

胡颓子叶对豚鼠离体气管平滑肌收缩功能的影响

代 黔, 王园园, 葛月宾*, 万定荣, 洪宗国

中南民族大学药学院, 湖北 武汉 430074

摘要: **目的** 研究胡颓子叶乙醇提取物正丁醇部位(胡颓子叶正丁醇部位)对正常及多种致痉剂诱导的豚鼠气管平滑肌收缩功能的影响。**方法** 制备豚鼠离体气管平滑肌螺旋条,在其正常状态下以及用乙酰胆碱、组胺、氯化钾、无钙下乙酰胆碱诱导细胞内钙释放和高钙下诱发细胞外钙内流条件下,观察胡颓子叶正丁醇部位对离体气管张力的影响。**结果** 胡颓子叶正丁醇部位对静息状态下的豚鼠离体气管平滑肌有明显的舒张作用,使乙酰胆碱和组胺的量效曲线发生明显右移,抑制加入高钾或高钙后引发细胞外钙内流导致的收缩。**结论** 胡颓子叶正丁醇部位能明显抑制正常状态及多种致痉剂诱发的豚鼠气管平滑肌收缩。

关键词: 胡颓子叶; 胡颓子叶正丁醇部位; 气管平滑肌; 气管舒缩; 细胞外钙内流

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)10-1305-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.019

Effect of *Elaeagnus pungens* leaves on contraction of isolated guinea pig tracheal smooth muscle

DAI Qian, WANG Yuan-yuan, GE Yue-bin, WAN Ding-rong, HONG Zong-guo

School of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *n*-butanol fraction from *Elaeagnus pungens* leaves (BFEP) on the contraction of isolated guinea pig tracheal smooth muscle under the basal tonus or spasmogens. **Methods** Guinea pig tracheal smooth muscle spiral strips were isolated. Under the normal state or the condition treated with acetylcholine (Ach), histamine (Hist), or KCl, Ca^{2+} release in cells without calcium, and extracellular Ca^{2+} influx at the high concentration of Ca^{2+} , the effect of BFEP on the tension of isolated trachea was observed. **Results** BFEP relaxed the tracheal strip significantly in the concentration-dependent manner under the basal tonus. The tested drug produced an unparallel rightward shift of the cumulative concentration-response curve of Hist or Ach. The contraction induced by high K^+ and extracellular Ca^{2+} influx was inhibited. **Conclusion** BFEP could inhibit the contraction of isolated guinea pig tracheal smooth muscle under the basal tonus or spasmogens.

Key words: *Elaeagnus pungens* leaves; *n*-butanol fraction from *Elaeagnus pungens* leaves; tracheal smooth muscle; tracheal contraction; extracellular Ca^{2+} influx

胡颓子叶为胡颓子科植物胡颓子(俗称牛奶子、羊奶子) *Elaeagnus pungens* Thunb. 的干燥叶, 分布于全国各地^[1]。胡颓子叶具有敛肺、平喘、止咳等功效, 临床上用于治疗哮喘、慢性喘息性气管炎^[2]。胡颓子属植物的主要化学成分有挥发油、萜类、生物碱、黄酮、皂苷、强心苷、糖、鞣质、萜醌等, 具有降血糖、调血脂、抗脂质过氧化、抗炎、镇痛、免疫及抗癌等多种药理作用, 而胡颓子叶的平喘作用研究鲜有报道^[3-6]。前期实验显示, 胡颓子叶醇提

取物能够明显推迟磷酸-组胺诱导的豚鼠哮喘发作时间^[7]。在此项研究结果的基础上, 本实验选择舒张气管平滑肌效果较好的胡颓子叶乙醇提取物正丁醇萃取部位(胡颓子叶正丁醇部位, *n*-butanol fraction from *Elaeagnus pungens* leaves, BFEP)^[7], 研究其对豚鼠离体气管平滑肌静息张力和多种致痉剂诱发的气管平滑肌收缩的影响, 为探讨胡颓子叶的止咳平喘活性及活性物质及开发其临床用途评价提供实验依据。

收稿日期: 2012-10-29

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31000156); 国家科技部“十二五”科技支撑计划项目(2012BA127B06)

