

黄腐酸钠的药理实验研究

摘 要

腐植酸(humic acid,HA)是由自然界植物残体腐烂分解后缩合形成的产物,含有羧基、羰基、醌基、酚基等多种活性基团,按照腐植酸分子量和在不同溶剂中的溶解度不同可分为黑腐酸、棕腐酸和黄腐酸。几千年前,李时珍在《本草纲目》中已有关于腐植酸药用的记载,主要用以治疗鼻子出血、妇女气血痛等疾病。现已发现腐植酸及其盐类具有醒酒、抗炎、抗溃疡、止血活血、抗菌、抗病毒等作用。黄腐酸(fulvic acid,FA)是HA中分子量最小、溶解度最高、生物活性最强、吸收效果最佳的部分,故药用中以FA及其盐类为主。不同产地的FA因煤化程度和提取方法不同而药效各异,在胃肠道运动及脂质代谢方面,各地的黄腐酸表现出不同的效果。本实验从云南寻甸年青褐煤中提取黄腐酸,并制成黄腐酸钠(FA-Na)。采用碳末推进法和胃溃疡模型,观察黄腐酸钠对小鼠小肠推进运动及胃溃疡的影响;以造模成功的昆明小鼠为实验对象,观察黄腐酸钠对高血脂模型及糖尿病模型小鼠的血脂、血糖的作用。

主要研究结果归纳如下:

1 以黑色炭末为指示剂,通过测定正常小鼠、复方地芬诺酯或生大黄分别致胃肠运动抑制或脾虚腹泻模型炭末推进百分率,观察黄腐酸钠对小鼠胃肠运动的影响;采用无水乙醇灌胃造成小鼠急性胃溃疡,观察黄腐酸钠预防给药对胃黏膜损伤的保护作用,计算溃疡指数和溃疡抑制率。结果:黄腐酸钠灌胃对正常小鼠、生大黄致小鼠腹泻模型均有一定抑制胃肠运动作用,对复方地芬诺酯所致小鼠胃肠运动减弱有明显的协同作用;对无水乙醇引起的小鼠胃黏膜损伤有保护作用,高剂量黄腐酸钠与阳性对照药物雷尼替丁的溃疡指数和溃疡抑制率无显著性差异。在剂量范围内,黄腐酸钠的急性毒性很小,具有止泻、抗胃溃疡、保护胃黏膜损伤的作用。

2 采用小鼠腹腔注射蛋黄乳剂造成急性高血脂模型,用酶标仪测定血清总胆固醇和甘油三酯的含量,观察黄腐酸钠对正常小鼠及高血脂模型小鼠总胆固醇和甘油三酯的影响。结果,腐酸钠对正常小鼠及高血脂模型小鼠的总胆固醇和甘油三酯均无明显的作用,黄腐酸钠没有降血脂的作用。

3 采用小鼠腹腔注射四氧嘧啶的方法造成糖尿病模型,考察黄腐酸钠、腐植酸钠及茶褐素对糖尿病小鼠的血糖、总胆固醇、甘油三酯以及口服葡萄糖耐量的影响。结果,黄

腐酸钠、腐植酸钠及茶褐素对糖尿病小鼠体内血糖、总胆固醇、甘油三酯的含量与模型组比较并无明显差异性。黄腐酸钠、腐植酸钠及茶褐素对于口服糖耐量试验，高剂量组的黄腐酸钠、腐植酸钠及茶褐素能显著改善糖尿病小鼠糖耐量。

结论：寻甸黄腐酸钠具有止泻、抗胃溃疡、改善糖尿病小鼠糖耐量的作用，但对高血脂及糖尿病模型的血脂、血糖并无明显作用。

关键词：黄腐酸钠；胃肠运动；胃溃疡；高血脂；糖尿病

ABSTRACT

Humic acid (HA) is produced by biodegradation of plant residues in nature, it is a complex polymer containing carboxyl, carbonyl, quinonyl, phenolic hydroxyl and other active functional groups. It can be divided into three main fractions by the molecular weight and solubility in different solvent: Black humic acid, Hymatomelanic acid, fulvic acid. Thousands of years ago, HA had been recorded in "Compendium of Materia Medica" compiled by Li Shizhen, which was mainly used for the treatment of nose bleeding, women's qi blood pain, abdominal pain and other diseases. In recent years, it has been found that HA and its salts possess various pharmacological properties, including anti-inflammatory, antiviral, anti-hypertensive, anti-neoplastic, hemostatic activities. Fulvic acid (FA) is a principal component of HA, which has the smallest molecular weight, highest solubility, strongest biological activity and optimal absorption in vivo, therefore what has been used in medicine is mainly FA. Due to the different degree of coalification and the different extraction method, FA from different area has different pharmacological properties. FA-Na used in this research is made from FA, which is extracted from young lignite of Xundian Yunnan province. The anthraco-propulsion and gastric ulcer model were used to observe effects of FA-Na on the intestine propulsion and gastric ulcer. The hyperlipemia and diabetic mice models were used to observe effects of FA-Na on blood fat and blood glucose.

