

基于大鼠胸主动脉血管环的蟾酥舒缩调控作用研究及效应成分发现

黄蓓蓓^{1,2}, 陈奕君^{4#}, 吴浩^{1,2}, 刘洁^{2,3}, 冯梦晗^{1,2}, 刘力榕^{1,2}, 王伟^{4*}, 肖红斌^{2,3*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029
2. 北京中医药大学 中药分析与转化研究中心, 北京 100029
3. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029
4. 广州中医药大学方证研究所, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 揭示蟾酥提取物对大鼠胸主动脉血管环舒缩的双向调控作用及潜在效应成分组成。**方法** 利用离体生物能量信号采集系统, 评价蟾酥提取物及其水洗脱部位和 70%乙醇洗脱部位对大鼠胸主动脉血管环的舒缩调控作用; 并在此基础上, 建立 UHPLC-Q TOF-MS/MS 联用方法, 对各样品进行成分解析; 根据成分鉴定结果, 逐一考察其中主要成分的血管调控效应。**结果** 蟾酥提取物对静息状态下的大鼠胸主动脉血管环表现出先收缩后舒张的双向调控作用; 而其水洗脱部位仅表现出血管收缩效应, 70%乙醇洗脱部位仅表现出血管舒张效应。进一步研究发现, 肾上腺素、5-羟色胺是蟾酥提取物水洗脱部位中发挥血管收缩效应的主要成分; 而华蟾酥毒基、酯蟾毒配基、华蟾毒它灵、去乙酰华蟾毒精和脂蟾毒精是蟾酥提取物 70%乙醇洗脱部位中发挥血管舒张效应的主要成分。**结论** 蟾酥提取物对于血管舒缩的双向调控作用, 与其中水溶性成分肾上腺素、5-羟色胺诱导血管收缩, 脂溶性成分华蟾酥毒基、酯蟾毒配基、华蟾毒它灵、去乙酰华蟾毒精和脂蟾毒精诱导血管舒张密切相关, 为中药单味药多成分作用于同一器官的多靶点协同拮抗调控效应研究提供了数据支撑。

关键词: 蟾酥; 胸主动脉血管环; 双向调控作用; 效应成分; 肾上腺素; 5-羟色胺; 华蟾酥毒基; 酯蟾毒配基; 华蟾毒它灵; 去乙酰华蟾毒精; 脂蟾毒精

中图分类号: R285; R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)02-0484-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.019

Study on vasomotor regulation and effective components of *Bufo venenum* based on vascular rings of thoracic aorta in rats

HUANG Bei-bei^{1,2}, CHEN Yi-jun⁴, WU Hao^{1,2}, LIU Jie^{2,3}, FENG Meng-han^{1,2}, LIU Li-rong^{1,2}, WANG Wei⁴, XIAO Hong-bin^{2,3}

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. Research Center for Chinese Medicine Analysis and Transformation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
3. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
4. Institute of Prescriptions and Syndromes, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To reveal the bidirectional regulation of Chansu (*Bufo venenum*) extract on the relaxation and contraction of thoracic aorta rings in rats, and to clarify its potential effective components. **Methods** Firstly, the *in vitro* bioenergy signal acquisition system was employed to evaluate the effects of *Bufo venenum* extract and its water elution fraction and 70% ethanol elution fraction on the vasomotor regulation of thoracic aorta vascular rings in rats. Subsequently, the UHPLC-Q TOF-MS/MS method was established to analyze the components of those above samples. After that, in accordance with the components identification results, the vascular regulation effects of the main components identified above were detected one by one. **Results** The extract of *Bufo venenum* showed

收稿日期: 2021-10-11

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81930113); 国家自然科学基金面上项目(81774155); 博士后科学基金面上项目(2020M680472)

作者简介: 黄蓓蓓(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制解析。E-mail: h1785411880@163.com

*通信作者: 王伟, 博士, 教授。E-mail: wangwei26960@126.com

肖红斌, 博士, 教授。Tel: (010)64286490 E-mail: hbxxiao69@163.com

#并列第一作者: 陈奕君

bidirectional regulation effects on the thoracic aorta vascular rings in rats. While, its water elution fraction only showed vasoconstriction effects, and its 70% ethanol elution fraction only exhibited vasodilation effects. Further investigation demonstrated that *L*-adrenaline and 5-hydroxytryptamine were the main effective components of vasoconstriction contained in water elution fraction, and cinobufagin, resibufogenin, cinobufotalin, desacetylcinobufagin and resibufagin were the main effective components of vasodilation contained in 70% ethanol elution fraction. **Conclusion** The bidirectional regulation effects of *Bufois Venenum* extract on thoracic aorta vascular rings in rats were result from the simultaneous regulation of the water-soluble components to induce vasoconstriction and the fat-soluble components to induce vasodilation. This study provides data supports for the investigation of synergistic antagonistic regulatory effects of multiple components contained in one traditional Chinese medicine acting on multiple targets on one same organ.

Key words: *Bufois Venenum*; thoracic aorta vascular rings; bidirectional regulation; effective components; *L*-adrenaline; 5-hydroxytryptamine; cinobufagin; resibufogenin; cinobufotalin; desacetylcinobufagin; resibufagin

蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 的干燥分泌物,多于夏、秋二季捕捉蟾蜍,洗净,挤取耳后腺和皮肤腺的白色浆液,经加工、干燥而成^[1]。蟾酥作为一种重要的传统动物药,其化学成分种类丰富,已有研究显示蟾蜍二烯羟酸内酯类和蟾毒色胺类化合物是蟾酥发挥药理作用的主要活性成分。其中,蟾蜍二烯羟酸内酯类化合物多为脂溶性,而蟾毒色胺类化合物常含有吲哚环,具有较好的水溶性。此外,蟾酥中还含有甾醇类化合物及肾上腺素、多肽、有机酸和多糖等其他类化合物^[2-6]。

近年来,国内外对于蟾酥有效成分及药理活性的研究不断深入,已有研究显示,蟾酥具有广泛的药理活性,但是目前对于蟾酥中所含成分调控血管张力的活性认知存在一定的分歧。陈瀛澜等^[2]对蟾酥的药理作用研究综述指出,蟾酥中的脂溶性成分如蟾毒配基类化合物主要表现为强心作用,并能升高血压;而其中所含的水溶性成分则主要表现为降血压作用。相反地,厉旭云等^[7]发现中成药华蟾素注射液作为中华大蟾蜍全皮提取物的水溶性制剂,能够引起L型电压依赖性钙离子通道的开放、胞外Ca²⁺内流而导致血管平滑肌收缩。课题组前期采用大鼠离体胸主动脉血管环灌流模型对蟾酥提取物及《中国药典》2020年版中蟾酥的3个指标成分(华蟾酥毒基、脂蟾毒配基和蟾毒灵)制成的混合对照品溶液分别进行了活性评价,发现蟾酥提取物表现为血管收缩与舒张的双向调控作用,而混合对照品溶液仅表现为血管舒张效应。

