

起生物膜脂质过氧化并与膜上脂质及蛋白质分子进行不可逆结合,导致肝细胞的损伤坏死,使细胞内转氨酶溢出进入血液,从而造成血清中 ALT、AST 活性的升高^[4]。研究表明肝损伤引起肝组织中 SOD 和过氧化氢酶活性降低,从而造成组织中 GSH、维生素 C (VC) 的降低,乳过氧化物酶 (LPO) 的增加^[2,3]; D-GalN 是通过限制细胞器及酶的生成和补充而造成肝弥漫性坏死和炎症。黄芩苷为黄酮类化合物,具有酚羟基结构,可抑制白三烯 (LTs) 合成,对肝细胞的异常凋亡也具有明显的抑制作用,具有较强的抗氧化、清除羟自由基、超氧自由基、烷自由基的功能,同时在清热、解毒、抗炎等方面具有显著的作用^[1,4,5]。本实验结果表明黄芩苷能显著增加肝组织、血清中 SOD 活性及 GSH 水平,进一步提高组织的抗氧化能力,通过抑制自由基的产生,降低 CCl₄、D-GalN 对小鼠肝组织的损伤作用,降低了生物膜脂质过氧化的发生,增强生物膜的稳定性,从而降低小鼠血清中 ALT、AST 活性及 MDA 水平,并

使血清、组织中 SOD 活性及 GSH 水平升高。提示黄芩苷对 CCl₄ 和 D-GalN 所致小鼠实验性急性肝损伤具有一定的防治作用,其作用机制与其降酶、抗脂质过氧化反应有关。

References:

- [1] Gao Z H, Huang K X, Xu H B. Progress of studies in the bioactivities of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 1998, 33(12): 705-706.
- [2] Ohta Y, Nishida K, Sasaki E, et al. Attenuation disrupted hepatic active oxygen metabolish with the recovery of acute liver injury in rats intoxicated with carbon tetrachloride [J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1997, 95(2): 191-207.
- [3] Nishida K, Ohta Y, Kongo M, et al. Response of endogenous reduced glutathione through hepatic glutathione redox cycle to enhancement of hepatic lipid peroxidation with the development of acute liver injury in mice intoxicated with carbon tetrachloride [J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1996, 93(2): 198-218.
- [4] Shimizu I, Ma Y R. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats [J]. *Hepatology*, 1999, 29(1): 149-160.
- [5] Krakauer T, Li B Q, Young H A. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines [J]. *FEBS Lett*, 2001, 500(1-2): 52-55.

青蒿素对大鼠血管平滑肌肌张力的影响

李鸿珠¹, 徐长庆^{1*}, 韩丽萍¹, 张红雨¹, 杨宝峰², 张艳桥³

(1. 哈尔滨医科大学 病理生理教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨医科大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

青蒿素 (artemisinin) 是从菊科植物黄花蒿中提取分离到的一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物。实验表明, 该药具有抗疟、抗孕、抗纤维化、抗血吸虫、抗弓形虫、抗心律失常和肿瘤毒性等作用^[1,2]。高血压病是指未查出明确病因而以非特异性循环动脉压持续升高为特点的病理过程, 常伴有不同程度心、脑、肾的损害。传统的抗高血压药物主要有 4 个类型, 即利尿剂、 β -受体阻断药、血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制剂和钙拮抗剂。研制高效、长效、多器官保护和低副作用的抗高血压药已成为人们关注的热点^[3]。青蒿素是否有抗高血压作用, 目前尚不清楚。本实验就其对大鼠血管平滑肌肌张力的影响进行了观察, 并初步探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂: 青蒿素 (沈阳药科大学提供, 质量分数 > 98%); 去甲肾上腺素 (简称 NA, 天津金耀氨基酸有限公司产品, 批号 0305281); 乙酰胆碱 (简称 Ach, 上海试剂二厂生产, 批号 20000420); 其余试剂均为分析纯。