The main results are summarized as follows:

- 1 Using charcoal powder as an indicator, the effects of FA-Na on gastrointestinal motility of mice was evaluated by determining the propulsive percentage of charcoal powder in normal mice, inhibition of gastrointestinal motility model induced by Compound Diphenoxylate and spleen asthenia and diarrhea model caused by *Rheum officinale* Baill; The protective effect of FA-Na as a prophylactic agent on gastric injury of acute gastric ulcer model induced by intragastric alcohol given orally was evaluated by calculating the ulcer index and the inhibition ratio of ulcer. The experimental results showed that FA-Na (intragastric administration) had some inhibition effects on gastrointestinal motility of normal mice and diarrhea model caused by *Rheum officinale* Baill, remarkably synergetic effect on gastrointestinal asynersis induced by Compound Diphenoxylate, and protective effect on mice gastric mucosal injury caused by dehydrated alcohol. Compared with the positive control durg Ranitidine, large doses of FA-Na had no significant differences in ulcer index and ulcer inhibition ratio. The acute toxicity of FA-Na is very low, it has the effects of antidiarrheal and anti-gastric ulcer.

2 Acute high blood fat mice model was induced by intraperitoneal injection of egg yolk. The influences of FA-Na on total cholesterol and triglyceride levels of normal mice and high blood fat mice were researched by detecting the serum total cholesterol and triglyceride levels using the enzyme mark instrument. Results: FA-Na has no significant effects on total cholesterol and triglyceride levels of normal mice and high blood fat mice, therefore FA-Na has no blood lipid lowering effects.

3 The diabetic mice model was induced by the intraperitoneal injection of alloxan. The influences of HA-Na, HA-Na, and theabrownine group on blood glucose level, the glucose tolerance, total cholesterol and triglyceride of diabetic mice were studied. Results: The influences of HA-Na, HA-Na, and theabrownine group on blood glucose level, total cholesterol and triglyceride of diabetic mice has no significant difference from that of controlled group. High doses of HA-Na, HA-Na, and theabrownine group can significantly improve the glucose tolerance of diabetic mice.

FA-Na possess pharmacological properties of antidiarrheal, anti-gastric ulcer and improving the glucose tolerance of diabetic mice, but it has no significant effects on blood fat level of high blood fat mice and blood glucose level of diabetic mice.

Keyword: *FA-Na, Gastrointestinal movement, Gastric ulcer, High blood fat, Diabetes*

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
插图和附表清单	IX
第一章 绪论	1
1.1 腐植酸及黄腐酸	1
1.1.1 腐植酸及黄腐酸简介	1
1.1.2 腐植酸、黄腐酸的制备	2
1.1.3 腐植酸、黄腐酸的结构和性质	2
1.1.4 腐植酸、黄腐酸的应用研究现状	5
1.2 腹泻疾病简介.....	10
1.3 胃溃疡简介.....	10
1.4 高血脂简介.....	11
1.5 糖尿病简介.....	12
1.6 本课题立体依据.....	13
1.7 本课题的研究内容及技术路线.....	13
1.7.1 研究内容	13
1.7.2 技术路线	13
第二章 黄腐酸钠对小鼠胃肠道运动及胃溃疡的实验研究	15
2.1 实验材料.....	15
2.1.1 药物及试剂	15

2.1.2 实验动物	15
2.2 实验方法.....	16
2.2.1 FA-Na 对正常小鼠及复方地芬诺酯所致的小鼠小肠推进抑制的影响	16
2.2.2 FA-Na 对脾虚小鼠体重及胃肠运动的影响	16
2.2.3 FA-Na 对无水乙醇致胃溃疡的影响	17
2.2.4 FA-Na 急性毒性实验	17
2.2.5 统计学处理方法	18
2.3 结果.....	18
2.3.1 FA-Na 对正常和胃肠运动抑制模型小鼠肠道内炭末推进率的影响	18
2.3.2 FA-Na 对脾虚小鼠体征、体重及小肠炭末推进运动的影响	19
2.3.3 FA-Na 对无水乙醇致胃溃疡的影响	20
2.3.4 FA-Na 急性毒性实验	21
2.4 结论与讨论	21
第三章 黄腐酸钠对正常小鼠及高血脂模型小鼠血脂的影响	23
3.1 主要实验仪器及试剂材料	23
3.1.1 主要实验仪器	23
3.1.2 主要试剂和药品	24
3.1.3 实验动物	24
3.2 实验方法	24
3.2.1 FA-Na 对正常小鼠血脂的影响	24