作者简介: 代 黔, 硕士研究生。Tel: (027)67841196 E-mail: daiqianzy@sina.com

*通信作者 葛月宾 Tel: (027)67841196 E-mail: duckygreen@163.com

1 材料

1.1 药物与试剂

胡颓子叶采自湖北省武汉市蛇山, 经中南民族大学万定荣教授鉴定为胡颓子 *Elaeagnus pungens* Thunb. 的叶。氯化乙酰胆碱 (ACh)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA), 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸组胺 (组胺), 上海楷洋生物技术有限公司; 克亨氏 (K-H) 营养液 (含 NaCl 118.4 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, 葡萄糖 11.1 mmol/L, pH 7.4), 高钾 Tris 液 (含 NaCl 119 mmol/L, KCl 40 mmol/L, 葡萄糖 11 mmol/L, Tris 6.0 mmol/L, CaCl₂ 1.5 mmol/L, pH 7.4), 均为国产分析纯。

1.2 动物

豚鼠, 普通级, 雌雄兼用, 体质量 250~300 g, 武汉市万千佳禾实验动物养殖有限公司提供, 许可证号: SCXK (鄂) 2007-0006。

1.3 仪器

ZH—GL 型离体组织灌流装置、HU—1 型肌张力传感器, 淮北正华生物仪器设备有限公司; BL—420F 型生物机能实验系统, 成都泰盟有限公司。

2 方法

2.1 胡颓子叶正丁醇部位制备

取胡颓子叶粗粉约 4 kg, 用 70% 工业乙醇加热回流提取 3 次, 第 1、2 次乙醇用量为药材的 20 倍, 第 3 次乙醇用量为药材的 15 倍, 合并 3 次提取液, 减压浓缩, 得总浸膏 886.0 g, 浸膏用水充分溶解, 依次用石油醚、醋酸乙酯和水饱和正丁醇萃取, 减压浓缩、干燥, 得到正丁醇萃取部位 62.0 g, 备用。

2.2 标本制备

豚鼠击头处死, 迅速取出气管, 浸入通有 5% CO₂、95% O₂ 混合气的 K-H 液中, 轻柔去除气管周围的疏松结缔组织, 气管剪成宽约 2 mm、长约 20 mm 的螺旋条, 放入含 12 mL K-H 液的恒温浴槽中, 温度 (37±1) °C, 持续通以 5% CO₂、95% O₂ 混合气, 上端接肌张力换能器, 生理记录仪记录肌张力的变化。标本初始负荷张力 2.0 g, 每 15 min 换液 1 次, 平衡 60 min 后开始实验^[8]。

2.3 对豚鼠正常离体气管的影响

离体气管标本平衡后, 加入低质量浓度 (1.46 g/L) 胡颓子叶正丁醇部位 (以 K-H 液作溶剂), 观察给药后 5 min 内气管条张力下降幅度, 计算药物解痉率。

解痉率 = (给药前张力高度 - 给药后张力高度) / 给药前张力高度

气管标本冲洗换液数次达平衡后, 同法分别加入胡颓子叶正丁醇部位至终质量浓度分别为 2.92、5.84 g/L。观察给药后 5 min 内张力下降幅度, 计算解痉率。另设对照组 (给予同体积空白溶剂) 和阳性对照氨茶碱 (0.125 g/L) 组。每组实验重复 8 次。

2.4 对 ACh 和组胺量效曲线的影响

离体气管标本平衡稳定后, 以累积方式向浴槽中加入 ACh, 使其终浓度为 $2 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-5}$ mol/L, 做 ACh 量效曲线, 计算减活指数 (pD'₂)^[9]。用营养液冲洗标本至重新平衡后, 加入胡颓子叶正丁醇部位 (终质量浓度为 5.84 g/L), 孵育 30 min, 重新建立 ACh 量效曲线, 并再求得 pD'₂。同方法得胡颓子叶正丁醇部位对组胺的量效曲线。每组实验重复 6 次。

2.5 对 KCl 致痉作用的影响

离体气管标本平衡稳定后, 换高钾 Tris 液使气管条达最大收缩, 之后分别加入胡颓子叶正丁醇部位 (终质量浓度为 2.92、5.84 g/L), 观察其对张力收缩幅度的影响。对照组给予空白溶剂。每组实验重复 6 次。

2.6 对细胞外 Ca²⁺内流和细胞内 Ca²⁺释放的影响

以无钙 K-H 液 (含 NaCl 118.4 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, EDTA 0.1 mmol/L, 葡萄糖 11.1 mmol/L, pH 7.4) 平衡气管标本 60 min, 待标本稳定后, 先加入 ACh (终浓度为 2×10^{-5} mol/L) 引发气管第一相收缩, 待收缩至坪值后, 加入 CaCl₂ (终浓度为 2×10^{-2} mol/L) 引发气管第二相收缩至稳定。用营养液冲洗标本至重新平衡后, 无钙 K-H 液中加入胡颓子叶正丁醇部位 (终质量浓度为 2.92、5.84 g/L), 对照组加入空白溶剂, 孵育 10 min, 按照上述步骤再次加入 ACh 和 CaCl₂, 观察胡颓子叶正丁醇部位引起第一相和第二相收缩张力的变化率。每组实验重复 6 次。

