

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00172

· 论 著 ·

乌饭树叶醇提物对睡眠剥夺大鼠脑干抗氧化能力的影响

马文领, 黄丽娜, 郭俊生

第二军医大学海军医学系军队卫生学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察乌饭树叶醇提物及其不同溶剂的萃取物对睡眠剥夺所致大鼠脑干抗氧化能力的影响。**方法** 采用小站台水环境的方法对大鼠进行睡眠剥夺, 给予高、中、低剂量(分别相当于生药含量 7.2、2.4、1.2 g/ml)乌饭树叶醇提物及其醇提物不同萃取物连续灌胃 10 d, 每天 1 ml, 以红景天苷(200 mg/ml)作为阳性对照, 观察不同剂量的乌饭树叶醇提物及其不同萃取物对大鼠脑干丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和总抗氧化能力(T-AOC)含量的影响。**结果** 正常对照组MDA、SOD和T-AOC分别为(16.4±0.42) nmol/mg protein、(2.9±0.62) U/mg protein、(154.3±14.47) U/ml。与正常对照组相比, 睡眠剥夺模型组大鼠脑干MDA、SOD和T-AOC含量均升高($P<0.05$), 阳性对照组红景天苷和高剂量醇提物组以及乌饭树叶水提取物组MDA含量减少($P<0.05$), SOD和T-AOC也降低。**结论** 高剂量乌饭树叶醇提物可以降低脑干的氧化应激水平, 具有较强的抗氧化能力, 其活性部位主要位于水提取物内。

[关键词] 乌饭树; 脑干; 氧化性应激; 睡眠剥夺**[中图分类号]** R 338.63**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2011)02-0172-03

Effect of *Vaccinium bracteatum* Thunb. Leaf ethanol extract on anti-oxidative capability of brain stem in sleep-deprived rats

MA Wen-ling, HUANG Li-na, GUO Jun-sheng

Department of Military Hygiene, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of *Vaccinium bracteatum* Thunb. Leaf ethanol extract (VEE) and its different extracts on the anti-oxidative capability of brain stem in sleep-deprived rats. **Methods** Rats were intragastrically administered with low, middle, and high dose of VEE (1.2 g/ml, 2.4 g/ml, and 7.2 g/ml) and different extracts daily for 10 days. The rat mental fatigue models were established by sleep deprivation through flower-pot on the 7th day. Rats treated with salidroside (200 mg/ml) were taken as positive controls. After 72 h sleep deprivation, the concentrations of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and total antioxidative capacity (T-AOC) in the brain stem were determined in each group. **Results** The concentrations of the MDA, SOD, and T-AOC in the normal control group were (16.4±0.42) nmol/mg protein, (2.9±0.62) U/mg protein, and (154.3±14.47) U/ml, respectively. Compared with the normal control group, the sleep-deprived group had significantly higher concentrations of MDA, SOD and T-AOC ($P<0.05$), and the groups of salidroside, high dose ethanol, and aqua extract of VEE had significantly lower MDA ($P<0.05$), and lower SOD and T-AOC. **Conclusion** The high dose VEE can greatly decrease the oxidative stress level of the brain stem, and it also has remarkable anti-oxidative ability, with the active part mainly in the aqua extract of VEE.

[Key words] *Vaccinium bracteatum* Thunb.; brain stem; oxidative stress; sleep deprivation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(2):172-174]

无论平时或战时, 在高度紧张的工作过程或紧急状态下(如军事行动、紧急救援、抗洪抢险、航海、长途运输)等难免会发生睡眠剥夺现象, 而睡眠剥夺是导致脑力(精神)疲劳的重要原因之一^[1-2]。睡眠剥夺可导致中枢神经系统(CNS)产生的活性氧(ROS)产物增加, 严重时造成神经组织的氧化应激损伤, 并且这种氧化应激损伤在疲劳的发生过程中

发挥着重要的作用, 而长期氧化应激损伤还是导致神经系统老化和慢性退行性疾病的重要原因^[3-4]。若在睡眠剥夺的同时给予抗氧化物质, 除可提高神经组织的抗氧化能力外, 还可缓解精神疲劳的症状并减轻神经组织的氧化损伤^[5]。

乌饭树(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 为乌饭树科植物, 乌饭树叶富含花青素、黄酮类、二萜类

