

映山红花总黄酮对全脑缺血再灌注大鼠脑基底动脉超极化反应的诱导作用

韩黎黎, 范一菲, 陈志武*

安徽医科大学基础医学院 药理教研室, 安徽 合肥 230032

摘要:目的 探讨映山红花总黄酮(TFR)对内皮源性超极化因子(EDHF)介导的全脑缺血再灌注大鼠脑基底动脉(CBA)血管舒张和平滑肌细胞膜静息电位超极化反应的诱导作用。方法 采用四血管结扎法建立大鼠全脑缺血再灌注模型,测定离体大鼠CBA平滑肌细胞膜静息电位和血管舒张功能。结果 在 3×10^{-5} mol/L L-NAME和 1×10^{-5} mol/L 吲哚美辛存在时,全脑缺血再灌注可明显促进乙酰胆碱(Ach, $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L)诱导大鼠CBA产生非NO、非PGI₂介导的血管舒张和平滑肌细胞膜静息电位超极化; TFR 11~2 700 mg/L可使全脑缺血再灌注大鼠CBA产生较明显的非NO、非PGI₂介导的血管舒张和平滑肌细胞膜静息电位超极化反应,并能被Ca²⁺激活的K通道阻断剂四乙胺(TEA, 1 mmol/L)和内源性硫化氢(H₂S)生成抑制剂dl-映丙基甘氨酸(PPG, 1×10^{-4} mol/L)显著抑制。结论 全脑缺血再灌注明显增强大鼠CBA中非NO、非PGI₂介导的血管舒张和平滑肌细胞超极化。TFR明显诱导全脑缺血再灌注大鼠CBA产生此种血管舒张和超极化,即EDHF反应,并可能与H₂S有关。

关键词: 映山红; 总黄酮; 内皮源性超极化因子; 硫化氢; 血管舒张; 超极化反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1164-05

Inducing effect of total flavones in rhododendra on endothelium-derived hyperpolarizing factor responses in cerebral basilar artery of rats subjected to global cerebral ischemia reperfusion

HAN Li-li, FAN Yi-fei, CHEN Zhi-wu

Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract: Objective To study the effect of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated responses of relaxation and hyperpolarization of vascular smooth muscle cell (VSMC) of rat cerebral basilar artery (CBA) subjected to cerebral ischemia/reperfusion (I/R) to total flavones in rhododendra (TFR). **Methods** The model of global cerebral I/R in rats was made by 4-vessel occlusion (4-VO). The vasodilation and resting membrane potential (RMP) of VSMC of rat CBA were detected *in vitro*. **Results** In the presence of 3×10^{-5} mol/L N ω -nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase) and 1×10^{-5} mol/L Indomethacin (Indo, an inhibitor of PGI₂ synthesis), the global cerebral I/R markedly enhanced $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L acetylcholine (Ach)-elicited relaxation and hyperpolarization of RMP of VSMC in rat CBA. In the presence of L-NAME and Indo, 11~2 700 mg/L TFR induced significant and dose-dependent hyperpolarization of RMP of VSMC and relaxation of rat CBA subjected to global cerebral I/R. The hyperpolarization and relaxation were obviously inhibited by tetraethylammonium (an inhibitor of I_{KCa} at 1 mmol/L) and 1×10^{-4} mol/L dl-propargylglycine (PPG), an inhibitor of endogenous hydrogen sulfide (H₂S) synthase. **Conclusion** Global cerebral I/R could enhance the non-NO-non-PGI₂-mediated responses of hyperpolarization and vasorelaxation in rat CAB. In rat CAB subjected to global cerebral I/R, TFR could significantly induce this non-NO-non-PGI₂ hyperpolarization and relaxation, the so-called EDHF response that might be mediated by endogenous H₂S.

