

隔山香正丁醇部位对大鼠胸主动脉的舒张作用及机制的影响

刘宇¹, 银杉杉¹, 刘磐¹, 邓丽红¹, 闫福曼², 张双伟³, 张军^{1*}

(1. 广州中医药大学 新药开发研究中心, 广州 510006;

2. 广州中医药大学 基础医学院, 广州 510006;

3. 广州医科大学 附属第二医院 心血管疾病研究所, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究隔山香(Lemonfragrant Angelica Root, LAR)正丁醇部位对大鼠胸主动脉环的舒张作用,并探讨其可能的作用机制。**方法:**采用离体大鼠胸主动脉血管环灌流方法,考察 0.34, 0.65, 1.22 g·L⁻¹ 隔山香正丁醇部位对氯化钾(KCl)和去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)预收缩的血管环张力的影响。在无 Ca²⁺ Kreb's 液中,考察 0.34, 0.65, 1.22 g·L⁻¹ 隔山香正丁醇部位对氯化钙(CaCl₂)量效曲线的影响和 NE 预收缩的血管环张力的影响。激光共聚焦扫描显微镜检测平滑肌细胞内[Ca²⁺]_i的变化。**结果:**隔山香正丁醇部位对 KCl 和 NE 预收缩的内皮完整和去除内皮血管环均具有浓度依赖性的舒张作用(P<0.01),并且去除内皮后的舒张作用未受影响;无 Ca²⁺ 条件下,隔山香正丁醇部位能使 CaCl₂, NE 预收缩强度显著性降低(P<0.01)。激光共聚焦扫描显微镜下,隔山香正丁醇部位(1.22 g·L⁻¹)能抑制 KCl, NE 和毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)引起的平滑肌细胞内[Ca²⁺]_i升高。**结论:**隔山香正丁醇部位对大鼠胸主动脉血管有一定的舒张作用,可能通过抑制外钙内流和内钙释放发挥作用。本实验为隔山香水蒸气蒸馏后煎煮入药的成药制备工艺和水溶性药效指标成分的分离提供了依据。

[关键词] 隔山香正丁醇部位; 胸主动脉环; 平滑肌细胞; 激光扫描共聚焦; 作用机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0139-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030139

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1600.020.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 16:00

Relaxation Effects and Mechanisms of *n*-Butanolic Fraction of Lemonfragrant Angelica Root on Rat Thoracic Aorta

LIU Yu¹, YIN Shan-shan¹, LIU Pan¹, DENG Li-hong¹, YAN Fu-man², ZHANG Shuang-wei³, ZHANG Jun^{1*}

(1. *Development & Research Center of New Chinese Drugs, Guangzhou University of Chinese Medicine,*

Guangzhou 510006, China; 2. *Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine,*

Guangzhou 510006, China; 3. *Institute of Cardiovascular Disease, the Second Affiliated*

Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relaxation effects and mechanisms of *n*-butanolic fraction of Lemonfragrant Angelica Root (LAR) on rat thoracic aorta. **Method:** Thoracic aortic ring perfusion in isolated rats was used to observe the effect of *n*-butanolic fraction on tension changes of aorta rings preshrunk by KCl and norepinephrine (NE). In Ca²⁺-free kreb's solution, the effects of *n*-butanolic fraction on Calcium chloride concentration-response curves and the tension changes shrunk by NE were investigated. Confocal laser scanning microscope was used to detect the changes of smooth muscle cells (VSMCs) [Ca²⁺]_i. **Result:** The *n*-butanolic

[收稿日期] 20160308(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274191);国家自然科学基金青年科学基金项目(81503523);广东省应用型科技研发专项资金项目(2016B020239005)

[第一作者] 刘宇,在读硕士,从事中药新药研究与开发, Tel:020-39356997, E-mail:1030534701@qq.com

[通讯作者] *张军,博士,研究员,博士生导师,从事中药新药研究与开发, Tel:020-39356997, E-mail:zhjxsh@aliyun.com

fraction of LAR relaxed the KCl and NE-induced contraction of aortic rings, either with or without intact endothelium, in a concentration-dependent manner, and there was no effect on relaxation after after endothelium-denuding. In Ca^{2+} -free solution, *n*-butanolic fraction of LAR significantly reduced the CaCl_2 and NE-induced contraction of aortic rings. Under confocal laser scanning microscope, *n*-butanolic fraction of LAR ($1.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) could inhibit the increase of smooth muscle cells (VSMCs) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by KCl, NE and thapsigargin (TG).

