

本文引用: 邹晓萍, 董化江, 单娜娜, 等. 藏麻正丁醇提取物对卵巢缺血再灌注损伤大鼠内皮素-1 的影响[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31 (9): 682-684.

【基础研究】

蕨麻正丁醇提取物对卵巢缺血再灌注损伤大鼠内皮素-1 的影响

邹晓萍¹, 董化江², 单娜娜³, 臧照辉⁴, 单云官²

(1.武警后勤学院附属医院妇产科,天津 300162;2.武警后勤学院人体解剖学与组织胚胎学教研室 天津市遗体防腐与整形整容重点实验室,天津 300162;3.武警后勤学院教育技术中心,天津 300162;4.武警后勤学院研究生处,天津 300162)

摘要: **目的** 探讨大麻正丁醇 (Pa) 对急性卵巢缺血再灌注损伤大鼠血清及卵巢组织中内皮素-1 (ET-1) 的影响。**方法** Wistar 雌性大鼠 60 只, 随机分为 6 组: 假手术组 (C 组)、缺血 24 h 组 (I24h)、缺血再灌注 24 h 组 (R24h 组)、缺血再灌注 48 h 组 (R48h 组)、给予 Pa 提取物预处理 + 缺血再灌注 24 h 组 (Pa + R24h 组) 和 Pa 提取物预处理 + 缺血再灌注 48 h 组 (Pa + R48h 组)。酶联免疫吸附试验测定法检测各组血清 ET-1 水平; 反转录聚合酶链反应、Western blot 法检测各组大鼠卵巢组织中 ET-1 mRNA 和蛋白的表达。**结果** 与 C 组比较, I24h 组、R24h 组和 R48h 组大鼠血清 ET-1 水平、卵巢组织中 ET-1 mRNA 及蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$); 与 I24h 组比较, R24h 组、R48h 组大鼠血清 ET-1 水平、卵巢组织中 ET-1 mRNA 和蛋白表达均显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 Pa + R24h 组和 Pa + R48h 组大鼠血清 ET-1 水平、卵巢组织中 ET-1 mRNA 和蛋白表达与 R24h 组、R48h 组比较显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** ET-1 在大鼠卵巢缺血再灌注损伤过程中表达上调, Pa 提取物进行干预可降低 ET-1 的表达。

关键词: 蕨麻正丁醇;大鼠;卵巢缺血再灌注损伤;内皮素-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2014)09-0682-03

Effect of *Potentilla anserina* on endothelin-1 in acute ovary ischemia reperfusion injury in rats

ZOU Xiao-ping¹, DONG Hua-jiang², SHAN Na-na³, ZANG Zhao-hui⁴, SHAN Yun-guan²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Hospital of Logistics University of CAPF, Tianjin 300162, China; 2. Department of Anatomy and Histoembryology, Logistics University of CAPF, Tianjin 300162, China; 3. Department of Technique and Education, Logistics University of CAPF, Tianjin 300162, China; 4. Graduate School, Logistics University of CAPF, Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of *Potentilla anserina* (Pa) on endothelin-1 (ET-1) in acute ovary ischemia reperfusion injury in rats. **Methods** Sixty female Wistar rats were randomly divided into sham group (group C), ischemic 24 hours group (group I24h), ischemic reperfusion 24 hour group (group R24h), ischemic reperfusion 48 hour group (group R48h), Pa + ischemic reperfusion 24 hour group (Pa + R24h) and Pa + ischemic reperfusion 48 hour group (Pa + R48h). The serum level of ET-1 was determined by enzyme linked immunosorbent assay. Reverse transcriptase polymerase chain reaction and Western blot were used to detect the ET-1 mRNA and protein in ovary tissue of rats. **Results** Compared with group C, ET-1 level in serum, ET-1 mRNA and protein in ovary tissue in group I24h, R24h and R48h increased significantly ($P < 0.05$); Compared with group I24h, ET-1 level in serum, ET-1 mRNA and protein in ovary tissue in group R24h and R48h increased significantly ($P < 0.05$). The ET-1 level in serum, ET-1 mRNA and protein in ovary tissue in group Pa + R24h and Pa + R48h decreased significantly compared with group R24h and R48h ($P < 0.05$). **Conclusion** ET-1 level is increasing in ovary ischemia and reperfusion injury in rats, which can be reduced by Pa.

