

率^[10]。红景天口服液对大鼠高原性肺水肿有预防作用^[11],红景天有效成分红景天苷可抑制缺氧状态下鼠肺动脉平滑肌细胞的增殖和DNA合成,从而降低肺循环阻力,起到保护肺的作用^[12]。尽管红景天对各种原因引起的肺损伤可能具有一定的保护作用,但其作用机制尚未清楚。目前,口服红景天制剂用于临床,在用药周期和剂量上受到诸多因素的限制。

红景天注射液属七类中药新药^[13],具有活血化瘀,改善心肌缺血,保护受损心肌的功效,对冠心病心绞痛病人有确切的疗效。有研究提示,红景天有效成分能够提高体内谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶的活性,减少组织中羟自由基的量,对组织蛋白质和细胞膜起到保护作用^[14,15],而氧化应激是油酸诱导急性肺损伤的重要发病机制之一。本次研究结果显示,在注入油酸15 min之前给予红景天注射液,有效抑制油酸引起的 $p(O_2)$ 的降低、减轻肺水肿、降低肺毛细血管膜通透性和肺病理损伤程度,提高肺组织中SOD活性、降低MDA量。综上所述,红景天注射液预先给药,可有效减轻油酸诱导的家兔ALI,可能通过清除和防止自由基的形成,进一步降低肺泡毛细血管膜通透性而达到保护作用。

参考文献:

- [1] Crimi E, Sica V, Slutsky A S, et al. Role of oxidative stress in experimental sepsis and multisystem organ dysfunction [J]. *Free Radic Res*, 2006, 40(7): 665-672.
- [2] Mattioli L, Perfumi M. *Rhodiola rosea* L. extract reduces stress-and CRF-induced anorexia in rats [J]. *J Psychophar-*

- macol*, 2007, 21(7): 742-750.
- [3] Battistelli M, De Sanctis R, De Bellis R, et al. *Rhodiola rosea* as antioxidant in red blood cells: ultrastructural and hemolytic behaviour [J]. *Eur J Histochem*, 2005, 49(3): 243-254.
- [4] Goel H C, Bala M, Prasad J, et al. Radioprotection by *Rhodiola imbricata* in mice against whole-body lethal irradiation [J]. *J Med Food*, 2006, 9(2): 154-160.
- [5] Narimanian M, Badalyan M, Panosyan V, et al. Impact of Chisan (ADAPT-232) on the quality-of-life and its efficacy as an adjuvant in the treatment of acute non-specific pneumonia [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(10): 723-729.
- [6] 储戟农, 张早华, 刘建勋, 等. 红景天注射液对动物血小板聚集、体外血栓形成及血液粘度的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(5): 39-41.
- [7] 储戟农, 张早华, 刘建勋, 等. 红景天注射液对大鼠心肌缺血再灌注所致心肌梗塞的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(5): 56-57.
- [8] McGuigan R M, Mullenix P, Norlund L L, et al. Acute lung injury using oleic acid in the laboratory rat: establishment of a working model and evidence against free radicals in the acute phase [J]. *Curr Surg*, 2003, 60(4): 412-417.
- [9] Schuster D P. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 149(1): 245-260.
- [10] 徐克勤, 张世范, 李庆新. 红景天在重症肺动脉高压体外循环肺损伤的防治作用 [J]. 中国综合临床, 2003, 19(10): 925-926.
- [11] 李巧云. 红景天口服液对大鼠高原性肺水肿的实验研究 [J]. 中华现代中西医杂志, 2003, 1(11): 965-966.
- [12] 赵贺玲, 林树新, 李 剑. 红景天苷对缺氧状态下鼠肺动脉平滑肌细胞增殖和 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 [J]. 解放军预防医学杂志, 2004, 22(4): 259-262.
- [13] 范军铭, 王守富, 庆 慧, et al. 红景天注射液治疗冠心病心绞痛(心瘀阻证) 233例的随机、双盲、阳性对照、多中心临床研究 [J]. 中医研究, 2005, 18(10): 26-28.
- [14] Kim S H, Hyun S H, Choung S Y. Antioxidative effects of *Cinnamomi cassiae* and *Rhodiola rosea* extracts in liver of diabetic mice [J]. *Biofactors*, 2006, 26(3): 209-219.
- [15] 朱 俐, 石仲璇, 吴小梅, 等. 红景天黄芪合剂预防大鼠模拟高原缺氧脑损伤的作用 [J]. 航天医学与医学工程, 2005, 18(4): 303-305.