Conclusion: *n*-Butanolic fraction of LAR may relax the tension of aorta rings, probably by inhibiting the influx calcium and calcium release. This study provided evidence for the production techniques of LAR decoction after steam distillation and separating the water-soluble efficacy mark components.

[Key words] *n*-butanolic fraction of LAR; thoracic aorta rings; VSMCs; confocal laser scanning; mechanisms

隔山香为伞形科植物隔山香的根或全株,其味辛、微苦,性平,有疏风清热、祛痰止咳、活血散瘀、行气止痛的功效,用于治疗心绞痛、腹痛、胃痛、跌打损伤等疾病^[1]。隔山香是我国特有物种,文献记载最早见于清代《植物名实图考(下)》^[2]。《中药大辞典》、《全国中草药汇编》及地方本草著作如《广西实用中草药新选》亦有收载隔山香药材的功效与应用^[3-5]。国家中药部颁标准中护心胶囊^[6]以本品为主药。现代药理研究表明,隔山香具有镇咳、祛痰、抗炎、抑菌等药效^[7-8],但隔山香药材及其成分对心血管药理的研究很少。本课题组的前期研究^[9]发现隔山香的石油醚部位和乙酸乙酯部位均具有较强的舒张血管作用以及隔山香药材中的低级性苯丙素类成分——异芹菜脑对大鼠胸主动脉血管环具有内皮性依赖的舒张作用,为药材和成药中异芹菜脑的质量控制提供了依据。但对于隔山香高极性部位——正丁醇部位的化学成分和药效学研究尚属空白,该研究与其水煎汤剂入药的药效物质关联性更强,亦有助于解释隔山香水蒸气蒸馏后煎煮入药的制备工艺合理性。本文在文献研究和前期工作的基础上从器官及细胞水平上对隔山香药材正丁醇部位的药效活性进行研究,证实了该部位所代表的高极性成分的活性,为从该部位分离隔山香水溶性药效指标成分提供了依据。

1 材料

JZ100 型张力换能器(0~10 g,北京新航兴业科贸有限公司),BL-420E⁺型生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司),ZC-10 型智能型超级恒温水槽(上海奥尔科特生物有限公司),CP225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司),SQG-4 型四脏器官浴槽系统(成都仪器厂),Forma3111 型恒温培养箱(Thermo 公司),CKX41 倒置电子显微镜(Olympus 公司),TGL-16G 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器

厂),SW-CJ-2G 型双人净化工作台(苏州净化设备有限公司),TCS SP5 型激光扫描共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)。

隔山香药材购于广西玉林,样品经广州中医药大学中药鉴定教研室黄海波副教授鉴定为隔山香植物 *Ostericum citriodorum* 的根或全株。隔山香正丁醇部位为广州中医药大学新药开发研究中心制备。去甲肾上腺素(NE,批号 045K0891),乙酰胆碱(Ach,批号 033K2604),乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA,批号 100789653),二甲基亚砜(DMSO,批号 RNBD5826),thapsigargin(TG,毒胡萝卜素,批号 20170607)均购自美国 Sigma 公司;盐酸维拉帕米注射液(上海禾丰制药有限公司,批号 43141201);胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司,批号 10099141);DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司,批号 AXM75422);青链霉素、二性霉素 B(广州瑞舒生物试剂有限公司,批号均为 20140626);0.25% 胰蛋白酶(中国医学科学院生物医学工程研究院,批号 20140624);fluo-3/AM(钙离子荧光探针,美国 Invitrogen 公司,批号 F6142);其余 NaCl, KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , Glucose, MgSO_4 , CaCl_2 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 等均试剂为分析纯。

SPF 级 SD 大鼠,雌雄不限,体重 150~180 g,购自广州中医药大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(粤)2013-0020。A7r5 血管平滑肌细胞购自中国科学院上海生命科学研究院。

2 方法

2.1 隔山香有效部位的制备 取隔山香药材 1 kg,碎成粗粉,用 10 倍量 80% 乙醇加热回流提取 3 次,滤过,合并提取液并减压浓缩得到总浸膏,再加适量水稀释,依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取多次至萃取完全,正丁醇萃取液减压浓缩至稠膏,冷冻干燥,冷藏备用。

