

微毛诃子对家兔胸主动脉环的作用及其机制

杨盛春, 赖泳*, 杜月, 李代航, 莽朝永
(大理学院药学与化学学院, 云南 大理 671000)

[摘要] **目的:**研究微毛诃子甲醇提取物和乙醇提取物对家兔离体胸主动脉环的作用并探讨其可能的作用机制。**方法:**采用累积加药法,观察0.01~0.08 g·mL⁻¹微毛诃子对家兔离体胸主动脉环血管张力的影响;观察乙酰胆碱、酚妥拉明预处理对0.01 g·mL⁻¹微毛诃子缩血管作用的影响;采用Ca²⁺剥夺和复加法,观察0.01 g·mL⁻¹微毛诃子对细胞内钙释放和外钙内流动脉收缩作用的影响。**结果:**微毛诃子甲醇提取物浓度依赖性对内皮完整的家兔胸主动脉环收缩幅度低于内皮不完整的收缩幅度($P < 0.05$),乙醇提取物对内皮完整的家兔胸主动脉环收缩幅度高于内皮不完整的收缩幅度($P < 0.05$),且具有浓度依赖性;0.01 g·mL⁻¹的微毛诃子的甲醇提取物或乙醇提取物均可使乙酰胆碱(Ach, 1×10^{-5} mol·L⁻¹)、酚妥拉明(10 mg·L⁻¹)预舒张的血管条收缩;维拉帕米(1×10^{-7} mol·L⁻¹)预处理可消除0.01 g·mL⁻¹微毛诃子甲醇提取物的缩血管作用;在无Ca²⁺液中,0.01 g·mL⁻¹的微毛诃子甲醇提取物对去内皮主动脉环的收缩幅度显著低于有Ca²⁺液中的收缩幅度($P < 0.05$)。**结论:**微毛诃子甲醇提取物和乙醇提取物对家兔离体胸主动脉均有收缩作用;其缩血管作用可能与M受体及 α 受体有关;微毛诃子甲醇提取物的收缩作用具有内皮依赖性,可能与其促使血管平滑肌细胞外Ca²⁺内流进入细胞有关。

[关键词] 微毛诃子醇提取物; 缩血管; 胸主动脉环; 乙酰胆碱; 酚妥拉明; 维拉帕米

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0134-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130134

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1529.017.html>

[网络出版时间] 2014-05-13 15:29

Effect and Mechanism of *Terminalia chebula* var. *tomentella* on Rabbit Thoracic Aorta

YANG Sheng-chun, LAI Yong*, DU Yue, LI Dai-hang, MANG Chao-yong
(Dali University of Pharmacy and Chemical Institute, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of methanol extract (ME) and ethanol extract (EE) of *Terminalia chebula* var. *tomentella* on rabbit thoracic aorta and to discuss the preliminary mechanism. **Method:** The method of cumulative dosing (concentration of extracts increased from 0.01 g·mL⁻¹ to 0.08 g·mL⁻¹, respectively.) was used to observe the influence on the tension of rabbit thoracic aorta. The effect of extracts of *T. chebula* var. *tomentella* (0.01 g·mL⁻¹) on vasoconstrictive action after acetylcholine and phentolamine pretreatment, in the absence of calcium and increasing calcium the effect of extracts *T. chebula* tomentella (0.01 g·mL⁻¹) on arterial systole was observed under the condition of intracellular calcium release and calcium influx. **Result:** The influence of ME on contraction extent of isolating thoracic aorta with endothelium was not obvious compared with the thoracic aorta without endothelium ($P < 0.05$). The action of EE was more obvious $P < 0.05$ and showed concentration dependent. ME (0.01 g·mL⁻¹) and EE (0.01 g·mL⁻¹) all depressed the predilated vascular strips by acetylcholine-induced (1×10^{-5} mol·L⁻¹) and phentolamine-induced (10 mg·L⁻¹), respectively. The vasoconstrictor effect of ME (0.01 g·mL⁻¹) was inhibited by verapamil. In the absence of Ca²⁺ solution, the

[收稿日期] 20131024(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81241139);云南省重点产业创新工程项目(2008IF012)

[第一作者] 杨盛春, 讲师, 从事有机合成和光谱分析研究, E-mail: dlyangsc@sohu.com

[通讯作者] * 赖泳, 教授, 硕士生导师, 从事中药药理、临床药理, Tel: 0872-2257412, Fax: (0872)2257401, E-mail: laiyong8879@163.com

contraction amplitude in endothelium-denuded aorta rings treated by ME ($0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) was significantly lower than those of contraction in Ca^{2+} solution ($P < 0.05$). **Conclusion:** ME and EE has contraction effect on rabbit thoracic aorta and the mechanism of vasoconstrictor effect may be in connection with M receptor, α -receptor and Ca^{2+} .

