

- [2] Muzes G, Deak G, Lang L, *et al.* Effect of the bioflavonoid silymarin on the *in vitro* activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme [J]. *Acta Physiol Hung*, 1991, 78 3-9.
- [3] Zi X, Zhang J, Agarwal R, *et al.* Slibin up-regulates insulin-like growth factor-binding protein 3 expression and inhibits proliferation of androgen-independent prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 5617-5620.
- [4] Zhao J, Lahiri-Chatterjee M, Sharma Y, *et al.* Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzol peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21 811-816.
- [5] Zi X L, Feyes D K, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB468 induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4 1055-1064.
- [6] Manna S K, Mukhopadhyay A, Van N T, *et al.* Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis [J]. *J Immunol*, 1999, 163 6800-6809.
- [7] Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60 1051-1059.
- [8] Meric F, Lee W P, Sahin A, *et al.* Expression protein of tyrosine kinase in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 361-367.
- [9] Kurokawa H, Lenferink A E G, Simpson J F, *et al.* HER-2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinase enhance tamoxifen action against HER-2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cell [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 5887-5896.
- [10] Ulrich H, Zong C S, Wang L H. ErbB-2-overexpressing human mammary carcinoma cells displays an increased requirement for the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth [J]. *Oncogene*, 2001, 20 7551-7562.
- [11] Bowers G, Reardon D, Hewitt T, *et al.* The relative role of ErbB 1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20 1388-1397.

东北鹤虱中香豆素类对兔离体回肠的作用

孟 林,尹勇强,高建华,周 晶
(天津医科大学 药理教研室,天津 300070)

摘要:目的 观察东北鹤虱中香豆素类对兔离体回肠的作用及对钙离子的影响。方法 采用兔离体回肠标本,给予不同剂量香豆素 (CM) 及维拉帕米 (Ver),观察对平滑肌收缩的影响。结果 CM 和 Ver 可剂量依赖性地抑制乙酰胆碱 (Ach) 引起的回肠的收缩,非竞争性拮抗 CaCl_2 所致回肠收缩,并对 Ach 引起的第 1, 2 相收缩均有影响。结论 东北鹤虱中提取的香豆素类具有与 Ver 相似的钙拮抗作用。

关键词: 东北鹤虱;香豆素类;维拉帕米;回肠平滑肌

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)03-0241-03

Effects of coumarin from LEG on contractivity in isolated rabbit ileum

MENG Lin, YIN Yong-qiang, GAO Jian-hua, ZHOU Jing

(Department of Pharmacology, Tianjin University of Medical Sciences, Tianjin 300070, China)

Abstract Object To observe the effects of coumarin (CM) and Verapamil (Ver) on contractivity and its relationship with Ca^{2+} in isolated ileal smooth muscle of the rabbits. **Methods** The effects of CM and Ver were observed in three doses by routine experimental methods in isolated rabbit ileal. **Results** CM and Ver inhibited the contraction of isolated ileal smooth muscle induced by acetylcholine and CaCl_2 . The responses were a concentration-dependent and non-competitive manner. CM and Ver were effective against the initial and sustained peak induced by acetylcholine. **Conclusion** CM has a calcium-antagonistic effect which is similar to that of Ver.

Key words *Lappula echinata* Gilib (LEG); coumarin (CM); Verapamil (Ver); ileal smooth muscle

东北鹤虱 *Lappula echinata* Gilib (LEG) 为紫草科植物东北鹤虱的果实,具有驱虫^[1]、抗炎^[2]、止泻^[3]的作用,本实验采用其果实中提取出的香豆素

类 (coumarin, CM),以兔离体回肠为标本,观察 CM 对生理激动剂乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 及氯化钙所引起的兔回肠平滑肌收缩反应的影响,

* 收稿日期: 2002-06-12

基金项目:天津市自然科学基金项目 (003608511)

