

相比, 差异不显著 ($P > 0.05$)。另外在各时间段, 胸腺的细胞凋亡率均高于脾脏和骨髓的细胞凋亡率至少1倍; 且随时间延长胸腺细胞凋亡率逐渐升高, 表明胸腺细胞对射线较为敏感, 且修复需要较长的时间。

4 讨论

放射线可通过直接和间接作用, 损伤细胞DNA、生物膜以及其他生物分子, 引起细胞周期紊乱, 从而造成细胞坏死和凋亡^[5-7], 而免疫器官(胸腺和脾脏)和造血器官(骨髓)对放射线又极为敏感, 故射线很容易加重机体免疫功能低下或紊乱, 使淋巴细胞失去调节机体免疫的作用, 使造血干细胞失去造血活性, 进而加速这些细胞的凋亡。

胸腺和脾脏作为参与免疫功能调节的重要免疫器官, 是高辐射敏感的细胞群。一般情况下, 机体受辐射后会引起胸腺、脾脏指数下降, 细胞凋亡增加, 机体免疫功能降低。本实验中辐照小鼠胸腺、脾脏指数的急剧下降证明了这一点。卷柏组小鼠的胸腺和脾脏指数高于模型组, 胸腺和脾脏细胞凋亡率明显低于模型组, 表明卷柏有效部位能够显著抑制辐射造成的小鼠胸腺、脾脏细胞的凋亡, 从而减轻照射损伤小鼠胸腺、脾脏的萎缩, 即其对免疫器官有辐射保护作用。卷柏有效部位可降低辐射小鼠骨髓细胞凋亡率, 即卷柏有效部位对造血组织也具有辐射防护

作用。

综上所述, 卷柏有效部位即水部位具有抗辐射作用, 其抗辐射作用的机制可能与其能抑制机体因受辐照造成的正常免疫细胞凋亡, 提高机体免疫功能和保护造血组织, 从而提高了小鼠因放疗的适应性和对有害刺激的抵御能力有关^[8], 至于其具体的机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 郑晓珂, 史社坡, 毕跃峰, 等. 卷柏中黄酮类成分研究[J]. 中草药, 2004, 35(7): 742-743.
- [2] 郑晓珂, 毕跃峰, 冯卫生, 等. 卷柏化学成分研究[J]. 药学学报, 2004, 39(4): 266-268.
- [3] 郑晓珂, 吕鹏飞, 王玲巧, 等. 卷柏等5种中药植物雌激素活性筛选的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13): 30-32.
- [4] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1997.
- [5] Cook T, Wang Z, Alber S, et al. Nitric oxide and ionizing radiation synergistically promote apoptosis and growth inhibition of cancer by activating p53[J]. Cancer Res, 2004, 64(21): 8015-8021.
- [6] Landsverk K S, Lyng H, Stoke T. The response of malignant B lymphocytes to ionizing radiation: cell cycle arrest, apoptosis and protection against the cytotoxic effects of the mitotic inhibitor nocodazole[J]. Radiat Res, 2004, 162(4): 405-415.
- [7] Yamauchi R, Morita A, Yasuda Y, et al. Different susceptibility of malignant versus nonmalignant human T cells toward ultraviolet A-1 radiation-induced apoptosis[J]. Invest Dermatol, 2004, 122(2): 477-483.
- [8] 王 晓, 周银平, 万小龙. 鼻咽净对受照射小鼠的防护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2003, 23(2): 140.

知母总黄酮对溴酸钾诱发小鼠肝损伤的保护作用

李满妹¹, 江 涛¹, 黄杰昌², 姚新生^{1*}, 栗原博^{1*}

(1. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632; 2. 广州莱泰制药有限公司, 广东 广州 510635)

摘 要: 目的 研究知母总黄酮对溴酸钾(KBrO_3)诱发小鼠肝损伤的保护作用。方法 200 mg/kg KBrO_3 诱发小鼠肝损伤模型, 分别测定小鼠血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)、NO、肝组织丙二醛(MDA)水平、抗氧化能力指数(ORAC)、谷胱甘肽(GSH)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果 与模型组相比, 知母总黄酮可以明显降低因 KBrO_3 引起的小鼠血浆ALT水平, 保护因 KBrO_3 诱发的肝损伤。此外, 知母总黄酮有效地提高应激小鼠肝组织匀浆的ORAC、GSH及GSH-Px活性, 降低血浆中NO及MDA水平。结论 知母总黄酮对 KBrO_3 诱发的小鼠肝损伤具有一定的保护作用, 其作用机制可能部分来自于清除自由基和抑制脂质过氧化过程。