基于此,本研究针对目前蟾酥研究中存在的主要问题,如蟾酥提取物对血管舒缩功能的具体调控作用、蟾酥提取物水溶性和脂溶性成分的调控作用差异及其发挥调控效应的潜在药效成分组成等,利

用离体生物能量信号采集系统结合UHPLC-Q TOF-MS/MS联用方法,通过评价蟾酥提取物及其不同极性洗脱部位以及其中的主要成分,较为全面地揭示蟾酥提取物对于血管舒缩的具体调控作用及其潜在效应成分组成,为蟾酥的后续研究提供可靠的数据支撑。

1 材料

1.1 样品与试剂

蟾酥提取物,由浙江康恩贝制药股份有限公司提供,批号T180501;腺苷(adenosine,批号20210601)、次黄嘌呤(hypoxanthine,批号GL01-INLO)购自北京百瑞极生物科技有限公司;L-肾上腺素(*L*-adrenaline,批号02011408)购自北京迈瑞达科技有限公司;5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,批号BA08064603)购自北京博奥森生物科技有限公司;华蟾毒它灵(cinobufotalinL,批号PS010795)购自成都普思生物科技股份有限公司;和蟾蜍它灵(gamabufotalinL,批号DST200920-075)、去乙酰华蟾毒精(desacetylcinobufagin,批号DST200901-144)、脂蟾毒精(bufogenin,批号DST200913-064)购自德思特生物公司;沙蟾毒精(arenobufagin,批号RFS-S06801909026)、蟾毒灵(bufalin,批号RFS-C02711801020)、蟾毒它灵(bufotaline,批号RFS-C05801902027)、远华蟾蜍精(telocinobufagin,批号RFS-L09511809010)、华蟾酥毒基(cinobufagin,批号RFS-H06101908016)、酯蟾毒配基(resibufogenin,批号RFS-Z04111812016)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;以上对照品的质量分数均≥98%;无水磷酸二氢钠(NaH₂PO₄,批号K12J10L92760)、无水硫酸镁(MgSO₄,批号S11D10Y105346)、D-葡萄糖(*D*-glucose,批号K1714004)购自源叶生物公司;碳酸氢钠(NaHCO₃,批号20160414)、无水氯化钙(CaCl₂,批号

20180716) 购自北京化工厂; 氯化钾 (KCl, 批号 20200529) 购自天津市光复科技发展有限公司; 氯化钠 (NaCl, 批号 20190719) 购自北京拜尔迪生物技术有限公司; 二甲基亚砷(DMSO, 批号 24117007) 购自美国 Corning 公司; MCI GEL CHP20/P120 树脂, 购自日本三菱化学公司; 乙醇为分析纯, 购自北京化工厂; 乙腈为质谱级, 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 甲酸为质谱级, 购自美国 Sigma 公司; 去离子水由 Milli-Q 纯水系统自制。

1.2 仪器

SV-4 离体组织器官灌流装置、BL-420N 张力传感器、HW-500 超级恒温水浴锅, 成都泰盟软件有限公司; 1290 超高效液相色谱、安捷伦 6550 离子漏斗四极杆飞行时间串联质谱仪 (G6550A), 配有自动采样器 (G42262A)、二极管阵列检测器 (G4212A)、四元泵 (G4220A)、柱温箱 (G1316C), 美国安捷伦公司; Practum SQP 电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.3 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 7 周龄, 体质量 (260±20) g, 购自北京维通利华实验动物科技有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2016-0006。实验期间, 动物可自由进食进水, 室温 (25±2) °C, 湿度 (50±5) % 保持稳定, 动物房内每天光照和黑暗交替循环各 12 h。动物实验经北京中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号为 No.4-2020010103-10045)。

2 方法

2.1 样品制备

称取蟾酥提取物 0.5 g, 用 2 mL 95% 乙醇完全溶解, 命名为 CS-TE; 采用湿法填柱的方法, 将 MCI 树脂填料均匀装填于内径 2 cm、长 25 cm 的玻璃管中; 将蟾酥提取物样品上柱, 依次采用 3 倍柱体积的水、30% 乙醇溶液、50% 乙醇溶液、70% 乙醇溶液及 95% 乙醇溶液进行洗脱, 收集洗脱液, 得到 5 个不同极性的流分。分别真空干燥得到用于血管活性评价及成分分析的后续实验样品, 依次命名为 Fr-0、Fr-30、Fr-50、Fr-70 及 Fr-95。

2.2 离体大鼠胸主动脉血管环的制备

SD 大鼠脱颈处死后, 快速打开胸腔取出胸主动脉, 置于 4 °C 的改良 Krebs-Henseleit (K-H, 118 mmol/L 氯化钠、4.7 mmol/L 氯化钾、2.5 mmol/L 氯化钙、1.2 mmol/L 磷酸二氢钠、1.2 mmol/L 硫酸镁、25 mmol/L 碳酸氢钠、10 mmol/L 葡萄糖, pH 7.4)

溶液中^[8]。清洗血管并小心剔除周围的结缔组织, 分割为长度 3~5 mm 的血管环。随后, 将血管环悬挂于盛有 10 mL K-H 溶液并持续通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的 (37.0±0.5) °C 恒温浴槽中。在无张力的状态下平衡 15 min, 之后调节基础张力为 2 g 平衡 1 h, 期间每 15 分钟更换 1 次 K-H 溶液。待平衡结束后, 以 KCl 溶液 (50 mmol/L) 重复刺激血管环 2 次, 若 2 次收缩幅度差值 < 10% 证明血管活性良好, 可以进行实验。

2.3 CS-TE 对大鼠胸主动脉血管环的影响

选择活性良好的大鼠胸主动脉血管环, 在血管环静息状态下加入 10 μL CS-TE, 使浴槽中样品的终质量浓度为 25 μg/mL, 记录给药前后血管环的张力变化情况, 并建立时间-收缩率响应曲线。将静息状态下的血管环张力定义为基础张力, 记为 T₀; 加入样品后血管环的张力记为 T_x。

$$\text{大鼠胸主动脉收缩率} = (T_x - T_0) / T_0$$

2.4 蟾酥提取物不同极性洗脱部位对大鼠胸主动脉血管环的影响

选择活性良好的大鼠胸主动脉血管环, 在静息或高钾溶液预收缩状态下, 依次向不同恒温浴槽中加入一定量的 Fr-0、Fr-30、Fr-50、Fr-70 及 Fr-95 溶液, 分别记录给药前后血管环的张力变化情况, 初步判断蟾酥提取物不同极性洗脱部位对于血管舒缩的影响。

