

去甲乌药碱对关节液的保护作用

张 家 俊 陈 文 为

(北京中医学院中西医结合研究室)

摘要 本文观察到去甲乌药碱对组织胺诱发的大鼠踝关节肿有明显的抗炎作用, 并且有较强的清除超氧自由基(O_2^-)的能力和抑制鼠肝匀浆脂质过氧化作用, 对 O_2^- 诱导的透明质酸和牛关节液中氨基多糖的解聚具有保护作用。

关键词 去甲乌药碱; 透明质酸; 牛关节液; 脂质过氧化作用; 超氧自由基; 抗炎作用

附子有强心和治疗关节炎作用⁽¹⁾。去甲乌药碱是日本附子中含有的单体之一, 已发现中国附子中也含此成分⁽²⁾, 化学结构清楚, 并已人工合成⁽³⁾。近年来, 一些文献指出⁽⁴⁾, 体内自由基与炎症有密切关系。一般情况下, 细胞外液中含有极少量的超氧化物歧化酶(SOD), 当关节炎患者在炎症期, 关节液中吞噬细胞产生多量的 O_2^- 难以及时清除, 易引起关节液中氨基多糖解聚(主要是透明质酸), 丧失与水分子结合的能力, 使得关节液粘度下降, 润滑功能减弱, 导致关节部位肿胀和疼痛等症状。本文拟以清除自由基的途径, 探讨去甲乌药碱抗炎及对关节液的保护作用。

药 物 和 试 剂

去甲乌药碱由中国医学科学院药物研究所合成室赠送。三羟甲基氨基甲烷(tris)、硫代巴比妥酸(TBA)和四甲氧基丙烷为Fluka公司出品; 硝基四唑兰(NBT)、酚嗪硫酸甲酯(PMS)和还原型辅酶I(NADH)、磷酸组织胺为Sigma公司出品; 透明质酸为中国科学院生化所出品; 氢化考的松为北京第三制药厂出品, 其它试剂均是分析纯为北京化工厂出品。新鲜牛关节液自北京牛羊肉联厂取得, 置4°C冰箱备用。

方 法 与 结 果

(一) 去甲乌药碱对大鼠后肢踝关节由组织胺诱发炎症的影响⁽⁵⁾

取体重160~200g的大鼠24只, 分成3组每组8只。实验组腹腔注射去甲乌药碱30mg/kg, 对照组腹腔注射生理盐水, 药物对照组皮下注射氢化考的松50mg/kg。给药30分钟后, 于大鼠后肢踝关节皮下注射0.1%的组织胺0.1ml, 在不同时间分别测量踝关节肿胀的周围长度。

从图1实验结果表明, 去甲乌药碱和氢化考的松对组织胺诱发的炎症有明显的对抗作用, 以15分钟时最为明显($P < 0.01$), 二者的作用程度相似。

(二) 去甲乌药碱对 O_2^- 的清除作用

参照Ponti等人方法⁽⁶⁾, 在NADH/PMS/NBT系统中, 产生的 O_2^- 可定量地使NBT还原成diformazan(兰色), 在560nm波长下测定, 从光密度变化观察药物对 O_2^- 的清除作用。

从图 2 看出, 去甲乌药碱有较强的清除 O_2^- 的能力, 当药物浓度分别在 1.63 和 208 μM 时, 其清除率各为 23.33 和 92.83%, 呈明显的量效关系。

