

瓜蒌皮提取物对大鼠主动脉 PDC Ca^{2+} 内流的影响[△]

四川大学原子核科学技术研究所(成都 610064)

莫尚武* 刘 宁 张坐奎

四川大学化学系

吴玉蓉 杨 涛

摘 要 为了研究瓜蒌皮治疗冠心病的有效成分,用醚醇法和水煎醇沉法提取瓜蒌皮的有效成分,并用⁴⁵Ca 跨膜测量方法研究各提取物对大鼠主动脉 PDC 钙通道 Ca^{2+} 内流的影响。发现氯仿和醇溶物能阻滞 Ca^{2+} 内流,水溶物具有相反的作用,其中氯仿提取物浓度为 30 mg/mL 时,使 Ca^{2+} 内流量比对照下降 31.57%。实验结果表明瓜蒌皮中可能有 7 种组分具有治疗冠心病的活性。

关键词 瓜蒌皮 钙拮抗剂 放射性同位素⁴⁵Ca 冠心病

Influence of Extract of Mesocarp of Mongolian Snakegourd (*Trichosanthes kirilowii*) on Transmembrane Ca^{2+} Influx in Rat Aortic Ring

Mo Shangwu, Wu Yurong, Liu Ning, *et al.* (Institute of Nuclear Sciences and Technology, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract Powdered mesocarp of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. was extracted with petroleum ether, ethanol and water, partitioned with chloroform and ethyl acetate or precipitated with the addition of ethanol to obtain a total of 14 fractions. Their effects on Ca^{2+} influx of rat aortic rings were studied with ⁴⁵Ca transmembrane influx technique. Results showed that 7 fractions could block potential dependent Ca^{2+} influx, suggesting their potential use for the treatment of coronary heart diseases. Among them, chloroform extract resulted in a decrease of Ca^{2+} influx of 31.57% in comparison with the control.

Key words *Trichosanthes kirilowii* Maxim. Ca^{2+} antagonist ⁴⁵Ca influx

瓜蒌始载于《名医别录》,原名栝楼实,为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 或双边栝楼 *T. rosthornii* Harms 的干燥成熟果实。果实剖开,除去果瓢及种子称瓜蒌皮。皮、籽合用称瓜蒌。瓜蒌是一种常用中药,具有清热、涤痰、宽胸散结、润燥滑肠之功效,对肺热、咳嗽、胸痹心痛、乳痛、肺痈、大便秘结有显著疗效^[1,2]。近年来研究证明瓜蒌有扩张冠脉、保护心肌缺血等功效^[3]。为了阐明瓜蒌治疗冠心病的有效成分,笔者用醚醇法和水煎醇沉法^[4]从瓜蒌皮中分离提取出 14 个组分,并用⁴⁵Ca 跨膜测量方法研究了各组分对大鼠主动脉电压依赖钙通道(PDC) Ca^{2+} 内流的影响。冠心病的发病机制,和

Ca^{2+} 大量涌入心血管细胞中有重要关系,用钙拮抗剂阻滞钙通道,减少 Ca^{2+} 内流,病况将出现好转^[5,6]。因此,瓜蒌提取物中凡能阻滞钙通道,减少 Ca^{2+} 内流的组分将被认为是治疗冠心病的有效成分之一。血管平滑肌细胞膜上至少存在 3 种钙内流途径:(1)溢流(leak)钙通道,细胞处于静息状态下的 Ca^{2+} 内流;(2)电位依赖性钙通道(potential-dependent Ca^{2+} channels, PDC);(3)受体操纵性钙通道(receptor-operated Ca^{2+} channels, ROC)。当高钾引起平滑肌细胞膜去极化,导致 PDC 开放时, Ca^{2+} 内流量较 leak 和 ROC 都强,因此研究瓜蒌皮提取物对大鼠主动脉 PDC Ca^{2+} 内流的影响,对筛选治疗冠心病中

* Address: Mo Shangwu, Institute of Nuclear Sciences and Technology, Sichuan University, Chengdu

[△]国家自然科学基金(19775034)、核工业科学基金项目

药的有效成分有一定意义。

1 材料和方法

1.1 动物及药品:Wistar 大鼠,体重(200±20) g,雌雄兼用,购自成都抗生素研究所实验动物中心;放射性同位素⁴⁵CaCl₂(1 750 MBq/g Ca)英国 Amershan 公司产品,硅胶 H60 青岛海洋化工厂产品。其它药物市售分析纯。