锦灯笼水提物对大鼠胸主动脉的舒张作用及机制

刘晓丹, 潘振伟, 庄须国, 李国玉, 牛慧莉, 吕延杰*, 杨宝峰

(哈尔滨医科大学药学院 药理教研室, 省部共建生物医药国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:目的 观察锦灯笼水提物对大鼠离体胸主动脉环的舒血管作用并探讨其作用机制。方法 采用大鼠胸主动脉环张力测定法。结果 在内皮完整及去内皮血管上, 锦灯笼水提物均浓度(0.5~64 g/L)依赖性降低苯肾上腺素(1.0×10^{-5} mol/L)及氯化钾(6.0×10^{-2} mol/L)预收缩血管的张力; 一氧化氮合酶抑制剂L-NAME对锦灯笼水提物的舒血管作用无明显影响($P > 0.05$); 钾通道阻断剂TEA、4-氨基吡啶(4-AP)、格列苯脲对锦灯笼水提物的舒血管作用无明显影响($P > 0.05$); 但在无钙环境下, 锦灯笼水提物对苯肾上腺素预收缩血管的舒张作用明显减弱, 与有钙液相比, 差异显著($P < 0.01$)。此外, 锦灯笼水提物对PDBu预收缩的血管有明显的舒张作用($P < 0.01$)。结论 锦灯笼水提物的舒张血管作用表现为非内皮依赖性, 其舒张作用可能有与其抑制外钙内流, 以及抑制PKC信号传导通路有关。

关键词: 锦灯笼水提物; 胸主动脉环; 舒张; 外钙内流

中图分类号: R284.2; R285.5; R965.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)11-1709-04

收稿日期: 2008-04-03

基金项目: 黑龙江省青年科学基金(QC07C69); 黑龙江省科学技术攻关重点项目(2006G2215-00)

作者简介: 刘晓丹(1981—), 女, 黑龙江省七台河市人, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学。Tel: (0451) 86671354

E-mail: lxdpopo@sina.com

*通讯作者 吕延杰 Tel: (0451) 86671354 Fax: (0451) 86699644 E-mail: cwf76928@163.com

锦灯笼为茄科植物酸浆 *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino 的干燥宿萼或带果实的宿萼。其气微,宿萼味苦,果实味甘、微酸;生长于路旁及田野草丛中,全国大部分地区均有分布^[1]。本品具有清热解毒、利咽、化痰、利尿作用^[2],用于咽痛音哑,痰热咳嗽,小便不利;外治天疱疮,湿疹。虽然锦灯笼的临床应用广泛,但目前未见其舒血管作用机制的报道。本研究利用离体大鼠胸主动脉环模型,观察锦灯笼水提物的舒张血管作用及相关机制。

1 材料

1.1 动物:Wistar 大鼠,雌雄兼用,体质量 250~300 g,由哈尔滨医科大学实验动物中心提供。

1.2 药品:锦灯笼水提物 (aqueous extract of *Calyx seu Fructus Physalis*, AECFP),将锦灯笼用 85% 乙醇回流提取,得到的粗提液进行减压浓缩,得粗浸膏,加适量蒸馏水,使其成为水混悬浊液,用等体积的石油醚萃取 3 次,将石油醚层弃去,水层通过 D101 大孔树脂柱,用水洗脱得水部分,用 95% 乙醇洗脱得醇部分,将醇部弃去,实验中使用的为锦灯笼水提取物 (含生药量 5 g/mL)。

1.3 试剂:左旋硝基精氨酸甲酯 (*N*^ω-nitro-*L*-arginine-methyl-ester, *L*-NAME), 4-氨基吡啶 (4-aminopyrimidine, 4-AP), tetrathylammonium (TEA), 苯肾上腺素 (phenylephrine, PE), 卡巴胆碱 (Carbacholine, CCH), 格列苯脲 (glybenclamide), 12, 13-二丁基佛波酯 (phorbol 12, 13-dibutyrate, PDBu) 及 EGTA 为 Sigma 公司产品,其他试剂为国产分析纯。

1.4 仪器:HV-4 血管环灌流系统 (成都泰盟科技有限公司)、BL-420 生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司)、JH-2 肌张力换能器 (北京航天医学工程研究所)。

2 方法

2.1 血管环的制备^[3]:将 Wistar 大鼠用 10% 的水合氯醛麻醉后,迅速取出胸主动脉,置于预先冷冻 (4 ℃) 的 Krebs-Henseleit (K-H) (NaCl 118 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, NaHCO₃ 25.0 mmol/L, Glucose 11.1 mmol/L, pH 7.20~7.40) 中,持续通混合气体 (95% O₂ 和 5% CO₂)。去除血管壁周围的结缔组织,将血管剪成 3~4 mm 的血管环。将血管环移至盛有 10 mL K-H 液,恒温 37 ℃,持续通混合气体的浴槽中,用两支 L

