度、纹理结构等皆未见组间有明显差异。未见组II、III各骨颜色变黄棕。

2.4 组织学检查:组II (5只)和其它 2组(各 4只)皆做 H-E 染色组织切片观察。

2.4.1 胃壁:组II、III各鼠胃粘膜结构完整、无糜烂,未见充血、水肿、炎性浸润等,粘膜的主细胞、壁细胞形态正常,与组I 无明显差异(见 118页图版 1)。

2.4.2 肝:组II、III的肝结构与组I 的无明显差异。不充血,Disse腔不扩张,肝细胞多角形,着色正常,未见浊肿、水样变、脂变或坏死现象。未见门管区异常(见 118页图版 2)。

2.4.3 肾:组II、III的肾小球不充血,肾小管上皮纹状缘结构完整。无浊肿、脂变、坏死等(见 118页图版 3)。

2.4.4 心:组II、III的心脏组织结构与对照组的无明显差异。心肌横纹清晰,未见变性坏死等(见 118页图版 4)。

2.4.5 股骨下端与胫骨上端:组II、III的与对照组的无明显差异,各关节软骨与骺板的软骨细胞分层

大鼠在灌胃的第 1天也有精神萎靡、活动减少等,3 小时后渐恢复,至次晨则与对照组的无明显差别;灌胃的第 2天起将含“毒”饮水加温至 20℃再灌胃后,大鼠仅有约 1小时的静卧少动,尔后即渐正常。第II组的 1号鼠于实验第 4天灌胃 4小时后死亡。经解剖证明其死因是灌胃针头刺破食道,大量黄棕色(FA的颜色)带血液体漏入两胸腔导致的急性呼吸衰竭。3号和 13号鼠于实验第 5天和 7天因灌胃时有液体溢入其口,继而吸入气道 20秒内全身青紫窒息而死。1号、3号和 13号鼠摄 FA 总量分别为 180、240和 360mg;组II 另 2只经历实验全程 7天,各摄入 FA 420mg 无 FA 致死例。

2.2 各组经历实验全程大鼠的体重及心、肝、肾重量见表 2

清晰、细胞柱排列整齐,未见软骨内成骨过程异常。未见软骨坏死等。未见类似 KBD 的任何病理改变(见 119页图版 5)。

3 讨论和结论

3.1 有学者已做过 FA 的急性毒性实验^[2,3]。本文主要参考文献^[2],再做榆林 KBD 新发户水井底泥中提取的 FA 对大鼠的急性毒性实验,以观察该 FA 的毒性。实验分为两部分:(1)一次突击大量给“毒”观察 7天,(2)7天喂养(蓄积毒性实验。第III组的设计属于第(1)部分。受试动物对毒物的反应一般见于接触毒物后的 24~36小时^[4]。本文 1日内灌入大量 FA 观察 7天,实验时间应是足够的。本文参考文献^[2]改用消化道——与 KBD 病人接触水中有机的相同途径给 FA 且将“致死”剂量再加 1倍,达到给大鼠 400mg/kg BW(如按每公斤体重占体表面积相对比值计,大鼠的等效剂量应是小鼠的 0.47^[5]达 188mg/kg BW 已足),结果是:大鼠在接受“毒物”的当天,可能因被灌入大量含 FA 的凉水等而有精神萎靡、拒食等,及至次晨上述异常表现基本消失,至第 3日,一切表现与对照组的无异。实验期体重增长 10.0g,无死亡鼠。第II组的设计属于实验的第(2)部分。该组单日 FA 摄入量虽少于组III的,但 7日累积量则比组III的多得多。组II 的 1 3和 13号鼠皆因有确切的实验事故在前,死亡紧接其后,事故与死亡的因果关系清楚,心、肝、肾、胃的解剖组织学检查也显示,该 3只并不存在可察觉中毒的形态学证据,自然

不会有严重中毒致死的可能。第II组在实验期体重也有增加(表2)。1次大量或7日蓄积灌胃给大鼠(后1组累计摄入2100mg/kg BW^o·7d)都未见FA致死鼠,因而也未得知榆林病区该FA对大鼠的半数致死量LD₅₀

3.2 FA是有机酸。有机酸在有酸性环境的胃粘膜处吸收^[6],经门脉至肝,在肝内经历有机体对之进行的生物转化^[7],进而主要经肾被排出体外。组II和组III所有大鼠的胃粘膜、心、肝、肾及骨软组织的组织学检查皆未能见任何受损害的形态学证据表明:经消化道摄入前述两个实验剂量的FA无论在生物转化之前或之后,并未显示对大鼠全身重要生命器官和骨软骨有明显毒性作用。

本文没有相关的生化学检测数据,但全身表现和解剖组织学全部正常的形态所见(体重有增加,心、肝、肾无浊肿、脂变等)也间接表明实验动物并无明显的中毒性生化代谢紊乱。

3.3 榆林重病点KBD新发户井水中的FA浓度为0.0642mg/L^[8]。如以体重20kg的6岁儿童每天饮水3L计,日摄入FA0.2mg(等于0.01mg/kg BW^o·d)。本实验组III鼠摄入FA400mg/kg BW,等于病区儿童(每kg BW摄入量)的40000倍,按每公斤体重占体表面积比值折算等效剂量^[5],等于病区儿童6800倍,即等于病区儿童18.6年的摄入量;组II鼠7天摄入量等于病区儿童九十八年的摄入量。以此大量的FA并未导致实验大鼠任何中毒形态迹象的结果推论:KBD病区人群每天摄入含0.0642mg^o FA/L饮水3~5L,该FA量理应是不能引起任何中毒的阈下量。

3.4 70年代以来,国内外早已将腐植酸或其组分之一的FA作为良好的抗炎、抗溃疡、抗菌、抗病毒……等药物应用人类疾病的临床治疗^[9]。袁盛榕等(1986)研究证明,黄腐酸钠(笔者注:以NaOH调pH_p≥7.0时,FA溶液中的FA也就是黄腐酸钠)对小鼠的急性毒性作用很小,一次性腹腔注射其LD₅₀±L⁹⁵(LD₁₀)=1417mg/kg BW;在亚急性毒性实验中,以0.8%黄腐酸钠水溶液、8.0mg/kg BW^o·d剂量肌肉注射于家兔8周,FA钠可刺激动物体重增长,对血Wbc总数和其分类、血红蛋白、肝功(SGPT)、肾功(血浆尿素氮)皆无任何不良影响。8.0mg/kg BW^o·d剂量(已是临床治疗剂量的10倍)长期应用对机体无毒性反应,可安全使用^[3]。黄腐酸钠也无致敏作用^[3]。以黄腐酸钠20.0mg/kg BW^o·d给大鼠腹腔注射7天,或给2.25~3.00mg/kg BW^o·d给小鼠连用7天观察3代,对大鼠或小鼠无致畸作用^[10],对小鼠骨髓细胞染色体亦无影响^[10],河南医学院一附院试用黄腐酸钠治疗食管癌,患者口服

2.5%黄腐酸钠水溶液每次30~40ml,每日3次,连续3~4周,单人每天摄入FA2.25~3.0g,摄入总量45~67.5g。受试8人中未观察到药物(FA)引起病人主观不适和对病人血像、肝功等方面的副作用;经FA治疗后再切除的4例食管癌标本的病理组织学观察亦未见FA所致退行性变化^[11]。提示治疗剂量FA对人体也未表现有明显毒性作用。

临床长期肌肉注射用量0.8mg^o FA/kg BW^o·d^[3]和病人每天口服2.25~3.0g(=45~60mg/kg BW^o·d)已经分别是KBD病区人群通过饮水摄入FA量的80倍和4500~6000倍。

