

柿叶提取物对小鼠缺氧耐受力的影响^{*}

□吴 睿 (广州白云山和记黄埔中药有限公司 广州 510515)

(教育部(省部共建)中药资源科学重点实验室 广州 510006)
(广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心)

陈蔚文^{**} (教育部(省部共建)中药资源科学重点实验室 广州 510006)
(广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心)

覃仁安 王德勤 李楚源^{**}

(广州白云山和记黄埔中药有限公司 广州 510515)

摘 要:目的:考察柿叶提取物对小鼠缺氧耐受力的影响,为柿叶在心脑血管疾病方面的应用提供依据。方法:分别以 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $180\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3 个剂量的柿叶提取物给予小鼠连续灌胃 30 天后,测定常压缺氧存活时间、亚硝酸盐中毒存活时间和急性脑缺血性缺氧喘气时间等指标。结果:柿叶提取物 $180\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组能够明显延长常压缺氧存活时间; $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组能显著延长亚硝酸盐中毒存活时间;与正常对照组比较, $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $180\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3 个剂量均能显著提高急性脑缺血性缺氧喘气时间($P<0.01$)。结论:柿叶提取物具有提高缺氧耐受力的功效。

关键词:柿叶提取物 缺氧 耐受力

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2012.05.014

柿叶为柿树科(*Ebenaceae*)植物柿树[*Diospyros Kaki* Linn (Thunb.)]的新鲜或者干燥叶,其入药始载于明《滇南本草》“经霜叶敷臃疮”^[1]。主要用于止血、降脂、降压,治疗功能性子宫出血等各种内出血、冠心病、高血压、缺血性脑中风等病症。现代研究发现,柿叶含有黄酮类、萜类、香豆素、有机酸、挥发油等化学成分^[2]。黄酮类物质是一类天然的抗氧化剂和自由基清除剂,具有多种生物活性。本实验旨在

探索柿叶提取物的耐缺氧作用,从抗整体小鼠缺氧作用方面探讨柿叶改善心脑血管的作用,为柿叶资源的综合开发及其在心脑血管方面的临床应用提供依据。

一、材料与方法

1. 实验材料

(1)受试物。

柿叶原药材购自广西省桂林市阳朔(批号:YS0301),经广州中医药大学中药资源科学与工程

收稿日期:2011-12-27

修回日期:2012-01-29

* 科学技术部国家“十一五”科技重大专项(2009ZX09103-305)治疗缺血性中风新药 BYS-HWL01 的研究,负责人:李楚源。

** 通讯作者:陈蔚文,本刊编委,广州中医药大学副校长,主要研究方向:中西医结合消化内科、药理学、分子生物学的科研、临床与教学,Tel: 020-36585080 E-mail: zhenww@gzhtcm.edu.cn 李楚源,本刊编委,高级经济师,广州医药集团有限公司总经理,广州白云山和记黄埔有限公司总经理,主要研究方向:新药研发与大品种二次开发,Tel: 020-81218016 E-mail: lichuyuan@813zy.com。

研究中心詹若挺研究员鉴定系为柿树科植物柿树 *Diospyros Kaki* Linn(Thunb.)的干燥叶,由广州白云山和记黄埔中药有限公司制备成柿叶提取物。制法:取 5 kg 柿叶去杂质,洗净切碎,采用水提醇沉法提取,减压干燥,回收乙醇,得到纯干膏约 0.18 kg(收率约为 3.6%)。

(2)实验动物。

SPF 级昆明种雄性小鼠,6~8 周龄,体重 20 ± 2 g,由广东省医学实验动物中心提供,随机分组。生产许可证号:SCXK(粤)2003-0002 号。动物实验室为 SPF 级,室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 环境中,相对湿度 60%~80%。实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2003-0011。颗粒饲料由广东省医学动物实验中心提供。

