论著

蕨麻醇提取物的抗缺氧与抗氧化研究

李灵芝　张　丽　龚海英　赵　赤　张　岭　朱　毅　李广策　陈　洋　李建宇
(武警医学院,天津　300162)

摘　要:为研究蕨麻乙醇提取物的抗缺氧作用及初步机制,采用常压密闭缺氧模型、减压缺氧模型和特异性心肌缺氧模型研究其抗缺氧作用,采用紫外分光光度法研究其抗氧自由基对红细胞的氧化作用。蕨麻乙醇提取物能明显延长常压密闭缺氧小鼠、异丙肾上腺素致心肌损伤小鼠在密闭状态下的存活时间,降低整体耗氧量,并能显著增加减压缺氧状态下小鼠的存活率。有明显的抗氧自由基对红细胞的氧化作用。蕨麻乙醇提取物具有明显的抗缺氧作用,此作用可能与其抗自由基的能力有关。

关键词:蕨麻;蔷薇科;抗氧化;自由基

Study on anti-hypoxia and anti-oxidation effects of Poteutilla anserina **L. alcohol extract**

LI Ling-zhi, ZHANG Li, GONG Hai-ying, ZHAO Chi,
ZHANG Ling, ZHU Yi, LI Guang-ce, CHEN Yang, LI Jian-yu
(Department of Pharmacy, Medical College of Chinese People's Armed Police, Tianjin 300162, China)

Abstract: To study on the anti-hypoxia and anti-oxidation effect and its mechanism of the *Poteutilla anserina* L. alcohol extract in mice, the models of normobaric hypoxia, hypobaric hypoxia and specific myocardial hypoxia resulted from isoprenaline were used to study its anti-hypoxia effect. The spectrophotometry was used to study its anti-oxidative action on human erythrocyte with $O_2^{\cdot}$ in vitro. The extract obviously prolonged the survival time of mice in groups of normobaric hypoxia and specific myocardial hypoxia. The oxygen consumption of the mice was significantly less than that of the controls. The survival rate of mice in the incrementall hypobaric hypoxia group was higher than that of the control group. It was also confirmed that the extract could significantly counteract the oxidative action of $O_2^{\cdot}$ on erythrocyte. The *Poteutilla anserina* L. alcohol extract showed obvious anti-hypoxia and anti-oxidation effects. It was also suggested that the effects may be related to its activity of inhibiting oxygen free radicals.

Key word: POTEUTILLA ANSERINA L; ROSACEAE; Antioxiodant; Free Radicals

蕨麻(*Poteutilla anserina* L.)为蔷薇科植物鹅委陵菜的膨大块根,始载于《西藏常用中药材》,主要产于青海、西藏、甘肃等高寒地带。其富含淀粉、多糖、蛋白质、脂质、维生素和人体必需的多种氨基酸和微量元素,并含有委陵菜甙及黄酮类成分[1]。性味甘、平,具有健脾益胃,生津止渴,益气补血之功效,主治脾虚腹泻,病后贫血,营养不良等症。民间药用时间已久,但对其醇提取物的药理作用及机理探讨较少,本文系统研究了其乙醇提取物的抗缺氧化作用,并从抗氧化的角度初步探讨了其抗缺氧机制。

1　材料与方法

1.1　药品及材料　蕨麻购自青海,粉碎后用 90 % 乙醇回流提取,减压除净乙醇得浓缩浸膏 EPot(每克浸膏相当于 3.0 g 生药)。用前以 0.3 %羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液配成所需浓度的混悬液。盐酸普奈洛尔片(Propranolol hydrochloride tablet, Pro)天津力生制药股份有限公司(0405007)。异丙肾上腺素注射液(Isoprenaline hydrochloride injection, ISO)上海禾丰制药有限公司(031001)。

实验动物　昆明种小鼠,雌雄各半,体重(20 ±

基金项目:国家自然科学基金项目(30471934)
作者简介:李灵芝　女　教授　博士

This work was supported by a Grant from National Natural Science Foumdation of China. (30471934)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2) g,中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号:SCK-(军)2002-001。

紫外分光光度计　岛津 1601 型。

常压缺氧装置　参照曹守仪报道方法[2]改装而成,由 1 只 125 ml 广口瓶(预先用水校正体积)及连有 1 根 2 m 长硅胶管的橡胶塞组成,1 ml 水在管内占有 5 cm 长度,预先在管上标出刻度。

减压缺氧装置　由Φ330 mm 玻璃真空干燥器、真空循环水泵、真空安全瓶、洗气瓶组成。在抽吸干燥器中空气的同时,通过洗气瓶向箱内输入适量空气,输入气量随所需减压程度而定。

1.2　方法

1.2.1　小鼠常压缺氧实验　60 小鼠只随机分为 4 组,灌胃给药。第 1 组给予 CMC-Na 溶液,第 2 组给予盐酸普萘洛尔 0.03 g/kg BW,pro 组。第 3、4 组分别给予含 EPot 的 CMC-Na 溶液(10、5 g/kg BW),EPot Ⅰ组和 EPot Ⅱ组,给药体积均为 2 ml/kg BW。给药 50 min 后,盖紧常压缺氧装置的瓶塞(瓶内放置 5 g 钠石灰),长管另一端没入装满水的平盘,保持瓶与长管及平盘在同一水平面。以呼吸停止为标志,记录小鼠存活时间,并读出耗氧体积。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验方法比较差异。

