

黄杨宁对大鼠胸主动脉血管环舒张作用的研究

余海滨^{1,2}, 王清照³, 沈俊岭^{1,2*}, 任周新^{1,2}, 崔琳^{1,4}

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000;

2. 河南省病毒性疾病中医药防治重点实验室, 郑州 450000; 3. 河南省医药学校, 河南 开封 475000;

4. 国家中医药管理局中药药理三级科研实验室, 郑州 450000)

[摘要] **目的:**研究黄杨宁(cycloviobuxine D, CVB-D)对大鼠胸主动脉的舒张作用,并探讨其可能的作用机制。**方法:**分别采用氯化钾(KCl)和去氧肾上腺素(PE)预收缩血管,观察 CVB-D($1 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对血管的舒张作用;将血管与 $6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CVB-D 预孵育,观察其对 KCl 或 PE 收缩血管作用的影响;观察不同抑制剂对 CVB-D 舒张大鼠离体血管环作用的影响。**结果:**在给药浓度范围内, CVB-D 对 KCl 或 PE 预收缩血管环的舒张作用呈剂量依赖性; CVB-D 对内皮完整血管环的舒张作用强于对去内皮血管环的舒张作用; CVB-D 与血管预孵育可抑制 KCl 或 PE 引起的血管收缩;一氧化氮合成酶(NOS)抑制剂左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)或选择性一氧化氮(NO)敏感的可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)抑制剂 ODQ 可阻断 CVB-D 的血管舒张作用。**结论:** CVB-D 对大鼠离体胸主动脉的血管舒张作用呈剂量依赖性,其舒张作用可能与一氧化氮-可溶性鸟苷酸环化酶-环磷酸鸟苷(NO-sGC-cGMP)途径相关。

[关键词] 黄杨宁; 胸主动脉; 内皮; 舒张作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0149-05

[doi] 10.11653/syfy2014040149

Vasorelaxant Effects of Cycloviobuxine D on Rat Thoracic Aorta Rings

YU Hai-bin^{1,2}, WANG Qing-zhao³, SHEN Jun-ling^{1,2*}, REN Zhou-xin^{1,2}, CUI Lin^{1,4}

(1. First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou

450000, China; 2. Key Laboratory of Viral Diseases Prevention and Treatment of TCM of

Henan Province, Zhengzhou 450000, China; 3. Henan Pharmaceutical School, Kaifeng 475000, China;

4. The Level Three Scientific Research Lab of Pharmacology of TCM,

the State Administration of TCM, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the vasorelaxant effects of cycloviobuxine D on isolated rat thoracic aorta rings and to investigate the possible mechanism. **Method:** The vasodilation of cycloviobuxine D at various concentrations (range from 1×10^{-5} to $6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on potassium chloride (KCl) or phenylephrine (PE) - precontracted aorta rings was observed. KCl or PE-induced contraction was also recorded after the aorta rings were preincubated with CVB-D at the concentration of $6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. When the aortic rings were incubated with different inhibitors, the effect of CVB-D on aortic rings was examined and investigated. **Result:** In KCl or PE-precontracted aorta rings, CVB-D showed dose-dependent vasorelaxant effect at the given range of concentrations on the rings precontracted by KCl or PE. Furthermore, CVB-D exhibited stronger vasorelaxation effect on the aorta rings with intact endothelium compared to the aorta rings denuded endothelium. Additionally, CVB-D

[收稿日期] 20130530(003)

[基金项目] 河南省教育厅科技攻关项目(2011A360022)

[第一作者] 余海滨, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药防治心血管病研究, Tel: 0371-66252978, E-mail: yhbzz@163.com

[通讯作者] * 沈俊岭, 硕士, 药师, 从事药理学研究, Tel: 0371-66251224, E-mail: sjl2008.729@163.com

preincubation could inhibit KCl or PE-induced contraction, while nitric oxide (NO) synthase inhibitor (*L*-NAME) or selected NO sensitive soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor 1H-[1], [2], [4]-oxadiazolo[4, 3- α] quinoxilin-1-one (ODQ) block the vasodilation effect of CVB-D. **Conclusion:** CVB-D has relaxation effect on rat isolated thoracic arterial rings in a dose-dependent manner, the relaxant effect may be related to the NO-sGC-cGMP (nitric oxide-soluble guanylate cyclase-cyclic guanosine monophosphate) pathway.

