

· 实验研究 ·

黄芪总黄酮对缺血再灌注损伤模型中
一氧化氮的作用及其影响*

汪德清 王成彬 田亚平 沈文梅

王彩云 周和平 颜光涛

内容提要 目的:研究黄芪总黄酮(total flavonoids of astragalus, TFA)对缺血再灌注损伤的防护作用。方法:应用家兔失血性休克/再灌注模型(shock/reperfusion, S/R),观察损伤后血浆中一氧化氮(nitric oxide, NO)代谢终产物亚硝酸盐(NO_2^-)的变化及 TFA 和磷脂酶 A_2 阻断剂氯喹(Chlq)治疗对其的影响。结果:数据表明 S/R 后 24h 内血浆中 NO_2^- 含量,与血 pH 值及二氧化碳总量(TCO_2)下降呈正相关;TFA 和 Chlq 可在一定程度上阻断 NO 的减少,且对维持体内酸碱平衡有一定作用。结论:TFA 对缺血再灌注损伤具有防护作用。

关键词 黄芪总黄酮 休克 缺血/再灌注 一氧化氮

Effect of Total Flavonoids of Astragalus on Nitroxide in Ischemia Reperfusion Injury Wang Deqing, Wang Chengbin, Tian Yaping, et al *General Hospital of PLA, Beijing (100853)*

Objective: To study the protective effect of total flavonoids of Astragalus (TFA) on ischemia/reperfusion injury. **Methods:** Change of nitrite (NO_2^-), the terminal product of nitric oxide (NO) metabolism, and the effect of TFA and chloroquine (a phospholipase A_2 inhibitor) on it were observed with hemorrhagic shock/reperfusion injury (S/R) rabbit model. **Results:** Plasma NO_2^- content was positively correlated with blood pH and total carbon dioxide content lowering. TFA and chloroquine could block the decrease of NO in certain degree and might have some effect on maintaining acid-base balance of body. **Conclusion:** TFA has protective effect on ischemia/reperfusion injury.

Key words total flavonoids of Astragalus, shock, ischemia/reperfusion, nitric oxide

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种无机小分子物质,广泛存在于脊椎动物的各种细胞内,具有调节血管张力,传递神经信息,抑制血小板凝聚,介导细胞免疫和细胞毒等多种生理学活性作用⁽¹⁾。有研究表明 NO 与缺血再灌注损伤有密切关系,其作用机理很可能是通过阻碍中性粒细胞的粘附而减轻缺血再灌注损伤程度⁽²⁾。由于缺血再灌注过程中有大量自由基产生。因此,探讨在缺血再灌注损伤模型中 NO 的作用与天然抗氧化剂的关系具有十分重要的理论意义和临床应用价值。

材料和方法

1 动物及分组 大耳白兔 52 只,6 月龄,体重

2~2.5kg,雌雄各半,军事医学科学院动物实验中心提供。随机分 4 组:S/R 复苏组(简称 S/R 组)11 只;假手术组(只作手术,不作放血等处理,简称 Sham 组)7 只;TFA 治疗组(简称 TFA 组,剂量为 10mg/kg)18 只;Chlq 治疗组(简称 Chlq 组,剂量为 40 $\mu\text{mol/kg}$)16 只。

2 药物 黄芪总黄酮(total flavonoids of astragalus, TFA):黄芪购自内蒙古呼和浩特药材采购批发公司,参照文献^(3,4)提取,药材饮片用 95%乙醇回流提取 3 次,每次 2h,合并提取液,过滤,浓缩,回收乙醇,浸膏用热蒸馏水溶解,以三倍量醋酸乙脂萃取,合并萃取液,过滤,浓缩至浸膏,将浸膏进行脱脂处理,得总黄酮。总黄酮成分由军事医学科学院二所鉴定。氯喹(Chlq)为 Sigma 产品。

3 试剂及仪器 乙醇和醋酸乙脂等均为分析纯试剂,由北京化工三厂生产。ABL520 血气分析仪(丹麦产),BT-224 半自动生化分析仪(意大利产)。

* 全军“九·五”卫生基金青年课题(No. 96Q101)

解放军总医院(北京 100853)

