

# 黄连解毒汤的抗氧化作用研究

王利津, 徐强\*

(中国药科大学中药药理教研室, 南京 210038)

**摘要** 目的: 探讨黄连解毒汤的抗氧化作用。方法: 红细胞溶血、肝匀浆 MDA 生成及羟自由基生成用比色法测定。结果: 黄连解毒汤体外给药能明显抑制红细胞自氧化或  $H_2O_2$  所致红细胞溶血, 并抑制小鼠肝匀浆自发性或  $Fe^{2+}$ -Vit C 诱发的脂质过氧化反应。对  $H_2O_2$  所产生的羟自由基亦有直接的清除作用。结论: 黄连解毒汤对血细胞和组织细胞具有膜保护作用。

**关键词** 黄连解毒汤; 脂质过氧化; 活性氧

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2001)01-0051-03

黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu Tang, HJT) 源于唐·王焘所著之《外台秘要》, 由黄连、黄柏、黄芩、栀子四味药组成, 为清热解毒的代表方。其加减方主要用于治疗各种火毒炽盛之内、外科疾病, 后者在现代医学上多属微生物感染和炎症性疾病。已有报道黄连解毒汤对一些实验性炎症模型有确切的抗炎活性, 但其详细机理尚不明了。中性粒细胞在炎症过程中起主要作用, 其作用一方面受复杂的细胞因子网络的影响, 最终导致组织损伤, 另一方面亦与释放过量的活性氧代谢产物有关。我们的前期研究已经发现, 黄连解毒汤可以抑制小鼠气囊滑膜炎模型中性粒细胞的游出及脂多糖刺激巨噬细胞生成 NO 及 IL-1<sup>[1]</sup>。本文进一步从抗氧化作用角度探讨其抗炎解毒的机理

## 1 材料

### 1.1 药品及试剂

黄连、黄芩、黄柏和栀子购自南京中医药大学江苏时珍药房。经本校中药复方研究室余伯阳教授鉴定分别为: 毛茛科植物 *Coptis chinensis* French. 的干燥根、唇形科植物 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根、芸香科植物 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮及茜草科植物 *Gardenia jasminoides* Ellis. 的干燥成熟果实。

取黄连、黄芩、黄柏和栀子按 3: 2: 2: 3 的比

例混合, 加 10 倍量的水, 煎煮 1.5 h, 共煎 3 次。滤液合并离心后浓缩干燥得黄连解毒汤提取物粉末, 收率为 22%。实验中所用的黄连解毒汤剂量均以该粉末计算。

### 1.2 动物

C57BL/6j 小鼠 (6~8 周龄, 体重 18~22 g), 购自江苏省实验动物中心。

## 2 方法与结果

### 2.1 对红细胞自氧化溶血的影响

红细胞取自小鼠眼眶静脉丛, 用 pH 7.4 磷酸缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 然后配成 1% 红细胞悬液。取红细胞悬液 2 ml, 加入含不同浓度 HJT 的 PBS 溶液 40  $\mu$ l (终浓度分别为 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/ml, 以不加药组为对照组), 加入 PBS 40  $\mu$ l 37°C 温育 24 h 后, 2 500 r/min 离心 10 min, 540 nm 处测定吸光度。以对照组为 100% 溶血, 计算溶血度。每次实验设三个平行管, 取平均值为一次实验的数据, 实验重复三次, 求  $\bar{x} \pm s$  (以下同)。

由表 1 所示, 红细胞经温育 24 h 后, 可出现明显溶血, 黄连解毒汤各剂量均可抑制红细胞的自氧化溶血。经方差分析,  $F(4, 10) = 88.709$ , 各实验组间有极显著性差异 ( $P < 0.001$ )。Student-Newman-Kuels 检验表明, 黄连解毒汤各浓度组与对照组间均有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

Tab 1. Effect of HJT on RBC hemolysis induced by auto-oxidation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Group	Dose (mg/ml)	RBC auto-oxidation	
		OD <sub>540</sub>	Hemolysis (%)
Control		0.89 ± 0.026	100.00
HJT	0.075	0.82 ± 0.018**	91.39
	0.15	0.8 ± 0.012**	90.44
	0.30	0.75 ± 0.013**	83.80
	0.60	0.69 ± 0.015**	76.84

\*  $P < 0.001$  vs control

## 2.2 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致红细胞氧化溶血的影响

取上述红细胞悬液 1 ml, 加入不同浓度黄连解毒汤 (终浓度分别为 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/ml) 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (终浓度为 1%), 37°C 温育 1 h 后, 2 500 r/min 离心 10 min, 415 nm 处测定吸光度以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 红细胞为对照组, 同时设正常红细胞组, 每次实验均设三个平行管, 实验重复三次。

