

葡聚糖和腐植酸：对免疫系统的协同作用

Vaclav Vetvicka¹, Roberto Baigorri², Angel M. Zamarreño², Jose M. Garcia-Mina^{2, 3}, Jean-Claude Yvin⁴ 著

周霞萍⁵ 樊兴明⁵ 译

(1 美国路易斯维尔大学病理学系 肯塔基州 40292

2 钛美农业国际鲁利耶集团研发部 奥尔科延 999019

3 西班牙纳瓦拉大学化学和土壤化学系 潘普洛纳 999023

4 法国钛美农业国际研发部 迪纳尔 999019

5 华东理工大学科学技术发展研究院 上海 200237)

摘要: 腐植酸是由有机物质分解产生的混合物。尽管它们普遍存在，但对它们的生物学效应了解有限，且目前的研究结果存在争议。因此对来源不同且具有不同的生化特性的两种类型的腐植酸的免疫效果进行评估。单独使用这两种腐植酸或与已知发酵衍生的免疫调节剂葡聚糖结合使用，并测其在细胞(吞噬作用和肿瘤抑制)和体液(抗体的产生和细胞因子的分泌)的免疫反应。研究表明，腐植酸是具有生物活性的免疫调节剂，影响体液免疫和细胞免疫反应。此外，本文研究的两种腐植酸在免疫反应的刺激下具有协同效应，为这些天然免疫调节剂的进一步研究提供了支持。

关键词: 葡聚糖 腐植酸 免疫力 吞噬作用

中图分类号: TQ314.1, R979.5

文献标识码: A

文章编号: 1671-9212(2015)06-0034-07

Glucan and Humic Acid: Synergistic Effects on the Immune System

Vaclav Vetvicka¹, Roberto Baigorri², Angel M. Zamarreño², Jose M. Garcia-Mina^{2,3}, Jean-Claude Yvin⁴ write

Zhou Xiaping⁵, Fan Xingming⁵ translate

(1 Department of Pathology, University of Louisville, Louisville, Kentucky, USA, 40292

2 R&D Department, Timac Agro International-Roullier Group, Orcoyen, 999019

3 Department of Chemistry and Soil Chemistry, University of Navarra, Pamplona, Spain, 999023

4 R&D Department, Timac Agro International, Dinard, France, 999019

5 Institute of Science and Technology Development, East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237)

Abstract: Humic acids are compounds resulting from decomposition of organic matter. Despite their common presence, our knowledge of their biological effects is limited, and current findings are controversial. We decided to evaluate the immunological effects of two different types of humic acids, differing in source and biochemical characteristics. Using both components either alone or in combination with the well-established yeast-derived immunomodulator glucan, we measured their effects on both the cellular (phagocytosis and tumor suppression) and humoral (antibody production and cytokine secretion) branches of immune reactions. In summary, our results suggest that humic acids are biologically active immunomodulators affecting both the humoral and cellular branches of immune reactions. In addition, the two humic acids studied here are working in synergy in stimulation of the immune reaction, supporting further studies of these natural immunomodulators.

Key words: glucan; humic acids; immunity; phagocytosis

有据可查,使用 β -1,3-葡聚糖作为一种免疫调节剂已经超过50年。实验表明粗制的酵母细胞制备物通过补体系统的激活来刺激巨噬细胞,使得对多糖免疫调节特性的研究兴趣第一次被提起来。实验进一步研究确定的免疫调节活性成分为 β -1,3-葡聚糖。随后大量研究表明 β -1,3-葡聚糖,无论是颗粒或是溶液,均表现出免疫刺激特性,包括抗细菌和抗癌活性。2500多种出版物报道, β -1,3-葡聚糖的溶液或颗粒,均表现出显著的免疫调节性能。目前,葡聚糖被认为是最有效的生物反应调节剂之一。

一些研究表明,与葡聚糖相结合的生物活性分子具有协同效应。大量报告显示,当葡聚糖与维生素C结合会产生一些有益的影响。与维生素C表现出协同效应的主要原因是:该维生素显示出与葡聚糖刺激完全相同的免疫反应,即巨噬细胞活性,自然杀伤细胞的活性,以及特定抗体的形成。一项研究显示,在小鼠被感染科氏中殖孔绦虫的治疗过程中,葡聚糖-维生素C的组合具有显著的治愈能力;治疗对肝纤维化和病理生理学变化产生积极的调制作用。同组研究人员还发现,发酵衍生的葡聚糖对几种寄生虫是一种前景广阔的药剂。至于肝病,裂褶菌胞外多糖葡聚糖被证明有助于抵抗肝脏的缺血再灌注损伤,这些影响机制可能是由于葡聚糖引起早期基因的表达减少了对肝脏的损伤。

腐植酸物质主要存于深度降解的泥炭中。腐植酸是一组由复杂的芳香族聚合物结构组成的高分子量的大分子物质,和黄腐酸代表了腐植酸物质中特定的组分,一些人认为是惰性的,而另一些人认为它们是生物毒素。更详细的研究显示出不同的结果:高剂量的腐植酸在肠细胞中会诱导染色体异常,造成DNA氧化损伤,抑制核因子 κ B的活性,刺激胸腺和中性粒细胞。另一方面,最近一些令人关注的、潜在的、临床重要的生物活性物质与各种类型腐植酸有关,包括抗病毒的特

性和淋巴细胞的增殖。也有研究将腐植酸添加到饲料中,促进了养殖动物的生长和健康。

最近的研究表明,白藜芦醇能够显著改善葡聚糖的生物活性,所以我们评估葡聚糖与腐植酸对免疫反应可能有协同作用。

1 材料和方法

1.1 动物

6~10周龄的BALB/c雌性小鼠,购自杰克逊实验室(美国缅因州巴尔港)。

所有动物实验是根据美国肯塔基州路易斯维尔市路易斯维尔大学的动物管理委员会的规范进行。动物用CO₂窒息处死。

1.2 材料

RPMI 1640培养基,柠檬酸钠,卵白蛋白,抗生素,瑞氏色素,鲎溶解物试验E-TOXATE,弗氏佐剂,伴刀豆球蛋白A(Con A)(从美国密苏里州圣路易斯Sigma公司购买),胎牛血清(从美国犹他州洛根Hyclone实验室购买)。

1.3 β -1,3-葡聚糖

本研究使用的葡聚糖从以下公司购得:酵母型不溶性葡聚糖No.300来自转运站(美国,南卡罗来纳州,哥伦比亚),水溶性葡聚糖海带多糖来自Sigma公司。

1.4 提取步骤

实验中使用的两种腐植酸:一个提取自捷克共和国的风化褐煤(HZ);另一个提取自中国的褐煤(HC)。对不同的腐植酸进行分离,依据国际腐殖质学会的程序进行纯化,并冷冻干燥。

1.5 固态¹³C-核磁共振(NMR)光谱

固态¹³C-核磁共振光谱,用Bruker(美国马萨诸塞州比尔里卡)的Avance AV-400WB(9.4-T)型光谱仪测定,共振频率为100.47 MHz,采用交叉极化磁性旋转技术,旋转频率为12 KHz,脉冲宽度为90°,采样时间为30 ms,延迟时间为4.0 s。

1.6 元素分析

冻干样品中的碳、氢、氮含量，一式2份，采用LECO[®](美国密歇根州圣若瑟)CHN 900型分析仪器进行元素分析。氧的含量通过差减法进行确定(无灰基)。

1.7 体外吞噬作用

在腹腔注射葡聚糖和/或如前面所述腐植酸之后，使用合成的微球(2-甲基丙烯酸羟乙酯[HEMA]颗粒)，供体外测定吞噬作用，即，采用0.05 mL的HEMA粒子(5×10^8 /mL)培养血液或分离的腹膜细胞。试管于37 °C培养60 min，并间歇振荡。涂片标本用瑞氏色素进行染色。细胞有3个或更多的HEMA粒子则认为呈阳性。同样的涂片标本再被用于评价细胞的类型。

1.8 白细胞介素(IL)-2的生产评价

纯化的脾细胞(2×10^6 /mL和5%的胎牛血清在RPMI 1640培养基中)加入到24孔培养板中。在阳性对照孔加入1 μg 伴刀豆蛋白A，将细胞在恒湿培养箱中(37 °C，5% CO₂)培养72 h。在培养结束后，收集上清液，过滤(孔径0.45 μm)，并测试IL-2的存在。IL-2水平使用Quantikine小鼠IL-2试剂盒(美国明尼苏达州明尼阿波利斯研发体系)测定。

1.9 细胞因子阵列

单个细胞因子通过联合生物技术(美国马里兰州维尔)在小鼠血清中进行测定。小鼠注射试验组合物24 h后，将小鼠处死，并收集血清，储存在-80 °C冰箱中。对于细胞因子的分析，我们采用联合生物技术所提供的蛋白质微阵列服务。简言之，该服务使用夹层的基于抗体的蛋白被用于多重测定。一个共轭链霉亲和素-Cy5被用于分析检测，该方法在每个芯片的阳性和阴性对照中

进行，一式4份测定。该测定法检测下列细胞因子：IL-2，干扰素- γ ，肿瘤坏死因子(TNF)- α ，IL-8，IL-12 p70，IL-12 p40，IL-4，IL-6，IL-10，IL-5，干扰素诱导蛋白-10，巨噬细胞炎性蛋白-1 β ，IL-13，IL-1 β 和单核细胞趋化蛋白(MCP)。

1.10 体内肿瘤抑制

每只小鼠在皮下脂肪垫中注射磷酸缓冲盐水(PBS)配置的 1×10^6 Ptas64细胞。在明显发现肿瘤后(一般在细胞注射14天后)，将小鼠分配给实验组。用PBS稀释过测试样品后，采用腹膜注射稀释样品，处理完成之后将小鼠处死，从其身上取出肿瘤并称量。

1.11 抗体的形成

小鼠用100 μg卵清蛋白注射2次(间隔2周)，在最后1次注射7天后收集血清。特异性抗体对抗卵清蛋白的水平通过酶联免疫吸附测定法进行检测。采用弗氏佐剂作为阳性对照。

1.12 统计

采用学生 t -检验对数据进行统计分析。

2 结果

在元素分析，特别是在¹³C-核磁共振分析中能够观察到，在芳香族和脂肪族结构部分，HZ呈现出比HC更多的功能性基团，主要体现在酚基碳、羰基碳、O-烷基碳的含量较高。但是，HC呈现出显著的芳香性，而HZ呈现出芳香性显著的脂肪族排列。因此得到了2个结构完全不同的腐植酸：HZ具有更多的含氧官能团，并与芳香族和脂肪族基团结合，HC具有较少功能性基团，但具有高芳香性(表1和表2)。

表1 腐植酸样品的元素分析

Tab.1 Elementary analysis of HA samples				%
腐植酸	C	H	N	O ^a
HZ	48.2	2.99	0.98	48.9
HC	57.5	1.60	1.10	39.8

注：a表示采用差减法测定。

表2 腐植酸样品的¹³C-核磁共振光谱分析
Tab.2 ¹³C-NMR spectroscopy of HA samples

腐植酸	范围 (ppm)				
	烷基碳(0~45)	氧烷基碳(45~110)	芳香碳(110~160)	酚基碳(140~160)	羰基碳(160~215)
HZ	27.4	12.6	46.5	12.8	13.5
HC	13.8	3.2	79.5	5.4	3.5

首先,测试腐植酸和腐植酸-葡聚糖对腹腔内一些细胞的影响。在随后的所有实验中,使用相同组合方式,观察到无论是腹腔注射或口服(数据未显示),细胞结构(关于二者总数和分类计数)没有变化。在所有情况下,葡聚糖、腐植酸、或葡聚糖-腐植酸能溶解在PBS中,被用作阴性对照。

各种葡聚糖对巨噬细胞的影响是公认的。然而,为了证明免疫调节剂的新组合确实表现出免疫调节特性,对吞噬作用进行评价是必要的。首先,我们测量了葡聚糖和/或腐植酸对末梢血中合成的HEMA微球体外吞噬作用的影响(图1)。葡聚糖和腐植酸均刺激合成颗粒的内部转化,但该组合制剂,特别是在比例为1:1时,对血液中性粒细胞表现出显著的协同效应。

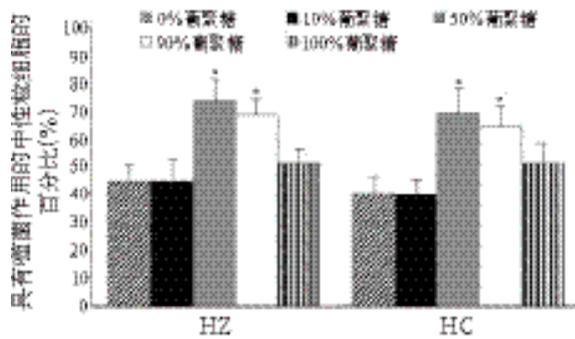


图1 腹腔内注射葡聚糖和/或腐植酸合成微球(HEMA粒子)对体外吞噬作用增强效果

Fig.1 Potentiation of in vitro phagocytosis of synthetic microspheres (HEMA particles) by intraperitoneally injected glucans and/or HAs

注:(1) 总共注射100 μg不同比例的样品,对照组(仅用PBS)值为33.4%。周边血液中性粒细胞中含有3个和更多HEMA粒子被认为具有阳性效果。(2) 3个独立的实验中实验数据采用平均值±标准偏差的形式(每个实验组5只小鼠)。*表示P≤0.05显著性差异水平。下同。

当测试腹腔巨噬细胞的体外吞噬作用时,得到了相同的结果(图2)。在这两种情况下,将细胞与注射了葡聚糖和/或腐植酸的小鼠身体分离。

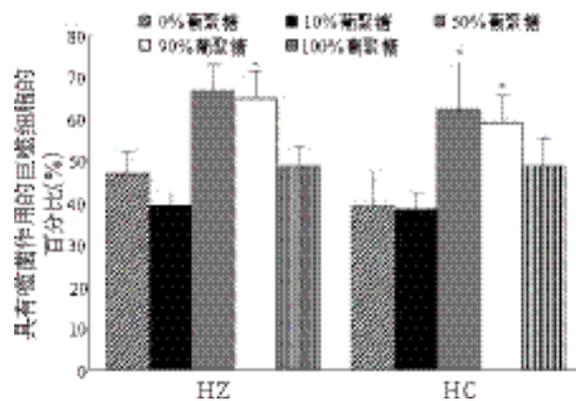


图2 腹腔内注射葡聚糖和/或腐植酸合成微球(HEMA粒子)对体外吞噬作用增强效果

Fig.2 Potentiation of in vitro phagocytosis of synthetic microspheres (HEMA particles) by intraperitoneally injected glucans and/or HA

注: 总共注射100 μg不同比例的样品,对照组(仅用PBS)值为36.5%。腹腔巨噬细胞中含有3个和更多HEMA粒子被认为具有阳性效果。

免疫调节活性也能通过对由脾细胞产生的IL-2的影响得到证明(图3)。从对照组和实验组小鼠分离出来的脾细胞在体外培养72 h后测定IL-2的产生。此外,葡聚糖和腐植酸结合的处理小鼠对IL-2的产生有显著的刺激效果。在采用HZ的情况下,当HZ与葡聚糖为9:1时表现出最高的刺激效果;而在采用HC的情况下,HZ与葡聚糖为1:9时IL-2获得最高的产生量。与单独使用葡聚糖或腐植酸相比,所有这些组合都表现出更高的刺激效果。由于无刺激的脾细胞(PBS组)IL-2的分泌量为零,所以即使是最低量的刺激在统计学

上产生的影响也是显著的。

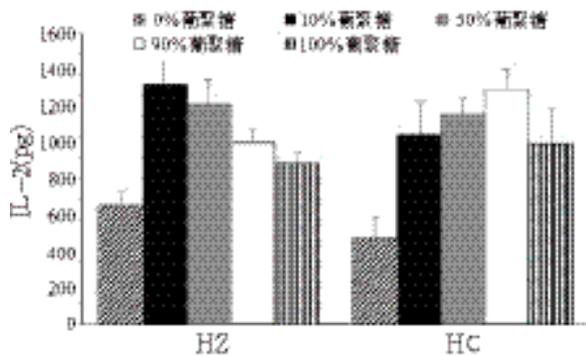


图3 葡聚糖-腐植酸结合物对伴刀豆球蛋白A刺激脾细胞分泌IL-2的影响

Fig.3 Effects of glucon-HA combinations on Con A-stimulated secretion of IL-2 by spleen cells

初步实验之后，我们测量取自24 h前腹腔内注射的小鼠的细胞因子分泌物。由表3所示的结果可清楚地观察到几个重要的结论：在测试的14种细胞因子中，腐植酸和葡聚糖只刺激其中6种细胞因子的分泌(IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α 和MPC-1)；在HC中有一个例外，它不刺激MCP-1的产生。关于HZ，相对于单独使用HZ或葡聚糖，HZ与葡聚糖结合对IL-5, IL-6和TNF- α 具有更高的刺激。稍微有点不同的是，HC-葡聚