[**Key words**] alcohol extraction liquid of *Terminalia chebula* var. *tomentella*; contraction; thoracicaorta; acetylcholine; phentolamine; verapamil

诃子是一种高大乔木类落叶植物,属于使君子科,主产于马来西亚、印度、缅甸等国,我国云南、西藏、广东、广西等地均有分布。诃子具有抗菌、强心、抗氧化、抗肿瘤、抗过敏、抗休克、抗心绞痛等多种药理作用^[1]。在民间用途广泛,但迄今为止对诃子的药理研究较少,现有文献也过多的局限于诃子原种的研究,尚未见对其变种药理研究。本实验使用的是诃子的原变种微毛诃子的甲醇、乙醇提取物,观察其对家兔离体胸主动脉环的作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 家兔,雄性,体质量 $2.7 \sim 3.0 \text{ kg}$,由大理学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(滇)2010-0003。

1.2 药品、试剂 微毛诃子于2013年3月采自云南临沧市耿马县孟定镇,经大理学院生药教研室张德全副教授鉴定为诃子的原变种微毛诃子^[2] *Terminalia chebula* var. *tomentella*。实验前,将新鲜药材晒干,粉碎。称取微毛诃子根皮和枝叶的混合物 50 g ,分别用甲醇和乙醇回流提取、过滤、浓缩后,得到 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙醇提取物和 $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甲醇提取物,即 1 g 浸膏相当于 4 g 原药材,冷藏备用。

乙酰胆碱(ACh, Solarbio 公司),去甲肾上腺素(NE,自广州明兴制药厂,批号 840731-1),维拉帕米(verapamil,上海禾丰制药有限公司,批号 120401),酚妥拉明(phentolamine,上海旭东海普药业有限公司,批号 100403),其余试剂为国产市售分析纯。K-H液($\text{NaCl } 6.9 \text{ g}$, $\text{KCl } 0.35 \text{ g}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.16 \text{ g}$, $\text{NaHCO}_3 2.1 \text{ g}$, $\text{CaCl}_2 0.28 \text{ g}$, $\text{glucose } 2 \text{ g}$,临用前配置)。

1.3 仪器 BL-420E⁺ 生物机能实验系统、HW-400E 恒温平滑肌槽、张力换能器(成都泰盟电子有限公司)。

2 方法

2.1 家兔胸主动脉环的制备与稳定 按文献[3]方法。健康家兔用 10% 水合氯醛 $850 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip 麻醉后,迅速游离胸主动脉置通以 $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ 混合气体的 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ K-H 液中,洗净残血,剔除外膜脂

肪及结缔组织,将血管条剪成约 $3 \sim 4 \text{ mm}$ 宽的血管环,避免过度牵拉以损伤内皮,可根据实验需要,用棉签磨擦血管环内表面,以去除内皮细胞。设置 BL-420E⁺ 生物机能实验系统各项参数,将处理好的血管环一端固定在通气钩,另一端连接张力换能器,放入含 20 mL K-H 液的浴槽内,持续通以 $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ 的混合气体,先在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 0.5 g 张力状态下稳定 15 min 后,将静息张力调至 2.0 g ,稳定 90 min ,期间每 20 min 换液 1 次,记录血管环张力变化。

记录一段正常曲线,用 $\text{KCl}(60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ 重复刺激 3 次检验动脉环的收缩性,收缩幅度相差 $< 10\%$ 的可用于实验。用 ACh 检验血管内皮活性:待动脉环稳定后,换液 1 次,浴槽中加入 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 去甲肾上腺素(NE),收缩达峰值 15 min 后,加入乙酰胆碱 ACh($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 检验血管内皮完整程度(预收缩的血管舒张程度 $> 90\%$,可认为内皮完整,舒张程度 $< 10\%$ 则认为去除内皮成功)。