关键词: 知母; 总黄酮; 肝损伤; 氧化应激; KBrO_3

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0252-04

知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎, 知母中富含皂苷和黄酮类化合物, 临床上用于清热泻火、生津润燥^[1]。近年

来国内外对知母皂苷的药理活性已有一些研究报道, 但有关知母总黄酮研究工作甚少。基于黄酮类化合物的抗氧化活性, 本研究以溴酸钾(KBrO_3)诱发

小鼠肝损伤的氧化应激模型^[2~5],探讨知母总黄酮对氧化应激小鼠血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平、肝组织NO释放能力、抗氧化能力指数(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平的影响,评价知母总黄酮对KBrO₃诱发的小鼠肝脏氧化应激性肝损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器:知母总黄酮由广州莱泰制药有限公司提供,批号050801。6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, 为维生素E的水溶性衍生物)、2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)、荧光素钠均为日本和光纯药株式会社产品。GSH (Kohjin Co., Ltd, 日本), 辛酸磺酸钠(SOS, Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd, 日本); ALT、MDA及GSH-Px测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。其余试剂均为国产分析纯。甲醇为Fischer色谱纯。MK3型酶标仪(Labsystem, Helsinki, 芬兰); GENios系列荧光酶标仪(Tecan Inc, Maennedorf, 瑞典); 日本Hitachi高效液相色谱仪和Eicom公司ECD-100型电化学检测器; ULTRA-TURRAX T8型组织匀浆机(IKA Labortechnik, Stanfen, 德国); 3-18K型台式高速冷冻离心机(Sartorius, Gottingen, 德国); BS210S电子分析天平(Sartorius, Gottingen, 德国); pH S-25型酸度计(上海伟业仪器厂)。

1.2 动物分组及模型制备:7周龄18~22 g雄性清洁级昆明种小鼠购自广东省医学实验动物中心[合格证号SCXK(粤)2003-2002]。饲养温度(23±2), 照明时间每天12 h。饲养1周后进行实验。动物随机分为正常组、模型组、知母总黄酮低、中、高剂量(125、250、500 mg/kg)组,共5组,每组10只。各组连续5 d,每天1次0.1 mL/10 g ig给予知母总黄酮化合物水溶液,正常组给予等容量水。第5天给药0.5 h后,一次性ip 200 mg/kg KBrO₃生理盐水溶液^[2],正常组小鼠ip等容量生理盐水。6 h后将小鼠乙醚麻醉,心脏采血,并置于肝素处理过的离心管中以5 000 r/min离心5 min分离血浆,用于测定ALT和NO。同时取肝组织,以3%高氯酸制成5%肝组织匀浆,12 000 r/min离心15 min后取上清液,经0.45 μm微孔滤膜过滤后,测定GSH水平;以生理盐水制成10%肝组织匀浆,3 000 r/min离心15 min后,取上清液测定蛋白量、GSH-Px

活性ORAC。

1.3 血浆中ALT活性测定:血浆样品直接以赖氏法(Reitman-Frankel)测定ALT活力,按试剂盒说明操作。

1.4 肝组织的MDA测定:5%生理盐水肝组织匀浆液在4℃条件下以3 000 r/min离心10 min,取上清液稀释成2%后以考马斯亮蓝蛋白试剂盒测定蛋白量。肝组织中MDA水平使用MDA检测试剂盒测定。

1.5 肝组织的GSH-Px测定:肝组织中GSH-Px活性采用试剂盒方法检测。

1.6 肝组织的GSH测定:使用Nacalai Tesque公司Cosmosil系列150 mm×4.6 mm 5C₁₈柱,流动相为99 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 2.5),1%甲醇,200 mg/L SOS,5 mg/L EDTA,磷酸盐缓冲液由磷酸二氢钠配制,用磷酸调pH值至2.5使用^[6]。柱温25℃,体积流量为1 mL/min,电压为600 mV及进样体积为15 μL。标准对照GSH以0.1 mol/L HCl溶解并稀释后-20℃保存。对照品储备液的制备过程需要在低温条件下进行操作。