糖结合物仅仅在1:9时才能提高IL-5, IL-6和TNF- α 的分泌。在这两种情况下，对MCP-1分泌的刺激都是微小的。

然后，我们专注利用辅助的组合物实验模型，采免疫卵清蛋白、葡聚糖、腐植酸、腐植酸和葡聚糖与两种腹膜剂量的抗原一起使用；用弗氏佐剂作为一个额外的阳性对照。所得结果表明(图4)，组合物在所有情况下对抗原都表现出显著的佐剂活性(光密度, 0.311 ± 0.026)。对于HZ，在9:1时表现出最高的刺激性，而HC，在1:1和1:9时表现出最高的刺激性。然而必须指出，没有一个葡聚糖增效的体液免疫值达到了弗氏佐剂的水平(光密度, 1.67 ± 0.22)。

最后，对接种了Ptas64乳腺肿瘤的小鼠，每日在腹膜内注射待测试的物质以测试其治疗效果(图5)。实验重复3次(每个实验组3只小鼠)，获得了相似的结果。对照组(仅PBS)肿瘤的平均重量为 699.7 ± 38.5 mg。实验数据表明，对于HZ实验组，对肿瘤生长起强烈抑制作用的分子很明显是葡聚糖，因为单独用葡聚糖的抑制性与HZ-葡聚糖的抑制性是一样的。而对HC实验组，测试样品在1:1的比例对肿瘤生长表现出强烈抑制性。这两种情况下，单独使用腐植酸都没表现出显著的抑制活性。

表3 腐植酸样品和葡聚糖对细胞因子分泌的影响
Tab.3 Effect of HA samples and glucon on cytokine secretion

腐植酸	葡聚糖	细胞因子						
		IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	TNF- α	MCP-1	
HZ	100%	0%	111.2 ± 8.8	149.2 ± 11.8	77.1 ± 4.4	56.2 ± 2.3	109.1 ± 5.5	1.0 ± 0.1
	90%	10%	233.8 ± 11.9	155.6 ± 8.8	56.6 ± 2.2	50.5 ± 4.5	120.1 ± 6.7	8.1 ± 1.1
	50%	50%	534.6 ± 21.2	651.5 ± 21.8	$268.8 \pm 11.5^*$	$109.2 \pm 3.3^*$	$434.4 \pm 21.7^*$	$17.2 \pm 1.1^*$
	10%	90%	599.9 ± 34.5	601.2 ± 33.8	$301.6 \pm 22.0^*$	$88.8 \pm 4.4^*$	$443.4 \pm 19.9^*$	9.2 ± 0.9
	0%	100%	597.2 ± 34.8	580.9 ± 40.1	119.6 ± 18.1	48.2 ± 3.8	270.1 ± 9.9	6.0 ± 1.1
HC	100%	0%	36.6 ± 1.8	97.1 ± 4.4	21.2 ± 1.9	61.5 ± 3.5	76.5 ± 3.9	0
	90%	10%	148.4 ± 8.8	142.2 ± 5.5	26.1 ± 2.2	38.4 ± 4.1	134.4 ± 7.1	1.0 ± 0.1
	50%	50%	465.4 ± 22.3	712.5 ± 34.9	199.7 ± 9.1	101.1 ± 4.5	354.5 ± 18.7	$9.1 \pm 1.7^*$
	10%	90%	715.2 ± 42.9	608.2 ± 36.5	$215.3 \pm 11.1^*$	$188.4 \pm 9.9^*$	$489.6 \pm 17.9^*$	4.4 ± 0.8

注：阴性对照组(仅PBS)通常为零。*表示 $P \leq 0.05$ 显著性差异水平。

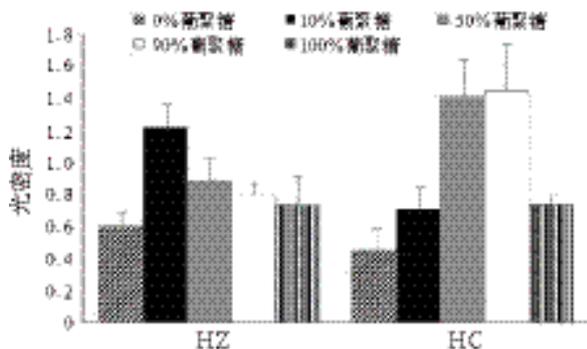


图4 腹腔注射两种腐植酸-葡聚糖组合对抗卵清蛋白抗体形成的影响

Fig.4 Effects of two intraperitoneal injections of tested HA-glucan combinations on formation of antibodies against ovalbumin

注：小鼠注射2次(间隔2周)，在最后一次注射7天后收集血清，通过酶联免疫吸附测定法检测针对卵清蛋白特定抗体的水平。

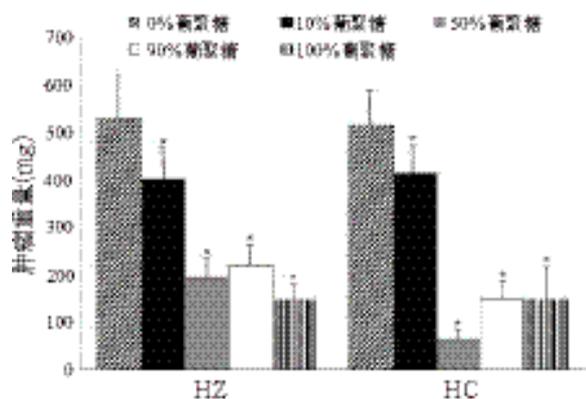


图5 腐植酸-葡聚糖对接种Ptas64乳腺肿瘤的BALB/c小鼠的治疗效果

Fig.5 HA-glucan therapy of BALB/c mice with Ptas64 mammary carcinoma

注：对每个实验组，治疗2周后测试每组小鼠的肿瘤的重量以此表示治疗效果。每组实验中，每个小鼠个体每天都腹膜注射100 μg的腐植酸，葡聚糖或两者的结合物。

3 讨论

腐植酸物质是土壤中腐殖质的主要成分。它们是动植物遗骸中有机物经化学和微生物降解的产物。它们的溶解度随pH值而不同。这3个主要的有机腐植酸组分可以分为：腐植酸，在碱性pH下可

溶，酸性pH下不可溶；黄腐酸，任何pH值下均可溶；棕腐酸在任何pH值下均不可溶。这些腐植酸物质的结构是不明确的。从定性的角度看，它们呈现相同类型的官能团和结构。然而，由于系统的多分散性，难于表明其确切的结构。一般而言，它们是具有不同分子量和分子大小的酸聚合电解质，并具有不同的芳香族特性。这些物质的特点是它们能影响不同生物的代谢和发育。因此，腐植酸物质能影响植物代谢，微生物活动和动物发育，这在许多其他的研究中已进行过描述。然而，对结构特征和生物活性的相关研究却很少。

不同的研究表明，表征腐植酸物质的实效方法是¹³C-核磁共振和元素分析法互补使用。我们将这些技术应用于本实验使用的两种腐植酸，在元素分析，特别是在¹³C-核磁共振(NMR)中能够观察到，在芳香族和脂肪族结构部分，HZ呈现出比HC更多的功能性基团。这种功能性基团主要体现在酚、羰基碳、O-烷基碳的含量较高。但是，HC呈现出显著的芳香性，而HZ呈现出芳香性(占主导)和显著的脂肪族排列。因此我们使用了两个结构完全不同的腐植酸：HZ具有更多的和芳香族和脂肪族基团结合的含氧官能团，HC具有较少官能团，但具有高芳香性(表1和表2)。

各种类型的免疫调节剂，尤其是葡聚糖，刺激吞噬作用是公知的。因此，通过评估这类免疫反应，来判定有生物活性的免疫调节剂效果是重要的。我们测试了血液周边白细胞和巨噬细胞在吞噬作用中使用HEMA合成微球后的变化。这些微粒具有轻微的负电荷，且也没有特别的附着到细胞表面，这保证了只有活性吞噬细胞内部转化这些惰性粒子。该现象通过相差显微镜，电子显微镜，以及猝灭法已经验证。我们发现，测试的这两种物质引起体外吞噬作用的显著增加，且这两种物质的组合物显示出对巨噬细胞和中性粒细胞的协同效应显著。所示数据不但反映了单次注射试验物质的效果，类似的效果在口服给药后(数据未显示出)也可以观察到。观察这些实验中由于直接的细胞活化，其血液或腹膜腔中各细胞总数和比例都没有变化。

除了直接影响免疫系统中的各种细胞， β -葡聚糖的免疫刺激和其他的免疫导致一些细胞因子的释放和合成作用增强。首先，我们注意到通过体外脾细胞的刺激产生了IL-2，发现 β -葡聚糖对免疫系统中的各种细胞有直接作用，葡聚糖和其他免疫调节剂的免疫刺激作用是增强合成作用和释放若干细胞因子来起作用的。并且发现，腐植酸-葡聚糖的组合物刺激比单独测试时释放更高的IL-2，而90%的HZ在与葡聚糖组合的情况下，释放的IL-2比HZ与伴刀豆球蛋白A组合时更高。

我们评估了对血清中14种不同细胞因子的影响。HC-葡聚糖刺激效果依赖于其比例，所以HZ比HC的刺激效果更明显，而且在所有情况下都比单独使用腐植酸刺激所产生细胞因子的效果高。刺激效果最高的细胞因子是IL-5，IL-6和TNF- α ，而14个细胞因子中的8个没有检测到刺激效果。

细胞因子是细胞间信息交流的重要载体，它们在不同免疫系统间的信息流动中起着极其关键的作用。报告中显示癌症中的ILs可以表现出对肿瘤生长的抑制功能及对癌症生长的促进功能。肿瘤恶化过程的性质是复杂的，由恶性细胞产生的细胞因子可作为自分泌生长因子和免疫调节剂。

最近的一些研究证实，葡聚糖也可以作为一种佐剂辅助体液免疫反应。我们通过比较测试葡聚糖-腐植酸组合物和弗氏佐剂的佐剂活性，试验结果表明，尽管活性总是低于弗氏佐剂，但还是很重要的，其中葡聚糖-HC二者组合的活性是最高的。

最后，我们决定测试腐植酸-葡聚糖的组合对小鼠体内乳腺肿瘤细胞Ptas64生长的影响。我们先前的研究工作表明，小鼠和人类CR3对葡聚糖响应有极高的相似性，这使得小鼠肿瘤模型适合于葡聚糖的研究。我们采用了与之前发表的文章相同的实验设计，即采用发酵衍生的葡聚糖。类似于抗体应答，发现1:1的HC-葡聚糖具有最高的抑制效果，我们观察到有92%以上的抑制率。该结果表明，腐植酸的芳香性在抗肿瘤作用中发挥重要作用，因为HZ的芳香性远远低于HC，HZ没有表现出高的抑制活性。

脂多糖污染可能掩盖任一免疫调节剂的实际效果。因此，我们检测了研究方案中的脂多糖污染，测定的结果都小于10 EU。另外，我们通过用10 μ g/mL多粘菌素B处理葡聚糖和腐植酸，消除脂多糖的功能，两种情况下得到了相同的结果。从常规的和无脂的多糖材料中取得的结果也相似，表明微量脂多糖的存在对提高免疫活性和抗肿瘤反应无影响。

总结我们的数据，结果表明腐植酸具有生物免疫调节活性，影响体液和细胞免疫反应。另外，HZ和HC在免疫反应的刺激中起着协同作用，这一发现为这些天然免疫调节剂的进一步研究提供了支持。

参考文献(略)

译自: *Journal of Medicinal Food*, 2010, 13(4): 863~869。

(来源: 腐植酸, 2015, 6: 34-40)

薏苡败酱汤联合黄腐酸治疗 YLI 阳性宫颈糜烂疗效观察

袁成彬¹, 李强¹, 张兰英¹, 赵海军², 王淑芬², 毕学杰²

(¹ 河北省怀安县中医院, 河北 怀安; ² 河北省石家庄市第四医院, 河北 石家庄)

[摘要] 目的 观察薏苡败酱汤联合黄腐酸治疗 AQC 阳性宫颈糜烂患者的临床效果! 方法 将 AQC 阳性的 11 例宫颈糜烂患者随机分为研究组和对照组各 2 例! 研究组给予薏苡败酱汤煎服, 同时黄腐酸阴道用药, 治疗 1 个月; 对照组给予保妇康栓阴道用药 1 个月! 比较 2 组治疗效果和 AQC 转阴情况! 结果 治疗 1 个月研究组总有效率和 AQC 转阴改善率明显高于对照组(均 $P < 0.05$)! 结论 薏苡败酱汤配合黄腐酸治疗 AQC 阳性宫颈糜烂患者, 不仅有利于病情更好恢复, 而且可促 AQC 转阴, 对宫颈糜烂发生癌变有预防作用!

[关键词] 宫颈糜烂; 人乳头瘤病毒; 癌变; 薏苡败酱汤; 黄腐酸; 保妇康栓

789: 1\$&/'/:#9<=#!\$2 > 221/#"\$!%#1#"\$&

[中图分类号] *(!#&"

[文献标识码] M

[文章编号] !\$2 > 221/("\$!)!1 > !%1& > &&

人乳头瘤病毒(AQC)对宫颈有特殊亲和力^[1], 已经有越来越多的证据说明, 持续的 AQC 感染是导致宫颈上皮内发生瘤病变(-LG)的主要原因^[2]! 所以, 从预防和治疗 AQC 感染做起, 对预防宫颈癌有重要意义^[3]! 宫颈炎波及上皮的 2 度以上时可以诊断为宫颈糜烂^[4]! 自从开展常规宫颈炎脱落细胞筛查以来, 发现很多宫颈糜烂的患者伴有 AQC 感染^[5]! 目前, 还没有确切的药物能够尽快使宫颈糜烂 AQC 阳性患者转阴, 因此, 发掘祖国医学治疗的优势, 在药物修复宫颈糜烂上皮的同时抑制 AQC 繁殖有重要意义! 薏苡败酱汤和黄腐酸是石家庄市第四医院制剂室加工而成的协定处方和消毒药液, 经过临床实践证实, 具有修复上皮生肌止血效果, 同时有明确的抗菌“抗病毒及调节机体免疫功能作用”^[6], 对滴虫“真菌”支原体等都有抑制作用, 有助于快速修复宫颈上皮脱落面, 抑制宫颈炎! 笔者观察了薏苡败酱汤和黄腐酸治疗 AQC 阳性宫颈糜烂患者的疗效, 现报道如下!

1 临床资料

1.1 一般资料 选择 2012 年 1 月至 2012 年 2 月在石家庄市第四医院门诊治疗的 AQC 阳性中重度宫颈糜烂患者 11 例, 均为已婚妇女, 有生育史! 所有病例经过 TCT 检测, 排除恶性疾病可能, 宫颈糜烂诊断标准符合《妇产科学》第 7 版教材! 随机分为 2 组: 研究组 2 例, 年龄(21~35)岁; 生育(1~2)次; 宫颈疾病史(1~2)年! 对照组 2 例, 年龄(21~35)岁; 生育(1~2)次; 宫颈疾病史(1~2)年! 2 组年龄“生育状况”“宫颈疾病史”“宫颈糜烂程度”比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$), 具有可比性!

1.2 治疗方案 研究组在每晚睡前使用妇科专用一次性推进器将黄腐酸(河北省石家庄市第四医院制剂室生产, 国药准字 H120112, 主要成分为风化煤“皂酚”)轻轻送入阴道深处至穹隆部, 自月经干净后第 8 天开始用药, 1 次, 隔日用药 1 次, 用药 1 次为 1 个疗程, 连续用药 1 个疗程, 同时每

天口服薏苡败酱汤中药免煎颗粒(药物组成: 重楼! 牡丹! 党参! 桑寄生! 续断! 薏苡仁! 丹参! 茯苓! 败酱草! 炒白术! 白花蛇舌草! 半枝莲! 地丁! 细辛! 金银花! 广州天一有限公司生产)先用开水冲开, 凉温后分 2 次服用, 连续服用 1 个月! 对照组给予保妇康栓(海南碧凯药厂生产, 主要成分为莪术油“冰片”)治疗, 1 粒, 隔日用药 1 次, 用药 1 次为 1 个疗程, 连续用药 1 个疗程, 用药当天禁性生活及盆浴!

1.3 AQC 检测 采用 AQC 免疫荧光法检测, 将采集的宫颈和宫颈管脱落细胞以异丙醇沉淀后离心, 加入 10% 乙醇洗涤“离心后提取 +G”! 将其放入配置好的 Q- 混合液, 置入 96 孔板“荧光定量 Q- 仪, 以反应条件为 B+H 反应 90 秒, 1 个循环; +G? 聚合酶激活为 90 秒, 1 个循环; +G? 扩增 90 秒, 1 个循环! 每份标本以 2 种不同波长荧光进行检测, 以 2 种软件进行分析!