2.2 分组及处理

2.2.1 对血管环基础张力的影响 当内皮完整或去除内皮的血管环在静息状态下稳定后,采用累积加药方法,每隔 10 min 加入微毛诃子乙醇或甲醇提取物(预先溶于 K-H 液),使恒温浴槽内药物质量浓度分别达 $0.01, 0.02, 0.04, 0.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,记录血管环张力变化。

2.2.2 对 ACh($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预舒张的内皮完整血管环张力的影响 当内皮完整的血管环达稳定状态,用 ACh($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预舒张血管达稳定后,加入微毛诃子甲醇或乙醇提取物使浴槽内药物质量浓度为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,观察其对 ACh($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预舒张内皮完整血管环张力的影响。

2.2.3 对酚妥拉明($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 预舒张的内皮完整血管环张力的影响 内皮完整的血管达稳定状态,用酚妥拉明($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 预舒张血管达稳定后,加入微毛诃子甲醇或乙醇提取物使浴槽内药物质量浓度为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,观察其对酚妥拉明($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 预舒张内皮完整血管环张力的影响。

2.2.4 维拉帕米对微毛诃子甲醇、乙醇提取物缩血

管作用的影响^[4] 去内皮的兔胸主动脉环用 0.01 g·mL⁻¹的微毛诃子甲醇提取物或乙醇提取物作用 15 min 后,加入 1 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹维拉帕米,观察血管环张力的变化。

2.2.5 无钙 K-H 液对微毛诃子甲醇提取物、乙醇提取物的作用 去内皮的大鼠主动脉环,分别在正常 K-H 液及无钙 K-H 液中孵育 30 min 后,加入微毛诃子甲醇提取物或乙醇提取物至药物质量浓度为 0.01 g·mL⁻¹,观察血管环张力的变化。

2.3 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,微毛诃子甲醇提取物或乙醇提取物对内皮完整与去内皮兔胸主动脉环张力的作用比较采用两因素方差分析,其余两组间均数比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性。以下收缩率均为血管环加药前后张力之差与去甲肾上腺素收缩张力的比值,用百分数表示。

3 结果

3.1 微毛诃子甲醇、乙醇提取物对内皮完整和不完整主动脉环的收缩作用 在内皮完整及去内皮的主动脉环,微毛诃子甲、乙醇提取物在 0.01 ~ 0.06 g·mL⁻¹均可使主动脉环张力呈浓度依赖性升高,0.08 g·mL⁻¹主动脉环张力开始下降,与空白对照组相比,均有显著性差异 (*P* < 0.05)。最大收缩率达 65%。微毛诃子甲醇提取物(0.01 ~ 0.08 g·mL⁻¹)对去内皮的主动脉环的收缩作用大于内皮完整的主动脉环 (*P* < 0.01)。微毛诃子乙醇提取物(0.01 ~ 0.08 g·mL⁻¹)对内皮完整的主动脉环的收缩作用大于去内皮的主动脉环 (*P* < 0.01)。如图 1,2 所示。