3.2.2 FA-Na 对高血脂小鼠血脂的影响	24
3.2.3 统计学处理	25
3.3 结果	25
3.3.1 FA-Na 对正常小鼠血脂的影响	25
3.3.2 FA-Na 对高血脂小鼠血脂的影响	25
3.4 结论与讨论	26
第四章 黄腐酸钠对糖尿病小鼠血糖及血脂的影响	27
4.1 主要实验仪器及试剂材料	27
4.1.1 主要实验仪器	27
4.1.2 主要试剂和药品	27
4.1.3 实验动物	28
4.2 实验方法	28
4.2.1 四氧嘧啶造模实验	28
4.2.2 FA-Na 对糖尿病小鼠血糖、血脂的影响	28
4.2.3 FA-Na 对糖尿病小鼠葡萄糖耐量的实验	28
4.2.4 腐植酸钠、茶褐素对糖尿病小鼠葡萄糖耐量的实验	29
4.2.5 腐植酸钠、茶褐素对糖尿病小鼠血糖、血脂的影响	29
4.2.6 统计学处理	30
4.3 结果	30
4.3.1 FA-Na 对糖尿病小鼠血糖、血脂的影响	30
4.3.2 FA-Na 对糖尿病小鼠葡萄糖耐量的实验	32
4.3.3 腐植酸钠、茶褐素对糖尿病小鼠葡萄糖耐量的实验	33

4.3.4 腐植酸钠、茶褐素对糖尿病小鼠血糖、血脂的影响	35
4.4 结论与讨论	37
第五章 结语与讨论	39
5.1 主要的研究结果与讨论	39
5.2 论文的创新之处	40
5.3 存在的问题和进一步的工作	41
5.3.1 存在的问题	41
5.3.2 进一步的工作	41
致谢	42
参考文献	43
附录 A 攻读硕士期间发表论文目录	48

插图和附表清单

图 1.1 Schnitzer 提出黄腐酸的结构	3
图 3.1 酶标仪	23
表 2.1 FA-Na 对正常和胃肠运动抑制模型小鼠小肠推进运动的影响	18
表 2.2 FA-Na 对脾虚小鼠体重的影响	19
表 2.3 FA-Na 对脾虚小鼠小肠碳末推进运动的影响	20
表 2.4 FA-Na 对无水乙醇致胃溃疡的影响	21
表 2.5 FA-Na 急性毒性实验中小鼠体重的变化结果	21
表 3.1 黄腐酸钠对正常小鼠总胆固醇、甘油三酯的影响	25
表 3.2 黄腐酸钠对高血脂模型小鼠总胆固醇、甘油三酯的影响	26
表 4.1 黄腐酸钠对糖尿病小鼠血糖的影响	30
表 4.2 黄腐酸钠对糖尿病小鼠总胆固醇、甘油三酯的影响	31
表 4.3 黄腐酸钠对糖尿病小鼠糖耐量的影响	32
表 4.4 腐植酸钠、茶褐素对糖尿病小鼠糖耐量的影响	33
表 4.5 腐植酸钠、茶褐素对糖尿病小鼠血糖的影响	35
表 4.6 腐植酸钠、茶褐素对糖尿病小鼠总胆固醇、甘油三酯的影响	36

第一章 绪论

1.1 腐植酸及黄腐酸

1.1.1 腐植酸及黄腐酸简介

腐植酸(humic acid, HA)在地球表面分布很广, 存在于土壤、煤炭、湖泊、河流及海洋中, 总量达万亿吨。天然腐植酸可分为土壤腐植酸、水体腐植酸和煤炭腐植酸三大类。

人类文明发展越迅速, 越感到资源的短缺。这样一类数以万亿吨计的潜在有机资源, 理应受到重视。当然, 作为资源利用的角度来考虑, 不是随便什么地方方的腐植酸都有利用价值。土壤中所含的 HA 总量最大, 但其含量平均不足百分之一; 水体中所含的总量也不小但浓度更低, 作为资源开发是不可能的。因此, 最有希望加以利用开发的腐植酸资源是一些煤炭, 诸如褐煤、风化煤和泥炭, 其 HA 含量达 10%~80%。世界褐煤总储量约 2.4 万亿吨, 主要分布于北美, 其次是俄罗斯、中国、西欧和日本。我国已探明储量 1216.09 亿吨, 占世界第三位^[1] (仅次于美国和俄罗斯)。

