

本实验研究结果表明,青藤碱体外可清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$;可显著降低肝匀浆的自氧化与 $VC-Fe^{2+}$ 诱导产生的 MDA;对于肝线粒体经 $VC-Fe^{2+}$ 诱导氧化引起的 MDA 的生成及肿胀度的改变有显著的抑制作用。说明青藤碱具有清除自由基和抗脂质过氧化作用,其抗氧化作用可能与其分子结构中的酚羟基有关^[7,8]。提示青藤碱可作为一种天然抗氧化剂,其药效学和作用机制有待进一步研究。

References

- [1] Jiangsu New Medical Collage. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1996.
- [2] Liu Q, Zhou L L, Li R. General development of sinomenine in chemistry, pharmacology and clinics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(4): 247-249.
- [3] Wang J C, Xin G S, Hu W F, *et al.* Effects of Ge-132 on oxygen free radicals and lipid peroxidation induced by hydroxyl free radical *in vitro* [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 1994, 29(1): 23-25.
- [4] Zhao S Q, Sun Y M, Cai Y F, *et al.* Studies on identification and anti-oxidative action of banana skin melanin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 496-498.
- [5] Gong G Q, Liu T Z, Li L W, *et al.* Antioxidative activity of crocetin *in vitro*. [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(4): 306-309.
- [6] Yamamoto M, Shim T. Possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration [J]. *Stroke*, 1993, 24(6): 977-981.
- [7] Hagergerman A E, Riedl K M, Alexander J G. High molecular weight plant polyphenolics as biological antioxidants [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(5): 1887-1891.
- [8] Husain S R, Gillard J, Gillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(9): 2489-2492.

葡萄籽原花青素舒张家兔离体主动脉的研究

张团笑¹, 贺 殿², 牛彩琴³, 秦晓民^{1*}

(1. 兰州医学院 生理学教研室, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州医学院 药物化学教研室, 甘肃 兰州 730000;
3. 甘肃中医学院 内科教研室, 甘肃 兰州 730020)

摘要:目的 研究葡萄籽原花青素(PC)对主动脉环的舒张作用及机制。方法 采用家兔离体主动脉平滑肌标本,以去甲肾上腺素(NA)预收缩主动脉后给予不同剂量PC观察其张力变化,并探讨去除血管内皮、给予NO合酶抑制剂左旋硝基精氨酸(L-NN A)、甲烯蓝(MB)、环氧酶抑制剂吲哚美辛(Indo)和 β 肾上腺素能受体阻断剂普萘洛尔(Prop)对血管张力变化的影响。结果 PC对动脉环静息张力无明显影响,但不同剂量PC可使 10^{-6} mol/L NA预收缩的血管出现明显地舒张($r=0.63$, $P<0.001$)。去除血管内皮、 10^{-4} mol/L L-NN A或 10^{-5} mol/L MB可减弱PC的舒张作用,但Indo和Prop无影响。另外,40 μ g/mL PC对无内皮血管环NA和KCl的量效收缩反应明显减弱,且NA和KCl的 PD_{50} 分别由对照组的 7.05 ± 2.19 和 1.57 ± 1.37 降低为 6.04 ± 1.77 和 1.01 ± 0.93 。结论 PC对主动脉的舒张作用是通过平滑肌细胞膜上的受体依赖性 Ca^{2+} 通道和电压依赖性 Ca^{2+} 通道抑制 Ca^{2+} 内流,使动脉环舒张,其作用与内皮释放的NO有关。

关键词: 原花青素; 离体主动脉环; 内皮细胞; 血管舒张

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2006)01-0087-03

Vasodilation of procyanidins from grape seeds on isolated rabbit aorta

ZHANG Tuan-xiao¹, HE Dian², NIU Cai-qin³, QIN Xiao-min¹

(1. Department of Physiology, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Pharmaceutical Chemistry, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China; 3. Department of Medicine, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China)

Key words procyanidins; isolated aortic rings; endothelial cells; vasodilation

原花青素(procyanidins, PC)是广泛存在于植物中的多酚类化合物,由不同数量的儿茶素或表儿

茶素缩合而成。PC在葡萄属植物种子中的量很高。葡萄盛产于西北,作为药用由来已久,具有补气血、

* 收稿日期: 2005-06-20

基金项目: 甘肃省教育厅科研项目(033B-02)