3.2 ACh, 酚妥拉明预处理对微毛诃子甲醇和乙醇提取物作用的影响 内皮完整的血管环达稳定状

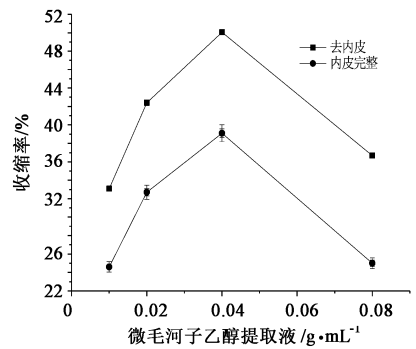


图 1 微毛诃子甲醇提取物对主动脉环的收缩作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

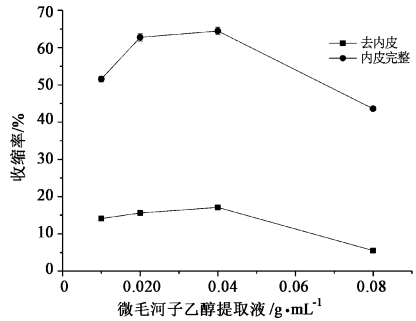


图 2 微毛诃子乙醇提取物对主动脉环的收缩作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

态,分别用 ACh (1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹)、酚妥拉明 (10 mg·L⁻¹) 预舒张血管达稳定后,加入微毛诃子甲醇提取物 0.01 g·mL⁻¹对主动脉环的收缩率分别为 (90.94 ± 2.11)%, (85.7 ± 1.3)%, 显著高于未处理的血管环的收缩率 (24.6 ± 0.33)% (*P* < 0.01); ACh (1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹)、酚妥拉明 (10 mg·L⁻¹) 预处理后加入微毛诃子乙醇提取物至 0.01 g·mL⁻¹对主动脉环的收缩率分别为 (8.09 ± 0.11)%, (12.6 ± 0.18)%, 显著低于未处理的血管环的收缩率 (33.02 ± 0.52)% (*P* < 0.05), 如表 1。

表 1 0.01 g·mL⁻¹微毛诃子醇提取物对 ACh 和酚妥拉明预处理内皮完整血管环的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度 / g·mL ⁻¹	孵育前	收缩率 / %	
			ACh	Phe
微毛诃子甲醇提取物	0.01	24.6 ± 0.33	90.94 ± 2.11 ²⁾	12.6 ± 0.18 ¹⁾
微毛诃子乙醇提取物	0.01	33.02 ± 0.52	8.09 ± 0.11 ¹⁾	85.7 ± 1.3 ¹⁾

注:与未加试剂预处理比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01。

3.3 维拉帕米预处理对微毛诃子甲醇和乙醇提取物作用的影响 去内皮的兔胸主动脉环用 0.01 g·mL⁻¹的微毛诃子甲醇或乙醇提取物作用 15 min 后,加入 1 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹维拉帕米,其中甲醇提取物组主动脉环的收缩幅度 (67.8 ± 0.39)% 显著高于未处理的血管环的收缩幅度 (9.9 ± 0.22)% (*P* < 0.01); 乙醇提取物组主动脉环的收缩幅度 (22.05 ± 0.29)% ,与未处理的血管环的收缩幅度比较无显著变化 (8.7 ± 0.12)% ,如表 2。

3.4 无钙 K-H 液对微毛诃子甲醇和乙醇提取物作用的影响 微毛诃子甲醇提取物 (0.01 g·mL⁻¹) 在无 Ca²⁺ 的 K-H 液中引起的血管环收缩率 (29.1 ± 0.17)% 明显低于在正常 K-H 液中的收缩率 (41.4 ± 0.11)% (*P* < 0.05); 微毛诃子乙醇提取物 (0.01 g·mL⁻¹) 在无 Ca²⁺ 的 K-H 液 (含 1 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ EGTA) 中引起的血管环收缩 (17.6 ± 0.09)% 与正常 K-H 液中的收缩幅度 (15.6 ± 0.1)% 无显著差异,如表 2。

表2 Verapamil 和外 Ca^{2+} 内流对 $0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 微毛诃子缩血管作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	收缩率/%			
		孵育前	有钙	无钙	Ver
微毛诃子甲醇提取物	0.01	9.9 ± 0.22	41.4 ± 0.11	$29.1 \pm 0.17^{2)}$	$67.8 \pm 0.39^{1)}$
微毛诃子乙醇提取物	0.01	8.7 ± 0.12	15.6 ± 0.1	17.6 ± 0.09	22.05 ± 0.29

注:与孵育前(未加试剂预处理)比较¹⁾ $P < 0.05$;与有 Ca^{2+} 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