1.7 肝组织的ORAC测定:参照Kurihara等方法^[7]并加以改进。96孔板每个微孔中加入不同浓度的待测样品溶液20 μL,再加入磷酸钾缓冲液20 μL和AAPH 140 μL(终浓度12.8 mmol/L),最后添加荧光素钠20 μL至终浓度为63 nmol/L,并启动反应,迅速将酶标板置于预置温度37℃荧光酶标仪中开始测定。采用动力学方式,每2 min测定一个点,至荧光强度衰减为零为止。

1.8 血浆和肝组织NO测定:参照Park等^[8]方法并加以改进,取40 μL血浆加入160 μL Griess试剂[0.1%奈乙二胺溶液与1%磺胺(5%)磷酸溶液,使用前12 h内等体积混合后静置20 min],550 nm波长测定溶液吸光度(A)值。根据NO标准曲线计算NO水平。

1.9 统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用Student's t检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 对KBrO₃诱发氧化应激小鼠血浆ALT水平的影响:与正常组相比,模型组小鼠血浆ALT水平明显升高($P < 0.01$)。知母总黄酮各剂量组均能降低KBrO₃负荷小鼠血浆ALT水平,其中高、中剂量组血浆ALT水平明显低于模型组($P < 0.05$),低剂量组也显示一定的降低作用,各剂量组间显示一定的量效关系(表1)。

表1 知母总黄酮对 KBrO_3 诱发氧化应激小鼠血浆 ALT、NO 及肝组织 ORAC、MDA、GSH、GSH-Px 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 1 Effect of total flavone of *A. asphodeloides* on levels of ALT and NO in plasma, ORAC, MDA, GSH, and GSH-Px in liver tissue of stress mice induced with KBrO_3 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ALT/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	ORAC	MDA/ ($\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)		GSH/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH-Px/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
					血浆	肝		
正常	-	82.5 ± 11.9	2.7 ± 0.4	29.0 ± 9.3	10.4 ± 1.2	9.1 ± 1.6	96.2 ± 4.8	37.6 ± 3.5
模型	-	$426.2 \pm 3.6^{**}$	$0.8 \pm 0.4^{**}$	$58.3 \pm 4.1^*$	$13.5 \pm 1.9^*$	$15.8 \pm 2.4^{**}$	$69.9 \pm 2.4^*$	$18.1 \pm 3.1^{**}$
知母总黄酮	125	320.6 ± 13.6	1.8 ± 0.3	35.3 ± 8.9	9.7 ± 1.9	8.4 ± 2.0	73.5 ± 8.1	21.6 ± 1.8
	250	290.3 ± 11.5	2.0 ± 0.2	27.1 ± 5.4	9.9 ± 1.5	8.2 ± 1.4	69.2 ± 9.2	26.3 ± 4.4
	500	280.6 ± 10.4	2.4 ± 0.3	32.8 ± 6.2	9.1 ± 0.9	7.9 ± 1.4	84.9 ± 10.7	29.2 ± 3.9

与正常组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal group; $P < 0.05$ $P < 0.01$ vs model group

2.2 对 KBrO_3 诱发氧化应激小鼠肝组织 MDA 水平的影响: 与正常组相比, 模型组小鼠肝组织 MDA 水平明显升高 ($P < 0.05$)。知母总黄酮各剂量组均能降低氧化应激小鼠肝组织 MDA 水平, 其中高、中剂量组明显低于模型组 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.3 对 KBrO_3 诱发氧化应激小鼠肝组织 ORAC 的影响: 与正常组相比, 模型组小鼠肝组织的 ORAC 值明显降低 ($P < 0.01$)。知母总黄酮对 KBrO_3 负荷小鼠肝组织 ORAC 的下降有明显减缓作用。与模型组相比, 知母总黄酮高、中剂量组有显著性差异 ($P < 0.05$), 低剂量组也显示一定的抗氧化作用, 各剂量组间显示一定的量效关系 (表 1)。

