

2 Otagiri T, Kiyono S, Sokoll MD. The effects of verapamil on the neuromuscular transmission in rats. *Jpn J Anesth* 1985; 34 : 216

3 Riker WK, Matsumoto M, Takashima K. Synaptic facilitation by 3-aminopyridine and its antagonism by verapamil and diltiazem. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 235 : 431.

4 Durant NN, Nguyen N, Katz RL. Concerning the site of action of verapamil on skeletal muscle (reply). *Anesthesiology* 1984; 61 : 784

5 Edeson RO, Madsen BW, Milne RK. Verapamil alters the amplitude and time course of miniature endplate current. *Neuropharmacology* 1985; 24 : 561

6 Dun NJ, Karczmar AG, Liu HC, Mo N. Anticholinesterase actions on mammalian sympathetic ganglia. In: Dowdall MJ, Hawthorne JN, eds. *Cellular and molecular basis for cholinergic function*. Chichester: Ellis Horwood, 1987; 569-81

7 Simmons MA, Dun NJ. Actions of 4-aminopyridine on mammalian ganglion cells. *Brain Res* 1984; 298 : 149

8 Douglas WW, Lywood DW, Straub RW. The stimulant effect of barium on the release of acetylcholine from the superior cervical ganlion. *J*

*Physiol (Lond)* 1961; 156 : 515

9 Baraka A. Action of verapamil at the neuromuscular junction: prejunctional or postjunctional? *Anesthesiology* 1985; 63 : 234

**维拉帕米对哺乳类交感神经节突触传递的影响**

刘汉清、邓乃健 (Department of Pharmacology, Loyola University Medical Center, Maywood IL 60153, USA)

**摘要** 以细胞内微电极技术观察维拉帕米对离体颈上交感神经节(SCG)突触传递的影响.在家兔及豚鼠SCG神经元,维拉帕米(100-400 μmol/L)抑制顺向刺激引起的突触反应(快-兴奋性突触后电位(f-EPSP)和/或所诱发的动作电位),以及压力加注ACh所产生的ACh电位.4-氨基吡啶(100 μmol/L)及氯化钡(5 mmol/L)可易化维拉帕米所抑制的f-EPSP,但对维拉帕米所抑制的ACh电位无明显作用.维拉帕米抑制吡啶斯的明(1 μmol/L)所增强的ACh电位.索曼(1 μmol/L)对ACh电位的强化作用可被维拉帕米所阻碍.以上结果提示,维拉帕米可通过突触前及突触后作用,阻断哺乳类SCG的突触传递.

**关键词** 维拉帕米; 交感神经节; 氨基吡啶类; 钡; 溴化吡啶斯的明; 索曼

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Sep; 11 (5) : 418-421

**水飞蓟宾对缺血再灌注脑产生氧自由基、脂质过氧化物及白三烯的影响<sup>1</sup>**

芮耀诚、张大志、孙笃新、曾国钱 (第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433, 中国)

**Effects of silybin on production of oxygen free radical, lipoperoxide and leukotrienes in brain following ischemia and reperfusion<sup>1</sup>**

RUI Yao-Cheng, ZHANG Da-Zhi, SUN Du-Xin, ZENG Guo-Qian (Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT** Brain ischemia was produced by

occluding bilateral common carotid arteries of Mongolia gerbil with clips for 30-min and reperfusion was established by removing the clips. Superoxide dismutase (SOD) in brain tissue was measured by chemoluminescence, malondialdehyde (MDA) by fluorescence spectrometry and leukotrienes (LT) by bioassay. Decrease of SOD and increase of MDA were significant in the brain after 30-min ischemia followed by 2-min reperfusion; The level of SOD increased from  $13.4 \pm 2.7$  to  $18.8 \pm 3.0$ ,  $19.8 \pm 2.5$ ,  $22.1 \pm 3.9 \times 10^3$  units/g brain tissue and MDA decreased from  $218 \pm 26$  to  $169 \pm 41$ ,  $167 \pm 36$ ,  $167 \pm 44$  nmol/g brain tissue respectively by ip silybin 100, 200 and 400 mg/kg 30-min before occlusion. LT decreased from  $3.1 \pm 1.0$  to  $1.5 \pm 0.4$  ng/g brain tissue after ip

Received 1989 Nov 29 Accepted 1990 May 18  
<sup>1</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No.3880742.

silybin 200 mg/kg. It suggested that the protective effect of silybin on ischemic brain result from the inhibition of 5-lipoxygenase and lipoperoxide and scavenging of oxygen free radical.

