

钾通道 (Ca^{2+} -dependent K^+ channels, K_{Ca})、内向整流钾通道 (inward rectifier K^+ channels, K_{IR}) 和 ATP 敏感性钾通道 (ATP-sensitive K^+ channels, K_{ATP})^[8]。本实验中分别采用非选择性钾通道阻断剂 CsCl、 K^+ 特异性阻断剂 4-AP、 K_{Ca} 特异性阻断剂 TEA、 K_{IR} 特异性阻断剂 BaCl_2 以及 K_{ATP} 特异性阻断剂格列本脲作为工具药进行研究, 结果发现 CsCl、TEA、格列本脲和 BaCl_2 可显著减弱丹参素异丙酯的舒血管作用, 但 4-AP 对其作用无明显影响, 提示丹参素异丙酯的舒血管作用可能与 K_{Ca} 、 K_{IR} 和 K_{ATP} 有关。

目前已知, 几乎所有的血管平滑肌都分布有受体, 激动时可引起血管舒张。本实验采用非选择性受体阻断剂普萘洛尔、特异性 α_1 受体阻断剂美托洛尔、特异性 α_2 受体激动剂沙丁胺醇为工具药, 发现这 3 种药对丹参素异丙酯的舒张血管作用均无明显影响, 提示其舒血管机制可能与受体无关。但是由于绝大多数血管同时存在受体和受体, 而且大多数血管以受体占主导地位, 受体在肺部亦主要以 α_2 受体亚型分布于气道而发挥其生理功能, 在肺动脉分布较少; 本实验中上述药物对丹参素异丙酯舒血管作用无明显影响, 是否也是因为受体作用被受体所掩盖, 尚待进一步证实。

综上所述, 丹参素异丙酯对大鼠肺动脉具有显著的舒张作用, 该舒张作用具有一定内皮依赖性, 与

内皮细胞 NO、 PGI_2 途径相关; 此外, 该药还可通过调节血管平滑肌细胞钙通道和钾通道的活动, 引起血管舒张。

参考文献:

- [1] 郑晓晖, 王世祥, 赵新锋, 等. 复方丹参滴丸人含药血清中丹参相关代谢产物的分析 [J]. 第四军医大学学报, 2007 (5): 435-437.
- [2] Don M J, Shen C C, Syu W J, et al. Cytotoxic and aromatic constituents from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67: 497-503.
- [3] Lam F F, Yeung J H, Chan K M, et al. Relaxant effects of danshen aqueous extract and its constituent danshensu on rat coronary artery are mediated by inhibition of calcium channels [J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 46: 271-277.
- [4] Chan Y C, Yao X Q, Lau C W, et al. The relaxant effect of urocortin in rat pulmonary arteries [J]. *Regul Peptide*, 2004, 121: 11-18.
- [5] Mishre S K, Abbot S E, Choudhury Z, et al. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein [J]. *Cardiovascular Res*, 2000, 46: 539-546.
- [6] Vanhoutte P M. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history [J]. *Pharmacol Res*, 2004, 49: 503-508.
- [7] Mandegar M, Yuan J X. Role of K^+ channels in pulmonary hypertension [J]. *Vascul Pharmacol*, 2002, 38: 25-33.
- [8] Bonnet S, Archer S L. Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins: Implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 115: 56-69.

蛇床子素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

何蔚, 连其深, 刘建新

(赣南医学院药理学教研室, 江西赣州 341000)

摘要:目的 研究蛇床子素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法 利用大鼠大脑中动脉短暂阻塞 (MCAO) 造成局灶性脑缺血 (2 h) 再灌注 (24 h) 损伤模型, 缺血后 1 h 舌下 iv 给予蛇床子素 5、10 mg/kg, 再灌注 24 h, 检测大鼠神经功能行为缺陷评分、脑水肿和脑梗死范围, 测定脑组织中 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶的活性和髓过氧化物酶 (MPO) 的活性及用放免法测定脑组织中白细胞介素-8 (IL-8) 的量。结果 蛇床子素能改善大鼠脑缺血再灌注后神经功能行为缺陷评分, 减轻脑水肿和降低脑梗死范围, 增强 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性, 降低脑组织中 MPO 的活性和 IL-8 的量。结论 蛇床子素对脑缺血再灌注损伤有保护作用, 其机制可能与蛇床子素抑制大鼠脑缺血再灌注后炎症反应和减轻脑水肿有关。