腐植酸, 包括黄腐酸(fulvic acid, FA), 主要由碳、氢、氧等元素组成。不同地点的褐煤、泥炭、风化煤中所含的 FA, 其主要元素含量是不同的但变化范围不是很大, 且各种来源的腐植酸都是碳和氧为主要元素, 而氮、氢和硫是少量的^[2]。HA 不同于其它天然大分子化合物有着固定的、完整的化学结构, 它们是在不同的植被分布条件和地质条件下, 由各种天然大分子随机聚合而成, 是一种暂态结构。在成煤过程的泥炭化阶段, 这种聚合作用并不是一种完全自发的自然过程, 除了自然条件的影响外, 微生物生命活动对 HA 的结构形成起了重要的促进作用, 可能对 HA 的结构形成及缩聚程度、对煤炭的煤化过程起到了决定性作用。大量研究结果表明, HA 是一种芳香族类的复合物, 由蛋白质、多糖、酚和金属元素化合而成, 其分子量界于 1000-200000 之间, 但化学结构尚未完全清楚。目前已知, 腐植酸和 FA 分子是由-O-, -CH₂-, -NH₂-等基团将二羟基苯、三羟基苯等芳环连接而成的多聚体^[3]。各芳环之间由桥键相连, 苯环上有各种功能基团,

主要是羧基、酚羟基、甲氧基等^[4]。

1.1.2 腐植酸、黄腐酸的制备

土壤、河流中的腐植酸含量低且成分十分复杂，用来生产HA比较难，很难大规模生产。目前，我国工业生产的HA，基本上都是从低级别煤（泥炭、褐煤、风化煤）中直接提取的。不少煤炭腐植酸原料中HA含量并不多，因此必须通过各种加工途径提高低级别煤中腐植酸（黄腐酸）的含量及其活性官能团的含量，可通过机械活化、物理分离、化学氧化及生物降解等方法来实现。

腐植酸的生产过程中常用的提取、纯化方法有：碱溶酸沉淀法、有机溶剂萃取法、离子交换树脂法、大孔树脂法等。目前，国内外分离腐植物质的经典方法是碱溶酸沉淀法，最常用的是氢氧化钠和焦磷酸钠。腐植酸中的阳离子可被焦磷酸络合，腐植酸被转化为钠盐。但在中性条件下，只有腐植质中强极性的部分被溶解，所以一般采用焦磷酸钠和氢氧化钠混合液浸提腐植酸。

硝酸氧化降解生产腐植酸（黄腐酸）：加压、常压条件下，经硝酸氧化降解后低级别煤中水溶性硝基黄腐酸的含量及产物中氮元素含量都增加了，其中的脂肪结构和芳环都被破坏，氧化降解形成-COOH、-OH、-C=O。李宝才等^[5]用硝酸氧化降解云南寻甸褐煤发现降解后FA含量有显著提高，其中的活性官能团含量也有一定的提高。硝酸氧化降解的方法存在有两点制约因素：（1）硝酸来源少且价格高，有条件的地方才适用。（2）硝酸反应产生尾气（NO和NO₂），不环保。

生物化学降解生产腐植酸：20世纪中叶，就有人开始使用生物降解制取腐植酸。现已发现多种真菌（曲霉、青霉、担子菌等）和细菌（放线菌、链霉、杆菌等）都对HA的芳环结构有选择性氧化降解的作用。

提取出来的腐植酸含有较多的无机质，腐植酸的纯化主要是去除无机质（俗称脱灰）。现有的方法^[6]是：渗析和电渗析法、吸附分离、重金属络合分离、用表面活性剂分离、溶剂分离。

1.1.3 腐植酸、黄腐酸的结构和性质

腐植酸结构复杂，斯尼茨尔和奥格纳根据黄腐酸的降解过程，提出黄腐酸可能含有苯羧酸和酚酸等物质成分，它们是通过氢键连接而形成的具有一定稳定性的多聚结构—黄腐酸。此多聚结构具有非常强的吸附能力，能吸附有机化合物和