2.4 对 KBrO_3 诱发氧化应激小鼠血浆及肝组织中 NO 水平的影响: 与正常组相比, 模型组小鼠肝组织中 NO 水平均明显升高 ($P < 0.05, 0.01$)。知母总黄酮高剂量组能显著降低 KBrO_3 负荷小鼠血浆 NO 水平 ($P < 0.05$), 中、低剂量组对血浆 NO 水平的升高也显示一定的改善作用, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。此外, 知母总黄酮各剂量组均能显著降低 KBrO_3 负荷小鼠肝组织 NO 水平 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.5 对 KBrO_3 诱发氧化应激小鼠肝组织 GSH 的影响: 与正常组相比, 模型组小鼠肝组织 GSH 水平明显降低 ($P < 0.05$)。知母总黄酮各剂量组对 KBrO_3 负荷小鼠肝组织 GSH 水平的降低均有一定的改善作用, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), (表 1)。

2.6 对 KBrO_3 诱发氧化应激小鼠肝组织 GSH-Px 活力的影响: 与正常组相比, 模型组小鼠肝组织 GSH-Px 活性明显降低 ($P < 0.01$)。知母总黄酮高剂量组能显著升高 KBrO_3 负荷小鼠肝组织 GSH-Px 活性 ($P < 0.01$), 中、低剂量组对 KBrO_3 负荷小鼠肝组织 GSH-Px 活性的降低也有一定的改善作用, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), (表 1)。

3 讨论

KBrO_3 ip 6 h 后小鼠血浆 ALT 水平与正常组相比显著升高, 诱发肝损伤。近年的研究证明 KBrO_3 诱发组织损伤的发病过程与活性氧自由基有关^[9]。本实验发现 KBrO_3 引起小鼠血浆 ALT 水平增高的同时, 肝组织中脂质过氧化产物 MDA 显著提高, 而 ORAC、GSH 及 GSH-Px 水平均不同程度下降, 表明小鼠机体处于氧化应激状态。肝脏是机体中主要的代谢器官, 容易受各种应激刺激的影响诱发肝损伤。Rauen 等^[10]研究确认氧化应激诱发肝损伤是来自肝组织脂质过氧化的链式反应, 损伤肝组织细胞的结果。本实验结果发现, 知母总黄酮显著降低氧化应激所致小鼠血浆 ALT 水平的同时, 抑制肝组织 MDA 的升高。ORAC 测定结果表明, 知母总黄酮能够提高氧化应激小鼠肝组织的抗氧化能力, 同时也对肝组织中 GSH、GSH-Px 等一些内源性抗氧化活性物质水平的下降起到保护作用。这些结果表明知母总黄酮可通过提高机体的内源性抗氧化能力及清除过多的氧自由基来减缓应激性肝损伤的发生。

NO 在体内具有多重生物活性, Watanabe 等^[12]研究证明 KBrO_3 能使体内 NO 释放过多, NO 可与超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot -}$) 反应生成过氧亚硝基阴离子 (ONOO^-), 后者可以分解成羟自由基 ($\text{OH}^{\cdot}$) 和二氧化氮而加重对体内组织的损伤。对 NO 的测定结果也发现, ip KBrO_3 6 h 后小鼠血浆及肝组织中 NO 水平均明显升高, 这一结果可能是导致肝组织损伤的原因之一。此外, 体内 NO 释放过多在一定程度上也将引起 GSH-Px 活性降低和 GSH 减少^[11]。对 KBrO_3 诱发肝损伤时的 GSH-Px 活性和 GSH 的测定中也确认这种相关性。知母总黄酮对 KBrO_3 负荷小鼠血浆及肝组织中 NO 水平的升高均有不同程度的改善作用, 说明其作用部分来自通过

抑制体内 NO 的释放来减轻氧化应激性肝组织损伤。

知母中富含的黄酮类化合物是一类含有一个或多个酚性基团具有清除自由基能力的抗氧化作用物质^[12], 知母总黄酮通过自身清除自由基, 有效地防止应激状态下活性氧引起的过氧化损伤, 从而改善应激性肝损伤的发生。本研究证明知母总黄酮在预防和改善氧化应激性疾病方面可能具有一定的应用价值。

