

氧化应激与实热“上火”的相关性研究

李思敏¹ 包洁² 汪琴静³ 窦晓兵² 范永升²

(1 浙江中医药大学附属第三医院, 杭州, 310005; 2 浙江中医药大学, 杭州, 310053; 3 浙江中医药大学附属江南医院, 杭州, 311201)

摘要 目的:通过检测观察组血液中过氧化指标(MDA、ROS)和抗氧化指标(GSH、T-AOC、SOD)的变化,探讨氧化应激与实热“上火”的相关性。方法:分别收集临床实热“上火”和正常人群的样本,检测其血浆中MDA、GSH、SOD、T-AOC水平和外周血白细胞中ROS含量,进行比较。结果:与对照组比较,观察组血浆中MDA、GSH、SOD、T-AOC浓度水平均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而白细胞内的ROS含量显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:观察组过氧化指标与抗氧化指标均有显著变化,说明实热“上火”与氧化应激密切相关,观察组机体处于过氧化与抗氧化相互交争状态,但氧化与抗氧化水平尚且处于平衡阶段。

关键词 实热“上火”;氧化应激;MDA;ROS;GSH;T-AOC;SOD

Study on Correlation between Oxidative Stress and Excess Heat “Shang huo”

Li Simin¹, Bao Jie², Wang Qinqing³, Dou Xiaobing², Fan Yongsheng²

(1 College of 3rd Clinical Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2 Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 3 Jiangnan Hospital Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 311201, China)

Abstract Objective: To study the correlation between oxidative stress and excess heat “shanghuo” through observing the changes of blood lipid peroxidation index (MDA, ROS) and antioxidant indexes (GSH, T-AOC, SOD) in the population of excess heat “shanghuo”. **Methods:** Excess heat “shanghuo” and normal population samples were collected, and the levels of MDA, GSH, SOD and T-AOC in plasma and ROS in peripheral blood leukocytes were detected and compared respectively. **Results:** The levels of MDA, GSH, SOD and T-AOC in the blood plasma of excess heat “shanghuo” were higher than those in the normal group ($P < 0.05$), and the levels of ROS in leukocytes decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** The excess oxidation index (MDA) and antioxidant index (GSH, SOD, T-AOC) were all increased in excess heat “shanghuo” people, and the levels of ROS in leukocytes decreased significantly, indicating that excess heat “shanghuo” is closely related to oxidative stress; the organism is in a level state of oxidation and antioxidation, but the oxidation and antioxidant levels are in balance.

Key Words Excess-heat “shanghuo”; Oxidative stress; MDA; GSH; T-AOC; SOD; ROS

中图分类号:R22 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.002

“上火”是指人体阴阳失调,表现为目赤、口疮、口腔溃疡、牙龈肿痛、咽痛、口干、尿赤、便干等一系列热象的病症^[1]。中医根据其基本病机将“上火”分为实热“上火”和虚热“上火”,实热“上火”属实热证,症见高热,目赤,渴喜冷饮,烦躁,小便黄,大便秘结,舌红苔黄,脉数等^[2],是最为常见的“上火”现象之一。“上火”一般认为是由人体各器官之间的不协调所造成,医学上也称之为应激性疾病^[3],是一种包括中枢神经、内分泌及免疫系统的应激负荷反应过程^[4]。随着社会的发展,工作节奏加快和精神压力不断增大等问题的出现,“上火”已成为常见的病证,因此,研究“上火”的机理具有现实意义。

中医学认为人体内外都是以阴阳平衡的形式存在,美国 Brunswick 研究中心在比较东西方文化中提

出的抗氧化的关系与阴阳学说时认为,过氧化及抗氧化平衡状态与体内的阴阳制约过程相关^[5]。而“上火”则是由于各种原因使人体内的阴阳平衡遭到破坏而出现的一些火热症状,因此,推测机体所表现的“上火”与“泄火”的生理反应可能是对应机体内的过氧化和抗氧化过程。丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、总抗氧化能力(T-AOC)、活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)等是临床常用的氧化应激指标,本文选取观察组及正常人群进行对照研究,探讨氧化应激与实热“上火”的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取浙江中医药大学学生及浙江中医药大学附属第一医院门诊的患者和健康体检者32例,随机分为观察组和对照组,每组16例。观察