作者简介: 张团笑(1968-),男,甘肃省静宁县人,讲师,1995年毕业于兰州医学院临床系,学士学位,现从事平滑肌生理和药理研究。Tel (0931) 8611050
E-mail lanyizhangtx@163.com

强筋骨、利尿等功效。葡萄类产品如红葡萄酒富含 PC, 在欧美国家被认为能降低冠状动脉疾病的发生^[1]。尽管如此, 常规应用葡萄酒预防心血管疾病还存在很多问题。为探讨 PC 对心血管疾病的影响, 本实验通过家兔离体动脉环灌流, 观察 PC 对去甲肾上腺素 (NA)、KCl 预收缩血管的舒张作用, 并探讨其影响机制, 为 PC 临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料: PC, 质量分数 $\geq 95.6\%$, 购自天津尖峰天然产物研究开发公司, 批号 20020930; 双蒸水配成 1.25、2.5 和 5.0 mg/mL 溶液备用。乙酰胆碱 (Ach) 和普萘洛尔 (Prop) 为北京第二制药厂产品; 左旋硝基精氨酸 (L-NNA) 为 Sigma 公司产品; 甲烯蓝 (MB) 为 Merck 产品; 吲哚美辛 (Indo) 为江苏太仓制药厂产品; 其他试剂均为分析纯。健康家兔, 体重 2.5~3.0 kg, 雌雄不拘, 由兰州医学院实验动物中心提供。

1.2 标本制备: 健康家兔 12 只, 猛击头部致昏后, 迅速取出胸主动脉, 置于盛 K-H 液培养皿中, 并持续通入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体, 剔除结缔组织后制成长 2.5~3.0 mm 动脉环^[2], 置 37℃ 恒流的灌流肌槽中, 持续通 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体, 经张力换能器将其张力变化输入电脑, 用 BL-410 智能型生物信号处理系统 (成都泰盟电子有限公司) 对实验数据进行记录与处理。给予 2.0 g 的前负荷, 每 20 min 更换一次 K-H 液 (37℃), 温育平衡 1.5~2.0 h, 待动脉环稳定后加入 10^{-6} mol/L NA 检查血管环的反应性, 收缩良好的用于实验。观察去内皮血管环时, 用棉签在主动脉环内壁来回滚动去除内皮细胞 (以 10^{-5} mol/L Ach 检验证实去内皮完全) 后, 开始实验。

1.3 PC 对 NA 预处理血管舒张的观察方法: 记录静息动脉环张力后, 加入 10^{-6} mol/L NA 收缩至最大值, 以此为 100% 效应。向浴槽中累计加入 1.25、2.5、5.0 μ g/mL PC, 描记 PC 的量效曲线, 计算其舒张率; 并以等量生理盐水 (NS) 和 10^{-5} mol/L Ach 作对照。

1.4 PC 对 NA 预处理血管舒张机制的观察方法: 冲洗后在不同的浴槽中分别加入 10^{-4} mol/L L-NNA、 10^{-5} mol/L MB、 10^{-5} mol/L Indo、 10^{-5} mol/L Prop 温育 15 min, 或去除内皮细胞后, 加入 10^{-6} mol/L NA 收缩至最大值, 再加入 5.0 μ g/mL PC 观察动脉环的变化。

1.5 离体动脉平滑肌 NA 和 KCl 量效的观察方

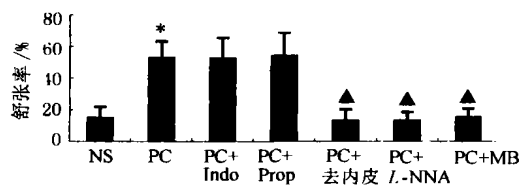
法: 在去除内皮细胞的情况下, 向浴槽中分别累计加入 NA (10^{-8} ~ 10^{-5} mol/L) 或 KCl (6.3~100 mmol/L), 描记量效曲线, 计算其收缩张力, 以此为 100% 的对照组; 冲洗后向浴槽中加入 40 μ g/mL PC 温育 15 min 后, 再重复 NA 和 KCl 的量效反应。