文献所及供注射用的^[3]或口服的FA^[11]和KBD病区水中的FA在化学组分上未必完全一样,但本文所用的KBD新发户水井内提取的FA,即使是很大剂量也未表现出对实验大鼠毒害作用的结果,也不支持本文前言中提到的“实验的前题假设”判断。

4 参考文献

- [1] 毕华银,陈萍,郑滨,等.榆林病区水黄腐酸拟复制大骨节病动物模型的实验报告[J]地方病通报,1998,13(3):9~14.
- [2] 彭安,徐朗秋.硒与腐植酸拮抗作用的研究[J]中国科学B辑,1986,6:835.
- [3] 袁盛榕,王书锦,等.黄腐酸钠的毒副作用研究[J]北京第二医学院学报,1986,7(1):18.
- [4] 乔赐彬.毒理实验设计[A]江泉观主编.基础毒理学[M]北京:化学工业出版社,1991:361~382.
- [5] 药理学实验编写组.药理学实验[M]北京:人民卫生出版社,1985:240~243.
- [6] 王兰.外源性化学物的吸收、分布和排泄[A]江泉观主编.基础毒理学[M]北京:化学工业出版社,1991:10~25.
- [7] 沈惠麟.外源性化学物的生物转化[A]江泉观主编.基础毒理学[M]北京:化学工业出版社,1991:57~82.
- [8] 中国科学院生态环境研究中心.陕西榆林大骨节病地区有机物的研究(内部资料,1995).
- [9] 薄芯.腐植酸在医学上的应用[J]生物学通报,1997,32(5):18.
- [10] 马统勋,段民江,刘恒,等.黄腐酸钠致敏、致畸和对染色体影响的实验研究[J]河南医学院学报,1984,19(1):7.
- [11] 范魁生整理.黄腐酸钠治疗食管癌疗效初步观察[J]河南医学院学报,1981,11(1):321.

(英文摘要见第14页)

(来源:地方病通报,1998,3:4)

榆林病区水黄腐酸拟复制大骨节病 动物模型的实验报告*

毕华银¹ 陈萍² 郑滨¹ 熊咏民¹
李广元¹ 王治伦¹ 张富军¹ 陈凤石¹ 张增铁¹

(西安医科大学: 1. 地方性骨病研究所; 2. 生物学与生物遗传学教研室, 西安 710061)

摘要 在低硒饲料条件下,以 50mg/L榆林大骨节病区黄腐酸(FA)饮水和 KBD新发户井水 10倍浓缩饮水分别致雏鸡 KBD模型实验 37天。前一组鸡每只每天摄入 FA 2.0mg,等于 10.0mg/kg BW⁰·d,该剂量约为该病区儿童每公斤体重摄入量的 1 000倍。上述两类饮水对两实验组的全身一般状况,部分相关生化指标,肝、心、肾等乃至骨软骨都未能显示任何有害作用,即未能导致雏鸡类似 KBD的任何病变。另以 100mg⁰病区 FA/L饮水(剂量 10.0mg⁰ FA/kgBW⁰·d)致大鼠 KBD模型实验 28天,其结果与雏鸡的完全一致。

关键词 大骨节病;黄腐酸;低硒;雏鸡;大鼠

分类号 R684.1; R996 R-332

大骨节病(KBD)病因说之一——水中有机物中毒说为一些学者所强调。该说认为水中有机物,特别是其中黄腐酸(Fulvic acid, FA)可能是 KBD的病因^[1,2]。能否复制出 KBD的动物模型仍然是争论的关键问题之一。按合同书的要求进行本实验。实验分两批进行。

1 实验 1

1.1 材料和方法

1.1.1 由西安机械化种鸡场购进“京白 904”出壳后第 23天的雏鸡 70只,皆雌性,体重 64~119克(平均 89克),来所适应 4天,即出壳后第 27天开始实验。实验期 37天。实验期分笼喂养,随意饮水进食。

1.1.2 以榆林 KBD新发户水井底泥中提取的浓 FA水溶液配成 50mg⁰ FA/L单蒸饮水;从北京密云水库底泥中提取的非病区浓 FA水溶液配成 50mg⁰ 非病区 FA/L单蒸饮水(以上两种 FA浓溶液皆由中国科学院生态环境研究中心制备提供)另以榆林 KBD新发户的井水(在实验室 < 50℃温箱

内)浓缩 10倍水供另一组实验用。

1.1.3 按体重排序后随机分为 6组。分组及处理因素见表 1

组别	例数	饮 水	饲 料
I	12	单蒸水(本校实验用)	低硒饲料*
II	12	同组I水	低硒+硒饲料**
III	14	50mg ⁰ 病区 FA/L单蒸水	同组I饲料
IV	14	同组III水	同组II饲料
V	13	50mg ⁰ 非病区 FA单蒸水	同组I饲料
VI	5	病区(水)浓缩 10倍水***	同组I饲料

* : 饲料的百分组成: 陕西耀县非病区低硒小麦粃 46.5, 低硒玉米粃 46.5, 骨粉 4.0, 含碘食盐 1.0, 酵母 1.0, 维生素 AD粉 0.4(含维 A 1000U, 维 D 200U), 植物油 0.5ml 实测含 Se 13ppb. 另补给有萝卜, 大青菜 5.0g/只·天

** : 上述低硒饲料 1kg内加硒 100⁰g(以 Na₂SeO₃ 220⁰g), 实测含 Se 107ppb 补充蔬菜量同上。

*** : 该 10倍浓缩水 10个化学元素的检测结果 (mg/L): Mn < 0.1, Cu 0.01, Zn 0.26, Cd < 0.003, Pb < 0.04, Hg < 1.0 × 10⁻¹⁰, Cr⁶⁺ < 0.01, Ag < 0.009, As 0.015, CN⁻ 0.1

* 收稿: 1998-05-19

“八·五”国家科研攻关项目(85-91)

作者简介: 毕华银, 男, 1933年生, 65岁, 教授

1.1.4 雏鸡来实验室之前和之后,按标准程序进行了马立克疫苗、新城疫乳剂疫苗、法氏囊疫苗等系统免疫。

1.1.5 处死时先在颈部抽血备做全血硒(按文献^[3])和血浆谷胱甘肽 GSH(按文献^[4])含量测定。取心、肝、肾、肌胃、右股骨下端、右胫骨上端检材 10% formalin液固定,常规(骨脱钙)石蜡切片、H-E染色、普通光镜观察。又取完整左股骨及左胫腓骨在自来水(pH8.2)内煮沸 15分钟,剥去软组织,继用 10% formalin液,再用 80% Alcohol固定凉干后以电子天平称重,游标卡尺(精度 0.02mm)测长径、横径,

以 Olympus体视显微镜观察骨外表结构等。

1.2 结果

1.2.1 实验中,组III 8只和组V的 3只,先后发生啄食癖,其中 1只被啄食致死。其余的被隔离喂养后外伤愈合。

1.2.2 实验终了时,动物精神状态、步态、羽毛色泽度各组间未见差异;低硒组皮下未见出血素质;组VI各鸡未见烦渴等高渗脱水现象。各组动物体重(表 2)、饲料消耗量看不出明显差别。各组饮水量相近,平均约 40ml/只·天。

表 2 实验终结时,雏鸡体重、全血硒及血浆 GSH含量($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	全血硒量(ng/ml)	GSH含量(mg/dl)
I	213.91±38.12(11) ^{a*}	26.50±5.32(6) ^a	52.6±5.81(7) ^a
II	203.73±33.93(11) ^a	126.89±23.30(9) ^b	50.65±5.35(6) ^a
III	201.69±34.05(13) ^a	27.00±9.18(8) ^a	40.56±6.30(5) ^b
IV	199.00±27.69(14) ^a	100.92±38.75(12) ^b	44.43±10.65(6) ^{ab}
V	212.92±26.84(12) ^a	26.64±6.49(11) ^a	52.50±5.52(6) ^a
VI	210.80±41.12(5) ^a	25.50±7.19(4) ^a	46.40±2.32(4) ^{ab}