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2014CB543001)

作者简介:李思敏(1989.09—),女,硕士,中医师,研究方向:中医药防治风湿自身免疫系统, E-mail:352930851@qq.com

通信作者:范永升(1955.11—),男,博士,教授,国家重点学科带头人,研究方向:中医药防治风湿自身免疫系统, E-mail:fysjztc@163.com

组男 7 例,女 9 例,平均年龄(25.06 ± 1.84)岁;对照组男 5 例,女 11 例,平均年龄(24.06 ± 1.18)岁。经过统计学分析,2 组间基线资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。见表 1。本研究经过浙江中医药大学伦理委员会批准并经患者及其家属知情同意。

表 1 2 组基线资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	性别(例)		年龄(岁)
	男	女	
实热“上火”组($n=16$)	7	9	25.06 ± 1.84
正常对照组($n=16$)	5	11	24.06 ± 1.18

1.2 诊断标准 1)1 个主症(头面部症状)或 2 个次症(至少 1 个头面部症状)。主症:口腔溃疡、咽喉肿痛、牙龈肿痛、口苦、口臭、鼻疮疖、热疮、目赤干涩;次症:口角糜烂、目眵增多、口渴、舌痛、鼻衄、鼻腔干燥、大便干结、心烦、小便黄、多食易饥、五心烦热、痔疮发作、潮热。2)实热证的诊断标准:1 个主症 + 舌象或脉象。主症:眼眵或痰、发热或恶热、面红、目赤、牙龈肿痛、大便秘结;舌脉:舌质红,苔黄燥,脉数而有力。3)平和质的诊断标准:主症:阴阳气血调和,体态适中、面色红润、精力充沛、睡眠良好,胃纳佳,二便正常;舌脉:舌色淡红,苔薄白,脉和缓有力。

1.3 纳入标准 实热“上火”组按照:1)符合“上火”及实热证的诊断标准;2)年龄在 18 ~ 60 周岁之间者;3)自愿参加本实验并签署进入临床研究知情同意书者。正常对照组纳入标准:1)符合平和质的诊断标准;2)年龄在 18 ~ 60 周岁之间者;3)自愿参加本实验并签署进入临床研究知情同意书者。

1.4 排除标准 1)不符合入选标准者;2)合并各系统靶器官严重病变、精神病、肿瘤等疾病的患者;3)怀孕及哺乳期妇女;4)研究中认为有任何不适宜入选情况者。

1.5 治疗方法 本研究采用病例对照研究方法,所有受试者均签署书面知情同意书,之后进行一般资料采集及采血检测。

标本采集与处理:所有受试者入组后抽取晨间外周静脉血约 10 mL,分装于 EDTA 抗凝试管内,立即混匀,于 2 000 r/min,离心 15 min,转移上层血浆至进口 1.5 mL 管 EP 管内,每份 500 μ L,一般可取 5 ~ 8 管,标记后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存待检。(从样本采集到分装完毕保存不超过 4 h)。采用硫代巴比妥法检测血浆中 MDA 含量,采用分光光度计法检测血浆中 GSH 含量,采用化学比色法检测血浆中总抗氧化

能力(T-AOC)含量,采用 DCFH-DA 荧光探针法测定外周血白细胞活性氧(ROS)含量,采用黄嘌呤氧化酶法测定血浆中超氧化物歧化酶(SOD)浓度。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析,计量数据用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均值间差异比较用独立样本 t 检验;计数资料用 χ^2 检验,均采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆中 MDA 的浓度水平比较 结果显示,与对照组比较,观察组血浆中 MDA 浓度水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 2 组人群血浆 MDA 浓度变化($\bar{x} \pm s$, nmol/L)

组别	MDA(nmol/L)
实热“上火”组($n=16$)	$1.92 \pm 0.74^*$
对照组($n=16$)	1.30 ± 0.82

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

2.2 白细胞内 ROS 含量比较 结果显示,与对照组比较,观察组细胞内的 ROS 含量显著下降,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 2 组人群细胞内 ROS 含量变化($\bar{x} \pm s$)