1.6 统计学分析: 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理, 组间用方差分析或 *t* 检验。

2 结果

2.1 PC 对 NA 预处理的血管的舒张作用: PC 可显著舒张 NA 预收缩内皮完整的动脉环, 1.25、2.5 和 5.0 μ g/mL PC 的舒张率依次为 (15.42±12.86)%、(41.43±13.24)% 和 (52.63±10.59)%, 并有剂量依赖关系 ($r=0.63$, $P<0.001$); 且 5.0 μ g/mL PC 和 10^{-5} mol/L Ach [舒张率 (54.66±14.01)%] 的舒张作用相似 ($P>0.05$)。

2.2 PC 对 NA 预处理的血管的舒张机制: 用 10^{-4} mol/L L-NNA、 10^{-5} mol/L MB 温育或去除内皮细胞后, 5.0 μ g/mL PC 对 NA 预收缩血管的舒张作用明显减弱; 但 10^{-5} mol/L Indo 和 10^{-5} mol/L Prop 温育后, 5.0 μ g/mL PC 对 NA 预收缩的血管无明显的舒张作用。见图 1。



与 NS 组比较: * $P<0.001$; 与 PC 组比较: ▲ $P<0.001$

* $P<0.001$ vs NS group; ▲ $P<0.001$ vs PC group

图 1 PC 对 NA 预收缩动脉环舒张作用机制观察结果

Fig. 1 Observation of relaxation mechanism of PC on NA-precontracted aortic rings

2.3 PC 对 NA 和 KCl 量效曲线的影响: PC 对 NA 和 KCl 量效曲线明显压低。40 μ g/mL PC 温育后 NA 的最大收缩反应降为 (78.31±15.02)% ($n=10$, $P<0.001$), 且其 PD_2 (50% 效应时剂量的负对数) 由 7.05±2.19 降为 6.04±1.78 (图 2-A); KCl 的最大收缩反应降为 (67.14±16.94)% ($n=10$, $P<0.001$), 其 PD_2 由 1.57±1.37 降为 1.01±0.93 (图 2-B)。

3 讨论

Preuss 等的在体实验研究表明 PC 能降低大鼠

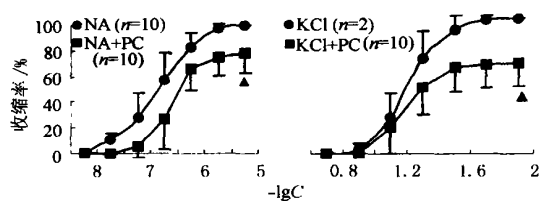


图 2 PC (40 μ g/mL) 对 NA 和 KCl 量效曲线的影响

Fig. 2 Effects of PC (40 μ g/mL) on NA and KCl concentration-dependent contraction curves

因年龄增长而升高的收缩压^[3]。在血管内皮完好的情况下, PC 与 Ach 相似, 可明显舒张 NA 预收缩的动脉环, 并有剂量依赖性。Ach 可经内皮细胞的 M₂ 受体 M₃ 受体途径激活一氧化氮合酶 (NOS) 作用于底物 L-精氨酸生成 EDRF 等^[4,5], 即 NO 通过可溶性鸟苷酸环化酶受体激活血管平滑肌内的鸟苷酸环化酶, 使 cGMP 浓度升高, 游离 Ca²⁺ 的浓度降低而引起血管扩张^[6]。用 NOS 抑制剂 L-NN A 和鸟苷酸环化酶抑制剂 MB 或去除内皮细胞后, 发现 PC 舒张 NA 预收缩血管的作用显著减弱, 说明其舒张血管效应是内皮依赖性的, 且与 NO 的释放有关。Fitzpatrick 等^[7]实验也证明了这一观点。

