

# 用<sup>45</sup>Ca研究红花对大鼠胸主动脉Ca<sup>2+</sup>内流的影响<sup>△</sup>

四川联合大学原子核科学技术研究所(成都 610064) 莫尚武\* 陈恒留 刘宁  
金建南 张淑渊 李文学  
成都中医学院 陈治恒 刘开明

**摘要** 用<sup>45</sup>Ca跨膜流动测定结果:红花提取物浓度为5、50、500μg/ml时,不影响大鼠主动脉静息状态下Ca<sup>2+</sup>内流;对去甲肾上腺素(NE: 1.2×10<sup>-8</sup>mol/L)和高钾溶液(KCl: 100mmol/L)引起的Ca<sup>2+</sup>内流,则具有不同程度的阻滞作用,并具有剂量-效应关系(即红花提取物浓度增高,Ca<sup>2+</sup>内流相应减少)。红花与钙拮抗剂verapamil的作用规律相似。说明能阻滞血管平滑肌细胞膜上的受体操纵钙通道(ROC)和电压依赖钙通道(PDC),是红花治疗冠心病的机理之一。  
**关键词** 放射性同位素<sup>45</sup>Ca 维拉帕米 红花 钙离子通道

红花为菊科植物*Carthamus tinctorius* L.红花的干燥花。该药辛温,归心、肝经,能活血通经,散瘀止痛<sup>[1]</sup>。近年研究表明:红花能降低冠脉阻力,增加冠脉流量;能降低血压;对心肌缺血有保护作用<sup>[2~5]</sup>,临床上可用于冠心病的治疗。红花是否具有Ca<sup>2+</sup>拮抗作用,目前尚未见报道。为了阐明红花治疗冠心病的机理,本实验用<sup>45</sup>Ca跨膜流动测定技术,研究了红花提取液对大鼠胸主动脉平滑肌细胞膜上3种钙通道Ca<sup>2+</sup>内流的阻滞作用,并与治疗心血管病的常用钙拮抗剂药物维拉帕米(verapamil)的作用特点进行了比较。

## 1 实验材料

<sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>中国原子能研究院产品,放射性比活度1820MBq/gca; verapamil购自德国Knoll公司,Wistar大鼠,体重210±30g。

## 2 药物来源

红花干品购于成都中医学院并经该院陈治恒教授鉴定。红花溶液制备过程如下:红花(干品)分别用95%、70%、35%乙醇浸泡,加热回流1h,过滤。合并3次滤液,回收乙醇,蒸干水分,获红花提取物干燥固体,实验时用重蒸水将提取物配制成一定浓度溶液供使用。

## 3 <sup>45</sup>Ca跨膜流动测定方法

3.1 测定原理:<sup>45</sup>Ca跨膜流动测定是核技术与生物技术相合,近年来发展起来的新方法,其基本原理是:放射性<sup>45</sup>Ca〔半衰期T<sub>1/2</sub>=163d,能量0.257MeV(β)〕,与生物组织中的Ca<sup>2+</sup>具有完全相同的化学性质及生物学特性。但<sup>45</sup>Ca能衰变释放出β射线,可以用液闪计数器探测。这就是<sup>45</sup>Ca跨膜流动测量的基础<sup>[6]</sup>。<sup>45</sup>Ca是由细胞膜钙通道进入细胞内的,测定细胞内<sup>45</sup>Ca的含量,即可计算出Ca<sup>2+</sup>内流量。欲测细胞内<sup>45</sup>Ca的量,必须除去组织间隙中存在的<sup>45</sup>Ca,因为90%Ca<sup>2+</sup>是非特异结合在细胞膜外和组织间隙内,否则测定结果无法代表细胞内Ca<sup>2+</sup>的变化,在除去细胞外Ca<sup>2+</sup>过程中同时必须保证已进入细胞内的<sup>45</sup>Ca不跨膜向外流失,这就是跨膜测定的关键技术。本实验是采用EGTA的冷生理液络合法<sup>[7]</sup>。