1.2 动物和血管环制备: 选用 Wistar 大鼠, 体重 0.25~0.3 kg, 雌雄不拘, 由哈尔滨医科大学动物实验中心提供。大鼠以 2% 戊巴比妥钠 ip 麻醉, 迅速取出胸主动脉, 剥去周围的结缔组织, 制成 2.5~3 mm 宽的血管环, 置于含 Krebs 液 5 mL 的浴槽中。Krebs 液成分为 (mmol/L): NaCl 118, KCl 4.75, KH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5, 葡萄糖 11; pH 7.4。浴液温度保持 37 °C, 持续通以 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体, 平衡 1.5 h, 静息张

收稿日期: 2004-10-14

基金项目: 黑龙江省科技厅国际合作课题资助 (WC02303)

作者简介: 李鸿珠 (1977—), 女, 黑龙江省庆安县人, 哈尔滨医科大学在读硕士, 主要从事心血管药物的研究。

E-mail: hongzhuli61@163.com

* 通讯作者 Tel: (0451) 86674548 E-mail: xucq45@126.com

力2 g,每20 min更换Krebs液1次,血管张力用组织器官浴槽装置(武汉华杭科技有限公司研制,BF—1型)、肌张力换能器、PowerLab生物功能实验系统(澳大利亚PowerLab AD Instruments公司研制,8—SP型)进行记录。

1.3 去内皮模型的建立及验证:血管环以棉条穿过血管腔的方法去除内皮。用10 $\mu\text{mol/L}$ NA使收缩呈最大反应,待稳定后加入10 $\mu\text{mol/L}$ Ach,观察舒张幅度。加入Ach后若血管舒张幅度大于50%,视为内皮完整,不产生舒张或舒张幅度小于10%视为去内皮成功。

1.4 实验分组:均设对照组和青蒿素组。各对照组为待血管环收缩后,不加入青蒿素,按加青蒿素的相同时间记录血管张力的变化。每组实验后均用Krebs液反复冲洗。

1.4.1 内皮完整含钙NA组:内皮完整的血管环在正常Krebs液中平衡1.5 h后,加入10 $\mu\text{mol/L}$ NA至收缩呈最大反应,以此为对照,用Krebs液反复冲洗,平衡至加NA前水平(需30~40 min),重复上述步骤2次(收缩幅度前后2次基本不变),待第3次收缩达坪值并稳定10 min后,以5 min的间隔累积加入青蒿素,使终浓度依次为0.1、1、10、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$,观察不同浓度青蒿素对血管环的舒张效应。

1.4.2 去内皮含钙NA组:步骤与1.4.1项相同,采用去内皮血管环。

1.4.3 内皮完整含钙KCl组:内皮完整血管环在正常Krebs液中平衡1.5 h后,加入40 mmol/L KCl至出现最大收缩反应,其余步骤同1.4.1项。

1.4.4 去内皮含钙KCl组:步骤与1.4.3项相同,采用去内皮血管环。

1.4.5 内皮完整无钙NA组:将内皮完整血管环置于正常Krebs液内平衡1.5 h,用无 Ca^{2+} Krebs液(正常Krebs液中去除 CaCl_2 加入EGTA 0.1 mmol/L,其他成分不变)反复冲洗,将其在无 Ca^{2+} Krebs液内温育30 min后,浴槽内加入10 $\mu\text{mol/L}$ NA至收缩呈最大反应,用无 Ca^{2+} Krebs液反复冲洗,其余步骤同1.4.1项。

1.4.6 去内皮无钙NA组:步骤与1.4.5项相同,采用去内皮血管环。

1.4.7 内皮完整组:内皮完整的血管环在正常Krebs液中平衡1.5 h后,以5 min的间隔累积加入青蒿素,使终浓度依次为0.1、1、10、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$,观察不同浓度青蒿素对血管环肌张力的直

接作用。

1.4.8 去内皮组:步骤与1.4.7项相同,采用去内皮血管环。

1.5 统计学处理:实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用配对 t 检验及方差分析中两两比较的 q 检验来比较差异显著性。实验组与对照组、含钙组与无钙组及内皮完整组与去内皮组比较用配对 t 检验,各浓度之间比较用 q 检验。