1.4 疗效判断标准^[2] 痊愈: 阴道镜可见宫颈光滑, 无任何临床症状; 好转: 糜烂面积较治疗前缩小! 临床症状减轻(白带减少“出血减少”“异味减轻”“偶有瘙痒”), 阴道镜可见颗粒型转为单纯型, 乳头型转为颗粒型; 无效: 阴道镜仍然可见糜烂面积无减少, 甚至可见颗粒型和乳头型糜烂面, 仍有临床症状(白带多“出液多”“异味重”“常有瘙痒”)

1.5 AQC 转阴改善判断标准^[7] 治疗 1 个月检测 AQC 均阳性, 即阳性率 40%, 同一亚型 AQC 1, AQC 2, AQC 3, AQC 4, AQC 5, AQC 6, AQC 7, AQC 8, AQC 9, AQC 10, AQC 11, AQC 12, AQC 13, AQC 14, AQC 15, AQC 16, AQC 17, AQC 18, AQC 19, AQC 20(等 20 种亚型, 任何一种亚型 AQC +G? 检测出均记为阳性! 转阴: 治疗后 AQC +G? 检测 \$!; 显著改善: 部分亚型未转阴, 但改善率 10%; 改善: 改善率 60%; 无改善: 改善率 60%; 升高: 次检测比值高于治疗前! 改善率 3(治疗前的阳性值 > 治疗后的阳性值): 治疗前阳性值 1! \$O!

1.6 统计学方法 采用 SPSS 软件分析, 计数资料用百分率表示, 治疗前后比较和组间比较均进行 χ^2 检验, $P < 0.05$

[通信作者] 赵海军, > ^DFE: UV: %! "!" n -9=D# W8^

为差异有统计学意义!

A 结果

A②? " 组疗效比较 研究组治疗效果明显优于对照组(" 6 \$#\$%) ,见表!!

表! " 组疗效比较 例(O)

组别	\$	痊愈	好转	无效	总有效
研究组	2"	'"(')	!!(!&)	/(!!)	(&(2/)'
对照组	2"	&((1%)	!"(!%)	&&(1\$)	1/(%/)

注: ! 与对照组比较, " 6 \$#\$%!

A③A " 组 AQC 临床转阴改善情况比较 研究组 AQC 临床转阴改善情况明显优于对照组(" 6 \$#\$%) ,见表"!

表" " 组治疗' 个月后 AQC +G? 检测结果比较 例(O)

组别	\$	转阴	显著改善	改善	无改善	升高	改善率:O
研究组	2"	&((1%)	&"(&)	%(')	2(!\$)	\$(\$)	/&'
对照组	2"	""(')	""(')	'()	&!(&2)	!(!)	'\$

注: ! 与对照组比较, " 6 \$#\$%!

B 讨论

宫颈糜烂是妇科常见病,实质上是宫颈的慢性炎症,由于该病容易复发,而且常伴有 AQC 感染,成为妇科研究的重点^[15]! 研究表明,AQC 亚临床感染对宫颈有嗜上皮特性,是宫颈癌及癌前病变的主要原因! 虽然导致宫颈糜烂的病原体很多,但只有控制了 AQC 感染,才能阻断宫颈上皮发生癌内病变^[11]! AQC 感染形成的慢性宫颈炎,宫颈因局部炎症破坏而使上皮细胞变薄,导致宫颈分泌的含有免疫因子的宫颈黏液减少,免疫功能下降,反过来,免疫功能减退又增加了 AQC 感染的机会,容易形成恶性循环! 临床有很多治疗宫颈糜烂的手段,包括物理治疗"药物治疗"免疫治疗"手术治疗等,其中药物治疗仍然是控制宫颈炎的主要措施,大多数药物对细菌感染"真菌感染"病毒感染有效,但仍然缺少控制 AQC 感染的可靠药物! 保妇康栓用于治疗宫颈糜烂已经多年,并取得了很好效果^[17],但因为栓子需要融化后局部吸收,往往吸收较慢,如果采用液态制剂,用阴道喷入器涂在宫颈上,考虑吸收效果会更好! 此外,保妇康栓的主要成分是莪术和冰片,能够抗菌"抗病毒"抗瘤,但没有确切的修复创面作用!

薏苡败酱汤配方可以有效疏通任督二脉经络,控制急性炎症,还能健脾疏肝"解毒散结,对妇科炎症疾病发病初期的患者尤其适宜! 方中薏苡仁有利湿排脓作用,经过党参"续断"细辛辅以正能量,其利湿排脓的作用大大增强,可有效缓解妇科炎症发病初期的盆腔"附件"宫颈"阴道组织水肿;败酱草"白花蛇舌草"重楼"半枝莲能清热解毒,消痈散结,不仅止痛退热效果好,而且对湿热病毒有很好的抑制作用;在茯苓"白术健脾益气 and 血壮阳的鼓舞下,加强了清热除湿的功能;更有丹参活血"桑寄生利水,改善了水肿组织的微循环,其抗炎递质的效果更佳! 现代药理研究表明^[18],薏苡仁"茯苓"金银花"败酱草及白花蛇舌草等药物有提高机体免疫力"抗菌消炎"解热镇痛等功效! 方中重楼具有清热解毒"消肿止痛"凉

肝定惊的作用;牡丹有散瘀血"清血"和血"止痛"通经之作用,还有降低血压"抗菌消炎之功效;党参具有增强免疫力"扩张血管"降压"改善微循环"增强造血功能等作用;桑寄生有补肝肾"强筋骨"除风湿"通经络"益血"安胎及治疗产后乳汁不下的功效;续断有补肝肾"续筋骨"调血脉的作用;薏苡仁可渗湿除痹,能舒筋脉,缓和拘挛;丹参可活血调经"祛瘀止痛"凉血消痈"清心除烦"养血安神;茯苓能祛邪,故脾虚湿盛,正虚邪实之症尤为适宜;败酱草有清热解毒"消痈排脓"活血行瘀的功效;炒白术有缓和燥性"借麸入中,增强健脾"消肿作用;白花蛇舌草清热解毒"利湿;半枝莲有清热"解毒"散瘀"止血"利尿消肿"定痛的作用;地丁清热利湿"解毒消肿效果显著;细辛祛风散寒"行水开窍;金银花能宣散风热,还善清解血毒,用于各种热性病的治疗! 以上诸药合用,既发挥各自特长,又组合增强各自效力,对妇科炎症的"火"毒"痰"湿及西医所指的病毒"特殊感染菌都是有效的!

黄腐酸含有羟基"烯醇基"磺酸基"氨基"甲氧基及羰基等多种官能团,具有较强的阳离子交换能力"络合能力"缓冲能力"吸附能力和催化能力^[11],不仅对各种类型的微生物有杀灭效果,而且能增强机体的免疫功能,与抗生素类药物相比,毒性极小,长期使用不会产生耐药性! 黄腐酸除了所带活性基团以外,还保留了多种氨基酸"多肽"多糖"核酸和微量元素,对创面新生肉芽组织有保护和促进生长的作用,也能在创面恢复过程中增加机体的抵抗力,调节免疫功能^[18]! 临床资料证实,黄腐酸所含的多元醇类和肽类,能促进细胞增殖和组织生长,促进表皮细胞生长和肉芽组织增生,促进黏膜毛细血管增生,改善局部血液循环,促进创面坏死组织脱落,加速创面修复;含有的黏糖氨酸和黏氨酸,能增加机体免疫功能,并能抗炎消肿^[17]! 外用黄腐酸可以快速激活局部免疫细胞"消除炎症水肿,缩短创面愈合时间^[10]! 黄腐酸的这些作用,对阻止 AQC 破坏宫颈上皮有保护作用,并通过降低血液高凝状态,抑制局部炎症反应,控制 AQC 感染,使 AQC 病毒失去了生存的环境! 所以,将黄腐酸研制成合适的剂型,能让患者更方便"舒服地把药液涂布于宫颈糜烂面,对控制 AQC 感染"加速宫颈糜烂康复更有实际价值!

中医认为,宫颈糜烂的发展是湿"痰"瘀不能被正气推动散开,才导致功能下降,浊气泛滥! 薏苡败酱汤从中医理论上实现了阻止会阴经络内痰"湿"瘀互结,能预防盆腔炎症包块形成"发展"红肿破溃等! 黄腐酸无味"性温,无任何刺激性,对杀死病毒等微生物效果可靠,有明显的祛腐生肌"抗炎作用! 二者联用提高了机体的免疫功能,也就增加了机体的正气,使得 AQC 病毒之浊气不能进入任督之脉,将其控制在气分,隔离在营分之中,阻断在血分之外,保护宫颈上皮不受侵犯! 黄腐酸还通过减少糜烂组织水肿,从多方位改善机体免疫保护功能,增加机体正能量,使宫颈所处的阴道环境不适合 AQC 病毒复制,进而使宫颈糜烂患者 AQC 转阴! 本研究结果表明,薏苡败酱汤联合黄腐酸治疗 AQC 阳性宫颈糜烂患者,不仅有利于病情更好恢复,而且可促 AQC(下转第! %1/页)

染! 在内毒素的作用下释放血管活性物质,导致血管通透性增加,引起肺部的感染等原因!

G*+a 又称为新生儿肺透明膜病,与 ?*+a 的临床表现非常相似,但是病因与发病机制却不尽相同,该疾病是指新生儿出生不久后由于缺乏 Qa 导致肺泡进行性萎缩,导致患儿出现进行性呼吸困难和呼吸衰竭"呻吟"发绀等症状^[8],该病发病急,除原发病如外伤"感染"中毒等相应症状和体征外,还伴有不同程度呼吸困难"三凹"鼻扇等,并伴有烦躁"焦虑表情"出汗等! 由于新生儿体质的特殊性加上疾病的严重性很容易造成新生儿的死亡,而且在临床患者胎龄越小,发病率越高,病死率也越高! 对现代新生儿的生存质量造成了极大地威胁,急需寻求有效的治疗手段治疗该疾病!

G*+a 是由于肺内缺乏肺泡活性物质所致,在疾病早期可补充 Qa 进行干预! Qa 是肺泡"型细胞分泌的一种脂蛋白,其主要成分为二棕榈酰卵磷脂(+QQ-)和表面活性物质结合蛋白(aQ),前者约占' \$O 以上,后者约占! \$O! Qa 分布于肺泡液体分子层表面,具有降低肺泡表面张力的作用,能维持大小肺泡容量的相对稳定,阻止肺泡毛细血管中液体向肺泡内滤出,具有增加肺的顺应性,降低肺泡表面张力,维持大小肺泡容积的相对稳定性,防治肺水肿"肺不张的作用! 它的主要成分是二棕榈酰卵磷脂,以单层分子形式垂直排列于肺泡液 > 气界面,如果肺泡表面活性物质缺乏,会造成肺泡的表面张力增加,大肺泡的破裂以及' 型肺泡的萎缩,同时亦会造成 ?*+a!

本研究采用常规治疗以及机械通气的基础上通过气管注入固尔舒作为 Qa 的替用品治疗,取得了一定的成效,观察组

呼吸机参数最高 b?Q 以及高浓度氧持续时间均低于对照组,观察组呼吸机有效指数高于对照组,但是氧合指数以及呼吸指数低于对照组,观察组的住院时间以及机械通气时间短于对照组! 观察组并发症病死率低于对照组,观察组患者满意度优于对照组!

综上所述,Qa 对 G*+a 氧合功能具有重要的影响,在治疗 G*+a 早期阶段,观测患儿的血氧饱和度"氧合功能,分析患儿的疾病进展和病情的严重程度,及早应用 Qa,可以有效地改善肺氧合功能,极大地缩短机械通气时间和用氧时间,降低疾病的并发症和病死率,增加患者的满意度! 同时也有利于提高医疗服务水平和服务质量,值得在临床上推广应用!

[参 考 文 献]

- [!] 常明,卢红艳# 肺泡表面活性物质对新生儿急性呼吸窘迫综合征氧合功能的影响 [I]# 临床儿科杂志,"\$!&,&! (/):2\$/ >2!!
- ["] 唐军,熊英,郭文俊,等# 肺泡表面活性物质对足月新生儿急性呼吸窘迫综合征的疗效观察 [I]# 中国妇幼保健,"\$\$2,"& ("1):&1!' >&1!(
- [&] 王宝宏,贾秀红,马莲美# 晚期应用肺表面活性物质治疗对呼吸窘迫综合征新生儿呼吸功能的影响 [I]# 实用儿科临床杂志,"\$\$2,"&(!') :!' '\$ >!' ""
- [1] 尚德永# 血清 <, *' b >!"Q-, 和 -*Q 在脓毒症肺损伤(?KL: ?*+a) 患者中的动态变化及中西医结合治疗的双盲随机对照研究 [+]# 大连: 大连医科大学,"\$!&
- [%] A9^ hP^DX aVXJ<ZVD# 产前肾上腺皮质激素和产后肺泡表面活性物质治疗新生儿呼吸窘迫综合征的对比性研究 [+]# 郑州: 郑州大学,"\$\$(<

[收稿日期] "\$!1 >\$ (>!)\$

(来源: 现代中西医结合杂志, 2015, 14: 1543-1544+1549)

黄腐酸抗氧化作用机制研究进展

宋游行 李宝才 张惠芬[△] 何 静 (昆明理工大学生命科学与技术学院,云南 昆明 9' *' **)

#关键词\$ 黄腐酸;抗氧化;自由基

#中图分类号\$! " #文献标识码\$ ' #文章编号\$ ()\$ *+)" (")& () **\$, " *); - . /: ()%, +&+ 01%/223% ()\$ *+)" "%") (&%)% ()&

研究表明,人体内的氧化损伤与多种疾病如肿瘤^①心脑血管疾病^②机体衰老等的发生密切相关^③。人体内自由基主要包括氧自由基(·O₂·),过氧化脂质(LPO)和脂类自由基,其对机体造成的损伤是体内氧化作用的结果,对生物大分子和膜结构均有不同方式的损伤作用。向系统内补充抗氧化剂,清除过多的自由基或终止体内自由基反应,可防止线粒体肿胀,抑制膜的脂质过氧化反应^④蛋白质交联等作用,对于保护生物膜结构

与功能完整性,抑制自由基诱发的疾病或增强体质和治疗疾病都是有意义的。因此,研究开发新型高效“绿色环保的天然抗氧化剂刻不容缓”。黄腐酸(HA)是自然界广泛存在的一类从泥炭“褐煤”风化煤等提取的活性产物,氧化程度高,含羧基“羟基”“酚羟基”“醌基”等多种活性官能团,极易被人体吸收利用,是医疗效果最好的腐植酸。早在几千年前,李时珍在《本草纲目》中已有类似腐植酸药用的记载,主要用以治疗鼻子出血“妇女气血痛及诸疮毒”“金疮出血等疾病”。近年来,部分研究报道了HA及其钠盐在消炎“抗病毒”“抗氧化”“抗癌”“抗溃疡”等方面的显著疗效,且其抗氧化作用可能是发挥相关重要的生理功效的药理基础^⑤。因此,对HA抗氧化作用机制的研究今后可能将成为其基础研究的重点之一。目前,对不同产地HA抗氧化作

基金项目:国家自然科学基金资助项目(899*)

△ 昆明理工大学云南省食品安全研究院

第一作者:宋游行(男),在读硕士,主要从事腐植酸医药应用研究。

用的研究以证明其具备抗氧化性为多,也有一些研究涉及分析其结构与抗氧化性的关系,但对“\”抗氧化作用实现的途径及其作用机制的研究报道较少^[10]。本文结合体内主要氧化产物自由基的产生途径,从抑制体内氧化物产生与清除已有氧化物的角度,综述近年来国内外有关“\”抗氧化作用机制的研究工作,为“\”抗氧化作用机制的研究提供一定思路。

(自由基的产生

自由基,化学上也称(游离基”,是指化合物的分子在光热等外界条件下,共价键发生均裂而形成的具有不成对电子的原子或基团。正常机体的氧化损伤和抗氧化体系处于动态平衡,机体正常代谢产生的活性氧自由基能不断地被抗氧化体系清除,以维持细胞氧化和还原稳态。而人体可能由于受到外界刺激,使机体产生应激反应,也可产生自由基,打破动态平衡,损害机体的组织和细胞,进而引起慢性疾病及衰老效应^[11]。据国内外相关报道,人体可产生各种各样的活性自由基。自由基是人体脂质过氧化和损伤的直接凶手,其中衰老“肿瘤产生”心脑血管疾病等^[9]多种疾病与自由基产生密切相关。

具体而言,人体内自由基的产生有内源性和外源性两种途径。例如化学诱导“环境污染”吸烟“微波震荡等外界因素都会使人体内产生外源性自由基^[9]。而内源性自由基的产生则不然,主要源于机体自身代谢和酶促反应,例如线粒体中电子传导系统“线粒体肿胀”线粒体脂质过氧化过程等引起。人体在呼吸代谢中需要能量,而适量的自由基则不断传递着能量,保持呼吸代谢正常运转。

