

# 葛根素对大鼠脑及脏器组织一氧化氮体系的影响及其作用机制的探讨<sup>\*</sup>

吴 平 曾繁荣 马厚勋

**内容提要** 目的:研究葛根素对大鼠脑及脏器组织一氧化氮(NO)含量、一氧化氮合酶(NOS)活性的影响。方法:16只大鼠随机分为两组,每组8只。葛根素组大鼠腹腔注射葛根素每天80mg/kg,对照组注射等体积丙二醇,两组均连续用药30天后,取大鼠心、脑、肝、肾组织,采用硝酸还原酶法测定NO含量,血红蛋白氧化法测定组织NOS的活性,同时对两组大鼠肝、脑组织作电镜超微结构观察。结果:葛根素组大鼠心、脑、肝、肾组织NO含量较对照组明显增高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );两组大鼠仅心、脑组织中检测到NOS活性,且葛根素组心、脑组织NOS活性高于对照组( $P<0.05$ );电镜观察两组大鼠肝、脑组织超微结构均未见异常。结论:葛根素增加组织NOS活性及NO含量,可能是其发挥药理作用的机制之一。

**关键词** 葛根素 一氧化氮 一氧化氮合酶

**Study on Effect of Puerarin on Nitric Oxide System in Rats' Tissue and Its Mechanism** WU Ping, ZENG Fan-rong, MA Hou-xun *The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing (400016)*

**Objective:** To evaluate the effect of Puerarin on nitric oxide(NO) content and nitric oxide synthase(NOS) activity in rats' tissue. **Methods:** Sixteen adult Wistar rats were randomly divided into two groups, 8 in each group. The Puerarin group was intraperitoneal administered Puerarin 80 mg/kg·d and the control group was given propylene glycol by intraperitoneal injection for 30 days. The NO content in rats' heart, brain, liver and kidney was determined by nitrate method and NOS was detected by oxyhemoglobin oxidation method. Besides, the electromicroscopic examination on rats' liver and brain was also conducted. **Results:** NO content in heart, brain, liver and kidney in the Puerarin group was significantly higher than that in the control group respectively( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). NOS was detected only in heart and brain in both groups and it was also higher in the Puerarin group than that in the control group( $P<0.05$ ). No abnormal ultrastructure was detected by electromicroscope in liver and brain of both groups. **Conclusion:** Increasing NO content and NOS activity in tissues may be one of the mechanism for pharmaceutical action of Puerarin.

**Key words** Puerarin, nitric oxide, nitric oxide synthase

葛根素具有多种药理作用,已广泛应用于治疗心脑血管疾病,并取得了满意疗效,其调节血管活性物质的作用已得到重视<sup>(1,2)</sup>。一氧化氮(nitric oxide, NO)为体内主要的血管舒张物质之一,在心脑血管疾病的发生发展中有极其重要作用。目前就NO体系与葛根素发挥其药理作用的关系方面研究甚少。本研究通过葛根素对大鼠组织NO体系的干预实验,探讨其对NO体系的调节机制及其生物学价值。

## 材料和方法

### 1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 大鼠,9~10月龄,雌雄各半。雌鼠体重270~310g,雄鼠体重480~560g。由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号:医动字第24301045。随机分为两组,每组8只。

1.2 药物、试剂及仪器 葛根素(puerarin)由豆科葛属植物葛根中提取,成分为4,7-二羟基-8-β-D-葡萄糖基异黄酮(分子式为 $C_{21}H_{20}O_9$ ,其原药粉由广东燕塘生物化学药业有限公司提供,批号:9809542,纯度为97%),以丙二醇作溶剂将葛根素配制成50mg/ml

<sup>\*</sup> 重庆市卫生医药学科科研重点课题(重卫科(43)97-21)  
重庆医科大学附属第一医院老年科(重庆 400016)

备用。血红蛋白(Hb)还原型辅酶Ⅱ(NADPH)二硫苏糖醇(DTT)苯甲磺酰氟(PMSF)为宝利曼公司产品,N-2-羟乙基哌嗪-乙磺酸(HEPES)L-精氨酸(L-Arg)L-缬氨酸(L-Val)铁氰化钾、硫代巴比妥酸(TBA)丙二醇、苯巴比妥等均为国产分析纯。UV-200 型双紫外分光光度计:德国西门子公司生产;H-600 型透视电镜:日本日立公司生产。

