

藏药唐古特青兰耐缺氧和清除氧自由基作用的实验研究

青海省高原医学科学研究所(西宁 810012) 叶于聪* 陈钦铭 柴凤玲 海 平 周生祥

摘要 唐古特青兰水提液灌胃或腹腔注射,通过小鼠密闭缺氧和减压缺氧实验,表明有耐缺氧作用;在特高海拔4700m地区取样测定小鼠红细胞SOD活性,提示有提高机体歧化过氧阴离子能力;模拟海拔6000m实验条件,测定小鼠肝脏脂质过氧化产物MDA,血红蛋白、血球压积,显示有抗肝脏脂质过氧化作用,降低异常增高的血红蛋白和血球压积作用。提示唐古特青兰耐缺氧作用部分是通过抗氧自由基引起的。

关键词 唐古特青兰 密闭缺氧 减压缺氧 超氧化物歧化酶 过氧化脂质

我国高原面积占全国总面积的33%,其中海拔3000m以上高原占全国总面积的16%,居住在高原地区的人口约6000万,因此保护广大高原地区劳动者,提高他们的生命质量,延缓早衰,防治急、慢性高山病是高原医学工作者的责任,其中心环节是提高机体耐缺氧能力。

唐古特青兰^[1]*Dracocephalum tanguticum* Maxim(简称DtM)是一种常用藏药,为唇形科多年生草本植物,内含黄酮甙、甾醇类等成分,具有疏肝和胃作用,藏医用于治疗肝炎、胃炎等。迄今,有关唐古特青兰提高动物缺氧耐受力 and 清除自由基能力的实验研究在文献中尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 药物: DtM采自青海省共和县海拔3400m,全草洗净切碎,先用温水浸泡1h,煮沸30min,合并3次上清液,80℃浓缩过滤,最后调节至每毫升药液含生药0.33g。

1.2 密闭缺氧实验:昆明种小鼠,4月龄,体重23~25g,40只,分2批进行试验,每批20只,随机分为2组,实验前禁食7h,用标定过的250ml无色透明密闭的广口瓶,瓶中放碱石灰5g以吸收二氧化碳和水汽,给药后30min开始实验,自放入小鼠密闭瓶口开始计时,直至呼吸停止,记录小鼠存活时间。

1.3 减压缺氧实验:减压舱由668型真空干燥箱改装而成(安装一个进气孔,使舱内空气能不断更新,把压力表上数字换算成海拔高度,凭借箱外照明灯从玻璃窗可向舱内瞭望动物情况)。小鼠48只,雌雄兼用,体重25~30g,随机分为2组,给药后15min同时放入减压舱中开始减压,保持均匀上升速度,每升高1000m历时6min,一直持续升高到10000m动物开始死亡,当约一半动物死亡时停止减压,开舱计数各组动物死亡数,经 χ^2 检验确定其差别。

1.4 红细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性测定^[2]——阿尼玛卿山现场考察:昆明种小鼠4月龄,雌雄各半,Wistar大鼠6月龄,雌雄各半,由西宁经陆地运到阿尼玛卿(海拔4700m),路途历时5d,第6天开始给药,每天一次,连续5d,第6天断头取血,肝素抗凝,立即放入液氮罐中冻存(-190℃)运回西宁,在相同条件下分批测定血红蛋白浓度(高铁氰化比色法)^[3]、红细胞SOD(用海军工程学院提供的超氧化物歧化酶测定试剂盒,微量邻苯三酚比色法)活性。比色用721分光光度计。

1.5 模拟6000m减压条件下肝脏脂质过氧产物丙二醛(MDA)^[4]、血红蛋白(Hb)、血球压积(Hct)测定:小鼠体重20~22g,随机分为2组,每天进减压舱前腹腔注射给药,对照组给生理盐水,减压舱压力模拟海拔6000m高度,每天减压8h,连续11d,第12天股动脉放血,测定血红蛋白浓度(高铁氰化比色法),血球压积(微量法)及制备肝匀浆测定MDA

*Address: Ye Yucong, Qinghai Provincial Institute of High Altitude Medical Sciences, Xining

含量。试剂：硫代巴比妥酸（TBA）上海试剂二厂，十二烷基硫酸钠（SDS）上海化学试剂厂分装，0.05mol/L磷酸缓冲液pH7.4，正丁醇（AR），0.1mol/LHCl。

1.5.1 原理：MDA（malondialdehyde）是膜脂质过氧化的终产物之一，MDA与TBA于酸性环境下，在沸水中可形成粉红色复合物，于532nm波长有最大吸收峰，利用MDA的这一特性，通过测MDA的产生情况，间接估计脂质氧化的程度。颜色越深，MDA产生越多，脂质过氧化越严重。比色用的仪器为721分光光度计。