无机化合物。斯尼茨尔提出了一个与实验室研究结果比较吻合的结构式。此结构式是由苯羧酸和酚酸通过氢键连接形成，其结构式见图1.1：

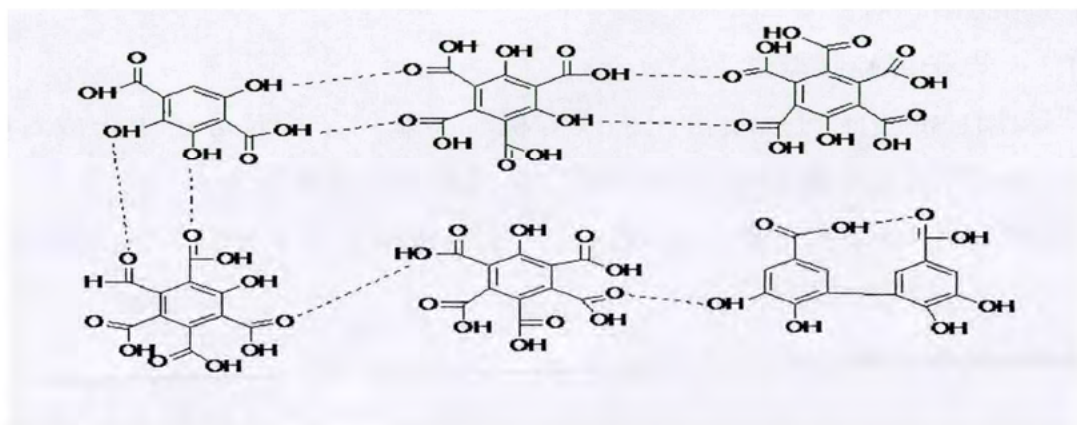


图 1.1 Schnitzer 提出黄腐酸的结构

Fig.1.1 The structure of FA proposed by Schnitzer

现在主要用紫外/可见光谱 (UV/VIS)、荧光光谱分析、红外光谱 (IR)、电子自旋共振谱 (ESR)、核磁共振 (NMR)、热分析 (DTG/DTA)、X 射线衍射分析 (XRD) 等技术来对 HA 进行结构分析^[7]。

1.1.3.1 紫外/可见光谱

HA的紫外/可见吸收光谱的典型特征^[8]：在波长为200~800nm时，光吸收量随波长增加呈递减趋势，并且吸收值依赖于pH值的变化，pH值升高，光吸收值也升高，反之则降低^[9]。

1.1.3.2 荧光光谱

应用荧光光谱解析HA的结构特征是一种经典的方法^[10,11]，由于HA中官能团和某些特殊结构部位在吸收入射光后有发射荧光的能力，据此对HA的结构和性质进行鉴定和分类^[12-14]。HA的荧光光谱特性相当显著，各种不同来源的HA荧光发射光谱都至少有一个峰值，并且峰的位置与HA的来源密切相关。此外，芳构化程度深、共轭程度高、吸电子基团多的HA在长波区有强吸收；反之，则在短波区有强吸收。

1.1.3.3 红外光谱

不同来源HA的IR特征吸收峰的位置或强度可能会有些变化，没有统一的规律可循，但同一来源HA遵循以下规律：随着分子量的减少，1100~1020cm⁻¹(多糖或

类似多糖物质的C-O伸缩震动)、 1720cm^{-1} (羧基和羰基的C=O伸缩)和 2920cm^{-1} (脂肪C-H的伸缩)位置的吸收峰逐渐增强,表明小分子量的HA羧基、羰基相对含量高,脂肪碳相对含量高。

1.1.3.4 电子自旋共振谱

利用ESR技术可以获得无机或有机游离基的结构及分子中未成对电子的密度。Rex^[15]最早发现HA具有顺磁性,并判断出其中不成对的电子属自由基类型。Wilson^[16]对HA在不同pH值溶液中的自由基浓度进行了测定,认为这些自由基全部或几乎全部是半醌结构。

1.1.3.5 核磁共振

光谱学方法是从官能团的特征谱解析HA, NMR则是从H、C、N和P的化学键方式解析HA。

腐植酸的氧化程度越高,活性官能团(羧基、酚羟基、醌基等)越多,生物活性就越高。黄腐酸就是其中分子量最小、活性官能团含量最多的一种腐植酸。黄腐酸具有腐植酸的一般的特性,也具有优于一般腐植酸的特性,即:(1)分子量小、水溶性大,容易被机体吸收利用;(2)含氧功能团含量多,生物活性大。这两大特征使黄腐酸在农业、畜牧业、工业、医药保健等方面具有广泛的用途。

组成结构决定性质,但由于腐植酸组成结构的多样性和复杂性,不可能像单体化合物那样,结构和性质有较明确的对应关系。经过多年的研究,也明确了腐植酸的一些物理性质和化学性质。

(1) 腐植酸的物理性质: HA 为褐色到黑色的松散粉状物,腐植化程度越高颜色越深; HA 平均真密度为 $1.5\text{g}/\text{cm}^3$, FA 平均真密度为 $1.5\text{g}/\text{cm}^3$, pH 对密度也有影响,近中性时密度最高; FA 可溶于水和酸、碱性溶液及一些极性较大的有机溶剂, HA 则易溶于强碱性溶液和一些含氮的极性有机溶液。

(2) 腐植酸具有胶体化学和表面化学性质。

(3) 腐植酸具有酸性、离子交换性、络合性、氧化-还原性。

(4) 腐植酸具有一定的生物活性,如改良土壤、增进肥效、增进植物体内有益元素的转化、促进呼吸作用和酶活性等等。

1.1.4 腐植酸、黄腐酸的应用研究现状

1.1.4.1 腐植酸在农业方面的应用

腐植酸(HA)在农业领域,腐植酸具有改良土壤、增肥、促进植物生长、抗旱等作用已成为一项不争得事实。近年来,腐植酸在农业领域得到广泛的应用:

