

· 药理 ·

大苞雪莲醇提物的抗缺氧作用及其初步机制研究

杨燕^{1,2}, 马慧萍², 陈垣¹, 张汝学², 何希瑞³, 姚娟³, 樊鹏程², 贾正平^{2*}

(1. 甘肃农业大学农学院, 兰州 730070; 2. 兰州军区兰州总医院药剂科, 兰州 730050;
3. 兰州大学药学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:研究大苞雪莲醇提物的抗缺氧作用及其机制。方法:将 BALB/c 小鼠随机分为缺氧模型组大苞雪莲醇提取物高低剂量(500,250 mg·kg⁻¹)组及阳性药(乙酰唑胺 300 mg·kg⁻¹)对照组,单次 ip 给药,通过常压密闭缺氧试验、急性减压缺氧试验,化学物质中毒缺氧试验,观察 ip 大苞雪莲醇提取物,小鼠在不同缺氧状态下的存活时间;并模拟高原低压低氧环境测定小鼠血浆中超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)活性及丙二醛(MDA)、乳酸(LD)含量。结果:与缺氧模型组相比,大苞雪莲醇提取物 500,250 mg·kg⁻¹ 均能显著延长不同缺氧状态下小鼠的存活时间($P < 0.01$),其中常压密闭缺氧模型小鼠存活时间及延长率分别为:(37.09 ± 4.25) min, (32.36 ± 4.22) min 及 44.36%, 23.93%。血浆生化指标测定结果表明,大苞雪莲醇提取物 500,250 mg·kg⁻¹ 均能提高模拟高原低压低氧环境下小鼠血浆中 SOD(126.31 ± 19.18), (120.45 ± 13.78) U·mL⁻¹ 和 LDH(11 334 ± 212.3), (10 882 ± 173.5) U·L⁻¹ 活性,降低 MDA(3.21 ± 0.52), (3.52 ± 0.33) μmol·L⁻¹ 和 LD(2.37 ± 0.44), (2.92 ± 0.36) nmol·L⁻¹ 含量($P < 0.01$)。结论:大苞雪莲醇提取物具有明显的抗缺氧作用,其机制可能与降低血乳酸水平、促进细胞无氧酵解和改善体内氧自由基代谢的作用有关。

[关键词] 大苞雪莲;抗缺氧;存活时间

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0145-04

Anti-hypoxia Effects of Ethanol Extract from *Saussurea involucrate*

YANG Yan^{1,2}, MA Hui-ping², CHEN Yuan¹, ZHANG Ru-xue^{1,2},
HE Xi-rui³, YAO Juan³, FAN Peng-cheng², JIA Zheng-ping^{2*}

(1. Department of Agronomy, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China;
2. Department of Pharmaceutical, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China;
3. Department of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of anti-hypoxia components from *Saussurea involucrate*. **Method:** The BALB/c mouse models of normobaric hypoxia, decompression hypoxia and chemistry poisoning hypoxia were developed to evaluate the survival time of mice in hypoxia, and the biochemical indicators, including superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), lactic acid (LD) and lactate dehydrogenase correlated with anti-hypoxia were measured. **Result:** Compared to the model group, the ethanol extract of *S. involucrate* at the dosage of 500, 250 mg·kg⁻¹ dose-dependently enhanced the survival time of mice in different hypoxia models. At the same time, they could increase SOD (126.31 ± 19.18), (120.45 ± 13.78) U·mL⁻¹ and lactate dehydrogenase LDH activities (11 334 ± 212.3), (10 882 ± 173.5) U·L⁻¹, and decrease the content of

[收稿日期] 20101111(002)

[基金项目] 国家科技部重大专项资助项目(2008ZXJ09004-52)

[第一作者] 杨燕, 硕士研究生, 从事中药新药的研制与开发研究, E-mail: yanzhizhi@yahoo. cn

[通讯作者] * 贾正平, 博士生导师, 教授, Tel: 0931-8994671, E-mail: mahuijingex@yahoo. com. cn

MDA (3.21 ± 0.52), (3.52 ± 0.33) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and LD (2.37 ± 0.44), (2.92 ± 0.36) $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in blood plasma of mice under a simulated decompression and hypoxia conditions. **Conclusion:** These results demonstrated that the ethanol extract of *S. involucreta* possessed notable anti-hypoxic activity. The mechanism may be related to decrease the level of LD, promote the process of anaerobic glycolysis and improve the metabolism of oxygen radicals to the body.

