

水蛭醇提物与水提物对肺缺血再灌注模型大鼠的保护作用

宿怀予*(乐山市人民医院药剂科,四川 乐山 614000)

中图分类号 R969.1;R971.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4447-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.10

摘要 目的:研究水蛭醇提物与水提物对肺缺血再灌注模型大鼠的保护作用,并比较两者的作用效果。方法:夹闭阻断大鼠左肺门30 min,开放后再灌注120 min以复制肺缺血再灌注损伤模型。32只SD大鼠随机分为假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、水蛭醇提物(400 mg/kg)组、水蛭水提物(400 mg/kg)组。手术前3 d腹腔注射给药,每天1次,连续3 d。放射免疫法测定大鼠血浆血栓素B₂(TXB₂)和6-酮前列腺素F_{1a}(6-keto-PGF_{1a})含量[可反映血栓素A₂(TXA₂)、前列环素(PGI₂)水平];酶联免疫吸附法测定大鼠血清一氧化氮(NO)含量与一氧化氮合酶(NOS)活性。结果:与假手术组比较,模型组大鼠血浆中TXB₂含量显著增加, TXB₂/6-keto-PGF_{1a}比值显著降低,血清中NO含量显著增加, NOS活性显著增强($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,水蛭醇提物组、水蛭水提物组大鼠血浆TXB₂、6-keto-PGF_{1a}含量显著减少, TXB₂/6-keto-PGF_{1a}比值显著升高,血清NO含量显著减少, NOS活性显著减弱($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且以上指标水蛭醇提物组均好于水蛭水提物组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:水蛭醇提物与水蛭水提物均可降低肺缺血再灌注模型大鼠TXA₂、PGI₂、NO含量和NOS活性,且前者效果好于后者。

关键词 水蛭醇提物;水蛭水提物;肺缺血再灌注;一氧化氮;一氧化氮合酶;血栓素A₂;前列环素

Protective Effects of Ethanol Extract and Water Extract of *Whitmania acranulata* on Lung Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

SU Huai-yu(Dept. of Pharmacy, Leshan Municipal People's Hospital, Sichuan Leshan 614000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study and compare the protective effects of ethanol extract vs. water extract of *Whitmania acranulata* lung ischemia-reperfusion injury model rats. METHODS: Lung ischemia-reperfusion injury model was induced by 120 reperfusion following 30 min hilum of left lung occlusion and blocking-up. 32 SD rats were randomly divided into sham operation group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), ethanol extract of *A. gulo* group (400 mg/kg), water extract of *W. acranulata* group (400 mg/kg). They were given intraperitoneal injection of medicine 3 days before surgery once a day, for 3 consecutive days. Radioimmunoassay was adopted to determine the contents of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1a} [to reflect the plasma level of TXA₂ and PGI₂]; ELISA assay was used to detect NO content and NOS activity. RESULTS: Compared with sham operation group, the contents of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1a}, serum content of NO, the activity of NOS in plasma were increased significantly in model control group, meanwhile, TXB₂/6-keto-PGF_{1a} ratio was decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with model group, the plasma contents of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1a}, serum content of NO, the activity of NOS were decreased significantly in ethanol extract of *W. acranulata* group and water extract of *W. acranulata* group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); meanwhile, TXB₂/6-keto-PGF_{1a} ratio was increased. above index of ethanol extract of *W. acranulata* group were better than those of water extract of *W. acranulata* group. CONCLUSIONS: The ethanol extract of *W. acranulata* group and water extract of *W. acranulata* group can reduce the contents of TXA₂, PGI₂ and NO, NOS activity in lung ischemia-reperfusion injury rats, and the former is better than the latter.

KEY WORDS Ethanol extract of *Whitmania acranulata*; Water extract of *Whitmania acranulata*; Lung ischemia-reperfusion; NO; NOS; TXA₂; PGI₂

肺缺血再灌注损伤(Ischemia reperfusion injury)可在多种情况下发生,是肺移植早期和心肺转流术后肺功能障碍的重要原因^[1]。中药水蛭为水蛭科动物蚂蟥(*Whitmania pigra* Whitman)、水蛭(*Hirudo nipponica* Whitman)或柳叶蚂蟥(*Whitmania acranulata* whitman)的干燥全体。《神农本草经》记载其“主逐恶血、瘀血、月闭,破血瘕积聚,无子,利水道”。大量文献报道水蛭可用于治疗缺血性心、脑血管疾病^[2-3],且可与其他药物在不同剂量配比下发挥抗凝血和抗血小板聚集的作用^[4],但对其治疗肺缺血的研究鲜有报道。本文就水蛭常规

