

- [2] Zhang J L, Ni C S, Chen H, et al. Research of effect of Shu-Gan-Huo-Xue principle on estrogen receptor in mice skin [J]. *Tianjin Med J* (天津医药), 2006, 34(9): 631-635.
- [3] Sun L W, Zheng J R. Estrogen promotes production of anti-dsDNA antibody and immunoglobulin G in peripheral blood mononuclear cell of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Foreign Med Sci: Dermatol Venereol* (国外医学: 皮肤性病学分册), 1999, 25(6): 372-373.
- [4] Xu D Q, Zeng F Q, Wu Z H, et al. *Lupus Erythematosus* (红斑狼疮) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2003.
- [5] Liu X X, Zhou Y. Research advancement of pathogenesis of sexual hormone in systemic lupus erythematosus [J]. *Guangzhou Med J* (广州医药), 2004, 35(3): 2-6.
- [6] Roa R, Greenstein B D. Evidence for pleomorphism of estrogen receptor capacity and affinity systemic in liver and thymus of immature BALB/c and NZB×NZW F1 mice, a model of lupus erythematosus [J]. *Int J Immunopharmacol*, 2000, 22(11): 897-903.
- [7] Lee S H. Validity of a histochemical estrogen receptor assay. Supported by the observation of a cellular response to steroid manipulation [J]. *Histochem Cytochem*, 1984, 32(3): 305-310.
- [8] Fishman J, Martucci C. Biological properties of 16 alpha-hydroxyestrone; implications in estrogen physiology and pathophysiology [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1980, 51(3): 611-615.
- [9] Jones S K. The effects of hormonal and other stimuli on cell-surface Ro/SSA antigen expression by human keratinocytes *in vitro*: their possible role in the induction of cutaneous lupus lesions [J]. *Br J Dermatol*, 1992, 126(6): 554-560.
- [10] Shah N N, Faaland C A, Thomas T, et al. Estradiol analogues and polyamines alter the binding affinity of estrogen receptor (ER) with estrogen response element (ERE): Potential implications for estrogenic action in lupus [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, 36 (Suppl): S109-S112.
- [11] Feldman M. Steroid receptor antibodies in autoimmune disorders [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 145(3): 1342-1348.
- [12] Bian T Y, Ding S X, Liu S M, et al. *Dermatology by integration of Chinese and Western Medicine* (中西医结合皮肤病学) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1996.
- [13] Zhao Z Y, Yang X J, Lou J S. Effects of Chinese herbal medicine LCF-2 on serum cytokines in lupus model mice [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2004, 39(2): 112-114.

紫苏叶油对肢体缺血-再灌注大鼠离体结肠平滑肌细胞的作用

刘 蓉¹, 徐 芳², 唐 方¹

(1. 天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052; 2. 天津中新药业达仁堂制药厂, 天津 300193)

紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 是唇形科紫苏属药用植物, 性温、味辛。紫苏叶具有发散风寒、行气和胃之功效。紫苏叶含挥发油, 主要成分为紫苏醛、黄酮以及金属元素。紫苏叶在临床上应用广泛, 其药理作用的研究也较丰富。有关其促进胃肠运动的作用虽有报道^[1], 但鲜有系统研究, 而基于胃肠动力障碍模型的研究尚未见报道。本研究拟在通过建立肢体缺血-再灌注引发大鼠胃肠动力障碍模型, 制备离体单个结肠平滑肌细胞, 观察紫苏叶油对模型大鼠结肠平滑肌细胞收缩的影响, 并通过钙螯合剂 EGTA 和钙离子通道阻断剂维拉帕米从细胞水平探讨其作用机制。

1 材料

- 1.1 药品: 紫苏叶油, 由天津达仁堂制药厂提供。
- 1.2 实验动物: 清洁级 Wistar 大鼠, 雌雄各半; 体重 (120±20) g, 购自北京大学医学部实验动物部, 许可证号: SCXK (京) 2002-0001。
- 1.3 试剂: I 型胶原酶, 美国 Invitrogen 公司;