钩穿过血管环,一支固定在浴槽内的挂钩上,另一支与肌力传感器相连,用 BL-420E 生物机能系统记录血管环的张力。实验前,血管环预先给基础张力 0.5 g,平衡 40 min,然后将张力调节至 1.5 g,再平衡 40 min,在平衡期间不断调整张力,使之维持 1.5 g,并每隔 20 min 更换营养液一次^[4]。在制备破坏内皮的血管环时,先用表面粗糙的棉棒插入主动脉内,轻轻地向同一方向旋转数圈,再将血管剪成血管环。以 CCH (4.5 μmol/L) 检查血管内皮是否完整。

2.2 锦灯笼水提物对血管的舒张作用:取内皮完整 (Endo+)、去内皮 (Endo-) 和用一氧化氮合酶抑制剂 *L*-NAME 孵育的血管环,加 PE 或 KCl 使终浓度分别为 1.0×10^{-5} 和 0.06 mol/L,达收缩平台后,采用累计加药法加入锦灯笼水提物,PE 预收缩时锦灯笼水提物的累计加药浓度为 2~64 g/L, KCl 预收缩时锦灯笼水提物的累计加药浓度为 0.5~64 g/L。加药间隔为 15 min,记录血管张力变化曲线。

2.3 K⁺通道阻断剂对锦灯笼水提物舒血管作用的影响:按需要取有或无内皮血管,分别与 *L*-NAME (3.0×10^{-3} mol/L)、4-AP (0.5 mol/L)、TEA (1 mol/L)、glybenclamide (1.0×10^{-3} mol/L) 于 37 ℃ 孵育 10 min,按上法测定锦灯笼水提物对 PE 预收缩血管张力的影响,然后对加入阻断剂与未加阻断剂的血管环收缩率进行比较,记录两种情况下血管张力的变化曲线。

2.4 钙离子对锦灯笼水提物舒血管作用的影响:去内皮血管用无钙液孵育 30 min,每隔 10 min 换无钙液一次,加 PE 使浓度为 1.0×10^{-5} mol/L,达到收缩平台后,一次性加入 32 g/L 锦灯笼水提物,观察在无钙环境下锦灯笼水提物对 PE 收缩血管张力的影响,并与有钙液组 (K-H 液) 进行比较。

2.5 锦灯笼水提物对 PDBu 缩血管作用的影响:去内皮血管加入蛋白激酶 C 激动剂 PDBu (1.0×10^{-4} mol/L),达到收缩平台后,加入 32 g/L 锦灯笼水提物,观察锦灯笼水提物对 PDBu 缩血管作用的影响。

2.6 数据处理:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student-t 检验和方差分析做统计学分析。

3 结果

3.1 锦灯笼水提物的舒血管作用:锦灯笼水提物可以显著舒张由 PE 引起的血管收缩,但在内皮完整、去内皮及加入一氧化氮合酶抑制剂 *L*-NAME 后,均不能减弱或阻断锦灯笼水提物对 PE 预收缩血管的舒张作用,但其舒张程度差异不显著 ($P > 0.05$)。

见图1。

锦灯笼水提物能够浓度依赖性地舒张由KCl引起的血管收缩,但在内皮完整、去内皮及加入L-NAME后的血管上差异不显著($P>0.05$)。见图2。

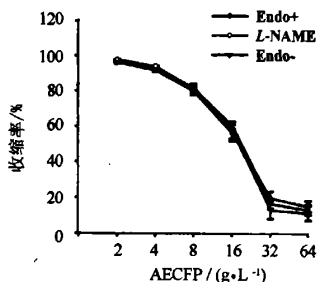


图1 锦灯笼水提物对PE预收缩血管的舒张作用($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 1 Relaxation of AECFP on PE-induced precontraction ($\bar{x}\pm s, n=10$)

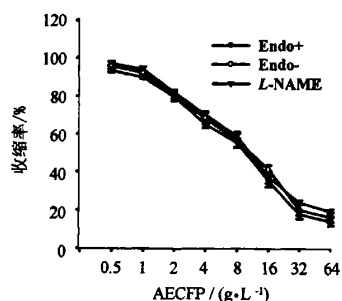


图2 锦灯笼水提物对KCl引起的血管收缩的舒张作用($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 2 Relaxation of AECFP on KCl-induced contraction ($\bar{x}\pm s, n=10$)