2.2 隔山香正丁醇部位对离体大鼠胸主动脉血管环张力的影响

2.2.1 离体大鼠胸主动脉血管环的制备 取 SD 大鼠 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 迅速取其胸主动脉放入已通混合氧气 (95% O₂ 和 5% CO₂) 的 Krebs' s 液 (NaCl 119 mmol·L⁻¹, KCl 4.7 mmol·L⁻¹, KH₂PO₄ 1.2 mmol·L⁻¹, NaHCO₃ 25 mmol·L⁻¹, Glucose 11 mmol·L⁻¹, MgSO₄ 1.2 mmol·L⁻¹, CaCl₂ 1.6 mmol·L⁻¹, ddH₂O 溶解) (4 °C 预冷) 中, 小心剔除血管壁周围的脂肪和其他组织, 将其中段剪成 3 ~ 4 mm 长的血管环。去除内皮的血管, 用与血管环内径相适的自制棉签摩擦血管环内壁表面。将血管环一端固定, 另一端连于张力换能器, 放入含 Krebs' s 液的浴槽 (37 °C) 内, 持续通入混合氧气, 使用 BL-420E⁺ 型生物信号采集分析系统记录血管环的张力变化。在 37 °C, 0.3 g 张力状态下缓慢调节张力直至 1.5 g, 达 1.5 g 后平衡 20 min, 再调节张力为 1.5 g 并继续平衡 20 min, 期间每隔 20 min 更换新鲜的 Krebs' s 液。待血管张力达到稳定值后, 浴槽中加入 1×10^{-5} mol·L⁻¹ NE 使主动脉血管环收缩, 待收缩稳定后加入 1×10^{-5} mol·L⁻¹ Ach, 若血管舒张幅度 > 80%, 可认为内皮完整, 舒张幅度 < 10%, 则认为内皮去除完整, 进行后续实验。

2.2.2 隔山香正丁醇部位对 KCl, NE 引起的主动脉血管环收缩的影响 当内皮完整或去除内皮的主动脉血管环在 Krebs' s 液中平衡好并稳定后, 用 KCl (60 mmol·L⁻¹) 或 NE 预收缩主动脉血管达到稳态后, 记录张力值, 分别往浴槽内加入 0.34, 0.65, 1.22 g·L⁻¹ 的隔山香正丁醇部位, 等体积的 Krebs' s 液, DMSO 对照溶液 (前期已证明 DMSO 1% 以内均不会影响血管张力), 分别观察 30 min, 每 10 min 记录 1 次张力值。

2.2.3 在无 Ca²⁺ Krebs' s 液中, 隔山香正丁醇部位对 CaCl₂ 收缩血管的影响 在去内皮血管环上, 血管内皮检验完并且平衡结束后, 将 Krebs' s 液更换为无 Ca²⁺ Krebs' s 液 (NaCl 119 mmol·L⁻¹, KCl 4.7 mmol·L⁻¹, KH₂PO₄ 1.2 mmol·L⁻¹, NaHCO₃ 25 mmol·L⁻¹, Glucose 11 mmol·L⁻¹, MgSO₄ 1.2 mmol·L⁻¹, 双蒸水溶解), 继续平衡 30 min 以上, 使细胞外钙离子被充分络合后加入无 Ca²⁺ 高钾 Krebs' s 液 (NaCl 119 mmol·L⁻¹, KCl 60 mmol·L⁻¹, KH₂PO₄ 1.2 mmol·L⁻¹, NaHCO₃ 25 mmol·L⁻¹, Glucose 11 mmol·L⁻¹, MgSO₄ 1.2 mmol·L⁻¹, 双蒸水

溶解)。不同质量浓度的隔山香正丁醇部位 (0.34, 0.65, 1.22 g·L⁻¹) 分别预处理 10 min 后, 不断累积加入 0.01, 0.03, 0.10, 0.30, 1.0, 3.0 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 加入间隔时间约为 10 min, 等体积 DMSO 溶液作为空白组, 维拉帕米 (1.0 μmol·L⁻¹) 作为阳性组。记录血管环张力的变化。

2.2.4 在无 Ca²⁺ Krebs' s 液中, 隔山香正丁醇部位对 NE 引起主动脉环收缩的影响 在内皮去除干净的胸主动脉血管环上, 血管内皮检验完并且平衡结束后, 将 Krebs' s 液更换为无 Ca²⁺ Krebs' s 液, 继续平衡 30 min 以上。不同浓度的隔山香正丁醇部位 (0.34, 0.65, 1.22 g·L⁻¹) 分别预处理 10 min 后, 加入 NE (10^{-5} mol·L⁻¹), 以等体积的 DMSO 溶液作为空白溶液。记录血管环张力的变化。