“ a’ 的抗氧化作用机制研究

“\”可能通过不同途径抑制或清除氧化损伤机体的自由基,从而发挥其抗氧化作用,但目前对“\”抗氧化作用实现的途径及其作用机制的研究报道较少。

“(\”化学结构决定其具有抗氧化作用。 “\”是一类从泥炭“褐煤”风化煤等提取的活性产物,氧化程度高,含羧基“羟基”酮基“醌基等多种活性官能团。 “\”中的氧[1h] =&h存在于官能团上,最重要的官能团是总酸性基团和醌基,这些基团决定了“\”的化学性质和生物活性。

“\”自身的多酚“醌基结构和芳香共轭体系对自由基具有清除作用。其在某些情况下是电子接受体,表现为氧化剂,而在有些情况下则是电子给予体,表现为还原剂,这证实了“\”本身就是一个氧化-还原体系,存在醌基-半醌-酚基的转换“硝基”酚羟基等的各种转换^[12]。在这种转换的过程中,MBD3 提出(自生电子传递中间体的假说。而这种氧化-还原体系在体内必然会参与到生理和能量代谢中。HOCI 等^[13]认为,“\”进入植物体主要作为氢的受体影响植物的氧化还原,促进植物体内糖的积累,特别是在缺少氧的条件下,可以促进“?”的积累合成,或者为多酚供应源,起呼吸催化剂的作用。IFK 等^[14]提出,“\”的芳香共轭体系,顺磁水平(自由基浓度) 与生理药理活性呈现正相关,并建议用自由基的浓度作为评价“\”生理药理活性的重要指标。可见,“\”的结构组成与其生理药理活性密切相关,可能是其抗氧化机制之一。

“\”对相关酶和激素活性的影响。有报道认为,“\”的生理作用实际就是激素的作用。动植物自身的体内激素有上百种之多,而“\”是由微生物的代谢产生,所以“\”中也有几十种激素,他们有的是和“\”以化学或者物理键结合,有的可能本来就是“\”组成中的一份子,不过是存在形式不一样而已。

也有部分报道认为,“\”是酶的激活剂或者抑制剂,大致包括以下几种: (&) 抑制透明质酸酶,与抗感染和减少炎症渗出有关; (/) 抑制红细胞中三磷酸腺苷酶,以调节基础代谢; () 抑制胆碱酯酶,与减缓疼痛相关; (0) 激活己糖激酶,促进糖氧化磷酸化和糖代谢; (‘) 激活凝血酶,或诱导纤维蛋白溶解酶原激活剂(A>”) 释放,这与凝血止血有关; (9) 活化植物体内的合成酶(主要为醛缩酶和转化酶), 促进可溶性碳水化合物积累,让细胞渗透压改变。此外,“\”还对过氧歧化酶“过氧化氢酶”脂合酶等都有活化或抑制作用^[15]。

“\”的金属离子络合作用。众所周知,自由基的另一重要来源是机体内过渡金属离子。绝大多数过渡金属离子都含有未配对的电子,它们可以催化机体产生自由基,对机体造成氧化损伤。而“\”对金属离子具有一定的络合作用,从而可以很大程度上抑制自由基产生。 “\”的羧基“酚羟基以及很多含-““6”M”等的基团都是电子给予体,所以是一类天然的络合剂或者螯合剂,较容易与金属离子配位。因至今很难分辨到底哪些是螯合,哪些是络合,故统称为络合反应。

王将等^[16]利用电子自旋共振(EPR) 波谱技术,分析铁离子影响下杏仁皮中黄酮类化合物抗自由基的效应。结果证明:杏仁皮中黄酮类化合物对铁影响下自由基诱发的红细胞膜过氧化有一定保护作用。分析其机制,一是杏仁皮中黄酮类化合物对铁的络合作用,减弱了铁的活性而抑制自由基的过渡产生;二是对膜脂质过氧化启动因子! -_ 的高效清除及对次级产生的脂自由基的清除,从而抑制脂质过氧化链的启动与增长。而李宝才等^[17]则认为茶褐素和黄腐酸具有相似的结构和官能团,由此生理药理活性相近。^H7 等^[18]研究茶多酚对铁诱导的突触小体脂质过氧化的保护作用,结果表明,茶多酚的抗氧化作用不仅与其清除自由基有关,而且也与其络合铁离子的能力密切相关。有学者的实验证明,茶黄素是通过与铜离子及铁离子的络合而降低细胞中低密度脂蛋白(LDL) 的氧化程度,并抑制体内\FKA7K 反应,从而起到抑制活性氧自由基产生的作用。

“\”的络合能力很强,虽然不知道具体的络合形式和配位数,但其对自由基产生和消除有影响是毋庸置疑的。据报道,‘光电子能谱(EPR, M) 可以鉴别元素的种类和化合价态”测定元素相对含量,了解中心原子与配位原子的相互作用,可能是研究电荷转移络合物最有利的手段之一。如有学者^[19]利用‘, M 研究发现,“\”>H 的 -&M 结合能比“\”>高,对自由基的抑制程度可能就会更高。

“\”抑制脂质过氧化反应。脂质过氧化是一种自由基链式反应,可反复进行,并伴随有大量中间产物产生(如: -_“_-/_#+-_- 等自由基和过氧化物); 损害细胞膜结构和功能,同时其中间产物及终产物丙二醛(CVD) 对细胞也具毒性。脂质过氧化过程中发生: -M 氧化生物膜的过程,即: -M 与生物

膜的磷脂酶和膜受体相关的多不饱和脂肪酸的侧链及核酸等大分子物质起脂质过氧化反应形成#，-，如cV"和0-羟基壬烯酸(_6f)，从而使细胞膜的流动性和通透性发生改变，最终导致细胞结构和功能的改变#& %

机体内的自由基可以攻击生物膜中的不饱和脂肪酸，并引发脂质自由基过氧化链式反应% \ " 可与脂质链式的中间产物脂氧自由基反应，从而终止链反应，抑制脂质过氧化% 曾述之#9% 研究表明，北京风化煤黄腐酸钠对体内不饱和脂肪酸氧化抑制率达到 =/5 (h，对应激红细胞过氧化(生成cV") 抑制率 =/50h，对! - _ 诱导溶血 " ' 0* 抑制率 ()5/h，对红细胞释放抑制率和红细胞膜胆碱酯酶("%Ef) 的灭活抑制率均增加了 & 倍左右% 王伟等#& % 研究发现，大骨节病(b! V) 病人体内存在脂质过氧化和谷胱甘肽过氧化物酶(^M_> J) 活力降低，由此， \ " 的自由基清除机制在保护生物膜成分和组织损伤的临床应用中得到初步证实%

"%\$ \ " 激活机体抗氧化体系 机体自身的抗氧化体系分为酶抗氧化系统和非酶抗氧化系统% 体内的抗氧化酶系统主要有超氧化物歧化酶(M-V) #^M_> J 以及过氧化氢酶(a"?) #细胞色素氧化酶(aa-) 等，这些酶可以抵抗自由基，防止衰老，保护生物体免疫损伤，因此也称为防御酶#& % 非酶系统则包括维生素 " " 维生素 f" 维生素 a 等%

\IIOOFl 等#& % 的研究报道， \ " 的施加可以影响植物的氧化过程，促进氧的吸收，提高生理代谢能力和酶的活力%: FVH> %7UH 等#& % 认为， \ " 螯合金属离子影响植物细胞膜通透性和膜上载体的性质，增加 " ?，酶的活性% 正是由于 \ " 的综合刺激活性，才促使植物各种酶# 包括多酚氧化酶(\ -V) # 蛋白分解酶" 过氧化氢酶(a" V) # 过氧化酶(， -V) 等\$的合成及生理活性增强% " KXBO 等#& % 的研究表明， \ " 具有激活细胞保护酶活性，延缓衰老的作用% 回振龙等#& % 也报道称， \ " 可以同时提高 M-V" a" V 和， -V 等酶的活性，清除活性自由基，激发作物生命活性%

在农业上，植物体中加入 \ " 之后也可以增加维生素 a 的含量，使 \ " 对自由基的清除进一步加强，而 \ " 本身可能也含有一些维生素类物质可以起到作用%

研究前景展望

近年来，茶多酚" 蜂胶" 壳聚糖" 橙皮素等许多天然抗氧化物质均得到了较好的应用，如国外天然蜂胶的生产工艺已比较成熟# %，橙皮素在欧洲被广泛作为一种具有食品补充剂使用# % 但抗氧化活性物质的研究及运用总体上还处在初级阶段，这也意味着对它们的研究有着广阔的前景，具有很大的潜力# % 据相关资料证实，在人们经常食用的产品中，天然抗氧化剂的毒性远远低于人工合成抗氧化剂，因此，从自然界中寻找天然抗氧化剂已引起越来越多科学家的高度重视% \ " 具有高效的天然抗氧化活性成分，如果能对其抗氧化作用进行深入研究与开发，或许可以产生丰富的商业价值和社会价值%

而 \ " 相关生物活性基础研究工作的难点和重点依旧是其自身的结构和稳定性问题% 大量的研究数据表明，不同产地来源，甚至同一产地不同分级成分 \ " 的生物活性作用都可能大

不相同，正如 MFKF 等#& % 所说 % 应当先研究简单的确定了了的腐植酸的化学结构和医疗效果，再推进更艰难的天然腐植酸研究" ! 作为食品添加" 医药实验或者临床试验的 \ " 产品，必须在严格实验的基础上，以原料产地固定产品来源，固定生产工艺，并对产品质量严格控制% 只有稳定的物质结构基础和稳定性，才能使 \ " 的生物活性基础研究更加明朗%

就目前而言，不同产地 \ " 抗氧化作用的研究以证明其具备抗氧化作用为多，但对其抗氧化作用实现的途径及其作用机制的研究报道相对较少% 笔者认为，首先，在 \ " 影响酶产生及活性方面，已知生物体中存在多达 & * 种以上的氧化酶，而 \ " 中也有多种类别的酶，但对两者之间相互关系的研究不多，需多开展这方面的相关工作% 其次，在提高机体抗氧化系统功能性方面，有关 \ " 增强机体抗氧化酶活性的研究较少，对不同性质及结构的 \ " 对不同的抗氧化酶活性影响的规律尚缺乏认识% 再次， \ " 的抗氧化性与其组分" 结构或聚合度都有密切关系，目前这方面的研究尚需要进一步探究% 最后，和已研究成熟的天然抗氧化剂相比较，在分子水平层面，应对 \ " 是否可以提高抗氧化酶 O > 6" 转录水平的表达量，对抗氧化酶基因表达是否可以呈现相关的调节作用来研究；而在细胞水平层面，则应该建立可行的细胞损伤模型和动物损伤模型对其进行深入的探讨；同时，还应加强对 \ " 发挥抗氧化作用的内源性分子靶点的研究，以找到问题的本质# % 上述方面必将成为今后黄腐酸抗氧化作用机制研究的重要发展方向%

Y 参考文献

- (a7OBY7 , ! HMI@BAH \ , . FKCOHOF c , # \$ % & ' () * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¨ ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿ À Á Â Ã Ä Å Æ Ç È É Ê Ë Ì Í Î Ï Ñ Ò Ó Ô Õ Ö × Ø Ù Ú Û Ü Ý Þ ß à á â ã ä å æ ç è é ê ë ì í î ï ð ñ ò ó ô õ ö ÷ ø ù ú û ü ý þ ÿ) * + , - . / : ; < = > ? @ A B C D E F G H I

研究#; \$中国粮油学报, /*&*; /' (&) : (1>1&5
 (" 李宝才, 龚加顺, 张惠芬, 等 5 腐植酸与普洱茶茶色素#; \$腐植酸,
 /**(; (&) : &=>95
 (, ^H7 +, <EH7 !, #1 c, # \$ %&&MABCIF@ 7K P07AF%AIUF OF%EHKI@O@ 7G 67B0
 %7OP7KFK@ 7G 20FFK AFH P7LDPEFK7@ H2HIK@ LIPIK PF07JICHAI7K IK @DKHP>
 A7@7OF#; \$! 17%EFO ! 17PED@ "%MH, &==9; &) *0() : /&* >/5
 (Y 袁欢欣, 欧阳健明 5 ' 射线光电子能谱在配合物研究中的应用及其
 研究进展#; \$光谱学与光谱分析, /**(; /((/) :)=' >5
 (\$ 陈文华, 赵凤达, 沈丽娟, 等 5 姜黄醇提取液对冰乙酸损伤性溃疡
 性结肠炎大鼠结肠黏膜保护作用及机制研究#; \$中国中医急症,
 /*&&; /*(&*) : &9&&>5
 (& 曾述之 5 福尔酸钠对羧自由基应激不饱和脂肪酸及人红细胞的影响
 #; \$腐植酸, &==0; () :)>95
 (V 王 伟, 陈静宏, 于伯泉, 等 5 自由基氧化损伤与大骨节病的相关
 性研究#; \$中国地方病学杂志, /*&&;)*(/ =) : &* >5
 (# : FYH%7UH . , ! HLCQIHK , , _0@FL7UH _ , # \$ %&&NKGLBFK%F 7G OIKF0HL HKC 70>
 2HK1% GF0AILHAI7K7K @7IL GBK2I, FKYDOF H%AIUIAIF@ HKC EBO1% @BW@HK%F@ IK
 HL7K2>AF00 G1FLC FJPF0IOFK#; \$ \7LIH C1%Q7WI7L(, QHEH) , /**(; ' / (0) :
 O&' >/&5
 (+ \QIOOFL _ , aE01@OHK : \5 _BO1% @BW@HK%F@ HKC AEF1Q 07LF IK AEF FK>
 UI07KOFK# C \$6FST703; ; 7EK Z1LFD M7K@, &=11: (' >15
 ") " KXBO M" , ZHK2 #, \H077R C, # \$ %&&BLUI% H%IC HPPLI%HAI7K IOP07UF@

AEF OHYF F0G70OHK%F BCKF0 SFLL SHAF0FC HKC C07B2EA %7KCIH7K@#; \$;
 " 207K7OD a07P M%I, /*&&; &=(0*=>&(5
 "(回振龙, 李自龙, 刘文瑜, 等 5 黄腐酸浸种对, F^ 模拟干旱胁迫下
 紫花苜蓿种子萌发及幼苗生长的影响#; \$西北植物学报, /*&);)
 (1) : &9/&>5
 "" ^HOCHKH a, ! HQWIF0I " , MIE7KFAI , , # \$ %&& ! 17A0HK@G70OHAI7K @QHAF2D A7
 QFCB%F HLLF02FK@ IK P07P7LI@#; \$ " PPL fKUI07K C1%Q7WI7L, /*&/; (1
 (&) : 09' 0>15
 ", MHAIK@3D V, ; HF2F07UH b, _HULI37UH #, # \$ %&& " KFS HKC GH@ _ , #a OFAE>
 7C 670 CFAFOIKHAI7K 7G 0BAIK, A07JF0BAIK, C17@OIK HKC EF@PFQICIK IK 677C
 @BPPLFOFK@ B@IK2 GB@FC%70F %7LBOK AF%EK7L72D#; \$ \77C " KHLDM%HL
 CFAE7C@, /*&); 9(') : &)' >9*5
 "Y 鲁晓翔 5 黄酮类化合物抗氧化作用机制研究进展#; \$食品研究与
 开发, /*&/;)(() : / /* >05
 "\$ MFKF@ 6, C1HK7 ?C5 _BO1% MBW@HK%F@ IK AEF 2L7WHL FKUI07KOFKA HKC
 IOPLI%HAI7K 7K EBOHK EFHLAE# C \$ 6FS T703: fl@FUIF0 , QF@, &==0:
 &/0' >5
 "& 赵海田, 王振宇, 程翠林, 等 5 松多酚类活性物质抗氧化构效关系
 与作用机制研究进展#; \$食品工业科技, , /*&/;)((/) : 0' 1>9&5
 # /*&' >&* &*& 修回 \$
 (编辑 曲 莉)

(来源: 中国老年学杂志, 2016, 10: 2532-2535)

黄腐酸钠对大鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应的影响

刘驰¹, 郑自龙¹, 周舰¹, 陈美心¹, 吴建华² (1. 湖北省大冶市人民医院神经内科, 湖北 大冶 435100; 2. 武汉大学中南医院药剂科, 武汉 430071)