**KEY WORDS** silymarin; free radicals; superoxide dismutase; lipid peroxides; leukotrienes; Gerbillinae; luminescence; fluorescence spectrometry; biological assay

**摘要** 钳夹蒙古沙土鼠双侧颈总动脉造成脑缺血 30 min, 再灌注 2 min 可降低脑组织中 SOD 含量, 升高 MDA 含量. 若缺血 30 min, 再灌注 30 min, 可升高白三烯含量. 缺血前 30 min, ip 水飞蓟宾 100, 200 或 400 mg/kg, 能降低被损伤脑组织中 MDA 及 LT 含量, 升高 SOD 含量. 提示水飞蓟宾可能通过消除氧自由基、抑制脂质过氧化及 5-脂氧酶活性来保护脑缺血.

**关键词** 水飞蓟宾; 自由基; 超氧化物歧化酶; 脂质过氧化; 白细胞三烯; 沙土鼠; 发光; 荧光光谱测定法; 生物测定

动物脑缺血再灌注损伤后氧自由基增加, 脂质过氧化加剧<sup>(1)</sup>. 本室以往的工作<sup>(2)</sup>提示水飞蓟宾(silybin)抑制离体脑血管 5-脂氧酶, 使花生四烯酸(AA)脂氧酶代谢产物-白三烯(LT)减少. 文献<sup>(3)</sup>报道水飞蓟宾为自由基清除剂. 因而我们设计用沙土鼠脑缺血模型, 以超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)作为指标, 观察药物对氧自由基、白三烯及脂质过氧化的作用. 探讨水飞蓟宾对脑缺血的保护作用及机理.

#### MATERIALS AND METHODS

水飞蓟宾由本院药厂提供(96%; mp 167-8°C), 制成葡甲胺盐<sup>(4)</sup>, 用 4% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)配成所需浓度并测定其含量. SOD 标准品、黄嘌呤氧化酶(上海生化所); 鲁米诺(luminol, 西德 Merck 公司); 四乙氧基丙烷(1,1,3,3-tetraethoxypropane, TEP)标准品及硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA, 军事医学科学院放射医学研究所); 白三烯 D<sub>4</sub> (leukotriene D<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, Merck Frosst Canada 公司); 阿托品和苯海拉

明(北京药品生物制品检定所); 赛庚啶(Sigma 公司); 蒙古沙土鼠(*Mongolia gerbillinae*, 浙江医学研究院动物实验中心).

**沙土鼠脑缺血再灌注模型** 蒙古沙土鼠, ♀♂ 不拘, 体重 55±SD 16g, 113 只, 分为给药组, 溶剂组、对照组及缺血组. 给药组 46 只, ip 不同剂量水飞蓟宾, 10min 后用戊巴比妥钠麻醉(ip, 35 mg/kg) 20 min, 分离双侧颈总动脉, 并用动脉夹夹之, 造成脑缺血 30 min, 打开动脉夹再灌注 2 min, 迅速断头置液氮中, 待测. 溶剂组 17 只, ip 4% PVP 溶液, 与给药组等剂量; 缺血组 23 只, 不给药或溶剂, 重复上述实验; 对照组 27 只, 分离双侧颈总动脉不钳夹, 即为假手术组.

**SOD 的测定** 取出冰冻的沙土鼠整个大脑半球, 用冰冷的双蒸水制成 10% 匀浆液, 取 0.9 ml 匀浆液, 加入 0.3 ml 冰冷的乙醇-氯仿混合液(1:1)混旋振荡, 4°C 1500 × g 离心 15 min, 取上清液, 用化学发光法<sup>(5)</sup>测定 SOD 含量. 在测量管中加入次黄嘌呤(0.2 mol/L)-鲁米诺(0.2 mol/L)混合液(1:1) 0.98 ml, 提取液 10 μl, 黄嘌呤氧化酶(0.1 mol/L) 10 μl, 振荡 10 s, 迅速放入 FJ-2107 型液体闪烁计数器中测 1 min 末 6 s 的发光计数(CP6s), 计算发光抑制%, 从 SOD 标准曲线上查得样品中所含 SOD 的单位数, 本实验所得的标准曲线为一条矩形曲线, 各数据取倒数, 进行直线回归, 得方程为:  $1/I = 0.8024 + 6.484 / C$ . I: 发光抑制%; C: SOD 的浓度,  $r = 0.9922$ .

**MDA 的测定** 测定管内加组织匀浆 0.1 ml, 标准管内加入四乙氧基丙烷 10 mol/L 标准液 0.2 ml, 另设一个空白管; 分别向上述 3 种管中加入 3% SDS 0.5 ml, pH 3.5 乙酸缓冲液 1.5 ml 及 0.8% 硫代巴比妥酸 1.5 ml, 各管用双蒸水加至总量 4.0 ml, 加盖摇匀, 95°C 水浴中加热 60 min, 冷却后加正丁醇-吡啶混合液(15:1) 5.0 ml, 振荡提取, 取上清液在 F-4000 日立荧光分光光度计上测定浓度值, 激发波长 515 nm, 发射波长 553 nm.

