

马齿苋总黄酮抗小鼠缺氧作用及其机制研究

董立巍, 王万银, 岳义田, 李 敏

(第二军医大学军队卫生学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 筛选马齿苋抗缺氧作用有效成分, 并对筛选出的有效成分进行作用机制的研究。方法: 马齿苋抗缺氧作用有效成分筛选: 将 70 只小鼠随机分为总黄酮组、总生物碱组、多糖组、酸性成分组、碱性成分组、人参总皂苷组(阳性对照)和生理盐水组(阴性对照), 每组 10 只。各组小鼠予以相应药物灌胃 1 周后, 进行常压缺氧暴露生存时间实验, 筛选出马齿苋抗缺氧作用的有效成分。马齿苋总黄酮抗缺氧机制研究: 将 90 只小鼠随机分为总黄酮组、人参总皂苷组和生理盐水组, 各组再分成 3 个亚组, 即缺氧暴露 12、24 和 36 h 组, 每组 10 只。将小鼠置于氮氧混合气(10% O₂ + 90% N₂)舱内分别缺氧暴露 12、24 和 36h 后, 测定红细胞计数、血红蛋白含量、血细胞压积、血浆红细胞生成素(erythropoietin, EPO)以及肾脏与大脑皮质 EPO mRNA 的表达水平。结果: 与生理盐水组比较, 马齿苋总黄酮组小鼠缺氧暴露生存时间明显延长; 马齿苋总黄酮组小鼠不同缺氧时段肾脏和大脑皮质 EPO mRNA 的表达水平明显增加, 血浆 EPO、红细胞计数和血红蛋白含量亦明显升高。结论: 总黄酮是马齿苋抗缺氧作用的有效成分, 其延长小鼠缺氧生存时间的机制可能是促进 EPO 的表达以及红细胞和血红蛋白的生成。

[关键词] 马齿苋; 黄酮; 缺氧; 血红蛋白类; 红细胞生成素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2005)06-0450-05

Effects of flavones extracted from *Portulaca oleracea* on ability of hypoxia tolerance in mice and its mechanism

DONG Li-Wei, WANG Wan-Yin, YUE Yi-Tian, LI Min

(Department of Military Hygiene, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To identify anti-hypoxia ingredients extracted from *Portulaca oleracea* and to find out the possible mechanism of its anti-hypoxia actions. Methods: Seventy mice were randomly divided into seven groups which were untreated (normal saline), ginsenosides-treated, polysaccharide-treated, acidic components-treated, basic components-treated, alkaloids-treated and flavones-treated groups, and the ingredients of polysaccharide, acidic components, basic components, alkaloids and flavones were extracted from *Portulaca oleracea*. The mice in each group were fed with corresponding ingredients for one week respectively. Then the survival time of mice in hypoxic conditions was observed. Another 90 mice were divided into 3 groups: untreated (normal saline), ginsenosides-treated and flavones-treated groups. The mice in each of these 3 groups were divided into 3 subgroups according to 12-, 24- and 36-hour exposure to hypoxia (10% oxygen and 90% nitrogen), respectively. After exposure to hypoxia, the red blood cell count (RBC), hemoglobin (Hb) concentration and hematocrit (HCT) in mice were determined. The plasma erythropoietin (EPO) levels of mice were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the relative values of EPO mRNA in renal tissue and pallium of mice were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results: The survival time of mice in hypoxic conditions in flavones-treated group was significantly longer than that in the untreated group. The RBC, Hb concentration, HCT, plasma EPO level and the relative values of EPO mRNA in renal tissue and pallium of mice were significantly higher in the flavones-

[基金项目] 国家中医药管理局资助项目(No. 04-05GP71)

[作者简介] 董立巍(1978-), 男, 在读硕士研究生. E-mail: donliwei@hotmail.com

Correspondence to: LI Min, MD, Professor. E-mail: linlimin115@hotmail.com

treated group than those in the untreated group . Conclusion: The anti-hypoxia ingredients extracted from *Portulaca oleracea* are flavones and the anti-hypoxia effects may be obtained by improving the expression level of EPO and accelerating the generations of erythrocyte and Hb .