摘要: 目的 观察黄腐酸钠对大鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应的影响。方法 SD大鼠随机分为假手术组、模型组、黄腐酸钠 50、100、150 mg 组。黄腐酸钠术前灌胃 3 d, 2 次·d⁻¹。线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 缺血 1.5 h 再灌注 24 h。术后对大鼠神经功能进行评分; TTC 染色观察脑梗死体积; 干湿重法测定脑含水量; 分光光度法测定髓过氧化物酶 (MPO) 活性; 伊文思兰 (EB) 法测定血脑屏障的损伤程度; ELISA 法检测 TNF- α 和 IL-1 β 的含量; Western blot 法检测核抽提物中 NF- κ Bp65 蛋白的表达。结果 3 个剂量的黄腐酸钠均能明显改善大鼠脑缺血再灌注损伤的神经缺陷症状, 缩小脑梗死体积。与黄腐酸钠 50 mg 治疗组相比, 黄腐酸钠 100 mg 治疗组更能改善大鼠神经缺陷评分和缩小脑梗死体积, 2 组之间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但黄腐酸钠 100 mg 治疗组与黄腐酸钠 150 mg 治疗组之间差异无统计学意义。黄腐酸钠 100 mg 能明显降低缺血侧脑组织的含水量、EB 含量及 MPO 活性; 显著抑制 TNF- α 和 IL-1 β 的表达并减少脑组织核抽提物中 NF- κ Bp65 的蛋白量 ($P < 0.05$)。结论 黄腐酸钠能明显改善血脑屏障通透性、减轻脑水肿, 减轻白细胞的浸润, 降低缺血区脑组织中 IL-1 β 与 TNF- α 的含量以及抑制 NF- κ Bp65 的活化, 减轻脑缺血再灌注损伤的炎症反应, 黄腐酸钠对脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

关键词: 黄腐酸钠; 脑缺血再灌注损伤; 炎症反应; 大鼠

中图分类号: R452

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2016)02-0145-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2016.02.009

Effect of sodium fulvate on inflammatory reaction after cerebral ischemia reperfusion injury in rats

LIU Chi¹, ZHENG Zi-long¹, ZHOU Jian¹, CHEN Mei-xin¹, WU Jian-hua² (1. Department of Neurology, People's Hospital, Daye Hubei 435100; 2. Department of Pharmacy, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071)

Abstract: Objective To determine the effect of sodium fulvate on inflammatory reaction after cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into 5 groups: a sham-operated group, a control group, sodium fulvate 50, 100 and 150 mg groups. Sodium fulvate was administered twice daily intragastrically injection for 3 days before the operation. Focal cerebral ischemia/reperfusion model in rats was made by transient occlusion of the middle cerebral artery for 90 min followed by 24 h reperfusion. The neurological function was scored and the infarct volume was measured after the operation. Brain edema was measured with dry-wet weight. Myeloperoxidase activity was determined by spectrophotometer. The permeability of the blood brain barrier was evaluated by measurement of the Evans Blue content in the brain with spectrophotometer. The brain content of TNF- α and IL-1 β were evaluated with ELISA method. The content of NF- κ Bp65 protein in the nuclear extracts was detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, sodium fulvate (50, 100 and 150 mg) could improved the neurological function and decreased the infarct size. Compared with the 50 mg sodium fulvate group, the 100 mg sodium fulvate group better improved the neurological function and decreased the infarct size ($P < 0.05$). However, there was no significant difference between the 100 mg sodium fulvate group and the 150 mg sodium fulvate group in the neurological function and infarct size. Sodium fulvate (100 mg) reduced the permeability of blood brain barrier and brain water content, inhibited the myeloperoxidase activity, and decreased the content of TNF- α and IL-1 β in brain tissue and the content of NF- κ Bp65 protein in the nuclear extracts significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Sodium fulvate can obviously

improve the blood brain barrier permeability, reduce brain edema and the infiltration of leukocytes, reduce ischemic brain tissue TNF- α and IL-1 β of the content and inhibit the activation of NF- κ Bp65, could protect cerebral ischemia reperfusion injury and the inflammatory response. Sodium fulvate has protective effects against cerebral ischemia reperfusion injury in rats.

Key words: sodium fulvate; cerebral ischemia/reperfusion injury; inflammation reaction rat

缺血性脑血管病 (ischemic cerebral vascular disease, ICVD) 是临床常见病及多发病, 是人类致死和致残的主要原因之一。缺血会导致脑组织的结构破坏和功能障碍, 长时间的完全缺血或严重缺血可引起不可逆的神经细胞凋亡和坏死。因此, 及时恢复血液再灌注有利于减轻脑缺血损伤, 但在某些情况下, 再灌注不但不能减轻缺血所引起的脑组织损伤, 反而会导致更严重的脑缺血再灌注损伤^[1]。

脑缺血再灌注后, 缺血再灌注区常伴有各种炎症介质的产生, 脑微血管内皮功能障碍, 白细胞黏附活化, 并出现以白细胞浸润、大量炎症介质释放、脑水肿为特征的急性炎症的发生^[2]。因此, 抑制炎症反应可以明显减轻脑缺血再灌注损伤。而在炎症反应中, TNF- α 、IL-1 β 是主要的促炎因子。NF- κ B 是炎症反应的重要信号转导分子, 在脑缺血再灌注损伤的炎症反应中起中心环节作用^[3-4], 抑制 NF- κ B 的活性, 降低促炎因子的表达, 可以减轻脑缺血再灌注损伤。

黄腐酸钠是从《本草纲目》金石部所载“乌金石”中提取的有效成分, 由各种天然结构单元和天然大分子随机聚合而成的有机大分子化合物, 具有活血化瘀及细胞保护作用。目前研究发现黄腐酸钠能提高多种组织器官的微循环功能, 并具有较强的抗炎作用^[5-10]。本文旨在利用大鼠脑缺血再灌注损伤模型, 研究黄腐酸钠对脑缺血再灌注中炎症反应的影响, 探讨黄腐酸钠对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制。

1 材料

1.1 试剂

氯化三苯基四氮唑 (TTC, 美国 Sigma 公司); 髓过氧化物酶 (MPO) 试剂盒 (南京建成生物公司); TNF- α 、IL-1 β ELISA 试剂盒及 DAB 显色试剂盒 (武汉博士德公司); NF- κ Bp65 单克隆抗体及 β -tubulin 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 黄腐酸钠 (云南韵雅生物科技有限公司, 批号: Z53021606, 有效物质含量 99.5%)。

1.2 实验动物

雄性 SD 大鼠, 体重 (270 \pm 20) g, 清洁级 (武汉大学实验动物学部, 许可证号: No. 4200500039)。

2 方法

2.1 分组及给药

185 只 SD 雄性大鼠, 根据预实验随机分成 5 组: 假手术组 (55 只)、脑缺血再灌注损伤组 (55 只)、黄腐酸钠低剂量治疗组 (50 mg \cdot kg⁻¹, 10 只)、黄腐酸钠中剂量治疗组 (100 mg \cdot kg⁻¹, 55 只)、黄腐酸钠高剂量治疗组 (150 mg \cdot kg⁻¹, 10 只)。黄腐酸钠治疗组术前 3 d 灌胃给予不同剂量黄腐酸钠。

2.2 局灶性脑缺血再灌注模型制作

根据 Longa 法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型^[11]。大鼠 10% 的水合氯醛腹腔麻醉 (0.3 mL/100 g) 后, 75% 的酒精消毒后在颈正中行约 1.5 cm 手术切口, 暴露右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 及颈内动脉 (ICA), 结扎 ECA 远心端及其分支, 结扎 ICA 的颅外分支翼腭动脉 (PPA) 防止线栓误入其内。在 ECA 近心端备线, 于 CCA 近心端、ICA 远心端分置动脉夹夹闭, 于 ECA 近分叉处用眼科剪开一约 0.2 mm 的 V 形切口, 并将线栓膨大端经 ECA 插入 ICA, 然后松开夹闭 ICA 的动脉夹, 继续插入线栓直至深度由分叉口计算约 (18.5 \pm 0.5) mm 且感到有轻微阻力时。栓塞 1.5 h 后, 将尼龙线缓慢分阶段拔出实现再灌注。实验过程中保持室内温度 25 $^{\circ}$ C, 直肠温度维持在 37 $^{\circ}$ C, 缝合皮肤, 麻醉苏醒后的大鼠放回鼠笼, 单笼饲养, 供给充足的饲料和水。如发生呼吸困难, 出血量过多者不用于实验对象。假手术组操作同上, 但尼龙线插入至大脑中动脉起始端后立即拔出。

2.3 神经缺陷评分

以经过修改后的 Bederson 评分法作为评分标准^[12], 总分为 8 分。术后 8、16、24 h 各进行 1 次神经缺陷评分, 24 h 内 3 次神经缺陷评分的平均值作为评价指标, 详见表 1。

表 1 修改后的评分法

Tab 1 Bederson score method after modification

项目 (item)	0 分 (0 point)	1 分 (1 point)	2 分 (2 points)
提尾悬空时, 缺血对侧前肢	无屈曲	腕屈	同时腕屈和肘屈
行走路径向缺血对侧	无偏移	适度偏移	严重偏移甚至原地旋转
刺激大鼠缺血对侧颊须	反应灵敏	反应不灵敏	没有反应
大鼠身体向缺血对侧扭转现象	无扭转	偶尔扭转	频繁扭转

2.4 脑梗死体积测定

大鼠脑缺血 1.5 h 再灌注 24 h 后, 立即颈椎脱臼处死, 于冰盘上剪开颅骨, 迅速取出大脑置于冰生理盐水中洗去血细胞, 去除嗅球、小脑和低位脑干, 脑组织冰冻约 15 min, 待其略变硬后, 取冠状面按解剖位置均匀切成约 3 mm 厚的脑片, 迅速将脑片放入 2% 的氯化三苯基四氮唑 (TTC) 溶液内, 37℃ 水浴避光染色 30 min, 然后用 10% 的福尔马林溶液固定 24 h, 拍照后用图象处理软件 (Adobe Photoshop 9.0) 描绘出每一层面 TTC 染色后呈白色的区域后, 再用 Image 图象面积处理软件求出每个脑片的梗死面积, 梗死面积 = 5 层脑片面积之和 × 层厚。

2.5 脑含水量测定

大鼠脑缺血 1.5 h 再灌注 24 h 后, 断头取脑, 分离缺血侧脑组织后迅速称重, 置烤箱烤干至恒重, 脑组织含水量按下式计算: 脑组织含水量 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

2.6 TNF- α 、IL-1 β 的测定

大鼠脑缺血 1.5 h 再灌注 24 h 后, 断头取脑。取缺血侧的脑组织, 称重, 按重量体积比为 1 : 10 加入生理盐水冰浴碾磨, 制成 10% 匀浆, 4℃, 3000 r · min⁻¹ 离心, 15 min 后, 取上清液, -20℃ 保存。测定前, 样品置于室温复融, 4℃ 离心后取上清液。TNF- α 、IL-1 β 的测定用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, EILSA)。

2.7 MPO 活性测定

大鼠脑缺血 1.5 h 再灌注 24 h 后, 断头取脑。分别切取缺血侧脑组织, 称重, 储存于 -70℃ 待测。利用试剂盒提供的匀浆介质, 将脑组织制成 5% 组织匀浆, 严格按照 MPO 试剂盒的要求操作。

2.8 血脑屏障通透性的测定

用伊文斯蓝 (EB) - 甲酰胺法测定血脑屏障通透性。大鼠脑缺血 1.5 h 再灌注 23 h 后经尾静脉注入 2%EB (2 mL · kg⁻¹), 1 h 后 10% 水合氯醛麻醉下心内灌注生理盐水 500 mL · kg⁻¹, 断头取脑, 称取缺血侧脑组织湿重后置于 4 mL 甲酰胺中。60℃ 孵育 24 h, 1000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 分光光度计 ($\lambda = 632$ nm) 测定上清液 OD 值。根据标准曲线计算出 EB 含量。

2.9 Western blot 法检测核抽提物 NF- κ Bp65 蛋白表达

用冰生理盐水漂洗手术侧脑组织, 除去血液后拭干。取 0.5 g 脑组织用于提取核蛋白。1 g 组织加入 5 mL 细胞裂解缓冲液, 用玻璃匀浆器进行匀浆, 4℃、3000 g 离心 10 min, 去上清液, 所得沉淀即为细胞核。将收集的细胞核加入 4 倍体积核蛋白提取液, 用玻璃匀浆器匀浆, 于冰上轻柔搅拌破坏核膜 30 min, 4℃、12 000 g 离心 30 min 后收集上清液 (核蛋白液)。用 Bradford protein assay 法测定蛋白含量, 取 20 μ g 蛋白经十二烷基硫酸钠 (SDS) - 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h,

一抗 4℃ 孵育过夜, PBST 漂洗 PVDF 膜 10 min × 3 次, 常温二抗孵育 1 h, PBST 漂洗 10 min × 3 次, 然后用 ECL 液滴加于 PVDF 膜上作用 1 min, 置于 X 光片盒中, 曝光 2 ~ 5 min, 显影、定影、水洗、晾干后。X 胶片置 Kodak 凝胶图像分析软件处理, 读取目的条带和内参照 β -tublin 的光密度值。采用 RI 值反映 NF- κ Bp65 指标在脑组织细胞核的相对表达强度, RI 值 = NF- κ Bp65 条带光密度值 / 内参照 β -tublin 的光密度值。

2.10 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。实验所得数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间差异比较用方差分析, 组间比较用 q 检验, 以 $P = 0.05$ 为检验标准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑缺血 / 再灌注大鼠神经缺陷评分及脑梗死体积的影响

大鼠脑缺血 1.5 h 再灌注 24 h 后, 模型组大鼠神经缺陷评分及脑梗死体积与假手术组相比明显增加 ($P < 0.01$), 表明造模成功。与模型组相比, 黄腐酸钠能明显改善大鼠神经缺陷评分, 缩小脑梗死体积 ($P < 0.05$)。与黄腐酸钠 50 mg 治疗组比较, 黄腐酸钠 100 mg 治疗组和 150 mg 治疗组更能改善大鼠神经缺陷评分和缩小脑梗死体积, 两者与 50 mg 组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但黄腐酸钠 100 mg 治疗组与黄腐酸钠 150 mg 治疗组之间差异无统计学意义。因此在探讨黄腐酸钠对脑缺血再灌注中炎症反应的影响时, 我们选用 100 mg 的黄腐酸钠作为干预治疗组 (见表 2)。

表 2 黄腐酸钠对脑缺血再灌注大鼠神经缺陷评分及脑梗死体积的影响 ($n = 10$)

Tab 2 Effect of sodium fulvate on nerve deficit score and cerebral infarction volume after cerebral ischemia reperfusion injury in rats ($n = 10$)

组别 (group)	神经缺陷评分 (nerve deficit score) / 分	梗死体积 (infarct size) / mm ³
假手术组	0.1 ± 0.2	—
模型组	5.6 ± 1.0**	238 ± 22**
50 mg 黄腐酸钠组	4.3 ± 1.1 [#]	197 ± 23 [#]
100 mg 黄腐酸钠组	3.1 ± 1.2 ^{#&}	176 ± 17 ^{#&}
150 mg 黄腐酸钠组	3.1 ± 0.9 ^{#&}	173 ± 20 ^{#&}

注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与黄腐酸钠 50 mg 组比较, [&] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$; compared with the 50 mg sodium fulvate group, [&] $P < 0.05$.

3.2 对白细胞浸润、脑含水量及血脑屏障通透性的影响

大鼠脑缺血 1.5 h 再灌注 24 h 后, 模型组缺血侧的脑组织 MPO 酶活性、含水量及 EB 含量均明显高于假手术组 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 黄腐酸钠组

缺血侧的脑组织 MPO 酶活性、脑组织含水量及 EB 含量均明显降低 ($P < 0.05$) (见表 3)。

表 3 黄腐酸钠对脑缺血再灌注大鼠 MPO 活性、脑含水量及 EB 含量的影响

Tab 3 Effect of sodium fulvate on MPO activity, brain water content and EB content after cerebral ischemia reperfusion injury in rats

组别 (group)	MPO 活性 (n = 8) (MPO activity) /U · g ⁻¹	含水量 (n = 8) (water content) /%	EB 含量 (n = 8) (EB content) /mg · g ⁻¹
假手术组	0.16 ± 0.02	77.8 ± 0.5	4.3 ± 0.6
模型组	0.38 ± 0.07**	82.2 ± 0.8**	8.8 ± 0.7**
100 mg 黄腐酸钠组	0.23 ± 0.06 [#]	79.2 ± 0.6 [#]	6.1 ± 0.7 [#]

注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$.

3.3 对 TNF- α 和 IL-1 β 含量的影响

假手术组大鼠脑组织中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量较低; 与假手术组比较, 模型组大鼠缺血侧的脑组织中 TNF- α 和 IL-1 β 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 黄腐酸钠 100 mg 组 TNF- α 和 IL-1 β 的含量显著减少 ($P < 0.05$) (见表 4)。

表 4 黄腐酸钠对脑缺血再灌注大鼠 TNF- α 及 IL-1 β 含量的影响 (n = 8)

Tab 4 Effect of sodium fulvate on TNF- α and IL-1 β after cerebral ischemia reperfusion injury in rats (n = 8)

组别 (group)	TNF- α 含量 (TNF- α content) /mg · mL ⁻¹	IL-1 β 含量 (IL-1 β content) /pg · mL ⁻¹
假手术组	1.2 ± 0.13	29 ± 3.3
模型组	2.1 ± 0.25**	58 ± 6.5**
黄腐酸钠 100 mg 组	1.6 ± 0.21 [#]	43 ± 5.8 [#]

注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$.