References

- [1] Meng Z Y, Zhang J Y, Xu S X, *et al*. Steroidal saponins from *Anemarrhena asphodeloides* and their effects on superoxide generation [J]. *Planta Med*, 1999, 65(7): 661-663.
- [2] Watanabe S, Yoshimura Y, Fukui T. Contribution of glutathione peroxidase and nitric oxide to potassium bromate-induced oxidative stress and kidney damage in mice [J]. *J Health Sci*, 2001, 47(6): 565-570.
- [3] Hinata K, Kuwahara T, Ando S, *et al*. Determination of bromate in bread by capillary gas chromatography with a mass detector (GC/MS) [J]. *Food Addit Contam*, 1994, 11(5): 559-569.
- [4] Khan N, Sultana S. Abrogation of potassium bromate-induced renal oxidative stress and subsequent cell proliferation response by soy isoflavones in Wistar rats [J]. *Toxicology*, 2004, 201(1-3): 173-184.
- [5] Kurihara H, Koda H, Asami S, *et al*. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress [J]. *Life Sci*, 2002, 70(21): 2509-2520.
- [6] Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S. Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1570(1): 47-52.
- [7] Kurihara H, Fukami H, Asami S, *et al*. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(7): 1093-1098.
- [8] Park Y C, Rimbach G, Salio C, *et al*. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- α secretion, and NF- κ B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages [J]. *FEBS Lett*, 2000, 465(2-3): 93-97.
- [9] Watanabe S, Togashi S, Fukui T. Contribution of nitric oxide to potassium bromate-induced elevation of methemoglobin concentration in mouse bloods [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(10): 1315-1319.
- [10] Rauen U, Reuters I, Fuchs A, *et al*. Oxygen-free radical-mediated injury to cultured rat hepatocytes during cold incubation in preservation solutions [J]. *Hepatology*, 1997, 26(2): 351-357.
- [11] Birnboim H C, Privora H. Depletion of intracellular glutathione reduces mutations by nitric oxide-donating drugs [J]. *Nitric Oxide*, 2000, 4(5): 496-504.
- [12] Nijveldt R J, van Wood E, van Hoorn D E C, *et al*. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications [J]. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74(4): 418-425.

复方瑞康欣对吗啡依赖大鼠戒断症状及下丘脑和丘脑单胺类神经递质的影响

李晓东¹, 邓菊平¹, 文兴¹, 黄秋艳¹, 麦创富¹, 罗素元²

(1. 珠海瑞桦戒毒康复中心, 广东 珠海 519070; 2. 遵义医学院 生物学教研室, 贵州 遵义 563003)

摘要:目的 观察复方瑞康欣对吗啡依赖大鼠戒断症状、下丘脑和丘脑单胺类神经递质水平的影响, 研究复方瑞康欣的戒毒作用机制。方法 SD 大鼠按剂量递增法 sc 吗啡建立大鼠吗啡依赖模型。复方瑞康欣 ig 给药 5 d 后, 经纳洛酮催瘾, 观察戒断症状, 并用荧光分光光度法检测下丘脑和丘脑去甲肾上腺素 (NA)、多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT) 和 5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA) 的量。结果 复方瑞康欣低、高剂量组戒断症状的评分值均低于吗啡戒断组 ($P < 0.01$); 复方瑞康欣能缓解吗啡依赖大鼠戒断后的体重丢失; 复方瑞康欣高剂量组下丘脑 NA、DA、5-HT 递质水平比吗啡戒断组显著降低 ($P < 0.05$); 在丘脑中 NA、DA、5-HT 和 5-HIAA 的变化无显著差异 ($P > 0.05$)。结论 复方瑞康欣能明显抑制吗啡依赖大鼠的戒断症状及降低下丘脑单胺类神经递质的量, 下丘脑单胺类神经递质水平的下调可能是复方瑞康欣的戒毒作用机制之一。

关键词: 复方瑞康欣; 吗啡依赖; 单胺类神经递质

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0255-04

复方瑞康欣是由元胡、牛膝、川芎、钩藤、当归等组成的中药复方, 在临床上用于治疗阿片类药物成

收稿日期: 2007-05-22

基金项目: 珠海市科技计划项目 (PC-2005.1092); 贵州省卫生厅科学技术基金资助项目 (D-211)

作者简介: 李晓东 (1960—), 男, 医学硕士, 副主任医师, 广东省珠海瑞桦戒毒康复中心院长, 主要从事药物依赖研究工作, 在专业杂志上发表论文 20 余篇。Tel: (0756) 8508096 E-mail: webmaster@21ruihua.com