[**Key words**] cyclovirobuxine D; thoracic aorta rings; endothelium; relaxation effect

黄杨宁,亦称环维黄杨宁 D 或环常绿黄杨碱 D (Cyclovirobuxine D, CVB-D),是从黄杨属植物小叶黄杨 *Buxus microphylla* Sieb. et Zucc. Var. *Sinica* Rehd. et Wils. 及其同属植物中提取出来的生物碱活性单体,临床应用于多种心律失常、缺血性心脏病、高脂血症、脑动脉硬化供血不足、心功能不全等的治疗^[1]。现代药理学研究表明, CVB-D 具有抗心肌缺血、抗心律失常、增强心功能等作用^[1-3],但是关于 CVB-D 对血管的作用及其机制研究较少,因此本实验通过观察 CVB-D 对大鼠离体胸主动脉血管环舒缩反应的影响,探讨 CVB-D 对血管的作用及机制,为进一步开发其心血管应用方面提供依据。

1 材料

1.1 仪器 MP-150 生物信号采集系统(美国 BIOPAC 公司), Radnoti 离体组织灌流系统(美国 Radnoti 公司), BS 210S 型电子天平(德国 Sartorius 公司), C-MAG HS7 型恒温磁力搅拌器(德国 IKA 公司), pH700 型酸度仪(新加坡 Eutech 公司)。

1.2 试剂 CVB-D 纯度 > 95%, 由河南省康利医药技术开发有限公司提供, 药品用 Krebs-Henseleit (K-H) 缓冲液 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$: NaCl 6.90, KCl 0.35, CaCl_2 0.14, MgSO_4 0.14, KH_2PO_4 0.16, NaHCO_3 2.10, 无水葡萄糖 1.98; pH 7.4) 配制成 $20.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮备液, 超声助溶, 临用时配成使之加入 20 mL 实验体系后成为 $1 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作液。相关试剂均为国产分析纯试剂; 盐酸去氧肾上腺素 (PE)、氯化乙酰胆碱 (Ach)、左旋硝基精氨酸甲酯 (N^{ω} -nitro-*L*-arginine-methyl-ester, *L*-NAME) 和 ODQ (1H-[1], [2], [4]-oxadiazolo[4, 3- α] quinoxalin-1-one) 均购自美国 Sigma 公司。

1.3 动物 雄性 Wistar 大鼠, 体重 300 ~ 350 g, 由河南省实验动物中心提供, 动物生产许可证编号 SCXK(豫)2010-0002。动物饲养于 SPF 级动物房中, 保持 12 h 光照/12 h 黑暗昼夜节律。动物自由摄食饮水。

2 方法

2.1 血管环的制备 动物脱颈处死后迅速开胸游

离大鼠胸主动脉, 置于 4 °C 充有混合氧 (95% O_2 和 5% CO_2) 的 K-H 液中剔除周围脂肪和结缔组织, 用手术刀切成 3 ~ 4 mm 长的血管环, 此为内皮完整的血管环; 将切好的血管环浸润于 K-H 液中, 用棉签在血管环内反复摩擦数次以去除血管内皮, 此为去内皮血管环。将血管环穿入两个不锈钢三角环之间, 悬挂于盛有 20 mL 充有混合氧的 K-H 液的浴槽内, 浴槽保持 37 °C 恒温。标本的一端固定于浴槽的玻璃固件上, 另一端与肌张力换能器连接, 通过多道生理记录仪记录血管环张力的变化。不施加张力稳定 15 min, 逐渐调节血管基础张力至 13.5 mN, 稳定 60 min 左右, 期间每 15 min 换液一次。血管环张力稳定后用 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 溶液刺激血管环收缩, 诱发血管环达到最大收缩, 洗脱并稳定后再次用 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 使血管环达到最大收缩幅度并稳定 10 min, 洗脱并稳定后加入 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PE 使血管环收缩达到稳态后加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ach。以 PE 引起的血管收缩力为基准值, 最大舒张幅度大于 70% 的血管环即认为血管内皮完整, 最大舒张幅度小于 5% 的血管环即认为血管内皮已去除。