在 F-4000 日立荧光分光光度计上测定浓度值。激发波长 515 nm, 发射波长 553 nm。

**水飞蓟宾清除氧自由基的体外实验** 与体内给药测 SOD 活性一样, 将水飞蓟宾配成一定浓度, 取代样品液, 在液体闪烁计数仪上测 1 min 末的 CP6s, 同时设溶剂对照组。

**白三烯含量的测定** 沙土鼠 15 只, 雌雄不拘, 体重  $60.5 \pm 7.8$  g, 仍分为前述 4 组, 每组鼠数见表。按前述方法造成脑缺血 30 min, 再灌注 30 min 后, 迅速断头, 置液氮中, 待测。按文献<sup>(6)</sup>, 取全脑称重, 用乙酸(7.5 mmol/L)缓冲液(pH 5.9)制成 20% 匀浆,  $3500 \times g$  离心 25 min, 上清液通过用 10 ml 无水乙醇、5 ml 乙酸缓冲液、10 ml H<sub>2</sub>O 予处理的 SEP-PAK 小柱(C<sub>18</sub> Cartridge, Waters) 3 次, 尔后用 5 ml 乙酸缓冲液, 10 ml 乙醇-水(15:85)混合液, 5 ml 石油醚洗涤, 最后用 3ml 甲酸甲酯洗脱, 收集甲酸甲酯洗脱液, N<sub>2</sub> 吹干备用。

对提取物进行生物测定<sup>(7)</sup>, 豚鼠回肠置于 Tyrode 液中 37℃ 通 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 稳定后, 加阿托品 1 μmol/L, 苯海拉明 1 μmol/L 和赛庚啶 2 μmol/L 稳定后 5 min, 加入标准品 LTD<sub>4</sub> 或提取物, 记录回肠段的收缩曲线。标准品 LTD<sub>4</sub> 浓度对回肠张力回归得标准曲线方程:  $g = -0.067 + 0.2064 \times C$ ,  $r = 0.9837$ 。

## RESULTS

**水飞蓟宾体外清除氧自由基作用** 水飞蓟宾 0.2, 0.4, 2 μmol/L, 对次黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶引起的化学发光的抑制%分别为  $34.0 \pm 3.0$ ,  $44.9 \pm 2.1$ ,  $95.4 \pm 0.2$ , 溶剂无显著抑制作用。

**水飞蓟宾对沙土鼠脑缺血再灌注引起的 SOD 和 MDA 变化的影响** 见 Tab 1 脑缺血再灌注损伤引起脑组织中 SOD 和 MDA 的含量显著变化, SOD 由正常的  $18.9 \pm 6.7$  降为  $13.4 \pm 2.7 \times 10^3$  units/g brain tissue ( $P < 0.05$ ), MDA 由正常的  $139 \pm 21$  升为  $218 \pm 26$  nmol/g brain tissue ( $P < 0.05$ )。ip 水飞蓟宾 100, 200, 400 mg/kg, 使沙土鼠脑缺血损伤后 SOD 含量显著升高, 分别为  $18.8 \pm 3.0$  ( $P < 0.05$ ),  $19.8 \pm 2.5$  ( $P < 0.01$ ),  $22.1 \pm 3.9$  ( $P < 0.01$ )  $\times 10^3$  units/g brain tissue, 而使 MDA 显著降低分别为  $169 \pm 41$  ( $P < 0.05$ ),  $167 \pm 36$  ( $P < 0.05$ ),  $167 \pm 44$  ( $P < 0.05$ ) nmol/g brain tissue, 溶剂对 SOD 和 MDA 无显著影响。

**水飞蓟宾对沙土鼠脑缺血再灌注后白三烯含量的影响** 见 Tab 1 结果表明脑缺血 30 min, 再灌注 30 min 后, LT 含量显著升高, 由正常的  $1.3 \pm 0.3$  升高到  $2.82 \pm 0.90$  ng/g brain tissue ( $P < 0.05$ )。silybin (200 mg/kg) 能显著降低缺血再灌注引起的 LT 升高。给药后

Tab 1. Effects of ip silybin on superoxide dismutase, malondialdehyde and leukotrienes in gerbil brain after ischemia and reperfusion.  $\bar{x} \pm SD$ . \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs ischemia group. \*\* $P < 0.05$ , vs control group. Number of brains in parentheses.