KEY WORDS *Portulaca oleracea*; flavone; anoxia; hemoglobins; erythropoietin

J Chin Integr Med, 2005, 3(6): 450-454

马齿苋 (*Portulaca oleracea*) 属一年生肉质草本植物, 全草含甲基肾上腺素、香豆精、黄酮、强心苷等多种生物活性物质, 是一种药食同源的野生植物^[1]。在发现马齿苋可显著延长老年小鼠低氧存活时间的基础上^[2], 我们对马齿苋总黄酮、生物碱及多糖等粗提成分进行了抗缺氧作用观察, 对筛选出的抗缺氧作用有效成分总黄酮的抗缺氧机制进行了初步研究, 现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 马齿苋抗缺氧作用有效成分筛选

1.1.1 实验动物 雄性 ICR 小鼠 70 只, 体质量 20 ~ 24 g, 购自中英合资上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 按体质量随机分为马齿苋总黄酮组、总生物碱组、多糖组、酸性成分组、碱性成分组、人参总皂苷组(阳性对照)和生理盐水组(阴性对照), 每组 10 只。

1.1.2 实验药物 马齿苋(干)购自上海雷允上中药店, 经本校药学院生药学教研室鉴定为马齿苋科马齿苋属植物马齿苋, 参照文献方法^[3~5]提取总黄酮、总生物碱、多糖、酸性成分和碱性成分。各提取物成分以适量乙醇溶解后, 加水加热使乙醇挥发, 最后以水定容, 配制成生药浓度均为 1 g/ml 的水溶液备用。人参总皂苷由黑龙江省东宁制药厂提供, 药品纯度 91.67%, 配制成药物浓度为 10 mg/ml 的水溶液备用^[6]。

1.1.3 实验方法 马齿苋各成分组均用配制好的相应药物水溶液, 按 40 g/kg 的剂量予以灌胃; 人参总皂苷组用配制好的人参总皂苷水溶液, 按 0.4 g/kg 的剂量予以灌胃; 生理盐水组给予等量生理盐水灌胃。1 次/d, 连续 7 d。小鼠于末次灌胃 1 h 后, 放入置有 10 g 碱石灰的 200 ml 广口瓶内, 1 只/瓶, 用凡士林封口, 自瓶盖封严即刻开始计时, 直至呼吸停止, 记录小鼠的生存时间^[7]。

1.2 马齿苋总黄酮抗缺氧机制研究

1.2.1 实验动物 雄性 ICR 小鼠 90 只, 体质量 20 ~ 24 g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 按体质量随机分为马齿苋总黄酮组、人参总皂苷组和生理盐水组, 各组再分成 3 个亚组, 即缺氧暴露 12、24、36 h 组, 每组 10 只。

1.2.2 实验药物 马齿苋总黄酮组、人参总皂苷组和生理盐水组各组用药同马齿苋抗缺氧作用有效成分筛选实验。

1.2.3 实验方法

1.2.3.1 给药方法 同马齿苋抗缺氧作用有效成分筛选实验。小鼠于末次灌胃 1 h 后分别予以缺氧暴露(直径 120 cm × 45 cm 的医用氧舱内充以含 10% O₂ 和 90% N₂ 的混合气体, 流量为 3 ~ 5 L/min)12、24、36 h。待小鼠出舱后立即断头处死, 取血、脑及肾脏等组织, 置于 -80 °C 冰箱内备用。