2.2.5 数据处理分析 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析, 组内前后比较用配对 *t* 检验, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。检验结果以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。血管舒张率计算公式如下。

舒张率 = (最大收缩张力 - 给药后对应时间点的收缩张力) / (最大收缩张力 - 基础张力) × 100%

2.3 激光共聚焦扫描显微镜检测平滑肌细胞内 [Ca²⁺]_i 的变化

2.3.1 A7r5 平滑肌细胞的培养及传代 A7r5 血管平滑肌细胞用含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 在 37 °C, 5% CO₂ 恒温孵箱内常规培养, 待 A7r5 血管平滑肌细胞生长至亚融合状态时, 以 0.25% 的胰酶消化后, 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基重悬细胞, 吹打均匀, 接种到新的培养瓶中, 常规培养。取对数生长期的细胞进行实验。

2.3.2 Fluo-3/AM 的检测原理 Fluo-3/AM 是目前最常用的检测细胞内 [Ca²⁺]_i 的荧光探针, 是第 3 代敏感钙荧光指示剂。Fluo-3/AM 的自身荧光非常弱, 且不会受 [Ca²⁺]_i 变化的影响, 但当 Fluo-3/AM 进入细胞后, 可被细胞内的非特异性酯酶剪切形成游离的 Fluo-3, 从而被滞留在细胞内, 当 Fluo-3 与胞浆内的游离钙离子结合, 荧光强度可迅速增加 60 至 80 倍, 特别适用于观察和检测瞬时动态的 [Ca²⁺]_i 的变化。其最大激发波长为 506 nm, 最大发射波长为 526 nm。实际检测时, 使用的激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 ~ 530 nm。

2.3.3 Fluo-3/AM 的负载 Fluo-3/AM 用无水 DMSO 配成 1 mmol·L⁻¹ 的储备液, -20 °C 避光保

存。使用时储备液加 Hank's ($\text{NaCl } 8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KCl } 4.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{NaHCO}_3 0.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Glucose } 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 0.098 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 0.222 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 液 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O } 0.126 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 双蒸水溶解) 或 D-Hank's 液 ($\text{NaCl } 8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KCl } 4.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{NaHCO}_3 0.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Glucose } 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O } 0.126 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 双蒸水溶解) 稀释。生长良好的细胞接 petri 皿, 培养 24 h 后用 Hank's 或 D-Hank's 液洗涤, 加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fluo-3/AM 荧光探针负载, 37°C 条件下避光孵育 40 min, 倒掉负载液, 再用 Hank's 液或 D-Hank's 液洗涤 3 次, 再孵育 10 min 后加入 Hank's 液或 D-Hank's 液 2 mL 进行检测。

2.3.4 参数设置 将负载好的细胞的置于激光扫描共聚焦显微镜的载物台上, 选择形态佳, 贴壁好, 3~5 min 内保持荧光值稳定的细胞 (单个或 3~5 个) 进行检测。20 倍物镜下, 激发光的波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm。扫描参数设置: 每隔 5 s 扫描 1 次。X-Y-T 扫描获得实验数据。