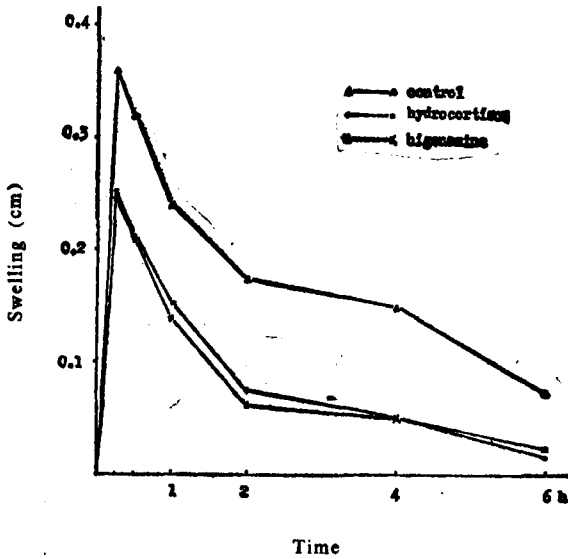


Fig 1. Effect of higenamine on the rats hind paw swelling induced by histamine

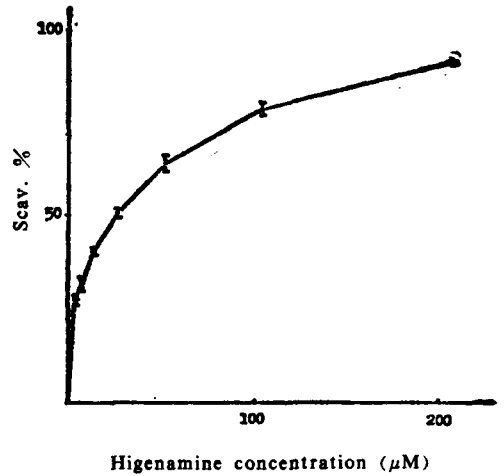


Fig 2. Scavenging action of various concentration of higenamine of the O_2^-

(三) 去甲乌药碱对鼠肝匀浆过氧化脂质生成的影响

按 Riely 等人方法⁽⁷⁾, 根据体外温育诱导大鼠肝匀浆生成过氧化脂质的原理。用生理盐水制成 10% 的鼠肝匀浆, 分别取 3.0 ml 肝匀浆, 实验管加入 50 μl 不同浓度去甲乌药碱, 对照管加 50 μl 生理盐水, 置 37°C 振荡温育 2 小时, 取出用硫代巴比妥酸显色测定过氧化脂质的含量, 比较药物对脂质过氧化物生成的抑制作用。

脂质过氧化作用是非酶催化的连锁反应⁽⁸⁾, 在自由基启动下, 使细胞膜脂双层磷脂分子中不饱和脂肪酸氧化产生过氧化脂质, 该产物的生成量反映了自由基对细胞膜破坏的程度。本文除观察到去甲乌药碱对 O_2^- 的清除作用外, 又证实该药物对鼠肝匀浆过氧化脂质的生成具有很强的抑制作用(如图 3), 且随药物浓度增加其抑制作用加强, 也表现量效关系, 说明这种抑制作用是通过清除自由基(O_2^-)的途径。

(四) 去甲乌药碱对 O_2^- 诱发的透明质酸和牛关节液粘度变化的影响

应用 NADH/PMS 反应系统⁽⁶⁾ 产生的 O_2^- 可诱发高粘度的透明质酸和牛关节液中氨基多糖解聚, 粘度下降, 在反应体系中加入去甲乌药碱观察对氨基多糖的保护作用。参考 McCord 等人方⁽⁹⁾ 测定相对粘度。

透明质酸是关节液中主要氨基多糖, 在 O_2^- 作用下, 反应 1 小时后, 其粘度明显下降, 相对粘度下降 9.02 秒, 如表 1 中对照管。而加入去甲乌药碱的实验管中的透明质酸粘度下降较慢, 并随药物浓度增加粘度下降缓慢, 当药物浓度在 312.5 μM 时, 相对粘度仅降低 2.07 秒, 证实该药物对 O_2^- 诱导的透明质酸解聚具有保护作用。

从图 4 看出, 对照管中的牛关节液在 O_2^- 作用下, 随反应时间延长其粘度下降较快, 加有药物的实验管中的牛关节液粘度下降较慢, 这种现象说明药物具有抑制 O_2^- 诱导的牛关节液中氨基多糖的解聚作用, 并与表 1 的实验结果趋势一致。

Tab 1. Protection of higenamine on the depolymerization of hyaluronic acid induced by O_2^- ($\bar{X} \pm SD$)

Concentration (μM)	Control tube		Experimental tube		
	0	9.75	78.13	156.25	312.5
Relative viscosity* before induction by O_2^-	75.15 \pm 0.35	74.18 \pm 0.68	75.38 \pm 0.24	73.93 \pm 0.30	73.25 \pm 0.53
Relative viscosity* after induction by O_2^-	66.13 \pm 0.23	66.46 \pm 0.45	69.80 \pm 0.06	70.62 \pm 0.17	71.18 \pm 0.01
Difference value	9.02	7.72	5.58	3.31	2.07
Inhibition %	0	14.41	38.14	63.30	77.05

Reaction mixture contained 500 μM NADH, 27 μM PMS, 1.8 mg hyaluronic acid, 0.016 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), total volume 2.0 ml; incubated in 30°C water bath for 1 h under aerobic condition; results are mean \pm SD from 3 determinations; relative viscosity of distilled water=39.51

* Flow rate sec/ml

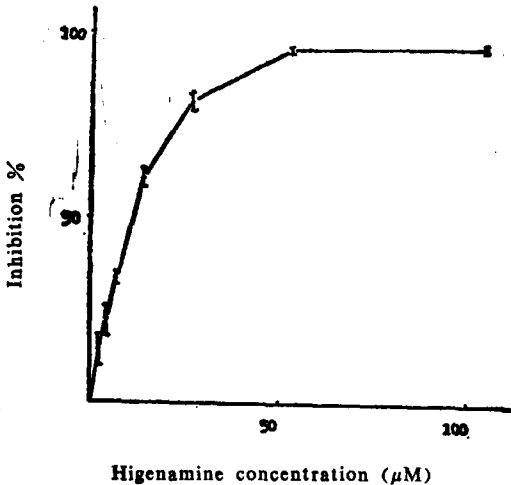


Fig 3. Inhibition of various concentrations of higenamine on the lipid peroxidation of rat liver homogenate

