

绞股兰总皂苷对小鼠脑缺血的保护作用及对自由基生成的抑制作用*

王 迪 李晓东¹ 王化洲 赵艳杰(锦州 121001 锦州医学院基础学院药理教研室, ¹锦州市中心医院麻醉科)

摘要 目的: 观察绞股兰总皂苷对小鼠脑缺血的保护作用及对自由基生成的抑制作用。方法: 不完全结扎小鼠一侧颈总动脉及迷走神经, 另侧完全结扎造成脑缺血, 观察 6h 卒中指数, 12h 存活时间和死亡率; 体外生成 O_2^- 。结果: 与对照组比较, 绞股兰总皂苷 17.5, 35 和 52.5 mg·kg⁻¹ ip 可以降低卒中指数, 分别降低 25.6% ($P < 0.05$), 36.7% ($P < 0.01$) 和 52.4% ($P < 0.01$); 延长存活时间, 分别延长 165% ($P < 0.01$), 189% ($P < 0.01$) 和 252% ($P < 0.01$); 降低死亡率, 分别降低 30% ($P < 0.01$), 48% ($P < 0.01$) 和 64% ($P < 0.01$); 均呈一定的剂量依赖性趋势。绞股兰总皂苷 50, 100 和 150 mg·L⁻¹ 对体外生成的 O_2^- 均有一定的抑制作用。结论: 绞股兰总皂苷对小鼠脑缺血具有保护作用, 且可能与其对自由基生成具有抑制作用有关。
关键词 绞股兰总皂苷; 脑缺血; 卒中指数; 存活时间; 死亡率; 超氧阴离子 O_2^-

Protection of Gynostemma Pentaphyllum against cerebral ischemia in mice and its effects on production of oxygen free radical in vitro

Wang Di, Li Xiao-Dong¹, Wang Hua-Zhou, Zhao Yan-Jie (Department of Pharmacology, Jinzhou Medical College, ¹Department of Anaesthesia, Jinzhou Central Hospital, Jinzhou 121001)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the protection of Gynostemma Pentaphyllum against cerebral ischemia in mice and its effects on production of oxygen free radical in vitro. **METHOD:** Cerebral ischemia of mouse was produced by partial ligation of bilateral common carotid arteries with vagi. Observing the apoplectic index of 6hr after cerebral ischemia, the survival time and mortality of 12hr after cerebral ischemia. Produce oxygen free radical in vitro. **RESULTS:** Gynostemma Pentaphyllum 17.5, 35 and 52.5 mg/kg ip, could decrease the apoplectic index and mortality and significantly increase the survival time. The results showed that Gynostemma Pentaphyllum has protective effect on the cerebral ischemic mouse. Gynostemma Pentaphyllum 50, 100, 150 mg·L⁻¹ has inhibitory effect on production of superoxide anion in vitro. **CONCLUSION:** It was speculated that the beneficial effects of Gynostemma Pentaphyllum on cerebral ischemic damage in mice might due to its depressing effects on the production of oxygen free radicals.

KEY WORDS Gynostemma Pentaphyllum, cerebral ischemia, apoplectic index, survival time, mortality, superoxide anion

绞股兰 (Gynostemma Pentaphyllum (Thunb) Mak, GPM) 为葫芦科绞股兰属植物, 基本化学结构是达码烷型。从绞股兰中分离, 定出 82 种皂苷, 其中绞股兰皂苷 3, 4, 8, 12 分别与人参皂苷的 Rb1, Rb3, Rd, F2 在化学结构上完全相同^[1]。目前关于绞股兰皂苷对于脑缺血的保护作用尚未完全肯定。本实验采用小鼠不完全脑缺血模型及体外生成 O_2^- 的方法, 观察了绞股兰总皂苷对小鼠脑缺血的保护作用及对体外生成的 O_2^- 的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料