3.2 测定步骤<sup>[8]</sup>:击昏大鼠,迅速取出胸主动脉,仔细除去表面结缔组织,剪成5~6mm动脉环,置于连续通O<sub>2</sub>,37℃的PSS生理液中平衡60min〔PSS生理液组成(mmol/L):NaCl

\*Address: Mo Shangwu, Institute of Nuclear Science and Technology, Sichuan Union University, Chengdu

△核工业科学基金资助课题

137, CaCl<sub>2</sub> 1.5, MgCl<sub>2</sub> 1.0, KCl 0.6, Hepea 20, 葡萄糖10, pH 7.4], 然后将动脉环移入含<sup>45</sup>Ca (37KBq/ml)的PSS溶液中预处理3min; 之后, 动脉环或继续留在原液中5min, 供研究溢流(leak, 静息状态下的<sup>45</sup>Ca内流); 或转入含去甲肾上腺素(NE: 1.2μmol/L)或高钾(KCl: 100mmol/L)的<sup>45</sup>Ca-PSS液中处理5min(供研究ROC或PDC的<sup>45</sup>Ca内流)。取出动脉环置于0~2℃ EGTA溶液中60min, 洗去细胞间隙中的<sup>45</sup>Ca EGTA溶液组成(mmol/L); EGTA 10, NaCl 137, MgCl 1.0, KCl 4.6, HEPES 10, 葡萄糖10, pH7.4]; 滤纸吸干动脉环, 称重, 消化; 加入甲苯闪烁液, 用FJ-210P型液体闪烁计数器测定<sup>45</sup>Ca计数率(cpm)。

被测药物在动脉环平衡15min后加入PSS液中, <sup>45</sup>Ca-PSS液中也加入了等量的同一药物。药物加入后反复搅动, 使药物和动脉环均匀接触。

Ca<sup>2+</sup>内流量由下列公式计算:

$$\text{Ca}^{2+}\text{内流量}(\mu\text{mol/kg}) = \frac{\text{动脉环}^{45}\text{Ca活度}(\text{dpm})}{\text{动脉环湿重}(\text{kg})} \times \frac{\text{溶液Ca}^{2+}\text{浓度}(\mu\text{mol/ml})}{\text{溶液}^{45}\text{Ca活度}(\text{dpm/ml})}$$

$$\text{上式中, }^{45}\text{Ca活度}(\text{dpm}) = \frac{\text{计数率}(\text{cpm})}{\text{探测效率}}$$

采用外标准道比法(ESCR)对样品进行淬灭校正。

溶液中Ca<sup>2+</sup>浓度用二甲酚橙-溴化十六烷基吡啶分光光度法测定[9]。

#### 4 实验结果

4.1 红花对静息Ca<sup>2+</sup>内流作用不明显, 见表1。对照组钙内流为87±9μmol/kg, verapamil用3个不同浓度进行处理后, 静息钙内流各组与对照组之间差异不明显。说明verapamil不影响Ca<sup>2+</sup>内流。红花提取物浓度500μg/ml时, 测得的Ca<sup>2+</sup>内流量为84±μmol/kg, 与对照组差异也不显著。说明红花对静息状态下Ca<sup>2+</sup>内流无阻滞作用。

4.2 红花对ROC Ca<sup>2+</sup>内流有阻滞作用: 见表2。在NE(1.2×10<sup>-6</sup>mol/L)作用下, 对照组

表2 红花、verapamil对受体操纵钙通道(ROC)Ca<sup>2+</sup>内流的影响

药物名称	药物浓度	Ca <sup>2+</sup> 内流量(μmol/kg) ( $\bar{x} \pm S$ )
对 照	0	115 ± 13(n = 18)
	0.011μmol/L	112 ± 18(n = 6)*
verapamil	0.110μmol/L	104 ± 10(n = 5)*
	1.100μmol/L	97 ± 16(n = 6)**
红 花	5μg/ml	107 ± 9(n = 6)*
	50μg/ml	104 ± 9(n = 6)
	500μg/ml	108 ± 9(n = 6)**