2 方法

2.1 组织匀浆缓冲液配制 50mmol/L HEPES, 0.5mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 5mg PMSF, 用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.4。缓冲液储存于 4℃, 1 周内使用。

2.2 氧合血红蛋白(HbO<sub>2</sub>)的制备与鉴定 按文献<sup>[3]</sup>方法,并用氰化高铁血红蛋白法标定<sup>[4]</sup>,同时测定 401nm 与 421nm 处吸光度差值,对 HbO<sub>2</sub> 浓度作图得摩尔消光系数为 77.400mmol·min<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>, *r* = 0.997,与文献报道一致<sup>[5]</sup>。

2.3 一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)测定的反应体系 HbO<sub>2</sub> 2.5μmol/L, CaCl<sub>2</sub> 200μmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1mmol/L, L-Arg 100μmol/L, L-Val 50mmol/L, NADPH 100μmol/L, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 40mmol/L, 用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.2 4℃冷藏, 1 周内使用。

2.4 给药方法及组织标本采集 葛根素组大鼠每天给予葛根素 80mg/kg 腹腔注射,对照组按体重注射等体积丙二醇,均连续给药 30 天。实验前夜两组动物禁食过夜,自由饮水,次日上午 9:00 每组按 60mg/kg 腹腔注射苯巴比妥麻醉后,由门静脉插管,以生理盐水灌流肝脏 2~3min 后,取心、脑、肝、肾组织于液氮中储存,用于测定 NO 含量和 NOS 活性。

2.5 组织匀浆液制备 从液氮罐中取出心、脑、肝、肾组织称重后移入玻璃匀浆器,按 1:5 (W/V)加入组织匀浆缓冲液,在冰浴中充分匀浆。匀浆液在 4℃以 12000r/min 离心 20min,分离上清液,置于冰块上,在 4h 内测定 NO 含量及 NOS 活性。

2.6 电镜标本制备 实验当日两组随机选择雌雄大鼠各 2 只,取肝、脑组织切成 1mm<sup>3</sup> 标本数块,置于 5%戊二醛浸泡 2h 后,转移至 1%磷酸缓冲液中保存,送重庆医科大学电镜实验室,观察组织超微结构。

3 测定指标与方法

3.1 组织 NO 含量测定 采用硝酸还原酶法,即利用硝酸还原酶特异性将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 还原为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,通过显色,在特定波长(550nm)处测定其光密度值。试剂盒购自南京建成生物制剂工程研究所。检测方法严格按照试剂盒说明书要求进行。

3.2 组织 NOS 活性测定 采用血红蛋白氧化法<sup>[6]</sup>。NOS 以 L-Arg 为底物,催化生成的 NO 与 HbO<sub>2</sub> 反应生成高铁血红蛋白,其吸光度亦发生相应变化。测定方法:在酶促反应体系中加入 20%组织匀浆上清液(W/V=1:5),在 37℃条件下,应用 UV-200 型双紫外分光光度计在 401nm 与 421nm 波长处监测 20min 内吸光度差异的变化(即代表 NOS 含量)。

4 统计学方法 采用成组设计 *t* 检验。

结 果

1 两组大鼠各组织 NO 含量测定结果 见表 1。葛根素组大鼠心、脑、肝、肾组织 NO 含量比对照组均显著增高(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

表 1 两组大鼠各组织中 NO 含量测定结果比较 (nmol/g 组织,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	心	脑	肝	肾
葛根素	8	26.73 ± 4.60 *	41.44 ± 6.96 *	37.93 ± 7.12 *	43.93 ± 6.83 **
对照	8	21.34 ± 3.77	34.41 ± 4.84	28.83 ± 5.26	28.87 ± 5.06

注:与对照组比较, \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01

2 两组大鼠各组织 NOS 活性测定结果 见表 2。葛根素组心、脑组织 NOS 活性较对照组显著增高(*P* < 0.05),两组大鼠肝、肾组织均未测出 NOS 活性。

3 电镜观察结果 结果两组大鼠脑、肝组织超微结构均未见明显异常。

表 2 两组大鼠各组织中 NOS 活性测定结果比较 (nmol·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	心	脑	肝	肾
葛根素	8	4.73 ± 1.31 *	11.75 ± 1.31 *	未测出	未测出
对照	8	3.18 ± 1.02	9.69 ± 1.65	未测出	未测出