*:各参数后括弧内的数字为例数;同一纵列内各参数右上角英文字母不同者表示差异有显著性($P < 0.05$),下同

1.2.3 实验结束时,II、IV组的全血硒水平非常显著地高于其它 4组($P < 0.001$)。在II和IV组之间,I、III、V和VI组之间的差别则无显著性(两 $P > 0.1$,表 2)。血浆 GSH含量第III组的最低,与I、II、V组比较,差异有显著性($P < 0.05$,表 2)。

1.2.4 测量剥去软组织的左胫骨重量、长度和中段额状横径,各组间差异无显著性(P 值皆 > 0.1 ,表 3)以第III组为例,实验 37天内胫骨长度由 42.0mm增至 62.0mm,即由软骨内成骨增加骨长约 20.0mm,骨两端每天平均各增长 270 μ m,相当于 10个肥大软骨细胞的叠加长度。

表 3 左胫骨重量、长度和中段额状横径($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	重量(g)	长度(mm)	中段额状横径(mm)
I	10	0.95±0.21 ^a	63.1±3.74 ^a	3.70±0.29 ^a
II	10	1.00±0.20 ^a	63.50±3.41 ^a	3.69±0.23 ^a
III	11	0.92±0.19 ^a	62.03±3.32 ^a	3.73±0.30 ^a
IV	10	0.90±0.08 ^a	62.13±2.77 ^a	3.74±0.19 ^a
V	10	0.96±0.13 ^a	64.54±2.81 ^a	3.67±0.17 ^a
VI	5	1.03±0.11 ^a	63.46±2.77 ^a	3.64±0.13 ^a

同时肉眼观察骨的纵轴旋转度、弯曲度和其它大体结构等,以及配对在体视显微镜下观察骨的表面颜色、光泽度、透明度及骨皮质表面纹理等皆未能见各组间有任何可察觉出的差异。

1.2.5 组织学检查

(1)在胫骨上端 H-E染色的组织切片上,63天的小鸡仍未见次级骨化中心。在骺软骨的贮备带见软骨渠(Cartilage canals)。测组I~IV的增殖带上界至深层干骺端成骨隧道顶部之间的垂直厚度(拟暂代替骺软骨厚度)和干骺端各成骨隧道顶部向下 0.5mm水平处的所及初级骨小梁中轴软骨宽度(这两个参数也部分地反映骺软骨的生长发育和其相关的软骨内成骨过程。结果见表 4)。

表 4 骺软骨厚度、干骺端原始骨小梁中轴软骨宽度(μ m)($\bar{x} \pm s$)

组别	骺软骨厚度(n)	初级骨小梁中轴软骨宽度(n)
I	593.38±50.17(8) ^a	101.68±38.56(7) ^a
II	588.59±62.90(7) ^a	82.60±19.34(7) ^a
III	570.19±71.14(11) ^a	78.66±23.48(11) ^a
IV	612.92±61.85(10) ^a	94.89±35.82(10) ^a

以组II各胫骨随机与其余 5组胫骨两两配对,表 4所见,各参数组间比较未见其差异有显著

性 (P 值皆 > 0.1) 组II 与其余各组的骺软骨均未见软骨坏死; 各组各骨增殖层与成熟层软骨细胞柱排列整齐, 干骺端成骨隧道的各顶端联线基本平齐于组间相近的水平处。初级骨小梁与骨长轴平行, 排列大致整齐。骺软骨的干侧部无软骨细胞局限性堆积且向干骺端膨出等迹象 (见 117 页图版 1 2)。

(2)心脏: 各组动物均见散在较少的心肌纤维嗜酸性变, 其它未见明显异常。随机取 I、II、III 组各 5 例心脏切片, 在油镜 (100 \times) 下测每例 20 条心肌纤维的横断面直径分别为 $4.54 \pm 0.53 \mu\text{m}$ 、 $4.85 \pm 0.63 \mu\text{m}$ 和 $4.61 \pm 0.43 \mu\text{m}$, 3 组间差异无显著性 (P 值皆 > 0.2)。

(3)肝: 各组各例肝小叶结构正常, 肝细胞多角形, 胞浆颗粒状, 轻度嗜碱性着色。各组皆未见肝细胞浊肿、脂变、细胞内淤胆或毛细胆管扩张现象。

(4)各组肾脏未见明显病变, 肌胃平滑肌未见坏死及其它异常。

2 实验 2

2.1 材料和方法

2.1.1 由陕西省实验动物中心提供 SD 大鼠 65 只, 雌雄各半, 体重 51~70 克, 随机分组后分笼喂养, 随意饮水进食。实验期 28 天。

2.1.2 以实验 1 所用两种 FA 配成各 $100\text{mg} \cdot \text{FA/L}$ 单蒸水。实验分组及处理因素见表 5。

2.1.3 乙醚麻醉下取肝做细胞色素 P-450 (按文献^[5]) 和脂质过氧化物丙二醛 (MDA) (按文献^[6]) 含量测定; 另取肋软骨做软骨生化组分含量测定 (按文献^[7]); 取左股骨观测骨重量、外形等 (标本处理及观测内容同实验 1 左胫骨); 取右股骨下端、右胫骨上端及心、肝、肾等常规石蜡切片、HE 染色、普通光镜观察。

表 7 肋软骨生化组分含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	羟脯氨酸 (mg/g 干粉)	胶原	粘多糖 (mg/100mg 干粉)		
				氨基己糖	己糖醛酸	硫酸基
I	9	23.76 \pm 2.80	182.69 \pm 21.55	8.28 \pm 0.68	10.01 \pm 2.06	2.28 \pm 0.82
II	10	22.07 \pm 3.71	169.74 \pm 28.54	7.74 \pm 0.41	8.12 \pm 2.02	1.57 \pm 0.31
III	11	21.16 \pm 2.58	162.72 \pm 19.84	8.86 \pm 1.27	8.63 \pm 1.05	1.74 \pm 0.42
IV	9	22.72 \pm 4.66	174.72 \pm 35.25	7.72 \pm 0.82	8.27 \pm 1.44	1.92 \pm 0.96
V	11	24.24 \pm 5.05	186.4 \pm 38.90	8.67 \pm 1.42	9.06 \pm 1.92	2.03 \pm 0.66

* : 5 个组各参数组间两两比较, P 值皆 > 0.05

2.2.3 测量剥去软组织的左股骨重量、长度和中段额状横径, 各组间差异无显著性 (P 值皆 > 0.05)

表 5 实验分组及处理因素

组别	例数	饮 水	饲 料
I	12	单蒸水 (本校实验用)	低硒饲料*
II	12	同组 I 水	低硒+ 硒饲料**
III	14	$100\text{mg} \cdot \text{FA/L}$ 病区单蒸水	同组 I 饲料
IV	14	同组 III 水	同组 II 饲料
V	13	$100\text{mg} \cdot \text{FA/L}$ 非病区单蒸水	同组 I 饲料

* : 同实验 1 低硒饲料。

** : 同实验 1 加硒饲料。各组都不加喂蔬菜。

2.2 结果

2.2.1 实验终结时, 各组动物的精神状态、体重及饲料耗量大致相近。每只大鼠每天饮水约 12.0ml, 各组相近。全血硒含量各组水平与实验 1 的类同 (数据从略)。

2.2.2 肝匀浆的过氧化物丙二醛 (MDA) 含量以组 III、IV 的微高; 细胞色素 P-450 含量以组 III 的略低, 但各组间差异皆无显著性 (表 6)。