3.2 K^+ 通道抑制剂对锦灯笼水提物舒血管作用的影响:各种 K^+ 通道抑制剂对锦灯笼水提物舒张PE预收缩血管的影响见图3。由图可知, Ca^{2+} 激活的钾离子通道抑制剂TEA, K_{ATP} 非特异性抑制剂格列苯脲以及电压敏感型 K^+ 通道抑制剂4-AP,对锦灯笼水提物引起的PE预收缩血管的舒张作用无明显影响($P>0.05$)。

3.3 钙离子对锦灯笼水提物的舒血管作用的影响:无钙环境中,当PE预收缩达到平台,加入32 g/L锦灯笼水提物,锦灯笼水提物的舒血管作用,与有钙液组相比差异有显著性($P<0.01$)。见图4。

3.4 PDBu对锦灯笼水提物舒血管作用的影响:锦灯笼水提物对PDBu预收缩血管的作用见图5。如图可知,在去内皮的血管中,加入PDBu后,血管显著收缩,达到平台后,加入32 g/L锦灯笼水提物,血管

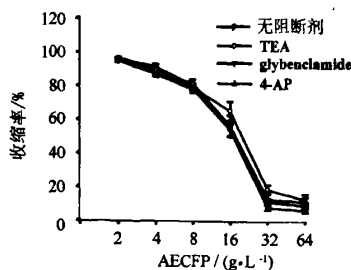
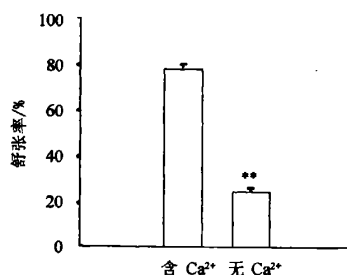


图3 TEA、4-AP、glybenclamide对锦灯笼水提物引起的去内皮血管的舒张作用($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 3 Effect of TEA, 4-AP, and glybenclamide on AECFP-induced relaxation in endothelium-denuded aortic rings ($\bar{x}\pm s, n=10$)

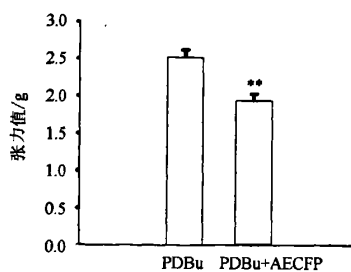


与有钙液组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs Ca^{2+} -containing group

图4 Ca^{2+} 对锦灯笼水提物舒血管作用的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 4 Effect of Ca^{2+} on AECFP-induced relaxation in endothelium-denuded aortic rings ($\bar{x}\pm s, n=10$)



与加入锦灯笼水提物前相比: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs group without adding of AECFP

图5 锦灯笼水提物对PDBu收缩血管张力值的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 5 Effect of AECFP on PDBu contraction of aortic rings ($\bar{x}\pm s, n=10$)

呈现明显的舒张作用,与加入锦灯笼水提物前相比,差异显著($P<0.01$)。

4 讨论

本研究显示,锦灯笼水提物可以浓度依赖性地

舒张 PE 及 KCl 引起的血管收缩,且在內皮完整及去內皮血管上差异不显著。在內皮完整血管上,一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 不能削弱锦灯笼水提物对 PE 和 KCl 预收缩血管的舒张作用。上述结果提示,锦灯笼水提物的舒血管作用不依赖于血管內皮,而是直接作用于血管平滑肌上。

K⁺通道在调节血管平滑肌收缩及血管张力中具有重要作用。激活血管平滑肌上的 K⁺通道,往往引起细胞膜超极化,从而抑制细胞外钙內流,引起血管舒张^[5]。血管平滑肌上主要存在 4 种 K⁺通道:ATP 敏感 K⁺通道 (K_{ATP}),Ca²⁺激活的 K⁺通道 (K_{Ca}),电压敏感型 K⁺通道 (K_v)及內向整流型 K⁺通道 (K_{IR}),glybenclami 为 K_{ATP}非特异性抑制剂,TEA 和 4-AP 分别是 K_{Ca}和 K_v抑制剂^[6]。本研究显示,TEA、4-AP 和 glybenclamide 对锦灯笼水提物的血管舒张作用无明显影响,提示锦灯笼水提物的血管舒张作用与 K⁺通道无关。