表1 红花、verapamil对静息Ca<sup>2+</sup>内流的影响

药物名称	药物浓度 (μmol/L)	Ca <sup>2+</sup> 内流量(μmol/kg) ( $\bar{x} \pm S$ )
对 照	0	87 ± 9(n = 10)
	0.011	85 ± 15(n = 5)*
verapamil	0.11	83 ± 8(n = 6)*
	1.00	86 ± 7(n = 5)*
红 花	500μg/ml	84 ± 10(n = 6)*

与对照组比较 \*P>0.05

与对照组 \*P>0.05, \*\*P<0.05 \*\*\*P<0.01(下同)

Ca<sup>2+</sup>内流为115±13μmol/kg(n=18), 说明NE促进了ROC钙通道开放。在不同浓度的verapamil和红花作用下, ROC的钙内流量呈减少趋势, 当verapamil的浓度为1.10μmol/L, 红花提取物的浓度为500μg/ml时, 钙内流量与对照组差异明显, 说明verapamil, 红花对通过RDC的Ca<sup>2+</sup>内流有阻滞作用, IC<sub>50</sub>分别为: 0.31μmol/L, 629.5μmol/ml。

4.3 红花PDC有较强的阻滞作用, 见表3, 在高钾溶液(KCl 100mmol/L)液中, 对照组Ca<sup>2+</sup>内流为143±1g(μmol/kg), 比静流和NE引起的Ca<sup>2+</sup>内流量都高, 说明高钾促进了PDC钙通道的开放。verapamil浓度为0.11μmol/L和1.10μmol/L, 红花浓度为50和

500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,  $\text{Ca}^{2+}$ 内流量与对照组差异分别达到显著和极显著,  $\text{IC}_{50}$ 分别为0.24 $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 509.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

## 5 讨论

5.1 verapamil对动脉平滑肌细胞膜 $\text{Ca}^{2+}$ 通道的阻滞特点是不影响静流; 对比ROC和PDC的 $\text{Ca}^{2+}$ 内流有阻滞作用并有量-效关系; 对PDC的作用大于ROC。本结果与国外文献一致[8]。红花提取液对大鼠胸主动脉 $\text{Ca}^{2+}$

内流阻滞特性与verapamil相似。提示: 红花具有钙拮抗作用, 阻滞ROC、PDC  $\text{Ca}^{2+}$ 的内流可能是红花治疗心血管疾病的机理之一。

5.2 红花对ROC、PDC的 $\text{Ca}^{2+}$ 内流阻滞1/2所需要的浓度( $\text{IC}_{50}$ )分别是: 629.5和059.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , verapamil则分别为0.31和0.24 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。说明对 $\text{Ca}^{2+}$ 内流要达到同样的阻滞效果, 红花的用量要比verapamil用量高。反过来, 说明红花的阻滞作用比verapamil弱。verapamil是化学合成的钙拮抗剂; 红花提取物含量复杂, 主要含有红花醌甙, 新红花甙, 红花甙, 有机酸, 蛋白质等几十种成分。其有效成分有待于深入研究。从红花中分离、浓缩有效成分, 开发新药, 进一步提高对冠心病的疗效, 很有应用前景和科学价值。

5.3  $^{45}\text{Ca}$ 跨膜流动测定技术, 是核技术与生物技术相结合发展起来的新技术, 目前已广泛用于钙拮抗作用研究, 此法较其它方法直观、准确, 能在细胞膜通道水平上阐明其药理, 也能用于中药钙拮抗剂的快速筛选和鉴定。但中药成分复杂, 有效成分含量相对较低, 因此在实验中, 中药提取物未经分离, 精制, 则其浓度要适当提高, 以防假阴性结果; 但用药浓度也不宜太高, 否则对组织产生毒害, 一般5~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为宜。