Key words: *Potentilla anserina*; rat; ovary ischemia reperfusion; endothelin-1

附件扭转 (adnexal torsion, AT) 是妇科常见的

急腹症,病情危重,发病率较高。蒂扭转发生后,卵巢血流受阻,出现卵巢缺血^[1-2],如能及时恢复血流可避免卵巢缺血坏死,但也出现了再灌注的病理过程。作者所在课题组基于大鼠模型,再现了卵巢缺血-再灌注的病理模型^[2],并在相应时间点复位结扎卵巢血供,恢复血流灌注,为临床研究卵巢缺血再灌注损伤提供理论依据^[2-3]。藏麻正丁醇(Potentilla

DOI: 10.7683/xxvxxb.2014.09.002

收稿日期:2014-02-17

基金项目:国家十一五科技支撑计划项目(编号:2007BAK38B05);
武警后勤学院科研创新团队项目(编号:WHTD201308-2)

作者简介: 邹晓萍 (1984 -), 女, 湖北大冶人, 硕士, 医师, 主要从事卵巢缺血再灌注研究。

通信作者:董化江(1983-),男,山东淄博人,硕士,讲师,主要从事缺血再灌注损伤研究。

anserina, Pa) 为近年来研究较热一种药物,具有抗缺血、缺氧损伤,抗炎、抗再灌注损伤等作用^[4-6]。本研究通过复制大鼠急性卵巢缺血再灌注损伤动物模型,阐明 Pa 对迄今所知最强的缩血管物质——内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 的对抗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 雌性无特定病原体级 Wistar 大鼠 60 只,体质量 247 ~ 298 g,由中国人民解放军军事医学科学院提供,实验动物编号:0050143。采用随机数字表法将大鼠分为假手术组(C组)、缺血 24 h 组(I24h 组)、缺血再灌注 24 h 组(R24h 组)、缺血再灌注 48 h 组(R48h 组)、Pa + 缺血再灌注 24 h 组(Pa + R24h 组)和 Pa + 缺血再灌注 48 h 组(Pa + R48h 组),共 6 组,每组 10 只。

1.2 主要试剂和仪器 ET-1 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、ET-1 多克隆抗体及甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体均购自上海西唐生物科技有限公司,羧甲基纤维素由天津科瑞斯公司提供,正丁醇购于天津大茂化学试剂厂;微创缝合针购于上海医菱医疗器械有限公司,PT-0200 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪由美国 MJ-Res 公司生产,Western blot 电泳仪及电转仪均由美国 Bio-Rad 公司生产;皮肤钳、手术剪刀、眼科镊、医用缝合线、血管钳、止血钳等。

1.3 Pa 的配制及模型复制 蕨麻由天津中医药大学提供,经正丁醇萃取并经减压、浓缩、冷冻、干燥后制得其正丁醇浸膏,经由质量分数 0.3% 的羧甲基纤维素钠溶解,配制成 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 混悬液。模型制作:(1) 各组大鼠实验前测体质量,根据体质量给予氯胺酮 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,待角膜反射明显减弱或消失、四肢肌张力明显降低后将实验大鼠仰卧位固定至手术台。(2) 各组大鼠均选取下腹部正中切口打开腹腔,充分显露双侧输卵管、卵巢,将各组(C组除外)大鼠双侧附件旋转 2 周(720°),60 s 后卵巢由灰白色变成深红色表明缺血明显,然后快速以 4 号丝线将其固定于腹壁。(3) 缺血 24 h 后复位,恢复血流灌注,分别至 24、48 h 后取双侧卵巢组织。C 组仅开腹后提拉出左侧附件至切口,再放回原处关腹。(4) Pa + R24h、Pa + R48h 组则手术前 30 d 用 Pa 提取物进行预处理,即按 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$

灌胃,连续 30 d,余同 R24 h 组和 R48 h 组。除 Pa + R24h、Pa + R48h 组外,其余组亦灌胃同等剂量生理盐水。该实验所采用动物处置方法符合实验动物伦理学标准。