Key words: *Rhododendron simsii* Planch.; total flavones; endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF); hydrogen sulfide; vasorelaxation; hyperpolarization

内皮源性超极化因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF)是由血管内皮产生的非NO、非前列环素(PGI₂)依赖的具有舒血管

作用的一类细胞因子^[1],在多种动物、多部位的血管,如人和犬冠状动脉、小鼠肠系膜动脉以及猪冠状动脉中均发现有EDHF存在^[2-5]。

收稿日期: 2011-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30840104); 高等学校博士点专项科研基金资助项目(2007036605)

作者简介: 韩黎黎(1985—),女,硕士研究生,安徽阜阳人,研究方向为心脑血管药理学。Tel: 13966750520 E-mail: hanlili198522@126.com

*通讯作者 陈志武 E-mail: wzcxiang@mail.hf.ah.cn

映山红花总黄酮 (total flavones in rhododendra, TFR) 是从杜鹃花科植物杜鹃花 *Rhododendron simsii* Planch. 花中提取的有效部位, 主要成分为槲皮素、金丝桃苷等黄酮类化合物^[6]。研究表明 TFR 可增加脑血流量, 对脑缺血损伤有明显保护作用^[7-8], 并有促进 EDHF 释放、舒张血管等作用^[9]。研究并明确 TFR 对脑血管是否具有舒张作用, 将有助于阐明其抗脑缺血作用, 然而这方面的研究尚未见文献报道。因此, 本实验研究了 TFR 对全脑缺血再灌注大鼠离体脑基底动脉 (CBA) 的舒张作用及其可能的与 EDHF 相关的作用机制。

1 材料

1.1 试剂

TFR, 由安徽合肥合源医药科技有限公司提供, 黄色粉末, 总黄酮质量分数达 80% 以上; 左旋硝基精氨酸甲酯 (*N*-nitro-*L*-arginine-methyl-ester, *L*-NAME)、吲哚美辛 (Indo)、乙酰胆碱 (Ach)、四乙胺 (TEA)、*dl*-炔丙基甘氨酸 (PPG) 均购自 Sigma 公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量 200~250 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK (皖) 2005-001, 实验室饲养温度 (18±2) °C。

2 方法

2.1 模型制备

采用 Pulsinelli 等^[10]的四血管结扎法建立全脑缺血模型。大鼠用 10% 水合氯醛 (330 mg/kg) ip 麻醉, 颈部正中切口并分离两侧颈总动脉, 置 4~0 号丝线备用。颈背部正中切口并暴露第一颈椎两侧的翼小孔, 用直径 0.5 mm 的电凝针烧灼两侧翼小孔内的椎动脉, 使椎动脉闭塞。术后 24 h, 在动物清醒状态下将其固定, 提起分离的颈总动脉, 用动脉夹夹住, 造成全脑缺血。以脑电图 (EEG) 波幅降至原来的 25% 以下、大鼠翻正反射消失、自主呼吸存在、瞳孔颜色灰白为模型成功的标志。手术过程中及手术后保持肛温 37 °C。

大鼠脑缺血 20 min 后, 松开动脉夹, 回笼饲养, 自由饮水进食。脑缺血后再灌注 24 h 后处死大鼠, 快速取脑, 分离 CBA, 进行平滑肌细胞膜静息电位测定或离体血管舒缩功能测定实验。假手术组仅暴露双侧颈总动脉和翼小孔, 不进行电凝和夹闭处理。

2.2 血管平滑肌细胞膜静息电位测定^[11]

将大鼠离体 CBA 血管段纵向剖开, 固定在铺有琼脂的灌流槽中, 灌流通入 95%O₂+5%CO₂ 混合气体的 37 °C 的 PSS 液 (mmol/L: NaCl 119、KCl 4.7、NaHCO₃ 24、KH₂PO₄ 1.18、MgSO₄ 1.17、EDTA 0.026、CaCl₂ 1.6、葡萄糖 5.5, pH 7.4) 温育 1 h 后, 在灌流液中加入相应的溶媒或药物温育 30 min。在连续变倍体视显微镜下用微操纵仪将电极推进至血管表面 (电极为尖端充以 3 mol/L KCl 的玻璃微电极, 电阻为 30~50 MΩ), 再改用步进式微电极推进器 (MO-81, Narishiger) 穿刺细胞。生物电信号经过 Intra767 型微电极放大器放大后, 输入至计算机信号采集分析系统 (Powerlab/4sp, 澳大利亚), 记录并处理血管平滑肌细胞的膜静息电位, 使静息电位负值进一步加大为平滑肌细胞的超极化。