1.2.2　小鼠减压缺氧实验　小鼠 40 只,随机分为 2 组,给药组灌胃给予 EPot 5 g/kg BW,对照组给予 CMC-Na 溶液,灌胃体积均为 2 ml/kg BW。50 min 后,给药组和对照组各取 5 只,放入减压装置中,减压速度为:10 min 减至 60 kpa,此后,按 55、50、45、40、35、30、26.7 kpa 递减,每个梯度 10 min。在 26.7 kpa(相当于海拔约 10 000 m)时停留,保持此压力不变,待动物死亡 50 %时,立即停止减压,缓缓放入空气,取出动物,记录各组死亡及存活数目,重复操作至实验完成。用 χ^2 检验统计存活率的显著性。

1.2.3　异丙肾上腺素引起小鼠特异性心肌缺氧实验　小鼠 75 只,随机分为 5 组,灌胃给药,前 2 组给予 CMC-Na 溶液,后 3 组分别给予 EPot 10、5 g/kg BW,盐酸普萘洛尔 0.03 g/kg BW,50 min 后,除第 1 组外,均腹腔注射 ISO 15 mg/kg BW,15 min 后,将小鼠放入常压缺氧装置中,同 1.2.1 方法,记录小鼠死亡时间及耗氧量。实验结果处理方法同 1.2.1。

1.2.4　抗 $O_2^{\cdot}$ 氧化红细胞实验　红细胞(RBC)取自正常人静脉血,用生理盐水洗 3 次,再用等渗磷酸缓冲液(PBS,pH 7.4)配成 10 ml/L RBC 悬浮液。按表 1 配制的反应体系,加入邻苯三酚启动反应后,立即用紫外分光光度计测定各反应体系吸光度(λ = 439 nm)随时间变化曲线,并测定反应 10 min 后的吸收光谱[3]。

表 1　不同反应体系溶液的配制

试样	RBC (10 ml/L)	PBS (pH 8.5)	EPot (15 g/L)	邻苯三酚 (50 mmol/L)
对照组	0.50	2.50	0	0
a	0.50	2.40	0.10	0
b	0.50	2.40	0	0.10
c	0.50	2.30	0.10	0.10

2　结果

2.1　对小鼠常压缺氧的影响　表 2 显示,与溶媒对照组相比蕨麻乙醇提取物 10.0 和 5.0 g/kg BW 使小鼠在常压密闭条件下的存活时间分别延长了 42.31 %和 27.17 %,差异具有显著性($P < 0.01$, $P < 0.05$),并能降低小鼠整体耗氧量。

表 2　蕨麻乙醇提取物对小鼠常压缺氧的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg BW)	死亡时间 (min)	耗氧量 C	延长率 (%)
对照组	—	17.37 ±2.98	198.28 ±31.04	—
Pro	0.03	26.11 ±2.10^b	159.46 ±13.73^b	50.32
EPot Ⅰ	10.0	24.72 ±3.92^b	168.25 ±26.11^a	42.31
EPot Ⅱ	5.0	22.91 ±2.22^b	179.09 ±16.33	27.17

注:与对照组相比,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$, $n = 15$。
C:耗氧量为每分钟每平方米体表面积消耗氧的毫升数。

2.2　对小鼠减压缺氧的影响　由表 3 可知,给予小鼠蕨麻乙醇提取物 5 g/kg BW,小鼠在减压缺氧条件下的存活率由对照组的 30 %提高至 70 %,差异具有显著性($P < 0.05$)。

表 3　蕨麻乙醇提取物对小鼠减压缺氧的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg BW)	存活数 (只)	死亡数 (只)	存活率 (%)
对照组	—	6	14	30
EPot	5.0	14	6	70^a

注:与对照组相比,a: $P < 0.05$, $n = 20$。

2.3　对小鼠特异性心肌缺氧的影响　由表 4 可知,提取物 10、5 g/kg BW 均能显著对抗 ISO 导致的心肌耗氧量增加($P < 0.01$),同时延长小鼠缺氧密闭状态下的存活时间($P < 0.01$)。

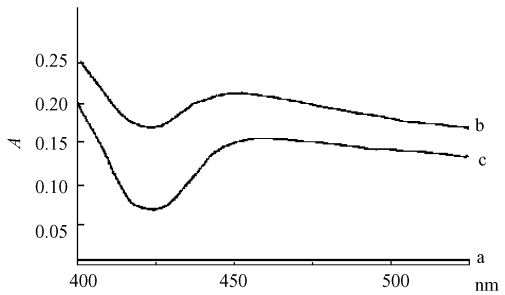
表 4　蕨麻乙醇提取物对小鼠特异性心肌缺氧的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg BW)	死亡时间 (min)	耗氧量 C
对照组	—	17.99 ±1.89	150.70 ±18.35
ISO	—	14.09 ±1.04^a	191.54 ±11.50^a
Pro + ISO	0.03	19.11 ±2.14^b	161.99 ±13.06^b
EPot Ⅰ + ISO	10.0	31.56 ±2.14^{a,b}	91.76 ±9.73^{a,b}
EPot Ⅱ + ISO	5.0	24.19 ±2.24^{a,b}	126.02 ±18.83^{a,b}