2.7 数据处理

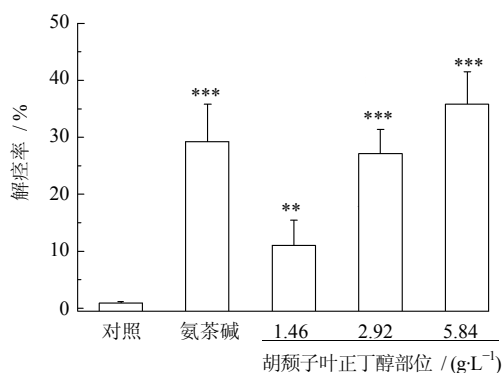
采用 Origin 8.0 统计软件分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 检验。

3 结果

3.1 对豚鼠正常离体气管的影响

与对照组比较, 胡颓子叶正丁醇部位 1.46、2.92、5.84 g/L 对静息状态下豚鼠气管平滑肌张力均有舒

张作用 ($P < 0.01$ 、 0.001), 并呈质量浓度相关性。解痉率分别为 $(10.98 \pm 4.47)\%$ 、 $(27.06 \pm 4.26)\%$ 、 $(35.76 \pm 5.76)\%$, 氨茶碱的解痉率为 $(29.20 \pm 6.57)\%$ 。结果见图 1。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 1 胡颓子叶正丁醇部位对豚鼠正常气管平滑肌静息张力的影响 ($n = 8$)

Fig. 1 Effect of BFEP on resting tension of guinea pig tracheal smooth muscle under basal tonus ($n = 8$)

3.2 对 ACh、组胺量效曲线的影响

在未加入胡颓子叶正丁醇部位时, ACh、组胺在 $2 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-5}$ mol/L 时, 引起豚鼠离体气管平滑肌收缩, 并随药物浓度增加收缩率逐渐增大, 量效曲线的 pD_2 分别为 5.91 ± 0.12 、 5.65 ± 0.06 。加入胡颓子叶正丁醇部位后, ACh 的量效曲线非平行性右移, pD_2 降低为 4.21 ± 0.81 (图 2); 组胺的量效曲线在其低浓度时无明显变化, 在高浓度时曲线右移, 收缩强度明显降低, pD_2 降低为 3.99 ± 0.45 , 结果见图 3。

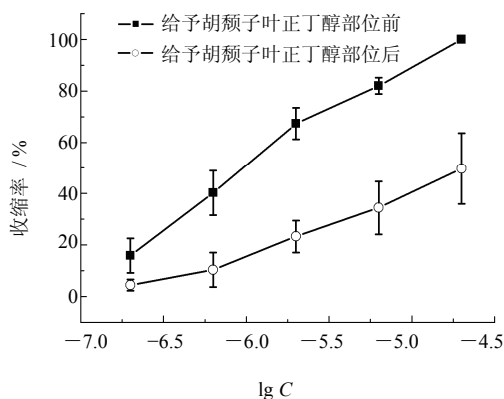


图 2 胡颓子叶正丁醇部位对 ACh 量效曲线的影响 ($n = 6$)
Fig. 2 Effect of BFEP on dose-response curve of ACh ($n = 6$)

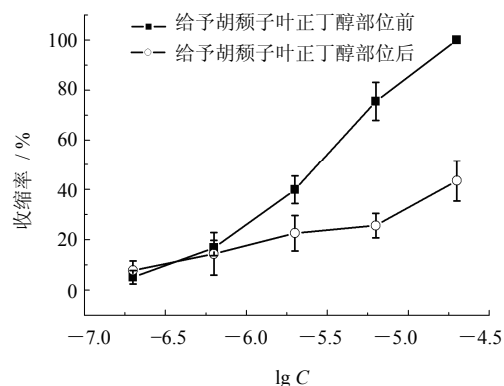


图 3 胡颓子叶正丁醇部位对组胺量效曲线的影响 ($n = 6$)
Fig. 3 Effect of BFEP on dose-response curve of Hist ($n = 6$)