Hank's 液、PBS, 北京鼎国生物技术有限公司; 台盼蓝、50% 戊二醛, 天津精细化工厂; 10% 水合氯醛溶液, 购自天津医科大学总医院制剂室。EGTA 为 Sigma 公司产品; 维拉帕米, 上海禾丰制药有限公司。

1.4 仪器: Nikon 102 光学显微镜, 日本; 5810R 型 Eppendorf 低温高速离心机, 德国; Olympus 倒置相差显微镜, 日本; Olympus-Vsp-3 显微照相系统, 日本; Cmias 2000 图像分析系统, 北京。

2 方法

2.1 肢体缺血-再灌注大鼠模型制备: 采用改良 Yassin 法^[2,3]。实验动物于造模前 24 h 禁食, 饮水不限。以 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) ip 行术前麻醉。结扎实验大鼠双侧大腿根部, 持续 3 h, 造成双侧下肢缺血。迅速解除结扎, 肢体再灌注 12 h, 模型制备完成。

2.2 离体单个结肠平滑肌细胞的制备: 模型大鼠脱颈椎处死, 迅速取出近端结肠 5 cm (回盲部 2 cm 以下部位) 并置于 4 ℃ 生理盐水中, 沿肠系膜对侧

将其剪开,去除黏膜与浆膜,将肌组织细切至 1~2 mm³块状,置于 10 mL 含 0.1% II 型胶原酶的消化液中,30 ℃、10 min,弃去消化液。PBS 冲洗 3 次,以适量 PBS 悬浮组织,吸管反复轻轻吹打,50 目筛网过滤,收集游离单个平滑肌细胞。台盼蓝染色确定细胞活力 > 90%,调整每检体细胞悬液细胞浓度为 5×10⁵/mL,供实验使用。

2.3 药物配制:以二甲基亚砜为溶媒,将紫苏叶油分别稀释至 10、5、2.5、1.25、0.625 mg/mL 5 个质量浓度的原液。

2.4 实验用药添加方法

2.4.1 紫苏叶油添加方法:将不同质量浓度紫苏叶油原液分别稀释至 500、250、125、62.5、31.25 μg/mL 终质量浓度组。分别于 250 μL 胃肠动力障碍模型大鼠离体结肠平滑肌细胞悬液中,加入 5 种质量浓度紫苏叶油各 12.5 μL,对照组加入等量 PBS,作用 1 min,以 2.5% 戊二醛固定,终止反应。

2.4.2 工具药添加方法:将 2 mmol/L EGTA 或 40 μmol/L 维拉帕米各 10 μL,分别加入 250 μL 模型大鼠结肠平滑肌细胞悬液中,反应 10 min,加入质量浓度 250 μg/mL 紫苏叶油 12.5 μL,作用 1 min 依常规固定。

2.5 结肠平滑肌细胞收缩量测定方法:于 20 倍倒置光学显微镜下,各浓度组每检体随机观测 30 个细胞,每组 10 例。应用图像分析系统计算其平均长度。细胞收缩反应的变化以细胞收缩率表示。

细胞收缩率=(对照组细胞平均长度-给药组细胞平均长度)/对照组细胞平均长度×100%

2.6 统计处理:采用 SPSS 11.5 统计软件,各组实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数比较用双侧 *t* 检验,多组样本均数比较用方差分析。

3 结果

3.1 模型大鼠游离结肠平滑肌细胞的变化:倒置相差显微镜下,正常大鼠平滑肌细胞呈梭形,细胞的长度 (21.62~113.82) μm [平均 (51.58±4.22) μm, *n*=10]。与之相比,模型大鼠结肠平滑肌细胞结构虽完整,但多呈长杆状,细胞长度 (23.46~118.21) μm [平均 (57.89±7.44) μm, *n*=10]。与正常组比较,模型大鼠结肠平滑肌细胞呈明显舒张,细胞平均长度显著增加 (*P*<0.05)。