表 1 隔山香正丁醇萃取部位对 KCl, NE 引起的血管环收缩的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别		KCl					
		质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$			去除内皮		
		10 min	20 min	30 min	10 min	20 min	30 min
空白	-	2.90 ± 2.64	6.13 ± 2.85	9.10 ± 4.13	1.54 ± 1.69	3.76 ± 2.84	5.72 ± 4.03
DMSO	-	1.80 ± 2.50	4.55 ± 3.22	7.72 ± 3.43	1.72 ± 1.81	3.71 ± 2.42	6.67 ± 3.55
隔山香正丁醇萃取部位	0.34	26.35 ± 5.87 ¹⁾	46.19 ± 8.67 ¹⁾	59.81 ± 9.29 ¹⁾	31.46 ± 5.34 ¹⁾	50.28 ± 6.16 ¹⁾	64.74 ± 8.43 ¹⁾
	0.65	58.07 ± 1.64 ¹⁾	74.95 ± 3.87 ¹⁾	91.20 ± 3.85 ¹⁾	60.21 ± 2.57 ¹⁾	79.16 ± 5.99 ¹⁾	92.53 ± 4.73 ¹⁾
	1.22	70.39 ± 4.24 ¹⁾	83.54 ± 3.60 ¹⁾	91.63 ± 3.39 ¹⁾	71.68 ± 2.74 ¹⁾	84.47 ± 3.06 ¹⁾	94.58 ± 2.10 ¹⁾
组别		NE					
		质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$			去除内皮		
		10 min	20 min	30 min	10 min	20 min	30 min
空白	-	1.42 ± 1.70	3.56 ± 2.59	7.10 ± 3.32	2.75 ± 2.48	4.84 ± 2.77	7.57 ± 3.43
DMSO	-	0.94 ± 1.45	3.34 ± 2.43	7.01 ± 3.57	2.69 ± 2.09	4.97 ± 3.08	7.55 ± 3.29
隔山香正丁醇萃取部位	0.34	19.98 ± 2.62 ¹⁾	35.41 ± 4.49 ¹⁾	59.51 ± 9.24 ¹⁾	19.50 ± 1.82 ¹⁾	27.98 ± 3.88 ¹⁾	35.48 ± 4.72 ¹⁾
	0.65	47.58 ± 3.28 ¹⁾	60.14 ± 5.63 ¹⁾	81.76 ± 4.33 ¹⁾	56.08 ± 3.16 ¹⁾	75.59 ± 3.05 ¹⁾	84.75 ± 4.32 ¹⁾
	1.22	57.88 ± 3.02 ¹⁾	71.73 ± 2.49 ¹⁾	85.23 ± 3.95 ¹⁾	64.36 ± 1.48 ¹⁾	81.72 ± 4.09 ¹⁾	93.04 ± 1.43 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 隔山香正丁醇部位对 NE 预收缩的血管环张力的影响 隔山香正丁醇部位 ($0.34, 0.65, 1.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 NE ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预收缩的大鼠胸主动脉血管环均有明显的舒张作用 ($P < 0.01$), 具有浓度依赖性, 但无内皮依赖性。见表 1。

2.3.5 隔山香正丁醇部位细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 扫描记录 1 min 后, 含 Hank's 液或 D-Hank's 的皿中分别加入 $0.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 隔山香正丁醇部位, 继续扫描 5 min。

含 Hank's 液的皿中分别给予 $0.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 隔山香正丁醇部位, $0.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 正丁醇部位 + VER ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 等量 DMSO, VER ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预孵育 10 min, 扫描记录 1 min 后, 均给予 KCl ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。含 D-Hank's 液的皿中分别给予 $0.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 隔山香正丁醇部位, 等量 DMSO, 维拉帕米 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预孵育 10 min, 扫描记录 1 min 后, 给予 TG ($2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 NE ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 至曲线平稳后, 加入 CaCl_2 ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

3 结果

3.1 隔山香正丁醇部位对 KCl 预收缩的血管环张力的影响 隔山香正丁醇部位 ($0.34, 0.65, 1.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 KCl ($60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预收缩的大鼠胸主动脉血管环均有明显的舒张作用 ($P < 0.01$), 具有浓度依赖性, 但无内皮依赖性。见表 1。

3.3 在无 Ca^{2+} Kreb's 液中, 隔山香正丁醇部位对 Ca^{2+} 引起主动脉环收缩的影响 隔山香正丁醇部位 ($0.34, 0.65, 1.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 预孵血管后, 可剂量依赖性的抑制 CaCl_2 引起的血管收缩作用 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 隔山香正丁醇萃取部位对 CaCl_2 , NE 引起的血管收缩作用 (最大收缩率) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of *n*-butanolic fraction of LAR on influx calcium of aorta rings depolarized by CaCl_2 , NE ($\bar{x} \pm s, n=8$) %

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	CaCl_2	NE
DMSO	-	100.00 \pm 5.55	9.06 \pm 2.29
隔山香正丁醇	0.34	38.22 \pm 2.57 ²⁾	6.25 \pm 1.84 ¹⁾
萃取部位	0.65	17.66 \pm 1.94 ²⁾	5.21 \pm 1.77 ²⁾
	1.22	3.62 \pm 0.87 ²⁾	4.48 \pm 1.94 ²⁾
维拉帕米	1 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.47 \pm 1.10 ²⁾	-

