

牛蒡根水提物扩血管作用及机制研究

曹剑锋^{1,2}, 张鹏英², 王超英¹, 候东², 陈靠山^{2*}

(1. 贵州师范学院, 贵州省生物资源开发利用特色重点实验室, 贵阳 550018;
2. 山东大学生命科学院, 济南 250100)

[摘要] **目的:** 探讨牛蒡根水提物对大鼠离体胸主动脉环的舒张作用及其作用机制。**方法:** 采用测定离体血管环张力的方法, 观察牛蒡根水提物(0.075 ~ 15 g·L⁻¹) 分别对基础状态、去氧肾上腺素(PE) 5 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 和氯化钾(KCl 40 mmol·L⁻¹) 预收缩的内皮完整血管环和去内皮血管环的舒张作用; 并观察左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME, 10⁻⁴ mol·L⁻¹) 和亚甲蓝鸟苷酸环化酶抑制剂(ODQ, 10⁻⁵ mol·L⁻¹)、吲哚美辛(Indo, 10⁻⁵ mol·L⁻¹)、四甲基乙二胺(TEA, 10⁻⁴ mol·L⁻¹) 预处理对牛蒡根水提物的舒张血管作用的影响。**结果:** 牛蒡根水提物对基础状态的内皮完整和去内皮血管环的张力无影响; 对 PE 预收缩的去内皮和去内皮完整血管环具有浓度依赖性舒张作用; L-NAME($P < 0.01$) 和 ODQ($P < 0.05$) 预处理可明显减弱牛蒡根水提物的舒血管作用, Indo 预处理没有作用; TEA 预处理($P < 0.05$) 显著性增强牛蒡根水提物舒张 PE 预收缩血管的作用; 对 KCl 预收缩的内皮完整血管环有明显舒张作用。**结论:** 牛蒡根水提物能引起血管发生内皮依赖性和非内皮依赖性的舒张作用, 其作用机制可能涉及促进血管内皮 NO 释放和血管平滑肌细胞的 Ca²⁺ 激活。

[关键词] 牛蒡根水提物; 主动脉; 血管舒张作用; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0258-04

[doi] 10.11653/syjf2013230258

Vasodilatation Induced by Aqueous Extract of *Arctium lappa* Roots and its Mechanisms

CAO Jian-feng^{1,2}, ZHANG Peng-ying², WANG Chao-ying¹, HOU Dong², CHEN Kao-shan^{2*}

(1. Guizhou Bioresource Development and Utilization Key Laboratory, Guizhou Normal College, Guiyang 550018, China; 2. College of Life Science, Shandong University, Ji'nan 250100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the vasodilative effect and the possible mechanisms of aqueous extract of *Arctium lappa* roots on the thoracic aorta rings of rats. **Method:** The study was performed with the model of isolate rat thoracic aorta rings in organ bath. **Result:** Aqueous extract of *A. lappa* roots did not directly relax or constrict vascular rings. Aqueous extract of *A. lappa* roots (0.075-15 g·L⁻¹) caused concentration-dependent relaxation with Phenylephrine (PE 5 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹) precontracted aorta rings with or without endothelium. The extent of relaxation was larger in endothelium-intact aortic rings than that in endothelium-denuded aortic rings. Relaxation effects were reduced partially but significantly by pretreatment with (ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10⁻⁴ mol·L⁻¹), 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4, 3-a] quinoxalin-1-one (ODQ, 10⁻⁵ mol·L⁻¹) in endothelium-intact aortic rings. However, they were not affected by indomethacin (10⁻⁵ mol·L⁻¹). The relaxation response of aqueous extract of *A. lappa* roots was significantly enhanced by potassium channel inhibitors

[收稿日期] 20130429(004)

[基金项目] 贵州师范学院博士基金(12BS032); 贵州省科技厅基金项目(黔科合J字[2013]2233); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2011SW016); 贵州省重点支持学科建设项目(2011231)

[第一作者] 曹剑锋, 博士, 副教授, 从事天然药物的研究, Tel:08515816647, E-mail:caojianfeng888@163.com

[通讯作者] * 陈靠山, 博士, 教授, 博士生导师, 从事天然多糖的分离、结构测定和活性的研究、植物诱导抗性研究等, Tel:0531-33865311, E-mail:ksc313@126.com

Tetraethylammonium chloride (TEA). The aqueous extract of *A. lappa* roots caused concentration-dependent relaxation in 40 mmol·L⁻¹ KCl aorta rings. **Conclusion:** Aqueous extract of *A. lappa* roots causes relaxation of aortic rings through endothelium-dependent and independent pathways. The mechanisms might be involved the release of NO from endothelium and is possibly mediated by the activation of Ca²⁺ channel.