组别	ROS
观察组($n=16$)	$4.13 \pm 0.1912^*$
对照组($n=16$)	4.98 ± 0.2482

注:与对照组比较, * $P < 0.01$

2.3 血浆中 GSH、T-AOC、SOD 的浓度水平比较 结果显示,与对照组比较,观察组血浆中 GSH、T-AOC、SOD 浓度水平有所升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 2 组血浆中 GSH、T-AOC、SOD 浓度水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	GSH(μ mol/L)	T-AOC(U/mL)	SOD(U/mL)
观察组($n=16$)	$22.14 \pm 7.46^*$	$11.86 \pm 2.86^*$	$17.90 \pm 0.4524^*$
对照组($n=16$)	13.36 ± 4.03	7.09 ± 2.89	15.45 ± 0.3167

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

“上火”是指人体阴阳失衡,表现为一系列热象的病症^[1]。《尚书·洪范》中曰:“火曰炎上”,高度概括了火的特性,因此“上火”是以头面部的损害为主^[6],多表现为眼干、目赤、口腔溃疡、牙龈肿痛等症状。现代医学一般认为是人体各器官之间不协调所造成,有的也称之为应激性疾病^[3],是一种包括中枢神经、内分泌及免疫系统的应激负荷反应过程^[4]。氧化应激是指在遭受有害刺激时,机体内活性自由基产生增多,并超出抗氧化酶的清除能力,造成抗氧

化系统和氧化系统失衡,引起生物损伤的一种反应^[7],如脂质过氧化过程产生多种醛类可促使细胞凋亡,被认为是导致疾病和衰老的一个重要因素^[8]。文献研究和临床观察均表明氧化应激与“上火”的主要症状具有一定的相关性。陈谦明^[9]等认为氧自由基可能是口腔溃疡的致病因素,它能产生大量的脂质过氧化物(LPO),造成细胞生物膜损伤导致口腔溃疡的发生。顾健峰^[10]等研究发现复发型口腔溃疡患者在发作期和缓解期时体内的 OX-LDL、MDA 水平较健康对照组均升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 RAU 患者机体内氧化应激状态增强,自由基产生过多,脂质过氧化产物增多。因此脂质过氧化损伤与口腔溃疡发病关系密切。冯亚卿^[11]等研究推测眼表发生氧化反应,产生过氧化物酶,进一步产生氧自由基使眼表组织损伤,从而导致眼干。Tsubota^[12]等研究干眼动物模型,发现眼表上皮功能障碍的发生与氧化应激有关。Nakamura^[13]等发现随着干眼症状的加重,干眼患者的结膜上皮中一氧化氮合酶随之增加。这些均提示氧化应激反应与眼干的发病过程具有一定的联系。张美芳^[14]等研究显示,牙周病患者血液及唾液中的 SOD 浓度均明显低于正常对照组,可能与牙周病氧化应激中抗氧化酶的大量消耗以及抗氧化相关营养素摄入不足有关,与 Singh^[15]的研究结果相同。黄萍^[16]等研究发现牙周病组龈沟液 GSH-Px 显著低于正常对照组,但在非手术治疗后,GSH-Px 可显著增高。证明氧化应激参与了牙龈肿痛的发病过程。

活性氧是体内氧自由基的一种(包括活性氧基 ROS 和活性氮基 RNS),正常情况下,生物体内存在适量的氧自由基,参与维持人体各种生理功能。但当体内的氧自由基的含量超过一定限度时,便可与细胞内的各种分子结合,引发一系列生物级联反应,如变异、激活细胞因子,最终导致细胞凋亡或者坏死^[17]。线粒体呼吸链漏出的电子被氧分子捕获,形成超氧阴离子是氧自由基的主要形成途径,约占线粒体正常总耗氧量的 1%~2%^[18]。在许多生理状态下,例如低氧、自噬、细胞分化等情况下,低剂量的 ROS 可以作为细胞信号分子,促进细胞适应应激^[19];而高剂量的 ROS 则会损害脂质、蛋白质和 DNA。