(3)主要仪器与试剂。

秒表、断头器等;亚硝酸钠(批号:20030214,分析纯级,广州化学试剂厂),乙醚(批号:20021109,分析纯级,广州化学试剂厂),乙醇(批号:20030127,分析纯级,广州化学试剂厂)。

2. 方 法

(1)动物分组与给药。

昆明种小鼠购进后,置于 SPF 级动物实验室中,适应 3 天,自由进食和饮水。然后将昆明种小鼠 144 只,随机分为 3 组,分别用于常压耐缺氧实验、亚硝酸钠中毒存活实验和急性脑缺血性缺氧实验,每组 48 只小鼠再随机分为 4 组:正常对照组、柿叶提取物低剂量组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、柿叶提取物中剂量组($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、柿叶提取物高剂量组($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。每天按照 $0.20 \text{ mL}/10 \text{ g}$ 灌胃给予受试物,正常对照组给予同等容量的生理盐水。

(2)柿叶提取物对小鼠常压耐缺氧实验。

正常对照组、柿叶提取物低剂量组、柿叶提取物中剂量组、柿叶提取物高剂量组 4 组动物经连续灌胃 30 天,于末次灌胃后 1 h,将各组小鼠分别放入盛有 15 g 钠石灰的 250 mL 磨口瓶内(每瓶 1 只),用凡士林封瓶口,盖严,使之不漏气,立即计时,以小鼠呼吸停止为指标,观察记录小鼠因缺氧死亡的时间。并观察动物的一般情况、呼吸频率及深度、口唇粘膜及耳、尾皮肤的颜色等。

(3)柿叶提取物对小鼠亚硝酸钠中毒存活实验。

正常对照组、柿叶提取物低剂量组、柿叶提取物中剂量组、柿叶提取物高剂量组 4 组动物经连续灌胃 30 天,于末次灌胃后 1 h,各组动物按 220

$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射亚硝酸钠(注射量为 $0.10 \text{ mL}/10 \text{ g}$),立即计时,记录动物存活时间。并观察动物的一般情况、呼吸频率及深度、口唇粘膜及耳、尾皮肤的颜色等。

(4)柿叶提取物对小鼠急性脑缺血性缺氧实验。

正常对照组、柿叶提取物低剂量组、柿叶提取物中剂量组、柿叶提取物高剂量组 4 组动物经连续灌胃 30 天,于末次灌胃后 1 h,各组小鼠自颈部逐只断头,立即按秒表记录小鼠断头后至张口喘气停止时间。

3. 实验记录和统计

计量资料数据均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两均数比较采用 t 检验,数据在 SPSS13.0 进行统计分析。

二、结 果

1. 小鼠形态学改变

置于常压缺氧环境下的小鼠呼吸深快,口唇粘膜、皮肤、内脏血液呈青紫色或紫蓝色。而腹腔注射亚硝酸钠的小鼠很快呼吸深快、口唇粘膜、皮肤、内脏、血液呈棕色。

2. 柿叶提取物对小鼠常压耐缺氧存活时间的影响

柿叶提取物中低剂量组对小鼠常压缺氧耐力改善不明显,高剂量组小鼠常压耐缺氧存活时间明显延长,差异有统计学意义($P < 0.01$)。说明该柿叶提取物能提高小鼠的缺氧耐力(见表 1)。

3. 柿叶提取物对小鼠亚硝酸钠中毒缺氧存活时间的影响

柿叶提取物低剂量组与对照组比较,亚硝酸钠中毒缺氧的存活时间明显延长,差异显著($P < 0.01$);中、高剂量组与对照组比较,差异均无显著性,但可见有延长存活时间的趋势(见表 2)。