2.3 离体血管舒缩功能测定

将大鼠离体 CBA 制成 2~3 mm 长的血管段, 置血管灌流槽中, 用两个微量玻璃管套入血管段的两端, 用 10~0 号尼龙线将血管段的两端结扎固定在微量玻璃管上, 并确保无渗漏, 然后将通入 95%O₂+5% CO₂ 混合气体的 37 °C 的 PSS 液加压灌注血管内腔 (压力 11.3 kPa, 灌注液体积流量 150 μL/min)。用通入相同气体的 PSS 液 (恒温 37 °C) 灌流液灌注血管外侧。血管平衡 1 h 后, 在血管内腔的灌流液中加入 *L*-NAME、吲哚美辛或其他工具药温育 30 min 后, 用 30 mmol/L 的 KCl 诱导血管收缩, 待收缩恒定后, 在血管内腔的灌流液中加入各种累加浓度的试药, 体视显微镜下观察测量灌流槽中血管直径并用数码照相机记录, 以血管直径的变化反映血管的舒缩功能的改变。计算血管舒张率。

$$\text{血管舒张率} = (D_x - D_{\min}) / (D_{\max} - D_{\min})$$

D_{\max} 为血管平衡 1 h 时的血管直径, D_{\min} 为加入收缩剂后收缩恒定时的血管直径, D_x 为加入各浓度试药后的血管直径

2.4 统计学处理

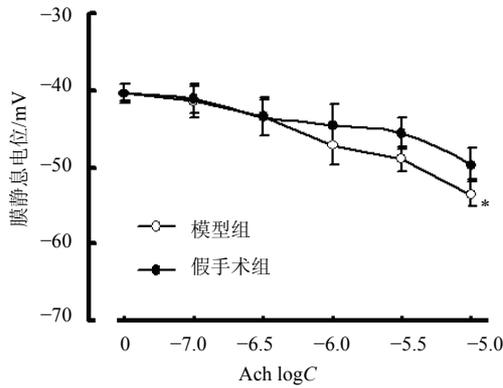
实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析, 方差齐采用 LSD 法分析, 方差不齐采用 Dunnett's *t* 3 检验。

3 结果

3.1 全脑缺血大鼠 CBA 的 EDHF 反应的变化

3.1.1 非 NO、非 PGI₂ 介导的平滑肌细胞膜静息电位超极化反应的变化 假手术组大鼠 CBA 在 NO 合酶抑制剂 *L*-NAME (3×10⁻⁵ mol/L) 和 PGI₂ 合成抑制剂吲哚美辛 (1×10⁻⁵ mol/L) 存在时, 平滑肌细胞膜静息电位为 (-40.3±1.2) mV; 加入 1×10⁻⁷~

1×10^{-5} mol/L Ach 后, 其膜静息电位负值有明显增加 ($P < 0.01$), 膜静息电位最大负值为 (-49.7 ± 1.9) mV。而脑缺血再灌注大鼠 CBA 在 3×10^{-5} mol/L L-NAME 和 1×10^{-5} mol/L 吡啶美辛存在时, 平滑肌细胞对 Ach 诱导的膜静息电位负值增大较假手术组有明显的增强 ($P < 0.05$), 膜静息电位最大负值为 (-53.5 ± 2.2) mV。结果提示全脑缺血再灌注可增强大鼠 CBA 的非 NO、非 PGI₂ 介导的平滑肌细胞超极化反应。见图 1。



与假手术组比较: $*P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs Sham group

图 1 Ach 对假手术组和模型组大鼠 CBA 平滑肌细胞膜静息电位的影响 ($n=20$)

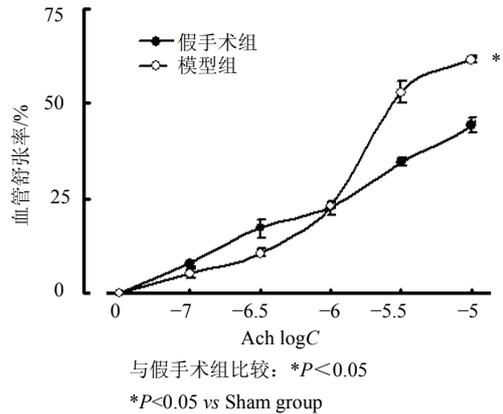
Fig. 1 Effect of Ach on membrane resting potential of VSMC of cerebral basilar artery of rat in Sham and model groups ($n=20$)