(1)腐植酸能改良土壤、化肥增效。土壤肥力是土壤供给植物水、肥、气等要素的能力,是制约农作物产量的主要因素,而土壤中有机质60%以上的HS含量的高低是衡量土壤肥力的主要指标之一。腐植酸对土壤能起到调节pH、减毒、提高土壤的生物学活性、促进土壤中微生物的活动以及养分的转化和释放等作用。将腐植酸与氮肥、磷肥、钾肥制造成各种腐植酸类复合肥,可提高氮肥、磷肥、钾肥对土壤的增肥作用。

(2)腐植酸能对土壤保水,史俊等^[17]用腐植酸和丙烯酸单体为原料制成树脂,发现腐植酸吸水性树脂与普通的聚丙烯酸吸水性树脂相比,除了吸水的能力增大以外,其耐盐、耐温能力也有较大的改善。

(3)腐植酸能提高植物抗病毒、抗寒、抗旱的作用,并促进种子提早萌发,促进植物根系生长,改善农产品品质。

在畜禽水产养殖业中,腐植酸得到广泛的应用。腐植酸可提高猪牛羊的肉产量,提高鸡鸭的产蛋量,防治畜禽疾病,调节养殖池的水质。

1.1.4.2 腐植酸在工业环保方面的应用

腐植酸不仅在农业、畜禽水产养殖业领域有广泛的应用,在工业、环保领域的应用也备受关注,有的还实现了产业化。主要有以下几个方面:

(1)作为钻井液处理剂,腐植酸起到调节钻井液流变性、降滤失性、降黏的作用。

(2)作为陶瓷的添加剂,可起到稀释和增塑的作用。

(3)作为混凝土的减水剂,能使水泥缓凝,改善水泥质量。

(4)在轻工业领域可作为染色剂和防腐涂料。

(5)在环保方面,腐植酸可对重金属、有机污染物进行处理。由于HA在土壤、地下水中普遍存在,并且具有溶解或悬浮金属的特性^[18],因此在环境毒理学研究中可用来辅助溶解金属^[19]。将HA制成树脂,可重复使用并提高对金属离子的吸附效率。

1.1.4.3 腐植酸在医药保健方面的应用

近年来,有许多报道肯定了腐植酸及黄腐酸在止泻、抗炎、抗菌、抗病毒、抗溃疡、免疫调节、活血止血、治疗白血病等方面的显著效果^[20-39],具体如下:

(1) 在临床上腐植酸能用于治疗急慢性腹泻。王衍山等^[23]用 0.5%黄腐酸钠灌肠治疗急慢性腹泻 26 例,得到比较满意的疗效,有效率高达 96.2%。

(2) 腐植酸及黄腐酸具有抗炎的作用:

抗炎药理作用通过抑制大鼠足肿胀、二甲苯致小鼠耳炎等实验来证明。Klöcking研究发现HA-NH₄的抗炎作用比HA-Na强,分别是乙酰水杨酸和氨基安替比林作用的两倍。祝亚勤等^[25]发现草炭黄腐酸钠具有明显的抗炎作用,对蛋清所致的大鼠足肿胀有明显的抑制作用,腹腔注射2h以后抑制率达到30%,7个小时后作用仍很明显;在慢性炎症实验(大鼠棉球直入法)中发现FA-Na对大鼠植下棉球所致的肉芽增生的抑制作用很明显。腐植酸药物可内服或外用,外用时它可通过皮肤进入人体,抑制炎症形成,使炎症的红、肿、热、痛减轻,减轻外周神经的痛感。

(3) 腐植酸及黄腐酸具有抗菌的作用:

陈启新等^[27]采用痘苗病毒进行了生物工程生产纯化的腐植酸小分子组分的体外抗病毒实验,发现腐植酸抑制病毒繁殖且对正常传代细胞无毒性反应;腐植酸能诱导小鼠和细胞产生干扰素,而干扰素具有广谱的抗病毒、抑制肿瘤生长和调节免疫等多种生物活性;腐植酸能增强小鼠NK细胞活性,NK细胞是抗病毒的作用机制之一。朱育凤等^[28]用黄腐酸钠制成的石炭膏对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌进行了体外抗菌试验。结果发现,石炭膏对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌以及大肠杆菌均有较强的抗菌作用,对金黄色葡萄球菌的抑杀能力强于大肠杆菌和绿脓杆菌。国外也有不少关于腐植酸抗菌、抗病毒的报道。德国、匈牙利发现腐植酸对革兰氏阴性菌、枯草芽孢杆菌、绿脓假胞杆菌、金色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌都有抑生作用。Klöcking等发现HA-NH₄对疱疹病毒及Coxsackie VirusA9病毒都有抗病毒作用。南非Girish J. Kotwal^[29]利用黄腐植酸与石榴汁中的多酚类化合物、β-谷甾醇和鞣花酸制备出了能抑制牛痘病毒、艾滋病(HIV)病毒和非典(SARS)病毒的药物。