2 结果

2.1 NA对含钙组和无钙组收缩血管作用的比较:NA收缩血管作用,含钙组大于无钙组。以静息状态下为基础值,二者内皮完整组收缩幅度分别为 $(17 \pm 3)\%$ 和 $(11.5 \pm 2)\%$;去内皮组收缩幅度分别为 $(16 \pm 2)\%$ 和 $(10.5 \pm 3)\%$,差异均显著($P < 0.05$)。

2.2 青蒿素对含钙Krebs液中NA与KCl收缩血管作用的影响:青蒿素能以浓度依赖性方式明显抑制在含钙Krebs液中NA或KCl引起的血管收缩,去内皮组与内皮完整组比较,差异无显著性($P > 0.05$);实验组与对照组比较,差异显著($P < 0.05$ 、 0.01) (表1和2)。NA和KCl二者引起的血管收缩,去内皮组与内皮完整组比较,差异均无显著性($P > 0.05$) (见表1和2)。

2.3 青蒿素对无 Ca^{2+} 溶液中NA收缩血管作用的影响:在无 Ca^{2+} 的Krebs液中,青蒿素能以浓度依赖性方式明显抑制10 $\mu\text{mol/L}$ NA引起的血管收缩,去内皮组与内皮完整组比较,差异不显著($P > 0.05$);实验组与对照组比较,差异显著($P < 0.05$ 、 0.01) (表1)。

2.4 青蒿素对未经任何预处理的血管环的影响:小剂量的青蒿素对未经任何预处理的血管环影响不明显,当浓度达到1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,血管环张力由静息时的2 g降为1.83 g,表明血管环出现扩张。

3 讨论

每组实验后,均用Krebs液反复冲洗,冲洗后,血管张力明显恢复可达到加药前的80%以上,这说明血管张力的变化是药物作用的结果,而不是由于时间延长及其他因素影响的结果。

Ca^{2+} 是兴奋-收缩耦联因子,血管平滑肌细胞内游离钙浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)的变化,显然将显著改变血管的张力。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高主要源于细胞外钙内流和细胞内钙库贮钙的释放。NA可通过开放受体操纵性钙通道(ROC)促使细胞外钙内流,同时通过 α_1 受体激活G蛋白与磷脂酶C,使三磷酸肌醇(IP_3)生成增加,继而引起内质网 Ca^{2+} 释放增加,进而导致

表1 青蒿素对NA收缩血管作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 1 Effect of artemisinin on vascular contraction induced by NA ($\bar{x} \pm s, n=8$)

处理	终浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	含钙内皮完整		含钙去内皮		无钙内皮完整		无钙去内皮	
		血管张力/g	收缩百分比/%	血管张力/g	收缩百分比/%	血管张力/g	收缩百分比/%	血管张力/g	收缩百分比/%
静息	—	2.00±0.02	0.00±0.88	2.00±0.01	0.00±0.46	2.00±0.02	0.00±0.91	2.00±0.01	0.00±0.89
NA	10	2.34±0.03	100.00±0.93	2.32±0.02	100.00±0.90	2.23±0.03	100.00±0.86	2.21±0.02	100.00±0.79
青蒿素	0.1	2.27±0.01	77.79±10.33*	2.27±0.02	78.70±10.95*	2.19±0.02	84.67±9.64	2.18±0.02	85.80±8.96
	1	2.20±0.02	56.72±9.26**	2.20±0.01	56.72±9.26**	2.15±0.02	66.74±8.88*	2.14±0.01	66.74±8.88**
	10	2.15±0.01	41.20±9.25**	2.14±0.02	42.40±9.35**	2.11±0.01	49.02±7.32**	2.11±0.02	51.24±7.06**
	100	2.07±0.03	16.99±7.56**	2.06±0.01	18.99±6.89**	2.05±0.01	21.23±8.51**	2.04±0.02	25.27±8.26**
	1 000	2.01±0.02	-0.40±8.79**	2.01±0.03	1.75±8.64**	2.02±0.02	9.64±7.61**	2.02±0.01	11.11±7.32**
冲洗	—	2.29±0.02	85.32±9.36	2.26±0.01	82.06±8.54	2.19±0.03	80.98±9.13	2.17±0.02	79.78±8.78