注:与对照组比较, \* *P* < 0.05

讨 论

内源性 NO 是体内具有广泛生物学活性的物质,由 L-Arg 在 NOS 催化下合成。NOS 在机体各组织器官中广泛存在,可分为结构型 NOS(constitutive NOS, cNOS)和诱导型 NOS(inducible, iNOS)。cNOS 主要分布于内皮细胞、神经细胞、平滑肌细胞、血小板和某些上皮细胞,并参与人体生理机能的调节;iNOS 主要分布于巨噬细胞、肥大细胞、中性粒细胞和肝细胞等,由一些细胞因子、内毒素等刺激产生 NO,参与机体防御机制,同时有一定的细胞毒作用。NO 是亲脂性很强的分子,能自由通过细胞膜而发挥其生物学效应。

葛根素为异黄酮类药物,有明确的扩张冠状血管、脑血管和改善微循环的作用,还通过抗血小板聚集,促进内皮细胞功能及调节血管活性物质,保护缺血再灌

注心肌,减少梗死面积等发挥作用,在治疗心绞痛、心肌梗死、脑梗塞等方面有确切疗效<sup>(7)</sup>。本研究揭示葛根素能增加大鼠心、脑、肝、肾组织 NO 含量,且在心、脑组织测得 NOS 活性也较对照组明显增加,说明葛根素通过调节 NOS 活性使 NO 增高可能是其发挥药理作用的机制之一。两组大鼠肝、肾组织 NOS 活性均未测出,其原因可能为该组织 NOS 活性太低,以至于超出本研究检测方法的最低检测限。而葛根素组大鼠肝、肾组织中 NO 含量明显增加,可能与肝、肾组织血液循环丰富,将其他部位(如血管内皮细胞)产生的 NO 带到该处,使其含量增高有关。

众所周知,NO 在机体的作用犹如一把“双刃剑”,一般由 cNOS 产生的生理剂量的 NO 具有生理性调节功能,而由 iNOS 产生的大剂量的 NO 则有细胞毒性作用。如在心肌炎和内毒素休克,iNOS 被诱导而产生过多的 NO,抑制心脏功能。有文献报道<sup>(8)</sup>败血症时肾小球滤过功能下降是由于 iNOS 所致的 NO 增加,使局部肾小球血管内皮性 NOS 抑制所致。脑缺血时由神经性 NOS 和 iNOS 产生的过量的 NO 具有神经毒性作用。本研究中应用大剂量长疗程葛根素的大鼠,虽然心、脑、肝、肾组织 NO 含量明显增高,但电镜观察脑、肝组织超微结构均未发现明显异常。提示葛根素的应用,并未出现 NO 过度生成所致的细胞损伤,说明在促进组织 NO 含量增加这一角度,葛根素是安全的。葛根素使组织 NOS 活性增加,是否通过 cNOS

活性增加来实现的,还有待于进一步研究证实。

## 参 考 文 献

1. 罗伟,李保东,杨瑞华,等.葛根素对高血压病患者血浆内皮素及血栓素 B<sub>2</sub>、6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>含量的影响.中国中西医结合杂志 2000 20(1):68—69.
2. 李淑梅,刘斌,陈海芬,等.葛根素注射液对急性心肌梗死患者血浆内皮素及肾素血管紧张素系统的影响.中国中西医结合杂志 1997 17(6):339—341.
3. Feelish M, Noack EA. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrate and activation of guanylate cyclase. Eur J Pharmacol 1987 139(1):19—30.
4. 叶应妩,李健斋,王玉琛.临床实验诊断学.上册.北京:人民卫生出版社,1989:969.
5. Knowles RG, Salter M, Moncada S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. Biochem Biophys Res Commun 1990 173(3):1042—1048.
6. Knowles RG, Merrett M, Salter M, et al. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. Biochem J 1990 270(3):833—836.
7. 朱庆磊,吕欣然.葛根素的药理学和临床应用研究.中草药 1997 28(11):693—696.
8. Bataineh A, Raj L. Angiotensin II, nitric oxide and end-organ damage in hypertension. Kidney Int 1998 54(Suppl): S14—S19.