血管内皮细胞可摄取循环血液中的花生四烯酸 (AA), 在环氧酶作用下生成前列腺素 H₂ (PGH₂), 再经前列腺素合成酶的作用生成 PGE₂, PGE₂ 通过激活腺苷酸环化酶使细胞内 cAMP 增加而舒张血管。通过环氧酶抑制剂 Indo 温育动脉环后, PC 扩张 NA 预处理血管的作用无明显改变, 说明 PC 舒张血管作用与前列腺素无关。血管平滑肌细胞的 β 肾上腺素能受体也参与血管舒张。肾上腺素能受体通过 G_s 蛋白激活膜内侧的腺苷酸环化酶 (AC), 使 ATP 分解成 cAMP, cAMP 增加后激活 cAMP 依赖性蛋白激酶而引起血管扩张。实验中用 β 肾上腺素能受体阻断剂 Prop 温育后, 发现 PC 舒张动脉环的作用与 β 肾上腺素能受体也无关。

胞浆中游离 Ca²⁺ 是引起平滑肌收缩的关键物质。NA 和高 K⁺ 分别通过受体依赖性钙通道 (ROC) 和电压依赖性钙通道 (PDC), 使细胞外 Ca²⁺ 内流和肌浆网释放 Ca²⁺, 从而升高胞浆中游离 Ca²⁺, 引起平滑肌的收缩。Kim 等^[8]发现从山楂中提取的 PC 缓解离体大鼠主动脉的紧张性, 可能是通过激活四乙铵敏感性的 K⁺ 通道而发挥的, 而与 Ca²⁺ 通道等无关。用 40 μ g/mL PC 温育无内皮的家兔离体主动脉环后, NA 和 KCl 引起血管收缩的量效曲线明显压低, 表明 PC 能非竞争性地拮抗 ROC 和 PDC 通道, 阻止 Ca²⁺ 的内流和释放, 从而降低胞浆中游离 Ca²⁺, 引起血管平滑肌的舒张。

本实验结果表明, PC 可引起血管平滑肌舒张, 此效应可能是内皮细胞依赖性的, 与 NO 的释放有关; 也可能是通过拮抗 ROC 和 PDC 通道, 抑制 Ca²⁺ 的内流和释放等机制而发挥作用的。

References

- [1] Nuttall S L, Kendall M J, Bombardelli E, et al. An evaluation of the antioxidant activity of a standardized grape seed extract, Leucoslect [J]. *Clin Pharm Ther*, 1998, 23(5): 358-359.
- [2] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.
- [3] Preuss H G, Chromium, Zinc, and grape seed extract (flavonoids) can overcome age-related increases in SPB normotensive rats [J]. *J Amer Coll Nutr*, 1997, 16(5): 43.
- [4] Shan L M, Wang H. Pharmacological characteristics of the endothelial target for acetylcholine induced vascular relaxation [J]. *Life Sci*, 2002, 70(11): 1285-1298.
- [5] Feletou M, Vanhoutte P M. The alternative EDHF [J]. *Mol Cell Cardiol*, 1993, 31(1): 15-22.
- [6] Qi Y M, Yang D J, Duan X, et al. Endomorphins inhibit contractile responses of rat thoracic aorta rings induced by phenylephrine and angiotensin II in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2002, 23(1): 40-41.
- [7] Fitzpatrick D F, Bing B, Rohdewald P, et al. Effect of procyanidins from cocoa on glutathione levels in endothelial cells challenged by activated macrophages [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 1998, 32(4): 509.
- [8] Kim S H, Kang K W, Kim K W, et al. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta [J]. *Life Sci*, 2000, 67(2): 121.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本, 包括: 1974-1975 年、1976 年、1979 年、1985-1994 年 (80 元/年), 1995-1997 年 (110 元/年), 1998 年 (120 元/年), 1999 年 (135 元/年), 2000 年 (180 元/年), 2001-2003 年 (200 元/年), 2004 年 (220 元/年), 1996 年增刊 (50 元), 1997 年增刊 (45 元), 1998 年增刊 (55 元), 1999 年增刊 (70 元), 2000 年增刊 (70 元), 2001 年增刊 (70 元), 2002 年增刊 (65 元), 2003 年增刊 (65 元), 2004 年增刊 (65 元), 2005 年增刊 (65 元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话: (022) 27474913 23006821 传真: (022) 23006821 E-mail: zcyzjb@tjipr.com