1.2.3.2 检测指标 用 F-800-Toa 全自动血细胞分类计数仪测定红细胞计数(red blood cell count, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)含量和血细胞比容(hematocrit, HCT)。参照 Priyadarshi 等^[8]方法, 用普通酶联免疫吸附试验检测小鼠血浆红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的含量, 采用羊抗小鼠抗体(R&D Systems, Inc. AF 959)检测 EPO, 以吸光度值表示 EPO 的相对含量。用 TRIzol Reagent 分别抽提脑、肾脏的总 RNA。聚合酶链反应试剂盒为 TaKaRa 生物工程公司生产的 RNA PCR Kit Ver. 3.0, 聚合酶链反应体系为 50 μl, 以逆转录反应产物为模板, 分别加入上、下游引物, 聚合酶链反应缓冲液 10 μl, Ex Taq 酶 0.25 μl, 蒸馏水补足反应体积。95 °C × 5 min 灭活逆转录酶后, 94 °C × 30 s, 退火温度 -actin 55 °C、EPO 60 °C, 30 s, 共 30 个循环。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测聚合酶链反应产物并进行密度扫描, 采用 SmartView 2001 生物电泳图像分析软件进行灰度扫描分析, 目的基因 mRNA 表达水平经 -actin 校正。EPO 及 -actin cDNA 引物根据文献进行设计^[9,10], 由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列: (1) EPO 上游引物: 5' TCCTTGCTACTGATTCCTCTGGG 3'; 下游引物: 5' GTATCCACTGTGAGTGTTTCG 3'。(2) -actin 上游引物: 5' CTAGGCACCAAGGTGGTAT 3'; 下游引物: 5' CAAACATGATCTGGGTCATC 3'。目的基因产物长度: EPO 为 449 bp; -actin 为 261 bp。

1.3 统计学方法 所有实验数据均采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析, 计量资料均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单样本的方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠生长及缺氧暴露前体质量的比较

各组小鼠饲养期间健康情况良好,未发生死亡及其他异常体征。各组小鼠缺氧暴露前体质量比较无统计学差异。见表 1。

2.2 各组小鼠常压密闭缺氧暴露生存时间的比较

与生理盐水组比较,总黄酮组与人参总皂苷组小鼠缺氧暴露生存时间明显延长,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);酸性成分组、碱性成分组、生物碱组和多糖组小鼠缺氧暴露生存时间与生理盐水组比较无统计学差异。总黄酮组小鼠缺氧暴露生存时间较酸性成分组和碱性成分组比较,均有明显延长,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。总黄酮组小鼠缺氧暴露生存时间较人参总皂苷组有一定的

延长,但两者比较无统计学意义。见表 1。

2.3 马齿苋总黄酮对不同缺氧时段小鼠血 RBC、Hb 及 HCT 的影响

小鼠分别缺氧暴露 12、24、36 h 后,马齿苋总黄酮组与生理盐水组比较,血红细胞数、血红蛋白含量及红细胞比容均有明显增高,其中以缺氧暴露 24 h 组的增高幅度最为明显 ($P < 0.01$)。马齿苋总黄酮组与人参总皂苷组比较,则差异无统计学意义。见表 2。

2.4 马齿苋总黄酮对不同缺氧时段小鼠血浆 EPO 含量的影响

小鼠分别缺氧暴露 12、24、36 h 后,马齿苋总黄酮组与生理盐水组比较,血浆 EPO 含量明显提高,其中尤以缺氧暴露 36 h 组的增高幅度最为明显 ($P < 0.01$)。人参总皂苷组小鼠血浆 EPO 含量较生理盐水组,虽也有一定程度的升高,但升高幅度不如马齿苋总黄酮组。见表 2。

表 1 各组小鼠缺氧暴露前体质量及缺氧暴露生存时间的比较

Tab 1 Comparisons of body weights of mice before exposure to hypoxia and survival time in hypoxic condition in different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Body weight (g)	Survival time in hypoxic condition (min)
Untreated	10	23.3 ± 4.35	37.18 ± 9.41
Polysaccharide-treated	10	27.2 ± 3.11	41.03 ± 7.44
Acidic components-treated	10	26.0 ± 1.63	37.83 ± 12.31
Basic components-treated	10	26.1 ± 3.48	38.12 ± 8.34
Alkaloids-treated	10	26.4 ± 1.90	39.23 ± 10.29
Flavones-treated	10	23.9 ± 0.88	50.49 ± 10.49**
Ginsenosides-treated	10	24.7 ± 2.76	46.63 ± 11.02*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs untreated group; $P < 0.05$ vs acidic components-treated group; $P < 0.05$ vs basic components-treated group