[收稿日期] 2010-05-04**[接受日期]** 2010-12-02**[基金项目]** 全军医学科学技术研究“十一五”计划课题(06MA168)。Supported by the Project of the “11th Five-year Plan” for Medical Science and Technology Development of PLA (06MA168).**[作者简介]** 马文领, 副教授。E-mail: wenlingma@163.com

等抗氧化成分^[6-7]。我们前期的实验证实乌饭树叶的醇提取物(VVE)及其不同溶剂的萃取物具有较强的抗精神疲劳的作用^[8-9],但其对睡眠剥夺大鼠脑干氧化应激过程的影响尚未见报道。本研究以小站台水环境睡眠剥夺组大鼠作为脑力疲劳的模型,以明确具有抗疲劳和抗氧化功能的红景天苷^[10]作为阳性对照,探讨乌饭树叶醇提取物及其不同溶剂萃取物对脑干氧化应激代谢产物丙二醛(MDA)和具有抗氧化功能的超氧化物歧化酶(SOD)以及总抗氧化能力(T-AOC)的影响,为进一步探讨乌饭树叶抗脑力疲劳及其导致的氧化应激机制和乌饭树叶资源的开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 乌饭树叶醇提取物及其不同成分萃取物的制备 将乌饭树叶(于 2010 年 4 月底采摘于浙江杭州,经第二军医大学药学院天然药物化学教研室鉴定为乌饭树科乌饭树叶)洗净晾干后,用 55% 的乙醇于 55℃ 的条件下,低温高压提取,之后用旋转蒸发器浓缩至无醇味,根据临床给药剂量(0.48 g/kg 体质量)的 10、20、60 倍分别配制成生药浓度含量为 1.2、2.4、7.2 g/ml 的 3 个剂型。部分浓缩液依次用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,所得各萃取液及剩余水溶物的药液减压浓缩至干后,加入 2% Tween-80、生理盐水制成生药含量为 7.2 g/ml 的混悬液备用。

1.2 动物分组 选用雌性 SD 大鼠 144 只(第二军医大学实验动物中心提供),体质量 200~250 g,其中 60 只大鼠用于乌饭树叶醇提取物对脑干抗氧化能力影响的实验,按体质量随机分为正常对照组(AI)、睡眠剥夺模型组(AII)、阳性药组(AIII)、乌饭树叶醇提取物高(AIV)、中(AV)、低剂量组(AVI),每组各 10 只;其余 84 只用于乌饭树叶醇提取物不同溶剂萃取物对脑干抗氧化能力影响的实验,按体质量随机分为正常对照组(BI)、睡眠剥夺模型组(BII)、阳性药组(BIII)、水提取物组(BIV)、氯仿提取物组(BV)、乙酸乙酯提取物组(BVI)及正丁醇提取物组(BVII)共 7 组,每组 12 只。

1.3 乌饭树叶提取物干预和睡眠剥夺过程 乌饭树叶醇提取物高(AIV)、中(AV)、低剂量(AVI)按高、中、低剂量(分别为 7.2、2.4、1.2 g/ml)连续灌胃共 10 d,每天 1 ml;水提取物组(BIV)、氯仿提取物组(BV)、乙酸乙酯提取物组(BVI)及正丁醇提取物组(BVII)分别用水、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取物连续灌胃共 10 d,每天 1 ml;正常对照组(AI、BI)、睡眠剥夺模型组(AII、BII)灌胃等体积生理盐水,阳性药组(AIII、BIII)灌胃红景天苷(由华东理工大学

生物反应器工程国家重点实验室提供,纯度 90% 以上,每天 200 mg/kg,溶入 1 ml 生理盐水中)。在连续灌胃 7 d 后进行睡眠剥夺。

第 7 天灌胃结束后,利用改良的小站台水环境法(flower-pot)对大鼠进行为期 72 h 的睡眠剥夺,剥夺期间继续灌胃直至睡眠剥夺结束。睡眠剥夺箱共设 2 组平台,大平台直径 18 cm,用于睡眠剥夺的正常对照,小平台直径 6 cm,用于其他组的睡眠剥夺过程。剥夺期间可自由进食水,室内照明控制 12 h/12 h 的明暗周期。

1.4 取材及测定方法 大鼠睡眠剥夺结束后,用 10% 水合氯醛腹腔麻醉,经左心室灌注生理盐水冲洗血液,取脑在冰上分离脑干,放置于 -80℃ 冰箱备用。测定时按试剂盒提供的方法检测脑干 MDA、SOD 和 T-AOC 的活性,试剂盒购自南京建成生物技术公司。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件,对数据进行单因素方差分析,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 乌饭树叶醇提取物对脑干氧化应激反应的影响

