

· 专题论坛 ·

大苞雪莲有效成分的抗缺氧药效学研究

马慧萍,王 昕,武柠子,景临林,贾正平,张 俊(兰州总医院全军高原环境损伤防治重点实验室,甘肃 兰州 730050)

[摘要] **目的** 研究大苞雪莲有效成分(石油醚活性部位及其主要单体成分二十八烷)的抗缺氧药效学。**方法** 首先采用常压密闭缺氧耐受力实验和急性减压缺氧耐受力实验联合评价大苞雪莲石油醚部位和二十八烷的抗缺氧活性,然后采用3种化学中毒缺氧模型(氰化钾、亚硝酸钠、盐酸异丙肾上腺素)进行其抗化学中毒缺氧活性的药效学评估。**结果** 大苞雪莲石油醚部位和二十八烷可以有效延长常压密闭缺氧小鼠的存活时间($P<0.01$),降低急性减压缺氧小鼠的死亡率($P<0.01$),且具有剂量依赖关系;化学中毒缺氧药效学研究表明,石油醚部位和二十八烷在化学中毒缺氧实验中的小鼠存活时间均明显大于乙酰唑胺($P<0.05$)。**结论** 大苞雪莲石油醚部位和二十八烷具有良好的抗缺氧活性。

[关键词] 大苞雪莲;抗缺氧;石油醚部位;二十八烷

[中图分类号] R969.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2018)03-0247-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.03.012

Pharmacodynamics of the effective anti-hypoxia constituents in *Saussurea involu-crata*

MA Huiping, WANG Xin, WU Ningzi, JING Linlin, JIA Zhengping, ZHANG Jun (Lanzhou General Hospital Key Lab of PLA for Prevention and Treatment of Injuries induced by High Altitude, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective** To study pharmacodynamics of the effective anti-hypoxia components in the petroleum ether extract of *Saussurea Involucrata* (PESI) and octacosane. **Methods** PESI and octacosane were first evaluated by normobaric hypoxia model, acute decompression model and followed by chemical induced hypoxic models with potassium cyanide, sodium nitrite and isoprenaline hydrochloride poisoning. **Results** PESI and octacosane can effectively prolong the survival time of hypobaric hypoxic mice ($P<0.01$) and reduce the mortality of acute hypobaric hypoxia mice ($P<0.01$) in a dose-dependent manner. Anti-hypoxic potency of PESI and octacosane obtained by chemical induced hypoxic model indicated that they significantly increase survival time ($P<0.05$) of hypoxia mice than acetazolamide. **Conclusion** PESI and octacosane have good anti-hypoxia activity.

[Key words] *Saussurea involucrata*; anti-hypoxia activity; petroleum ether extract; octacosane

目前,国内外对雪莲在祛风除湿、终止妊娠及提高机体免疫力等方面的药理作用研究较多^[1-3],但对其在抗缺氧作用方面的报道寥寥无几。本课题组前期研究表明,大苞雪莲具有比红景天和乙酰唑胺更强的抗缺氧活性,并发现其抗缺氧有效成分主要集中于大苞雪莲石油醚部位(the petroleum ether extract of *Saussurea involucrata*, PESI)^[4,5],经过进一步分离后提取出多个单体成分,确定二十八烷(octacosane)具有较高的抗缺氧活性^[6]。本实验研

究 PESI 和 octacosane 的抗高原缺氧药效,为从中开发抗急性高原病新药奠定基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 BALB/c 小鼠,雄性,8 周龄,体重:18~22 g,购自兰州生物制品有限公司动物实验中心(合格证号:16-002),饲养于兰州总医院实验动物中心。

1.2 药品与试剂

PESI 和 octacosane 由实验室按文献[6]方法制备,实验前称取适量,加入少量吐温-80,边研边加蒸馏水,分别配制成高、中、低 3 个不同剂量的混悬液;乙酰唑胺(武汉远城科技发展有限公司,批号:20100216);亚硝酸钠(NaNO_2 ,沈阳新西试剂厂,批号:20091206);氰化钾(KCN,上海徐航化工厂,批

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81571847,81402848);甘肃省

自然科学基金(145RJZA089);军队医药卫生科研项目(C LZ14JA01)