1.5.2 操作：用预冷磷酸缓冲液制备10%肝匀浆，取0.1ml肝匀浆加入带塞的玻璃试管，并立即加0.1ml 10%SDS沉淀蛋白，静置室温约20min，加2ml 0.1mol/L HCl和1mol1%TBA显色剂，盖上塞子混匀后，于100℃水浴中煮1h，冷却后加4ml正丁醇，振荡3min以提取颜色，3000r离心10min，取上层正丁醇液于532nm波长比色，按下列公式求MDA的量：

$$C = \frac{O \cdot D \text{值}}{\Sigma \cdot D} (\text{n.mol MDA/g肝})$$

O·D值-正丁醇提取液在532nm波长的吸收度。

D-每克肝重 Σ -为消光系数（ $1.56 \times 10^5 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ）

2 结果

- 2.1 DtM对小鼠密闭缺氧耐受力的影响：见表1。DtM能非常显著提高小鼠对密闭缺氧耐受力。
- 2.2 DtM对小鼠减压缺氧耐受力的影响：见表2。DtM可降低减压缺氧动物死亡率，提高小鼠对减压缺氧的耐力。
- 2.3 DtM对动物红细胞SOD活性的影响：见表3。DtM可显著提高犬、小鼠红细胞SOD活性，以提高机体歧化过氧阴离子能力。

表 1 DtM对小鼠密闭缺氧耐受力的影响

组 别	剂 量 (g/kg)	动物数 (只)	给药 途径	平均存活时间 $\bar{x} \pm \text{SD}(\text{min})$
DtM	10	10	ig	$33.5 \pm 4.6^{***}$
盐水对照	30ml	10	ig	27.6 ± 5.7
DtM	6.6	10	ip	$65.6 \pm 9.0^{***}$
盐水对照	20.0ml	10	ip	26.4 ± 6.3

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, (下表同)

表 2 DtM对小鼠减压缺氧耐受力的影响

组 别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	给药 途径	死亡率 (%)
DtM	6.6	12	ip	50**
盐水对照	20.0ml	12	ip	100
DtM	3.3	12	ip	8.3*
盐水对照	10.0ml	12	ip	50

2.4 DtM对模拟6000m减压小鼠肝脏脂质过氧化产物MDA、Hb和Hct的影响：见表

4。在模拟6000m低氧条件下，DtM能非常明显降低小鼠MDA、Hb和Hct。

3 讨论

由密闭缺氧和减压缺氧实验结果提示DtM有提高机体耐缺氧能力，这有利于机体对低氧环境的适应及延缓高原人早衰，因为高原人早衰与高原环境的低氧、紫外线强等恶劣气候条件有关。DtM提高机体抗缺氧耐力的机理是什么？我们试图从抗自由基来加以说明。

目前，已知很多疾病的发生发展与异常的自由基反应有关，这些异常的自由基反应可以由生理条件下产生的，也可以是由外源性化学剂或物理的电离辐射所致的自由基引起。高原地区气候寒冷、干燥、低氧、光照时间长、紫外线辐射强、其中紫外线和低氧都可造成机体超氧阴离子生成增多。阿尼玛卿海拔4700m，大气氧分压约为海平面的一半左右（56%），紫外线却比海平面高数倍^[5]。文献认为低氧所造成超氧自由基增多与缺氧时ADP降解有

表 3 DtM对动物红细胞SOD活性的影响

动 物	组 别	剂 量 (g/kg.d × d)	动物数 (只)	给药途径	SOD活性 (u/gHb, $\bar{x} \pm SD$)
小 鼠	DtM	3.3 × 5	12	ip	838.0 ± 111.6*
	DtM	6.6 × 5	12	ip	763.0 ± 86.3
	盐水对照	10.0ml × 5	12	ip	720.6 ± 117.4
大 鼠	DtM	3.3 × 5	10	ip	834.0 ± 107.9*
	盐水对照	10.0ml × 5	10	ip	718.8 ± 87.9

表 4 DtM对小鼠肝脏MDA、Hb、Hct的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

组 别	剂 量 (g/kg.d × d)	动物数 (只)	MDA (nmol/g肝)	Hb (g/L)	Hct (%)
DtM	3.3 × 11	10	60.32 ± 6.06**	179.5 ± 99.3**	58.7 ± 2.20***
盐水对照	10.0ml × 11	10	73.88 ± 9.37	195.4 ± 9.76	67.2 ± 2.45

关^[6],因为缺氧时ATP生成受阻,代偿性ADP分解加强,ADP分解成腺苷和次黄嘌呤,后者在黄嘌呤氧化酶作用下,于形成尿酸的过程中,可产生超氧阴离子(O_2^-)自由基,并由此引起链锁反应,生成羟自由基($OH\cdot$)、氢过氧基(OH_2)等一系列自由基对机体造成危害。SOD广泛存在于机体的组织和红细胞内,是一类重要超氧阴离子自由基清除剂,此酶具有保护细胞抗炎、抗病毒、抗辐射、抗衰老等重要作用^[7]。高原地区正常人SOD活性明显低于平原地区,且随海拔升高RBC-SOD的活性降低^[8],体内SOD活性下降将使体内自由基含量增高可能是高原人早衰的原因之一。DtM能明显升高机体RBC-SOD活性而提高机体清除 O_2^- 的能力,这也许是DtM提高抗缺氧耐力的机理之一。