1.2 试液:PSS 溶液(mmol/L):NaCl 137, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.0, KCl 3.0, HEPES 20, 葡萄糖 20;高钾 PSS 溶液(mmol/L):KCl 100, NaCl 40, 其余成分同 PSS 溶液;无 Ca²⁺-EGTA 洗涤液(mmol/L):EGTA 10, 无 CaCl₂, 其余成分同 PSS 液,以上溶液用重蒸水配制 pH7.4;甲苯闪烁液:PPO 5.0 g, POPOP 0.4 g, 乙二醇乙醚 300 mL 加甲苯定容至 1 000 mL。

1.3 瓜蒌皮分离提取方法

1.3.1 醚醇提取法:将瓜蒌皮粉碎用石油醚回流提取 2 h,残渣再用 95%乙醇回流 2 h,然后将提取液浓缩,浓缩液分别用 50 mL 的水-氯仿=1:1;水-乙酸乙酯=1:1 洗涤,得石油醚、氯仿、乙酸乙酯有机相和水相 4 个组分,将各组分除尽溶剂,配成 30 mg/mL 水溶液备用(若不溶可加少量吐温-40)。

1.3.2 水煎醇沉法:将瓜蒌皮粉碎,水煎 3 次,合并滤液蒸发成浸膏状,95%乙醇沉淀,滤液蒸干,过大孔树脂,分别用水和 30%, 70%, 95%的乙醇梯度洗脱,除尽溶剂,配制 30 mg/mL 水溶液备用。

1.4 ⁴⁵Ca 跨膜测量:按文献^[7,8]加以改进。击昏大鼠取出胸主动脉,置于 PSS 溶液中轻轻除去血管外结缔组织,剪成长 5~6 mm 的动脉环(重 5 mg 左右),将动脉环置 PSS 液中保温 1 h,移动脉环到含⁴⁵Ca(37 kBq/mL)的 PSS 平衡 10 min;再移动脉环到含⁴⁵Ca(37 kBq/mL)高钾溶液中处理 10 min,以上步骤都是在 37℃连续通 O₂ 条件下进行。然后将动脉环移入 0~2℃无钙 EGTA 中洗涤 1 h,用滤纸吸干动脉环称重后,分别放入测量瓶

中,加入 70% HClO₄ 25 μL 和 30% H₂O₂ 50 μL,于 80℃水浴中消化 20 min,冷却后加甲苯闪烁液 4 mL 黑暗中放置 3 h,用 EJ-2107P 液体闪烁计数器测量放射性活度(dpm)。动脉环 Ca²⁺ 内流量由以下公式确定:

Ca²⁺ 内流量(μmol/kg)=

$$\frac{\text{动脉环}^{45}\text{Ca dpm}}{\text{动脉环重量(kg)}} \times \frac{\text{溶液 Ca}^{2+}\text{浓度}(\mu\text{mol/mL})}{\text{溶液中}^{45}\text{Ca 活度(dpm/mL)}}$$

实验数据用 $\bar{x}+s$ 表示,用 *t* 检验计算显著性差异。操作过程中,待测药物于保温 0.5 h 后加入到 PSS 液中,继续保温 0.5 h,移到⁴⁵Ca-PSS 平衡液和⁴⁵Ca-高钾液这两溶液中也含相同浓度待测药物。对照组于相应步骤加等量的三蒸水。

2 实验结果

2.1、瓜蒌皮醚醇法提取物 Ca²⁺ 拮抗作用:见表 1。

表 1 瓜蒌皮醚醇法提取物对 PDCCa²⁺ 内流的影响

组别	浓度(mg/mL)	Ca ²⁺ 内流量(μmol/kg)
对照	—	182.80±14.84
石油醚组	30	138.98±8.11**
石油醚组	3	167.27±13.58*
氯仿组	30	127.50±10.0***
氯仿组	3	158.16±11.34**
乙酸乙酯组	30	143.76±18.81**
乙酸乙酯组	3	169.87±13.32*
水溶组	30	216.79±8.55**
水溶组	3	208.79±14.39**

n=6,与对照组比较:**P*<0.05 ***P*<0.01

****P*<0.001

石油醚、氯仿、乙酸乙酯提取物浓度在 30 mg/mL 时,都使 Ca²⁺ 内流显著减少,当浓度稀释 10 倍,即为 3 mg/mL 时,仅氯仿组阻滞 Ca²⁺ 内流的作用仍显著。表明氯仿萃取物钙拮抗作用很好。水溶组分不使 Ca²⁺ 内流减少,反使 Ca²⁺ 内流上升。浓度为 30 和 3 mg/mL 的 Ca²⁺ 内流量比对照分别增加 33.99 和 25.99(μmol/kg)。说明水溶物不仅无钙拮抗作用,而且有激动作用。