表 2 马齿苋总黄酮对不同缺氧时段小鼠血 RBC、Hb、HCT 及血浆 EPO 含量的影响

Tab 2 Effects of flavones extracted from *Portulaca oleracea* on RBC, Hb concentration, HCT and plasma EPO level in mice exposed to hypoxia for different hours

Group	n	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/L)	HCT (L/L)	Plasma EPO (kU/L)
Untreated					
12-hour exposure to hypoxia	10	7.23 ± 0.72	122.1 ± 14.9	0.388 ± 0.02	0.170 ± 0.016
24-hour exposure to hypoxia	10	7.11 ± 0.64	117.5 ± 13.3	0.388 ± 0.03	0.327 ± 0.020
36-hour exposure to hypoxia	10	6.90 ± 0.90	127.5 ± 5.7	0.401 ± 0.02	0.379 ± 0.026
Ginsenosides-treated					
12-hour exposure to hypoxia	10	7.92 ± 0.52*	133.9 ± 10.4	0.405 ± 0.03	0.187 ± 0.024
24-hour exposure to hypoxia	10	7.70 ± 0.68	126.2 ± 12.6	0.416 ± 0.02*	0.359 ± 0.031*
36-hour exposure to hypoxia	10	7.79 ± 0.47*	134.1 ± 6.7*	0.435 ± 0.01**	0.384 ± 0.028
Flavones-treated					
12-hour exposure to hypoxia	10	8.14 ± 0.53*	129.3 ± 14.2	0.423 ± 0.01*	0.202 ± 0.012*
24-hour exposure to hypoxia	10	7.99 ± 0.42**	129.3 ± 9.30*	0.423 ± 0.01*	0.381 ± 0.045*
36-hour exposure to hypoxia	10	7.87 ± 0.54*	130.9 ± 6.17	0.422 ± 0.02*	0.426 ± 0.040**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs untreated group exposed to hypoxia for the same hours

2.5 马齿苋总黄酮对缺氧小鼠肾脏及大脑皮层 EPO mRNA 表达的影响

2.5.1 马齿苋总黄酮对缺氧小鼠肾脏 EPO mRNA 表达的影响

缺氧暴露 12、24、36 h 后,马齿

菟总黄酮组小鼠肾脏 EPO mRNA 的表达水平与生理盐水组比较,均有明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而马齿苋总黄酮组和人参总皂苷组比较,差异无统计学意义。见图 1、表 3。

2.5.2 马齿苋总黄酮对缺氧小鼠大脑皮层 EPO mRNA 表达的影响 缺氧暴露 12、24、36 h 后,马

齿苋总黄酮组小鼠大脑皮层 EPO mRNA 的表达水平与生理盐水组比较,均有明显升高,其中尤以缺氧暴露 36 h 组大脑皮层 EPO mRNA 的表达水平增高最为明显,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);马齿苋总黄酮组和人参总皂苷组比较,差异无统计学意义。见图 2、表 3。

