

枳椇子提取物对低压缺氧环境下小鼠游泳的影响

杨 建^①, 裴小玲^①, 嵇 扬^②

摘 要 目的 考察枳椇子提取物对低压缺氧环境下小鼠游泳至力竭时间的影响。方法 雄性 ICR 小鼠随机分为 8 组, 分别为空白对照组、诺迪康胶囊阳性药组、枳椇子提取物 1 (200、100、50 mg/(kg·d)) 和枳椇子提取物 2 (32、16、8 mg/(kg·d)) 高、中、低各 3 个剂量组, 连续给药 5 d 后进行低压缺氧下游泳实验。结果 枳椇子提取物能够延长低压缺氧环境下小鼠游泳至力竭时间。结论 低压缺氧环境下枳椇子提取物能够延缓机体运动性疲劳。

关键词 枳椇子; 游泳实验; 低压; 缺氧; 抗疲劳

中图分类号 R965

文献标志码 A

文章编号 1008-9926(2012)01-074-03

DOI 10.3969/j.issn.1008-9926.2012.01.22

Effect of *Hovenia Dulcis* Thunb Extracts on Tolerance Time of Exhaustion in Swimming Test under Low Pressure and Hypoxia

YANG Jian^①, PEI Xiao-ling^①, JI Yang^②

^①Graduate School of Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

^②Institute for Drug and Instrument Control Health Department GLD of PLA, Beijing 100071, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of extracts from *Hovenia dulcis* thunb on the tolerance time of exhaustion of mice in swimming test under low pressure and hypoxia. **Methods** Male ICR mice were randomly divided into 8 groups at blank group, *Nuodikang* capsule positive group, three groups of *Hovenia dulcis* Thunb extracts 1 and 2 at high, middle and low dosage. The mice were treated consecutively for 5 and then the swimming test was performed. **Results** *Hovenia dulcis* Thunb extracts could extend the tolerance time of exhaustion in swimming test under low pressure and hypoxia. **Conclusion** *Hovenia dulcis* Thunb Extracts can help relieve the exercise fatigue under low pressure and hypoxia.

[Key words] *Hovenia dulcis* thunb; swimming test; low pressure; hypoxia; anti-fatigue

枳椇子为鼠李科 (*Rhamnaceae*) 拐枣属 (*Hovenia thunb*) 植物枳椇的带肉质果柄的果实或种子。枳椇子始载于《唐本草》, 味甘, 性平, 有止渴除烦, 清湿热, 解酒毒功能, 可用于中酒毒、烦渴呕逆、二便不利等症。现代药理学研究表明, 枳椇子具有解酒^[1]、保肝^[2]、抗疲劳^[3]、抗缺氧^[4]等多种活性。

本课题组一直致力于研究枳椇子抗缺氧活性来完成枳椇子高原耐缺氧药物的研制工作。我们对枳椇子有效成分的提取和精制工艺进行了考察, 发现枳椇子提取物 1 和 2 都是药物的中间产物。本实验旨在考察提取物 1 和 2 在模拟高原缺氧环境下抗疲

劳的作用, 为枳椇子抗高原缺氧和高原环境下对抗疲劳提供实验证据, 并为下一步制剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 试药 枳椇子 (购自北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司, 批号: F801002102, 经北京同仁堂药材有限责任公司芦振英老师鉴定为鼠李科拐枣属植物枳椇 (*Hovenia dulcis thunb*) 的干燥成熟种子)。诺迪康胶囊 (规格: 0.28 g/粒, 西藏诺迪康药业股份有限公司, 批号: 101102, 灌胃时将胶囊内容物倒出, 与 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 水溶液研磨均匀制成混悬液)。CMC-Na (国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20050913)。钠石灰 (上海研生生物技术科技有限公司, 批号: 091120)。

1.2 仪器 低压舱 (第二军医大学海军医学系自制)。游泳箱 (40 cm × 7 cm × 25 cm, 装有 10 个直径

作者简介: 杨 建, 硕士研究生。研究方向: 中药药理。E-mail: jerryangjian@sohu.com

作者单位: ① 200433 上海, 第二军医大学研究生院; ② 100071 北京, 总后勤部卫生部药品仪器检验所

通讯作者: 嵇 扬, Tel: (010) 66949059

65 cm 高 150 cm 的透明塑料圆桶作为隔栏)。负重铅块、温度计、秒表等由实验室自备。

1.3 动物 ICR 小鼠 80 只, ♂, 体质量 18 ~ 22 g (上海斯莱克实验动物有限公司, 动物合格证号: SCXK(沪) 2007-0005)。给药期间, 小鼠在第二军医大学药学院普通级别动物房饲养。游泳实验当天将小鼠移入第二军医大学潜水实验室, 室温适应 1 h 后进行实验。

1.4 枳椇子提取物 1 和 2 的制备 将枳椇子用水煎煮数次, 煎煮液浓缩后, 用一定浓度的乙醇醇沉除去杂质, 将乙醇液干燥后得到提取物 1, 浸膏得率约 10%。用乙酸乙酯对提取物 1 的水溶液进行多次萃取, 将得到的乙酸乙酯萃取溶液干燥后制得提取物 2, 得率约 17%。灌胃时分别与 0.5% CMC-Na 水溶液研磨均匀制成混悬液。