作者简介:孟 林,女,副教授,毕业于天津医科大学医学系,从事中药药理研究工作。

并与钙拮抗剂维拉帕米 (Verapamil, Ver) 相比较, 对其作用机制进行分析。

1 材料与方法

1.1 动物: 大耳白兔,雌雄兼用,体重 2.0~ 3.0 kg,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂: CM 由天津医科大学药学院植化教研室鉴定,用蒸馏水配制成所需浓度;维拉帕米注射液,上海禾丰制药有限公司产品,批号 010601; Ach 粉剂,军事医学科学院药材供应站产品;其他试剂均为市售优级纯或光谱纯

1.3 台氏液 (mmol/L): NaCl 136.8, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.1, NaHCO₃ 12, NaH₂PO₄ 0.4, Glucose 5;无钙液为不加 CaCl₂的台氏液;无钙高钾液为无钙液中加入 KCl 60 mmol/L 替代等摩尔的 NaCl

1.4 方法: 取禁食 24 h 的兔,击头部致昏后取回肠段 (1.5~ 2.0 cm),置于含 40 mL 台氏液的麦氏浴槽中,一端固定于通气钩,另一端与张力换能器连接,持续通入氧气,保持温度恒定在 37℃,前负荷 1 g,平衡 0.5 h 开始实验,实验所用药物均以最终浴槽内浓度计算。平滑肌张力变化通过张力换能器记录到 XWT-106型台式平衡记录仪上。实验结果以最大收缩为 100%,观察抑制百分率

1.5 统计学处理: 结果采用 SPSS 10.0统计软件进行处理,各组实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据之间的差异采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 CM, Ver 对回肠自律性收缩的影响: 标本稳定 0.5 h,待收缩规律恒定后,描记正常收缩曲线。分别加入 CM (5~ 20 g/L) 和 Ver (40~ 120 nmol/L),加药后温育 30 min, CM, Ver 可剂量依赖性地使回肠平滑肌自律性收缩幅度下降,与对照组比较有显著性差别 ($P < 0.05, 0.01$), IC₅₀值分别为 (15.19± 0.154) g/L, (55.23± 0.18) nmol/L,见表 1

2.2 CM, Ver 对 Ach 所致回肠收缩活动的影响: 标本稳定 0.5 h,产生规律恒定的收缩后,描记正常收缩曲线。给 Ach (5.5× 10⁻³ mol/L) 使回肠平滑肌产生短暂快速的收缩效应,并以此收缩幅度为 100%。分别加入 CM (10~ 30 g/L) 和 Ver (40~ 120 nmol/L) 温育 30 min, CM 和 Ver 均剂量依赖性地对抗 Ach 所致的回肠收缩,与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。IC₅₀值分别为 (24.11± 0.23) g/L, (70.53± 0.23) nmol/L,见表 2

表 1 不同剂量 CM, Ver 对兔离体回肠自律性收缩的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effects of CM and Ver in different doses on spontaneous contractions in isolated rabbit ileum ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂 量	收缩百分率 %
空白	-	98.36± 1.506
CM	5 g/L	85.57± 0.847
	10 g/L	70.45± 3.244 *
	20 g/L	38.53± 10.430 *
Ver	40 nmol/L	69.38± 6.274 *
	80 nmol/L	41.04± 3.587 *
	120 nmol/L	25.85± 3.530 *

与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

表 2 不同剂量 CM, Ver 对 Ach 所致兔离体回肠收缩的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

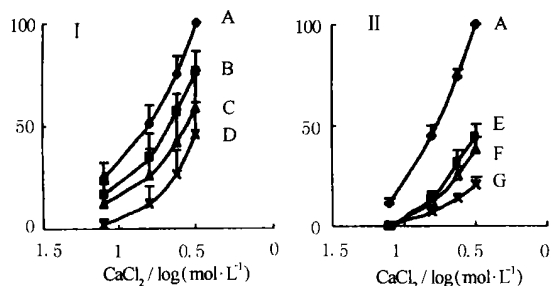
Table 2 Effects of CM and Ver in different doses on Ach-induced contractions in isolated rabbit ileum ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂 量	收缩百分率 %
空白	-	100.63± 1.506
CM	10 g/L	74.48± 5.111 *
	20 g/L	63.6± 13.060 *
	30 g/L	39.28± 12.840 *
Ver	40 nmol/L	74.88± 6.831 *
	80 nmol/L	50.04± 3.038 *
	120 nmol/L	26.80± 5.257 *