3.4 对核抽提物中 NF- κ Bp65 蛋白表达的影响

假手术组中核抽提物中 NF- κ Bp65 蛋白在脑组织表达较弱; 与假手术组比较, 模型组核抽提物中 NF- κ Bp65 蛋白表达明显增强 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄腐酸钠组核抽提物中 NF- κ Bp65 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$) (见图 1)。

4 讨论

临床上初次卒中的病例中大脑中动脉梗塞占很大比例, 大脑中动脉阻塞 (MCAO) 动物模型模拟的病理过程与临床卒中很相似, 故本实验采用线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 以此研究黄腐酸钠对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其可能机制。本实验结果表明黄腐酸钠可以明显缩小缺血再灌注后脑

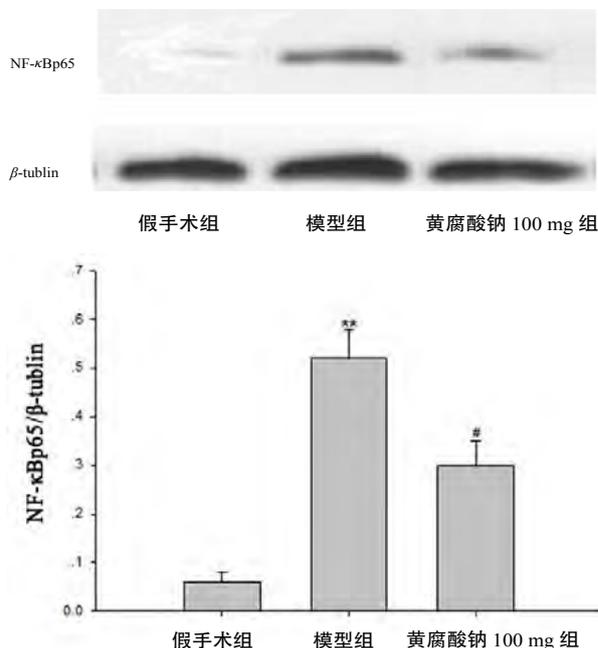


图 1 黄腐酸钠对核抽提物中 NF- κ Bp65 含量的影响 (n = 5)

Fig 1 Effect of sodium fulvate on the content of NF- κ Bp65 nuclear extracts (n = 5)

注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$.

梗死体积, 改善神经缺陷症状, 对脑缺血再灌注损伤有确实的保护作用。

动物实验及临床试验均证实炎症反应是脑缺血后组织持续损伤的重要原因之一, 尤其在脑缺血再灌注时更为显著^[13]。因此遏制炎症反应是减轻脑缺血再灌注损伤的一个重要策略。

血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 是存在于脑组织与血液之间的一个复杂的细胞系统。EB 是一种被广泛用来评价 BBB 的通透性的偶氮基荧光染料。本研究采用分光光度法, 检测渗入脑组织中的 EB 含量, 发现模型组 EB 含量明显升高, 提示脑缺血再灌注后 BBB 的通透性明显增加, BBB 破坏严重。脑缺血后 BBB 的破坏会导致血管源性脑水肿, 脑组织含水量也必然增加。脑组织含水量的测定至今仍是反映脑水肿的重要指标, 干湿重法因其简单易行而被广泛采用^[14]。本实验中模型组的脑组织含水量明显升高, 提示脑缺血再灌注后发生了严重的脑水肿。而用黄腐酸钠干预后, EB 含量及脑组织含水量明显降低。表明黄腐酸钠能明显改善血脑屏障通透性以及减轻脑水肿。

脑缺血时侵入的白细胞主要是中性粒细胞和单核细胞, 此 2 种细胞内均含有嗜天青颗粒, 内含多种酶, 其中 MPO 是 2 种细胞特有的酶。测定 MPO 活性便可以反映细胞的数量^[15]。本实验结果显示与假手术组相

比,模型组脑缺血再灌注 24 h 后, MPO 活性显著增加,表明缺血区有大量的白细胞浸润。应用黄腐酸钠治疗,能显著降低 MPO 活性,表明黄腐酸钠能明显减轻白细胞的浸润。

TNF- α 是众多细胞因子的重要启动因子,通过促进凝血、增加内皮细胞通透性及诱导黏附分子或其他炎性介质表达,增加 BBB 的通透性,而加重脑缺血再灌注损伤^[16]。IL-1 β 主要是由活化的神经胶质细胞和单核/巨噬细胞分泌,能够诱导其他炎性介质的产生,黏附分子的表达,增加白细胞浸润,诱导血管源性脑水肿的产生,促进 NOS 生成,使 NO 合成增加,诱导兴奋性氨基酸和自由基产生,启动多种细胞因子级联反应,通过多种途径损伤神经元^[17-18]。因此抑制 IL-1 β 和 TNF- α 的表达可以减轻炎症反应,对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用。本研究发现脑缺血再灌注 24 h 后可诱导 IL-1 β 和 TNF- α 大量表达,黄腐酸钠可显著降低缺血区脑组织中 IL-1 β 与 TNF- α 的含量,从而起到减轻炎症反应的作用。

NF- κ B 是炎症反应的重要信号转导分子,在脑缺血再灌注损伤的炎症反应中起中心环节作用^[19]。活化的 NF- κ B 可诱导促炎因子如 IL-1 β 和 TNF- α 的表达,从而进一步破坏血脑屏障,加重脑水肿,促进白细胞在缺血区黏附、聚集、浸润,从而加重脑缺血再灌注损伤。而在我们实验中发现黄腐酸钠组的核抽提物中 NF- κ B p65 蛋白的表达水平也明显降低。这表明黄腐酸钠可以抑制脑缺血再灌注损伤中 NF- κ B 的活化。但在脑缺血再灌注中黄腐酸钠如何抑制 NF- κ B 的活化机制仍需进一步探讨。

综上所述,黄腐酸钠对脑缺血再灌注损伤动物模型能明显改善 BBB 通透性、减轻脑水肿;减轻白细胞的浸润;降低缺血区脑组织中 IL-1 β 与 TNF- α 的含量以及抑制 NF- κ B 的活化,从而抑制炎症反应,对脑缺血再灌注损伤产生保护作用。本实验结果为临床治疗脑缺血再灌注损伤提供了一个新的思路,其确切的临床价值有待于进一步研究和证实。

参考文献

- [1] Burggraf D, Martens HK, Dichgans M, et al. Rt-PA causes adose-dependent increase in the extravasation of cellular and non-cellular blood elements after focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2007, 1164 (10) : 55-62.
- [2] Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells [J]. J Leukocyte Biol, 2010, 87 (5) : 779-789.
- [3] Nichols TC. NF- κ B and reperfusion injury [J]. Drug News & Perspectives, 2004, 17 (2) : 99-104.
- [4] Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, et al. Molecular

signaling pathways in ischemia/reperfusion [J]. Exp Clin Transplant, 2004, 2 (1) : 174-177.

- [5] 陈祥银, 严仪昭, 西品香, 等. 黄腐酸钠对角又菜胶致胸膜炎作用的实验研究 [J]. 生理科学, 1988, 8 (1) : 42-44.
- [6] 袁盛榕, 杨东旭, 罗慧英. 北京风化煤黄腐酸钠抗炎作用的研究 (II) [J]. 生理科学, 1989, 9 (1) : 46-47.
- [7] 吕景刚, 金京淑, 池龙郁, 等. 黄腐酸钠注射液和复方黄腐酸钠注射液抗炎作用的对比研究 [J]. 腐植酸, 1999, (1) : 20-23.
- [8] 杨光燃, 袁申元, 朱良湘, 等. 黄腐酸钠对 STZ-DM 大鼠周围神经病变的防治研究 [J]. 中国医药导报, 2000, 2 (5) : 34-36.
- [9] 杨光燃, 袁申元, 袁明霞, 等. 实验性糖尿病神经和微血管形态研究及黄腐酸钠早期干预 [J]. 微循环学杂志, 2000, 10 (2) : 3-5.
- [10] 马庆凯, 王虹. 黄腐酸钠灌肠治疗慢性非特异性结肠炎 180 例 [J]. 中国冶金工业医学杂志, 2002, 19 (5) : 285-286.
- [11] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1) : 84-91.
- [12] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986, 17 (3) : 472-476.
- [13] Lakhani SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches [J]. J Transl Med, 2009, 7 (1) : 97-107.
- [14] Liu SJ, Zhou SW, Xue CS. Effect of tetrandrine on neutrophilic recruitment response to brain ischemia/reperfusion [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22 (11) : 971-975.
- [15] Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, et al. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (47) : 18584-18589.
- [16] Candelario-Jalil E, Taheri S, Yang Y, et al. Cyclooxygenase inhibition limits blood-brain barrier disruption following intracerebral injection of tumor necrosis factor-alpha in the rat [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 323 (2) : 488-498.
- [17] Hailer NP, Vogt C, Korf HW, et al. Interleukin-1beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures [J]. Eur J Neurosci, 2005, 21 (9) : 2347-2360.
- [18] Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1beta and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema [J]. J Neurosurg, 2000, 92 (1) : 108-120.
- [19] Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, et al. Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats [J]. Stroke, 1997, 28 (5) : 1073-1081.

(收稿日期: 2015-07-17; 修回日期: 2015-09-28)

(来源: 中南药学, 2016, 2: 145-149)

载银黄腐酸抗菌剂的合成及抗菌性研究

张林, 朱宝伟, 杜国丰, 苑 蕾, 付晓伟, 李思群, 姚诗楠

(营口理工学院, 辽宁 营口 115000)

摘 要: 研究了载银黄腐酸抗菌剂的制备及其抗菌效果。通过在水溶液中黄腐酸与银离子之间的络合作用得到了载银黄腐酸抗菌剂。红外光谱分析表明黄腐酸与 Ag^+ 离子发生了络合反应。热重分析结果显示载银黄腐酸的热稳定性大大提高。将载银黄腐酸抗菌剂添加到聚乙烯醇中得到了抗菌塑料。抗菌实验表明加入载银黄腐酸抗菌剂的聚乙烯醇塑料对枯草杆菌和大肠杆菌均表现出良好的抗菌性能。

关 键 词: 载银黄腐酸; 抗菌性能; 热分解温度

中图分类号: TQ 201 文献标识码: A 文章编号: 1671-0460 (2017) 03-0446-03

DOI:10.13840/j.cnki.cn21-1457/tq.2017.03.018

Synthesis and Antibacterial Activity of Silver Supported Fulvic Acid Antibacterial Agent

ZHANG Lin, ZHU Bao-wei, DU Guo-feng, YUAN Lei, FU Xiao-wei, LI Si-qun, YAO Shi-nan
(Yingkou Institute of Technology, Liaoning Yingkou 115000, China)

Abstract: Preparation and antibacterial activity of silver-loaded fulvic acid antibacterial agent were studied. Silver-loaded fulvic acid antibacterial agent was prepared by the complexation between Ag^+ ions and fulvic acid in aqueous solution. IR characterization proved the formation of fulvic acid- Ag^+ complexes, and thermogravimetric analyses showed that the fulvic acid- Ag^+ complexes exhibited higher thermal decomposition temperature than fulvic acid. The fulvic acid- Ag^+ complexes were blended with polyvinyl alcohol to obtain antimicrobial plastics. Antibacterial experiments approved that PVA plastics had excellent bacteriostasis against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*.

Key words: Silver-loaded fulvic acid; Antibacterial properties; Thermal decomposition temperature

人类使用抗菌剂的历史由来已久,但直到 20 世纪,才出现人工合成抗菌剂^[1,2]。抗菌剂根据其成分不同可分为有机类、无机类和天然类等^[3]。无机抗菌剂是一种广谱抗菌剂,拥有广谱抗菌、耐久、耐水、耐酸碱、耐洗刷的优势,其中银离子以抗菌广谱、杀菌效率高、不易产生抗药性等优点使得载银抗菌剂成为抗菌材料发展的重要分支^[4,5]。

常见载银型无机抗菌剂主要分为以下几类^[6]:沸石抗菌剂、磷酸钛盐抗菌剂、膨润土抗菌剂、托勃莫来石抗菌剂、硅胶抗菌剂、 SiO_2 - Al_2O_3 凝胶微球抗菌剂等,这几种抗菌剂制备方法复杂,且对外部应用环境要求较高,所以应用受到一定限制。因此,找到一种更为合适的载体成为载银型抗菌剂发展史上的重要突破^[7]。

黄腐酸(Fulvic Acid, FA)又称富里酸,是腐植酸类物质中既能溶于稀碱溶液又能溶于酸和水的分子量较低部分,具有密集的多种活性官能团且分子结构比较特殊:大分子中存在芳香核,各种羟基和氨基基团,脂肪族基团,各种羰基基团,此外还可

能含有羰基的芳香结构、烯键、酰胺等^[8,9]。基于如此特殊的分子结构,黄腐酸可以简单快速的与银离子紧密络合,大大增加了抗菌剂中银离子的浓度进而提高抗菌效果。另外,黄腐酸作为光敏化剂,在吸收紫外光或者太阳光辐射后产生一系列的光活性物质而发生降解,降解过程亦是释放银离子的过程。因此,黄腐酸的自身降解使载银黄腐酸成为一种比较安全的绿色抗菌剂^[10]。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

FA(微波辅助法制备),硝酸银(分析纯 天津市瑞金特化学品公司),聚乙烯醇(聚合度 1750 国药集团化学试剂有限公司),去离子水;

傅里叶红外光谱仪(WQF-510A 北京北分瑞利有限公司),热重分析仪(Q500 Waters 公司),生化培养箱(SPX-25013-Z 上海博迅实业有限公司医疗设备厂),生物光学显微镜(N-117M 宁波永新光学股份有限公司),高压灭菌器(YXQ-LS-305 II 上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 抗菌剂及抗菌塑料制备工艺

将硝酸银与黄腐酸分别以 1:3, 1:5, 1:7 和 1:10 的摩尔比混合均匀后在 60 °C 条件下搅拌反应 3 h。反应结束后, 将得到的混合物进行离心分离 (5 000 r/min, 5 min), 然后取出离心管底部沉淀并将其进行冷冻干燥 24 h, 最后即可得到载银黄腐酸系列抗菌剂, 记作 FA-Ag(1:3, 1:5, 1:7, 1:10)。

利用抗菌色母粒法将上述制备出的抗菌剂与聚乙烯醇固体颗粒以 2% 的质量比通过双螺杆挤出机挤出造粒, 即得到聚乙烯醇抗菌塑料。

1.3 抗菌性能测试

根据 QB/T 2591-2003 进行抗菌性能测试。样品处理: 用消毒剂 (70% 乙醇溶液) 擦拭样品表面, 1 min 后用无菌水冲洗, 自然干燥; 将新鲜培养的菌株用生理盐水洗下, 制成菌液浓度为 $(5.0\sim 10.0) \times 10^5$ cfu/mL 的菌悬液; 分别取 0.2 mL 试验用的菌液加在阴性对照样品、空白对照样品和抗菌塑料样品上, 表面覆盖膜后, 置 (37 ± 1) °C 培养 24 h。取出培养 24 h 的样品分别加入生理盐水, 充分摇匀后, 适当稀释, 取一定量接种于营养琼脂培养基上, 在 (37 ± 1) °C 下培养 24~48 h 后活菌计数。

1.4 热分解温度测试

氮气气氛下, 称取质量为 5~10 mg 样品, 以 10 °C/min 的升温速率程序升温至 350 °C。

2 结果与讨论

2.1 FA-Ag 系列抗菌剂的红外谱图分析

黄腐酸与 AgNO_3 反应半个小时后, 原来呈棕色的溶液变为黑色, 因此表明黄腐酸分子与 Ag^+ 已经发生反应。

从图 1 可知 FA-Ag 系列抗菌剂在 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现一个较宽弱谱带, 在 $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现一个尖锐的强峰, 而文献^[11]中黄腐酸的特征峰为羧基的 $\nu_{\text{C=O}}$ ($1\ 720\ \text{cm}^{-1}$) 和 ν_{OH} ($2\ 000\sim 3\ 000\ \text{cm}^{-1}$), 出现这种变化的原因应该是黄腐酸分子与 Ag^+ 发生了反应。

据 Nakamoto 报道, 与金属配位的 C=O 伸缩振动谱带应在 $1\ 650\sim 1\ 620\ \text{cm}^{-1}$, 而以离子型结合的金属盐的谱带则在 $1\ 630\sim 1\ 575\ \text{cm}^{-1}$ 。Vinkerf 在研究黄腐酸与一些碱金属和碱土金属络合物的红外光谱后归纳出共价键合的 COO 伸缩振动在 $1\ 630\sim 1\ 615\ \text{cm}^{-1}$, 离子型结合 $1\ 600\sim 1\ 580\ \text{cm}^{-1}$, 而离子-共价的过渡则在 $1\ 615\sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 。另据回瑞华^[12]报道, 羧酸盐在 $1\ 650\sim 1\ 550\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现两个类似羧酸在 $1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ 左右的羰基吸收峰。