## 参 考 文 献

- 1 阴 健, 等编. 中药现代研究与临床应用. 1, 北京: 学苑出版社, 1994. 330
- 2 黄正良, 等. 中草药, 16(10): 459
- 3 王炳章, 等. 药学报, 1979, 14(8): 474
- 4 李世英, 等. 中华医学, 1979, 59(9): 550
- 5 王大骏, 等. 心血管疾病, 1976, 4(4): 265
- 6 董 辉, 等. 生理学进展, 1990, 21(2): 171
- 7 Van Breman C, et al. Calcium Blockers Baltimore-Munich; Urban and Schwarzenberg, 1982. 54
- 8 Godfraind T. J Pharmacol Expther, 1983, 224: 443
- 9 匡 军, 等. 分析化学, 1984, 12(2): 736

(1994-08-08收稿)

## 安徽省高校科技函授部 中医大专招生

经省教委批准继续面向全国招生。本着继承和发展祖国医学, 培养具有专业技能的中医人才, 选用11门全国统编中西医函授教材, 与当前全国高等教育自考相配合, 聘有专家教授进行教学, 全面辅导和答疑。愿本部能成为你医学道路上的良师益友。凡具有中学程度者均可报名, 详情见简章。附邮5元至合肥市望江西路6-008信箱中函处, 简章备索。邮编260022 电话0551-5569396

Effect of *Gynostemma pentaphyllum* Makino extract on the vitality and life-span of thorny nude belly water flea was studied. Results showed that all 0.0125%, 0.0250%, 0.0500% and 0.1000% extract of *G. pentaphyllum* significantly effected the growth, development, reproduction and life span of the water flea.

(Original article on page 527)

### Effect of Jinyingzi (*Rosa laevigata*) Aqueous Extract on Urinary System

Lu Yin, Sun Zhiguang, Xu Huiqi, et al

Jinyingzi is the dry ripe fruit of *Rosa laevigata* Michx.. It contains mainly tannic acid, malic acid, citric acid, vitamin C and saponins. Its effect on urinary system was studied on mouse pollakiuria model by severing hypogastric nerve. Results showed that the water extract of *R. laevigata* can decrease the frequency and prolong the interval of urination and increase the quantity of each urination. The said extract can inhibit the automatic contraction of isolated rabbit jejunal smooth muscle and antagonize the spasmodic contraction aroused by acetylcholine and barium chloride of isolated rabbit jejunal smooth muscle, and isolated vesical smooth muscle of mouse, and antagonize reaction of contractility aroused by noradrenalin on isolated thoracic aorta strips of rabbit. All of the the three inhibitions of smooth muscle contraction showed significant dose-response curve.

(Original article page 529)

### Influence of Safflower (*Carthamus tinctorius*)

#### on $Ca^{2+}$ Transmembrane Influx in Rat Aorta

Mo Shangwu, Chen Zhiheng, et al

Influence of *Carthamus tinctorius* L. has been studied on  $Ca^{2+}$  transmembrane influx in rat aorta when its extract was used at 5, 50, 500  $\mu\text{g/ml}$ . It was shown that the resting  $^{45}\text{Ca}$  influx in rat aorta ring was not altered by *C. tinctorius* but the  $^{45}\text{Ca}$  influx evoked by norepinephrine ( $1.2 \times 10^{-6}$  mol/L) and KCl solution (100mmol/L) was inhibited in a concentration-dependent manner. The results demonstrated that the receptor-operated  $Ca^{2+}$  channel (ROC) and potential-dependent  $Ca^{2+}$  channel (PDC) in cell membrane of smooth muscle could be blocked by *C. tinctorius* as well as by verapamil.

(Original article on page 532)

### Tissue Culture of Thickstem Gentian (*Gentiana crassicaulis*)

#### and Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis

Meng Yuling, Jia Jingfen

Callus of *Gentiana crassicaulis* was initiated from hypocotyl and cotyledon on MS medium supplemented with 2mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BA. Induction frequencies of callus were 100%. Somatic embryos were formed on MS medium containing 2mg/L BA, 3mg/L ZT, 1mg/L NAA, 3mg/L GA, three time MS organics and vitamins, 6% sucrose and 500 mg/L LH and three time  $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{Na}_2\text{EDTA}) \cdot 40\%$  Callus produced somatic embryos. It developed into complete plants on hormone-free MS medium.

(Original article on page 537)