与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.3 CM, Ver 对 CaCl₂所致回肠收缩活动的影响: 标本稳定 0.5 h,产生规律恒定的收缩后,换无钙台氏液温育 30 min,再换无钙高钾液使细胞去极化, 30 min 后累加给予 CaCl₂,后次给药须在前次给药的反应达最大时,以最大收缩为 100%,测出 CaCl₂ 累加浓度-效应曲线作为对照。而后用无钙液冲洗,待肌张力恢复给钙前水平后 30 min,换无钙高钾液,并分别加入 CM (6~ 18 g/L), Ver (40~ 120 nmol/L) 温育 30 min 后重复上述累加给予 CaCl₂,测定 CM, Ver 对 CaCl₂所致回肠收缩活动的影响。结果 CM, Ver 均可抑制 CaCl₂所致的回肠收缩,不仅使曲线右移,且降低其最大效能,呈非竞争性拮抗作用,见图 1

2.4 CM, Ver 对 Ach 所致的两个收缩时相的影响: 标本稳定 30 min,产生规律恒定的收缩后,用无钙液冲洗并温育 30 min,加入 Ach (5.5× 10⁻³ mol/L) 可致短暂收缩 (第 1 时相 initial peak),其张力为 (2.15± 0.10) g,继加入 0.02 mol/L CaCl₂,产生进一步的收缩 (第 2 时相 sustained



A-对照 B-香豆素 (6 g/L) C-香豆素 (12 g/L) D-香豆素 (18 g/L) E-维拉帕米 (40 nmol/L) F-维拉帕米 (80 nmol/L) G-维拉帕米 (120 nmol/L)

A-control B-CM (6 g/L) C-CM (12 g/L) D-CM (18 g/L) E-Ver (40 nmol/L) F-Ver (80 nmol/L) G-Ver (120 nmol/L)

图 1 CM(I), Ver(II) 对 CaCl_2 所致兔离体回肠收缩的拮抗作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Antagonism of CaCl_2 -induced contractions by CM(I) and Ver(II) in isolated rabbit ileum ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Peak), 张力为 $(3.22 \pm 1.7) \text{ g}$, 以此作为对照, 观察 CM, Ver 对 Ach 所致的两个收缩时相的影响。用台氏液冲洗标本并稳定 30 min, 再用无钙液冲洗同时分别加入 CM 和 Ver 温育 30 min 后重复上述实验, 结果 CM 1 g/L, Ver 6 nmol/L 使 Ach 所致的第 1 时相收缩分别下降到原收缩幅度的 $(68.2 \pm 7.51)\%$, $(51.5 \pm 10.31)\%$ ($P < 0.01$); 对第 2 时相影响不大, 分别为 $(89.4 \pm 8.75)\%$, $(91.7 \pm 5.98)\%$ 。CM 20 g/L, Ver 120 nmol/L 使 Ach 所致的第 1 时相收缩分别下降到 $(59.9 \pm 13.21)\%$, $(43.3 \pm 26.52)\%$ ($P < 0.01$), 使 Ach 所致的第 2 时相收缩分别下降到 $(65.9 \pm 13.6)\%$, $(28.4 \pm 12.8)\%$ ($P < 0.01$)。