3.2 紫苏叶油对模型大鼠结肠平滑肌细胞收缩的影响:不同质量浓度紫苏叶油对模型大鼠结肠平滑肌细胞收缩影响的比较结果显示,31.25~250 μg/mL 4 个紫苏叶油组,细胞收缩率具有显著性差异

(*P*<0.01),且随质量浓度的增加,细胞收缩率增加,呈明显剂量依赖关系 (*r*=0.745, *P*<0.01),250 μg/mL 组细胞收缩达高峰 (*P*<0.01)。当质量浓度为 500 μg/mL,细胞收缩变化呈显著下降 (*P*<0.01)。图 1。

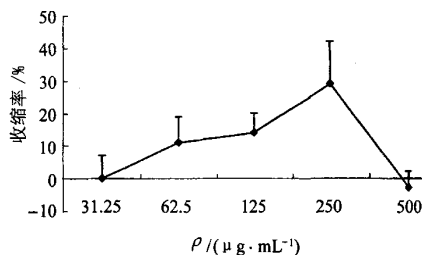


图 1 不同质量浓度紫苏叶油对模型大鼠结肠平滑肌细胞收缩率比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Comparison on contraction rate of model colonic smooth muscle cells among different concentration *P. frutescens* leaf oil ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.3 EGTA 和维拉帕米对紫苏叶油效应的影响:钙整合剂 EGTA 与 PBS 中 Ca²⁺结合,紫苏叶油对模型大鼠结肠平滑肌细胞的收缩率显著下降 (*P*<0.01),为紫苏叶油收缩效应 79%。钙通道阻断剂维拉帕米则可完全阻断紫苏叶油对细胞的收缩作用 (*P*<0.01),其抑制效应为 100% (见表 1)。

表 1 不同药物对模型大鼠结肠平滑肌细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of different drugs on model colonic smooth muscle cells ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	收缩率/%
模型+紫苏叶油	0.29±0.13
模型+EGTA+紫苏叶油	0.06±0.05**
模型+维拉帕米+紫苏叶油	-0.002±0.08**

与模型+紫苏叶油组比较: ***P*<0.01

***P*<0.01 vs model+*P. frutescens* leaf oil group

4 讨论

肢体缺血-再灌注大鼠是近年来国内外进行肠黏膜形态与功能研究的常用模型。前期实验显示:肢体缺血-再灌注大鼠,血清 NO、TNF 显著升高^[3,4],胃平滑肌张力和节律均有不同程度下降,胃平滑肌细胞平均长度明显增加,胃肠发生显著的运动功能障碍。证实,缺血-再灌注引发大鼠结肠平滑肌细胞舒张,平均长度明显增加 (*P*<0.05)。该模型作为结肠动力障碍模型具有可行性及可重复性。

紫苏气味芳香,长于理气和胃,广泛运用于经典中成药及临床方剂中。Koezuka^[1]报道,紫苏叶提取物紫苏酮可明显促进小鼠肠推进力。提示紫苏促肠

推进作用可能与肠动力相关。为此在探讨紫苏叶油对胃肠动力障碍模型大鼠结肠肌张力影响的基础上,为避免神经、体液因素的干扰,本实验采用离体单个平滑肌细胞分离技术,观察了紫苏叶油对结肠平滑肌细胞收缩活动的直接作用。结果表明,31.25~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 紫苏叶油可促进结肠平滑肌细胞收缩,其效应呈剂量依赖关系,最大效应质量浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。当紫苏叶油质量浓度大于 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对细胞收缩作用反呈下降趋势,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对细胞收缩作用明显低于 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.01$)。提示,药物对细胞的作用效应存在一个适宜浓度范围,不及或超越这个范围不但不能达到预期的疗效,甚至适得其反。