2.2 CVB-D 对 KCl 或 PE 预收缩血管环的作用

检验完血管内皮完整性后, 用 K-H 液充分泡洗至血管张力平衡, 以 $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 或 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PE 使血管环收缩达稳态, 分别以累积剂量法加入 CVB-D ($1 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 至最大舒张作用, 以等量 K-H 液作为空白对照, 以 $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 或 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PE 诱发的最大收缩幅度为 100%, 观察 CVB-D 对内皮完整和去内皮血管环的舒张作用。

2.3 CVB-D 预孵育后对 KCl 或 PE 收缩血管环作用的影响 检验完血管内皮完整性后, 用 K-H 液中充分泡洗血管环至张力平衡, 加入 $6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CVB-D 预孵 25 min, 以等量 K-H 液作为对照; 血管环张力稳定后, 分别以累积剂量法加入 KCl ($10 \sim 80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 PE ($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 作血管收缩反应的量效曲线, 观察 CVB-D 对 KCl 或 PE 收缩血管作用的影响。

2.4 L-NAME 和 ODQ 预孵育后对 CVB-D 舒张 PE

预收缩血管环作用的影响 为了观察 CVB-D 的血管舒张作用与内皮生成 NO 和与 cGMP 生成的关系,在内皮完整血管环实验中,检验完血管内皮完整性后,K-H 液充分泡洗至血管张力平衡,向浴槽灌流液内分别加入 $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 非选择性 NO 合成酶抑制剂 *L*-NAME 或 $30 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 选择性 NO 敏感的可溶性鸟苷酸环化酶抑制剂 ODQ,孵育 20 min 后,加入 $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PE 使血管环收缩达到稳态,以累积剂量法($1 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,以 0.5 对数单位增加)加入 CVB-D 至最大舒张作用。以等体积 DMSO 代替 *L*-NAME 或者 ODQ 作为对照加入浴槽。以 $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PE 诱发的最大收缩幅度为 100%,观察 *L*-NAME 预孵育后对 CVB-D 舒张由 PE 预收缩内皮完整血管环作用的影响。

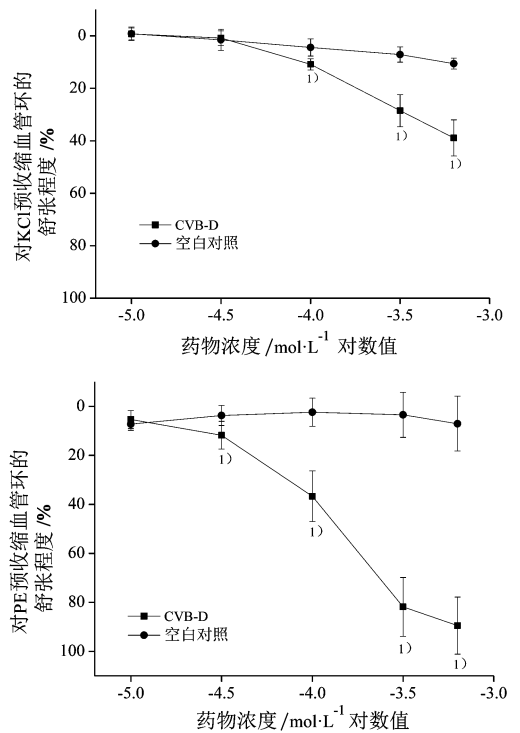
2.5 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。CVB-D 组与对照组间的两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为统计学上有显著性差异。

3 结果

3.1 CVB-D 对 KCl 或 PE 预收缩血管环的作用 在 KCl 或 PE 预收缩内皮完整血管的模型中,CVB-D 在给药浓度范围内显示有良好的舒张作用,而且其血管舒张作用呈剂量依赖性, E_{maxKCl} 和 E_{maxPE} 分别为 $38.9\% \pm 6.9\%$, $89.5\% \pm 11.7\%$,与对照组相比,差异具有显著性($P < 0.05$,图 1);在 KCl 或 PE 预收缩去内皮血管的模型中,CVB-D 在给药浓度范围内显示有良好的舒张作用,而且其血管舒张作用呈剂量依赖性, E_{maxKCl} 和 E_{maxPE} 分别为 $30.4\% \pm 3.2\%$, $45.2\% \pm 4.5\%$,与对照组比较,差异具有显著性($P < 0.05$,图 2);在给药浓度范围内,CVB-D 对 KCl 预收缩去内皮血管环的舒张作用弱于内皮完整血管环,对 PE 预收缩去内皮血管环的舒张作用也弱于内皮完整血管环,差异具有显著性($P < 0.05$)。