[作者简介] 马慧萍,博士,研究方向:高原药理学, Tel: (0931) 8994671, Email: 1026573411@qq.com

[通讯作者] 张 俊,主任医师,研究方向:医院管理和新药研发, Tel: (0931) 8994024, Email: 404798020@qq.com

号:20091115);盐酸异丙肾上腺素(上海禾丰制药有限公司,批号:20100302);钠石灰(Molecular Products Limited公司,英国)。

1.3 仪器

广口瓶(250 ml,采用注水法校准);BP210S 电子天平(荷兰赛多利斯有限公司);FLYDWC50-II A型低压低氧动物实验舱(中航贵州风雷航空军械有限责任公司)。

2 方法

2.1 常压密闭缺氧实验

取 SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠 80 只,饲养适应 3 d 后进行随机分组:缺氧模型组(HC),乙酰唑胺阳性药组(AZ, 200 mg/kg),PESI 高(PESI-H, 200 mg/kg)、中(PESI-M, 100 mg/kg)、低(PESI-L, 50 mg/kg)剂量组, octacosane-高(octacosane-H, 100 mg/kg)、中(octacosane-M, 50 mg/kg)、低(octacosane-L, 25 mg/kg)剂量组,共分为 8 组,每组 10 只。单次尾静脉注射给药,给药体积为 0.2 ml/20 g。给药后 20 min,分别放入 250 ml 广口瓶中(瓶内盛 5 g 钠石灰用于吸收 CO₂ 和 H₂O,垫滤纸以吸收尿液),每瓶放入 1 只小鼠,密封(凡士林涂抹瓶口),使之不漏气,立即计时,记录从小鼠放入广口瓶至呼吸完全停止的时间。

2.2 急性减压缺氧实验

取 SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠 40 只,适应性饲养 3 d 后进行随机分组:HC 组, AZ 组(200 mg/kg),PESI-H 组(200 mg/kg),octacosane-H 组(100 mg/kg),共分为 4 组,每组 10 只。单次尾静脉注射给药,给药体积为 0.2 ml/20 g。给药后 20 min,将动物放入低压舱,密闭舱门,以 1 000 m/min 的速度减压,模拟至海拔高度 5 000 m 和 8 000 m 时分别各停留 5 min,最终上升至海拔高度 10 000 m,维持此高度 1 h,调节进气孔阀门,缓慢降至正常海拔高度,打开舱门,观察统计 1 h 内小鼠的死亡率,采用 χ^2 检验统计实验结果。

2.3 化学性中毒缺氧实验

2.3.1 亚硝酸钠

取 SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠 40 只,适应性饲养 3 d,随机分为 4 组,每组 10 只。各给药组分别尾静脉注射 AZ 200 mg/kg, PESI-H 200 mg/kg, octacosane-H 100 mg/kg, 而 HC 组给予等体积蒸馏水(加少量吐温-80),给药体积为 0.2 ml/20 g。给药 20 min 后,按 10 mg/kg 剂量向每只小鼠腹腔注射亚硝酸钠,立即计时,记录小鼠从注射亚硝酸钠完

毕至呼吸完全停止的时间。

2.3.2 氰化钾

参照“2.3.1”项下方法进行分组和给药。给药 20 min 后,按 10 mg/kg 剂量向每只小鼠腹腔注射氰化钾,立即计时,记录小鼠从注射氰化钾完毕至呼吸完全停止的时间。

2.3.3 盐酸异丙肾上腺素

参照“2.3.1”项下方法进行分组及给药。给药 20 min 后,按 10 mg/kg 剂量向每只小鼠腹腔注射盐酸异丙肾上腺素,注射完毕 10 min 后,将小鼠分别放入 250 ml 广口瓶中(瓶内盛 5 g 钠石灰用于吸收 CO₂ 和 H₂O,垫滤纸以吸收尿液),每瓶放入 1 只小鼠,密封(凡士林涂抹瓶口),使之不漏气,立即计时,记录从小鼠放入广口瓶至呼吸完全停止的时间。

2.4 数据处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA)和 LSD 检验,计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 常压密闭缺氧对小鼠存活时间的影响