由表 2 所示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以破坏红细胞膜, 导致血红蛋白逸出。黄连解毒汤可显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的这种作用。方差分析显示,  $F(5, 12) = 27.924$ , 各实验组间有极显著差异 ( $P < 0.001$ )。黄连解毒汤 0.15 mg/ml 以上有极显著的抑制作用 ( $P < 0.001$ )。

Tab 2. Effect of HJT on RBC hemolysis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Group	Dose (mg/ml)	RBC oxidation induced by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
		OD <sub>415</sub>	Hemolysis (%)
Normal		0.273 ± 0.044	7.61
Control		3.46 ± 0.440 <sup>#</sup>	100
HJT	0.075	3.090 ± 0.620	84.71
	0.15	2.086 ± 0.987**	57.41
	0.30	0.985 ± 0.565***	27.37
	0.60	0.33 ± 0.091***	9.38

<sup>#</sup>  $P < 0.001$  vs normal; <sup>\*</sup>  $P < 0.001$  vs control

Normal: RBC alone; Control: RBC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 2.3 对小鼠肝匀浆脂质过氧化的影响

小鼠断头处死, 迅速取肝置于 4°C 生理盐水中, 洗去表面残血, 制成 5% 的肝匀浆。取肝匀浆 0.6 ml, 加入各种浓度的黄连解毒汤 40 μl (终浓度分别为 0.3, 0.6, 1.2 mg/ml), 以不加药组作为对照管, 加入生理盐水 40 μl。37°C 温育 2.5 h 后, 加入 2% 三氯醋酸 0.6 ml。3 000 r/min 离心 10 min, 取上清 1 ml, 加入 0.67% 的硫代巴比妥酸溶液 1 ml, 沸水浴加热 10 min, 冷却后在 721 型分光光度计 532 nm 处比色测定。以四乙氧基丙烷为标

准, 计算每 ml 溶液中丙二醛 (MDA) 的生成量。每次实验设三个平行管, 实验重复四次, 结果见图 1。

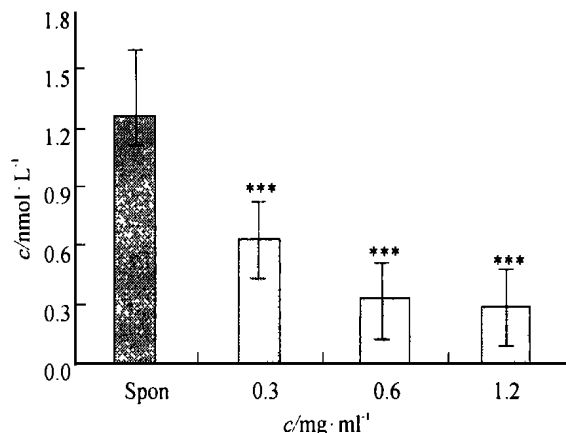


Fig 1. Effect of HJT on MDA production in liver homogenate. Liver homogenate (5%) was cultured at 37°C for 2.5 h in the presence of various concentrations of HJT. The production of MDA was examined by thiobarbituric acid colorimetric assay. Each column indicates the mean of four independent experiments and each experiment includes triplicate sets. <sup>\*</sup>  $P < 0.001$ , vs Spon. ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

Spon: liver homogenate products MDA spontaneously.

黄连解毒汤各浓度均可显著抑制小鼠肝匀浆自发生成 MDA ( $P < 0.01$ )。经方差分析,  $F(3, 12) = 24.646$ , 各实验组间有极显著性差异 ( $P < 0.001$ )。

在上述反应体系中加入 FeSO<sub>4</sub> (0.01 mol/L) 0.01 ml, 维生素 C (0.01 mol/L) 0.01 ml。由图 2 所示, 与正常肝匀浆相比, Fe<sup>2+</sup> 使小鼠肝匀浆生成 MDA 显著增加。黄连解毒汤对 Fe<sup>2+</sup> 诱导的小鼠肝匀浆脂质过氧化有极显著的抑制作用。经方差分析,  $F(4, 10) = 22.940$ , 各实验组间有极显著性差异 ( $P < 0.001$ )。黄连解毒汤各浓度组与对照组间均有极显著性差异 ( $P < 0.001$ )。

## 2.4 对羟自由基的清除作用

取试管, 每管加入邻二氮菲及 FeSO<sub>4</sub> 各 0.75 mmol/L, pH 7.4 PBS 150 mmol/L, 不同浓度药物或蒸馏水, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.8 mmol/L, 于 37°C 振荡反应 1 h, 测 OD<sub>536</sub>, 未损伤管不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 以  $\Delta OD_{536} = OD_{536}(\text{未损}) - OD_{536}(\text{损})$  表示。OH 生成的多少, 按下式计算表观 OH 清除率。表观 OH 清除率 =  $(1 - \Delta OD_{536}(\text{药物}) / \Delta OD_{536}(\text{空白})) \times 100\%$ 。实验中每个点设三个平行管。