4 造模及给药方法 静脉注射 30% 乌拉坦 (5ml/kg) 麻醉动物, 肝素化, 分离左侧颈动脉, 接三通, 分别监测血压和放血, 10min 内血压 (MAP) 降到 20mmHg (5.3kPa), 休克, 持续 60min, 失血占循环血量的 50% 左右, 快速回输自体血和 20ml 生理盐水 (治疗组药物加于生理盐水中), 血压回升至 40mmHg (8.9kPa)。同时, 分别于失血前、复苏 30min、2h、6h、24h 采血 2ml, 其中 1ml 经肝素抗凝, 作血气分析 (TCO_2 和 pH 值), 另 1ml 离心 (2500r/min, 5min) 分离血浆, 存于 -80°C 冰箱待测 NO 终产物 NO_2^- 。各组动物除回输血液外, 外加液体 100ml (用以补充手术过程中丢失的水分), 其中 1/2 量于 S/R 后 1h 内输完, 余量在 2~3h 内输完。

5 观察项目及检测方法

5.1 NO 代谢终产物 NO_2^- 的测定 应用 Griess 法^[5], 待测血浆同 Griess 试剂 (1% 对氨基苯磺酸, 0.1% 萘酚, 5% 磷酸) 进行重氮偶氮反应, 其产物在 548nm 处有最大吸收峰, 用亚硝酸钠作标准, 在 BT-224 半自动生化分析仪上用双波长 (主波长 546nm, 副波长 630nm) 测定亚硝酸盐浓度。

5.2 TCO_2 和 pH 值的测定 采用 ABL520 血气分析仪测定。

6 统计分析 采用 t 检验, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行相关分析。

结 果

1 S/R 对血浆 NO_2^- 的改变及黄芪总黄酮对其的影响 见图 1。S/R 引起血浆中 NO_2^- 的含量下降, 24h 为最低值, 为失血前的 1/3 (与放血前比较, $P < 0.01$)。Sham 组 NO_2^- 含量也有下降, 但 24h 时又显著回升, 且高于 S/R 组 (与 S/R 组比较, $P < 0.05$)。TFA 和 Chlq

可有效的防止 NO 浓度的下降, 与 Sham 组和 S/R 组比较, 各时间点均有显著性差异 ($P < 0.05$), TFA 组在 24h 时与 S/R 组比较有显著性差异 ($P < 0.01$); 24h 时 Sham 组、TFA 组及 Chlq 组血浆中 NO_2^- 均显著高于 S/R 组 ($P < 0.01$)。

2 黄芪总黄酮对 S/R 所致血 TCO_2 变化的影响 见表 1。S/R 可致血中 TCO_2 下降, 24h 时为最低点 (与休克前比较, $P < 0.05$)。Sham 组亦有类似改变, 但 24h 时又显著高于 S/R 组 (与 S/R 组 24h 时比较, $P < 0.01$), 从治疗组 (TFA 和 Chlq) 的数据可以看出, TCO_2 先出现明显下降, 而后逐渐恢复, 至 24h 时显著高于 S/R 组 (与 S/R 组同期比较, $P < 0.01$)。

3 黄芪总黄酮对 S/R 所致血 pH 值变化的影响 见表 2。S/R 能引起血 pH 下降, 24h 时达最低点 ($P < 0.01$)。假手术组的变化不明显, 黄芪总黄酮可明显改善 pH 的变化, 在 24h 时显著高于 S/R 组 ($P < 0.05$)。