2 方法

2.1 分组与给药 将小鼠 80 只随机分为 8 组, 空白组给予 0.5% CMC-Na 溶液 0.2 ml/10 g, 阳性组给予诺迪康 0.5% CMC-Na 混悬液 280 mg/(kg·d), 枳椇子提取物 1 50、100、200 mg/(kg·d) 组, 枳椇子提取物 2 8、16、32 mg/(kg·d) 组, 每组 10 只, (枳椇子提取物 2 的剂量是按照提取物 2 的得率由提取物 1 的剂量换算得来), 小鼠每天按照 0.2 ml/10 g 灌胃 1 次, 连续灌胃 5 d, 第 4 天 18 时开始禁食, 末次灌胃 1 h 后开始实验。每天灌胃结束后对小鼠进行 2 min 的常压非负重游泳适应性训练。灌胃中受伤或训练过程中呛水小鼠体质量会下降或者状态变差, 剔除并进行大体解剖, 证实非药物所致。

2.2 低压缺氧下负重游泳实验 游泳箱中装有洗衣粉饱和的自来水溶液, 水深 20 cm, 水温 28℃。小鼠按照体质量的 5% 在尾根部负重铅块, 逐只快速放入游泳箱隔栏中, 每格 1 只, 计时。将游泳箱移入舱底铺有钠石灰的低压舱中, 关紧舱门, 60 s 时开始抽气, 2 min 左右降压至相当于海拔 5000 m 高度压力, 保持。以小鼠下沉且抽搐不能上浮为体力耗竭标志, 记录小鼠从计时开始到体力耗竭的时间作为小鼠游泳时间。

2.3 统计分析 利用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对阳性组、枳椇子提取物 1 和 2 各组游泳时间均值和空白组均值差异做 LSD-*t* 检验。

3 结果

给药 5 d 后, 枳椇子提取物 1 和 2 各剂量组及

阳性对照组小鼠的游泳时间均长于空白对照组, 呈剂量依赖性, 其中枳椇子提取物 1 中、高剂量组、枳椇子提取物 2 高剂量组和阳性组小鼠游泳时间较空白组的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 枳椇子提取物 1 和提取物 2 各剂量组小鼠游泳时间与阳性组游泳时间比较没有统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 枳椇子提取物对小鼠低压缺氧环境下游泳时间的影响

组别	剂量 (mg/(kg·d))	n	游泳时间 (min)
空白组	...	9	28.7 ± 16.3
阳性组	280	8	53.3 ± 21.0 ^b
提取物 2 组	8	9	48.4 ± 16.8
	16	9	49.1 ± 25.3
	32	9	52.6 ± 23.3 ^b
提取物 1 组	50	8	47.9 ± 25.8
	100	8	55.7 ± 26.1 ^b
	200	8	62.7 ± 28.2 ^c

注: 与空白组比较, ^b $P < 0.05$; ^c $P < 0.01$ 。

4 讨论

本实验中, 枳椇子提取物 1 采用了传统的水提醇沉工艺, 利用水煮提取, 并用乙醇进行必要的纯化, 既坚持了传统水煎剂的工艺, 保存了传统中药的药效, 又减少了服用量。枳椇子提取物 2 是对提取物 1 的进一步精制, 其主要成分是黄酮类化合物, 本实验证明其同样具有抗缺氧和抗疲劳的活性。同时, 有研究表明枳椇子提取物中部分黄酮醇、二氢黄酮醇等黄酮类化合物在细胞实验中显示了清除自由基和中枢损伤保护作用^[8]。枳椇子总黄酮对酒精性肝损伤大鼠肝组织中超氧化物歧化酶活性降低和丙二醛含量增高具有逆转作用^[9]。王飞等^[10]也证实了枳椇子总提取物具有羟自由基清除作用, 而有效部位集中在黄酮类成分富集的乙酸乙酯部位。上述研究提示枳椇子总黄酮很可能是枳椇子提取物药理作用的主要物质基础之一。

二氢杨梅素、杨梅素、槲皮素和二氢槲皮素是枳椇子提取物中的主要黄酮类化合物。其中, 二氢杨梅素对 H_2O_2 所致细胞损伤具有保护作用^[11], 杨梅素可以通过刺激 DNA 的自我修复功能来对抗 Fe^{3+} 所致基因损伤^[12], 槲皮素和二氢槲皮素的抗氧化活性^[10-12]也有多篇报道。但是, 药物抗缺氧抗疲劳作用的机制不仅是对抗缺氧或疲劳所导致的自由基损

伤的逆转,可能的机制是复杂而多方面的。例如,对葡萄糖的利用能力(细胞葡萄糖阈值,摄取率)的作用,对糖原储备的影响,对氧气利用的影响等等。这其中,乳酸脱氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶等酶的活性,血红蛋白含量即代表携带氧的能力,尿素氮等代谢产物水平都是反映药物作用机制的很好指标。黄酮类化合物的药理活性,以及他们的药理作用机制和相互之间的协同作用与抗缺氧抗疲劳药效之间的关系有待进一步考察。