综合以上观点可以得出结论: FA-Ag 系列抗菌剂中出现的 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 谱带均为 $\nu_{\text{C=O}}$, $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 属于金属配位的 COO 伸缩振动谱带, 且黄腐酸分子与 Ag^+ 通过络合作用结合。

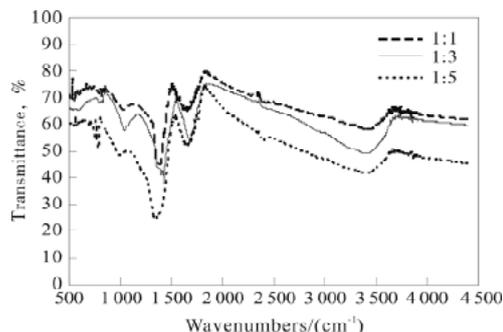


图 1 FA-Ag 系列抗菌剂的红外光谱图
Fig.1 Infrared spectrum of Silver-loaded fulvic acid antibacterial agents

2.2 FA-Ag 系列抗菌剂的热失重分析

从图 2 中可知: FA-Ag 系列抗菌剂热失重曲线与黄腐酸热失重曲线有明显的区别, 黄腐酸热失重速率远远高于 FA-Ag 抗菌剂的热失重速率, 这进一步说明黄腐酸与 Ag^+ 在本实验条件下发生了反应生成载银黄腐酸络合物。黄腐酸与 Ag^+ 通过络合作用提高了自身的稳定性, 因此当升温至相同温度如 300 °C 时, FA-Ag 系列抗菌剂失重百分比约为 10%~15% 远低于黄腐酸的约为 40%。

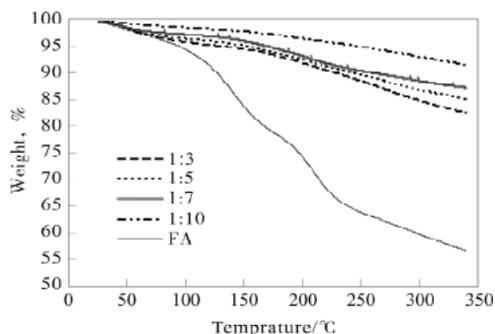


图 2 FA-Ag 系列抗菌剂热失重情况
Fig.2 Thermogravimetric analyse of Silver-loaded fulvic acid antibacterial agents

对于 FA-Ag 系列抗菌剂来说, 随着参加反应的 Ag^+ 含量的增加, 其热分解温度逐渐升高。当温度升高至 300 °C 时, FA-Ag (1:3) 抗菌剂失重质量为总质量 15.31%, 而 FA-Ag (1:10) 仅失重 7.03%。这是由于随着参加反应的 Ag^+ 含量的增加, 单个黄腐酸分子可以与更多个 Ag^+ 络合, 进而提高了抗菌剂的稳定性。

FA-Ag 系列抗菌剂在升温初期缓慢失重, 当温

度达到 150 °C 后开始快速失重,与黄腐酸分子热失重曲线对比可发现,在 150 °C 之前主要是黄腐酸分子自身发生分解,而 150 °C 之后则主要发生黄腐酸与 Ag⁺间的分离。

2.3 FA-Ag 系列抗菌剂的抗菌性能分析

依据 QB/T 2591-2003 对 2.3 制备的抗菌剂进行抗菌性能测试,其结果如表 1 所示。

表 1 FA-Ag 系列抗菌剂的抗菌率
Table 1 Antibacterial rate of Silver-loaded fulvic acid antibacterial agents %

菌种	大肠杆菌	枯草杆菌
FA	0	0
1 : 3	90.00	85.50
1 : 5	92.50	89.10
1 : 7	95.00	90.50
1 : 10	97.00	92.40

添加 FA-Ag 系列抗菌剂制得的聚乙烯醇与仅添加黄腐酸的聚乙烯醇相比,可明显看出添加 FA-Ag 后的聚乙烯醇对大肠杆菌、枯草杆菌均具有较强的抑菌作用,且对大肠杆菌的抑菌作用更强。

3 结束语

采用本文方法,黄腐酸与硝酸银中 Ag⁺发生了络合反应,且随着硝酸银含量的增加,更多的 Ag⁺参与反应与黄腐酸络合。对于 FA-Ag 系列抗菌剂,随着参加反应的 Ag⁺含量的增加,其热分解温度逐

渐提高,也就是说,其热失重速率逐渐减慢。本文制备得到的 FA-Ag 系类抗菌剂对大肠杆菌、枯草杆菌均具有一定的抑菌作用,且对大肠杆菌的抑菌作用更强。

参考文献:

- [1] Wen B,Zhang J J,Zhang S Z,et al. Phenanthrene sorption to soil humic acid and different humin fractions[J].Environmental Science and Technology,2007(9):3165-3171.
- [2] Chun Y Y,Xie Q,Xiao X Q,et al. Effects of humic acid fractions with different polarities on photodegradation of 2,4-D in aqueous environments[J].Frontiers of Environmental Science Engineering in China,2008(3):291-296.
- [3] 张文钰,张羽天.载银抗菌材料及其制品[J].贵金属,1998,19(4):50-53.
- [4] 李炜罡,吕维平,王海滨,霍冀川.抗菌材料进展[J].化工新型材料,2003,31(3):7-10.
- [5] 惠兴伟.银离子抗菌技术涂层钢技术及应用[J].表面技术,2008,37(6):87-90.
- [6] 孙剑,乔雪亮,陈建国.无机抗菌剂的研究进展[J].材料导报,2007,21(S1):344-347.
- [7] 汪山,程继健,陈齐.载银型无机缓释抗菌材料的研究与应用[J].中国陶瓷,2000,36(2):7-9.
- [8] 张洪云,车德基,杨箴立.黄腐酸及其金属盐热稳定性研究[J].江西腐植酸,1986(1):21-25.
- [9] 许旭旦.黄腐酸研究的意义与成就[J].腐植酸,1996(1):32-34.
- [10] 周少丽,贺燕.铬在黄腐酸上吸附行为及机理的研究[J].有色矿冶,2007,23(6):46-48.
- [11] 朱宝伟,陈红.微波辅助下从泥炭中提取黄腐酸类物质的研究[J].腐植酸,2008(3):14-18.
- [12] 回瑞华,关崇新,侯冬岩.羧酸及其盐红外光谱特性的研究[J].鞍山师范学院学报,2001(1):95-98.

(来源:当代化工,2017,3:446-448)

腐植酸是治疗疾病理想的基础药

原煤炭部环保办公室主任 秦万德

所谓基础药是指对机体的各个系统、器官、腺体和细胞组织等具有增强与调整的再培养作用，从而使正常机体更加健壮，使病理状况下存在的有关功能障碍及时得到纠正，以促使机体达到内环境的平衡状态。在此基础上，当机体有病毒等入侵或滋生肿瘤等时，可再及时补以有针对性的专一性药物或专一性治疗方法予以抗击，这样内、外因结合，使之达到治愈疾病的目的。

乌金石（即风化煤）中的腐植酸用于人体疾病的治疗，始于公元1127年（北宋），明代李时珍的《本草纲目》九卷二十八页和《中国药学大辞典》（1956年版）上册，442页及《中国医药大辞典》（1975年版）第一册927页，都以石炭又名乌金石为药物。但由于当时只知道采用自然淡水直接熬制的萃取方法，所以有效成分释放有限，因此效果差，被逐渐放弃了应用。

1957年，中科院煤炭研究室曾进行过草炭的利用研究工作。1958年，全国大搞群众运动时，人们解放思想，于是在我国东北等有草炭的地方，掀起了大搞腐植酸类肥料的群众运动。但由于当时对分解程度差的草炭的强还原性认识不足，致使不少地方减产，而后自消自灭。

1960年，煤炭部基本建设口总负责人，部党组成员高振德到国内各矿区出差过程中，发现陕西某煤矿区黑土地上栽种的苹果树上的苹果，被香港发现，要求包销，并飞机直送到港。以此为线索，高振德又发现：矿区黑土地上种植的其他农作物，质量好，产量也高。为此高振德责成该基建口的有关技术人员，与有关研究单位及有关大专院校的教师合作，总结增产经验，并连续不断地到各省有关地区宣传、推广。

到1973年年底，仅河北、山西、内蒙古、辽宁、云南等13个省、地区的不完全统计，就有千吨以上的腐植酸类肥料厂40多个。在此基础上，走在前列的地区，还利用风化煤制取不同纯度的腐植酸

钠，应用于养殖业的饲料添加剂和水质改良剂，结果不但增产、增收，而且可以防病、治病，且效果显著。

1974年11月5～15日，国家先后在广东湛江和广西南宁召开了“腐植酸类肥料试验、推广经验交流会”，并在会后1974年11月16日，即刻以国务院（国发〔1974〕110号）文件，转发了“燃化部、农林部关于积极试验、推广和发展腐植酸类肥料的报告”。上述会议精神和国务院文件的下达，就像春天的雨露滋润着会上交流的各种腐植酸类肥料试验的企业，使之像雨后春笋般地快速茁壮成长。

1977年8月8～18日，“全国腐植酸类肥料研究成果交流会”在吉林省长春市召开。会上王震副总理给会议发去一封表彰信，信中说：“近几年来，由于各省、市、自治区党委的重视，经过不断的实践、总结，证实腐植酸复合肥料肥效好，且有其他广泛用途的可能，你们这次会议就是要把它作为科学研究的一项重要课题来进行研究总结，这是十分需要的。”信中提到的“且有其他广泛用途的可能”指的就是腐植酸用于人体疾病的治疗所取得的初步研究成果；信中后面提到的“你们这次会议就是要把它们作为科学研究的一项重要课题来进行研究总结”指的是腐植酸用于人体疾病的治疗，今后要作为科学研究的重要课题来进行研究总结。

1977年10月17日的《人民日报》报道，当时几年，我国一些医药卫生单位，已开始研究用腐植酸类物质治病，从广东、广西等八个省市的部分医院近2万个临床病例来看，用腐植酸类药物治疗的疾病已达60多种。

王震副总理的指示和腐植酸治疗60多种疾病的报道极大地鼓舞了从事腐植酸事业的化学研究单位、医学院校、大医院等的有志者。于是，一个空前的围绕腐植酸的基础研究全面展开了。

由中国化学会主持领导的四次“腐植酸化学学术研讨会”、由北京大学医学部主持召开的“腐植酸医药应用科研协作会”，以及由国家经委对煤炭腐植酸医药应用的无偿拨款的支持等，就像三根粗壮的顶梁柱，使长时间以来就已经开展起来的腐植酸应用研究工作得到了空前的加强，于是在治疗一般疾病的同时，探讨治疗各种疑难疾病的研究工作也开始了。

1979年7月22日，为了和世界腐植酸治病接轨，煤炭部成立了中国煤炭学会泥炭专业委员会，以便通过该专业委员会加强与世界的联系，本人任秘书长。之后多次赴美、欧、原苏联等，组团参加国际泥炭医药等应用推广会议。

1990年12月7日，由于风化煤腐植酸的优越性以及国家的支持，河南省卫生厅终于完成了“黄腐植酸钠口服液”[豫卫药准字(1990)88044号]的任务。该口服液主要用于消化系统，以治疗溃疡与出血等。全国各地用风化煤治疗其他多种疾病的工作都在分头有序进行，如抗肿瘤、乙型肝炎、HIV感染以及常见而多发的感染性疾病等，都开始进行研究及临床试验。

经过腐植酸人的坚持不懈，攻坚克难，腐植酸在医药方面有了突破性的进展。本人就是一个疑难病的典型。40多年前曾患黄斑病变病，当时北京医院等的医嘱为：“你的右眼已不可挽回，左眼现又有发病征兆，而且视力也明显下降，建议你每天注射大量Vc抗氧化剂，以阻止体内氧自由基对眼底的脂质过氧化，那样情况可能就会好转”。但我认为不安全，自己选择服用全国各地送到北京的腐植酸样品，结果奇迹出现了，旧病灶固定，新病症停止发展。当时用腐植酸抢救下来的左眼，一直用残留的0.3的视力工作并保持到现在。

回顾过去我国组织、协调研究应用腐植酸治疗人体各种疾病的过程，经过梳理总结，对照和跟踪几十年来世界医疗事业的发展状况，发现中国对乌金石中腐植酸的研究和应用是最详尽和最深入的。大量试验研究的结果表明：(1)腐植酸对所有生命体无任何毒副作用，仅有促进其生长发育和繁殖的作用，但当疾病进入动物(人)体后，腐植酸可以

利用其再培养起来的免疫系统功能，通通将其消灭。(2)腐植酸可以促使细胞分裂正常化，可使两性受精过程中所形成的合子最优化，可使未用腐植酸的亲代两性受精过程中存在的差错得到纠正，且均达显著水平。(3)腐植酸对正常动物没有显著的生物活性，仅表现出对其各器官、腺体、细胞组织等有再培养作用，但当动物(人)某些器官组织出现病理状况时，腐植酸能当即表现出显著的生物活性。

上述腐植酸的对有机体的再培养作用，以及病理状况下所表现出的生物活性，说到底都与腐植酸是氧化态的有机物质有关，这是它区别于其他药物的主要原因。其特点有：(1)腐植酸可以作为呼吸链末端的氢受体，能使机体的所有细胞，包括免疫器官或内分泌腺体等本身的功能细胞及其前者所产生的各种免疫活性细胞(成熟的红细胞除外)等，额外多合成约三分之一的ATP(三磷酸腺苷)。这些多出的ATP和细胞正常情况下合成的ATP一起，自然可使正常机体更加健壮，可使功能下降或衰退的各种细胞，立即振作精神，去完成自己的特定任务，从而使病理状况下的各种症状得以迅速治愈。(2)腐植酸具有最完美的抗氧化作用。动物(人)可以因各种原因而产生氧自由基，腐植酸对弱氧化性超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)无任何作用，以便使腐植酸通过活化后体内的酶系统，更快更彻底地转变成水，并放出氧。相反对具有破坏性的强氧化性的羟自由基($\cdot OH$)却有很好的清除作用。

综上所述，中国发现的氧化态乌金石腐植酸所产生的、由内源性因素而引起的各种独特的内源性激素、内源性免疫功能显著提高，内源性ATP全面再培养动物(人)机体各种功能等的作用，不带有任何外源性因素(如激素、免疫增强剂、ATP等的副作用)。因此不难看出，乌金石腐植酸是一种理想的基础药。希望有关科研单位和企业以我国腐植酸环境友好产业发展60年为契机，以过去积累的大量临床资料和研究成果为借鉴，不断创新，将腐植酸医药产业发展壮大，以真正造福人类。

(来源：腐植酸，2017，4：39-40)

黄腐酸有机锡羧酸酯的合成及抗肿瘤活性

陈 璠¹, 霍萃萌¹, 代本才¹, 武传伟², 赵永德¹

(1. 河南省科学院 化学研究所有限公司, 郑州 450002; 2. 郑州炜盛电子科技有限公司, 郑州 450001)

摘要: 以黄腐酸和有机锡化合物为原料, 合成了8个新的有机锡化合物. 通过红外光谱、元素分析、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)对其进行结构表征, 并利用MTT法测定了目标化合物的体外抗肿瘤活性. 结果显示, 目标化合物对人急性骨髓白血病细胞(KG-1a)、大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞(PC12)和人慢性髓原白血病细胞(K562)均有较好的增殖抑制作用. 其中三苯基锡黄腐酸酯(**3g**)、三环己基锡黄腐酸酯(**3h**)能较强地抑制被测的三种癌细胞, IC_{50} 值在 10.79~29.22 mg/L⁻¹, 抑制效果最好为 10.79±0.37 mg/L⁻¹; 二甲基锡黄腐酸酯(**3a**)、二辛基锡黄腐酸酯(**3f**)对PC12细胞的抑制作用也较好, 其 IC_{50} 值分别为 34.41±0.61、52.41±1.58 mg/L⁻¹.

关键词: 腐植酸; 黄腐酸; 有机锡羧酸酯; 抗肿瘤活性

中图分类号: O 627.4 文献标识码: A

Synthesis and Anti-tumor Activity of Fulvic Acid Organotin Carboxylates

CHEN Jin¹, HUO Cuimeng¹, DAI Bencai¹, WU Chuanwei², ZHAO Yongde¹

(1. Institute of Chemistry Co. Ltd., Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Zhengzhou Winsen Electronics Technology Co. Ltd., Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Eight new organotin carboxylates were synthesized from fulvic acid and organotin compounds. Their structures were characterized by IR, elemental analysis and ICP-MS, and antitumor activity was determined by the MTT method. The results showed that they exhibited a good antitumor activity *in vitro* against KG-1a, PC12 and K562. A good antitumor activity of fulvic acid triphenyltin carboxylate (**3g**) and fulvic acid tricyclohexyltin carboxylate (**3h**) was exhibited against the three kinds of cancer cells with IC_{50} value of 10.79–29.22 mg/L⁻¹, and the best was 10.79±0.37 mg/L⁻¹; the IC_{50} value of fulvic acid dimethyltin carboxylate (**3a**) and fulvic acid dioctyltin carboxylate (**3f**) against PC12 cells were 34.41±0.61, 52.41±1.58 mg/L⁻¹ respectively.