3 讨论

钙是胃肠道平滑肌的兴奋-收缩偶联者, 引起肠道平滑肌收缩所需的大部分钙是在动作电位发生时从细胞外进入肌细胞的, 小部分来源于肌浆网, 当胞内 Ca^{2+} 浓度升高到一定水平时, 触发平滑肌收缩^[4,5]。Ver 主要影响钙离子的跨膜内流而致平滑肌松弛^[6]。将平滑肌置于高钾溶液中, 降低了肌细胞膜内外 K^+ 的浓度差, 肌细胞膜电位差减小, 膜处于持续去极化状态, 此时 Ca^{2+} 通过电压依赖性钙通道内流, 使胞内钙维持在较高水平, 而产生去极化型肌张力, Ver 也可阻断高钾性去极化型肌张力的产生。本实验结果显示, 以上作用也可被 CM 阻断, 且与 Ver 的作用相似, 并呈现剂量依赖性, 这说明 CM 与 Ver 一样, 对电压依赖性钙内流所致的平滑肌收

缩有抑制作用。

生理活性物质 Ach 使平滑肌收缩, 是因为 Ach 与膜表面 M 受体结合, 打开电位敏感型 Ca^{2+} 通道 (PSC) 或受体活化型 Ca^{2+} 通道 (ROC), 造成胞外 Ca^{2+} 内流, 胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 肌膜去极化, 胞内 Ca^{2+} 浓度升高继发引起胞内 cGMP 含量升高, cGMP 促进肌浆网释放 Ca^{2+} , 使胞内 Ca^{2+} 浓度进一步升高, 平滑肌产生收缩^[8,9]。胞内 Ca^{2+} 的释放也可直接通过 IP_3 , G-蛋白途径激活^[7]。无钙液中 Ach 引起的收缩是肌浆网释放钙引起的, 称第 1 时相收缩 (initial peak)^[10], 可以被预先给予 CM 和 Ver 抑制, 说明 CM 与 Ver 相似, 在细胞内有作用点^[4,6]。在第 1 时相收缩基础上加入 CaCl_2 可产生持续性的收缩, 是 PSC 或 ROC 钙通道开放使 Ca^{2+} 内流引起, 称第 2 时相收缩 (sustained peak)^[10], 预先给予 CM 1 g/L, Ver 6 nmol/L, 对此相均无明显影响, 但当剂量增加为 CM 20 g/L, Ver 120 nmol/L 时两者均有明显抑制作用, 说明 CM 对钙的内流也有一定的影响, 但对 PSC 和 ROC 钙通道有无选择性, 有待进一步研究。

本实验证明 CM 具钙拮抗作用, 可抑制各种来源的钙引起的平滑肌收缩, 提示其有多个作用点。

References

- [1] Ran X D. *China Pharmaceutical Sciences* (中华药海) [M]. Harbin: Harbin Publishing House, 1993.
- [2] Wang X C, Pei Y H, Li R, *et al.* Study on the antibacterial active parts of *Lappula echinata* Gilib [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1986, 21(3): 183-186.
- [3] Meng L, Gao W Z, Liu Y Z, *et al.* Effects of *Lappula echinata* Gilib on diarrhea [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm.* (中国医药学报), 1997, 15: 477-479.
- [4] Yue W H. The principles of smooth muscle contraction [J]. *Prog Physiol Sci* (生理科学进展), 1981, 12(1): 1.
- [5] Bolton T B, Prestwich S A. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles [J]. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61: 85-115.
- [6] Bondi A Y. Effects of verapamil on excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1978, 205(1): 49-57.
- [7] Zheng G H. The second messenger system and the regulations of contractions in the gastrointestinal smooth muscles [J]. *Prog Physiol Sci* (生理科学进展), 1995, 26(4): 359-362.
- [8] Bolton T B, Lim S P. Action of acetylcholine on smooth muscle [J]. *Z Kardiol*, 1991, 80 (Suppl 7): 73-77.
- [9] Pucovsky V, Zholos A V. Muscarinic cation current and suppression of Ca^{2+} current in guinea pig ileal smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 10, 346(2-3): 323-330.
- [10] Pacaud P, Bolton T B. Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells [J]. *J Physiol*, 1991, 441: 477-499.