表 1 数据显示,与 HC 组相比,AZ 及 PESI 高、中、低 3 个剂量均可延长小鼠在常压密闭缺氧环境下的存活时间($P < 0.01$),PESI 各剂量对存活时间的延长率分别为 130.68%、81.10% 和 42.90%,与 AZ 组相比具有显著性差异($P < 0.01$);与 HC 组比较,octacosane 高、中、低 3 个剂量也均可延长小鼠在常压密闭缺氧环境下的存活时间($P < 0.01$),octacosane 各剂量的延长率分别为 109.90%、66.16% 和 28.96%,其中 octacosane 高、中剂量与

表 1 PESI 和 octacosane 对常压密闭缺氧小鼠存活时间的影响($n=10$)

| 组别 | 给药剂量 (mg/kg) | 存活时间 (t/min) | 延长率 (%) |
|----------------|-----------------|-----------------|------------|
| HC 组 | — | 30.70±2.13 | — |
| AZ 组 | 200 | 37.09±4.25** | 20.81 |
| PESI-H 组 | 200 | 70.82±8.22***# | 130.68 |
| PESI-M 组 | 100 | 55.57±9.75***# | 81.10 |
| PESI-L 组 | 50 | 43.87±5.75***# | 42.90 |
| octacosane-H 组 | 100 | 64.44±12.61***# | 109.90 |
| octacosane-M 组 | 50 | 51.01±10.03***# | 66.16 |
| octacosane-L 组 | 25 | 39.59±4.96** | 28.96 |

** $P < 0.01$, 与 HC 组比较;# $P < 0.01$, 与 AZ 组比较

AZ组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$),说明 PESI 和 octacosane 均具有显著的抗缺氧活性,且线性关系良好。

3.2 急性减压缺氧对小鼠死亡率的影响

表2数据显示,与HC组相比,高剂量 PESI 和 octacosane 均能明显延长小鼠急性减压密闭缺氧环境下的存活时间,其1h内的死亡率分别为40%和50% ($P < 0.01$),明显低于AZ组($P < 0.05$)。

表2 PESI-H和 octacosane-H对急性减压缺氧小鼠死亡率的影响($n=10$)

| 组别 | 给药剂量 (mg/kg) | 1 h 内死亡数 (只) | 1 h 内死亡率 (%) |
|----------------|--------------|--------------|--------------|
| HC 组 | — | 10 | 100 |
| AZ 组 | 200 | 7 | 70** |
| PESI-H 组 | 200 | 4 | 40**# |
| octacosane-H 组 | 100 | 5 | 50**# |

** $P < 0.01$,与 HC 组比较;# $P < 0.05$,与 AZ 组比较

表3 PESI-H和 octacosane-H对化学物质中毒缺氧小鼠存活时间的影响($n=10$)

| 组别 | 给药剂量 (mg/kg) | 亚硝酸钠 (t/min) | 氰化钾 (t/min) | 盐酸异丙肾上腺素 (t/min) |
|----------------|--------------|----------------|---------------|------------------|
| HC 组 | — | 7.19±0.34 | 4.03±0.67 | 20.48±2.59 |
| AZ 组 | 200 | 7.43±0.60 | 4.84±0.32** | 34.30±2.14** |
| PESI-H 组 | 200 | 10.60±0.42***# | 8.56±1.98***# | 50.74±3.21***# |
| octacosane-H 组 | 100 | 9.53±1.12***# | 7.75±2.59***# | 39.43±3.72***# |

** $P < 0.01$,与 HC 组比较;## $P < 0.01$,与 AZ 组比较

小鼠在急性缺氧条件下的死亡率。

氰化钾中毒导致的缺氧属组织细胞内缺氧,氰化钾能与细胞色素 C 的 Fe^{3+} 结合,使之无法形成还原型的细胞色素氧化酶,从而影响机体的呼吸功能,引起呼吸链中断^[8];亚硝酸钠中毒导致的缺氧属组织细胞外液缺氧,亚硝酸钠能与血红蛋白结合,变为高铁血红蛋白,影响 O_2 与血红蛋白的结合能力^[9];而异丙肾上腺素能够拮抗肾上腺素功能,加快心率^[10]。实验结果表明,高剂量 PESI 和 octacosane 均能明显延长小鼠组织细胞内、外缺氧存活时间,并有效对抗异丙肾上腺素所致的缺氧损伤。