3.1.2 非 NO、非 PGI₂ 介导的血管舒张反应的变化 在 3×10^{-5} mol/L L-NAME 和 1×10^{-5} mol/L 吡啶美辛存在时, 假手术组和模型组大鼠对 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L Ach 均有明显的血管舒张反应, 且模型组大鼠的反应明显强于假手术组。全脑缺血再灌注可使大鼠 CBA 的最大舒张反应由假手术组的 (44.3 ± 1.9) % 升至 (61.7 ± 1.1) % ($P < 0.05$), 提示全脑缺血可增强非 NO、非 PGI₂ 介导的大鼠 CBA 舒张反应。见图 2。

3.2 TFR 对全脑缺血再灌注大鼠 CBA 中非 NO、非 PGI₂ 介导的 EDHF 反应的影响

与对照组和用药前比较, 在 3×10^{-5} mol/L L-NAME 和 1×10^{-5} mol/L 吡啶美辛存在时, TFR 11~2 700 mg/L 以质量浓度依赖方式明显地诱导全脑缺血再灌注大鼠 CBA 平滑肌细胞膜静息电位负值增大 ($P < 0.01$), 用药前膜静息电位为 (-40.7 ± 5.7) mV, 而用药后最大膜静息电位达 (-56.1 ± 2.3) mV ($P < 0.01$)。

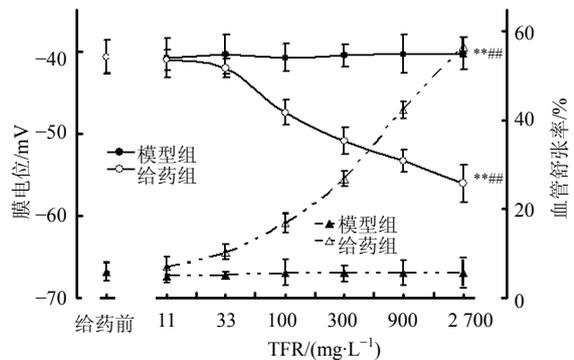
与对照组和用药前比较, 在 3×10^{-5} mol/L L-NAME 和 1×10^{-5} mol/L 吡啶美辛存在时, TFR 11~2 700 mg/L 亦可明显并以质量浓度依赖方式诱导全脑缺血再灌注大鼠 CBA 舒张反应 ($P < 0.01$), TFR 用药后最大舒张率可达 (56.6 ± 3.3) %。上述结果表明 TFR 可明显诱导全脑缺血再灌注大鼠 CBA 中非 NO、非 PGI₂ 介导的平滑肌细胞膜电位超极化和血管舒张反应。见图 3。



与假手术组比较: $*P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs Sham group

图 2 Ach 对假手术组和模型组大鼠 CBA 舒张反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of Ach on relaxation of cerebral basilar artery of rat in Sham and model groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)



与给药前比较: $**P < 0.01$; 与模型组比较: $###P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs pre-treatment $###P < 0.01$ vs model group

图 3 TFR 对全脑缺血再灌注大鼠 CBA 血管舒张 ($n=6$) 和平滑肌细胞膜电位超极化 ($n=20$) 的影响

Fig. 3 Effects of TFR on relaxation ($n=6$) and hyperpolarization of membrane resting potential of VSMC ($n=20$) of rat cerebral basilar artery subjected to global cerebral I/R

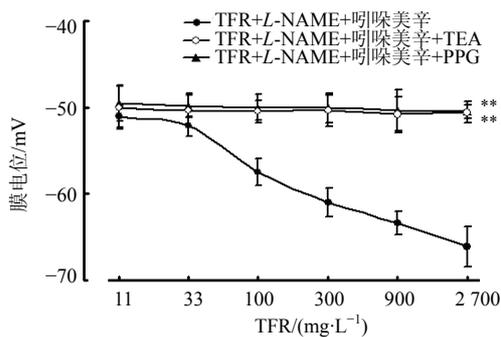
3.3 TEA 对 TFR 作用的影响

如图 4、5 所示, 11~2 700 mg/L TFR 在 3×10^{-5} mol/L L-NAME 和 1×10^{-5} mol/L 吡啶美辛存在时, TFR 对全脑缺血再灌注大鼠 CBA 平滑肌细胞膜电位超极化反应的诱导作用和血管舒张作用