注:与对照组相比,a: $P < 0.01$, b: $P < 0.01$ ISO, $n = 15$。
C:耗氧量为每分钟每平方米体表面积的耗氧毫升数。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 抗 $O_2^{\cdot}$ 对红细胞的氧化作用　各反应体系在反应 10 min 后的吸收光谱及吸光度随时间的变化曲线见图 1、2。



a:RBC + 蕨麻乙醇提取物; b:RBC + 邻苯三酚;
c:RBC + 邻苯三酚 + 蕨麻乙醇提取物

图 1　与 RBC 作用的吸收光谱

a:RBC + 蕨麻乙醇提取物; b:RBC + 邻苯三酚;
c:RBC + 邻苯三酚 + 蕨麻乙醇提取物

图 2　$O_2^{\cdot}$ 与 RBC 作用时间曲线(λ = 439 nm)

3　讨论

由 $O_2^{\cdot}$ 与 RBC 作用的吸收光谱可以看出,a 体系在整个测定波长范围内基本无吸收,b、c 体系由于加入了邻苯三酚,其吸光度值在各个波长处与体系 a 相比均增大,这是由于邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化放出 $O_2^{\cdot}$ 作用于 RBC 膜,使其类脂分子中不饱和键被氧化,导致吸收增强。b 和 c 体系在 λ 为 439 nm 处均有最大吸收,但体系 c 在 439 nm 及其它在各个波长吸光度值与 b 相比均降低。由 $O_2^{\cdot}$ 与 RBC 作用时间曲线可以看出,b、c 两体系吸光度值均随着时间的延长逐渐增大,但 c 体系增大的幅度低于 b 体系,且随着时间的延长有逐渐趋于平缓的趋势,而 b 体系在测定时间内无平缓的迹象。说明提取物能够对抗 $O_2^{\cdot}$ 对细胞膜的氧化作用。文献报道青海蕨麻中维生素 C 含量很高[4],可以作为一种抗氧化剂清除自由基。此外黄酮类化合物由于酚羟基的存在,也具有抗氧化作用。但蕨麻中是否还有其它抗氧化的特殊化学成分,尚有待进一步研究证实。

曾有文献报道过蕨麻生药[1]及其水煎剂[5]的抗缺氧作用,但对其抗缺氧机制及其醇提物的抗缺氧作用尚未见报道。本实验观察到醇提取物浓度为 10.0 和 5.0 g/kg BW时,均可延长小鼠的常压缺氧耐受时间,并降低整体耗氧量,但随剂量增大,小鼠缺氧耐受能力增强更显著。醇提取物浓度为 5.0 g/kg BW时,还能明显提高小鼠在减压缺氧条件下的存活率($P < 0.05$)。这可能与实验中观察到的该提取物具有较强的对抗 $O_2^{\cdot}$ 的能力有关。机体缺氧时,体内自由基含量增加,清除自由基的能力下降。而蕨麻醇提物能够对抗自由基的作用,因此能增强机体的抗氧化活性,减少自由基对机体的损伤,从而延长了小鼠的缺氧耐受时间。

ISO 可增加心肌耗氧量,引起心肌损伤,甚至坏死,以此可形成心肌缺氧的特异状态。我们的实验结果也显示:小鼠给予 ISO 后,在缩短缺氧耐受时间的同时,其整体耗氧量也明显增加。蕨麻醇提物可延长 ISO 所致心肌损伤小鼠在密闭缺氧状态下的存活时间,显著降低整体耗氧量,且显示出剂量效应,表明它可能具有降低心肌氧耗,保护心肌的作用。但该作用是否像盐酸普萘洛尔一样通过拮抗 ISO 对心脏 β 受体的作用而实现,我们正在进行进一步的实验研究。

参考文献

[1] 贾守宁,杨卉. 蕨麻抗缺氧作用的实验研究[J]. 中国民族医药杂志,1999,5(1):37.

[2] 曹守仪,李宝华. 同时测定小鼠抗缺氧和耗氧量的简便实验方法[J]. 中国药理学通报,1995,11(1):85-86.

[3] 王桥,曾昭晖,陈仪,等. 生姜石油醚提取物对四种氧自由基体系抗氧化作用研究[J]. 中国药学杂志,1997,32(6):343-346.

[4] 王晋,张坚,康胜利,等. 青海产蕨麻营养成分的研究[J]. 青海医药杂志,1998,28(2):52-53.

[5] 回晶,尚德静,李庆伟,等. 西藏人参果对小鼠抗疲劳及抗缺氧能力的影响[J]. 营养学报,2003,25(2):218-219.

[收稿日期:2005 - 03 - 28]

中图分类号:R15;Q949.751.8　　文献标识码:A　　文章编号:1004 - 8456(2005)04 - 0306 - 03

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net