研究证实,钙离子在介导平滑肌收缩反应中起核心作用^[5]。平滑肌细胞收缩时,细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高源于细胞外钙内流和细胞内钙库的释放。细胞外的 Ca^{2+} 可通过质膜离子通道进入细胞内,主要包括电压门控钙通道和配体门控钙通道,前者是胞外 Ca^{2+} 内流的主要通道^[6]。本实验选用钙螯合剂 EGTA 螯合细胞外缓冲液中的 Ca^{2+} ,观察其对紫苏叶油刺激结肠平滑肌细胞收缩的影响,结果紫苏叶油对细胞收缩效应明显降低 ($P < 0.01$)。进一步观

察了 L 型 Ca^{2+} 通道阻断剂维拉帕米的影响,紫苏叶油收缩作用完全被抑制 ($P < 0.01$)。且 EGTA 和维拉帕米对紫苏叶油刺激细胞收缩效应影响无差异 ($P > 0.05$)。提示,紫苏叶油通过促进细胞外 Ca^{2+} 内流介导结肠平滑肌细胞的收缩,且主要经 L 型 Ca^{2+} 通道实现。紫苏叶油对结肠平滑肌细胞收缩作用是否与胞内钙库 Ca^{2+} 释放有关,有待于进一步研究。

References:

- [1] Koezuka Y, Honda G, Tabata M. An intestinal propulsion promoting substance from *Perilla frutescens* and its mechanism of action [J]. *Planta Med*, 1985 (6): 480.
- [2] Yassin M M I, Barros D' S A, Parks T G, et al. Lower limb ischemia-reperfusion injury alters gastrointestinal structure and function [J]. *Br J Surg*, 1997, 84: 1425-1429.
- [3] Xie Y C, Tang F. Experimental study on protecting intestinal barrier function of Huoxiang Zhengqi Soft Capsule [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(3): 252-254.
- [4] Xie Y C, Tang F. Experimental study on protecting intestinal barrier function of Huoxiang Zhengqi Soft Capsule [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(5): 456-458.
- [5] Boyer J C, Magous R, Christen M O, et al. Contraction of human colonic circular smooth muscle cells is inhibited by the calcium channel blocker pinaverium bromide [J]. *Cell Calci*, 2001, 29(6): 429-438.
- [6] Nelson M T, Quayle, J M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268: c799-c822.

金丝桃苷等 10 个天然黄酮类化合物的抗抑郁活性筛选研究

王卫星,胡新颖,刘 鹏,郭洪祝*,果德安

(北京大学药学院 生药生物技术研究室,北京 100083)

抑郁症是一种以显著而持久的心境低落为主要特征的综合症,已经成为危害现代人类健康的重要疾病之一,据世界卫生组织预测,到 2020 年抑郁症将成为仅次于心脏病的第二大疾病^[1]。目前抑郁症主要采用化学药物治疗,存在疗效较低,不良反应较大的弊端。因此,国内外在抗抑郁药物的研制与开发方面逐渐重视传统药物和天然药物^[2]。天然黄酮类化合物广泛存在于药用植物、水果和蔬菜中,现代药理研究表明,其在心血管系统、内分泌系统和抗肿瘤方面具有明显的药理作用^[3]。近年来,黄酮类化合物的抗抑郁作用陆续有了研究报道^[4,5],其中对抗抑郁

植物药贯叶金丝桃的研究发现,黄酮类化合物在其抗抑郁有效成分中发挥着重要的作用^[4]。这些研究结果提示黄酮类化合物可能是一类安全有效的抗抑郁先导化合物,但是目前关于黄酮类化合物的抗抑郁作用仅见零散报道,其结构与活性之间的联系未见研究。鉴于此,本实验拟通过研究常见黄酮类化合物的抗抑郁活性,来阐述可能存在的构效关系。通过利用经典抗抑郁模型——小鼠强迫游泳实验和小鼠悬尾实验对所选择的 10 个典型天然黄酮类化合物的抗抑郁活性作了初步的筛选。

1 实验材料

收稿日期:2006-10-21

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7062039)