动物: 昆明种小鼠, 雄性, 18~20g, 由北京医科大学实验动物部提供。

药品: 绞股兰总皂苷由北京医科大学药化教研室提供。超氧化物歧化酶(甘肃省夏和生物制剂厂), 黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶(Sigma 公司产品), 其它试剂均为国产分析纯。

仪器: 721 分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 方法

脑缺血方法^[2,3]: 给小鼠吸入少量乙醚, 在浅麻下分离双侧颈总动脉和迷走神经, 在一侧颈总动脉和迷走神经下放置一直径 0.5mm 的细钢丝, 套 0 号缝线, 结扎后抽出钢丝, 再结扎另侧带迷走神经的颈动脉, 缝合皮肤, 放入笼中, 观察动物活动情况, 12h 存活时间和死亡率, 6h 卒中指数。卒中指数、存活时间和死亡率的观察: 采用双盲法计算小鼠脑缺血后 6h 内每小时的卒中指数, 并计算其总和。观察 12h 内各组的存活时间和死亡率, 卒中指数参照 Ohno 等^[4]的方法, 观察的神经症状包括竖毛震颤、运动减少、旋转运动、肢体瘫痪和昏睡等。

1.3 O_2^- 的生成及其测定

黄嘌呤(XAN)在黄嘌呤氧化酶(XO)催化的代谢过程中, 可产生 O_2^- , 后者在酸性条件下可使羟胺发生氧化反应, 生成亚硝酸盐, 其反应式如下: $2O_2^- + NH_2OH \rightarrow H_2O_2 + H_2O + NO_2$ 。亚硝酸盐可与对氨基苯磺酸和 α -萘胺发生成色

* 辽宁省自然科学基金资助 972004

反应,在 530nm 处有最大吸收,用比色法测出 NO₂ 的浓度,由此可换算出 O₂⁻ 生成量。反应体系中含有: Xan 375 μmol·L⁻¹, 羟胺 500 μmol·L⁻¹, PBS (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) 100 mmol·L⁻¹, pH 7.8 及各种待测药物,37℃ 水浴预温 5 min,加入 XO 0.003U 触发反应,总反应体积为 1 ml,然后在 37℃ 水浴中孵育 30 min,冰浴终止反应。取反应液 1 ml 加入对氨基苯磺酸 17.26 mmol·L⁻¹, α-萘胺 7 mmol·L⁻¹, PBS 100 mmol·L⁻¹ 1 ml 混匀,室温下静止 20 min,以空白管调零,于 530nm 波长处比色。以亚硝酸钠制备标准曲线,根据标准曲线计算 O₂⁻ 生成量。

2 结果

表 1 绞股兰总皂苷对脑缺血小鼠存活时间,卒中指数和死亡率的影响

组别	剂量 (mg/kg)	n	存活时间 (min) (x±s)	卒中指数 (score) (x±s)	死亡率
假手术组		10	720.00±0.00	1.66±0.87	0/10
缺血组		18	123.24±101.56 ⁺⁺	17.07±4.64 ⁺⁺	18/18 ⁺⁺⁺
绞股兰总皂苷	17.5	20	326.59±125.68 [*]	12.70±5.43 [*]	14/20 ^{**}
	35	21	356.16±164.11 ^{**}	10.80±7.48 ^{**}	11/21 ^{**}
	52.5	22	433.80±115.57 ^{**}	8.13±5.60 ^{**}	8/22 ^{**}

与假手术组比较⁺⁺ $P < 0.01$ 与缺血组比较^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ a. X² 检验

2.2 绞股兰总皂苷对 O₂⁻ 生成的抑制作用

如表 2 所示。黄嘌呤(XAN)在黄嘌呤氧化酶(XO)作用下可生成 O₂⁻,生成量为 15.75±0.17 μmol·L⁻¹·30 min⁻¹。绞股兰总皂苷 50、100、150 mg·L⁻¹ 对 O₂⁻ 的生成均有一定抑制作用,与对照组比较,其抑制率分别为 16.3%, 18.8%, 21.5% ($P < 0.05$) 而超氧化物歧化酶(SOD)组与空白对照组比抑制 O₂⁻ 的生成率为 92.3% ($P < 0.01$)。结果表明绞股兰总皂苷和 SOD 对 O₂⁻ 的生成均有抑制作用。