PE 诱导的血管收缩是由 α₁-肾上腺素受体的激活造成的,主要是通过激活磷脂酶 C,产生甘油二酯 (diglyceride, DG) 和三磷酸肌醇 (1, 4, 5-inositol triphosphate, IP₃),DG 可以激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC),使血管平滑肌细胞 (VSMC) 內钙调蛋白等细肌丝磷酸化、肌球蛋白 ATP 酶激活、细胞內 [Ca²⁺]_i上升,导致肌球蛋白牵动肌动蛋白引起平滑肌的收缩^[7]。而 IP₃ 则可以诱导肌浆网內的钙离子释放^[8~10]。因此 PE 是通过胞內肌浆网中 Ca²⁺释放及胞外 Ca²⁺內流而引发血管收缩的。在本实验中,锦灯笼水提物抑制 PE 引起的血管收缩,说明其作用可能是抑制肌浆网中 Ca²⁺释放或抑制外钙內流。由于用无钙液孵育,细胞外液无 Ca²⁺存在,PE 只能通过胞內 Ca²⁺释放而实现收缩。而锦灯笼水提物使 PE 收缩血管作用明显减弱,提示锦灯笼水提物的舒血管作用可能与抑制外钙內流有关。

Ca²⁺非依赖性机制或 Ca²⁺敏感化机制一般包括 3 条信号传导通路:PKC、Rho 激酶和 p44/42 丝

裂原活化蛋白激酶 (p44/42 MAPK) 传导通路。血管活性物质与平滑肌细胞膜结合后除升高 [Ca²⁺]_i外,还激活 PKC、Rho 激酶和 p44/42 MAPK。前两者最终抑制肌球蛋白轻链磷酸酶 (MLCPh),减少磷酸化的肌球蛋白轻链的脱磷酸化,从而增加磷酸化的肌球蛋白轻链的量,这种调节机制增加血管平滑肌收缩,同时并不增加 [Ca²⁺]_i,所以被称为 Ca²⁺非依赖性机制或 Ca²⁺敏感化机制。在实验中,锦灯笼水提物使 PKC 激动剂 PDBu 预收缩的血管舒张,说明锦灯笼水提物抑制 PKC 信号传导途径,从而实现对血管的舒张作用。

本研究表明,锦灯笼水提物对大鼠胸主动脉产生非內皮依赖性的血管舒张作用,其作用机制可能与抑制外钙內流及抑制 PKC 信号传导通路有关。锦灯笼水提物的血管舒张作用可能是其降血压作用的主要机制。其对离子通道作用的直接依据正在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 严仲凯,李万林. 中国长白山药用彩色图志 [M]. 北京:人民卫生出版社,1997.
- [2] 帕提古丽,马合木提,高莉中博,酸浆花萼色素的提取及理化性质研究. [J]. 食品科学,2004,25(9):35.
- [3] Zahid Ashraf M, Ejaz Hussain M, FAEhim M. Endothelium mediated vasorelaxant response of garlicin isolated rat aorta: role of nitric oxide [J]. *Ethnopharmacology*, 2004, 90: 5-9.
- [4] Kubota Y K, Tanaka N K, Umegaki K, et al. *Ginkgo biloba* extract-induced relaxation of rat aorta is associated with merease in endothelium intracellular calcium level [J]. *Life Sci*, 2001, 69(20): 2327.
- [5] Nelson M T, Quayle J M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268: C799.
- [6] Ferrer M, Mann J, Encabo A, et al. Role of K⁺ channels and sodium pump in the vasodilation induced by acetylcholine, nitric oxide, and cyclic GMP in the rabbit aorta [J]. *Gen Pharmacol*, 1999, 33(1): 35.
- [7] Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses [J]. *FAS EB*, 1995, 9(4): 484-491.
- [8] 高钰琪,孙秉庸. 血管平滑肌细胞的钙动力学 [J]. 生理科学进展,1990,21(4): 305-309.
- [9] 吴其夏,余应年,卢 建. 新编病理生理学 [M]. 北京:中国协和医科大学出版社,1999,136-142.
- [10] Putney J W. Receptor-regulated calcium entry [J]. *Pharmacol Ther*, 1990, 48(3): 427-434.

《中国新药杂志》2009 年征订启事

《中国新药杂志》是由国家食品药品监督管理局主管的国家级药学期刊,主要报道我国新药的临床前研究和临床试验的创新性研究成果,辟有全球新药快报、新药策略、综述、实验研究、制剂与质控、临床研究、新药申报与审评技术、新药述评、临床药师、年度新药点评等栏目。本刊为半月刊,每月 15 日和 30 日出版,国内定价:12 元/期,全年 288 元。邮发代号:82-488。

地址:北京市西城区北三环中路乙 6 号伦洋大厦 703 室 邮编:100120
电话:010-82282300 (编辑室) 010-82282303 (发行室) 传真:010-82282300-805
网址: <http://www.newdrug.cn> 电子信箱:xyz711@sohu.com, cndj@newdrug.cn