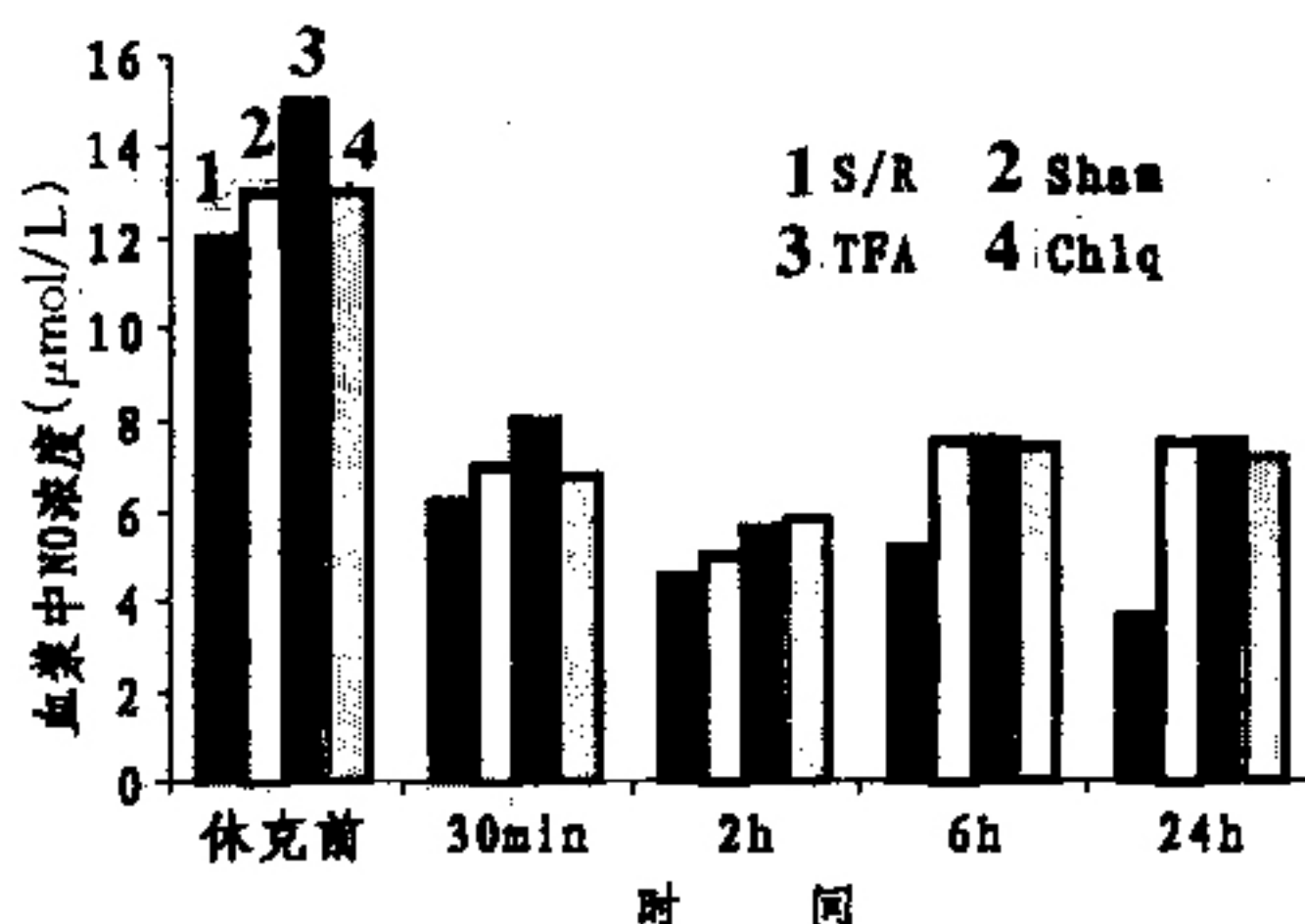


图 1 S/R 对血浆 NO_2^- 的改变及黄芪总黄酮对其的影响

表 1 黄芪总黄酮对 S/R 所致血 TCO_2 变化的影响 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	休克前	灌注后			
			30min	2h	6h	24h
S/R	11	44.7 ± 10.8	37.8 ± 5.4	33.6 ± 8.6*	35.7 ± 8.4*	27.7 ± 10.7*
Sham	7	47.6 ± 5.3	34.5 ± 9.5**	32.5 ± 9.4**	38.9 ± 7.3*	39.7 ± 6.9*△
TFA	18	49.6 ± 5.7	33.4 ± 7.3**	34.4 ± 5.7**	38.1 ± 7.5**	36.5 ± 9.5**△
Chlq	16	46.7 ± 6.9	34.4 ± 7.3**	37.9 ± 10.8*	37.4 ± 6.2**	33.7 ± 5.4**△

注: 与本组休克前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 S/R 组同期比较, △ $P < 0.01$

表 2 黄芪总黄酮对 S/R 所致血 pH 值变化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	休克前	灌注后			
			30min	2h	6h	24h
S/R	11	7.33 ± 0.06	7.27 ± 0.08	7.23 ± 0.13*	7.24 ± 0.11*	7.15 ± 0.14**
Sham	7	7.33 ± 0.06	7.32 ± 0.07	7.33 ± 0.07	7.35 ± 0.06△	7.31 ± 0.11△
TFA	18	7.34 ± 0.06	7.28 ± 0.09	7.29 ± 0.08	7.29 ± 0.08	7.25 ± 0.13*△
Chlq	16	7.37 ± 0.04	7.32 ± 0.07	7.29 ± 0.09	7.25 ± 0.25	7.26 ± 0.13**△

注: 与本组休克前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 S/R 组同期比较, △ $P < 0.01$