大鼠经过睡眠剥夺后,与正常对照组相比,MDA、T-AOC 和 SOD 含量均增高($P < 0.05$);与睡眠剥夺模型组相比,红景天苷阳性药物对照组和高剂量乌饭树叶醇提取物组可降低 MDA 和 SOD 的含量($P < 0.05$),但中剂量和低剂量乌饭树叶醇提取物组对 MDA 的影响不明显。红景天苷阳性药物对照组和高剂量乌饭树叶醇提取物组虽也可降低 T-AOC,但差异不具有统计学意义(表 1)。

表 1 乌饭树叶醇提取物对睡眠剥夺大鼠脑干 MDA、T-AOC 及 SOD 水平的影响

Tab 1 Effects of VVE on MDA, T-AOC, and SOD activities in brain stem of SD rats

Group	(n=10, $\bar{x} \pm s$)		
	MDA $z_B/(\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1})$	T-AOC $z_B/(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$	SOD $z_B/(\text{U} \cdot \text{ml}^{-1})$
A I	16.4 ± 0.42	2.9 ± 0.62	154.3 ± 14.47
A II	37.0 ± 4.68*	10.8 ± 0.33*	200.4 ± 18.52*
A III	14.6 ± 0.93 Δ	5.6 ± 0.44	142.6 ± 6.07 Δ
A IV	17.1 ± 4.95 Δ	7.4 ± 0.10	157.8 ± 28.80 Δ
A V	28.6 ± 2.94*	8.1 ± 0.98*	162.1 ± 20.01 Δ
A VI	34.7 ± 0.56*	9.7 ± 1.33*	183.6 ± 2.66* \blacktriangle

A IV, A V, A VI are 7.2, 2.4, 1.2 g/ml VVE group, respectively.

* $P < 0.05$ vs Control (A I) group; Δ $P < 0.05$ vs Sleep-deprived (A II) group; \blacktriangle $P < 0.05$ vs Positive control (salidroside, A III) group

2.2 乌饭树叶不同萃取物对脑干氧化应激反应的影响 在乌饭树叶的不同萃取物中,与睡眠剥夺模

型组相比,乌饭树叶水提物可显著降低脑干 MDA、T-DOC 和 SOD,与阳性对照红景天昔组之间无明显差异。氯仿提取物组、乙酸乙酯提取物组及正丁醇提取物组虽也可降低脑干 MDA、T-DOC 和 SOD,但差异没有统计学意义(表 2)。

表 2 乌饭树叶不同溶剂提取物对脑干氧化应激的影响

Tab 2 Effects of VEE solvent extracts on brain stem oxidative stress

(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Group	MDA $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$	T-AOC $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$
B I	6.4 ± 0.42	8.1 ± 0.98	25.7 ± 2.57
B II	37.0 ± 4.68*	22.2 ± 9.59*	117.6 ± 29.78*
B III	14.6 ± 0.93 Δ	5.6 ± 0.44 Δ	63.9 ± 6.84 Δ
B IV	17.1 ± 4.95 Δ	2.9 ± 0.62 Δ	62.9 ± 24.05 Δ
B V	28.6 ± 2.94*	10.8 ± 0.33	82.3 ± 12.25
B VI	26.7 ± 5.87*	7.4 ± 0.10	134.3 ± 30.79 \blacktriangle
B VII	34.7 ± 0.56*	9.7 ± 1.33	153.8 ± 54.33 \blacktriangle

* $P < 0.05$ vs Control (B I) group; $\Delta P < 0.05$ vs Sleep-deprived (B II) group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs Positive control (Salidroside, B III) group

3 讨 论

睡眠剥夺干扰了正常的睡眠周期,导致氧自由基产生增加的同时,氧自由基的清除能力降低,最终导致氧化产物的堆积而引起氧化损伤^[3-4,11]。睡眠剥夺的小鼠海马和下丘脑氧化应激水平增加,而睡眠可以消除氧自由基产物,并补充能量储备^[4-5]。本研究表明,睡眠剥夺可使脑干的氧化应激代谢产物 MDA 的含量明显增加,与此同时脑干清除氧自由基的 SOD 含量也代偿性增加,脑干总抗氧化能力也增加。两者看似矛盾的结果,其实可能是由于睡眠剥夺导致 ROS 大量产生的同时,使抗氧化物质 SOD 和总抗氧化能力 T-DOC 也得到代偿性增加,只是抗氧化能力增加还没有达到全部清除多余 ROS 及其代谢产物的缘故。