[**Key words**] *Saussurea involucreta*; anti-hypoxic activity; survival time

大苞雪莲 *Saussurea involucreta* 又名新疆雪莲, 天山雪莲, 系菊科风毛菊属多年生草本植物, 是我国高山地区民间常用的一类名贵中草药。雪莲性温、味微苦、具有散寒除湿、强筋助阳、抗炎镇痛、调经补血、收缩子宫等功能, 可治疗风湿性关节炎、月经不调、阳痿等, 并具有抗衰老和抑制癌细胞增生等作用^[1-4]。近年来, 国内对雪莲药理的研究主要集中于提高机体免疫力、祛风除湿和终止妊娠等作用^[5-6], 而关于其抗缺氧作用的研究较少。本实验系统研究了其乙醇提取物的抗缺氧作用, 并初步探讨了其抗缺氧机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 大苞雪莲 *Saussurea involucreta* Kar et Kir, 全草入药, 药材购自青海西宁三江宝商贸有限公司, 并经兰州大学药学院生药学研究所杨永建教授鉴定, 药品粉碎后先后加入 20, 15, 10 倍量 70% 乙醇回流 3 次, 浸泡 30 min, 加热煮沸回流提取 2 h, 过滤取滤液, 残渣继续按上述方法提取 2 次, 弃去药渣, 合并 3 次滤液, 减压干燥, 临用前加适量聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(吐温-80), 然后边研边加蒸馏水, 配成 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度的混悬液; 氰化钾(上海徐航化工厂, 批号 011010), 盐酸异丙肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司, 批号 100501), 亚硝酸钠(沈阳新西试剂厂, 批号 200108), 乙酰唑胺(湖北尹合化工有限公司, 进口分装), 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸(LD)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号 20100714)。

1.2 动物 清洁级 BABL/C 小鼠, 体重(20 ± 2) g, 雌雄各半, 由兰州生物制品研究所实验动物中心提供, 动物合格证号 14-002, 饲养于兰州军区兰州总医院动物实验科。

1.3 仪器 SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司), BP210S 电子天平(荷兰赛多利斯有限公司生产), 离心机(Thermo ElecTRON

COKPORATION)。KQ500 型单通道气体报警检测器(河南英特电器设备有限公司)。

2 方法

2.1 常压密闭缺氧实验^[7] 取清洁级 BABL/C 小鼠 40 只, 雌雄各半, 随机分成 4 组, 每组 10 只, 单次 ip 给药, 缺氧模型组注射等容积生理盐水加上适量吐温-80。大苞雪莲醇提物 I, II 组分别 ip 大苞雪莲醇提物 $500, 250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 阳性对照组 ip 乙酰唑胺 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。给药 30 min 后, 将小鼠放入 250 mL 广口瓶中, 每瓶放 1 只小鼠, 密封(瓶内放碱石灰 5 g 以吸收 CO_2 和 H_2O , 垫滤纸以吸收尿液, 广口瓶用前均盛水校正容量), 以呼吸停止为指标, 记录小鼠的存活时间。

2.2 急性减压缺氧实验^[8] 分组及给药方法参照 **2.1**。给药 30 min 后, 将各组小鼠先后放入盛有 50 g 钠石灰的 5 000 mL 玻璃干燥器中, 干燥器盖的气阀(关闭)用橡胶管通过玻璃平衡瓶(15 000 mL)与抽气泵相连, 以 $1 000 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度急速减压至预定的低压条件 47.33 kPa(海拔 6 000 m), 停止抽气。将干燥器盖密封后, 打开气阀, 待干燥器与平衡瓶内气压平衡时关闭气阀开始试验, 保持此压力不变, 观察统计 1 h 内动物死亡率, 重复操作至实验完成, 并对实验结果进行卡方检验。

2.3 化学物质中毒缺氧实验^[9-11]

2.3.1 对氰化钾中毒小鼠存活时间的影响 取清洁级 BABL/C 40 只小鼠, 雌雄各半, 分组与给药剂量同 **2.1**。给药后 20 min, 每只小鼠再 ip 氰化钾 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 记录小鼠从氰化钾注射完毕至停止呼吸的时间。

2.3.2 对亚硝酸钠中毒小鼠存活时间的影响 分组及给药方法同 **2.1**。给药后 20 min, 每只小鼠再 ip 亚硝酸钠 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 记录小鼠从亚硝酸钠注射完毕至停止呼吸的时间。

2.3.3 对盐酸异丙肾上腺素中毒小鼠存活时间的影响 分组及给药方法同 **2.1**。给药后 20 min, 每只

小鼠再 ip 异丙肾上腺素 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。10 min 后,放入 250 mL 广口瓶中,每瓶放 1 只小鼠,密封(瓶内放碱石灰 5 g 以吸收 CO_2 和 H_2O ,垫滤纸以吸收尿液,广口瓶用前均盛水校正容量),以呼吸停止为指标,记录小鼠的存活时间。