丙二醛(MDA)是自由基作用于脂质发生过氧化反应,产生的脂质氧化终产物,是常用的膜脂过氧化指标^[20],与机体过氧化的程度密切相关。又因 MDA 便于测定且重复性好,因此常通过测定 MDA

含量来反映机体受氧化应激损伤的程度及抗氧化性能的好坏^[21-23]。当 MDA 水平升高时,提示产生的脂质氧化终产物增加,已发生氧化反应,总抗氧化活性降低,过氧化与抗氧化失衡即发生氧化应激反应,可导致机体相关疾病发生,如衰老、多种心血管疾病、糖尿病、氧中毒、烧伤等^[24]。

此外,生物体内同时存在抗氧化防御的体系,包括超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、过氧化氢酶(CAT)及非酶类物质谷胱甘肽、尿酸、维生素和胡萝卜素等^[25]。抗氧化防御体系能够抵御适量的自由基,将其限制在正常生理功能之内,时刻保持着生物体内氧化和抗氧化的动态平衡。但当机体受到过度刺激,无论是内源性还是外源性的刺激,或者当机体发生病理改变时,体内氧自由基大量产生,远远超过抗氧化防御体系的清除能力时,则氧自由基就会在体内大量停留,产生破坏作用,而这就是氧化应激(OS)^[17]。

谷胱甘肽(Glutathione)是一种自由基清除剂,有氧化型(GSSG)和还原型(GSH)2种形式,其中还原型谷胱甘肽(GSH)占大约 95%^[26],参与体内糖代谢及三羧酸循环,通过激活多种酶,促进蛋白质、糖及脂肪代谢。在糖尿病、酒精性肝病、肝硬化、外源性毒物致过氧化时、艾滋病、帕金森病、衰老及低氧血症等病理情况下,GSH 水平会下降,有研究发现老年人伴 GSH 低下者的身体健康状况较 GSH 高者差,也进一步提示,GSH 在体内抗氧化过程中的重要作用^[27]。

机体内还存在多种抗氧化物,如酶、抗氧化小分子和抗氧化大分子等,可清除体内产生的各种活性氧,从而阻止氧化应激的产生。因此可以说一个体系内的各种抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶的总的水平即可以体现该体系内的总抗氧化能力 T-AOC^[28],通过测定 T-AOC 不仅经济省时,还可同时反映一些目前技术上尚难以衡量或可能尚未被发现的抗氧化剂的效应。在许多病理情况下 T-AOC 水平表现下降,如荨麻疹、肺水肿、急性肺炎、糖尿病、原发性高血压、肾性高血压、脑出血、脑梗死等,一般年老者均较年青者低,提示体内抗氧化能力明显降低,氧化损伤作用增强。

本研究通过检测 MDA、GSH、T-AOC、SOD、ROS 在观察组及正常对照人群的血浆中浓度的变化,结果显示:观察组 MDA、GSH、SOD、T-AOC 浓度水平均升高,白细胞内的 ROS 含量显著下降,提示实热“上火”与氧化应激密切相关,在“上火”上火状态时,体

内产生脂质过氧化物,较正常时增加,提示已经发生过氧化反应,正邪相争,出现口腔溃疡、牙龈肿痛等“上火”症状,但同时机体就开始启动自身的抗氧化防御体系,总抗氧化水平 T-AOC 增加,如生成大量的 GSH、SOD,及时清除不良刺激,这也是体内 ROS 维持在较低水平的原因之一。说明实热“上火”状态下,机体处于过氧化与抗氧化相互竞争状态,但氧化与抗氧化水平尚且处于平衡阶段。