肋软骨的生化组分含量 (表 7) 各组间差异亦无显著性。

表 6 肝匀浆 MDA 及细胞色素 P-450 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA (nM/mg 蛋白)	细胞色素 P-450 (nM/mg 蛋白)
I	1.5792 \pm 0.2222(6) [*]	44.08 \pm 9.08(5) [*]
II	1.4552 \pm 0.2444(9)	54.08 \pm 6.87(6)
III	1.6022 \pm 0.2898(9)	39.56 \pm 11.31(7)
IV	1.5964 \pm 0.1795(5)	44.54 \pm 13.08(8)
V	1.5768 \pm 0.2179(8)	41.8 \pm 17.79(7)

* : 5 个组各参数间两两比较, P 值皆 > 0.05

(表 8 列出 3 个组的参数)。

表 8 左股骨重量、长度和中段额状横径 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	重量(g)	长度(mm)	中段额状横径(mm)
I	9	0.24±0.04	27.54±1.39	3.16±0.27
II	9	0.23±0.03	27.07±1.00	3.12±0.21
III	9	0.2±0.03	26.38±1.65	3.02±0.21

* : 3个组各参数组间两两比较, P值皆> 0.05

以组II各股骨随机与其余4组股骨两两配对同时肉眼或体视显微镜下观察骨的外形及骨表面形态结构,未能看出各组间有任何明显差异。

2.2.4 心、肝、肾等的组织学检查未见病变。各组大鼠的股骨下端和胫骨上端已出现次级骨化中心且已接近等经期。骺板的骺侧见骨骺终板,关节软骨深层的远心性化骨过程仍在进行中。各组的骺板厚度大致接近,厚薄均匀,软骨细胞柱排列整齐,骺板干侧部的软骨内成骨过程皆正常。干骺端骨竖刺排列整齐且与骨干长轴相平行。未见骺板软骨细胞局限性。

2.3.1 所用低硒饲料的 Se含量 13ppb,与陕西彬县病点小麦中的 Se量 14ppb^[18]相接近。

2.3.2 在实验1和2中,第III组的处理因素(饲料)低硒和(饮水)FA,是两个可疑致KBD因素的叠加。该组是验证低硒+FA能否引起类似人类KBD病变的重点观察对象。实验1中第VI组是疑及病区水中除腐植酸组分之一的FA外,是否还存在有其它尚未探知的致病因素,特别是某些小分子有机物或其它化学致病因素而设计。病区水在<50℃温度下浓缩10倍,一般不会引起饮水水质和某些小分子有机化学物性质及其致病作用的改变。

2.3.3 实验1、2中的各低硒饲料组和各加硒饲料组,实验结束时其全血硒都有相应的反映(表2)。各低硒组的骨软骨、肝、肌胃等皆未见萎缩或坏死等。低硒各组间未见组织结构差异。

2.3.4 陕西榆林重病区KBD新发户井水中FA平均含量为0.0642mg/L^[9]。以体重约20kg的病区6岁儿童每天饮水3L计,每天摄入FA量约为0.2mg(0.01mg/kgBW·d)。本实验中雏鸡饮水40.0ml/只·天,III、IV两组每鸡每天摄入病区FA量约为2.0mg(10.0mg/kgBW·d),按每公斤体重计,是病区儿童量的1000倍;按每公斤体重占体表面积的对比值(假设雏鸡的与大鼠的相接近)折算,为病区儿童的166倍。实验2结束时,大鼠体重平均120g,第III、IV组大鼠摄入FA量亦为10.0mg/kgBW·d。

按Harber规则:某一毒物剂量(C1)使动物染毒一定时间(T1)而产生一定的效应(R);如剂量增加或减少(C2)时,则改变染毒时间(T2)仍可得相同的效应(R)^[11]。见下列公式:

$$C_1 \times T_1 \approx C_2 \times T_2$$

$$T_2 \approx \frac{C_1 \times T_1^{(11)}}{C_2} \quad (1)$$

$$C_2 \approx \frac{C_1 \times T_1}{T_2} \quad (2)$$

已知进入病区,罹患KBD的最短时间(T1)是6个月^[12](183天), (现假设FA为病因,且在榆林KBD新发户井水FA剂量C1条件下),本文实验1、2中,C2剂量增大166倍,T2理论值应为1.1天,本实验期分别为37天和28天,对复制KBD模型来说,其时间应是足够的;按公式(2),其实验剂量C2也是绰绰有余的。

2.3.5 水中有机物,诸如含酸性官能团的腐植酸,或含氧的醇、酚、醚、醌、酮等的小分子有机物^[13]进入有机体后,有机体要进行(就体内能进行的内容^[14])并对应完成对这些外化物的生物转化过程^[14]。有关生物转化所需的酶类,广泛存在于许多有机体。脊椎动物以哺乳类为主,还存在于鸟类、鱼类等^[14]。生物转化过程分为两相:I相为氧化、还原、水解等反应,参与该反应的重要物质是细胞色素P-450 II相为结合反应,参与该反应的重要物质是谷胱甘肽(GSH)^[14]。本实验中,大鼠肝匀浆的细胞色素P-450含量以第III组的较低(为第I组的89%,但差异不显著,表6);雏鸡血浆GSH含量亦以第III组的较低(达第I组的77%,差异有显著性,表2)。上两物质含量降低显然与机体对水中有机物生物转化中的消耗相关。实验2中大鼠肝匀浆的脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量第III、IV组的仅微量高于第I组的,但差异无显著性(表6)。MDA是体内自由基作用于多不饱和脂肪酸形成脂质过氧化产物的代表物质。本实验中MDA含量无明显增加,提示大鼠虽饮高于病区FA量1558倍的水,每kg体重摄FA量等于病区儿童的1000倍条件下,肝内自由基含量并无明显的增加。经消化道进入体内的外化物,所经历的生物转化部位主要在肝。本实验1、2的第III、IV组肝细胞的形态结构正常,揭示外化物的“毒物”强度(剂量)未超过肝细胞的适应代偿和生物转化能力^[15]。实验FA剂量对肝细胞的毒理病理来说可看作是最大无作用剂量。

实验组软骨组分含量正常,表明所用FA剂量并未明显地影响动物的软骨生化代谢。其结果与软骨的形态学所见相一致。

2.3.6 实验组动物的精神状态、步态、羽毛光泽度、体重、饮水量、进饲量等与对照组的相近;对外化物生物转化的卓有成效;细胞色素P-450和GSH略有降低,MDA仅微量增加;肝、心、肾和肌胃的大体及组织学检查未见变性、坏死等毒理病理改变;软骨的生化组分含量、软骨与骨的形态结构以及形态计量学数据等与对照组的未见明显差异的结果表

明:低硒饲料加 50mg 病区 FA/L 饮水或病区水 10 倍浓缩水作用雏鸡 37 天,或低硒饲料加 100mg 病区 FA/L 饮水作用大鼠 28 天,既未引起动物的全身任何中毒表现,也未影响骨与软管的生长发育及其相关的软骨内成骨,即实验因素未能复制出类似 KBD 的任何改变。

2.3.7 按食品毒理实验结果判定条例:实验中的任何一项敏感指标(本实验以软骨和肝病变为准)的最大无作用剂量(以 mg/kg 体重计)大于或等于人的可能摄入量的 300 倍者,则不必进行慢性实验,可进行评价^[6]。实际情况是实验动物的 FA 摄入量(10.0mg/kgBW·d)是榆林病区儿童的(0.01mg/kgBW·d)1 000 倍。笔者认为榆林病区水中该 FA 量(0.0642mg/L)对人是无毒无害的。这个结论是应该可以得出的。

承蒙中科院生态环境研究中心王文华副研究员等提供实验用的 FA 液,谨致谢意。

3 参考文献

[1] 生态环境专题研究组. 生态环境综合考察报告 [A] 中共中央地方病防治领导小组编. 永寿大骨节病科学考察文集 (1979~ 1982) [A] 北京: 人民卫生出版社, 1984: 55~ 103.