(4) 黄腐酸能保护胃肠黏膜损伤,促进溃疡的愈合。张建树等^[30]发现黄腐酸钠与甲硝唑、谷维素合用,对不耐受磺胺类药物的溃疡性结肠炎患者进行治疗取得满意的疗效,该复方可以促进溃疡迅速愈合,肠镜检查粘膜恢复正常,停药 6

个月后无一例复发。于建新等^[31]用自拟健脾化湿汤配合腐植酸灌肠治疗溃疡性结肠炎 82 例, 1~3 个疗程内, 痊愈 62 例, 显效 17 例, 无效 3 例, 总有效率 96.34%。

(5) 黄腐酸钠具有独特的活血作用, 可明显降低血液粘度、改善微循环障碍等作用。临床观察发现黄腐酸钠对于缓解糖尿病合并周围神经病变患者的疼痛有明显疗效。杨光然等^[32]对黄腐酸钠的研究发现, 黄腐酸钠可减轻重症胰腺炎, 使大鼠胰腺血流量减少; 对实验性糖尿病视网膜病变有一定抑制作用。实验发现, HA-Na 不能降低糖尿病大鼠的血糖; 但治疗组其神经组织山梨醇含量明显低于病理组, 提示 HA-Na 对糖尿病大鼠周围神经变化有一定的抑制作用。活血化瘀的 HA-Na 虽不能降低血糖, 但在改善糖尿病神经病变方面仍有一定作用。

(6) 黄腐酸钠具有抗心律失常的作用。白建平等^[33]发现黄腐酸钠能缩短由 BaCl₂ 诱发大鼠心律失常持续的时间, 使氯仿诱发小鼠室颤的发生率降低, 使乌头碱诱发大鼠心律失常出现的时间延迟, 其抗心律失常的作用机理可能是与阻止肌细胞 Ca²⁺ 或 Na⁺ 内流, 稳定细胞膜有关。

(7) HA 有诱导白血病细胞凋亡的作用。

Hsin-Ling 等^[35]通过对人早幼粒白血病 HL-60 细胞系的细胞活性丧失、染色质凝聚、核小体间 DNA 断裂等凋亡特征的观察, 研究腐植酸诱导细胞凋亡的作用, 观察了不同时间不同剂量 (50-400 μg/mL) 腐植酸对细胞凋亡的影响。

Hsin-Ling 等发现腐植酸诱导细胞凋亡与 Bax 蛋白水平相关, 同时可观察到 Bcl-2 蛋白水平有微量降低。实验发现处于凋亡期的 HL-60 细胞溶质中细胞色素 c 含量升高, 同时线粒体中相应减少, 细胞色素 c 由线粒体转移至细胞溶质从而激活 caspase3 (天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶)。

Ca²⁺ 作为一种普遍的介质, 在细胞凋亡中扮演着重要的角色^[36]。腐植酸可降低内皮细胞活性并更改其作用, 腐植酸与内皮细胞的相互作用可能直接增加 Ca²⁺ 的通透性, 然后通过激活蛋白激酶或其他 Ca²⁺ 依附酶而过度刺激 Ca²⁺ 第二信使系统。这些发现意味着腐植酸可能通过持久维持细胞溶质内 Ca²⁺ 浓度, 导致核酸内切酶活化, DNA 断裂, 细胞凋亡, 从而诱导 HL-60 细胞死亡。

电子自旋共振谱检测显示腐植酸内存在自由基, 该基团稳定存在于腐植酸大分子基团中。曾有研究发现腐植酸可能是通过介导超氧阴离子使兔关节处软骨细胞氧化损伤^[37]。由此推测氧性应激可能是腐植酸诱导 HL-60 细胞凋亡的介质之一。HL-60 细胞在受到致命损伤期间腐植酸对 NO 的含量有影响, 可提高 NO 生

成量。经腐植酸处理过的 HL-60 细胞可提高 NO 生成量,可能会导致 HL-60 细胞损伤。

因此,腐植酸通过诱导细胞色素c易位、caspase3活化、Bcl-2和Bax蛋白比例失调,使HL-60细胞凋亡。

(8) HA在治疗癌症方面的应用。

As₂O₃ 常用于治疗癌症。宫颈癌是影响女性生活的第二大癌症,近来体内外研究表明三氧化二砷(As₂O₃)可通过促进细胞凋亡及抑制癌细胞转移起到抗癌疗效。Hung-Chih Ting等^[38]通过对细胞增殖,细胞死亡,胞内ROS及谷胱甘肽的测定,来验证As₂O₃与HA合用对人宫颈癌HeLa或SiHa细胞系在体外的生长抑制性及影响。