缺氧、寒冷等高原极端环境下,保持运动能力对于高原驻军、高原施工队、运动员等特殊人群来说比单纯的延长存活时间更加具有意义。对于承担高原应急处突任务的低海拔人群来说,药物短时间内起效同样具有相当的实战意义。本课题组试图利用低压舱模拟高原环境,通过力竭游泳来考察枳椇子提取物短时间内(5 d)对小鼠模拟高原环境下运动能力的影响。实验结果证明,短暂的服用枳椇子提取物 1 和 2(5 d)可以显著延长低压缺氧环境下小鼠游泳至力竭的时间,为枳椇子提取物能够提高小鼠高原环境下运动能力提供了实验证据。

一般来说,未经高原习服的人群进入海拔 3000 m 以上地区时会发生高原反应,鉴于小鼠的适应能力强于人类,我们选择 5000 m 海拔相当氧分压作为实验条件。发现小鼠在低压力竭游泳的时间比常压常氧力竭游泳时间长,原因可能是在急性低压时小鼠毛发腭理中的气泡膨胀增加了小鼠在水中的浮力,抵消了低氧对小鼠游泳能力的负面影响。洗衣粉饱和溶液起到润湿剂的作用,可以使小鼠毛发很快润湿,并且使抽气过程中水中溶解的空气在析出时不会粘附在小鼠身上,迫使小鼠不停的运动。因实验所用低压舱空间有限,致使游泳箱体积受限,为使同组小鼠同时进舱游泳,又不至于因小鼠密度太大而至相互踩踏而干扰结果,我们引进了栅栏,用来分隔小鼠。栅栏内壁应光滑,直径要适当,避免小鼠撑在壁上休息。

(上接 73 页)

3 讨论

本文采用 50% 甲醇为溶剂,超声(500 W, 50 Hz)处理 30 min 提取,试验证明可行。在线光谱显示儿茶素和表儿茶素最大吸收波长均在 278 nm 左右,故确定 278 nm 作为检测波长。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中

参考文献

- [1] 梁 赅,詹 莉. 人参和枳椇子对小鼠乙醇急性中毒保护作用及其机制研究[J]. 医学新知杂志,2006,16(2):82-83
- [2] 刘秀玲,张 洪,王 飞. 枳椇子提取物对实验大鼠肝组织中 TIMP-1 与 MMP-13 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2006,31(13):1097-1100
- [3] 嵇 扬,王文俊,孙 芳. 枳椇子水提取液对小鼠综合体能的影响[J]. 中医药学报,2003,31(3):47-49
- [4] 伊 佳,嵇 扬. 枳椇子乙酸乙酯提取物对小鼠耐缺氧能力及糖原含量影响实验研究[J]. 解放军药学报,2009,25(2):130-131
- [5] Li G, Min BS, Zheng C, et al. Neuroprotective and free radical scavenging activities of phenolic compounds from *Hovenia dulcis* [J]. *Arch Pharm Res*, 2005,28(7):804-809
- [6] 张永昕,俞 发. 枳椇子总黄酮治疗酒精性肝病及其作用机制研究[J]. 中药材,2010,33(11):1782-1785
- [7] 王 飞,张 洪,刘秀玲. 枳椇子各部位清除羟自由基作用的比较[J]. 华西药杂志,2006,21(1):48-50
- [8] Tan GY, Zhang MH, Feng JH, et al. Effects of Pretreatment by the Flavanol Ampelopsin on Porcine Kidney Epithelial Cell Injury Induced by Hydrogen Peroxide [J]. *Agricultural Sci China*, 2010,4(9):598-604
- [9] Abalea V, Cillard J, Dabos MP, et al. Repair of Iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures [J]. *Free Radic Bio Med*, 1999,26:1457-1466
- [10] Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, et al. Neuroprotective effects of antioxidant flavonoids quercetin (1)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* [J]. *Brain Res*, 2003,965:130-136
- [11] Muthukumaran S, Sudheer AR, Menon VP, et al. Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats [J]. *Toxicology*, 2008,243:207-215
- [12] Renugadevi J, Prabu SM. Quercetin protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cadmium in rats [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2010,62:471-481

(收稿日期:2011-11-01;修回日期:2012-01-03)

(本文编辑 魏 萍)

国医药科技出版社,2010.9-10

- [2] 路 飏,彭咏梅. HPLC 测定心脑血管滴丸中儿茶素和表儿茶素的含量[J]. 湖南中医杂志,2007,23(1):78-83
- [3] 谭生建,刘 刚,张 锋,等. 高效液相色谱法测定茶黄酞中儿茶素、表儿茶素和黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(9):64-66
- [4] 阮桂平,袁旭江. HPLC 法同时测定珠黄吹喉散中儿茶素和盐酸小檗碱的含量[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):296-298

(收稿日期:2011-04-02;修回日期:2011-07-20)

(本文编辑 梁爱君)