结果黄连解毒汤显著增加了对羟自由基的清除率。0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml 对羟自由基的清除率分别为 10.3%, 12.4%, 16.5% 及 33.3%。

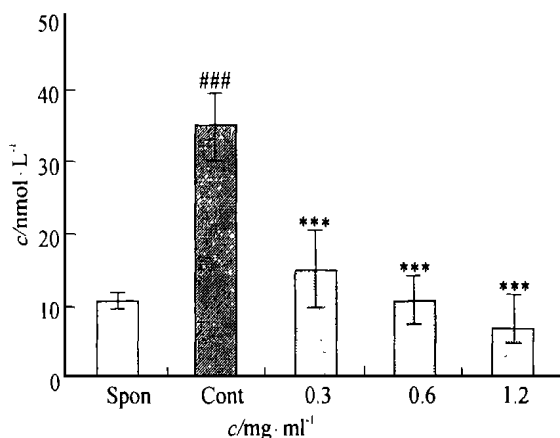


Fig 2 Effect of HJT on MDA production in liver homogenate induced by  $\text{Fe}^{2+}$ . Liver homogenate (5%) was cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2.5 h in the presence of  $\text{Fe}^{2+}$  and various concentrations of HJT. The production of MDA was examined by thiobarbituric acid colorimetric assay. Each column indicates the mean of three independent experiments and each experiment includes triplicate sets.

$^{\#}P < 0.001$ , vs Spon.  $^*P < 0.001$ , vs Cont. ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Spon: liver homogenate-products MDA spontaneously.

Cont: liver homogenate-products MDA in the presence of  $\text{Fe}^{2+}$ .

### 3 讨论

在炎症过程中,过量炎性介质的释放可使正常组织和细胞受到损伤。这些炎性介质包括 NO、IL-1 等细胞因子以及呼吸爆发所产生的各种活性氧。我们的前期研究已发现,黄连解毒汤对 NO、IL-1 等细胞因子的生成有抑制作用<sup>[1]</sup>,鉴于炎症与自由基的密切关系,并已知黄连解毒汤组成中药黄芩中的黄酮类化合物如黄芩苷、黄芩素<sup>[2-3]</sup>等及黄连的水

提物<sup>[4]</sup>均有抗氧化活性,本文着重研究了体外黄连解毒汤抗氧化能力,发现黄连解毒汤对于红细胞的自氧化和  $\text{H}_2\text{O}_2$  所致的氧化均具有显著的抑制活性。红细胞膜易受到氧自由基的攻击发生脂质过氧化,而使红细胞膜完整性改变,导致溶血。黄连解毒汤降低溶血度与抑制膜脂质过氧化有关。

黄连解毒汤对脂质过氧化反应的终产物丙二醛(MDA)的研究发现,黄连解毒汤体外可显著降低肝匀浆 MDA 的生成。此外,黄连解毒汤还具有一定的清除羟自由基的能力。

以上结果表明,黄连解毒汤可显著抑制脂质过氧化反应,并有一定的清除羟自由基活性,提示其对血细胞和组织细胞具有膜保护作用。黄连解毒汤的这种膜保护作用很可能与其抗炎解毒作用有关。

### 参考文献

- [1] 王利津(Wang LJ),徐强(Xu Q).黄连解毒汤的抗炎作用机理研究[J].中国中药杂志(*China J Chin Mater Meds*), 2000, 25(8): 493-496.
- [2] Gao Z, Huang K, Yang X, et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1472(3): 643-650.
- [3] Ng TB, Liu F, Wang ZT. Antioxidative activity of natural products from plants [J]. *Life Sci*, 2000, 66(8): 709-723.
- [4] Liu F, Ng TB. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs [J]. *Life Sci*, 2000, 66(8): 725-735.

## Anti-oxidative Activity of Huanglian Jiedu Tang, a Traditional Chinese Recipe

WANG Li-Jin, XU Qiang

Department of Pharmacology for Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

**Abstract** **AIM** To examine the antioxidative and hydroxyl radical-scavenging activities of Huanglian Jiedu Tang (HJT) *in vitro*. **METHODS** The hemolysis of red blood cells, MDA production in liver homogenate and hydroxyl free radical productin were measured by colorimetric assay. **RESULTS** The aqueous extracts of HJT exhibited a significant potency in inhibiting murine erythrocyte hemolysis ( $P < 0.001$ ) and lipid peroxidation in mouse liver homogenate ( $P < 0.001$ ). The hydroxyl free radical induced by Fenton reaction could be scavenged by HJT. **CONCLUSION** These results indicate that HJT has a protective activity for the membranes of erythrocytes and tissue cells.

**Key words** huanglian Jiedu Tang; lipid peroxidation; hydroxyl free radical