3.2 CVB-D 预孵育后对 KCl 和 PE 收缩血管环作用的影响 CVB-D 与内皮完整或去内皮血管环预孵育后,均可明显抑制 KCl 或 PE 引起的血管收缩作用。内皮完整血管环与 CVB-D 预孵育后,KCl 和 PE 诱发的最大收缩力 E_{maxKCl} 和 E_{maxPE} 分别为 13.44 mN 和 10.44 mN ,与对照组相比,差异具有显著性($P < 0.05$,图 3)。去内皮血管环与 CVB-D 预孵育后, E_{maxKCl} 和 E_{maxPE} 分别为 13.65 mN 和 16.34 mN ,与对照组比较,差异具有显著性($P < 0.05$,图 4~5)。

3.3 CVB-D 舒血管作用与内皮舒张因子的关系 NO 是主要的内皮舒张因子,由左旋精氨酸在 NO 合



与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ (图 2 同)

图 1 CVB-D 对 KCl 或 PE 预收缩内皮完整血管环的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

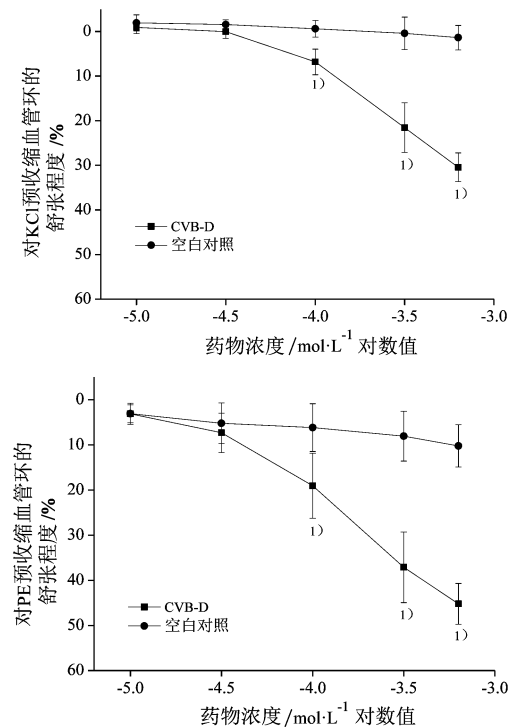


图 2 CVB-D 对 KCl 或 PE 预收缩去内皮血管环的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

成酶(NOS)的作用下生成,其可以介导内皮依赖的血管舒张作用。在 PE 预收缩内皮完整血管环的模型中,CVB-D 在 $1 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范

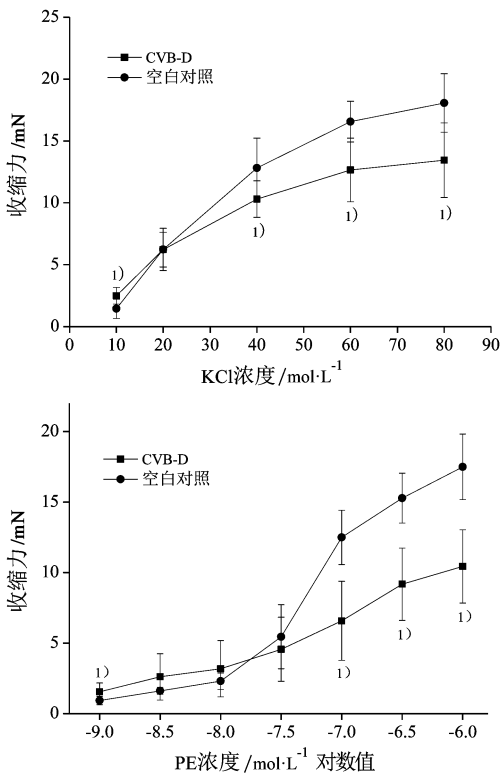


图 3 CVB-D 预孵育后对 KCl 或 PE 累加给药收缩内皮完整血管环作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