提取方法所得的醇提物与水提物对肺缺血再灌注大鼠的一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、前列环素(PGI₂)、血栓素A₂(TXA₂)的影响作一探讨并进行比较,以期为其后续研究提供借鉴。

1 材料

1.1 仪器

ZD42型电热恒温水箱(上海黎春仪表电器有限公司);1-14k型高速离心机(德国Sigma公司);旋转蒸发器(南京科尔仪器设备有限公司);小动物呼吸机(北京众实迪创科技)。

1.2 药材

水蛭中药材为市售,经笔者鉴定为柳叶蚂蟥(*W. acranulata*)

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0833-2152601。
E-mail: sclsshy@hotmail.com

Whitman)。

1.3 试剂

血栓素B₂(TXB₂)、6-酮前列腺素F_{1a}(6-keto-PGF_{1a})试剂盒(北京华英生物技术研究所);NO、NOS(南京建成生物工程研究所);水为双蒸水。

1.4 动物

健康SD大鼠32只,♂,体质量256~338g,由四川大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(川)2009-0001]。

2 方法

2.1 水蛭提取物的制备

2.1.1 水蛭醇提物的制备 按文献^[5]方法加以改进,取水蛭粗粉8g,过40目筛,分别用10、8、6倍量95%乙醇溶液回流提取3次,合并3次提取液,旋转蒸发浓缩至无醇味,加蒸馏水40ml溶解,先用石油醚萃取,水溶液部分用乙酸乙酯萃取,乙酸乙酯部分旋转蒸发回收溶剂,得水蛭醇提物(以生药材计2g/10ml),贮藏,备用。

2.1.2 水蛭水提物的制备 按文献^[6]方法加以改进,取水蛭粗粉8g,过40目筛,加水220ml,煎煮2h,离心,沉淀加水240ml继续煎煮2h,离心去沉淀,合并两次离心的上清液,100℃水浴加热浓缩至约15ml,再次离心,上清液100℃水浴挥干,即得水蛭水提物(以生药材计5.3g/10ml),贮藏,备用。

2.2 模型的制备^[7]

大鼠ip戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉,颈部气管切开插管,接小动物呼吸机,机械通气维持呼吸,呼吸比为1:1.5(V/I),潮气量维持10ml/kg,呼吸频率维持在60次/min。胸骨正中切口,尾iv1mg/kg肝素。在大鼠吸气末用无创伤血管夹阻断左肺门30min,开放后再灌注120min。假手术不阻断左肺门,持续灌注150min。

2.3 分组与给药

实验分为四组,即假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、水蛭醇提物(400mg/kg)组、水蛭水提物(400mg/kg)组。分别于术前3天ip给药,每天1次,连续3d。

2.4 生化指标的测定

再灌注120min后大鼠颈总动脉取血2ml,分别置于抗凝管和无抗凝剂试管中静置2h,4℃下以离心半径为8cm,3000r/min离心15min,分离血清、血浆。用酶联免疫吸附(ELISA)法测定大鼠血清中NO含量、NOS活性,求TXB₂/6-keto-PGF_{1a}比值;由于TXA₂和PGI₂性质极不稳定,目前难以测定,TXB₂和6-keto-PGF_{1a}分别为TXA₂、PGI₂的稳定代谢产物,故采用放射免疫法测定TXB₂和6-keto-PGF_{1a}来反映大鼠血浆中TXA₂、PGI₂的水平。

3 结果

3.1 水蛭提取物对模型大鼠血浆中TXB₂、6-keto-PGF_{1a}含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血浆TXB₂含量显著增加(P<0.01),TXB₂/6-keto-PGF_{1a}比值显著升高;与模型组比较,水蛭醇提物组与水蛭水提物组大鼠血浆TXB₂、6-keto-PGF_{1a}含量显著减少(P<0.01或P<0.05),TXB₂/6-keto-PGF_{1a}比值显著降低;水蛭醇提物组大鼠血浆TXB₂、6-keto-PGF_{1a}含量、TXB₂/6-keto-PGF_{1a}比值均低于水蛭水提物组,但差异无统计学意义(P>0.05)。水蛭提取物对模型大鼠血浆中TXB₂、