Group	Superoxide dismutase ( $10^{-3} \times$ units/g tissue)	Malondialdehyde (nmol/g tissue)	Leukotrienes (ng/g tissue)
Control	$18.9 \pm 6.7$ (14)	$139 \pm 21$ (13)	$1.3 \pm 0.3$ (4)
Ischemia	$13.4 \pm 2.7^{**}$ (17)	$218 \pm 26^{**}$ (6)	$2.8 \pm 0.4^{**}$ (4)
Solvent	$14.5 \pm 4.0^*$ (11)	$286 \pm 56^*$ (6)	$3.1 \pm 1.0^*$ (4)
Silybin (mg/kg)			
100	$18.8 \pm 3.0^{**}$ (6)	$169 \pm 41^{**}$ (6)	
200	$19.8 \pm 2.5^{***}$ (11)	$167 \pm 36^{**}$ (11)	$1.5 \pm 0.4^{**}$ (4)
400	$22.1 \pm 3.9^{***}$ (6)	$167 \pm 44^{**}$ (6)	

LT 含量为  $1.49 \pm 0.37$  ng/g brain tissue ( $P < 0.05$ )。溶剂组无显著影响。

缺血 30 min, 再灌注 2 min, 脑内 LT 含量与假手术组无显著差异。

#### DISCUSSION

本实验结果表明, 钳夹沙土鼠双侧颈总动脉, 造成脑缺血 30 min, 再灌注 2 min, 脑组织中 SOD 含量显著降低, MDA 含量显著增加; 缺血 30 min, 再灌注 30 min, 可显著升高脑组织中 LT 的含量; 说明脑缺血再灌注过程中自由基反应、脂质过氧化及白三烯生成等加剧。已有文献<sup>(8,9)</sup>报道, 脑缺血时, 膜脂被破坏, 大量不饱和脂肪酸释放, 再灌注后提供氧, 一方面脂质过氧化加强; 另一方面 AA 释放增加, 脂氧酶代谢产物 LT 增加, 同时在 LT 产生过程中氧自由基增加, 三者关系密切, 本实验进一步支持了这一结论。

水飞蓟宾的体外实验表明对氧自由基有显著消除作用, 与文献<sup>(3)</sup>报道一致; 体内实验表明水飞蓟宾使脑缺血再灌注损伤后脑组织中 SOD 含量显著升高, MDA 及 LT 含量显著降低, 这是水飞蓟宾对氧自由基的清除作用及脂氧酶抑制作用的结果。提示水飞蓟宾可能通过抗氧自由基、抗脂质过氧化及抑制 5-脂氧酶等多种途径而保护脑缺血再灌注损伤。

#### REFERENCES

- 1 Chu GX, Chen X. Anti-lipid peroxidation and protection of ginsenosides against cerebral ischemia-reperfusion injuries in rats. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11 : 119
- 2 Lin AY, Rui YC. Inhibitory effect of silybin on the activity of 5-lipoxygenase of the porcine cerebral basilar artery. *Ibid* 1989; 10 : 414
- 3 Parasassi T, Martellucci A, Conti F, Messina B. Drug-membrane interaction: silymarin, silybin and microsomal membranes. *Cell Biochem Funct* 1984; 2 : 85
- 4 Wu ZX, Zhang SX, Xu LR, Yu RG. An assay of silybin and its water-soluble derivatives. *J Nanjing Coll Pharm* 1981; 2 : 28
- 5 Yang JP, Zhou X. Micro-assay of serum and tissue superoxide dismutases - Chemoluminescence. *J Norman Bethune Univ Med Sci* 1987; 13 : 16
- 6 Minamisawa H, Terashi A, Katayama Y. *et al.* Brain eicosanoid levels in spontaneously hypertensive rats after ischemia with reperfusion: leukotriene C<sub>4</sub> as a possible cause of cerebral edema. *Stroke* 1988; 19 : 374
- 7 Engineer DM, Niederhauser U, Piper PJ, Sirois P. Release of mediators of anaphylaxis: inhibition of prostaglandin synthesis and the modification of release of slow reacting substance of anaphylaxis and histamine. *Br J Pharmacol* 1978; 62 : 61
- 8 Yoshida S, Inoh S, Asano T, *et al.* Effect of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain. *J Neurosurg* 1980; 53 : 323
- 9 Cao XQ. The effects of lipid peroxidation on cells and organisms. *Biochem Biophys* 1986; 2 : 17

### 欢迎购阅《中国药理学报十年累积索引》

本刊采用电脑编印了《中国药理学报十年累积索引》, 通过刊载的作者名、中英文关键词名、刊登的年卷期页各单位单个项目索引可查到有关的相应资料, 大大方便了文献检索的需要, 特别适用于科技情报单位。

本刊加印了少量索引本, 每本定价 8.10 元, 欢迎购阅。如有需要本软件者, 可与本刊编辑部联系。