

小叶锦鸡儿总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响

李媛媛¹, 石任兵^{1*}, 岳永花², 李先荣²

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 山西省中医药研究院, 太原 030012)

[摘要] 目的:探讨小叶锦鸡儿黄酮类成分对实验性脑缺血再灌注损伤大鼠的作用。方法:以正常大鼠作为空白对照组,采用大脑中动脉阻断(MCAO)制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,以阿司匹林($12.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)作为阳性对照,小叶锦鸡儿总黄酮(CMF)按照 $25, 50, 100\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量,灌胃给药4周,观察给药后对MCAO大鼠脑组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量的影响,并测定其全血黏度和血浆黏度(η),血小板聚集率(PAgT),红细胞聚集指数(EAI),红细胞刚性指数(IR),红细胞变形指数(DI)。结果:通过比较各组大鼠血流变学指标 $\eta(\text{mPa}\cdot\text{s})$, PAgT(%), EAI, IR, DI时发现,阿司匹林组 $[(1.71\pm0.08)\text{ mPa}\cdot\text{s}, (56.49\pm3.74)\%, 8.83\pm0.59, 3.94\pm0.22, 0.69\pm0.08]$; CMF中剂量组 $[(1.72\pm0.11)\text{ mPa}\cdot\text{s}, (57.67\pm4.31)\%, 8.30\pm0.92, 3.99\pm0.22, 0.73\pm0.06]$ 、高剂量组 $(1.57\pm0.10)\text{ mPa}\cdot\text{s}, (55.59\pm4.58)\%, 7.83\pm0.58, 3.65\pm0.17, 0.70\pm0.07]$ 较模型组大鼠 $[(1.96\pm0.09)\text{ mPa}\cdot\text{s}, (65.69\pm4.59)\%, 10.75\pm0.79, 4.89\pm0.17, 0.45\pm0.05]$ 的 η , PAgT显著降低、红细胞参数EAI, IR显著降低, DI升高;通过比较各组大鼠脑组织SOD($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)活性、MDA($\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$)含量时发现,与模型组 $(50.21\pm10.74)\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}, (1.61\pm1.07)\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 相比, CMF低剂量组 $(55.45\pm11.67)\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}, (1.38\pm0.96)\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、中剂量组 $(60.23\pm13.59)\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}, (1.17\pm0.44)\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、高剂量组 $(64.58\pm9.36)\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}, (1.08\pm0.42)\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均可提高MCAO大鼠脑组织SOD活性,降低MDA含量。结论:CMF对脑缺血再灌注损伤具有脑保护作用,这可能与其抗氧化应激、降低血黏度有关。

[关键词] 小叶锦鸡儿; 总黄酮; 脑缺血再灌注; 血液流变学指标

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0273-04

Effect of Total Flavonoid from *Caragana microphylla*
Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

LI Yuan-yuan¹, SHI Ren-bing^{1*}, YUE Yong-hua², LI Xian-rong²

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Shanxi Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

[Abstract] Objective: To explore the effect of total flavonoid on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. Method: The middle cerebral artery occlusion (MCAO) was used to induce focal cerebral ischemia reperfusion injury model in rats, and the normal Wistar rats were used as control group. After *Caragana microphylla* Lam total flavonoid (CMF) at dose of 25, 50, 100 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and aspirin $12.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ was orally given for 4 weeks, the hemorrheologic parameters including blood viscosity (η), platelet aggregation rate (PAgT), erythrocyte aggregation index (EAI), rigidity index (IR), erythrocyte deformed index (DI), were observed. The contents of superoxide dismutase (SOD) and malonyldialdehyde (MDA) were determined. Result: In terms of the change of hemorrheology [$\eta(\text{mPa}\cdot\text{s})$, PAgT(%), EAI, IR, DI], positive control group $(1.71\pm0.08)\text{ mPa}\cdot\text{s}, (56.49\pm3.74)\%, (8.83\pm0.59), (3.94\pm0.22), (0.69\pm0.08)$, CMF medium group $(1.72\pm0.11)\text{ mPa}\cdot\text{s}, (57.67\pm4.31)\%, (8.30\pm0.92), (3.99\pm0.22), (0.73\pm0.06)$ and CMF high dose group $(1.57\pm0.10)\text{ mPa}\cdot\text{s}, (55.59\pm4.58)\%, (7.83\pm0.58), (3.65\pm0.17), (0.70\pm0.07)$ were obviously

[收稿日期] 20120605(003)

[第一作者] 李媛媛, 硕士, 在读博士研究生, 主要从事中药化学方面的研究, E-mail: liyy0411@foxmail.com

[通讯作者] * 石任兵, 教授, 博士生导师, E-mail: shirb@126.com

reduced in η , PAgT, EAI, IR. And they were decreased in DI. Through Comparation of different groups in contents of SOD and MDA, CMF low (55.45 ± 11.67) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, (1.38 ± 0.96) $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, medium (60.23 ± 13.59) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, (1.17 ± 0.44) $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, high dose group (64.58 ± 9.36) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, (1.08 ± 0.42) $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ increased the bioactivity of SOD and decreased the content of MDA. **Conclusion:** The CMF has a protective effect on cerebral ischemia reperfusion injury in rats; it might be relevant to the role of anti-oxidative stress and decreased blood viscosity.