1.4 血清 ET-1 水平及卵巢组织中 ET-1 mRNA 和蛋白检测 各组实验大鼠在相应目的时间点均开胸右心房取血, 4°C 、 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 分离血清,按照 ET-1 试剂盒说明书检测 ET-1 水平;取各实验组大鼠卵巢组织,TRIzol 匀浆,提取总 RNA,紫外光检测样品吸光度(A), A_{260}/A_{280} 为 1.95 ~ 2.15,应用反转录 (reverse transcription, RT) PCR 检测 ET-1 mRNA 表达;卵巢组织加入裂解液,研磨至组织无肉眼可见的碎片,用 $200 \mu\text{L}$ 裂解液冲洗研磨器,离心机 4°C 、 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 取上清;Western blot 法检测 ET-1 蛋白表达水平变化。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 进行统计分析,计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 ET-1 水平比较 结果见表 1。与 C 组比较,I24h 组、R24h 组、R48h 组、Pa + R24h 组和 Pa + R48h 组大鼠血清 ET-1 水平均显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 I24h 组比较,R24h 组、R48h 组、Pa + R24h 组和 Pa + R48h 组大鼠血清 ET-1 水平均显著升高 ($P < 0.05$);与 R24h 组和 R48h 组比较,Pa + R24h 组、Pa + R48h 组大鼠血清 ET-1 水平均显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠卵巢组织中 ET-1 mRNA 和蛋白表达比较 结果见表 1。与 C 组比较,I24h 组、R24h 组、R48h 组、Pa + R24h 组和 Pa + R48h 组大鼠卵巢组织中 ET-1 mRNA 及蛋白表达均显著上调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 I24h 组比较,R24h 组、R48h 组、Pa + R24h 组和 Pa + R48h 组大鼠卵巢组织中 ET-1 mRNA 及蛋白表达显著上调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 R24h 组比较,Pa + R24h 组和 Pa + R48h 组大鼠卵巢组织中 ET-1 mRNA 及蛋白表达水平显著下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 R48h 组比较,Pa + R24h 组和 Pa + R48h 组大鼠卵巢组织中 ET-1 mRNA 及蛋白表达水平亦显著下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠血清 ET-1 水平及卵巢组织中 ET-1 mRNA 和蛋白的表达

Tab.1 ET-1 level in serum and the expression of ET-1 mRNA and protein in tissue of ovary in each group

组别	n	(x̄ ± s)		
		血清 ET-1/ (μg · L ⁻¹)	卵巢组织中 ET-1 mRNA	卵巢组织中 ET-1 蛋白
C 组	10	9.1 ± 1.8	0.20 ± 0.01	0.30 ± 0.04
I24h 组	10	44.0 ± 3.1 ^a	0.29 ± 0.02 ^a	0.34 ± 0.05 ^a
R24h 组	10	77.6 ± 4.4 ^{ab}	0.55 ± 0.04 ^{ab}	0.43 ± 0.06 ^{ab}
R48h 组	10	88.2 ± 5.2 ^{abc}	0.71 ± 0.02 ^{abc}	0.77 ± 0.07 ^{abc}
Pa + R24h 组	10	51.4 ± 4.4 ^{abcd}	0.41 ± 0.04 ^{abcd}	0.39 ± 0.10 ^{abcd}
Pa + R48h 组	10	66.6 ± 6.9 ^{abcd}	0.57 ± 0.02 ^{abcd}	0.62 ± 0.02 ^{abcd}

注:与 C 组比较^aP < 0.05;与 I24h 组比较^bP < 0.05;与 R24h 组比较^cP < 0.05;与 R48h 组比较^dP < 0.05。

3 讨论

AT 是妇科急诊常见病症之一。扭转所致卵巢损伤可导致内分泌及生殖功能等问题,因此必须及时处理,如治疗延迟可致女性不孕^[1-3],AT 多以突发下腹剧痛为主要表现,好发于 10 岁左右的女性儿童,临床以右侧多见。AT 轻者多在较短时间内自行缓解或者疼痛消失,但反复发作较多见,重症患者多不能自行恢复,会相应的出现组织缺血,及时医疗干预并恢复血流灌注是最佳的处理措施,但缺血再灌注损伤却是不可回避的问题之一,如进一步发展也可发生卵巢坏死及卵巢破裂^[4]。