2.4 慢性减压缺氧实验 取清洁级 BABL/C 小鼠,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 10 只,分为正常对照组、缺氧模型组、乙酰唑胺组($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和大苞雪莲醇提物($250, 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。单次 ip 给药,给药体积为 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。给药后 20 min,将各组小鼠先后置于盛有 50 g 钠石灰的 5 000 mL 打开盖的玻璃干燥器中,干燥器盖的气阀(关闭)用橡胶管通过玻璃平衡瓶(15 000 mL)与抽气泵相连,以 $100 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度减压至预定的低压条件 54 kPa(海拔 5 000 m)。到达指定压力后停止抽气,并用单通道气体报警检测器控制干燥器中 O_2 的含量。到达指定压力后停止抽气,保持此压力 6 h,适时调整干燥器中 O_2 含量。完成预定缺氧时间后,将装置内压力升至正常大气压取出小鼠处死,立即采血 $400 \mu\text{L}$,3.8% 枸橼酸钠抗凝,4 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,分离出血浆,低温保存备用,用于 SOD, LDH 活性及 MDA, LD 含量的测定。

2.5 统计方法 采用统计软件 SPSS 13.0 处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 常压密闭缺氧实验对动物存活时间的影响

表 3 大苞雪莲醇提物对化学物质所致中毒缺氧存活时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	存活时间/min		
		KCN	NaNO_2	盐酸异丙肾上腺素
缺氧模型	-	3.93 ± 0.55	6.91 ± 0.37	21.27 ± 4.91
乙酰唑胺	300	$4.53 \pm 0.32^{1)}$	$7.53 \pm 0.60^{1)}$	$30.30 \pm 2.14^{2)}$
大苞雪莲醇提物	250	$6.34 \pm 2.59^{2)}$	$8.34 \pm 1.12^{2)}$	$35.43 \pm 9.72^{2)}$
	500	$7.33 \pm 1.98^{2)}$	$9.55 \pm 0.42^{2)}$	$58.74 \pm 8.21^{2)}$

3.4 对慢性减压缺氧小鼠血浆中 SOD, MDA, LD 和 LDH 的影响 与正常对照组相比,缺氧模型组血浆 LD 含量明显升高, LDH 活性显著降低, SOD 活性显著下降, MDA 含量升高。预先用大苞雪莲醇提物处理的小鼠血浆 LDH, SOD 活性相对缺氧模型组显著升高 ($P < 0.01$), LD, MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$)。结果见表 4。

4 讨论

小鼠密闭缺氧耐受力试验和小鼠急性减压缺氧

大苞雪莲醇提物组和阳性对照药乙酰唑胺组均可显著延长常压缺氧小鼠的存活时间 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 结果见表 1。

表 1 大苞雪莲醇提物对常压缺氧小鼠存活时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	存活时间/min	延长率/%
缺氧模型	-	26.11 ± 2.84	-
乙酰唑胺	300	$29.84 \pm 5.92^{1)}$	8.45
大苞雪莲醇提物	250	$32.36 \pm 4.22^{2)}$	23.93
	500	$37.09 \pm 4.25^{2)}$	44.36

注:与缺氧模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 急性减压缺氧实验对动物死亡率的影响 与缺氧模型组相比,大苞雪莲醇提物组能明显延长小鼠减压密闭缺氧存活时间 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 大苞雪莲醇提物对急性减压缺氧对小鼠生存时间的影响($n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	1 h 内死亡数/只	1 h 内死亡率/%
缺氧模型	-	10	100
乙酰唑胺	300	7	70 ²⁾
大苞雪莲醇提物	250	6	60 ²⁾
	500	5	50 ²⁾

3.3 化学物质中毒缺氧实验对动物存活时间的影响 乙酰唑胺和大苞雪莲醇提物均可延长小鼠 KCN, NaNO_2 和盐酸异丙肾上腺素中毒缺氧的存活时间,与缺氧模型组比较有显著差异 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 见表 3。

耐受力试验是在密闭缺氧和模拟高原缺氧条件下,从整体水平上观察药物延长缺氧死亡时间,评价药物对动物缺氧耐受力的提高程度。实验结果表明, ip 500, 250 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大苞雪莲醇提物均能延长密闭环境低氧小鼠的生存时间。此外,大苞雪莲醇提物还能够有效降低小鼠在急性缺氧条件下的死亡率。因此从整体动物水平上看,大苞雪莲醇提物能显著延长在密闭缺氧和急性减压缺氧条件下小鼠的死亡时间,明显提高实验小鼠的缺氧耐受力程度。