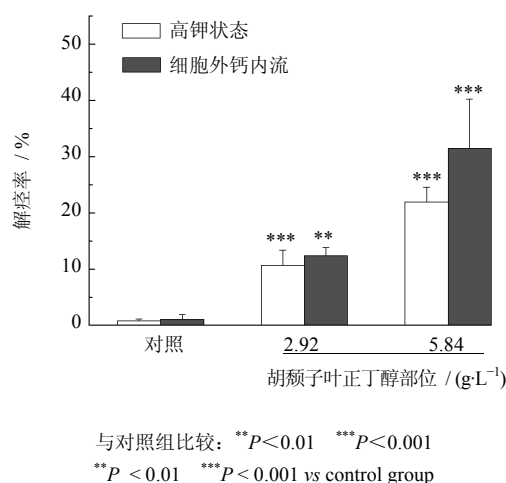
3.3 对 KCl 致痉作用和细胞外 Ca²⁺ 内流的影响

在高钾状态下, 浴槽中离体气管标本张力迅速增加至平台, 加入 2.92、5.84 g/L 的胡颓子叶正丁醇部位后, 气管收缩受到较明显抑制, 解痉率分别为 $(10.66 \pm 2.64)\%$ 、 $(21.88 \pm 6.81)\%$ 。

在无钙条件下, 胡颓子叶正丁醇部位对 ACh 致豚鼠离体气管条第一相依内钙收缩 (细胞内 Ca²⁺ 释放导致) 抑制作用不明显; 在 2.92、5.84 g/L 时, 能抑制高浓度 CaCl₂ 所致第二相依外钙收缩 (细胞外 Ca²⁺ 内流导致), 抑制率分别达 $(12.37 \pm 1.43)\%$ 、 $(31.42 \pm 8.75)\%$ 。结果见图 4。

4 讨论

本实验结果表明, 胡颓子叶正丁醇部位对静息状态下的豚鼠离体气管平滑肌有明显舒张的作用,



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 4 胡颓子叶正丁醇部位对 KCl 致痉作用和细胞外 Ca²⁺ 内流的影响 ($n = 6$)

Fig. 4 Effect of BFEP on KCl-induced spasm and extracellular Ca²⁺ influx ($n = 6$)

并呈质量浓度相关性;能明显降低致痉剂 ACh 和组胺量效曲线的 pD'_2 值,使量效曲线发生非平行性右移,最大效应明显降低,表明胡颓子叶正丁醇部位可能是毒蕈碱型受体和组胺 H_1 型受体的拮抗剂,并且是非竞争性拮抗剂。高钾通过引起细胞膜去极化激活膜上电位依赖性钙通道,引起平滑肌收缩,而胡颓子叶正丁醇部位对高钾引起的平滑肌收缩有拮抗作用;在无钙条件下,其对 ACh 引起细胞内 Ca^{2+} 释放导致的气管收缩则抑制作用不明显,但抑制高钙引发细胞外钙内流导致的收缩,且抑制作用呈质量浓度相关性,提示胡颓子叶正丁醇部位的作用机制可能与其通过阻断受体操纵型 Ca^{2+} 通道而抑制细胞外钙内流有关。

胡颓子叶含有黄酮、萜类等化学成分,前期研究表明^[8,10],在具有平喘活性的正丁醇部位(延长乙酰胆碱-组胺诱导豚鼠的引喘时间达 49.82%)中,分离到黄酮苷类等化合物,而单一成分与活性部位间的相关性,还需进行相关研究。

综上所述,胡颓子叶正丁醇部位对豚鼠离体气管的舒张作用除与抑制细胞外钙内流有关外,还与拮抗致痉剂和受体结合有关。

参考文献

- [1] 周国齐, 郑小江. 鄂西南木本植物资源 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2000.
- [2] 万定荣, 陈家春, 余汉华. 湖北药材志 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002.
- [3] 黄浩, 赵鑫, 姜标. 胡颓子科植物化学成分研究概况 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 307-309.
- [4] Bekker N P, Glushenkova A I. Components of certain species of the Elaeagnaceae family [J]. *Chem Nat Compds*, 2001, 37(2): 97-116.
- [5] 付义成, 王晓静. 胡颓子属植物化学成分及药理活性研究综述 [J]. 齐鲁药事, 2007, 126(14): 232-233.
- [6] 张银娣, 肖继震, 唐瑜零, 等. 胡颓子叶提取物平喘作用的初步研究 [J]. 中草药, 1987, 18(5): 36.
- [7] Ge Y B, Liu J Q, Su D F. *In vivo* evaluation of the anti-asthmatic, antitussive and expectorant activities of extract and fractions from *Elaeagnus pungens* leaf [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(3): 538-542.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [9] 杨宝峰. 药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [10] 李孟顺, 廖矛川, 葛月宾, 等. 胡颓子叶化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1224-1226.