[2] 中国科学院生态环境研究中心, 等. 饮水中某些有机物在大骨节病中的作用 (1991. 11~ 1995. 11). 内部资料, 1995: 1~ 2.

[3] 王光亚, 周瑞华, 孙淑庄, 等. 生物样品、水及土壤中痕量硒的测定 [J] 营养学报, 1985, 7 (1): 39.

[4] Beutler E, Duron O and Kelly BM, Improved method for the determination of blood glutathion [J] J Lab & Clin Med, 1963, 61: 882.

[5] 丛铮, 郑洪昌. 小鼠肝匀浆细胞色素 P- 450

含量测定方法的探讨 [J] 中药通报, 1984, 9 (2): 39.

[6] 向荣, 王鼎年. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进 [J] 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(3): 241.

[7] 张矢达, 莫晓燕主编. 软骨生化与骨软骨疾病 [M] 西安: 陕西科学技术出版社, 1995: 196~ 202, 206~ 234.

[8] 中国科学院地理研究所. 陕西彬县克山病、大骨节病环境病因研究. 内部资料, 1995.

[9] 毕华银, 王治伦, 白仁思, 等. 榆林大骨节病区水中有机物的调查报告 [J] 地方病通报, 1998, 13 (3): 51~ 55.

[10] 药理学实验编写组. 药理学实验 [M] 北京: 人民卫生出版社, 1985: 240~ 243.

[11] 曲青山, 江泉观. 基础毒理学序论 [A] 江泉观主编. 基础毒理学 [M] 北京: 化学工业出版社, 1991: 1~ 9.

[12] 《大骨节病防治工作标准(试行)》(1989年7月全国大骨节病病情监测工作会议通过) [A] 陕西省人民政府地方病防治领导小组办公室编. 防治地方病文件选编(内部资料) [C] 1991: 149~ 155.

[13] 王文华. 典型病区水(粮)中有机物的分离及结构特征研究 [A] 中国科学院生态环境研究中心, 等. 微生物毒素及其它有机物致大骨节病作用的研究总结报告 (1986~ 1990) [C] 内部资料, 1990: 35~ 61.

[14] 沈惠麟. 外源性化学物的转化 [A] 江泉观主编. 基础毒理学 [M] 北京: 化学工业出版社, 1991: 57~ 82.

[15] 李寅增. 毒理病理 [A] 同上: 57~ 82.

[16] 乔锡彬. 毒理实验设计 [A] 同上: 332~ 348.

(来源: 地方病通报, 1998, 3: 5)

“乌金石”亦名石炭,药理作用在《本草纲目》中已有记载,其味甘辛温,风化煤即古代之“乌金石”。黄腐酸为从风化煤中提取的有效成份。黄腐酸是“乌金石”有效成份中能溶于水、分子量最小的部分。黄腐酸钠经中国科学院化学研究所测定的结构表征,合碳 55.23%,氢 2.32%,氮 0.75%,氧 38.35%,各种官能团的含量为羧基、酚羟基、醇羟基、甲氧基、醌基各为 7.96、1.43、0.11、0.04、2.4 $\mu\text{g/g}$,平均分子量为 1035。

我们用新疆黄腐酸科技开发总公司所属哈密黄腐酸厂生产的黄腐酸溶液和粉剂治疗各种疾病,包括内、外、妇、儿等诸科均取得了奇特的效果。现就根据有关资料和临床实践对其药理作用做以下简述。按疗效可分为以下八类。

一 对微循环的作用

由去甲肾上腺素所造成的微循环障碍,局部应用“乌金石”对微动脉作用最迅速,它可使痉挛的微动脉口径扩张,流速明显加快,血流量增加,防止血小板凝集及微小血栓形成。“乌金石”对微血管作用的特点表明,它可能具有 α 受体阻断剂的作用。“乌金石”可使红细胞电泳时间明显缩短,全血和血浆比粘度显著降低和减少血小板凝集,故能改善由于动脉病变引起的局部供血不足,改善微循环,恢复正常的血液动力学,达到治疗目的。“乌金石”即能改善循环又能改变血液流变性。“乌金石”是一种很有希望的活血化瘀的中药制剂。

二 对抗炎症的作用

“乌金石”抑制与炎症渗出有密切关系的透明质酸酶,调整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歧化酶是含锌、铜的酶,此酶的活性如被“乌金石”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,抗炎和抗渗出作用几乎是“乌金石”的共性,其治疗学可进展到兽医治疗。

三 对免疫功能的作用

免疫功能被加强,巨噬细胞功能被激活,胸腔重量显著增加,按 5mg/kg“乌金石”腹腔内注射,胸腺明显增大,表示对免疫器官有激活作用。但上述剂量增大 10 倍,胸腺重量减轻。

四 对消化性溃疡的作用

“乌金石”有明显的抗溃疡形成和促进愈合的作用。直接抑制胃粘膜的壁细胞分泌和刺激胃粘膜内的前列腺素合成,前列腺素有保护胃粘膜的作用。“乌金石”增加胃粘膜的血流量,这也是保护胃粘膜预防溃疡形成和促进胃粘膜修复之愈合。

五 对肿瘤的作用

“乌金石”是一种很有希望的活血化瘀的中药制剂。活血化瘀属于祖国医学“祛邪”的范畴,它可以改善瘤灶及其周围的微循环,增强单核细胞的吞噬活性,直接作用于肿瘤细胞的代谢。由于肿瘤患者血液处于高粘高凝状态,红细胞变形能力下降,使抗癌药物和免疫活性细胞不易深入瘤体内,影响药物作用的发挥;通过活血化瘀,降低患者高粘、高凝状态,改善红细胞的变形能力,促使药物向肿瘤组织内移行,从而增加抗癌效果。虽然,“乌金石”不能直接杀死肿瘤细胞,但能调整机体的部分免疫功能,因此它是一种免疫性的抗肿瘤的药物。

六 对活血、止血的作用

“乌金石”对血管破裂的出血和渗血,有明显的止血作用,用“乌金石”静脉注射,使血管弹性明显改善。“乌金石”能逆转异常的微循环灌注,促进其恢复正常,必然有利于病变脏器的恢复。

七 对内分泌的作用

“乌金石”可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。研究表明“乌金石”对于药物引起的甲低和甲亢具有保护和调节作用。

八 对抗病毒的作用

“乌金石”对肿瘤有治疗作用。如甲瘤细胞的抑制作用,并使甲状腺功能恢复正常。

综上所述,“乌金石”的有效成份黄腐酸制剂是祖国中医药宝库中正在开展和开发应用的一种新型药物。国际泥炭学会把黄腐酸的应用已扩展到农业、工业、医药等诸方面。我国在上述各个领域近年来也有突破性进展,由国务院列为九五计划重点攻关项目,北京中医研究院、同仁医院、海军总医院等全国各大医院对黄腐酸的临床应用和药理作用的研究已达到相当高的水平,在剂型出产已有溶剂、针剂、糖浆剂、雾化剂等。黄腐酸的理化性质研究及黄腐酸对微循环的影响;对植物神经功能影响,对免疫

功能的影响,对肿瘤的作用研究,对内、外、妇、儿、皮肤、五官等科的疾病治疗,有关医院均作了大量的报道。在新疆医药领域中黄腐酸的开发和应用仅处于起步阶段,而新疆有大量的提取黄腐酸资源——风

化煤即古代之“乌金石”。我们要利用这一优势,使这古老的医药资源——黄腐酸放出异彩,造福于人类。

(来源:新疆中医药, 1998, 3: 38-39)