近年来,有关脂质过氧化物(LPO)与人体衰老机制的研究颇受重视。临床与实验研究的大量数据表明:LPO的增加与老年生理病理有着密切的联系,因此,利用各种手段阻止LPO的大量蓄积,可获得一定的延缓衰老的作用。在模拟6000m条件下,DtM能非常明显降低小鼠肝脏脂质过氧化产物丙二醛含量,这是很有意义的。

另外,在模拟6000m减压实验中,DtM还能明显降低小鼠异常增高的血红蛋白浓度和血球压积而改变血液浓、粘、凝、聚的特点,使组织器官的供血情况有所改善以减轻低氧对机体的危害,但与西宁地区(海拔2260m)小鼠Hb浓度($145.2 \pm 9.1g/L$),Hct($54.99 \pm 1.44\%$)比较仍然高出许多($P < 0.01$),这也许属机体对低氧的生理性适应的结果。

表3大剂量组不能显著提高小鼠红细胞SOD活性,也许是剂量过大产生毒副作用的缘故。因为一次给药量约为腹腔注射半数致死量的1/3,并连续给药5d。

另外,关于表2两组生理盐水死亡率相差很多,是因为掌握开舱时间不够准确,减压舱内动物有扎堆的习性,压在下面动物的死亡情况不易观察到。

参 考 文 献

- 1 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册. 上海, 上海人民出版社, 1977. 1911
- 2 丁克祥, 等. 老年学杂志, 1987, 7(2): 42
- 3 朱忠勇, 等主编. 临床医学检验血红蛋白测定. 上海: 上海科技出版社, 1978. 6
- 4 卢 华, 等. 全国第二届抗炎免疫药理学学术会议论文汇编. 1986. 6
- 5 Simon L M. Lung Biology in Health and Disease, 1978(8): 151
- 6 Rag R S, et al. Fed Proc, 1982(4): 767
- 7 王赞舜, 等. 中华老年医学杂志, 1985, 4(4): 193
- 8 王芝山, 等. 高原医学杂志, 1990, (2): 16

(1993-02-22 收稿)

Determination of the Effective Substances in Roots of Chinese Pokeweed (*Phytolacca*) Plants

Zhang Jianchun, Wang Yan, Zheng Hanchen, et al

Total esculentosides and polysaccharides are determined and compared in roots of *Phytolacca acinosa* Roxb., *P. americana* L., *P. polyandra* Bat., *P. zhejiangensis* W.T. Ean Produced in China. Results showed that *P. polyandra* Bat. has the highest content of esculentosides (6.24%), while *P. acinosa* is most rich in polysaccharides (10.57%).

(Original article on page 126)

Studies on the Antihypoxia and Free Radical Scavenging Activity of Tangut Dragonhead (*Dracocephalum tanguticum*)

Ye Yucong, Chen Qinming, Chai Fengling, et al

Aqueous extract of *Dracocephalum tanguticum* Maxim. (DTM), when given ig or ip to experimental hypoxia mice, markedly increased their tolerance to normobaric and hypobaric hypoxia. Erythrocyte superoxide dismutase (SOD) activity of mice or rats determined at high altitude (Animaqing mountain 4700 m above sea level) showed an elevated dismutation activity of peroxide anions. At an experimentally simulated altitude of 6000 m above sea level, determination of MDA, Hb and Hct showed an obvious reduction of all the abnormally elevated criteria. It is suggested that the antihypoxia activity of DTM may be partly due to its free radical scavenging activity.

(Original article on page 134)

Effects of Whiteflower Hogfennel (*Peucedanum praeruptorum*) on Isolated Rabbit Pulmonary Arteries

Wei Minjie, Zhang Xinhua and Zhao Naicai

Qian Hu is the roots of *Peucedanum praeruptorum* Dunn. The object of the present paper was to determine the effects of water extract (QH-I) and petroleum ether extract (QH-M) of Qian Hu on smooth muscle contractility of isolated rabbit pulmonary artery rings. QH-I and QH-M antagonized pulmonary artery rings contraction elicited by NE as well as KCl. QH-I and QH-M caused relaxation of rabbit pulmonary artery rings precontracted with NE as well as KCl. The contraction dose-response curves of pulmonary artery rings with NE were shifted to the right and the maximal contraction response were inhibited $73.1 \pm 8.0\%$ and $43.6 \pm 4.2\%$ by $1.6 \times 10^{-5}\%$ and $8.0 \times 10^{-5}\%$, QH-M, $PD'_2 = 4.73 \pm 0.43$. These results indicate that Qian Hu may relax pulmonary artery smooth muscle directly as a Ca^{2+} antagonist.

(Original article on page 137)