2.2 氯仿组分薄层分离的 4 种成分的钙拮抗作用:见表 2。将氯仿提取物过硅胶柱(G60),用丙酮-乙酸乙酯-石油醚=1:2.7:

2.7 进行薄层分析,发现共有 4 个斑点。A: $R_f=0.86$,B: 为两种物质 $R_{f1}=0.61$ 、 $R_{f2}=0.46$,C: $R_f=0.22$,D: $R_f=0$ (即在原点)。用展开剂分离洗脱获取 A,B,C,D 4 种成分。从表 2 看出,当浓度为 10 mg/mL 时,这 4 种成分的钙拮抗作用与对照组比都有显著差异。而相互之间差异不大。说明这 4 种成分药效学特性相近。

表 2 氯仿组分中 4 种成分对 PDC Ca^{2+} 内流的影响

组别	浓度(mg/mL)	Ca^{2+} 内流量(μ mol/kg)
对照	—	179.52±10.26
A	10	156.39±6.40**
B	10	152.80±13.98**
C	10	152.49±3.61**
D	10	149.50±16.99**

n=6,与对照组比较:**P<0.05

2.3 水煎醇沉法提取物的 Ca^{2+} 拮抗作用:见表 3。

表 3 水煎醇沉法提取物对 PDC Ca^{2+} 内流的影响

组别	浓度(mg/mL)	Ca^{2+} 内流量(μ mol/kg)
对照	—	189.25±10.84
水煎液	30	179.10±15.56*
水煎液的醇沉物	30	223.16±15.92**
醇溶液过柱 30%乙醇洗	30	169.40±11.92**
70%乙醇洗	30	149.06±6.6**
95%乙醇洗	30	164.16±11.89**
水洗	30	198.27±14.61*

n=6,与对照组比较:*P>0.05 **P<0.05

结果表明:瓜蒌皮水煎液的钙拮抗作用很弱, Ca^{2+} 内流比对照组下降仅 8.1 μ mol/kg,差异不明显。水煎液乙醇的沉淀物没有钙拮抗作用,反而使 Ca^{2+} 内流增加 35.91 μ mol/kg。水煎液醇沉后的醇溶部分,经柱层析,水洗脱组分,也无钙拮抗作用,而且能使内流上升。乙醇 30%~95%的洗脱组分,都使 Ca^{2+} 内流减少,共中 70%乙醇洗脱组比对

照降低达 20.40%,有显著差异。

3 讨论

3.1 瓜蒌中所含化学成分十分复杂,用常规方法筛选治冠心病的活性成分工作量较大,在分离筛选过程中,有效成分易丢失,最后得到的单体化合物往往不令人满意。用⁴⁵Ca 跨膜测量技术和化学分离方法相结合,初步确定氯仿萃取的 4 种成分和 30%~95%乙醇洗脱的 3 种组分具有钙拮抗作用。这几种组分可能是瓜蒌皮治疗冠心病的有效成分之一。今后拟进一步分离纯化,再用质谱、核磁共振谱以确定其分子结构。

3.2 瓜蒌皮的水溶部份有明显的钙激动作用。目前有关钙拮抗剂研究资料较多,但钙激动剂研究资料还很少。其水溶部分主要由蛋白质、多糖、多肽组成。到底是那种物质有激动作用,有待深入研究。

3.3 ⁴⁵Ca 跨膜流动测量方法,在筛选中药钙拮抗剂的有效成分研究中有快速、准确、直观等优点,可避免有效成分在分离、纯化过程中丢失。所得的有效成分是否真有价值,尚需进行临床检验。各提取组分对静流钙通道(leak)和受体钙通道(ROC)的影响,将另文报道。

参考文献

1 颜正华,主编. 中药学. 北京:人民卫生出版社,1991: 611
2 巢志茂. 中国中药杂志,1990,15(12):49
3 杜上鉴. 医药工业,1988,19(7):301
4 陈奇. 中药药理研究方法. 北京:人民卫生出版社, 1993:66
5 张廷杰. 心血管病学进展杂志. 1995,16(1):43
6 戴万生,等. 云南中医学院学报,1994,17(2):25
7 Godfraing T. J Pharmacol Exp Ther, 1983,224:443
8 陈恒留. 新药与临床,1994,513(3):144

(1998-01-12 收稿)

敬告读者

本刊编辑部尚存部分过刊精装合订本,包括:1991~1994 年(50 元/年);1995~1997 年(102 元/年);1998 年(120 元);1996 年增刊(50 元);1997 年增刊(45 元);1998 年增刊(55 元);1999 年增刊(70 元)。欢迎来函来电订购。