草炭腐植酸钠半数致死量的测定*

祝亚勤 范卓文 曹玲 陈立军 李铭

(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

一、前言

桦川草炭腐植酸经实验研究初步确定其属于一种芳香酸和不饱和脂肪酸的复合物。其结构上有多种活性功能团,如:羧基、羟基、甲氧基、羰基。除此之外还含有氨基酸、抗生素、维生素、酶类及多种微量元素。

据文献报道腐植酸盐有较强的抗菌、抗病毒、抗炎、止血、改善微循环、调节体内免疫和内分泌功能等作用。本文在参考大量文献的基础上,为了进一步应用于临床,实验用简化几率单位法进行半数致死量(LD₅₀)的测定。结果测定的LD₅₀相当于临床上拟用日剂量的81倍。

二、半数致死量的测定

1. 实验器材

小白鼠46只(体重17-19g雌雄混合)、注射器及针头、小铁丝笼、6.8%腐植酸钠溶液。

2. 实验方法与结果

2.1 实验步骤

本实验所采用方法:简化几率单位法。

经预实验测得引起0%死亡率(D_n)的剂

量为18.06mg/ml,引起100%死亡率(D_m)剂量为36.89mg/ml,在此范围内,使半组数的反应率在10-50%之间,另一半组数的反应率在50-90%之间,其中、生理盐水组1组,剂量组5组,组间剂量为1:0.8,小白鼠每组6只。注射途径为腹腔注射,注射剂量为0.2mg/10g。

2.2 计算:

$$LD_{50} = \log^{-1} \left[\frac{10i(y - \bar{y})}{2(y_5 - y_1) + (y_4 - y_2)} + X_3 \right]$$

i - 组间剂量比的对数; y - 几率单位;

X - 剂量的对数。

2.3 结论

经实验测得腐植酸钠LD₅₀为208.9mg/kg,是临床拟用日剂量的81倍,结果见表1,表2,表3(LD₅₀的测定)和表4(症状谱)。

三、结果与讨论

1. 在毒理实验中测得腐植酸钠LD₅₀为208.9mg/kg,相当于临床拟用日剂量的81倍。此次测定结果是比较令人满意的。

从实验过程中可看出,腐植酸的毒副作用很小,症状反应不是很明显。而且小剂量

表1 毒理实验数据处理表

组数 (N)	鼠数 (只)	剂量 (d)	logd(x)	死亡数 (只)	死亡率 (P)	几率 单位 (y)	权重 系数 (Wc)	权重 (W)
1	6	生理盐水		0	0			
2	6	18.58	1.27	2	33%	4.48	0.576	5.76
3	6	23.22	1.37	4	67%	5.52	0.576	5.76
4	6	29.03	1.46	4	67%	5.52	0.576	5.76
5	6	36.27	1.56	5	83%	5.84	0.490	4.90
6	6	45.36	1.67	5	83%	5.84	0.490	4.90

$\bar{i} = 0.0968$ $\bar{y} = 5.44$

表2 急性毒性实验结果报告表

药物名称	腐植酸钠		
试验日期	1997.4	给药途径:腹腔注射	环境温度:15℃
动物	品种:小白鼠 周龄:5周	品系:昆明种 体重:17-19g	供应单位:黑龙江中医药大学动物实验中心

表3 LD₅₀的测定

剂量 (mg/ml)	动物数		死亡率	LD ₅₀ 值和可信限
	♂	♀		
18.58	3	3	33%	LD ₅₀ = 208.9mg/kg 可信限为(159.55, 273.47mg/kg) (P = 0.95) 相当于临床拟用日剂量81倍
23.22	3	3	67%	
29.03	3	3	67%	
36.27	3	3	83%	
45.36	3	3	83%	

表4 症状谱

自发活动	异常肌肉运动	对外界反应	瞳孔	分泌物	大便	肤色	眼	呼吸
减少	麻痹	冷漠	扩大	流泪	便秘	紫绀	眼球凸出	抑制

时,小鼠食欲良好,毛皮比未用药前更光亮,且较肥壮,可看出腐植酸还有很好的保健功能。

由于本次实验在早春进行,温度较低,而且小白鼠开始给药时体重较小。所以测定结果可能受到影响。

2. 在毒理实验中,首先作了预试验:取10只小鼠,随机分5组;组间剂量为1:0.7,找出引起0%及100%死亡率的剂量,其中一组为生理盐水组,其它四组剂量分别为12.64mg/ml, 18.06mg/ml, 25.80mg/ml, 36.89mg/ml, 经预试验测得 D_n = 18.06mg/

ml, D_m = 36.89mg/ml。根据 D_n、D_m 来安排正式实验,这样可使给药剂量范围缩小,提高实验效率。

参考文献

1. 朱新生等,腐植酸,1991;4:50-51
2. 张德和等,化学通报,1981;11:17-20
3. 张德和等,化学通报,1986;7:43-45
4. 中华人民共和国药典,1995版
5. 物理化学试验,北京:高等教育出版社,1986
6. 中药药理实验,贵阳:贵州人民出版社,1988

(来源:腐植酸,1998,3:27-28)

草炭腐植酸钠经皮给药的动力学研究*

许伟 祝亚勤 田明 李廷利 陈立军

(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

一、前言

经皮给药系统 (Transderm Delivery System, TDS) 又称经皮治疗系统 (Transdermal Therapeutic System, TTS) 是药物以一定的速率通过皮肤、经毛细血管吸收进入体循环产生药效的一类制剂⁽¹⁾。经皮给药系统近十年来发展很快。据不完全统计美国 1986-1988 年的药学年会中就有 200 余篇有关透皮吸收的研究论文; 日本 1985 年和 1986 年在东京召开了两次学术讨论会, 有 61 篇关于经皮给药的学术论文发表; 法国、英国经皮给药的研究也同样是热门领域。我国 1985 年以来, 经皮给药系统研究发展也很快, 1987-1990 年各种药学期刊公开发表论文 25 篇。

皮肤作为药物输入体循环的门户, 使药物发挥治疗作用或外药内治, 这是对传统医学的重要贡献。在我国经皮给药具有悠久历史, 明代李时珍在《本草纲目》⁽²⁾中记载“蜈蚣咬伤者, 取腐木溃汁涂之, 亦可研末和醋敷之。凡是手足掣痛, 不红不随者, 朽木煮汤热溃痛处, 甚良。”草炭腐植酸钠, 是以桦川草炭为原料, 由本课题组九名教师十一名本科生和研究生, 历经十年筛选出来的一类抗炎、止痛有效活性组分。本产品保持了原绿色本性, 经光谱、药理、药动及 100 余例临床验证, 此类化合物有可能是多羟基不饱和有机弱酸 (或多羟基不饱和醇类), 草炭腐植酸钠是该类化合物的钠盐。15 例风湿症患者, 经皮洗浴 2-3 个疗程后, 植物血织素 (PHA) 阳转阴率达 80%, 管祥畸形人数治疗后减少了 86%, 33% 的患者由原来行走艰难, 手握不上, 合不拢, 经治疗后, 行走自如, 能写字并可

从事家务劳动。可见“草炭”与“腐木”内涵一致。

药物动力学是近二十年来发展起来的一门较年轻的药学学科。它是运用动力学的原理方法, 用数学模型反映药物体内经时过程的一门学科⁽³⁾。它的研究原理和方法, 是经皮给药系统研究的依据。经皮给药的动力学研究是非常复杂的过程。药物经皮进入体循环, 并能用高灵敏度检测手段定量的检测出来, 找出规律, 提供用药的理论依据, 其所涉及的问题非常多, 另外药物进入体循环不光是透过还有代谢等问题, 加之药动学又是一门年轻的学科, 可借鉴的东西少, 就更增加了难度。草炭腐植酸钠有良好的特性, 它分子量小、水溶性好、无毒、副作用, 对皮肤无刺激性和过敏性, 很适于经皮给药制剂的开发。本课题以透皮效果最好的水包油型软膏为经皮给药制剂, 并与口服灌胃后进入体循环的腐植酸钠口服液作比较; 同时也对腐植酸钠经皮吸收促进剂的筛选及其释药机理作了研究, 得出了科学的结论, 指导了实践, 利用高灵敏度的荧光分光光度法对大鼠体内血药浓度作了测定, 通过与药效学实验对比, 找出规律, 用药 1h 后开始达到治疗浓度, 可维持 12h 血药浓度稳定, 24h 血药浓度达低谷。