作者简介:王卫星(1980—),男,江苏吴江人,北京大学药学院硕士研究生。E-mail: wangwx@bjmu.edu.cn

* 通讯作者 郭洪祝 Tel/Fax: (010) 82802024 E-mail: guohz@bjmu.edu.cn

紫苏叶油对肢体缺血-再灌注大鼠离体结肠平滑肌细胞的作用

作者: 刘蓉, 徐芳, 唐方

作者单位: 刘蓉,唐方(天津医科大学总医院,中医科,天津,300052), 徐芳(天津中新药业达仁堂制药厂,天津,300193)

刊名: 中草药 ISTIC PKU

英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS

年,卷(期): 2007,38(6)

被引用次数: 1次

参考文献(6条)

1. Koezuka Y, Honda G, Tabata M An intestinal propulsion promoting substance from Perilla frutescens and its mechanism of action 1985(06)
2. Yassin M M I, Barros D' S A, Parks T G Lower limb ischemia-reperfusion injury alters gastrointestinal structure and function 1997
3. Xie Y C, Tang F Experimental study on protecting intestinal barrier function of Huoxiang Zhengqi Soft Capsule[期刊论文]-中草药 2003(03)
4. Xie Y C, Tang F Experimental study on protecting intestinal barrier function of Huoxiang Zhengqi Soft Capsule[期刊论文]-中国中药杂志 2004(05)
5. Boyer J C, Magous R, Christen M O Contraction of human colonic circular smooth muscle cells is inhibited by the calcium channel blocker pinaverium bromide[外文期刊] 2001(06)
6. Nelson M T, Quayle J M Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle 1995

本文读者也读过(9条)

1. 徐在品, 谭健民, 陈春华, 霍欣, 邓小燕, 张迪, 简秀华 紫苏叶提取物对家兔脂肪肝的影响[期刊论文]-黑龙江畜牧兽医2009(5)
2. 吕美云, 刘临, LV Mei-Yun, Liu Lin 原子吸收光谱法测定紫苏叶中微量元素[期刊论文]-微量元素与健康研究 2008, 25(6)
3. 谭健民, 陈春华, 徐在品, 霍欣, 邓小燕, 张迪, 简秀华 紫苏叶提取物对高脂血症家兔血脂及脂质过氧化的影响[期刊论文]-安徽农业科学2008, 36(18)
4. 陈春华, 谭健民, 徐在品, 陈超, 霍欣, 邓小燕, 张迪, 简秀华, CHEN Juan-hua, TAN Jian-min, XU Zai-pin, CHEN Chao, HUO Xin, DENG Xiao-yan, ZHANG Di, JIAN Xiu-hua 紫苏叶提取物抗家兔动脉粥样硬化的实验研究[期刊论文]-时珍国医国药2008, 19(11)
5. 俞清翔, 陈荣, 王邦茂, 唐方, 方维丽, 常毅湘, YU Qingxiang, CHEN Mo, WANG Bangmao, TANG Fang, FANG Weili, CHANG Yixiang 胃间质瘤患者胃电活动的初步研究[期刊论文]-天津医药2010, 38(1)
6. 李平 应用多层螺旋CT 血管成像观测曲泽穴与肱动脉的位置关系[期刊论文]-亚太传统医药2009, 5(1)
7. 黄丽, 韦保耀, 滕建文, HUANG Li, WEI Bao-yao, TENG Jian-wen 紫苏叶抗过敏有效成分的研究[期刊论文]-食品科技2005(5)
8. 李丹 唐方教授运用柴胡枳桔汤验案举隅[期刊论文]-江苏中医药2009, 41(4)
9. 谭健民, 陈春华, 徐在品, 霍欣, 邓小燕, 张迪, 简秀华, TAN Jian-min, CHEN Juan-hua, XU Zai-pin, HUO Xin, DENG Xiao-yan, ZHANG Di, JIAN Xiu-hua 紫苏叶提取物对高脂血症家兔血脂及脂质过氧化的影响[期刊论文]-农业科学与技术(英文版)2008, 9(1)

引证文献(1条)

1. [苏洁](#), [陈素红](#), [吕圭源](#) [紫苏归肺、脾经相关药理研究进展](#)[期刊论文]-[安徽医药](#) 2010(6)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200706042.aspx