本实验通过家兔离体胸主动脉环的张力变化,观察微毛诃子甲醇或乙醇提取物对血管环张力的影响,发现对内皮完整和去内皮的兔胸主动脉环,微毛诃子甲醇提取物或乙醇提取物都可以引起血管收缩,而甲醇提取物对血管内皮不完整的收缩作用更强,乙醇提取物对血管内皮完整的收缩作用更强,由此表明微毛诃子甲醇或乙醇提取物均有直接作用于血管平滑肌而导致血管收缩的作用,且微毛诃子乙醇提取物更大程度上依赖于内皮。乙酰胆碱(ACh)主要作用于血管平滑肌 M 胆碱受体^[5],其使 M 胆碱受体激动从而使血管舒张,预先用乙酰胆碱作用于血管平滑肌使血管舒张后,观察微毛诃子提取物对血管环张力的影响,发现微毛诃子甲醇或乙醇提取物对血管的收缩幅度与未加 ACh 前比较均具有差异性,因此表明微毛诃子甲醇或乙醇提取物的缩血管机制可能与其抑制血管平滑肌上的 M 胆碱受体有关。酚妥拉明主要作用于血管平滑肌上的 α 受体^[6],其抑制 α 受体从而使血管舒张,预先用酚妥拉明处理血管使其舒张后,观察微毛诃子提取物对血管环张力的影响,发现微毛诃子甲醇或乙醇提取物对血管的收缩幅度与未加药前比较均具有差异性,由此表明微毛诃子甲醇或乙醇提取物的缩血管机制可能与血管平滑肌上的 α 受体有关。已知血管平滑肌细胞内 Ca^{2+} 增高是引起血管平滑肌收缩的必要条件。平滑肌收缩所需要的 Ca^{2+} 来源于细胞外 Ca^{2+} 内流和细胞内 Ca^{2+} 释放,通过电压依赖性钙通道(voltage-dependent Ca^{2+} channel, VDC)的 Ca^{2+} 内流是其中的主要途径^[7]。在本实验无 Ca^{2+} 液中,微毛诃子甲醇提取物的作用明显减弱,提示微毛诃子甲醇提取物收缩血管的作用可能依赖于细胞外 Ca^{2+} 内流;L 型 VDC 阻滞剂维拉帕米明显减弱微毛诃子甲醇提取物作用,进一步表明微毛诃子甲醇提取物可能通过引起 L 型 VDC 的开放、细胞外 Ca^{2+} 内流而导致血管收缩。在本实验无 Ca^{2+} 液中,微毛诃子乙醇提取物的收缩作用无明显差异性,提示微毛诃子乙醇提取物收缩血管的作用可能不依赖于细胞外 Ca^{2+} 内流;L 型 VDC 阻滞剂维拉帕米减弱

微毛诃子乙醇提取物作用无明显差异性,进一步表明微毛诃子乙醇提取物的收缩机制可能与 L 型 VDC 的开放、胞外 Ca^{2+} 内流无关。

研究表明,微毛诃子甲醇提取物与微毛诃子乙醇提取物对血管均具收缩作用,但其收缩机制有所区别。提取物甲醇的脂溶性大于乙醇,因此其提取的成分有异^[8-9],由此可以看出微毛诃子中含有不同成分致使其对主动脉具有收缩作用,可对其进行进一步研究。

综上所述,本实验首次发现了微毛诃子甲醇或乙醇提取物的血管收缩作用,并发现其缩血管机制可能与其抑制血管平滑肌上的 M 受体、兴奋血管平滑肌上的 α 受体有关;微毛诃子甲醇提取物的缩血管机制还可能与血管平滑肌上的 L 型 VDC 的开放而导致的细胞外 Ca^{2+} 内流有关。

[参考文献]

- [1] 蔡小华,谢兵,杜海军,等. 微毛诃子化学成分及药理作用的研究进展[J]. 药学进展,2008,32(5):212.
- [2] 杨永康,格桑索朗,吴家坤,等. 微毛诃子、毛微毛诃子和余甘子的植物分类研究和药学特性综述[J]. 中国医学生物技术应用杂志,2004,14(1):14.
- [3] 杨彩玉,安希文,付伟,等. 香青兰总黄酮对大鼠离体胸主动脉的舒张作用[J]. 生物物理学报,2010,26(4):334.
- [4] 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.
- [5] 王雯,朱盈芬,蒋东桥,等. 植物雌激素-玉米赤霉醇对大鼠胸主动脉血管的舒张效应[J]. 中国临床康复,2006,10(23):87.
- [6] 管福兰,王汝俊,王建华,等. 枳壳及辛弗林对兔离体小肠运动的影响[J]. 中药药理与临床,2002,18(2):9.
- [7] Karakih, Ozakih, Horim, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle [J]. Pharmacol Rev, 1997,49(2):157.
- [8] 栗世婷,何琳,周武杰,等. 不同提取条件下对微毛诃子中鞣质含量的影响[J]. 药物临床,2008,32(1):26.
- [9] 丁冈,刘延泽,韩全斌,等. 微毛诃子属植物化学成分与生物活性研究进展[J]. 国外医药:植物分册,1996,11(6):255.

[责任编辑 聂淑琴]