可被 1 mmol/L TEA 明显削弱, 与 TFR+L-NAME+ 吡啶美辛组比较差异显著 ($P<0.01$), 其最大膜电位和最大舒张率分别由 (-56.1 ± 2.3) mV、 (56.6 ± 3.3) %降至为 (-40.6 ± 1.2) mV、 (7.9 ± 0.6) %。

3.4 PPG 对 TFR 作用的影响

如图 4、5 所示, TFR 11~2 700 mg/L 在 3×10^{-5} mol/L L-NAME 和 1×10^{-5} mol/L 吡啶美辛存在条件下, 对全脑缺血再灌注大鼠 CBA 平滑肌细胞膜电位超级化反应的诱导作用和血管舒张作用也可被 1×10^{-4} mol/L PPG 明显削弱, 与 TFR+L-NAME+ 吡啶美辛组比较差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01), 其膜电位最大值和最大舒张率分别由 (-56.1 ± 2.3) mV、 (56.6 ± 3.3) %降至 (-40.5 ± 0.8) mV、 (25.9 ± 3.2) %。



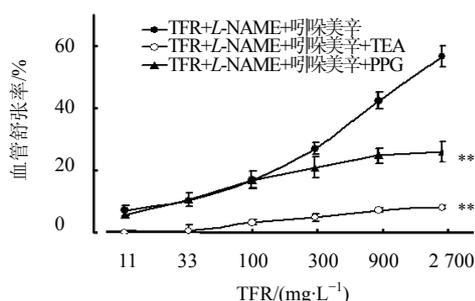
与 TFR+L-NAME+吡啶美辛组比较: ** $P<0.01$
** $P<0.01$ vs TFR+L-NAME+Indo

图 4 TEA、PPG 对 TFR 诱导全脑缺血再灌注大鼠 CBA 非 NO、非 PGI₂ 介导的平滑肌细胞膜电位超级化反应的影响 ($n=20$)

Fig. 4 Effect of TEA and PPG on non NO, non PGI₂-mediated hyperpolarization induced by TFR in VSMC of rat cerebral basilar artery subjected to global cerebral I/R ($n=20$)

4 讨论

在缺血性脑损伤的发生、发展和转归中, 脑血管张力变化是一个决定性的因素。血管内皮细胞通过释放 NO、PGI₂ 和 EDHF 等内皮因子舒张血管, 调节着脑血流的供应。NO 和 EDHF 可共同调节血管的舒张反应, 一般认为以 NO 为主。但是在内皮损伤情况下, NO 作用被削弱时, EDHF 可占主导作用^[12]。目前关于 EDHF 对血管功能调节作用的研究, 主要采用一氧化氮合酶抑制剂和 PGI₂ 合成抑制剂排除 NO 和 PGI₂ 作用后, 观察 Ach 等血管活性物质诱导的血管及其平滑肌的反应。本实验在离体大鼠 CBA 上, 采用 L-NAME 和吡啶美辛预处理以排除 NO 和 PGI₂ 作用, 发现 Ach 对全脑缺血再灌注模



与 TFR+L-NAME+吡啶美辛组比较: ** $P<0.01$
** $P<0.01$ vs TFR+L-NAME+Indo

图 5 TEA、PPG 对 TFR 诱导的全脑缺血再灌注大鼠脑基底动脉非 NO、非 PGI₂ 介导的血管舒张的影响 ($n=6$)
Fig. 5 Effect of TEA and PPG on non NO, non PGI₂-mediated relaxation induced by TFR in VSMC of rat cerebral basilar artery subjected to global cerebral I/R ($n=6$)

型组大鼠 CBA 产生的血管平滑肌细胞膜电位超级化和血管舒张作用均较假手术组有明显的增强, 表明全脑缺血再灌注能明显提高脑血管的 EDHF 反应, 这与文献报道一致^[13]。在 L-NAME 和吡啶美辛存在时, TFR 11~2 700 mg/L 可明显地诱导 CBA 平滑肌细胞膜电位的超极化和血管舒张反应, 即 TFR 可使全脑缺血再灌注大鼠 CBA 产生明显的、质量浓度依赖性的非 NO、非 PGI₂ 介导的血管平滑肌细胞膜电位的超极化和血管舒张反应, 这与张建华等^[14]报道 TFR 可使正常大鼠 CBA 产生非 NO 和非 PGI₂ 反应相一致。