4 相关分析 结果表明 S/R 后 24h 内血浆中 NO_2 含量与血 pH 值及 TCO_2 下降呈正相关(相关系数分别为 0.905 和 0.952); Sham 组仅与 TCO_2 下降呈正相关($r = 0.763$); TFA 和 Chlq 可在一定程度上阻断 NO_2 的减少, TFA 与血 pH 值及 TCO_2 的相关系数分别为 0.776 和 0.953, Chlq 与血 pH 值及 TCO_2 的相关系数分别为 0.808 和 0.911。提示 TFA 和 Chlq 对维持体内酸碱平衡有一定作用。

讨 论

NO 作为一种真核生物细胞中新近发现的重要活性介质, 几乎参与各种疾病过程⁽⁶⁾。近年来, NO 在严重感染及失血性休克再灌注损伤中的作用引起了人们的重视。有实验表明, 在体外 NO 有促进脂多糖(LPS)调控中性粒细胞释放肿瘤坏死因子(TNF)的作用⁽⁷⁾, 但在整体情况下, NO 可减轻 LPS 诱导的肝脏微循环障碍⁽⁸⁾, 提示 NO 在体内可能对重要脏器有保护作用。

在缺血再灌注过程中有大量的氧自由基产生, 氧自由基攻击细胞膜上的不饱和脂肪酸, 造成脂质过氧化损伤。脂质过氧化与花生四烯酸代谢有密切关系, 其中激活磷脂酶 A_2 (PLA_2), 是其关键因素, 它通过调节前列腺素、白三烯和血小板激活因子等途径介导过度的炎性反应造成损伤。我们以往的研究已证明黄芪总黄酮可直接清除氧自由基的功效⁽⁹⁾, 阻断脂质过氧化反应⁽¹⁰⁾, 但黄芪总黄酮对缺血再灌注损伤所致 NO 改变的报道尚属首次。Vadas P 等的研究表明 PLA_2 阻断剂在治疗脓毒血症过程中对脏器功能有明显保护作用⁽¹¹⁾, 而脓毒血症又与许多生物因子(如肿瘤坏死因子、内皮素等)有关。因此, 在研究黄芪总黄酮对缺血再灌注损伤时所致 NO 变化同时, 比较观察了 PLA_2 阻断剂的作用。

本实验结果表明 S/R 后血 NO 逐渐下降, 并同血 TCO_2 和 pH 改变密切相关, 表明 NO 下降可能是 S/R 损伤的早期原因之一; 黄芪总黄酮及 PLA_2 阻断剂均

可明显提高由 S/R 所致的 NO 下降, 减轻酸中毒, 维持内环境稳定。提示 NO 可能具有对抗酸中毒的作用, 氧自由基和 PLA_2 的代谢产物在 S/R 损伤过程中与 NO 有关。至于天然抗氧化剂通过清除自由基还是通过其他途径而达到提高 NO 的浓度, 缓解酸中毒, 减轻 S/R 所致损伤尚需进一步研究证实。

参 考 文 献

1. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43: 109—142.
2. Hazem A, Lracs PI, Cathal JK. Nitric oxide (Endothelium derived relaxing factor) attenuates revascularization-induced lung injury. *J Surg Res* 1994;57:39—43.
3. 贺正全, 王宝琴. 蒙古黄芪化学成分的分鉴定. *药学学报* 1991;25(9):694—698.
4. 王志学, 马启凤, 何 群, 等. 黄芪化学成分的研究. *中草药* 1983;14(3):1—3.
5. 王成彬, 沈文梅, 田亚平, 等. 铜离子活化镉还原法测定血清中硝酸盐浓度. *中华医学检验杂志* 1996;19(5):281—283.
6. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994;31:131—139.
7. Derort AL, Yan L, Madara PJ. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF- α production by human neutrophils. *J Immunol* 1994;152:4102—4109.
8. Nishida J, Robett SM, Deborah M. Protective role of NO in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia. *Am J Physiol* 1994;267(6):G1135—1141.
9. 汪德清, 沈文梅, 田亚平, 等. 黄芪有效成分对氧自由基清除作用的 ESR 研究. *生物化学与生物物理进展* 1996;23(3): 260—262.
10. 汪德清, 沈文梅, 田亚平, 等. 黄芪活性提取成分对膜脂质过氧化损伤的防护作用. *中国中药杂志* 1996;21(12):746—748.
11. Vadas P, Stefanski W. Potential therapeutic efficacy of inhibition of human phospholipase A_2 in septic shock. *Agents Action* 1996;19:194—197.

(收稿:1998-02-04 修回:1998-08-20)

欢 迎 投 稿

欢 迎 订 阅