与NA组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs NA group表2 青蒿素对KCl收缩血管作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 2 Effect of artemisinin on vascular contraction induced by KCl ($\bar{x} \pm s, n=8$)

处理	终浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	含钙内皮完整		含钙去内皮	
		血管张力/g	收缩百分比/%	血管张力/g	收缩百分比/%
静息	—	2.00±0.02	0.00±0.93	2.00±0.01	0.00±0.85
KCl	4.0×10^4	2.26±0.02	100.00±0.90	2.24±0.01	100.00±0.78
青蒿素	0.1	2.21±0.02	82.50±9.88	2.20±0.01	83.75±10.32
	1	2.17±0.01	67.50±10.21*	2.16±0.02	70.00±10.09*
	10	2.13±0.02	50.83±6.90**	2.13±0.02	50.83±6.90**
	100	2.06±0.02	23.33±10.47**	2.05±0.01	24.63±8.51**
	1 000	2.02±0.01	8.33±6.36**	2.02±0.02	9.64±6.99**
冲洗	—	2.22±0.01	84.56±8.28	2.19±0.01	82.96±7.98

与KCl组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs KCl group

平滑肌收缩^[4,5]。本实验观察到,在含 Ca^{2+} 的Krebs液中,青蒿素能够抑制NA所致的血管收缩,提示青蒿素的舒张血管机制可能是通过抑制ROC及内钙释放发挥作用的;无 Ca^{2+} 的Krebs液中,青蒿素也能够抑制NA所致的血管收缩,进一步证明,青蒿素对内钙释放有抑制作用。

高钾可使细胞膜静息电位负值变小,使电压依赖性钙通道(VDC)开放,外钙内流增加,导致平滑肌收缩^[4,5]。本实验结果显示,青蒿素对KCl预收缩的血管产生明显松弛作用,表明青蒿素可能抑制VDC的开放,从而显著降低 $[\text{Ca}^{2+}]$,导致血管舒张。

从本实验的结果,不难看出内皮完整组和去内皮组相比,差异不显著($P>0.05$),表明青蒿素的舒血管作用并非为内皮依赖性。提示青蒿素引起的舒血管作用,内皮释放的舒张因子不是决定因素,其舒张机制可能主要与血管平滑肌细胞相关。

本实验中,NA所致血管收缩作用,含钙组大于无钙组。这是由于含钙组的血管张力增加是内钙释放和外钙内流共同作用的结果,而无钙组的血管张力增加只是内钙释放一方面作用的结果。这与文献报道相符^[6]。

本实验结果显示,低浓度青蒿素对未经任何处理的血管环影响不明显,浓度达到1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,血管环出现了扩张,其机制尚待进一步探讨。

许多扩血管药通过增加细胞内腺苷酸环化酶(cAMP)或鸟苷酸环化酶(cGMP)水平,使依赖cAMP或cGMP的蛋白激酶对某些功能性蛋白或酶磷酸化,从而影响血管平滑肌细胞的功能^[6]。青蒿素是否为 α 受体或钙通道阻断剂,是否抑制钙与其受体蛋白的结合,尚待研究。笔者将采用膜片钳、激光共聚焦等技术,对青蒿素舒张血管的机制进行研究。

References:

- [1] Li W, Shi C R. Advance in artemisinin [J]. *China Pharm* (中国药房), 2003, 14(2): 118-119.
- [2] Li B X, Yang B F, Li Y R, *et al.* Mechanism of antiarrhythmic effect of artemisinin [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1999, 15(5): 449-452.
- [3] Chen Y F, Deng Y Z. Advance in antihypertensive medication [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2000, 14(3): 186-188.
- [4] Karaki H, Ozaki H, Horl M, *et al.* Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle [J]. *Pharm Rev*, 1997, 49(2): 157-230.
- [5] Glusa E, Graser T, Wagner S, *et al.* Mechanisms of relaxation of rat aorta in response to progesterone and synthetic progestins [J]. *Maturitas*, 1997, 28(2): 181-191.
- [6] Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues [J]. *Pharm Rev*, 1995, 47(3): 477-501.