4. 柿叶提取物对小鼠急性脑缺血缺氧喘气时间的影响

各剂量组与对照组比较,小鼠急性脑缺血性缺氧喘气时间明显延长,且差异均有非常显著性意义($P < 0.01$),见表 3。

5. 柿叶提取物对小鼠体重的影响

从表 1~3 可见,各剂量组与对照组比较,给药前与给药 30 天体重的差异均无统计学意义($P > 0.05$),初步提示柿叶提取物对小鼠无明显毒副作用。

表 1 柿叶提取物对小鼠常压耐缺氧存活时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	给药前体重(g)	给药 30 天后体重(g)	存活时间(min)
正常对照组	0	20.96 $\pm$ 0.77	38.29 $\pm$ 1.24	20.99 $\pm$ 1.43
低剂量组	30	20.93 $\pm$ 0.80	38.61 $\pm$ 1.82	22.23 $\pm$ 3.55
中剂量组	60	20.95 $\pm$ 0.66	38.61 $\pm$ 1.37	22.76 $\pm$ 3.20
高剂量组	180	20.93 $\pm$ 0.72	38.22 $\pm$ 2.11	25.27 $\pm$ 2.65**

注:** 与对照组比较 $P<0.01$ 。

表 2 柿叶提取物对小鼠亚硝酸钠中毒缺氧的存活时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	给药前体重(g)	给药 30 天后体重(g)	存活时间(min)
正常对照组	0	20.52 $\pm$ 1.21	38.92 $\pm$ 1.70	20.51 $\pm$ 1.97
低剂量组	30	20.69 $\pm$ 1.04	38.04 $\pm$ 1.84	25.91 $\pm$ 4.01**
中剂量组	60	20.96 $\pm$ 0.77	38.66 $\pm$ 0.92	22.78 $\pm$ 3.60
高剂量组	180	20.90 $\pm$ 0.80	38.15 $\pm$ 1.48	22.00 $\pm$ 4.19

注:** 与对照组比较 $P<0.01$ 。

表 3 柿叶提取物对小鼠急性脑缺血性缺氧喘气时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	给药前体重(g)	给药 30 天后体重(g)	喘气时间(s)
正常对照组	0	20.24 $\pm$ 0.51	40.68 $\pm$ 2.57	17.00 $\pm$ 2.26
低剂量组	30	20.12 $\pm$ 0.62	40.31 $\pm$ 1.64	19.92 $\pm$ 1.98**
中剂量组	60	20.08 $\pm$ 0.45	40.37 $\pm$ 1.72	20.00 $\pm$ 2.09**
高剂量组	180	20.27 $\pm$ 0.59	39.99 $\pm$ 1.32	21.00 $\pm$ 2.52**

注:** 与对照组比较 $P<0.01$ 。

三、讨 论

缺氧耐受是一种应激反应,是机体多个系统功能的综合表现。此类抗整体小鼠缺氧实验是筛选大脑组织因缺血缺氧引起功能障碍的常用方法之一。柿叶及其提取物近年来已经被应用于临床缺血缺氧性脑损伤的治疗。柿叶黄酮中主要是槲皮素和山萘酚为苷元的黄酮苷,如黄芪苷、异槲皮苷、金丝桃苷等。这些含有酚羟基的黄酮苷成分具有很强的清除自由基和生物抗氧化作用^[3]。柿叶乙醇提取物能够对心肌缺血缺氧大鼠有保护作用^[4],能够增加离体兔心和在体蛙心冠状动脉血流量,增强小鼠心肌营养性血流量^[5,6],使麻醉狗心脏负荷减少、总外周血管阻力和血压明显下降、冠脉流量明显增加、心肌耗氧量下降^[7]。对于实验性脑缺血缺氧导致的脑损伤具有一定的保护作用^[8]。此外,柿叶提取物对缺