2.5 Fr-0 对静息状态下大鼠胸主动脉血管环的收缩活力考察

选择活性良好的大鼠胸主动脉血管环, 在静息状态下, 采用累积加药法依次向恒温浴槽中加入 10 μL 不同质量浓度的 Fr-0 溶液, 给药间隔 5 min, 使浴槽中样品质量浓度分别达到 5、10、20、40、80、160 μg/mL, 记录给药前后血管环的张力变化情况, 并绘制浓度-收缩率响应曲线。

2.6 Fr-70 对 KCl 预收缩状态下的大鼠胸主动脉血管环的舒张活力考察

利用 KCl (50 mmol/L) 诱导大鼠胸主动脉血管环收缩, 随后采用累积加药法依次向恒温浴槽中加入 10 μL 不同质量浓度的 Fr-70 溶液, 给药间隔 10 min, 使浴槽中样品质量浓度分别达到 5、10、20、40、80、160 μg/mL。对照组加入相同体积的 DMSO。记录给药前后血管环的张力变化情况, 并绘制浓度-舒张率响应曲线。将静息状态下的血管环张力定义为基础张力, 记为 T₀, KCl 诱导收缩平衡后的张力记为 T_{KCl}, 加入样品后的张力记为 T_x。

大鼠胸主动脉舒张率 = $(T_{KCl} - T_x) / (T_{KCl} - T_0)$

2.7 Fr-0 及 Fr-70 成分解析

2.7.1 供试品溶液的制备 准确称取一定量浓缩干燥后的 CS-TE、Fr-0 及 Fr-70 样品, 分别以 2 mL 70% 甲醇溶液完全溶解, 配制成 1.0 mg/mL 的各样品溶液母液, 随后分别移取上述样品溶液 100 μ L, 用 70% 甲醇溶液定容至 1 mL, 过 0.22 μ m 滤膜, 即得。

2.7.2 对照品溶液的制备 准确称取一定量 L-肾上腺素、次黄嘌呤、腺苷、5-羟色胺、华蟾毒它灵、和蟾蜍它灵、去乙酰华蟾毒精、脂蟾毒精、沙蟾毒精、蟾毒灵、蟾毒它灵、远华蟾蜍精、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基对照品, 以 70% 甲醇溶液溶解, 分别配制成 1.0 mg/mL 的单一对照品溶液母液, 备用。依次量取上述各对照品溶液母液 50 μ L 于 2 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇溶液定容, 过 0.22 μ m 滤膜, 即得。

2.7.3 色谱条件 Acquity UPLC[®] HSS T3 柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~4 min, 95%~77% A; 4~12 min, 77%~55% A; 12~19 min, 55%~45% A; 19~22 min, 45%~30% A; 22~24 min, 30%~5% A; 24~25 min, 5% A。进样体积 2 μ L, 体积流量 0.4 mL/min, 柱温 35 $^{\circ}$ C。

2.7.4 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 扫描范围 m/z 100~1700 (MS), 50~1500 (MS/MS), 正负离子模式检测, 毛细管电压分别为 4 kV (ESI⁺) 和 -3.5 kV (ESI⁻), 干燥器温度 230 $^{\circ}$ C, 干燥器体积流量 1.5 L/min, 鞘气温度 300 $^{\circ}$ C, 鞘气体积流量 12 L/min, 雾化器压力 344.7 kPa (50 psi), 碰撞能量 10~40 eV, 采样频率 0.25 s。

2.8 Fr-0 及 Fr-70 中主要成分对大鼠胸主动脉血管环舒缩的影响

选择活性良好的大鼠胸主动脉血管环, 依次考察 Fr-0 及 Fr-70 中的 14 个主要成分对血管环舒缩功能的影响。分别精密称取一定量的 L-肾上腺素、腺苷、次黄嘌呤、5-羟色胺, 以水溶解配制成质量浓度为 10 mg/mL 的单一化合物母液。在血管环静息状态下, 分别吸取上述样品母液 50 μ L 加入到浴槽中, 使各样品终质量浓度为 50 μ g/mL, 记录给药后的张力变化。随后, 分别精密称取一定量的华蟾毒它灵、和蟾蜍它灵、去乙酰华蟾毒精、脂蟾毒精、沙蟾毒精、蟾毒灵、蟾毒它灵、远华蟾蜍精、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基, 以 DMSO 溶解配制成质量浓度为 50 mg/mL 的单一化合物母液。利用 KCl (50 mmol/L) 诱导大鼠胸主动脉血管环收缩, 待收缩稳定后, 依次吸取上述样品母液 10 μ L 加入到浴槽中, 使各样品最终质量浓度为 50 μ g/mL, 对照组加入 10 μ L DMSO, 记录给药后的张力变化。

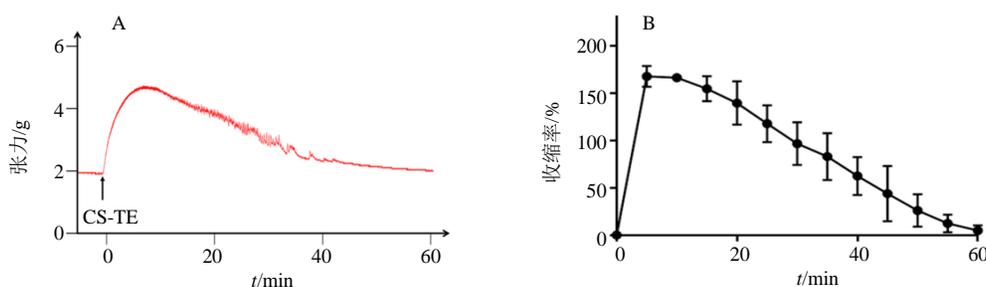
2.9 数据的统计与分析

各数据均采用 IBM SPSS Statistics 20 统计软件处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同组别之间的数据分析采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test), $P < 0.05$ 表示数据结果具有显著的统计学差异。