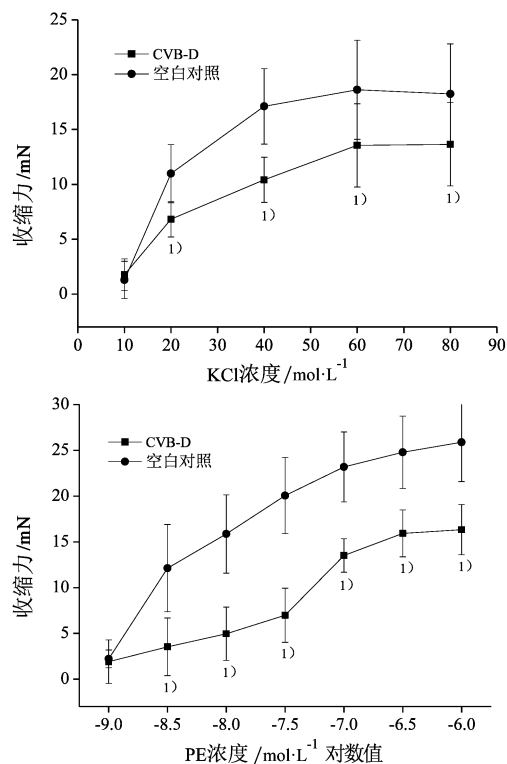
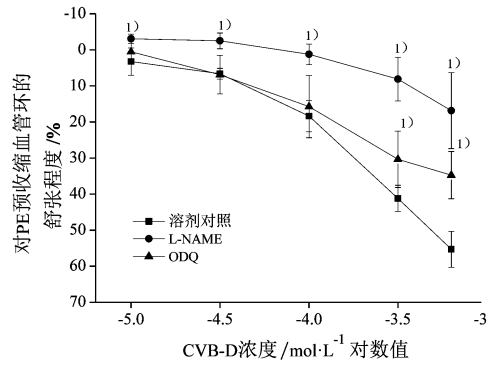


图 4 CVB-D 预孵育后对 KCl 或 PE 累加给药收缩去内皮血管环作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与溶剂对照组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 5 预孵育 L-NAME 和 ODQ 对 CVB-D 舒张内皮完整血管环的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

围内均显示有良好的血管舒张作用,且呈剂量依赖性;预孵育 L-NAME 或 ODQ 30 min 后,与对照组相比, CVB-D 的剂量-效应曲线受到明显抑制,而且差异有统计学意义,提示 CVB-D 的血管舒张作用与促进内皮释放 NO 并活化 NO-cGMP 通路有关。

4 讨论

CVB-D 可以改善心肌缺血,这一药理作用可能与其血管扩张作用有关^[2]。有实验表明, CVB-D 能够对猪在体或豚鼠离体的冠状动脉具有舒张作用,可增加冠状动脉的血流量^[4]。本实验结果也显示, CVB-D 对 KCl 或 PE 预收缩的内皮完整血管环和去内皮血管环均有显著舒张作用,而且对内皮完整血管环的舒张作用更明显,并且呈剂量依赖性;对 CVB-D 预孵育的血管,由 KCl 或 PE 引起的血管收缩作用也均有明显的降低。

研究表明^[5-8], KCl 和 PE 引起血管收缩的机制不同。KCl 的血管收缩作用主要与开放细胞膜上的电压依赖性钙离子通道 (VDCC), 引起细胞外钙内流,使平滑肌细胞超极化而致血管收缩。PE 是通过激活 α_1 -肾上腺素受体,激活磷脂酶 C,产生二酰甘油 (diacylslycerol, DAG) 和三磷酸肌醇 (1, 4, 5-triphosphateinositol, IP_3), DAG 通过蛋白激酶 C (protein kinase, PKC) 激活肌凝蛋白轻链促进钙离子的释放; IP_3 则可以诱导肌浆网内的钙离子释放,从而引起血管收缩。

研究表明,血管内皮可通过释放血管收缩因子和血管舒张因子主动调节血管张力^[9]。内皮依赖性的血管舒张主要是通过刺激内皮细胞产生 NO^[10-11],即一种由血管内皮细胞合成的强效血管舒张因子,由左旋精氨酸在内皮 NOS 的作用下转化而来,通过激活血管平滑肌细胞的可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC),增加环鸟苷酸 (cGMP) 的含量,降低血管