参考文献

- [1]何森泉,鲍玺,温成平. 火热证候的临床特征[J]. 中华中医药杂志,2013,28(3):791-792.
- [2]谢志军,王伟杰. 上火病因病机初探[J]. 浙江中医药大学学报,2013,37(3):226-228.
- [3]唐晓阳,谢冠群,范永升. 现代医学对上火的认识及其对中医治疗的启示[J]. 浙江临床医学,2013,15(3):389-390.
- [4]何蓉蓉,栗原博. 论“上火”与应激反应[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2008,10(5):37-41.
- [5]Ou B, Huang D, Hampshwoodill M, et al. When east meets west: the relationship between yin-yang and antioxidation-oxidation[J]. FASEB Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2003, 17(2):127-129.
- [6]潘照,朱星瑜,范永升. 从能量代谢及粘膜免疫看“上火”与肠道菌群的关系[J]. 浙江中医药大学学报,2015,39(8):591-594.
- [7]Kohen R, Nyska A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification[J]. Toxicologic Pathology, 2002, 30(6):620-650.
- [8]Kirkham P A, Caramori G, Casolari P, et al. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease[J]. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine, 2011, 184(7):796-802.
- [9]陈谦明. 口腔黏膜病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:125-126.
- [10]顾健峰,马建华,李瑜芳. 复发性口疮患者血浆氧自由基及脂质过氧化水平检测的意义[J]. 中外健康文摘,2012,9(8):142-143.
- [11]冯亚卿,陈轶卉,盛敏杰. 干眼发病机制的研究进展[J]. 国际眼科纵览,2008,32(3):213-216.
- [12]Tsubota K. Oxidative stress and inflammation: hypothesis for the mechanism of aging[J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2007, 111(3):193-205.
- [13]Nakamura S, Shibuya M, Nakashima H, et al. Involvement of Oxidative Stress on Corneal Epithelial Alterations in a Blink-Suppressed Dry Eye[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007, 48(4):1552-1558.
- [14]张美芳,黄怡憬,张海峰,等. 氧化应激与牙周病易感性的相关分析[J]. 上海口腔医学,2013,22(5):571-576.
- [15]Singh N, Chander NS, Kumar SR, et al. Vitamin E supplementation, superoxide dismutase status, and outcome of scaling and root planing in patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial[J]. Journal of Periodontology, 2014, 85(2):242-249.
- [16]黄萍,舒婷,王晖,等. 成人牙周炎患者治疗前后龈沟液中谷胱甘肽过氧化物酶水平的变化[J]. 华西口腔医学杂志,2000,18(2):106-108.
- [17]Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? [J]. British Journal of Pharmacology, 2004, 142(2):231-255.
- [18]Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, et al. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships[J]. Current Medicinal Chemistry, 2005, 12(22):2601-2623.
- [19]Sena L A, Chandel NS. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species[J]. Molecular Cell, 2012, 48(2):158-167.
- [20]Bouchama A, Roberts G, Al M F, et al. Inflammatory, hemostatic, and clinical changes in a baboon experimental model for heatstroke[J]. Journal of Applied Physiology, 2005, 98(2):697-705.
- [21]Wang L, Muxin G, Nishida H, et al. Psychological stress-induced oxidative stress as a model of sub-healthy condition and the effect of TCM[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 2007, 4(2):195-202.
- [22]张玲,王晓闻. 欧李仁多肽抗氧化作用的研究[J]. 中国食品学报,2012,12(7):36-41.
- [23]许丽璇,蔡建秀,岳枝玲. 桦褐孔菌乙醇提取物对小鼠体内外抗氧化作用研究[J]. 中国食品学报,2012,12(6):48-55.
- [24]刘时中,林壮基,黄谷送. 血清脂质过氧化产物—丙二醛测定及其意义[J]. 广东医学院学报,1985,1(1):18-22.
- [25]Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1):44-84.
- [26]赵绍强. 还原型谷胱甘肽、纳洛酮联合治疗急性酒精中毒 51 例分析[J]. 中国实用神经疾病杂志,2009,12(9):61-62.
- [27]王金权. 谷胱甘肽作为脂质过氧化损伤指标的临床研究[J]. 中国保健,2010,18(7):17-18.
- [28]罗丽萍,高荫榆,洪雪娥,等. 薯蓣黄酮和多糖体内抗氧化作用研究[J]. 食品科学,2005,26(8):408-410.

(2017-11-03 收稿 责任编辑:张文婷)