6-keto-PGF_{1a}含量的影响见表1。

表1 水蛭提取物对模型大鼠血浆中TXB₂、6-keto-PGF_{1a}含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of *W. acranulata* extract on plasma contents of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1a} ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量,mg/kg	n	TXB ₂ ,ng/mg	6-keto-PGF _{1a} ,ng/mg
假手术组		8	42.76±4.51	99.27±11.54
模型组		8	90.35±6.97 [*]	108.46±12.95
水蛭醇提物组	400	8	51.65±4.98 ^{##}	94.51±9.76 [#]
水蛭水提物组	400	8	67.41±5.73 ^{##}	96.22±9.84 [#]

与假手术组比较: *P<0.01;与模型组比较: #P<0.05, ##P<0.01

vs.sham operation group: *P<0.01;vs.model group: #P<0.05, ##P<0.01

3.2 水蛭提取物对模型大鼠血清中NO含量、NOS活性的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清NO含量显著减少,NOS活性显著增强(P<0.05);与模型组比较,水蛭醇提物组与水蛭水提物组大鼠血清NO含量显著增加,NOS活性显著减弱(P<0.05);水蛭醇提物组大鼠血清NO含量、NOS活性均低于水蛭水提物组,但差异无统计学意义(P>0.05)。水蛭提取物对模型大鼠血清中NO含量、NOS活性的影响见表2。

表2 水蛭提取物对模型大鼠血清中NO含量、NOS活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of *W. acranulata* extract on NO content and NOS activity in serum of model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量,mg/kg	n	NO,μmol/L	NOS,U/ml
假手术组		8	28.25±1.87	19.65±7.41
模型组		8	36.74±2.08 [*]	45.28±11.39 [*]
水蛭醇提物组	400	8	29.55±1.73 [#]	21.42±8.53 [#]
水蛭水提物组	400	8	32.42±1.96 [#]	23.74±8.96 [#]

与假手术组比较: *P<0.05;与模型组比较: #P<0.05

vs.sham operation group: *P<0.05;vs.model group: #P<0.05

4 讨论

TXA₂和PGI₂均是花生四烯酸经环氧合酶(COX)途径,分别由6-keto-PGF_{1a}和TXB₂催化产生。在正常情况下,TXA₂和PGI₂处于适当的比例,缺血再灌注时,一方面血管内皮细胞受损,PGI₂生成减少;另一方面,又致血小板释放TXA₂增多,发生强烈的血管收缩和血小板聚集并进一步释放TXA₂,扰乱TXA₂/PGI₂的动态平衡,致微血管强烈收缩,血栓形成与堵塞,血管通透性增高,加重缺血和周围组织水肿^[8]。

NO具有促进血管扩张、低浓度下可保护细胞,抑制细胞膜钙通道活性,减轻细胞内钙超载的作用;而高浓度下,NO可与超氧阴离子反应生成超氧亚硝酸根离子,对细胞有损伤作用。NOS是NO合成的限速酶,是调节NO的最重要环节^[9]。

本研究显示,肺缺血再灌注损伤模型大鼠血浆TXB₂含量明显增加,6-keto-PGF_{1a}无明显变化,但TXB₂/6-keto-PGF_{1a}比值明显增高,提示循环血中TXB₂/6-keto-PGF_{1a}的平衡失调;大鼠血清NO含量明显增加,NOS活性明显增强,表明机体处于病理状态。通过术前给药3d,可看出大鼠血浆TXB₂含量明显减少,6-keto-PGF_{1a}无明显变化,TXB₂/6-keto-PGF_{1a}比值明显降低;大鼠血清NO含量明显减少,NOS活性明显减弱,且水蛭醇提物作用好于水蛭水提物,表明水蛭醇提物与水蛭水提物均可降低肺缺血再灌注模型大鼠TXA₂、PGI₂、NO含量与

正交试验优选白藜芦醇微囊处方[△]

胡 荣*, 罗先钦, 秦伟瀚, 张小梅, 励 娜, 王云红, 杨荣平[#](重庆市中药研究院, 重庆 400065)

中图分类号 R283.62;R286 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4449-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.11

摘 要 目的: 优选白藜芦醇微囊的处方。方法: 采用滴制法制备白藜芦醇微囊, 以海藻酸钠黏度、海藻酸钠与白藜芦醇质量比、海藻酸钠质量分数、氯化钙质量分数为考察因素, 以白藜芦醇载药量和包封率的综合评分为评价指标, 采用正交试验优选白藜芦醇微囊处方。结果: 最优处方为海藻酸钠黏度为 380 cps、海藻酸钠与白藜芦醇的质量比为 0.5:1、海藻酸钠质量分数为 2.0%、氯化钙质量分数为 3.0%。结论: 所选白藜芦醇微囊处方合理, 制得的白藜芦醇微囊载药量和包封率较高。