[Key words] *Caragana microphylla*, flavonoid, MCAO, blood rheology

小叶锦鸡儿为豆科锦鸡儿属多年生灌木,俗称“柠条儿”^[1],全草或花、种子入药,味苦、性寒,具有祛风除湿、活血通络、镇静消炎等功效^[2]。民间用于治疗骨髓炎、风湿性关节炎等病症。小叶锦鸡儿主要分布在山西、内蒙古、陕西、甘肃等地,具有耐寒、耐旱等特性,常为绿化荒山,保持水土、防风固沙的理想树种。通过对其根茎叶花等的化学成分和药理活性进行研究,有助于促进小叶锦鸡儿资源的综合开发和可持续利用,同时对生态环境也有一定的保护作用。前期研究工作发现,小叶锦鸡儿醇提物具有抗炎、改善血流变、降血压和清除自由基等药理作用。为了进一步阐明小叶锦鸡儿总黄酮对缺血再灌注模型大鼠的治疗作用,并初步探讨其作用机制是否与抗氧化应激及改善血液流变性有关,进行了本项研究。

1 材料

1.1 药材 小叶锦鸡儿 *Caragana microphylla* Lam 采于山西省农科院试验地,药材经山西省中医药研究院李先荣主任药师鉴定。

1.2 动物 健康雄性 Wistar 大鼠,85 只,体重(220 ± 20)g,购自山西省中医药研究院实验动物中心,许可证号 SCXK(晋)2010-0002。饲养于清洁恒温环境中,自由饮水进食,适应性饲养 1 周。

1.3 仪器 TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),KDC-2046 低速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),BS223S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),电热恒温箱(北京市医疗设备厂),医用冷冻冰箱(SANYO Medical Freezer),双路多功能血流变参数分析仪(重庆麦迪克科技发展有限公司)。

1.4 试剂 芦丁(批号 100080-200707,中国药品生物制品检定所),其余试剂均分析纯。CMF,本实验室自制,用蒸馏水配制成(生药量)1.25,2.50,5.00 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个质量浓度;阳性对照药:阿司匹林肠溶片(批号 BTA84G6, Bayer Schering pharma);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20110917)、丙二醛

(MDA)试剂盒(批号 20110605),均购自南京建成生物科技有限公司。

2 方法

2.1 CMF 的提取 称取用乙醚提取后的干燥小叶锦鸡儿药材粉末 500 g,加 60% 乙醇 60 $^{\circ}\text{C}$ 浸提,提取液趁热过滤,合并滤液,减压浓缩至无醇味,加适量蒸馏水溶解,过 AB-8 大孔吸附树脂柱,蒸馏水洗至无色,弃去,再用 60% 乙醇洗脱,收集洗脱液,减压浓缩,真空干燥,即得小叶锦鸡儿总黄酮。

2.2 标准溶液的制备 精密称取芦丁对照品 25.0 mg,用 70% 乙醇溶解后移至 100 mL 量瓶中定容。精密吸取 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL 分别置于 25 mL 量瓶中,分别加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL,放置 6 min,加 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 10 mL,用 70% 乙醇稀释至刻度,放置 15 min,在 510 nm 下测定吸光度值,即可。用最小二乘法进行线性拟合,得曲线回归方程为 $A = 0.1135C - 0.1201$ ($r = 0.9996$),其中, A 代表吸光度, C 代表总黄酮含量。

2.3 动物模型建立、分组、给药、标本制备及检测

2.3.1 动物模型建立^[3] 75 只大鼠采用 Longa^[4] 等的改良线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,造模后动物自然苏醒,参照 Zea Longa 的 V 级标准^[5],选取神经功能障碍在 II, III, IV 级的大鼠 50 只,常规条件下饲养。

2.3.2 动物分组、给药 筛选上述合格模型 50 只,随机分为 5 组,即模型组,阿司匹林组(12.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),CMF 低、中、高剂量组(25,50,100 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。每组 10 只;另取 10 只正常大鼠作为对照组。术后 24 h,按上述剂量给药,每天 1 次,连续 4 周。