关键词: 蛇床子素; 局灶性脑缺血再灌注; ATP 酶; 髓过氧化物酶 (MPO)

中图分类号: R286.10 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)01-0086-04

收稿日期: 2008-05-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30560172)

作者简介: 何蔚 (1968—), 男, 江西大余人, 博士, 教授, 主要研究方向为心脑血管药理学。

Tel: (0797) 8657601 E-mail: hewei8286291@yahoo.com.cn

Protective effects of osthole on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

HE Wei, LIAN Qi-shen, LIU Jian-xin

(Department of Pharmacology, Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China)

Abstract : Objective To investigate the protective effect of osthole on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Focal cerebral ischemia-reperfusion model in rat was made by transient occlusion of the middle cerebral artery for 2 h and followed by reperfusion for 24 h. Osthole 5 and 10 mg/kg were iv injected through sublingual vein at 1 h after the onset of ischemia, respectively. After 24 h of reperfusion, the influence of osthole on neurological behaviour deficit score, brain edema, and infarct size were evaluated. The activity of Na^+ , K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase, and myeloperoxidase (MPO) in the ischemic hemisphere cortex of the middle cerebral artery area was assayed by spectrophotometry. The level of IL-8 was detected with radioimmunoassay. **Results** Osthole significantly reduced the neurological behaviour deficit score, brain edema, and infarct size, enhanced the activity of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase, inhibited the activity of MPO, and decreased the level of IL-8 in the brain tissue. **Conclusion** The results suggest that osthole could attenuate the brain damage following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats and its mechanism may be partly related to the inhibition of inflammation and brain edema induced by ischemia-reperfusion.

Key words: osthole; focal cerebral ischemia-reperfusion; ATPase; myeloperoxidase (MPO)

蛇床子素 (osthole) 又名甲氧基欧芹酚或欧芹酚甲醚, 是伞形科蛇床属植物蛇床 *Cnidium monnier* (L.) Cusson 的果实中提取的一种香豆素, 具有抗炎、扩张血管、改善学习记忆、抗凝血、抑制血栓形成和血小板聚集的作用^[1-6]。本研究利用大鼠大脑中动脉短暂阻塞造成局灶性脑缺血 2 h 再灌注 24 h 模型, 观察蛇床子素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂: 蛇床子素由成都龙泉高科天然药业有限公司提供 (质量分数 > 96%), 实验前用 *N*-2 甲基甲酰胺溶解, 聚山梨酯-80 助溶后用生理盐水稀释至所需浓度; 溶剂对照液含 *N*-2 甲基甲酰胺-聚山梨酯-80-生理盐水 (1 : 1 : 8); 髓过氧化物酶 (MPO)、 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^+ , K^+ -ATP 酶试剂盒 (南京建成生物技术有限公司); 白细胞介素-8 (IL-8) 放免试剂盒 (北京东亚生物技术所); 其他试剂为市售分析纯。

1.2 实验动物: SD 大鼠, 雄性, 体质量 220 ~ 260 g, 由本校实验动物中心提供, 动物合格证号: JXA2005318。

1.3 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的制备: SD 大鼠, 用 10% 水合氯醛溶液 (350 mg/kg, ip) 麻醉, 参照 Longa 等^[7] 的方法制备大脑中动脉阻断 (MCAO) 模型, 将一尼龙线 (长 4 cm, 直径 0.23 mm) 经颈外动脉 (ECA) 主干切口缓慢向颈内动脉 (ICA) 入颅方向推进, 以颈总动脉 (CCA) 分叉处为标记, 推进 18 ~ 20 mm 感到轻微阻力时, 即达到