表 2 绞股兰总皂苷对体外生成的 O₂⁻ 的抑制作用

组别	剂量	N	O ₂ ⁻ (μmol·30 min ⁻¹)
对照组		4	15.75±0.17
绞股兰总皂苷	50 mg·L ⁻¹	4	13.18±0.21 ⁺
	100 mg·L ⁻¹	4	12.79±0.36 ⁺
	150 mg·L ⁻¹	4	12.36±0.22 ⁺
SOD	300 u·ML ⁻¹	4	1.23±0.06 ⁺⁺⁺

与对照组比较⁺ $P < 0.05$, ⁺⁺⁺ $P < 0.001$

3 讨论

目前脑缺血病理模型的制作方法已有多种,如结扎蒙古沙土鼠双侧或单侧颈动脉;结扎大鼠三血管(基底动脉及双侧颈动脉)和四血管(双侧椎动脉及双侧颈动脉)以及结扎大鼠双侧颈动脉合并降低血压;其它尚有结扎猫或大鼠大脑中动脉等。但由于这些模型的手术多较复杂或动物来源困难,

2.1 绞股兰总皂苷对脑缺血小鼠卒中指数、存活时间和死亡率的影响 由表 1 可见,小鼠脑缺血后,卒中指数和死亡率明显增加,存活时间明显缩短,与假手术组相比,经统计学处理,均有显著差异 ($P < 0.01$) 绞股兰总皂苷 17.5, 35 和 52.5 mg/kg 组与缺血组比较,6h 卒中指数降低,分别降低 25.6% ($P < 0.05$), 36.7% ($P < 0.01$) 和 52.4% ($P < 0.01$): 12h 存活时间相应增加,分别增加 165% ($P < 0.01$), 189% ($P < 0.01$) 和 252% ($P < 0.01$): 12h 死亡率降低,分别降低 30% ($P < 0.01$), 48% ($P < 0.01$) 和 64% ($P < 0.01$), 均呈一定的剂量依赖性趋势。结果表明绞股兰总皂苷对脑缺血具有保护作用。

故不适于大量新药的初筛。为此,我们采用由冯亦璞等^[2]发展起来的小鼠脑缺血模型并参照 Ohno 等的卒中指数评分标准和 12h 存活时间及死亡率对绞股兰总皂苷的疗效进行初步评价。结果显示绞股兰总皂苷能够降低卒中指数及死亡率,延长存活时间,对缺血性脑损伤具有一定的保护作用。缺血性脑损伤的发病机理至今尚未完全阐明,目前较为公认的三种学说是:兴奋性氨基酸毒性学说,自由基损伤学说和钙超载学说。我们从自由基入手,发现绞股兰总皂苷对体外生成的自由基 O₂⁻ 的生成具有一定的抑制作用。因此推测绞股兰总皂苷对自由基的影响可能与其发挥脑保护作用有关。绞股兰总皂苷对缺血性脑损伤的影响及其它的可能作用机制我们已在大鼠四血管结扎模型上进行了进一步的证实与研究,这些材料将在另文报道。

参考文献

- 郭生栋. 绞股兰研究进展. 中草药, 1987; 18(7): 37
- 冯亦璞, 孙亚丁. 小鼠脑缺血后的能量代谢改变和药物的作用. 药理学学报, 1989; 24(2): 89
- 徐淑云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学: 北京: 人民卫生出版社, 1991: 948
- 李麟仙, 王子灿. 三七皂苷对急性脑缺血的保护作用, 中国药理学通报, 1991; 7(1): 56

收稿日期: 1999- 09- 24