关键词 白藜芦醇; 微囊; 海藻酸钠; 氯化钙

Optimization of the Formulation of Resveratrol Microcapsules by Orthogonal Test

HU Rong, LUO Xian-qin, QIN Wei-han, ZHANG Xiao-mei, LI Na, WANG Yun-hong, YANG Rong-ping (Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the formulation of Resveratrol microcapsules. METHODS: Resveratrol microcapsules were prepared by the dropping method. The formulation of Resveratrol microcapsules was optimized by orthogonal test with the viscosity of sodium alginate, mass ratio of sodium alginate to resveratrol, mass fraction of sodium alginate, mass fraction of calcium chloride as factors using the drug-loading amount and encapsulation coefficient of resveratrol as index. RESULTS: The optimal formulation was as follows: sodium alginate of 380 cps, mass ratio of sodium alginate to resveratrol 0.5:1, mass fraction of sodium alginate 2.0%, mass fraction of calcium chloride 3.0%. CONCLUSIONS: Resveratrol microcapsules are reasonable in formulation and characterized with high drug-load amount and high encapsulation coefficient.

KEY WORDS Resveratrol; Microcapsules; Sodium alginate; Calcium chloride

白藜芦醇是萘醌蒽类化合物, 主要来源于蓼科植物虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) 的根茎提取物^[1]。研究表明, 其有抗癌、抗心脑血管疾病、抗突变、抗菌、抗炎等药理作用^[1-4]。但是, 白藜芦醇对光、热的稳定性较差^[5-7], 因此提高其稳定性是拓宽白藜芦醇应用范围的关键。

微囊是利用天然的或合成的高分子材料将固体或液体药物包嵌而成的微型胶囊, 粒径在 2~10 mm 范围内, 其中大粒

径微囊主要用于掩盖药物气味、提高稳定性, 小粒径微囊则用于靶向给药^[8]。微囊以源于天然海洋多糖作为载体, 具有良好的生物相容性、生物降解性和低毒性, 越来越受到人们的重视, 广泛应用于医药卫生和食品领域, 在新剂型的研究中也显示出良好的应用前景^[9]。

1 材料

1.1 仪器

NOS 活性, 且前者效果好于后者。

参考文献

- [1] 王晓杨, 毛宇飞, 王万铁, 等. 氧化应激与总肺缺血再灌注细胞凋亡的相关性及川芎嗪干扰的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(18): 3 857.
- [2] 李艳玲, 黄荣清, 崔玉芳, 等. 水蛭的研究概况及展望[J]. 科学技术与工程, 2004, 4(3): 239.
- [3] 李可建. 水蛭治疗缺血性中风急性期随机对照试验的系统评价[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(17): 2 311.
- [4] 梁进权, 宓穗卿, 王宁生. 水蛭、蛇虫配伍的抗凝血和抗血

- 小板聚集的作用[J]. 中药材, 2009, 32(9): 1 347.
- [5] 冯光军, 朱正光, 余传林, 等. 水蛭乙醇提取物体外抗凝血活性研究[J]. 中药材, 2007, 30(8): 910.
- [6] 朱正光, 吴曙光, 孙燕荣. 水蛭水煎液抗栓作用机制的体外实验研究[J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22(5): 229.
- [7] Zhang X, Bedard EL, Potter R, *et al*. Mitogen-activated protein kinases regulate HO-1 gene transcription after ischemiareperfusion lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283(4): 1 815.
- [8] 王卫, 王万铁, 徐正, 等. 川芎嗪对家兔肠缺血再灌注损伤时血浆 TXA₂/PGI₂ 水平的影响[J]. 温州医学院学报, 2004, 34(4): 256.
- [9] 杜文兵, 甄丽芳, 黄福开, 等. 二十五味珊瑚丸对偏头痛大鼠血浆 NO 和 NOS 的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 29(2): 147.

(收稿日期: 2013-10-22 修回日期: 2013-11-12)

[△] 基金项目: 重庆市卫生局中医药科技项目 (No. 2011-2-149)

* 助理研究员, 硕士。研究方向: 药物新剂型。电话: 023-89029068。E-mail: hr790606@163.com

[#] 通信作者: 研究员, 博士。研究方向: 新药开发。电话: 023-89029056。E-mail: rongpingyang18@yahoo.com.cn