较细大脑前动脉 (ACA), 阻断大脑中动脉 (MCA) 的所有血液供应。2 h 后, 拨出尼龙线, 扎紧动脉残端, 缝合皮下组织和皮肤, 完成缺血再灌注损伤模型。假手术组大鼠只暴露和分离出 CCA、ECA 和 ICA, 不闭塞 MCA。术中严格控制室温在 23 ~ 25 。

1.4 实验分组与给药: 雄性 SD 大鼠 96 只, 分 4 批实验 (每批 24 只)。第 1 批用于大鼠神经功能行为缺陷评分和脑水肿检测, 第 2 批用于检测脑梗死范围, 第 3 批检测脑组织中 ATP 酶的活性和 IL-8 的水平, 剩余动物用于脑组织中 MPO 的活性测定。每批动物随机分为 4 组, 即假手术组、缺血再灌注模型组、蛇床子素 (5、10 mg/kg) 组, 每组均为 6 只大鼠。蛇床子素在 MCAO 后 1 h 舌下 iv 给予, 假手术组、模型组给予等体积的溶剂。

1.5 大鼠神经功能行为缺陷评分: 再灌注 24 h, 按 Longa 法^[7] 对动物的神经功能行为进行评分, 标准如下: 0 分, 未观察到神经功能缺陷症状; 1 分, 不能完全伸展手术对侧前爪 (轻度局灶性神经功能缺陷); 2 分, 向手术对侧转圈 (中度局灶性神经功能缺陷); 3 分, 向手术对侧倾倒 (重度神经功能缺陷); 4 分, 不能自发行走, 意识昏迷。

1.6 干湿质量法测定大鼠脑水肿: 神经功能行为缺陷评分后将大鼠断头处死, 取出全脑, 左右脑分开, 取缺血侧大脑, 去除小脑、低位脑干和嗅球, 立即称湿质量。然后将脑组织烘干 (105 °C, 24 h), 再称质量, 按干湿质量法^[8], 求出脑组织含水量。

$$\text{脑组织含水量} = \frac{\text{脑湿质量} - \text{脑干质量}}{\text{脑湿质量}} \times 100\%$$

1.7 脑梗死范围测定:再灌注 24 h,大鼠断头处死取出全脑,然后将右前脑沿冠状面切成厚度基本相同的 5 片,脑片置于 1.5 mL 2% TTC 溶液中避光孵育 30 min。再将脑片置 10% 甲醛中固定。参照文献方法^[9],计算梗死百分比。

梗死百分比 = 苍白区质量 / (苍白区质量 + 非苍白区质量) × 100%

1.8 缺血脑组织 ATP 酶活性和 IL-8 水平测定:缺血 2 h,再灌注 24 h 后,将大鼠断头取脑。切取缺血区大脑皮层约 100 mg,用生理盐水在冰浴下制成 10% 组织匀浆,4℃,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 722 N 光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)测定 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性。ATP 酶活性测定采用定磷法,以每克蛋白每小时分解 ATP 产生的无机磷量表示酶活性。IL-8 水平的测定采用放射免疫法,严格按试剂盒说明书进行操作。蛋白定量采用考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白为标准。

1.9 缺血脑组织 MPO 活性的测定:缺血 2 h,再灌注 24 h,将大鼠断头取脑。取缺血区大脑皮层约 100 mg,利用试剂盒提供的匀浆介质,将脑组织制成 5% 的组织匀浆,按照 MPO 试剂盒的要求操作,用 722 N 光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),在 460 nm 处测吸光度值。

1.10 统计方法:各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,两组之间比较用 *q* 检验。

2 结果

2.1 蛇床子素对大鼠神经功能行为缺陷评分、脑水肿和脑梗死范围的影响:蛇床子素 10 mg/kg 组大鼠神经功能行为评分和脑组织含水量同模型组比较明显减少 ($P < 0.05$),蛇床子素 5 mg/kg 组有下降趋势,但与模型组比较无统计学差异;蛇床子素 5、10 mg/kg 组的脑梗死范围与模型组比较差异显著 ($P < 0.05, 0.01$)。表明蛇床子素对大鼠脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用。结果见表 1。