3 结果

3.1 CS-TE 双向调控静息状态下的大鼠胸主动脉血管环

如图 1-A 所示, 向静息状态下的离体大鼠胸主动脉血管环浴槽中加入 CS-TE (25 μ g/mL) 后, 大鼠胸主动脉血管环的张力首先迅速升高, 之后随时



A-原始采样数据 B-时间-收缩率响应曲线
A-original sampling data B-time-contraction rate curve

图 1 蟾酥提取物 (25 μ g mL⁻¹) 对静息状态下大鼠胸主动脉血管环的影响 (n = 6)

Fig. 1 Effects of *Bufonis Venenum* extract (25 μ g mL⁻¹) on thoracic aortic rings in resting tension (n = 6)

间的推移其张力缓慢下降并逐渐恢复至初始状态,表明 CS-TE 对静息状态下的大鼠胸主动脉血管环表现出先收缩后舒张的双向调控作用。图 1-B 为 CS-TE 作用下血管环的时间-收缩率响应曲线,由图中可以看出,在 5~10 min 时 CS-TE 诱导的血管环张力达到最大值,60 min 时 CS-TE 诱导的血管环几乎舒张至初始状态,表明引起血管收缩的效应成分发挥作用迅速而引起血管舒张的效应成分发挥作用较为平稳。

3.2 Fr-0 诱导静息状态下的大鼠胸主动脉血管环收缩

如图 2-A 所示,采用累积加药法向悬挂有离体大鼠胸主动脉血管环的恒温浴槽中加入 Fr-0 (蟾酥提取物水洗脱部位)后,短时间内血管环的收缩张力明显升高,且随着浴槽中 Fr-0 质量浓度的不断增

大,血管环的收缩作用逐渐增强,呈现出收缩率与剂量的正向相关性;并且当 Fr-0 的质量浓度为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,血管环的收缩张力达到最大值。由图 2-B 的 Fr-0 浓度-张力响应曲线可以计算出,当 Fr-0 质量浓度为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与初始状态下的张力相比,Fr-0 引起的张力收缩率为 $(275.42 \pm 25.54)\%$ 。

3.3 Fr-70 诱导 KCl 预收缩的大鼠胸主动脉血管环舒张

如图 3-A 所示,离体大鼠胸主动脉血管环在 KCl 溶液 (50 mmol/L) 诱导下,其张力迅速升高,并逐渐保持稳定;随后,采用累积加药法向恒温浴槽中不断加入 Fr-70,由 KCl 诱导的血管环收缩逐步被抑制;当浴槽中 Fr-70 质量浓度达到 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其对于预收缩血管环的抑制率达到最大值。由图 3-B 中结果可以计算出,当浴槽中 Fr-70 质量浓

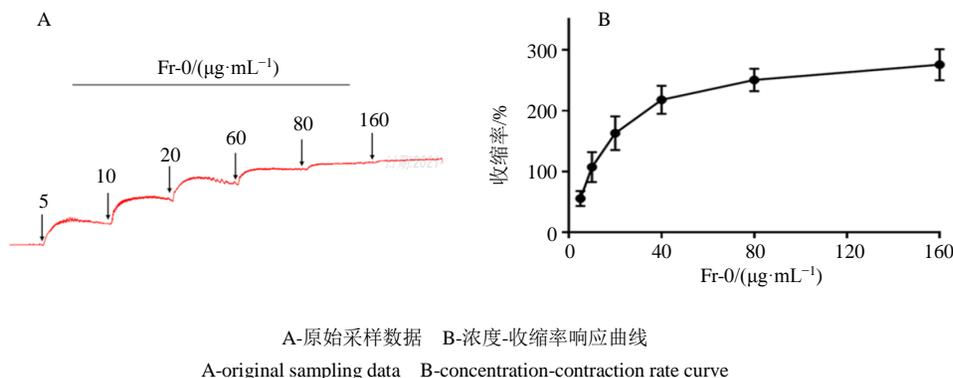


图 2 蟾酥提取物水洗脱部位 (Fr-0) 对静息状态下大鼠胸主动脉血管环的影响 ($n = 6$)

Fig. 2 Effects of water eluting part of *Bufo venenum* extract (Fr-0) on tension on thoracic aortic rings in resting tension ($n = 6$)

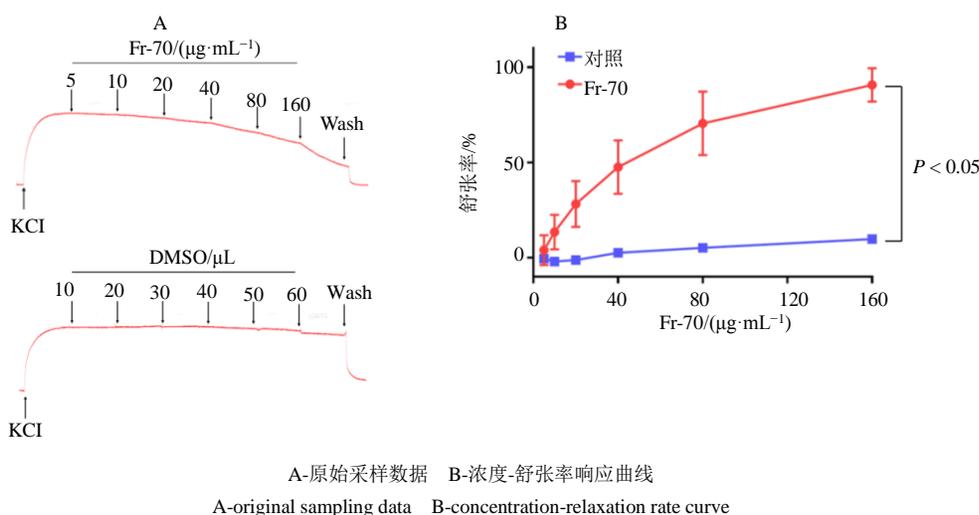


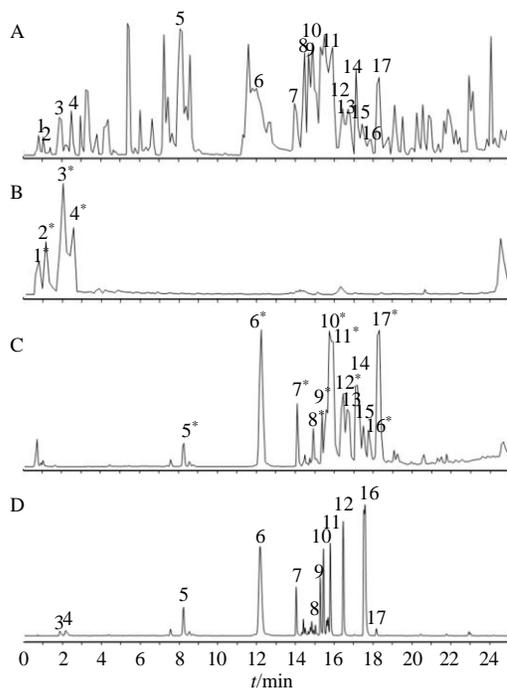
图 3 蟾酥提取物 70% 乙醇洗脱部位 (Fr-70) 对 KCl 诱导的大鼠胸主动脉血管环收缩的抑制 ($n = 6$)