As₂O₃单独作抗癌剂时,可抑制体内早期肿瘤生长,但是从患晚期肾癌、晚期黑素瘤、早期肝癌,心室内阻滞或复发性宫颈癌住院病人的II期临床试验初步数据看来,还不能得出定论^[39]。这说明 As₂O₃单独抑制实体瘤增殖疗效有限。为设法增强其临床活性,应与其他治疗方式相结合。

近来有报告称 As₂O₃ 作用于肿瘤细胞而产生 ROS 是细胞凋亡的主要原因之一,HA 可与无机及有机物质发生化学反应,可能参与氧化还原调节。As₂O₃ 可诱导产生过氧化物和 H₂O₂。HA 可产生 ROS,如超氧负离子等,并可消耗谷胱甘肽和几种抗氧化酶。HA 作用的 HeLa 细胞内 ROS 也不断增加,这表明 HA 相比于 As₂O₃ 是一种更稳定的自由基供体。

研究表明 As₂O₃ 和 HA 并用作用于人宫颈癌 HeLa 或 SiHa 细胞系时,其抗增殖效应和生长抑制作用显著增强,最可能是由于 ROS 介导细胞损伤并激活了细胞凋亡途径。

(9) HA 具有解毒的作用^[40]。HA 有重金属解毒的作用并能防止铵中毒,对马钱子等药物毒性也有缓解作用。

(10) HA 在其他方面的应用。

黄腐酸可用作药用辅料,FA 与阿司匹林包合后可显著提高阿司匹林的稳定性。Mohammad Khalid Anwer 等^[41]用不同的方法分别将黄腐酸(FA)、羟丙基-β-环糊精与阿司匹林络合,观察不同的络合物对阿司匹林(ASA)稳定性的影响。结果发现 FA 和羟丙基-β-环糊精均能提高阿司匹林的稳定性,但 FA 在提高阿司匹林的稳定性方面的能力不及羟丙基-β-环糊精。

腐植酸在化妆品行业也有应用，HA与保湿因子等配制成护肤霜、护手霜，对皮肤有较好的保湿效果。HA对透明质酸酶的活性有抑制作用而且有类激素样的特征，将HA添加到粉刺类产品的基质中，并与黄芩、黄连、黄柏等中药制成面膜、洗面奶等产品，此类产品经医院临床观察，其对粉刺防治高达90%以上^[42]。

腐植酸也有些副作用，Lee WJ 等^[33]发现腐植酸可能通过激活多重信号通道（ERK，JNK 和 PI3K/Akt）而加强人肺腺癌细胞系 A549 的增殖，并增强 AP-1 和 NFκB 的转录激活。还有资料表明腐植酸与大骨节病、黑足病和周围血管疾病有关，还能诱导人体 TM4 细胞生长发育迟缓^[44-45]。

腐植酸资源非常丰富，药理作用明显，有些专家认为，腐植酸类药物可能代替一些对人体有害的药物来治疗一些重大的疾病。但腐植酸结构和成分复杂，且不同的来源和提取工艺得的产物成分又并不完全相同，因而增加了腐植酸在医学研究上的难度和复杂性，不同的研究者可能得出不完全一样的结论。目前，对腐植酸各种治疗作用的机制和构效关系的研究还相对较少，很多治疗作用的机制和构效关系还不十分明确。同时，要将腐植酸应用于医药领域，不可回避的一个问题就是腐植酸对人体的毒理作用，但目前对腐植酸的安全性的研究还不够充分，并不能得出完全肯定的结论。因此在很大程度上限制了腐植酸类物质在医药领域的应用。

所以，要使腐植酸类物质在医学上的应用得到更好地发展，还需要解决好如下几个问题：

（1）标准化问题。腐植酸类物质的来源、提取工艺都要标准化，使实验所用药品成分一致，使不同研究者可以得到重复性较好的实验结果，从而降低分析处理实验数据的复杂度、提高不同实验数据的可比性。

（2）腐植酸的治疗作用机制问题和构效关系问题。需要开展更多、更深入的研究，只有知道了腐植酸的结构以及所起药效的机制，清楚了其起作用的成分的构效关系，才能通过提取纯化有效成分，去除杂质成分，从而提高药效、降低毒副作用。

（3）腐植酸的安全性问题。需要更深入地对腐植酸进行有关安全性研究，包括给药方式、给药时间和各种剂型的安全性研究，特别是涉及HA长期毒性和特殊毒性的研究。

只有解决好这些问题，HA在医药领域中的应用才能得到更长远的发展。