草炭腐植酸钠经皮给药动力学实验数据颇多, 为减少篇幅, 今只对血药动力学作论述。

二、仪器和药品

荧光分光光度计: shimadzu RF-540。

改进 Franz 扩散池: 自制。

超级恒温水浴、磁力搅拌器、分析天平、

超声波清洗仪。

腐植酸钠对照品:自制(精制)。

腐植酸钠软膏:自制。

所用试剂均为分析纯和光谱纯。

动物:Wistar 大鼠(黑龙江中医药大学实验动物中心提供)

三、荧光分析条件的建立

精密称定干燥至恒重的 200mg 腐植酸钠的对照品,用二次蒸馏水定容于 100ml 容量瓶中;吸取此标准液 20 μ l,定容 10ml。在荧光分光光度计上扫描。

条件如下(荧光光谱略):

LIST OF PARAMETER

ABSCISSA SCALE	X ₂	ORDINATE SCALE	X ₁
SCAN SPEED	FAST	SENSITIVITY	HIGH
EXCITATION SLIT(NM)	10	EMISSION SLIT(NM)	10
EXCITATION WAVELENGTH(NM)	320.0	EMISSION WAVELENGTH(NM)	420.0

精密吸取腐植酸钠标准液,配成标准系列,以生理盐水作空白,在 E_m 为 420.0nm 处,测荧光强度,线性回归后得浓度 C 与荧光强度 F 回归方程:

$$F = 0.2054 + 7.0631c (r = 0.9992)$$

精密吸取一系列腐植酸钠标准液,分别加入大鼠空白血浆 0.5ml, 10% 三氯醋酸 3.0ml, 超声波 200V 振 2min、3000rpm 离心 5min, 将上清液用 0.45 μ m 滤膜过滤,以空白血浆作空白,得体内循环回归方程:

$$f = 0.1801 + 1.7761c (r = 0.9987)$$

四、腐植酸钠软膏血药浓度测定

1. 实验方法

取体重 200g \pm 10g 的 Wistar 大鼠,雌雄各半,实验期间服标准鼠食和水,给药前禁食过夜(分两组,备用)。

第一组为软膏组:取上述大鼠 10 只,用脱毛剂脱毛(勿伤)约 10cm²,脱毛部位洗净,休息 24h,让脱毛处皮肤恢复正常;实验时另取 3 只作空白。分别按每只脱毛大鼠给 0.2g

软膏或空白软膏基质,均匀涂布脱毛处,面积约 8cm²。

第二组为灌胃组:取 10 只备用大鼠,按 40mg/kg 腐植酸钠口腔给药,另取 3 只以生理盐水作空白对照。

按给药后不同时间,用肝素抗凝毛细管于大鼠眼眶取血 1ml、3000rpm 离心 5min,取血浆 0.5ml,加 10% 三氯醋酸 3.0ml,200V 超声振 2min,3000rpm 离心 5min,分别取上清液,用 0.45 μ m 滤膜过滤,在 420.0nm 处测其各次荧光强度,求出各次平均血药浓度,并由计算机拟合得出药动参数。见表 1、表 2 和图 1。

表 1 大鼠灌胃后平均血药浓度表

time(hour)	mean concentration in blood(μ g/ml) \pm SD
0.5	10.012 \pm 2.131
2	14.004 \pm 1.675
4	9.003 \pm 4.013
5	4.676 \pm 1.489
8	2.612 \pm 1.253
12	0.984 \pm 0.632
24	0.308 \pm 0.108

表 2 大鼠软膏给药后平均血药浓度表

time(hour)	mean concentration in blood(μ g/ml) \pm SD
1	4.903 \pm 2.312
2	6.726 \pm 1.832
4	8.014 \pm 2.071
8	9.436 \pm 3.018
12	7.912 \pm 1.223
16	4.836 \pm 1.754
24	1.473 \pm 0.803
48	0.315 \pm 0.215

2. 实验结论

软膏组: T(peak) = 7.93hour, C(max) = 9.44 μ g/ml

口服组: T(peak) = 2.15hour, C(max) = 14.04 μ g/ml

两组相比,软膏组达峰时间长,峰浓度

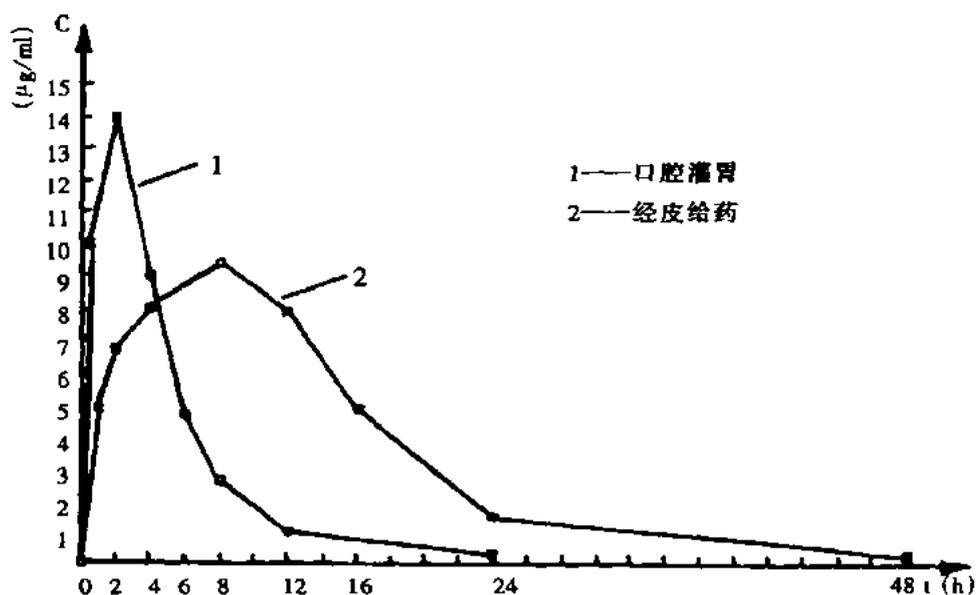


图1 腐植酸钠口腔灌胃与经皮给药的血药浓度—时间曲线

低，有效血药浓度维持 12hour 以上，而口服仅为 4hour，说明腐植酸钠软膏药效平稳持久，是一种缓释长效制剂，从而说明了草炭腐植酸钠适于经皮给药制剂的开发。

五、讨论

1. 腐植酸钠经皮给药后血药浓度曲线与口服血药浓度曲线相比，经皮给药 1h 即产生疗效，维持 12h，比口服延长 8h，从临床经皮给药看，腐植酸钠抗炎作用是肯定的，它的治疗机理是与它活性基因有关。经初步结构分析知其有甲氧基、羟基、羰基、羧基及不饱和双键等。是否由于这些活性基因的存在，在体循环过程中改变了 Na^+ 、 K^+ 、及 Cl^- 离子在淋巴细胞膜上的转运速度，进而影响到神经系统，内分泌系统和免疫系统之间的相互关系及整体机能而达到内病外治的目的，有

待进一步研究证实。

2. 本文建立的“荧光分光光度法”作为经皮给药后，血药浓度的测量方法，是先进的、可行的，此方法是我们依据草炭腐植酸的特点与结构特征，在对比了其它方法之后，在大量实验基础上建立起来的。荧光分光光度法要比紫外分光光度法和同位素示踪法高几个数量级，非常适于血液中微量组分的测定。