氧复氧和晚期糖基化终产物诱导的乳鼠心肌细胞凋亡也有一定的抑制作用^[9]。

本研究 3 个实验反应的缺氧耐受机制不同,研究结果表明柿叶提取物能延长不同原因导致的缺血缺氧小鼠的生存时间,提示柿叶可以降低整体动物耗氧量,提高机体的血氧利用率,降低机体耗氧量,进而提高组织利用氧的能力,促进对动物心脑等重要器官的供养需求,减少因缺氧造成的供氧能力不足所致的动物死亡。并证明柿叶提取物对于缺氧动物有很好的保护效应,对于机体是一种有益的应激效应,这种效应有效地降低组织细胞的氧化过程。综合实验结果,笔者认为柿叶的抗缺氧可能与以下机制有关:增加血流量,抑制脂质过氧化,提高机体供氧能力;清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$),抑制 $\cdot\text{OH}$ 所致丙二醛的产生,减少红细胞溶血,减轻肝线粒体膨胀程度^[10];黄酮和酚类物质通过影响神经细胞

谷氨酸兴奋毒性、细胞内钙离子浓度和超氧阴离子自由基而起保护作用;抑制因缺氧或缺氧缺血等导致的神经细胞损伤。其确切的作用机制仍有待于深入研究。

本研究证实了柿叶提取物具有提高缺氧耐受力的作用,对于开发利用柿叶新资源,拓宽柿叶资源现有的研究和应用方向,研制柿叶新型保健品和药品提供了参考依据。

参考文献

- 1 兰茂(明),《滇南本草》整理组整理. 滇南本草(第一卷).云南:云南人民出版社, 1975:332~335.
- 2 马彦. 柿叶的化学成分研究进展. 中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版, 2004, 25(1):10~16.
- 3 Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*, 1998, 37:837~841.
- 4 邓瑞春, 张文生, 杨洪军, 等. 柿叶乙醇提取物抗大鼠心肌缺血作用的研究. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(7):591~592.
- 5 梁催, 符福民. 柿叶对心血管系统的药理作用. 药学通报, 1985, 20(4):245.
- 6 韩克慧, 韩道昌, 张益民. 柿树的药理和临床应用. 中成药研究, 1983, 7(1):27~28.
- 7 黄树莲, 陈立峰, 陈德钊. 柿叶醇提取物对麻醉狗心功能与血液动力学的影响. 广西医学, 1983, 5(5):230~232.
- 8 覃仁安, 臧忠良, 赵专友, 等. 脑心清对实验性脑缺血的保护作用. 中药药理与临床, 2011, 27(3):105~107.
- 9 欧阳平, 贝伟剑, 赖文岩, 等. 柿叶黄酮对缺氧复氧以及晚期糖基化终产物诱导的乳鼠心肌细胞凋亡的影响. 第一军医大学学报, 2003, 23(7):680~682.
- 10 杨建雄, 原江锋, 李发荣. 柿叶黄酮的体外抗氧化作用研究. 营养学报, 2003, 25(2):215~217.

Effect of *Diospyros kaki* Extract in Enhancing Anoxia Endurance in Rats

Wu Rui^{1, 2, 3}, Chen Weiwen^{2, 3}, Qin Ren'an¹, Wang Deqin¹, Li Chuyuan¹

(1. Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Company Limited, Guangzhou 510515, China;

2. Key Laboratory of Chinese Medicine Resources under Ministry of Education, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

3. Research Centre of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: This study was aimed to evaluate the effect of *Diospyros kaki* Extract in enhancing anoxia endurance. The mice of experimental groups were given *Diospyros kaki* Extract once a day for 30 days, with the dosage of 30, 60, 180 mg/kg BW, respectively. And the negative control group was given distilled water. Then, after 30 days the survival time of mice were measured in anoxia with normal air pressure, in poisoning by nitrite and in acute lack of blood in brain. The results showed that the survival time of experimental groups at dosages of 180 mg/kg BW in anoxia with normal air pressure, 30 mg/kg in poisoning by nitrite and 30, 60, 180 mg/kg BW in acute lack of blood in brain were all longer than that of negative group ($P < 0.01$). It was concluded that *Diospyros kaki* Extract had a significant effect for enhancing anoxia endurance.

Keywords: *Diospyros kaki* Extract, anoxia, endurance

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 王 晶)