2.3.3 标本制备及检测 末次给药后,麻醉,心脏采血,置抗凝管中,用锥板式测定法测定全血黏度和血浆黏度(η)。取血后立即断头取脑,称重,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 水浴匀浆器匀浆,低温离心 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min,取上清液,制备 10% 大脑组织匀浆, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。以化学比色法测定脑组织 SOD 活性及

MDA 含量,按试剂盒说明书操作。

2.4 统计学分析 实验结果采用 SPSS 17.0 进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 CMF 含量的测定 精确称取 CMF 样品 0.1 g,按照 2.2 项下“加入 5% 亚硝酸钠”方法平行制备样品 3 份,以 70% 乙醇定容于 50 mL,在相同条件下测

定总黄酮含量为 $70.7\% \pm 0.38\%$ 。

3.2 对大鼠血流变学指标的影响 模型组大鼠全血黏度和血浆黏度(η),PAgT 显著升高、红细胞参数 EAI,IR 显著升高,DI 降低,较对照组有统计学差异, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;阿司匹林组、CMF 中、高剂量较模型组大鼠 η b,PAgT 显著降低,红细胞参数 EAI,IR 显著降低,DI 升高,均有统计学意义, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,且呈剂量依赖性。见表 1~2。

表 1 CMF 对模型大鼠血液黏度及血小板聚集率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	全血黏度/mPa·s			血浆黏度 /mPa·s	PAgT/%
		1·s ⁻¹	30·s ⁻¹	200·s ⁻¹		
对照	—	25.46 ± 0.77	5.42 ± 0.31	3.53 ± 0.07	1.32 ± 0.07	45.76 ± 2.96
模型	—	29.78 ± 0.84 ¹⁾	7.89 ± 0.47 ¹⁾	4.46 ± 0.08 ¹⁾	1.96 ± 0.09 ²⁾	65.69 ± 4.59 ²⁾
阿司匹林	0.0125	27.65 ± 0.19 ³⁾	6.47 ± 0.35 ³⁾	3.76 ± 0.07 ³⁾	1.71 ± 0.08	56.49 ± 3.74 ⁴⁾
小叶锦鸡儿总黄酮	25	28.43 ± 0.90	7.01 ± 0.35	3.84 ± 0.06	1.79 ± 0.10	59.63 ± 4.06 ³⁾
	50	26.77 ± 0.74	6.75 ± 0.42	3.80 ± 0.07	1.72 ± 0.11	57.67 ± 4.31 ³⁾
	100	25.93 ± 0.97 ³⁾	6.39 ± 0.46 ³⁾	3.72 ± 0.06 ⁴⁾	1.57 ± 0.10 ³⁾	55.59 ± 4.58 ⁴⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 CMF 对模型大鼠红细胞参数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	EAI	IR	DI
对照	—	7.61 ± 0.54	4.46 ± 0.19	0.68 ± 0.06
模型	—	10.75 ± 0.79 ²⁾	4.89 ± 0.17 ¹⁾	0.45 ± 0.05 ²⁾
阿司匹林	0.012 5	8.83 ± 0.59	3.94 ± 0.22	0.69 ± 0.08 ⁴⁾
小叶锦鸡儿总黄酮	25	8.24 ± 0.63 ³⁾	3.96 ± 0.23	0.68 ± 0.05 ³⁾
	50	8.30 ± 0.92	3.99 ± 0.22	0.73 ± 0.06 ⁴⁾
	100	7.83 ± 0.58 ⁴⁾	3.65 ± 0.17 ³⁾	0.70 ± 0.07 ⁴⁾

3.3 对大鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 含量的影响

模型组大鼠脑组织 SOD 活性较对照组显著降低($P < 0.01$),MDA 含量较对照组显著增加($P < 0.01$);阿司匹林组,CMF 低、中、高剂量较模型组均可提高脑组织 SOD 活性,降低 MDA 含量, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。见表 3。

表 3 CMF 对模型大鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 含量影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /nmol·mL ⁻¹
对照	—	70.17 ± 15.61	0.96 ± 0.41
模型	—	50.21 ± 10.74 ²⁾	1.61 ± 1.07 ²⁾
阿司匹林	0.0125	62.17 ± 10.02 ³⁾	1.02 ± 0.59 ⁴⁾
小叶锦鸡儿总黄酮	25	55.45 ± 11.67	1.38 ± 0.96 ³⁾
	50	60.23 ± 13.59	1.17 ± 0.44 ³⁾
	100	64.58 ± 9.36 ³⁾	1.08 ± 0.42 ⁴⁾