蕨麻亦称人参果,为蔷薇科委陵菜属多年生草本植物,富含镁、锌、钾、钙等微量元素,具有较高的营养价值,其提取物亦具有十分重要的治疗作用,可收敛止血,止咳利痰,亦作滋补。近年来研究表明,蕨麻亦具有抗缺血、耐缺氧、抗再灌注损伤的显著疗效^[5-7]。ET-1 为血管内皮细胞受损后所释放的血管活性物质,是目前所知的最强效的缩血管物质,在调节血管张力与血流重布及缺血再灌注损伤等方面起重要作用^[8]。基于本课题组前期研究分析,Pa 有可能在卵巢的缺血再灌注损伤过程中起一定作用,且可能与 ET-1 存在某些联系。

本研究利用大鼠复制再现卵巢扭转-复位的病理过程,结果表明,Pa 对 ET-1 有相应的抑制作用,可有效保护缺血再灌注损伤的卵巢组织。ET-1 在卵巢的缺血再灌注损伤过程中表达升高,且缺血组高于假手术组,再灌注组高于缺血组。利用蕨麻预

处理后可有效对抗 ET-1 的作用或降低其表达。

本研究结果还表明,ET-1 在卵巢缺血再灌注损伤的病理进程中发挥了重要作用。在卵巢缺血再灌注过程中,随着再灌注时间的延长,ET-1 水平不断升高,R48h 组 ET-1 达到最高。但由于经费有限课题组没有选取更多的时间点观察 ET-1 的进一步变化规律,但是在卵巢缺血再灌注损伤的某些时间段,如 R24h、R48h 组,通过 Pa 的干预可有效抑制 ET-1 的表达,Pa 作为一种保护卵巢缺血再灌注损伤的措施是可行的。

文献报道,给予一定剂量的 ET 受体抑制剂以对抗 ET-1 的生物学效应,可有效减轻缺血再灌注损伤,但因其不良反应较多、价格高昂,至今仍难以在临床推广应用^[9]。本研究提示,Pa 可作为 ET 受体抑制剂的一种替代品,下调血清及卵巢组织中 ET-1 水平,或削弱其生物学效应,间接起到对卵巢的保护作用。其具体作用机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Oelsner G, Shashar D. Adnexal torsion [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2006,49 (3):459-463.
- [2] 李巨,于月新,孙静莉,等.保留卵巢的附件扭转手术及相关问题探讨[J]. *中国实用妇科与产科杂志*,2006,22 (6):474-475.
- [3] Breech L L, Hillard P J. Adnexal torsion in pediatric and adolescent girls [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*,2005,17 (5):483-489.
- [4] 张晶晶,董化江,单娜娜,等.蕨麻正丁醇提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤内皮素-1 的影响[J]. *新乡医学院学报*,2012,29 (5):324-326.
- [5] 马春花.藏药蕨麻的化学成分及药理作用研究概况[J]. *时珍国医国药*,2006,17 (8):1584-1585.
- [6] 谢学渊,王强.蕨麻提取物抗衰老作用研究[J]. *重庆医学*,2007,36 (8):734-736.
- [7] 董化江,罗悦晨,刘未,等.左旋精氨酸对急性心肌缺血再灌注损伤大鼠内皮素-1 的影响[J]. *中国危重病急救医学*,2011,23 (12):731-733.
- [8] 李龙学.慢性阻塞性肺疾病患者血清 C-反应蛋白和内皮素-1 水平与肺动脉高压的关系[J]. *新乡医学院学报*,2011,28 (4):476-478.
- [9] Vetter D, Shaw S G, Brandes R P, et al. Beneficial cardiovascular effects of endothelin ET (A) receptor blockade in established long-term heart failure after myocardial infarction [J]. *Exp Biol Med*, 2006,231 (6):857-860.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)