2.2 蛇床子素对大鼠缺血区脑组织中 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性的影响:脑缺血再灌注损伤模型组 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性明显降低,同假手术组比较差异显著 ($P < 0.05$);蛇床子素 10 mg/kg 组 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性比脑缺血再灌注损伤模型组明显增强 ($P < 0.05$),表明蛇床子素能抑制脑缺血再灌注损

伤后 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性的降低,保护缺血脑组织。结果见表 2。

表 1 蛇床子素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后神经功能行为缺陷评分、脑水肿和脑梗死范围的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of osthole on neurological behaviour deficit score, brain edema, and infarct size after focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经功能评分	脑含水量/%	脑梗死范围/%
假手术	-	-	77.8 ± 1.5	-
模型	-	2.00 ± 0.89	80.8 ± 2.3 ^{##}	20.07 ± 3.68
蛇床子素	5	1.33 ± 0.52	79.8 ± 1.8	15.33 ± 3.43 [*]
	10	0.83 ± 0.75 [*]	78.6 ± 0.9 [*]	12.84 ± 2.74 ^{**}

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs Sham group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 2 蛇床子素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑组织中 ATP 酶活性、IL-8 水平和 MPO 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of osthole on activity of ATPase, level of IL-8, and MPO activity in cortex after focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶/(mmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	Ca ²⁺ -ATP 酶/(mmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	MPO/(U·g ⁻¹)	IL-8/(ng·g ⁻¹)
假手术	-	5.23 ± 0.75	6.17 ± 1.52	0.31 ± 0.08	15.93 ± 3.76
模型	-	3.27 ± 0.44 [#]	4.20 ± 0.79 [#]	0.57 ± 0.14 [#]	56.99 ± 10.83 ^{##}
蛇床子素	5	3.80 ± 0.65	4.84 ± 1.91	0.45 ± 0.11	22.73 ± 7.98 [*]
	10	4.27 ± 0.85 [*]	5.57 ± 1.04 [*]	0.40 ± 0.10 [*]	20.11 ± 5.03 ^{**}

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs Sham group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

2.3 蛇床子素对缺血脑组织 MPO 活性和 IL-8 水平的影响:缺血再灌注模型组缺血区大脑皮层 MPO 活性明显高于假手术组 ($P < 0.01$),而蛇床子素 10 mg/kg 组大鼠脑缺血区皮层中 MPO 活性显著低于模型组 ($P < 0.05$),蛇床子素 5 mg/kg 组有下降趋势,但与模型组比较无统计学差异。模型组 IL-8 水平较假手术组明显提高 ($P < 0.01$),蛇床子素 5 和 10 mg/kg 组与模型组比较明显降低,差异显著 ($P < 0.05, 0.01$),表明蛇床子素能抑制大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织中 IL-8 的产生,抑制 MPO 活性,抑制中性粒细胞的激活、趋化和浸润,保护缺血脑组织。结果见表 2。

3 讨论

Na^+ 、 K^+ -ATP 酶的主要功能是将细胞内的 Na^+ 泵出和将胞外的 K^+ 泵入,平衡细胞内外 Na^+ 、 K^+ 浓度; Ca^{2+} -ATP 酶的主要功能是将细胞内 Ca^{2+} 泵出,它同 Na^+ - Ca^{2+} 交换共同维持细胞内 Ca^{2+} 稳态。 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性下降,导致细胞内 Ca^{2+} 、 Na^+ 增多。胞内 Na^+ 增多引起 Na^+ 、 Ca^{2+} 交换增加,进一步加剧细胞内 Ca^{2+} 超载。因此, Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶对维持细胞内离子浓度、维持细胞的正常结构和功能起着十分重要的作用。脑缺血再灌注时, Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性下降,导致 K^+ 大量流向细胞外液, Na^+ 及 Ca^{2+} 大量流入细胞内,伴随 H_2O 的进入而导致细胞急速肿胀,产生脑水肿。本研究结果表明,蛇床子素通过增强 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性,降低脑缺血再灌注后脑组织含水量,从而保护缺血脑组织。