4 讨论

小叶锦鸡儿是叶型较小的中生、中旱生、旱生和沙生灌木,作为一种天然产物开发利用的植物资源已经逐渐引起研究者的重视,该植物分布于我国北方自然条件恶劣的干旱、半干旱、荒漠等地区,是这些地区绿化和水土保持的重要植被,在不破坏该种植物资源和生态环境的情况下,如能充分利用其茎叶等可再生部位,对改变该地区的农林产品结构和实现天然资源的可持续利用具有重要意义。

目前认为,自由基引发的氧化应激反应被认为是脑缺血再灌注的重要机制之一,其介导的连锁反应是脑缺血再灌注的核心病理环节。在脑缺血再灌注时,通过黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase,XO)途径及白细胞呼吸“爆发”产生大量氧自由基。自由基损伤的主要病理机制是引发脂质过氧化反应,导致细胞损伤破裂,血脑屏障破坏,脑水肿形成。自由基还可以攻击血管内皮细胞膜,加重血管源性脑水肿,进一步加重缺血性脑损伤,并使大脑缺血半暗区(penumbra)的

肉桂多酚改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的分子机制

卢兆莲¹,黄才国^{2*}

(1. 济南军区总医院 实验诊断科,济南 250031;
2. 第二军医大学 生物化学与分子生物学教研室,上海 200433)

[摘要] 目的:研究肉桂多酚改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的分子机制。方法:以 HepG2 细胞为模型,设立对照组和肉桂多酚实验组,肉桂多酚组设 5,10,15 mg·L⁻¹ 3 种不同质量浓度组。肉桂多酚作用细胞 24 h 后,运用实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术,检测肉桂多酚对胰岛素抵抗 HepG2 细胞内葡萄糖转运蛋白 2 (GLUT2)、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)基因表达的影响。结果:与对照组比较,肉桂多酚作用细胞 24 h 后,降低了 GLUT2 mRNA 的表达($P<0.05$);肉桂多酚能够明显降低 PEPCK,G-6-Pase mRNA 的表达($P<0.05,P<0.01$),且随着浓度的升高,肉桂多酚对 PEPCK 和 G-6-Pase mRNA 表达的抑制作用越明显。结论:肉桂多酚对 HepG2 胰岛素抵抗具有明显的改善作用,其机制可能与降低细胞内 GLUT2,PEPCK 和 G-6-Pase mRNA 的表达有关。

[关键词] 肉桂多酚; HepG2; 胰岛素抵抗; 葡萄糖转运蛋白 2、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0276-04

Molecular Mechanism of Cinnamon Polyphenols
on Improvement of Insulin Resistance in HepG2 Cells *in vitro*

LU Zhao-lian¹, HUANG Cai-guo^{2*}

(1. Department of Laboratory Medicine, General Hospital of Ji'nan Military Area, Ji'nan 250031, China;
2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To study the molecular mechanism of cinnamon polyphenols on improvement of insulin resistance in HepG2 cells *in vitro*. **Method:** The HepG2 cells were used as cell model. Cells were

[收稿日期] 20120528(007)
[通讯作者] * 黄才国,教授,从事药理学研究,Tel:021-81870970,E-mail:huangcaiguo@hotmail

血管痉挛及血管内凝血,导致脑梗死范围扩大而加重脑组织损伤范围。自由基及脂质过氧化物的增多,远远超过脑组织的清除能力,机体自身抗氧化酶大量消耗,导致 SOD 等抗氧化酶活性降低^[6]。本试验通过对小叶锦鸡儿总黄酮的研究发现,CMF 各剂量组较模型组均可明显提高模型大鼠脑组织 SOD 活性,降低 MDA 含量;明显抑制血液黏度升高,降低血小板聚集性,改善红细胞变形能力。因此,其防治脑缺血再灌注损伤的机制可能与其抗氧化应激及降低血黏度作用有关。

[参考文献]

[1] 牛西午. 柠条研究论文集[C]. 太原:山西科学技术出版社,2003:163.

[2] 杜学武,郭晓玲,郭春林,等. 锦鸡儿治疗风湿性关节炎临床研究[J]. 中国医药杂志,1995,4(3):11.

[3] 孙国栋,岳永花,李先荣,等. 芪蛭通络胶囊辅助阿司匹林对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):202.

[4] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:35.

[5] Zea Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J] Stroke, 1989, 20(1):84.

[6] Cuzzocrea S, Riley D P, Caputi A P, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/ reperfusion injury [J]. Pharmacol Rev, 2001;53(1): 135.

[责任编辑 聂淑琴]