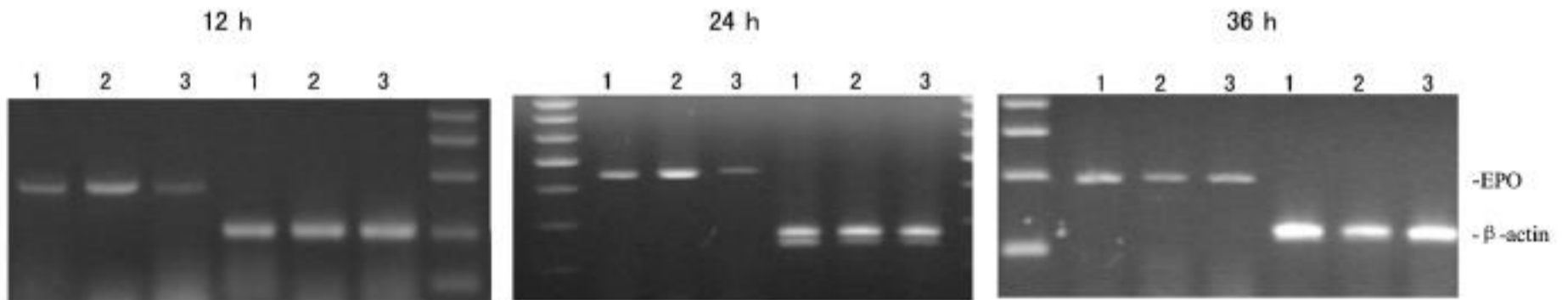


图 1 马齿苋总黄酮对小鼠肾脏 EPO mRNA 表达的影响

Fig 1 Effects of flavones extracted from *Portulaca oleracea* on expression level of EPO mRNA in renal tissues of mice exposed to hypoxia for different hours

1: Flavones-treated group; 2: Ginsenosides-treated group; 3: Untreated group

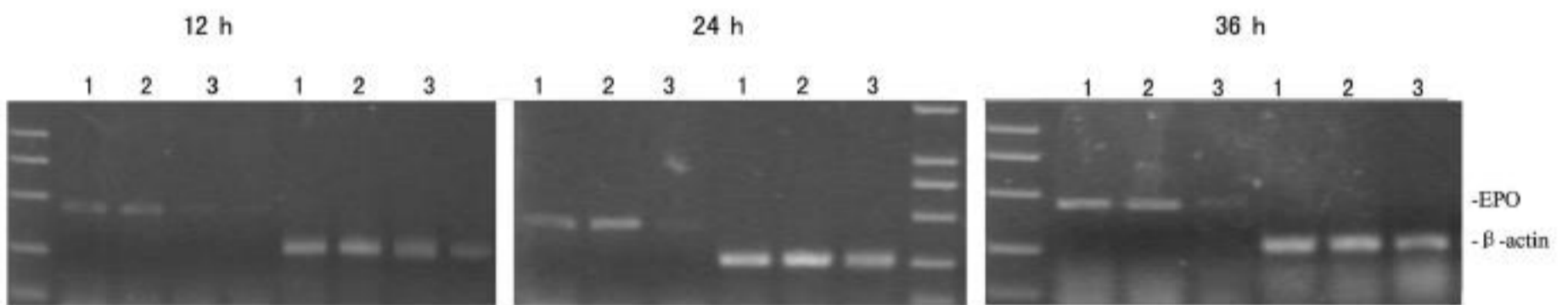


图 2 马齿苋总黄酮对小鼠大脑皮层 EPO mRNA 表达的影响

Fig 2 Effects of flavones extracted from *Portulaca oleracea* on expression level of EPO mRNA in pallium of mice exposed to hypoxia for different hours

1: Flavones-treated group; 2: Ginsenosides-treated group; 3: Untreated group

表 3 马齿苋总黄酮对不同缺氧时段小鼠肾脏及大脑皮层 EPO mRNA 表达水平的影响

Tab 3 Effects of flavones extracted from *Portulaca oleracea* on relative values of EPO mRNA in renal tissues and pallium of mice exposed to hypoxia for different hours

Group	n	EPO mRNA/ -actin	
		Renal tissues	Pallium
Untreated			
12-hour exposure to hypoxia	10	0.71 ± 0.03	0.85 ± 0.01
24-hour exposure to hypoxia	10	0.80 ± 0.01	0.80 ± 0.02
36-hour exposure to hypoxia	10	0.73 ± 0.02	0.89 ± 0.03
Ginsenosides-treated			
12-hour exposure to hypoxia	10	0.93 ± 0.08*	0.93 ± 0.02*
24-hour exposure to hypoxia	10	1.01 ± 0.04**	0.85 ± 0.03*
36-hour exposure to hypoxia	10	0.78 ± 0.02*	0.94 ± 0.01*
Flavones-treated			
12-hour exposure to hypoxia	10	0.83 ± 0.04*	0.92 ± 0.02*
24-hour exposure to hypoxia	10	0.88 ± 0.02*	0.86 ± 0.03*
36-hour exposure to hypoxia	10	0.77 ± 0.02*	0.98 ± 0.02**