注:与 DMSO 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

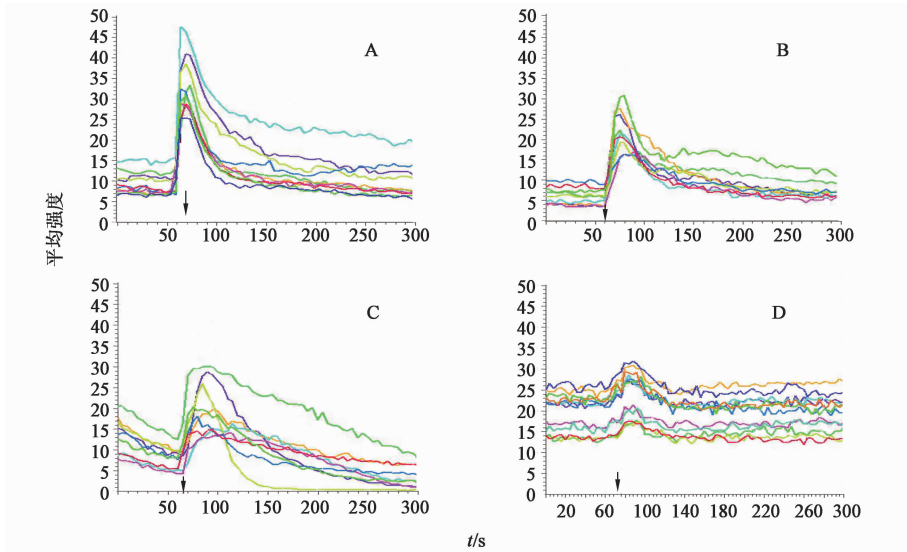
3.4 在无 Ca^{2+} Kreb's 液中, 隔山香正丁醇部位对 NE 引起主动脉环收缩的影响 隔山香正丁醇部位 (0.34, 0.65, 1.22 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 预孵血管后, 可剂量依赖性的抑制 NE ($10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的血管收缩作用。见表 2。

3.5 隔山香正丁醇部位对静息状态细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$

的变化 静息状态的细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的相对平均荧光强度为 1.08 ± 0.15 , 隔山香正丁醇部位孵育 VSMC 10 min, 在 Hank's 液和 D-Hank's 液中的相对荧光强度分别为 1.06 ± 0.09 , 1.07 ± 0.14 , 与静息状态比较, 无统计学意义, 提示隔山香正丁醇部位对 VSMCs 静息状态的细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 没有影响。

3.6 隔山香正丁醇部位对细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

有外钙的条件下, $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 诱发细胞荧光强度明显升高, 并且作用时间为 72 s 左右达到最高峰值。分别用 VER ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 隔山香正丁醇部位 ($0.65 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 以及 VER ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 隔山香正丁醇部位 ($0.65 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 孵育 VSMC 10 min, 再分别加入 $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 分别出现了不同程度的抑制效果见图 1。无外钙条件下, 隔山香正丁醇部位 ($0.65 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 能明显抑制 TG 引起的细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高效应及延缓并减弱 NE, TG 诱导的 CaCl_2 引起的细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高效应见图 2, 3。



A. CON 组; B. Ver 组; C. 正丁醇部位孵育; D. 正丁醇与 Ver 共孵; ↓ 加入时间 (图 2, 3 同)

图 1 隔山香正丁醇部位对 KCl 诱导的细胞内荧光密度变化

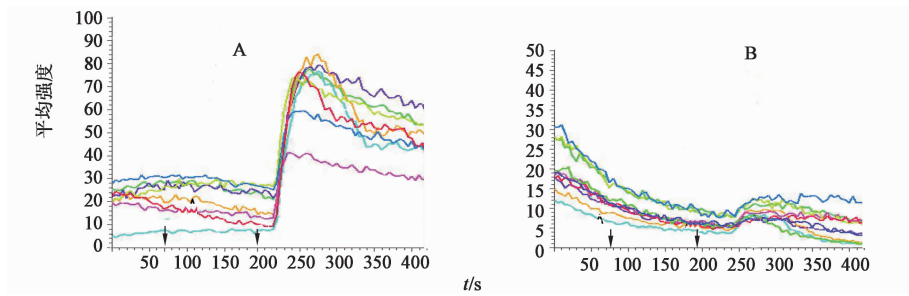
Fig. 1 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ profiles of VSMCs induced by KCl following addition of *n*-butanolic fraction of LAR