EDHF 反应的特征之一就是可被 Ca²⁺ 激活的 K 通道 (K_{Ca}) 阻滞剂所抑制。TEA 为非特异性的 K⁺ 通道阻滞剂, 浓度为 1 mmol/L 时对 K_{Ca} 通道具阻断作用^[15]。本实验结果表明, TFR 诱导的非 NO、非 PGI₂ 介导的脑缺血再灌注大鼠 CBA 平滑肌细胞膜电位的超极化和血管舒张反应均可明显地被 1 mmol/L 的 TEA 所消除, 进一步证明 TFR 可诱导脑缺血再灌注大鼠 CBA 的 EDHF 反应。

EDHF 是当今血管内皮因子研究中的一个热点。但迄今为止, 对 EDHF 的化学本质, 尤其是脑血管中的 EDHF 化学本质尚不十分清楚。本实验室近年的研究表明, 脑血管上 EDHF 可能是 H₂S, 血管内皮中的 H₂S 是由胱硫醚-γ-裂解酶 (cystathionine-γ-lyase, CSE) 催化半胱氨酸所产生的。在本实验中发现 TFR 在全脑缺血再灌注大鼠 CBA 上诱导非 NO、非 PGI₂ 介导的平滑肌细胞超极

化和血管舒张反应可被 1×10^{-4} mol/L 的 PPG (CSE 的特异性抑制剂) 明显减弱, 提示 TFR 诱导的 EDHF 反应可能是 H_2S 介导的。

综上所述, 全脑缺血再灌注可明显增强大鼠 CBA 中非 NO、非 PGI_2 介导的平滑肌细胞超级化和血管舒张, TFR 能明显地诱导全脑缺血再灌注大鼠 CBA 产生的细胞超级化和血管舒张, 即 EDHF 反应, 并且这种作用可能与 H_2S 有关。TFR 诱导的 EDHF 反应可能是其抗脑缺血再灌注损伤的作用机制之一。

参考文献

- [1] Cohen R A. The endothelium-derived hyperpolarizing factor puzzle: a mechanism without a mediator? [J]. *Circulation*, 2005, 111(6): 724-727.
- [2] Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, et al. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation *in vivo* [J]. *Circulation*, 2003, 107(7): 1040-1045.
- [3] Miura H, Bosnjak J J, Ning G, et al. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles [J]. *Circ Res*, 2003, 92(2): e31-e40.
- [4] Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(12): 1521-1530.
- [5] Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries [J]. *Nature*, 1999, 401(6752): 493-497.
- [6] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [7] Guo Y, Chen Z W. Protective effects of total flavones of rhododendra on cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36(2): 343-354.
- [8] Yu T, Chen Q E, Chen Z W, et al. Protective effects of total flavones of rhododendra against global cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37(5): 877-887.
- [9] 王启海, 陈志武. 金丝桃苷对离体大鼠腹主动脉的舒张作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 766-770.
- [10] Pulsinelli W A, Brierley J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267.
- [11] Miura H, Liu Y, Gutterman D D. Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization: contribution of nitric oxide and Ca^{2+} -activated K^+ channels [J]. *Circulation*, 1999, 99(24): 3132-3138.
- [12] Najibi S, Cowan C L, Palacino J J, et al. Enhanced role of potassium channel in relaxation to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery [J]. *Am J Physiol*, 1994, 266: 2061-2067.
- [13] 程敬君, 匡培根. 缺血再灌注对鼠脑血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2001, 8(1): 3-4.
- [14] 张建华, 陈志武. 大鼠脑基底动脉舒张作用的 EDHF 机制及杜鹃花总黄酮的作用 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2009.
- [15] Smirnov S V, Aaronson P I. Ca^{2+} -activated and voltage-gated K currents in smooth muscle cells isolated from human mesenteric arterie [J]. *J Physiol*, 1992, 457: 431-454.