Key words: humic acid; fulvic acid; organotin carboxylates; antitumor activity

腐植酸类物质是由动物、植物残体在微生物及地球化学作用下分解和合成的一类天然有机高分子聚合物^[1]. 腐植酸类物质的分子中具有多种活性官能团, 它具有酸性、亲水性、界面活性、阳离子交换能力、络合作用及吸附分散能力. 黄腐酸是腐植酸类物质碱溶-酸析后留在酸性溶液中的那部分可溶性有机酸, 可以溶于酸性、中性水溶液以及丙酮、乙醇等溶液, 对植物具有保水、抗旱、生长调节等作用^[2-5], 在医学上具有抗炎、止痛、脱敏、去腐生肌与调节免疫功能等作用^[6-8], 它由于分子量较低, 功能团更聚集, 羧基和酚羟基含量相对于腐植酸来说更高, 被认为有更高的反应活性和更强的络合能力^[9-11].

有机锡化合物是锡和碳元素直接结合所形成的金属有机化合物, 通式为 R_nSnX_{4-n} ($n=1-4$, R 为烷基或芳香基). 有机锡羧酸酯是其中重要的一种, 特别是近年来发现有机锡羧酸酯具有良好的抗癌活性, 有关其结构和抗癌活性的研究倍加重视^[12-13]. 自从1972年Brown^[14]首次发现 $Ph_3SnO_2CCH_3$ 具有抑制小鼠肿瘤的生长作用以来, 对有机锡羧酸酯的合成, 分子结构及生物活性的研究越来越多, 并取得了很多有意义的结果^[15]. 研究表

明^[16-18], 烷基锡羧酸酯大多具有良好的杀菌活性和抗癌活性. 本论文以风化煤中提取的黄腐酸为原料 **1**, 引入活性基团有机锡, 合成了目标化合物 **3a~3h**(图1), 并对这8个新的有机锡羧酸酯类化合物进行了结构表征及抗肿瘤活性研究.

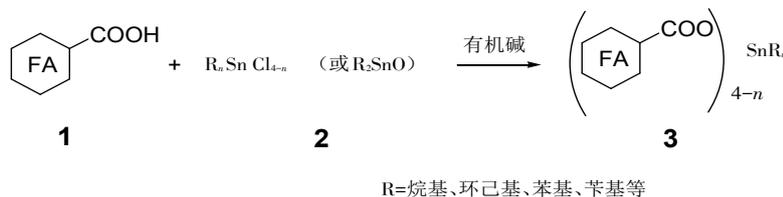


图1 黄腐酸有机锡羧酸酯的合成路线

Fig.1 Synthetic route of fulvic acid organotin carboxylates

1 实验部分

1.1 实验试剂与仪器

实验试剂: 黄腐酸(自制, 内蒙古风化煤提取, 含量82.1%); 有机锡化合物(分析纯, 阿拉丁试剂(上海)有限公司); MTT(分析纯, 阿拉丁试剂(上海)有限公司); 顺铂(分析纯, 百灵威科技有限公司); 甲苯、乙醇、三乙胺(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司).

细胞: 人急性骨髓白血病细胞(KG-1a)、大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞(PC12)和人慢性髓原白血病细胞(K562)由新乡医学院提供. 取繁殖期的细胞, 在质量分数10%小牛血清, 100 U/mL青霉素, 50 μg/mL链霉素的培养液中, 于37 °C, 5%CO₂恒温恒湿培养箱中培养.

实验仪器: LT2002E 电子天平(常州市天之平仪器设备有限公司); 6700型傅立叶变换红外光谱仪(美国Nicolet公司); NEXION 300X 电感耦合等离子体质谱仪(美国PE公司); Vario EL 元素分析仪(德国Elementar公司).

1.2 实验步骤

1.2.1 原料**1**的提取^[19-21]

1) 风化煤预处理. 内蒙古风化煤经烘干、研细并通过80目筛. 称取上述100 g风化煤溶于1000 mL去离子水中, 滤除机械杂质后, 滤液用NaOH调节pH至10.0, 搅拌1 h, 然后在离心机中离心20 min, 取上层清液待用.

2) 离子交换树脂预处理. 称取500 g 001*7型离子交换树脂; 用两倍体积的饱和食盐水浸泡树脂24 h, 放尽食盐水, 去离子水漂洗至无黄色水排出; 用两倍体积的5% HCl溶液浸泡树脂4~8 h, 放尽酸液, 去离子水漂洗至中性; 将浸泡的树脂装柱, 柱高约50 mm; 用3000 mL去离子水淋洗柱子, 流速10~15 mL/min, 得到001*7H⁺型离子交换树脂.

3) 静态交换. 将预处理后的腐植酸溶液, 加入500 g 001*7H⁺型离子交换树脂, 50 °C下恒温振荡2 h, 静置, 离心分离, 用500 mL去离子水洗涤, 收集滤液.

4) 动态交换. 上步滤液通过装有离子交换树脂的玻璃柱进行动态交换, 流速1.0 mL/min左右, 收集流出液放入恒温干燥箱中70 °C烘干, 得到棕黄色固体16.5 g, 即黄腐酸, 收率为16.5%.

1.2.2 目标化合物**3a~3e**、**3g~3h**的合成 将有机锡化合物**2**(0.005 mol)、黄腐酸(本论文分子量按平均值1036计, 10.36 g, 0.01 mol)、三乙胺(1.01 g, 0.01 mol)及50 mL甲苯加入100 mL反应瓶中, 搅拌加热至回流, 反应6 h. 冷却之后过滤, 固体70 °C烘干, 得到目标化合物**3**.

1.2.3 目标化合物**3f**的合成 将氧化二辛基锡(1.81 g, 0.005 mol)、黄腐酸(10.36 g, 0.01 mol)、分子筛(1 g)及50 mL带水剂加入100 mL反应瓶中, 搅拌加热, 回流带水反应8 h. 冷却之后过滤, 水洗, 70 °C烘干, 得到9.21 g深黄色固体二辛基锡黄腐酸酯(**3f**).

1.2.4 抗肿瘤活性测试 通过MTT法测试目标化合物对人急性骨髓白血病细胞(KG-1a)、大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞(PC12)和人慢性髓原白血病细胞(K562)的抗肿瘤活性, **1**为原料黄腐酸.

取对数生长期的细胞制成单细胞悬液, 调整细胞个数约为5×10⁵个/mL, 加到96孔培养板中使其贴壁培

养过夜, 24 h 后加入不同浓度的样品液(设置 7 个浓度, 分别为 5、10、20、40、80、160、320 mg/L), 每个浓度设 4 个复孔, 48 h 后加入 MTT 溶液, 每孔 100 μL ; 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下于培养箱中培养 4 h, 再除去细胞上清液, 将每孔细胞结晶用 150 μL DMSO 溶解. 分别将样品组、空白对照组(不加样品)和阳性对照组(阳性药为顺铂), 在酶标仪上测量波长 570 nm 处得的光密度(OD)值. 测得光密度值后由下面的公式计算出不同样品浓度下的肿瘤细胞抑制率.

$$\text{肿瘤抑制率} = (\text{对照组 OD 值} - \text{样品组 OD 值}) / \text{对照组 OD 值} * 100\%$$

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 22 软件进行分析, 计算 IC_{50} 值, 与对照组比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义.

2 结果与讨论

2.1 化合物的结构鉴定

二甲基锡黄腐酸酯(**3a**): 棕黄色固体, 收率 92.8%. IR(KBr, cm^{-1}): 3424、2938、2677、2492、1624、1474、1397、1165、615、551、463. 元素分析(%): C, 50.90; H, 5.08; N, 3.27; Sn, 13.6.

三甲基锡黄腐酸酯(**3b**): 棕黄色固体, 收率 89.7%. IR(KBr, cm^{-1}): 3436、2939、2677、2490、1633、1473、1398、1035、609、459. 元素分析(%): C, 43.90; H, 4.08; N, 2.27; Sn, 0.94.

三乙基锡黄腐酸酯(**3c**): 棕黄色固体, 收率 73.5%. IR(KBr, cm^{-1}): 3447、2973、2938、2739、2676、2490、1632、1473、1398、1137、613. 元素分析(%): C, 45.30; H, 3.87; N, 2.42; Sn, 2.23.

丁基锡黄腐酸酯(**3d**): 深黄色固体, 收率 88.7%. IR(KBr, cm^{-1}): 3406、2938、2677、2490、1632、1473、1398、1169、602、467. 元素分析(%): C, 46.72; H, 3.94; N, 2.55; Sn, 3.20.

三丁基锡黄腐酸酯(**3e**): 棕黄色固体, 收率 71.6%. IR(KBr, cm^{-1}): 3446、2938、2678、2492、1474、1399、1135、616、459. 元素分析(%): C, 37.71; H, 2.27; N, 1.55; Sn, 0.089.

二辛基锡黄腐酸酯(**3f**): 深黄色固体 g, 收率 76.3%. IR(KBr, cm^{-1}): 3429、1632、1401、1156、599、470. 元素分析(%): C, 43.80; H, 3.86; N, 2.01; Sn, 0.54.

三苯基锡黄腐酸酯(**3g**): 棕黄色固体, 收率 90.3%. IR(KBr, cm^{-1}): 3431、2938、2675、2489、1634、1399、1132、615、460. 元素分析(%): C, 44.33; H, 3.57; N, 2.39; Sn, 2.21.

三环己基锡黄腐酸酯(**3h**): 棕黄色固体, 收率 77.8%. IR(KBr, cm^{-1}): 3433、2937、2677、2491、1632、1399、1134、615、472. 元素分析(%): C, 43.02; H, 3.35; N, 2.20; Sn, 0.17.

2.2 结构表征

采用 IR、元素分析和 ICP-MS 对目标化合物的结构进行了表征. 在目标化合物的红外光谱图中, 在 3400 cm^{-1} 左右是氢键结合的酚、醇羟基的吸收峰; 1600 cm^{-1} 左右是芳香结构共轭双键 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动峰、羧基中的 $\text{C}=\text{O}$ 和 COO^- 的不对称伸缩振动峰; 在 1200~1000 cm^{-1} 是醚基 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的伸缩振动峰. 在 472~459 cm^{-1} 和 616~599 cm^{-1} 两处新出现的吸收峰, 表明化合物中形成了 $\text{Sn}-\text{C}$ 和 $\text{Sn}-\text{O}-\text{Sn}$ 键. 红外图谱中除了黄腐酸的特征吸收峰之外, 还有有机锡化合物的特征吸收峰, 这证明产物为黄腐酸有机锡羧酸酯化合物. 元素分析和 ICP-MS 进一步表征了目标化合物的结构.

2.3 抗肿瘤活性

采用 MTT 法测定了目标化合物对 KG-1a、PC12 和 K562 的抗肿瘤活性, 实验结果见表 1.

实验结果表明: 目标化合物对被测定的三种肿瘤细胞增殖均有不同程度的抑制作用, 其

表 1 目标化合物的体外抗肿瘤活性

化合物	$\text{IC}_{50}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$		
	KG-1a	PC12	K562
空白对照组	0 \pm 0.04	0 \pm 0.07	0 \pm 0.05
3a	163.52 \pm 1.17**	34.41 \pm 0.61**	293.29 \pm 4.42**
3b	113.21 \pm 0.40**	59.88 \pm 1.12**	126.26 \pm 2.86**
3c	171.69 \pm 0.90**	170.21 \pm 2.32**	267.86 \pm 4.24**
3d	102.63 \pm 0.50**	59.09 \pm 1.40**	158.37 \pm 1.19**
3e	146.97 \pm 1.17**	162.05 \pm 4.87**	96.49 \pm 1.28**
3f	130.01 \pm 0.55**	52.41 \pm 1.58**	53.06 \pm 0.58**
3g	14.86 \pm 0.21**	17.75 \pm 0.60**	26.71 \pm 1.26**
3h	14.05 \pm 2.27*	29.22 \pm 1.05**	10.79 \pm 0.37**
1	144.88 \pm 1.03**	93.34 \pm 1.92**	289.09 \pm 4.29**
顺铂	9.17 \pm 0.24**	11.66 \pm 0.45**	8.31 \pm 0.50**

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

中 **3g**、**3h** 能较强地抑制被测的三种癌细胞, IC_{50} 为 10.79~29.22 mg/L⁻¹; 该类化合物对这三种肿瘤细胞的抑制活性均低于对照药顺铂, 其中 **3h** 对 K562 的活性 (10.79±0.37 mg/L⁻¹) 接近对照药的活性 (8.31±0.50 mg/L⁻¹); **3a**、**3f** 对 PC12 细胞的抑制作用也较好, 其 IC_{50} 分别为 34.41±0.61、52.41±1.58 mg/L⁻¹.

3 结论

- 1) 成功合成了 8 个未见报道的黄腐酸有机锡羧酸酯类化合物, 并对其进行了结构表征;
- 2) 初步抗癌活性实验证明: 合成的目标化合物对 KG-1a 细胞、PC12 细胞、K562 细胞均有抑制作用.

参考文献:

- [1] HENDRICKSON J B, GRAN D T, HAMMOD G S. Organic chemistry[M]. Boston: Willard Grand Press, 1970: 287-288.
- [2] 杨晓玲, 朱京涛, 张建文. 生化黄腐酸的提取及其理化性质的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(1): 18-20.
- [3] 崔文娟, 牛育华, 赵冬冬, 等. 腐植酸肥料的研究现状及展望[J]. 磷肥与复肥, 2016, 31(9): 20-23.
- [4] 王永卫, 冯志明. 黄腐酸等生物制剂在作物上的应用研究[J]. 腐植酸, 2003(1): 28-32.
- [5] 李善祥. 腐植酸类物质与农药研究应用与展望[J]. 腐植酸, 2002(2): 172-175.
- [6] 薄芯. 腐植酸在医学上的研究应用[J]. 生物学通报, 1997, 32(5): 18-19.
- [7] 冯元琦. 我国腐植酸综合利用[J]. 江西腐植酸, 1986(2): 1-7.
- [8] 王兴洲, 王柳, 孙淑芳, 等. 腐植酸化物的药理作用及其应用[J]. 饲料博览, 1992(1): 6-7.
- [9] PICCOLO A. Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils[J]. Bioresource Technology, 1992, 40(3): 275-282.
- [10] 张振民. 腐植酸类物质的胶体化学性质[J]. 江西腐植酸, 1981(1): 3-11.
- [11] SAIZ J C. The chemical structure of humic substances: recent advances[M]//ALESSANDRO P. Humic Substances in Terrestrial Ecosystems Elsevier, Amsterdam, 1996: 1-44.
- [12] CHANDRASEKHAR V, GOPAL K, SASIKUMAR P, et al. Organotin assemblies from Sn-C bond cleavage reactions[J]. Coord Chem Rev, 2005, 249(17): 1745-1765.
- [13] GIELEN M. Review: Organotin compounds and their therapeutic potential: a report from the organometallic chemistry department of the free university of brussels[J]. Appl organomet Chem, 2002, 16(9): 481-494.
- [14] BROWN M N. In tin-based antitumor drugs[M]. Berlin: Springer Verlag, 1990: 69-75.
- [15] MOLLOY K C, BLUNDEN S J, HILL R. Organotin biocides part II: Triphenyltin benzoates: electronic versus steric control of structure[J]. Cheminform, 1988, 19(33): 1259-1266.
- [16] SHUJAH S, REHMAN Z, MUHAMMAD N, et al. New dimeric and supramolecular organotin(IV) complexes with a tridentate schiff base as potential biocidal agents[J]. J Organomet Chem, 2011, 696(15): 2772-2781.
- [17] TZIMOPOULOS D, SANIDAS I, VARVOGLI A C, et al. On the bioreactivity of triorganotin aminobenzoates. Investigation of trialkyl and triaryl tin(IV) esters of 3-amino and 4-aminobenzoic acids[J]. J Inorg Biochem, 2010, 104(4): 423-430.
- [18] SHANG X, MENG X, ALEGRIA E, et al. Syntheses, molecular structures, electrochemical behavior, theoretical study, and antitumor activities of organotin(IV) complexes containing 1-(4-chlorophenyl)-1-cyclopentanecarboxylate ligands[J]. Inorg Chem, 2011, 50(17): 8158-8167.
- [19] 尹淑芝. 碱溶、离子交换树脂混合法提取黄腐酸[J]. 化学工程师, 1994, 45(6): 53-54.
- [20] 邹静, 王芳辉, 朱红, 等. 风化煤中腐植酸的提取研究[J]. 化工时刊, 2006, 20(6): 10-12.
- [21] 焦元刚. 从风化煤中提取黄腐酸[D]. 北京: 北京交通大学, 2006.

(来源: 河南科学, 2017, 6: 874-877)