Fig. 3 Effects of of 70% ethanol eluting part of *Bufo venenum* extract (Fr-70) on tension in KCl pre-contracted aortic rings ($n = 6$)

度为 160 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其对于预收缩血管环的舒张率达到 (90.78 \pm 8.73) %。图 3 结果表明, Fr-70 中存在一些成分能够有效地抑制由外界抗原引起的血管环收缩, 从而表现出血管舒张效应。

3.4 CS-TE、Fr-0 及 Fr-70 谱图信息对比

如图 4 所示, 蟾酥提取物中成分信息十分丰富, 均匀的分布在整个洗脱的时间范围内; 而蟾酥提取物的水洗脱部位 (Fr-0) 的成分主要集中在前 3 min, 共包含有 4 个主要成分; 蟾酥提取物 70% 乙醇洗脱部位 (Fr-70) 的成分主要分布在 8~19 min, 共包含有 13 个主要成分。进一步将蟾酥提取物及其洗脱部位的质谱图与蟾酥提取物的色谱图对比可以看出, 有 12 个成分既有较好的离子化效率, 同时也具有较强的紫外吸收, 很可能是蟾酥提取物不同极性洗脱部位中发挥效应的主要成分。



A-正离子模式下 CS-TE 的总离子流图 B-正离子模式下 Fr-0 的总离子流图 C-正离子模式下 Fr-70 的总离子流图 D-315 nm 波长下 CS-TE 的色谱图 *表示与对照品比较 (下同)

A-total ion chromatogram (TIC) of CS-TE in positive mode B-TIC of Fr-0 in positive mode C-TIC of Fr-70 in positive mode D-chromatogram of CS-TE at 315 nm *represents for those components which was compared with reference substances (same as below)

图 4 蟾酥提取物 (CS-TE) 及其水洗脱部位 (Fr-0)、70% 乙醇洗脱部位 (Fr-70) 谱图信息

Fig. 4 Spectrogram information of *Bufonis Venenum* extract (CS-TE) and its water eluting part (Fr-0) and 70% ethanol eluting part (Fr-70)

3.5 Fr-0 及 Fr-70 中主要成分的质谱解析

由图 4 结果可知, 在 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈组成的流动相体系中, 蟾酥提取物及其洗脱流分均具有较好的峰形及分离度。进一步对比正负离子模式下上述各样品的出峰情况, 发现正离子模式下, 化合物无论是出峰数量或离子化效率均表现更佳, 因此对 Fr-0 及 Fr-70 中化合物的解析选择在正离子模式下进行。成分解析过程中, 利用在线数据库 (PubMed、SciFinder) 实时监测及离线数据库 (TCMSP) 成分信息汇总等方式, 结合 UHPLC-Q TOF-MS/MS 中测定的成分一级精确相对分子质量、二级碎片离子信息及化合物的色谱信息, 进一步通过对碎片离子裂解方式推导, 并与数据库及文献比对, 同时借助化合物疏水常数 (ClogP) 等辅助鉴定方法, 对图 4-B (Fr-0) 及图 4-C (Fr-70) 中的 17 个主要成分进行了鉴定, 图 5 为所鉴定的 17 个化合物在正离子模式下的二级质谱图, 表 1 为所鉴定化合物的具体信息。同时, 在鉴定结果中有 14 个化合物通过与对照品的色谱保留时间及质谱裂解规律进行比对而确认, 所鉴定的化合物的误差范围均在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 以内。为进一步明确 Fr-0 及 Fr-70 中发挥血管舒缩调控效应的成分组成, 接下来对 Fr-0 中的 4 个成分及 Fr-70 中具有较强紫外吸收的 10 个成分进行活性评价。

3.6 Fr-0 诱导大鼠胸主动脉血管环收缩的效应成分确认

选取 Fr-0 中鉴定所得的 4 个主要成分, 依次向恒温浴槽中分别加入 L-肾上腺素、腺苷、次黄嘌呤、5-羟色胺样品 (50 $\mu\text{g/mL}$) 后, 如图 6-A 所示, L-肾上腺素及 5-羟色胺能够显著且较为迅速地引起静息状态下的血管环收缩, 而腺苷及次黄嘌呤无此作用。同时, 由图 6-B 结果可以看出, L-肾上腺素及 5-羟色胺引起的血管环收缩率分别为 (257.73 \pm 35.73) % 及 (41.68 \pm 3.29) %, 表明同等浓度条件下, L-肾上腺素对血管环的收缩效应更强。

3.7 Fr-70 抑制大鼠胸主动脉血管环收缩的效应成分确认

选取 Fr-70 中鉴定所得的 10 个具有较强紫外吸收的主要成分, 对于 KCl (50 mmol/L) 诱导收缩状态下的血管环收缩的影响, 依次向恒温浴槽中分别加入 50 $\mu\text{g/mL}$ 上述 10 个样品后, 如图 7-A-1~10 所示, 华蟾毒它灵、去乙酰华蟾毒精、脂蟾毒精、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基 5 个成分表现出较好的血管环舒张