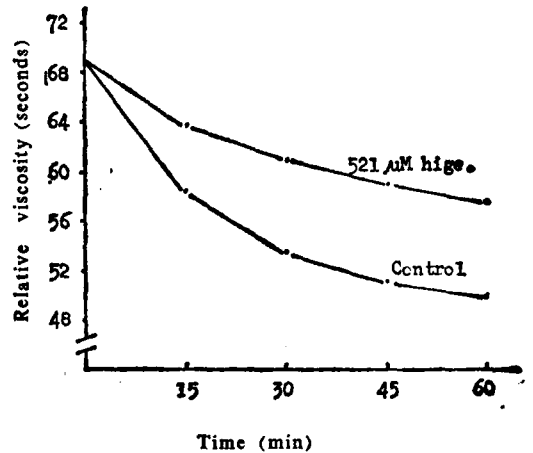


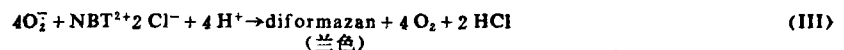
Fig 4. Higenamine protection on the depolymerization of bovine synovial fluid induced by O_2^-

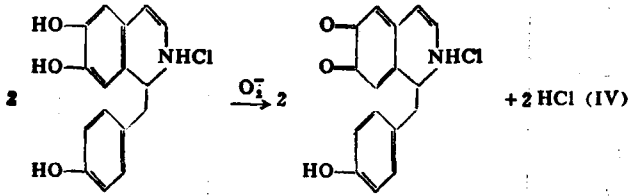
讨 论

本文结果发现去甲乌药碱具有较强的清除 O_2^- 的能力和抑制鼠肝匀浆脂质过氧化作用, 对组织胺诱发的大鼠踝关节肿有明显的抗炎能力。从透明质酸和牛关节液粘度测定实验中, 证明该药物对 O_2^- 诱导的氨基多糖解聚具有保护作用, 推测上述作用是通过清除 O_2^- 的途径, 这对于防止自由基对关节液的损伤和关节周围组织细胞膜的脂质过氧化作用都是有益的, 对治疗关节炎也有积极意义。

从本文实验结果分析去甲乌药碱清除 O_2^- 的反应原理,

1. O_2^- 的生成和与 NBT 的反应⁽⁶⁾



2. 去甲乌药碱与 O_2^- 的反应:

实验说明去甲乌药碱是通过清除 O_2^- 抑制 NBT 的还原, 阻止反应式 (III) 的进行。据 Graziano 报导⁽¹⁰⁾, 2,3-二羟基苯甲酸在清除 O_2^- 时, 其分子中邻二酚羟基被氧化成邻二醌。因此, 去甲乌药碱分子中邻二酚羟基在清除 O_2^- 时可能也是通过氧化成邻二醌的途径, 如反应式(IV)。至于药物在体内的代谢、分布等作用尚待继续研究。

致谢 中日友好医院邵金莺同志指导抗炎实验

参 考 文 献

1. 周远鹏. 附子及其主要成分的药理作用和毒性. 药学报 1983,18:394.
2. 横田正实等. 中国产附子中强心成分. 中药通报 1984,3:119.
3. 黄龙珍等. 去甲乌药碱(附子一号)的合成. 药学报 1981,16:931.
4. 荣永海等. 自由基与疾病. 《国外医学》分子生物学分册 1980,2:72.
5. 于传斌. 解热、抗炎药物实验法. 徐叔云等主编. 药理实验方法学. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 1982:524~547.
6. Ponti V, et al. Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. *Chem Biol Interact* 1978,23:281.
7. Riely CA, et al. Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. *Science* 1974,183:208.
8. Johan FK, et al. Lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1980,620:489.
9. McCord JM, et al. Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974,185:529.
10. Graziano JH, et al. Inhibition of membrane peroxidation in thalassaemic erythrocytes by 2,3-dihydroxybenzoic acid. *Br J Haematol* 1976,32:351.

PROTECTION OF SYNOVIAL FLUID BY HIGENAMINE

ZHANG Jie-Jun and CHEN Wen-Wei

(Beijing College of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Higenamine was shown to possess marked antiinflammatory action on swelling induced by histamine in the rat hind paw. Since the drug also showed strong ability to scavenge superoxide anion radical (O_2^-), inhibition the lipid peroxidation of rat liver homogenate and decrease the polymerization of glycosamine glycan (hyaluronic acid and bovine synovial fluid), the authors presume that the mechanism of protective action is probably the scavenging of superoxide anion radical in synovial fluid.

Key words Higenamine; Hyaluronic acid; Bovine synovial fluid; Lipid peroxidation; Superoxide anion radical; Anti-inflammation