4 讨论

实验结果表明, 内皮完整及去除内皮的胸主动脉血管环上, 隔山香正丁醇部位对 NE 和 KCl 预收缩的血管环都具有浓度依赖性的舒张作用, 表明隔山香正丁醇部位的舒张血管作用是非内皮依赖性的, 有可能是直接作用于血管平滑肌从而导致血管舒张的。

血管平滑肌细胞的收缩与舒张与细胞内多种离子的调节相关, 主要依赖于细胞胞浆内 Ca^{2+} 浓度的

变化^[10]。血管平滑肌上的钙通道主要包括电压依赖性钙通道 (VDCC) 和受体依赖性钙通道 (ROCC)^[11-12]。其中 L 型 VDCC 是平滑肌细胞钙内流的主要途径^[13], 可被维拉帕米阻断^[14]。NE 作用于血管平滑肌上的 α 受体, 一方面通过 Gq/11 蛋白激活磷脂酶 C, 产生三磷酸肌醇 (triphosphateinosito, IP_3) 进而激活肌浆网上的 IP_3 受体使内质网 Ca^{2+} 释放, 使胞浆内 Ca^{2+} 增加而引起血管的收缩^[15]; 另一方面可激活细胞膜上的 ROCC, 导致细胞外 Ca^{2+}



A. CON; B. 正丁醇部位孵育(图 3 同)

图 2 隔山香正丁醇部位对 NE 和 CaCl₂ 诱导的细胞内荧光密度变化

Fig. 2 [Ca²⁺]_i profiles of VSMCs induced by NE and CaCl₂ following addition of *n*-butanolic fraction of LAR

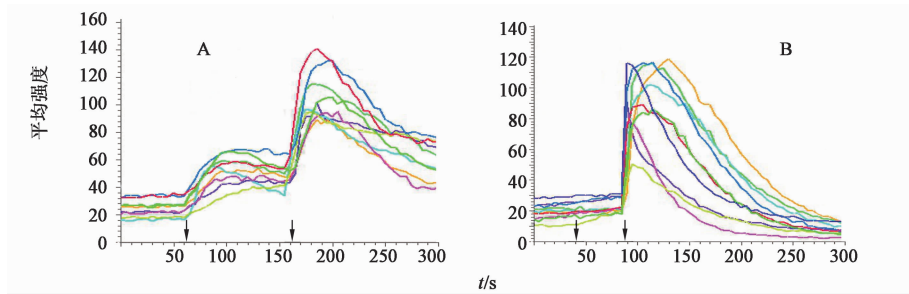


图 3 隔山香正丁醇部位对 TG 和 CaCl₂ 诱导的细胞内荧光密度变化

Fig. 3 [Ca²⁺]_i profiles of VSMCs induced by TG and CaCl₂ following addition of *n*-butanolic fraction of LAR

内流,使细胞内钙离子浓度增加而引起血管的收缩。在本实验研究中,隔山香正丁醇部位可以舒张由 NE 预收缩的血管环,提示隔山香正丁醇部位可能是参与阻断这两种途径发挥舒张血管的作用。KCl 主要是引起血管平滑肌细胞去极化,激活细胞膜上的 VDCC,引起细胞外 Ca²⁺ 离子的内流,从而使细胞内钙离子浓度增加促使血管收缩^[16-17]。在本研究中,隔山香正丁醇部位可以舒张由 KCl 预收缩的胸主动脉血管环、降低 KCl 诱导的细胞内 [Ca²⁺]_i 变化,提示隔山香正丁醇部位可能通过阻断血管平滑肌的细胞膜去极化从而阻断 VDCC 途径,进而阻止细胞外 Ca²⁺ 内流而发挥作用。

此外,本实验采用无钙液(并以 EGTA 螯合细胞外可能存在的 Ca²⁺,以排除细胞外 Ca²⁺ 离子内流的影响)孵育去内皮血管环,以 KCl 去极化后,再以不同浓度的隔山香正丁醇部位预孵育处理后,当以累积浓度的方式加入 CaCl₂,隔山香正丁醇部位能够使 CaCl₂ 引起的收缩及细胞内 [Ca²⁺]_i 的变化降低。表明隔山香正丁醇部位对 VDCC 通道引起血管平滑肌细胞外钙离子内流有明显的抑制作用。