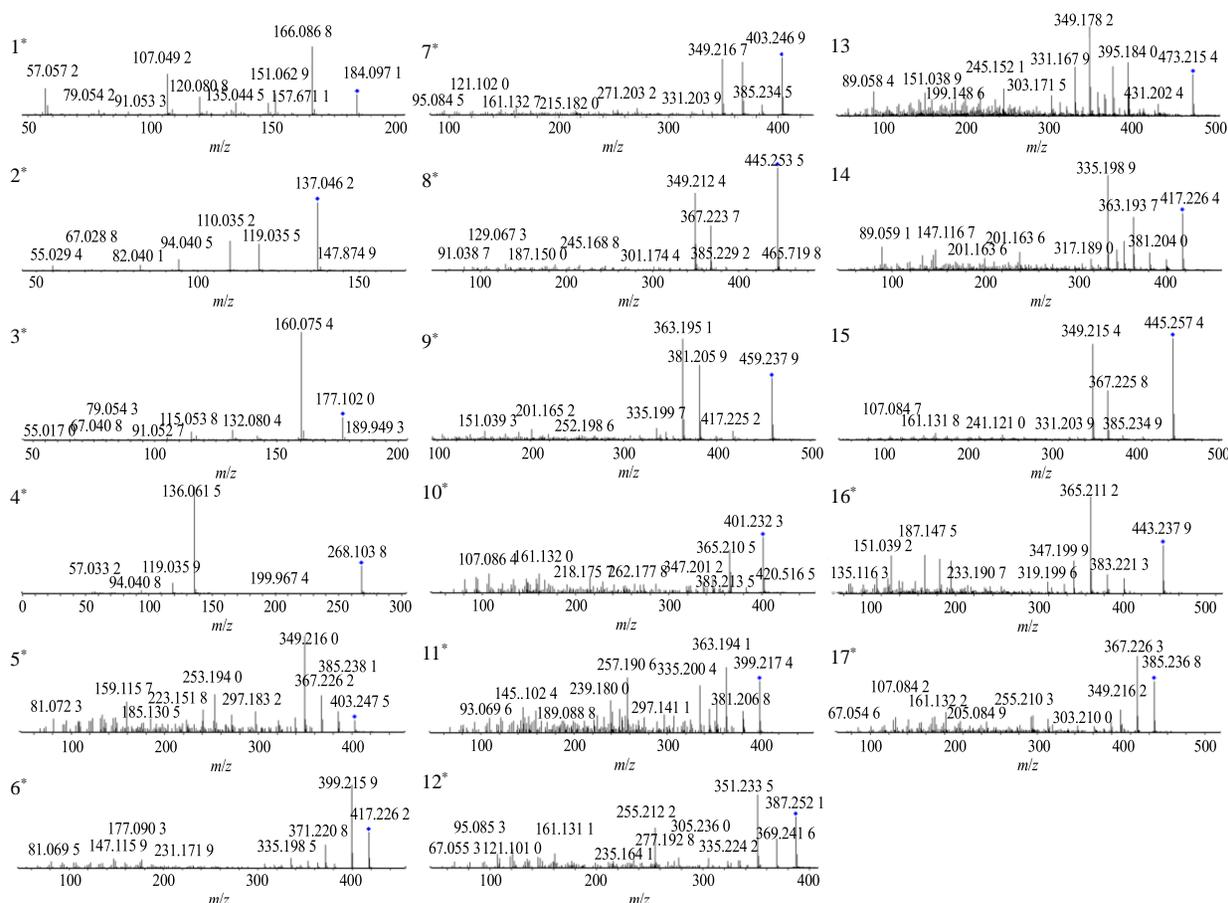


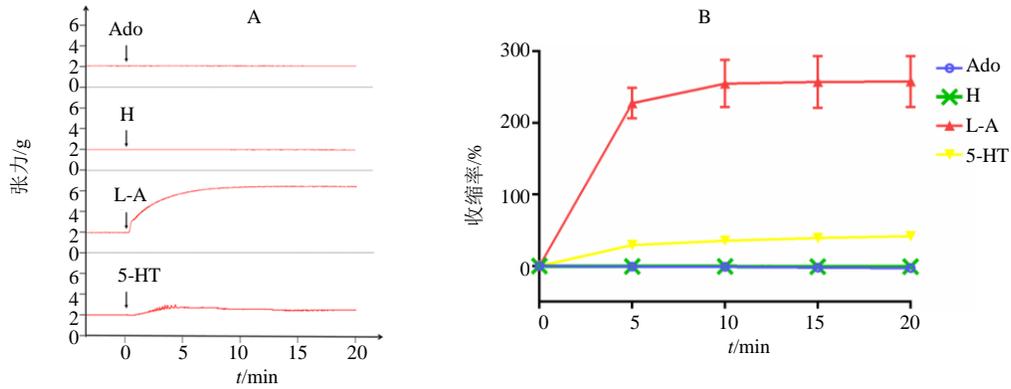
图5 蟾酥提取物水洗脱部位 (Fr-0) 及 70%乙醇洗脱部位 (Fr-70) 中 17 个成分在正离子模式下的二级质谱图

Fig. 5 Spectrograms (MS/MS) of 17 identified components in water eluting part (Fr-0) and 70% ethanol eluting part (Fr-70) of *Bufo venenum* extract (positive mode)