Silva 等^[3]证明,给予抗氧化剂褪黑素、 α -苯基-N-4-丁基硝酮(N-tert-butyl- α -phenylnitron, PBN)或维生素 E 能消除由于睡眠剥夺导致的 MDA 升高和提高氧化/还原型谷胱甘肽的比例。近代药理研究发现乌饭树叶提取物中不仅含有丰富的维生素、矿物质及必需氨基酸,还含有大量的黄酮、酚类等抗氧化活性物质^[6-7],并且从乌饭树叶的氯仿提取物中分离出的槲皮素具有广泛的生理活性及维生素 P 样作用,它不仅能降低血管脆性和血脂,还可抗炎、抗过敏、抗病毒、抗氧自由基。我们的前期研究结果显示,高剂量的乌饭树叶醇提取物能改善睡眠剥夺大鼠的学习记忆能力,延长负重游泳时间^[8-9]。本研究证

明,高剂量乌饭树叶醇提取物能使睡眠剥夺大鼠脑干内 MDA 含量明显降低,使异常升高的 SOD、T-AOC 活性降至正常范围,提示高剂量的乌饭树叶提取物能清除氧自由基,减少脂质过氧化产物的累积,可能对减轻睡眠剥夺过程中自由基和脂质过氧化产物对神经细胞的损伤具有重要作用。

由于乌饭树叶醇提取物是由多种化学成分组成的复合物,要想了解主要由哪种(些)化合物在睡眠剥夺过程中发挥抗氧化作用,必需将醇提取物进一步分离纯化。本实验应用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水对乌饭树叶的醇提取物进行进一步萃取,得到氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水的萃取物,其中水及氯仿萃取物组大鼠脑干 MDA 含量得到显著改善,说明乌饭树叶抗精神疲劳成分可能主要集中在水和氯仿萃取物内。本实验进一步证明乌饭树叶的水萃取物能降低脑干内的氧化应激产物丙二醛的含量,同时也使 SOD 和 T-DOC 恢复到正常水平,因此可以推测乌饭树叶的抗氧化成分主要集中在水提物内。

[参 考 文 献]

- [1] Griffith J P, Zarrouf F A. A systematic review of chronic fatigue syndrome: don't assume it's depression[J]. Prim Care Companion J Clin Psychiatry, 2008, 10: 120-128.
- [2] Boksem M A, Meijman T F, Lorist M M. Mental fatigue, motivation and action monitoring[J]. Biol Psychol, 2006, 72: 123-132.
- [3] Silva R H, Abilio V C, Kameda S R, Takatsu-Coleman A L, Carvalho R C, Ribeiro R A, et al. Effects of 3-nitropropionic acid administration on memory and hippocampal lipid peroxidation in sleep-deprived mice[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2007, 31: 65-70.
- [4] Andersen A L, Perry J C, Bignotto M, Tufk S. Differential effects of sleep loss and chronic stressors on lipid metabolism[J]. Sleep Sci, 2009, 2: 135-140.
- [5] Mamelak M. Alzheimer's disease, oxidative stress and gamma-hydroxybutyrate[J]. Neurobiol Aging, 2007, 28: 1340-1360.
- [6] 李增亮, 张琳, 田景奎, 周文明. 乌饭树叶的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33: 2087-2089.
- [7] 张琳, 李宝国, 付红伟, 李增亮, 田景奎. 乌饭树叶黄酮苷类成分研究[J]. 中国药学杂志, 2009, 44: 1773-1776.
- [8] 黄丽娜, 马文领, 周健, 王晶, 郭俊生. 乌饭树叶醇提取物抗大鼠精神疲劳作用[J]. 中国公共卫生, 2008, 24: 964-966.
- [9] 马文领, 黄丽娜, 苗雨, 付泽健, 陈建波, 郭俊生. 乌饭树叶不同萃取物改善大鼠精神疲劳作用的研究[J]. 海军医学杂志, 2008, 29: 97-99.
- [10] 马莉, 蔡东联, 黎怀星, 童本德, 王莹, 裴素萍. 红景天昔对疲劳小鼠氧化损伤的保护作用[J]. 中西医结合学报, 2009, 7: 237-241.
- [11] Tutik S, Andersen M L, Bittencourt L R, De Mello M T. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research[J]. Ann Brazilin Acad Sci, 2009, 81: 521-523.

[本文编辑] 尹 茶