药效学研究结果表明,PESI 和 octacosane 不仅能延长在常压密闭缺氧环境下小鼠的存活时间、降低在急性缺氧条件下小鼠的死亡率,而且对化学物质中毒所致的组织细胞内、外缺氧和特异性增加心肌耗氧量的小鼠具有明显的保护作用,说明两者均具有良好的抗缺氧活性。本课题组前期已从物质代谢、能量代谢、自由基代谢水平等方面^[4,11,12]对大苞雪莲醇提物的抗高原缺氧机制进行了初步研究,表

3.3 化学物质中毒缺氧对小鼠存活时间的影响

表3数据显示,与HC组相比,PESI和 octacosane 高剂量均可延长小鼠在 $NaNO_2$ 、KCN 和盐酸异丙肾上腺素中毒缺氧状态下的存活时间 ($P < 0.01$),AZ 虽可延长小鼠在氰化钾和盐酸异丙肾上腺素中毒缺氧状态下的存活时间 ($P < 0.01$),但不能延长亚硝酸钠中毒缺氧状态下的存活时间 ($P > 0.05$),且均明显小于 PESI 和 octacosane 高剂量 ($P < 0.05$)。

4 讨论

常压密闭缺氧模型和急性减压缺氧模型是评价药物抗缺氧活性的两种常用的实验方法^[7]。实验结果表明,尾静脉注射高、中、低剂量的 PESI 和 octacosane 均能延长常压密闭环境下小鼠的存活时间,呈剂量依赖性,且存活时间明显长于阳性对照药 AZ。此外,高剂量 PESI 和 octacosane 还能够降低

其作用机制主要为:改善缺氧小鼠的自由基代谢,提高机体抗氧化系统的功能,减少自由基对机体的损伤;改善缺氧小鼠的物质代谢水平,保证重要脏器的能量供应;改善缺氧小鼠的能量代谢水平,在一定程度上缓解缺氧所致的能量代谢障碍,进而保护细胞膜上的 Na^+-K^+ ATP 酶和 $Ca^{2+}-Mg^{2+}$ ATP 酶的功能。因此,笔者推测大苞雪莲有效成分的抗缺氧机制一定也与其抗水肿、抗自由基损伤和对物质代谢和能量代谢的正向调节有关,下一步拟先从这3个方面进行系统研究,并综合应用于 iTRAQ 的高通量蛋白组学技术、生物信息学技术以及蛋白靶点验证技术等手段,阐明其抗高原缺氧作用的分子机制,明确分子靶标,为研发安全有效的防治急性高原病的药物开辟一条新的途径。

【参考文献】

[1] 翟科峰,王 聪,高贵珍,等.天山雪莲的研究进展.湖北农业科学,2009,48(11):2869-2873.

温暴露时间有关,随暴露时间的延长,心肌组织损伤程度加重,但脑组织在暴露 3 d 时损伤最为严重,这可能是缺氧损伤与机体防卫机制之间相互对抗的结果,其具体的机制还需要进一步探究。

【参考文献】

- [1] Luo Y, Yang X, Gao Y. Strategies for the Prevention of acute mountain sickness and treatment for large groups making a rapid ascent in China[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 169(2): 97-100.
- [2] Luks AM, Swenson ER, Bartsch P. Acute high-altitude sickness[J]. *Eur Respir Rev*, 2017, 26(143): 160096.
- [3] Bultas J. Mountain sickness[J]. *Cas Lek Cesk*, 2015, 154(6): 280-286.
- [4] Boggild AK, Costiniuk C, Kain K C, et al. Environmental hazards in Nepal: altitude illness, environmental exposures, injuries, and bites in travelers and expatriates[J]. *J Travel Med*, 2007, 14(6): 361-368.
- [5] 白振忠. 高原鼠兔对缺氧、寒冷极端高原环境适应的分子机制研究[D]. 青海: 青海大学, 2015.
- [6] 陈 有, 李素芝, 黄学文, 等. 模拟高原环境大鼠 AQP5 表达和肺动脉压变化[J]. *西南国防医药*, 2009, 19(1): 4-6.
- [7] Ohinata A, Nagai K, Nomura J, et al. Lipopolysaccharide changes the subcellular distribution of aquaporin 5 and increases plasma membrane water permeability in mouse lung epithelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(3): 521-526.
- [8] Lisk C, McCord J, Bose S, et al. Nrf2 activation: a potential strategy for the prevention of acute mountain sickness[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 63: 264-273.
- [9] 王雷琛, 姜 艳, 张 迪, 等. 虎杖苷对模拟高原低氧环境所致小鼠脑、肺损伤的保护作用[J]. *中南药学*, 2015, 13(4):

343-348.