表 1 蟾酥提取物水洗脱部位和 70%乙醇洗脱部位中主要成分的 UHPLC-Q TOF-MS/MS 解析

Table 1 Main components of Fr-0 and Fr-70 identified by UHPLC-Q TOF-MS/MS

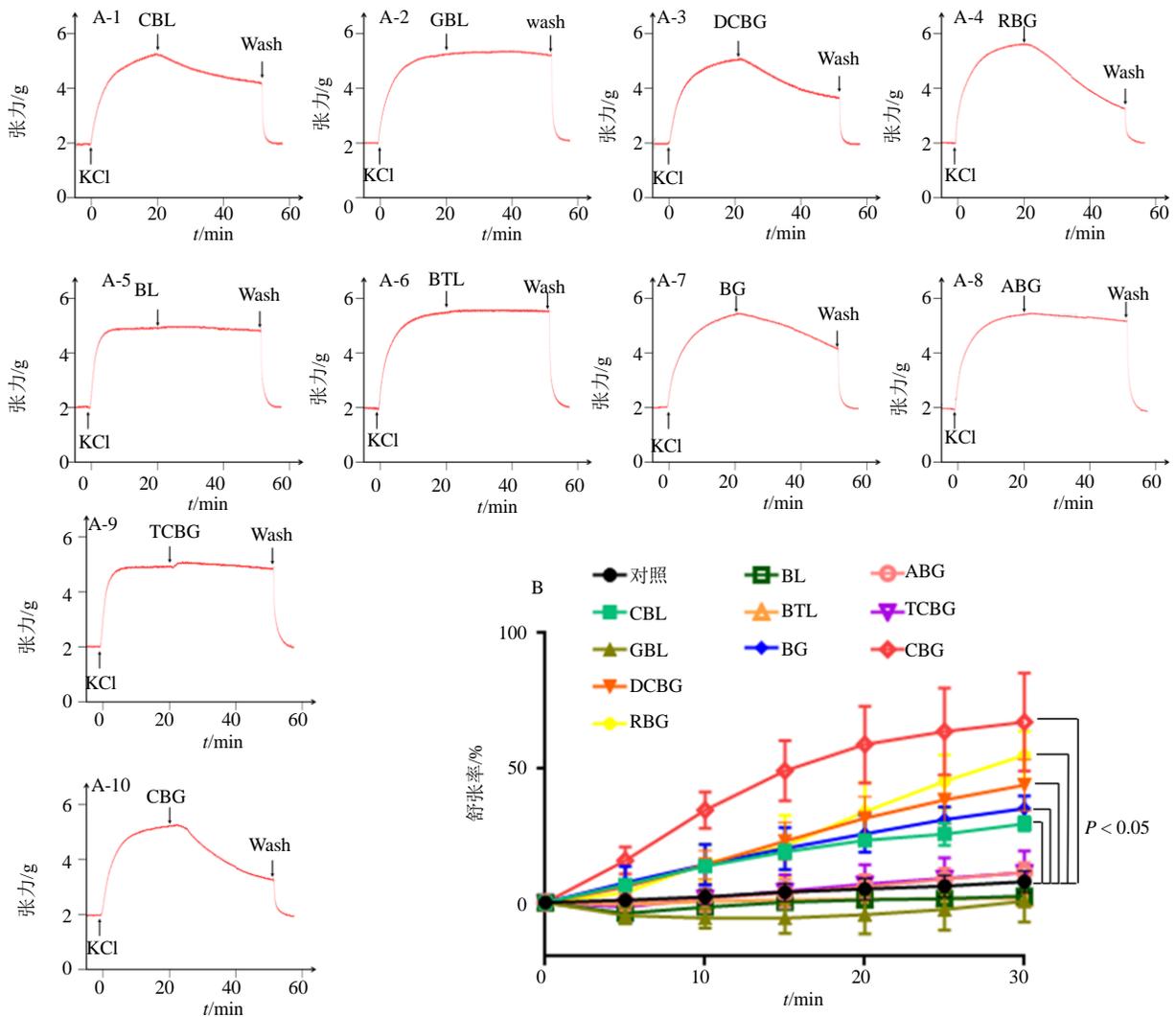
峰号	t_R /min	分子式	离子模式	相对分子质量 (m/z)		误差/ $(\times 10^{-6})$	碎片离子 (m/z)	化合物
				理论值	实测值			
1*	0.794	C ₉ H ₁₃ NO ₃	[M+H] ⁺	184.097 1	184.096 8	-1.52	166.086 8, 151.069 2, 107.049 2	L-肾上腺素
2*	1.057	C ₅ H ₄ N ₄ O	[M+H] ⁺	137.046 2	137.045 9	-3.01	119.035 5, 110.035 2, 94.040 5	次黄嘌呤
3*	2.124	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	177.102 0	177.102 2	1.35	160.075 4, 132.080 4, 115.053 8	5-羟色胺
4*	2.607	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	268.103 8	268.103 9	0.86	136.061 5, 119.035 9, 94.040 8	腺苷
5*	8.080	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	[M+H] ⁺	403.247 5	403.247 9	0.99	385.238 1, 367.226 2, 349.216 0, 253.194 0	和蟾蜍它灵
6*	12.456	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	[M+H] ⁺	417.226 2	417.227 2	2.31	399.215 9, 371.220 8, 335.198 5	沙蟾毒精
7*	14.234	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	[M+H] ⁺	403.246 9	403.247 9	0.99	385.234 1, 367.225 6, 349.215 1	远华蟾蜍精
8*	14.984	C ₂₆ H ₃₆ O ₆	[M+H] ⁺	445.257 8	445.258 5	1.49	367.223 7, 349.212 4	蟾毒它灵
9*	15.242	C ₂₆ H ₃₄ O ₇	[M+H] ⁺	459.237 3	459.237 7	0.94	417.225 2, 381.205 9, 363.195 1	华蟾毒它灵
10*	15.417	C ₂₄ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	401.232 3	401.232 3	0.01	365.210 5, 347.201 2, 215.175 7	去乙酰华蟾毒精
11*	15.599	C ₂₄ H ₃₀ O ₅	[M+H] ⁺	399.216 5	399.216 6	0.25	381.206 8, 363.194 1, 335.200 4, 257.190 6	脂蟾毒精
12*	16.500	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	[M+H] ⁺	387.252 6	387.253 0	1.00	369.246 1, 351.233 5, 255.212 2	蟾毒灵
13	16.806	C ₂₆ H ₃₂ O ₈	[M+H] ⁺	473.215 9	473.217 0	2.31	395.184 0, 377.174 0, 349.178 2, 331.167 9	19-氧-华蟾毒它灵
14	17.146	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	[M+H] ⁺	417.226 4	417.227 2	1.83	381.204 0, 363.193 7, 335.198 9	去乙酰华蟾毒它灵
15	17.462	C ₂₆ H ₃₆ O ₆	[M+H] ⁺	445.257 4	445.258 5	1.49	367.225 8, 349.215 4	3-乙酰-和蟾蜍它灵
16*	17.723	C ₂₆ H ₃₄ O ₆	[M+H] ⁺	443.242 4	443.242 8	0.94	383.221 3, 365.211 2, 347.199 9, 187.147 5	华蟾酥毒基
17*	18.234	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	[M+H] ⁺	385.236 8	385.237 3	1.39	385.236 8, 367.226 3, 349.216 2	酯蟾毒配基



Ado-腺苷 H-次黄嘌呤 L-A-L-肾上腺素 5-HT-5-羟色胺; A-原始采样数据 B-时间-收缩率响应曲线(下图同)
Ado-adenosine H-hypoxanthine L-A-L-adrenaline 5-HT-5-hydroxytryptamine A-original sampling data B-time-contraction rate curve (same as below)

图6 Fr-0中4种主要成分对静息状态下大鼠胸主动脉环的影响 (n = 6)

Fig. 6 Effects of four components contained in Fr-0 on thoracic aortic rings in resting tension condition (n = 6)



CBL-华蟾毒它灵 GBL-和蟾蜍它灵 DCBG-去乙酰华蟾毒精 RBG-酯蟾毒配基 BL-蟾毒灵 BTL-蟾毒它灵 BG-脂蟾毒精 ABG-沙蟾毒精
TCBG-远华蟾蜍精 CBG-华蟾酥毒基
CBL-cinobufotalin GBL-gamabufotalin DCBG-desacetylcinobufagin RBG-resibufogenin BL-bufalin BTL-Bufotaline BG-bugogenin ABG-arenobufagin TCBG-telocinobufagin CBG-cinobufagin