参考文献

1. 梁秉文，经皮给药制剂，北京：中国医药科技出版社，1
2. 李时珍，《本草纲目》，本部 2172(37)
3. 孙其荣，药物动力学，北京，解放军出版社，1984；1

(来源：腐植酸，1998，3：18-20)

草炭腐植酸钠抗溃疡作用的研究*

祝亚勤 王洪杰 李秀宏 赵 英

(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

摘 要

本文以大鼠胃溃疡模型为起点,用三种不同浓度的腐植酸钠为实验药物,并以生理盐水作空白,胃得乐为阳性对照药。观察溃疡程度,发现腐植酸钠具有较强抗溃疡作用,其作用在一定浓度下明显优于阳性对照药胃得乐,进而找出了量效关系,并得到了量效关系曲线,为胃溃疡的合理用药作了一些有益的工作。

一、实验物品

实验动物:大鼠(雌性)25只,体重在200g左右,Wistar系,黑龙江中医药大学实验动物中心提供。

仪器:摄子、动物手术台、超级恒温水浴锅、解剖显微镜、动物笼子、沙布、缝合线。

药品:生理盐水(0.9%)、腐植酸钠(2mg/ml)、胃得乐(黑龙江肇东制药二厂 960803)

二、实验内容

1. 阳性药物——胃得乐

1.1 作用与用途:制酸药及收敛药,用于胃溃疡、十二指肠溃疡、胃酸过多及胃炎等。

1.2 灌胃剂量:正常人每次服用4片,根据人鼠剂量折算系数大鼠每次服用0.0714片。

2. 不同浓度的腐植酸钠的配制

2.1 低浓度,取2mg/ml的腐植酸钠制成浓度为1mg/ml的溶液。

2.2 中浓度,浓度为2mg/ml的溶液即是。

2.3 高浓度,取中浓度药液40ml浓缩至20ml,即得4mg/ml的药液。

3. 操作步骤

在此实验之前,根据文献报道我们应用了水浸应激性方法制造胃溃疡模型,其溃疡模型很成功,具体操作如下:

取Wistar系体重在200g左右的雌鼠25只,随机分为5组(其中一组为生理盐水组、二组为低浓度组、三组为中浓度组、四组为高浓度组、五组为阳性药物组),每组5只称重后标记,分早晚2次给药,给药3天后禁食24小时,将大鼠装入特制铁丝笼内,使其无法自由活动,头部向上垂直浸入23℃的水浴中,7小时后将大鼠处死,取出胃,向胃内注入1%的福尔马林溶液,然后再放在1%的福尔马林中固定5-10分钟。沿胃大弯剪开胃,用自来水轻轻冲洗去掉胃内容物,将胃展开,用滤纸拭去附在其表面的附属物,在解剖镜下观察溃疡模型图的面积,按统计学方法处理数据。

三、实验结果

通过刻度尺测得最大横径长度为 d_1 ,最大纵径长度为 d_2 ,根据公式 $S = \pi \cdot \frac{d_1}{2} \cdot \frac{d_2}{2}$ 得溃疡面积为表2。

四、结论与讨论

1. 腐植酸钠的疗效明显优于阳性对照组。

表1 大鼠溃疡面积和溃疡指数表

组别	浓度	鼠号	溃疡面积					溃疡指数(X ± SD)
生理盐水组	0.9%	1	15.7	29.4375	7.065	12.56	15.495	10.91 ± 5.35
		2	17.27	11.775	15.7	7.065	9.8125	
		3	14.13	7.85	10.5975	6.672	4.71	
			9.42	8.2425				
		4	17.27	8.2425	9.42			
溃疡组	1mg/ml 低剂量组	1	1.175	5.495	13.55			5.2329 ± 5.15 *
		2	13.55	1.099	1.57	0.314	1.4113	
		3	3.14	15.7	3.532	15.7		
		4	7.065	6.28	3.297	3.925		
		5	1.57	1.57	2.355	2.355		
溃疡组	2mg/ml 中剂量组	1	4.71	3.5325	3.925	4.71		3.47 ± 1.8 **
		2	4.71	5.652	3.14	3.5325		
		3	5.495	0.471	4.71	1.57	0.58875	
		4	2.355	1.9311	4.71			
		5	2.355	0.785	5.652			
溃疡组	4mg/ml 高剂量组	1	0.3925	1.775				1.83 ± 1 **
		2	0.5495	2.355	3.925			
		3	2.355	0.785	2.355			
		4	1.1775	1.9625	2.7475			
		5	2.355	2.9525	0.3925			
阳性对照组		1	2.7475	0.82425	1.37375	0.3925	0.942	2.44 ± 1.4 **
		2	4.71	3.925	4.3175	3.925		
		3	3.14	2.198	2.355	3.925	3.925	
		4	2.355	0.58875	0.785	2.355		
		5	0.4906	3.14				

表2 体重与剂量表

组别	鼠号	体重(g)	剂量(ml)	组别	鼠号	体重(g)	剂量(ml)			
一组	生理盐水组	1	205	0.08	二组	低剂量组	1	225	0.1	
		2	198	0.08			2	220	0.08	
		3	210	0.1			3	215	0.1	
		4	220	0.1			4	200	0.08	
		5	203	0.08			5	205	0.08	
三组	中剂量组	1	215	0.1	四组	高剂量组	1	218	0.1	
		2	210	0.08				2	210	0.1
		3	229	0.1				3	195	0.08
		4	225	0.1				4	222	0.1
		5	200	0.08				5	207	0.08
五组	阳性药物组	1	198	0.08						
		2	203	0.08						
		3	215	0.1						
		4	215	0.1						
		5	200	0.08						

2. 溃疡抑制百分率:

$$\text{溃疡抑制百分率} = \frac{\text{对照组溃疡长度总和} - \text{实验组溃疡长度总和}}{\text{对照组溃疡长度总和}} \times 100\%$$

表3 溃疡抑制百分率表

组数	1	2	3	4	5
E%	0	46.3	62.55	72.25	56

由表可画出腐植酸钠的量效曲线关系图。

3. 与其它动物溃疡模型相比较,水浸应激法时间短,溃疡发生率高,便于广泛应用。应激性溃疡发生的机理比较复杂,一般认为应激性首先使皮质中枢的兴奋与抑制过程失调,引起皮质下中枢机能紊乱,使胃肌痉挛,胃血运障碍,胃分泌紊乱而形成溃疡。

4. 对溃疡程度的评价有的学者仅采取纯计算溃疡数或仅测量溃疡长度作为粘膜损害程度的溃疡指数,但其溃疡点的大小和粘膜损害的长度与宽度是很不一致的。仅以溃疡点计数或测量溃疡最大径(长度)较难反映溃疡损害程度。许多溃疡资料表明,用溃疡面积作为溃疡指数其可信度高。

5. 根据实验观察影响溃疡面积大小的因素有许多,其中主要有:浸泡水温和动物的体质。

浸泡水温:水温过高,则动物不易造成溃疡;水温过低,则动物易死亡。

动物体质:根据观察体质是影响溃疡的主要因素。实验中若动物体质较好则需低浸泡水温或延长浸泡时间;若动物体质较差,则需提高浸泡水温或缩短浸泡时间。

参考文献

1. 袁申元,腐植酸,1988;4:6-8
2. 薛宏基,江西腐植酸,1982;1:1-52
3. 竺心影,药理学(第三版),北京:人民卫生出版社,1992
4. 夏炳南,药理学实验教程,贵阳:贵州人民出版社
5. 陈奇,中药药理实验,贵阳:贵州人民出版社

(来源:腐植酸,1998,3:24-26)