同时,无外 Ca²⁺ 环境下,NE 引起的血管小幅度收缩与细胞内 [Ca²⁺]_i 浓度的升高依赖于内质网、肌浆网上 Ca²⁺ 的释放,而隔山香正丁醇部位能浓度

依赖性的抑制 NE 引起的血管收缩。此外,隔山香正丁醇部位预孵细胞后,TG 诱导的细胞 [Ca²⁺]_i 升高作用消失,而再加 CaCl₂ 所致的 [Ca²⁺]_i 变化有所减小。而 TG 为钙泵 ATP 酶抑制剂,能使内质网不能摄取及储存钙,从而被动清空内质网上的钙离子^[18]。当内质网钙库钙离子大量释放到胞浆时,细胞膜上的 SOC 通道可被激活,可引起细胞外钙离子持续内流^[19]。因此,提示隔山香正丁醇部位可一定程度抑制细胞内钙释放。

本研究表明,隔山香正丁醇部位具有舒张血管的作用,其舒张作用是非内皮依赖性的,且具有一定的浓度依赖性。它可能是通过拮抗钙离子通道(包括 VDCC 和 ROCC),抑制细胞内 IP₃ 敏感 Ca²⁺ 通道的开放进而抑制外 Ca²⁺ 内流和内钙释放,使细胞内钙离子浓度减少,从而引起血管环舒张,确切机制尚有待进一步研究。本研究提示隔山香药材中不仅存在前期研究证实的以异芹菜脑为代表的挥发油低极性药效成分,亦存在水溶性高极性活性成分。本研究为隔山香水蒸气蒸馏后煎煮入药的成药制备工艺提供了依据,为后续从隔山香正丁醇部位分离水溶性药效成分提供了依据。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:951.

- [2] 吴其睿. 植物名实图考(下) [M]. 北京:商务印书馆,1957:620.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:2425.
- [4] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京:人民卫生出版社,1976:826.
- [5] 《广西实用中草药新选》编辑部. 广西实用中草药新选 [M]. 广西:广西人民出版社,1969:212.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂)第十九册 [M]. 北京:人民卫生出版社,1998:158.
- [7] 田文艺,兰芳,李淑平,等. 隔山香的初步药理研究 [J]. 中国药理学通报,1989,5(4):249.
- [8] 马允慰,吴皓,胡小鹰,等. 隔山香成分-异苜蓿脑抑制平滑肌作用的初步实验研究 [J]. 中药药理与临床,1985,5(9):183.
- [9] 童国勇. 异苜蓿脑对大鼠胸主动脉的舒张作用及其机制研究 [D]. 广州:广州中医药大学,2014.
- [10] Rembold C M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle [J]. Hypertension, 1992, 20 (2): 129-137.
- [11] Putney J W. Receptor-regulated calcium entry [J]. Pharm Ther, 1990, 48 (3): 427-434.
- [12] 朱莉. 血管平滑肌细胞的钙通道 [J]. 国外医学:心血管疾病分册,1995,26(6):323-326.
- [13] Medonal T F, Pelzer S, Trautwein W, et al. Regulation and modulation of calcium channels in cardiae, skeletal, and smooth muscle cell [J]. Physiol Rev, 1994, 74 (2): 365-461.
- [14] 孙涛,刘静,曹永孝. 淡竹叶黄酮收缩血管的作用 [J]. 中药药理与临床,2010,26(5):57-59.
- [15] Eckert R E, Karsten A J, Utz J, et al. Regulation of renal artery smooth muscle tone by $\alpha 1$ adrenoceptors; role of voltage-gated calcium channels and intracellular calcium stores [J]. Urol Res, 2000, 28:122-127.
- [16] Takeuchi M, Watanabe J, Horiguchi S, et al. Interaction between L-type channels and sarcoplasmic reticulum in the regulation of vascular tone in isolated rat small arteries [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2000, 36 (5): 548-554.
- [17] Leblanc N, WAN X, Leung P M. Physiological role of Ca^{2+} -activated and voltage-dependent K^{+} currents in rabbit coronary myocytes [J]. Am J Physiol, 1994, 266 (6 Pt 1): C1523-1537.
- [18] Alexandre B, Xavier A, Sylvie B, et al. A store-operated Ca^{2+} influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca^{2+} stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice [J]. Dev Brain Res, 2005, 159(1):64-71.
- [19] 胡亚莉. 内皮细胞 STIM1 在钙库排空后其细胞内的分布变化 [D]. 武汉:华中科技大学,2009.

[责任编辑 邹晓翠]