($\bar{x} \pm s$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs untreated group exposed to hypoxia for the same hours

3 讨 论

本实验结果表明,马齿苋多种粗提成分中只有马齿苋总黄酮可明显延长小鼠在密闭缺氧环境中的生存时间,说明总黄酮可能是马齿苋发挥抗缺氧作用的有效成分;马齿苋总黄酮组小鼠在密闭缺氧环境中的生存时间较人参总皂苷组更长。人参总皂苷的抗缺氧作用已得到许多实验的证实^[11]。人参皂苷是贵重中药人参的提取物,而马齿苋是药食两用植物,地理分布广泛,来源极其丰富。若能进一步阐明马齿苋总黄酮提高机体缺氧耐受能力的作用机制,将有助于抗缺氧新药的开发。

EPO 增多导致红细胞生成及血红蛋白含量增多,是缺氧所引起的血液系统代偿反应之一。以往研究认为,EPO 是一种血细胞因子,其主要作用是促进造血祖细胞的增殖与分化^[12]。近年来的研究表明,EPO 具有神经营养活性,对缺血缺氧机体的中枢神经系统有保护作用。星形胶质细胞是脑部生成 EPO 的主要细胞。最近的研究发现:大脑皮层神经元也有 EPO 的表达^[13]。本实验发现,马齿苋总黄酮能明显促进缺氧小鼠肾脏 EPO mRNA 的表达,进而提高缺氧小鼠血浆 EPO 的含量、红细胞计数及血红蛋白量。马齿苋总黄酮可上调 EPO mRNA 的表达,进一步促进缺氧机体红细胞和血红蛋白的生成,这可能是马齿苋总黄酮能明显延长小鼠在密闭缺氧环境中生存时间的机制之一。本实验还发现马齿苋总黄酮可促进缺氧小鼠大脑皮层 EPO mRNA 的表达,是否马齿苋总黄酮对缺氧机体大脑神经元亦有保护作用,值得进一步研究。

[参考文献]

1 肖 玫,杨 进,刘 彪,等.马齿苋及其在食品工业

中的利用现状和开发前景[J].2003,24(9):159-162.

- 2 凌 晨.马齿苋对 D-半乳糖衰老模型小鼠应激能力的影响及其机制研究[J].中西医结合学报,2004,2(5):361-363.
- 3 王仲英,李香兰,宣春生.马齿苋总生物碱的测定[J].太原理工大学学报,2001,32(2):197-198.
- 4 庄向平,虞杏英,杨更生,等.银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法[J].中草药,1992,23(3):122-124.
- 5 刘万水.马齿苋多糖的提取与精制[J].天津中医学院学报,2002,21(4):39.
- 6 王 斌,张声华,李晓莉,等.人参皂苷的耐缺氧效应机理研究[J].食品科学,2002,23(8):270-272.
- 7 徐叔云,卞如濂,陈 修,等.药理实验方法学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2002.1510-1512.
- 8 Priyadarshi A, Periyasamy S, Burke TJ, *et al*. Effects of reduction of renal mass on renal oxygen tension and erythropoietin production in the rat [J]. *Kidney Int*, 2002, 61(2): 542-546.
- 9 Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, *et al*. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain[J]. *Glia*, 2000, 30(3): 271-278.
- 10 Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, *et al*. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 279(6): E1242-E1248.
- 11 姜正林,吴新民,陈 云,等.人参皂甙的抗鼠脑缺氧损伤作用[J].中华航海医学杂志,2000,7(1):28-32.
- 12 Kendall RG. Erythropoietin [J]. *Clin Lab Haematol*, 2001, 23(2): 71-80.
- 13 Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, *et al*. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grows in culture[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001, 60(4): 386-392.

[收稿日期] 2005-06-29 [本文编辑] 黄文华 周庆辉