- [10] Norris JN, Viirre E, Aralis H, et al. High altitude headache and acute mountain sickness at moderate elevations in a military population during battalion-level training exercises[J]. *Mil Med*, 2012, 177(8): 917-923.
- [11] Singh M, Thomas P, Shukla D, et al. Effect of subchronic hypobaric hypoxia on oxidative stress in rat heart[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(8): 2405-2419.
- [12] Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. A role for oxidative stress[J]. *Contrib Nephrol*, 2011, 174: 138-148.
- [13] 张 洁, 袁东亚, 李文华, 等. 氧自由基与高原病研究进展[J]. *医学综述*, 2011, 17(22): 3384-3386.
- [14] Shi Q, Fu J, Ge D, et al. Huperzine A ameliorates cognitive deficits and oxidative stress in the hippocampus of rats exposed to acute hypobaric hypoxia[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(9): 2042-2052.
- [15] Sakr HF, Abbas AM, El Samanoudy AZ. Effect of vitamin E on cerebral cortical oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor gene expression induced by hypoxia and exercise in rats[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2015, 66(2): 191-202.
- [16] 马慧萍, 吴金华, 高荣敏, 等. 低压氧舱模拟急性高原缺氧动物模型建立的初探[J]. *解放军药学学报*, 2013, 29(4): 301-304.
- [17] Mirtschink P, Krek W. Hypoxia-driven glycolytic and fructolytic metabolic programs: Pivotal to hypertrophic heart disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(7 Pt B): 1822-1828.
- [18] Cheng F, Xie S, Guo M, et al. Altered glucose metabolism and preserved energy charge and neuronal structures in the brain of mouse intermittently exposed to hypoxia[J]. *J Chem Neuroanat*, 2011, 42(1): 65-71.

【收稿日期】 2017-09-14 【修回日期】 2018-01-24

【专栏编辑】 李睿旻

(上接第 249 页)

- [2] Jia JM, Wu CF, Liu W, et al. Antiinflammatory and analgesic activities of the tissue culture of *Saussurea involucrata*[J]. *BiolPharm Bull*, 2005, 28(9): 1612-1614.
- [3] Lee JC, Kao JY, Kuo DH, et al. Antifatigue and antioxidant activity of alcoholic extract from *Saussurea involucrata*[J]. *J Trad Compl Med*, 2011, 1(1): 64-68.
- [4] 马慧萍, 焦 阳, 高荣敏, 等. 大苞雪莲乙醇提取物对模拟高原缺氧小鼠生化指标的影响[J]. *中药材*, 2014, 37(1): 99-103.
- [5] Ma HP, Fan PC, Jing LL, et al. Anti-hypoxic activity at simulated high altitude was isolated in petroleum ether extract of *Saussurea involucrata*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1510-1515.
- [6] 景临林, 何 蕾, 樊鹏程, 等. 天山雪莲抗缺氧活性成分研究[J]. *中药材*, 2015, 38(1): 89-92.
- [7] 马慧萍, 何 蕾, 王 昕, 等. 藏紫菀总黄酮对模拟高原缺氧小

鼠的保护作用[J]. *解放军医药杂志*, 2016, 28(6): 1-4.

- [8] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 63-78.
- [9] 许福会, 曾 南, 彭 希, 等. 芳香开窍药对小鼠急性缺氧损伤的影响[J]. *中药药理与临床*, 2010, 26(5): 72-74.
- [10] 景临林, 马慧萍, 杨芳芳, 等. 新型双靶标化合物的合成与其抗高原缺氧损伤活性研究[J]. *解放军医药杂志*, 2016, 28(6): 5-8, 13.
- [11] 马慧萍, 高荣敏, 吴金华, 等. 大苞雪莲乙醇提取物对模拟高原缺氧小鼠物质代谢的影响[J]. *解放军药学学报*, 2013, 29(4): 279-282.
- [12] 蒋 炜, 樊鹏程, 何 蕾, 等. 天山雪莲乙醇提取物对缺氧小鼠肝脏线粒体的保护作用研究[J]. *中药材*, 2015, 38(4): 790-793.

【收稿日期】 2017-11-08 【修回日期】 2018-01-18

【专栏编辑】 李睿旻