IL-8 是免疫性炎症反应过程中的炎性趋化细胞因子,在脑缺血和缺血再灌注损伤中起着重要作用。IL-8 主要由中性粒细胞、单核巨噬细胞、内皮细胞等在缺血、缺氧、IL-1、内毒素 (LPS)、内皮素-1 (ET-1) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 等诱导下合成。IL-8 使中性粒细胞激活,促使其趋化、聚集、黏附于血管内皮和产生大量自由基及蛋白水解酶等炎症介质,损害局部血管,导致血管通透性增加,造成组织水肿坏死。脑缺血和缺血再灌注损伤后,缺血区脑组织中 IL-8 生成增加,使大量中性粒细胞激活,促进其趋化和浸润,并释放毒性氧自由基、细胞因子和一些炎症介质,导致局部脑水肿和脑组织坏死。中性粒细胞中含有 MPO,每个细胞所含的酶量是一定的,利用这一特点,可以通过测量 MPO 活性定量分析中性粒细胞的数目和组织的浸润情况^[10,11]。本研究发现,蛇床子素可抑制 IL-8 产生,阻断中性

粒细胞激活,抑制 MPO 活性,降低脑缺血再灌注后中性粒细胞在脑组织中的浸润和聚集,抑制局部脑组织炎症反应,减轻脑水肿,保护缺血脑组织。

本研究结果表明,蛇床子素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用。通过抑制 IL-8 产生,抑制 MPO 活性,降低脑缺血再灌注后中性粒细胞在脑组织中的浸润,抑制局部脑组织炎症反应,增强 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性,降低脑缺血再灌注后脑组织含水量,减轻脑水肿,是其治疗脑缺血损伤的机制之一。

参考文献:

- [1] 连其深,周 俐,叶和扬,等. 蛇床子素抗炎作用的实验研究 [J]. 赣南医学院学报, 1999, 19(3): 165-168.
- [2] 李 乐,庄斐尔,赵更生. 蛇床子素对家兔主动脉的钙拮抗作用 [J]. 中国药理学通报, 1992, 8(3): 227-231.
- [3] Chiou W F, Huang Y L, Chen C F, et al. Vasorelaxing effect of coumarins from *Cnidium monnieri* on rabbit corpus cavernosum [J]. *Planta Med*, 2001, 67(3): 282-284.
- [4] 沈丽霞,张丹参,张 力,等. 蛇床子素对学习记忆的影响及其机制分析 [J]. 药理学报, 1999, 34(6): 405-409.
- [5] 陈 蓉,谢梅林,周 佳. 蛇床子素抑制血栓形成和血小板聚集的实验研究 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(4): 440-443.
- [6] 周 俐,刘建新,周 青,等. 蛇床子素抗凝血作用 [J]. 中药药与临床, 2006, 22(3): 42-43.
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] Young W, Rappaport Z H, Chalif D J, et al. Regional brain sodium, potassium and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia [J]. *Stroke*, 1987, 18(4): 751-759.
- [9] Lundy E F, Solik B S, Frank R S, et al. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils [J]. *J Pharmacol Methods*, 1986, 16(3): 201-214.
- [10] Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, et al. Correlation between myeloperoxidase quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat: effects of neutrophil depletion [J]. *Stroke*, 1994, 25(7): 1469-1475.
- [11] Barone F C, Schmidt D B, Hillelsgass L M, et al. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia [J]. *Stroke*, 1992, 23(9): 1337-1347.

野西瓜挥发油抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的研究

季宇彬^{1,2,3},王 崑¹,于 蕾^{1,2,3},崔荣田¹,莫 科¹,邹 翔^{1,2,3}

(1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心,黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学 药物研究所博士后科研工作站,黑龙江 哈尔滨 150076; 3. 抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要:目的 研究野西瓜挥发油的抗肿瘤作用。方法 采用 MTT 实验和 SRB 实验观察野西瓜挥发油对 SGC-

收稿日期:2008-05-22

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(D200610)

作者简介:季宇彬(1956—),男,博士,博士后,教授,博士生导师,研究方向为抗肿瘤药物研究。