表 4 大苞雪莲醇提取物对减压缺氧后血浆中 LDH, SOD 活性和 LD, MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	LD /nmol·L ⁻¹	LDH /U·L ⁻¹	MDA /nmol·mL ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹
正常对照	-	1.02 ± 0.33	8 031 ± 800.1	3.22 ± 0.37	149.17 ± 9.64
缺氧模型	-	4.81 ± 0.38	6 137 ± 810.6	5.44 ± 0.66	92.75 ± 21.08
乙酰唑胺	200	3.28 ± 0.67 ²⁾	7 133 ± 875.6 ²⁾	3.71 ± 0.82 ²⁾	117.08 ± 15.10 ²⁾
大苞雪莲醇提取物	250	2.92 ± 0.36 ²⁾	10 882 ± 173.5 ²⁾	3.52 ± 0.33 ²⁾	120.45 ± 13.78 ²⁾
	500	2.37 ± 0.44 ²⁾	11 334 ± 212.3 ²⁾	3.21 ± 0.52 ²⁾	126.31 ± 19.18 ²⁾

氰化钾中毒死亡模型属细胞内缺氧模型, 氰化钾可与氧化型细胞色素氧化酶的三价铁结合为氧化高铁细胞色素氧化酶, 使之不能形成还原型细胞色素氧化酶, 以致呼吸链中断, 引起细胞内窒息和组织缺氧; 亚硝酸钠中毒死亡模型属细胞外液缺氧模型, 亚硝酸钠可使血红蛋白变成高铁血红蛋白, 失去携带氧的功能, 造成组织缺氧; 异丙肾上腺素引起小鼠缺氧死亡, 与其具有抗异丙肾上腺素加快心率和降低肾上腺素功能的效应有关。实验结果表明, 大苞雪莲醇提取物能明显延长机体细胞内、外液缺氧的存活时间, 并能够有效对抗异丙肾上腺素所致的缺氧死亡。

SOD 和 MDA 是反映机体自由基代谢的重要指标, SOD 是机体内最重要的抗氧化酶之一, MDA 是脂质过氧化反应的主要产物, 检测这一对指标, 可敏感地反映机体内抗氧化酶系统的平衡。LDH 和 LD 是反映机体糖无氧酵解的 2 个重要指标, LD 既是糖无氧酵解的产物, 又是糖异生的原料之一, LDH 主要使乳酸脱氢生成丙酮酸, 便于利用乳酸氧化功能, 检测这一对指标, 可敏感地反映机体内能量代谢的情况。结果表明, 将小鼠暴露在相当于海拔 5 000 m 的低压舱中, 小鼠血浆中 SOD 活性明显下降。给予大苞雪莲醇提取物可以使血浆 SOD 活性升高, 显著降低 MDA 含量。提示大苞雪莲醇提取物能够改善自由基代谢与脂质过氧化作用, 从而减轻自由基过量生成与脂质过氧化作用对机体的损伤。此外, 大苞雪莲醇提取物可通过提高 LDH 活性, 减少缺氧状态下血浆乳酸含量, 提高 LD 代谢能力, 促进细胞无氧酵解过程, 维持缺氧状态下能量供应的作用, 延长小鼠缺氧存活时间。

综上所述, 大苞雪莲醇提取物不仅对常压缺氧和减压缺氧小鼠有保护作用, 而且对组织和细胞缺氧也有明显的保护作用, 对特异性增加心脏耗氧的小

鼠能明显延长其生存时间。说明大苞雪莲醇提取物具有明显的抗缺氧作用, 其机制可能与降低血乳酸水平、促进细胞无氧酵解和改善体内氧自由基代谢的作用有关。

[参考文献]

- [1] 胡熙明, 张文康, 朱庆生, 等. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 931.
- [2] 李君山, 蔡少青. 雪莲花类药材的化学和药理研究进展[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(8): 449.
- [3] Cho J Y, Baik K U, Jung J H, et al. *In vitro* anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 398(3): 399.
- [4] Lee H J, Kim N Y, Son H J, et al. A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF- α in LPS-activated macrophages [J]. *Planta Med*, 1999, 65(2): 104.
- [5] 王晓玲, 李启发, 丁立生. 天山雪莲的化学成分研究[J]. 中草药, 2007, 38(12): 1795.
- [6] 王利彦, 陈湘宏, 车胜荣. 雪莲的抗缺氧研究[J]. 高原医学杂志, 2003, 13(3): 30.
- [7] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 195.
- [8] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 782.
- [9] 付守庭, 付宇. 黄芩甙的耐缺氧作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(5): 207.
- [10] 戴伟娟, 辛勤, 王绍红. 苯妥英对缺氧小鼠的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(1): 113.
- [11] 张早华, 孟竞壁, 樊菊芬. 红景天对心肌缺氧、缺血保护作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(10): 617.

[责任编辑 聂淑琴]