平滑肌细胞舒张平滑肌 Ca^{2+} 浓度,从而舒张血管^[12]。有研究表明 CVB-D 可以明显保护大鼠主动脉内皮细胞免受缺氧损害,增加血管舒张因子 NO 从内皮细胞释放^[13]。

在本实验中,对 KCl 或 PE 预收缩的血管模型, CVB-D 可剂量依赖地舒张由 KCl 或 PE 预收缩的血管,而且对内皮完整血管环的舒张作用更明显。在用 NOS 抑制剂 L-NAME 或 sGC 抑制剂 ODQ 预孵育血管环后, CVB-D 的舒血管作用被明显抑制。实验结果提示 CVB-D 的血管舒张作用可能与其促进内皮细胞释放 NO 并活化 NO-cGMP 通路有关。

对 KCl 或 PE 预收缩的去内皮血管模型, CVB-D 也可剂量依赖性地舒张由 KCl 或 PE 预收缩的血管,提示 CVB-D 的舒血管作用一部分为内皮依赖性的,另一部分为非内皮依赖性的。

梁涛等^[14]发现 CVB-D 能够升高大鼠心肌细胞内游离钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$)。对 CVB-D 预孵育的血管,由 KCl 或 PE 引起的血管收缩作用明显的降低,提示 CVB-D 的血管舒张作用一方面可能通过抑制 VDCC 的开放,减少细胞外钙内流,使 $[Ca^{2+}]_i$ 下降而舒张血管;另一方面也可能与抑制 α_1 肾上腺素受体介导的细胞外钙内流或者内钙释放有关。

综上, CVB-D 对大鼠离体胸主动脉具有舒张作用,其效应可能是多种途径共同作用的结果,一方面可能与 NO-GC-cGMP 途径相关的内皮依赖性舒张机制有关,另一方面可能与抑制 VDCC 引起细胞外钙内流和 IP_3 诱导的内钙释放相关,确切机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 陈爱芳,崔志清. 黄杨宁的临床和实验研究近况[J]. 中华中医药学刊,2007,25(4):767.
- [2] 周玖瑶,廖惠芳,黄桂英. 环维黄杨星 D 抗异丙肾上腺素致心肌缺血药理研究[J]. 中药材,2006,29(11):1218.
- [3] 杨芳芳,胡申江. 环维黄杨星 D 对大鼠心脏功能及血压的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2007,21(4):255.
- [4] Grossini E, Battaglia A, Brunelleschi S, et al. Coronary

effects of cycloviobuxine D in anesthetized pigs and in isolated porcine coronary arteries[J]. Life Sci,1999,65(5):PL59.

- [5] Zhang B Q, Hu S J, Qiu L H, et al. Diphasic effects of astragalus membranaceus (Leguminosae) on vascular tone in rat thoracic aorta[J]. Biol Pharm Bull,2005,28(8):1450.
- [6] Putney J W. Receptor-regulated calcium entry [J]. Pharmacol Ther, 1990,48(3):427.
- [7] Rembold C M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle [J]. Hypertension, 1992, 20(2):129.
- [8] Zhang N, Zou H, Jin L, et al. Biphasic effects of sodium danshensu on vessel function in isolated rat aorta[J]. Acta Pharmacol Sin,2010,31:421.
- [9] Sun P Y, Kimamura Y, Kawasak H. Endothelial modulation of agonist-induced vasoconstriction in mesenteric microcirculation[J]. Yakugaku Zasshi,2010,130(5):723.
- [10] Qi Y M, Yang D J, Duan X, et al. Endomorphins inhibit contractile responses of rat thoracic aorta rings induced by phenylephrine and angiotensin II *in vitro* [J]. Acta Pharmacol Sin,2002,23(1):40.
- [11] Gioaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension [J]. N Engl J Med, 1995, 333(7):214.
- [12] Tanaka Y, Koyke K, Toro L. Maxi K channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms [J]. J Smooth Muscle Res,2004,40(4/5):125.
- [13] Hu D, Liu X Y, Wang Y Y, et al. Cycloviobuxine D ameliorates acute myocardial ischemia by K_{ATP} channel opening, nitric oxide release and anti-thrombosis [J]. Eur J Pharmacol,2007,569(1/2):103.
- [14] 梁涛,方泰惠,姚秀娟,等. 环维黄杨星 D 对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用和对心肌细胞内游离钙浓度的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(12):94.

[责任编辑 聂淑琴]