图7 Fr-70中10种主要成分对KCl诱导收缩状态下的大鼠胸主动脉血管环的舒张效应 (n = 6)
Fig. 7 Effects of 10 components contained in Fr-70 on KCl pre-contracted aortic rings (n = 6)

作用,能够有效地抑制由 KCl 诱导的血管环收缩;而和蟾蜍它灵、蟾毒灵、蟾毒它灵、沙蟾毒精和远华蟾蜍精与对照相比,未表现出明显的血管环舒张效果。进一步对图 7-B 中的结果分析可以看出,同等浓度下,华蟾酥毒基对于血管环的舒张效果最优,舒张率可达(67.07±18.17)%;酯蟾毒配基其次,舒张率为(54.77±8.79)%;去乙酰华蟾毒精、脂蟾毒精及华蟾毒它灵对于血管环的舒张率分别为(43.66±9.53)%、(34.98±4.59)%和(29.28±4.59)%。

4 讨论

本研究通过对比蟾酥提取物及其不同极性洗脱部位对静息状态下或高钾溶液预收缩状态下血管环的舒缩调控作用发现,蟾酥提取物对静息状态下的离体大鼠胸主动脉血管环表现出先收缩后舒张的双向调控作用;其水洗脱部位主导血管环收缩,70%乙醇洗脱部位主导血管环舒张;而其余极性洗脱部位效果较弱或几乎无作用。由此表明,基于不同溶剂提取所得的蟾酥提取物,可能在离体血管环上反映出不同的调控效应,这可能是目前对于蟾酥调控血管活性认知产生分歧的主要原因所在。

进一步利用 UHPLC-Q TOF-MS/MS 对上述发挥血管调控作用的成分解析发现,蟾酥提取物水洗脱部位发挥血管收缩作用的主要成分为蟾蜍的内源性化合物,其中肾上腺素能够作用于血管平滑肌上的 α_1 受体而开放受体操纵性钙通道(receptor operated calcium channel, ROCC),或激活肌浆网上三磷酸肌醇受体(inositol triphosphate receptor, IP₃R),使肌浆网内存储的 Ca²⁺ 释放到细胞质中,引起胞质内 Ca²⁺ 水平升高,进而导致血管收缩^[9];而 5-羟色胺作为动物体内的一种神经递质,其进入血液后能够引起血管平滑肌细胞的增殖和收缩,从而最终调控血管收缩,其机制与 5-HT_{2A} 受体、磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)/蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)/大鼠肉瘤蛋白同源物(rat sarcoma homologue, Rho) 通路以及 L 型电压依赖性钙通道(L-voltage dependent calcium channel, L-VDCC) 和钙池操纵性钙通道(store operated calcium channel, SOCC) 相关的钙调控有关^[10]。同时,蟾酥提取物 70%乙醇洗脱部位中发挥血管舒张作用的成分主要为蟾蜍二烯羟酸内脂类,其中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基是《中国药典》2020 年版中蟾酥的指标性成分,也被认为是蟾酥发挥强心作用的主要效应成分,其机制可能与抑制心肌细胞膜上 Na⁺, K⁺-ATP 酶、促

进三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)合成、影响 L 型电压依赖性钙离子通道、增加动作电位有关^[11-15]。此外,根据文献调研可知,通过释放血管内皮舒张因子一氧化氮(nitric oxide, NO),激活可溶性鸟腺苷环化酶(soluble guanosine cyclase, sGC),引起环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)升高,继而激活 cGMP 依赖性蛋白激酶(GMP-dependent protein kinase, PKG),抑制细胞内 Ca²⁺动员,降低胞内的 Ca²⁺浓度是华蟾素发挥血管舒张调控作用的主要机制^[7],因此,蟾酥中发挥血管舒张作用的成分很有可能是通过该机制发挥调控效应。

综上,本研究不仅明确了蟾酥提取物对于血管舒缩活性的具体调控效应,同时系统揭示了发挥上述调控作用的主要效应成分组成,为蟾酥调控血管的科学认识提供了数据支撑,同时也为中药单味药多成分作用于同一器官的多靶点协同拮抗调控效应提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1088.
- [2] 陈瀛澜, 郝艳艳, 郭夫江, 等. 蟾酥化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2579-2588.
- [3] 喻昌燕, 孟令杰, 姜念, 等. 蟾皮化学成分和药理活性的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1206-1220.
- [4] 孙崇峰, 范圣此, 罗毅, 等. 蟾酥化学成分及其人工合成的研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3183-3192.
- [5] 林植云, 蓝天, 沈子悦, 等. 蟾酥的有效成分及药理作用概述 [J]. 生物学教学, 2018, 43(1): 4-5.
- [6] 应金琴, 杨明, 张普照, 等. 蟾酥的炮制历史沿革、化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3529-3539.
- [7] 厉旭云, 陆源, 单绮娴, 等. 华蟾素对大鼠胸主动脉的缩血管作用及其机制 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2006, 35(2): 178-181.
- [8] Gan L, Wang Z H, Zhang H, *et al.* Endothelium-independent vasorelaxant effect of 20(S)-protopanaxadiol on isolated rat thoracic aorta [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(12): 1555-1562.
- [9] Kopetz V, Kennedy J, Heresztyn T, *et al.* Endothelial function, oxidative stress and inflammatory studies in chronic coronary slow flow phenomenon patients [J]. *Cardiology*, 2012, 121(3): 197-203.

- [10] 王昊, 邓春玉, 饶芳, 等. 5-羟色胺诱导冠状动脉收缩的机制研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(5): 825-831.
- [11] Fedorova L V, Raju V, El-Okdi N, *et al.* The cardiotonic steroid hormone marinobufagenin induces renal fibrosis: Implication of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(4): F922-F934.
- [12] Wansapura A N, Lasko V, Xie Z, *et al.* Marinobufagenin enhances cardiac contractility in mice with ouabain-sensitive alpha1 Na⁺-K⁺-ATPase [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(6): H1833-H1839.
- [13] Cheng C J, Lin C S, Chang L W, *et al.* Perplexing hyperkalaemia [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(11): 3320-3323.
- [14] Dmitrieva R I, Bagrov A Y, Lalli E, *et al.* Mammalian bufadienolide is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage [J]. *Hypertension*, 2000, 36(3): 442-448.
- [15] Bick R J, Poindexter B J, Sweney R R, *et al.* Effects of Chan Su, a traditional Chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes: Cardiotoxicity due to more than Na⁺, K⁺-ATPase blocking [J]. *Life Sci*, 2002, 72(6): 699-709.

[责任编辑 潘明佳]