[**Key words**] aqueous extract of *Arctium lappa* roots; thoracic aorta; vasodilative acts; mechanisms

牛蒡是我国药食同源植物,自日本人将牛蒡培育成优良的蔬菜品种引种我国后,已在我国许多地区广泛种植。传统中药认为牛蒡具有清血、降血压、降血脂作用等,但有关牛蒡的降血压作用及应用研究尚未有报道,牛蒡对离体血管舒张作用及机制也未有研究报道。因此,本实验利用大鼠离体胸主动脉环灌流模型,研究牛蒡水提物对血管张力的影响并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠(300~350 g)清洁级,购于山东中医药大学实验动物中心,许可证号SCXK(鲁)20110003。

1.2 药品和试剂 牛蒡水提物:牛蒡为菊科牛蒡属植物,新鲜牛蒡的根于2011年10月购自济南农贸市场,由山东大学陈靠山教授鉴定为牛蒡(*Arctium lappa* L.)根,用自来水冲洗干净后阴干,牛蒡根4 kg切成薄片后加入蒸馏水(料液比1:10),在80℃浸提1.5 h,连续提2次,热水提取物用Whatman No. 1滤纸过滤,合并滤液,60℃旋转蒸发仪(北京博益康,SD-1A-50)浓缩后,冰冻干燥,样品储存在-20℃,测定可溶性成分含量为12.2%。临用时加入Krebs-Henseleit(K-H)液溶解。

乙酰胆碱(Ach, Sigma,批号A6625),吲哚美辛(Indo,贝斯特试剂,批号BRS000347),左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME,批号N5757),氯化四乙铵(TEA, Sigma,批号T2265),亚甲蓝鸟苷酸环化酶抑制剂(ODQ, Sigma,批号03636),去氧肾上腺素[PE,梯希爱(上海),批号61-76-7],其他试剂均为分析纯,购自天津化工有限公司。

1.3 仪器 ML136型生物信号放大器、MI785-powerlab型八通道记录仪(悉尼ABI公司),JH-2B型肌张力换能器(北京航天医学工程研究所),双层套管平滑肌灌流基槽和玻璃挂钩(山东大学化学与化工学院玻璃仪器厂),Q/XCCKY004-2001型恒温水浴锅(北京长安恒温仪器厂)。

2 方法

2.1 大鼠胸主动脉环的制备 参照文献[1]制备大鼠胸主动脉环:取大鼠,用木锤击晕后行颈部脱

臼,剪开胸腔,迅速取出胸主动脉条上段,置于4℃的K-H液中,溶液通入CO₂。小心剔除其周围结缔组织后,将血管剪成3~4 mm长的主动脉环,迅速悬挂至离体灌流装置中。溶液以95% O₂ + 5% CO₂饱和。采用Power-lab生理记录仪记录和Chart 5.0软件分析主动脉环张力变化。逐步调节主动脉环张力至2 g,稳定1 h;每隔15 min更换1次K-H液。待稳定后,用40 mmol·L⁻¹ KCl液刺激主动脉环收缩,共重复3次,以激发最大收缩。主动脉环以5 μmol·L⁻¹ PE预收缩后,用10⁻⁵ mol·L⁻¹ Ach舒张主动脉环以检查血管内皮的完整性,舒张幅度达50%以上者可认为内皮完整。需去内皮的血管环在悬挂至离体灌流装置前,先用机械法去除血管内皮。已完全去内皮的血管,用Ach后不产生舒张^[2]。

2.2 牛蒡根水提物对血管环的直接作用 取E-和E+的血管环,以累积加药法依次加入牛蒡根水提物0.075~15 g·L⁻¹,给药间隔约3~5 min,以药物作用达到坪值为准,观察血管环张力的改变。

2.3 牛蒡根水提物对PE预收缩的血管环的作用 取去内皮和内皮完整的血管环,分别以5×10⁻⁶ mol·L⁻¹ PE预收缩血管环,在达到坪值后,以累积加药法依次加入牛蒡根水提物0.075~15 g·L⁻¹,给药间隔约3~5 min,以药物作用达到坪值为准,记录牛蒡根水提物作用的量效曲线。

2.4 ODQ, L-NAME, Indo预处理对牛蒡根水提物血管环舒张作用的影响 取E+的血管环,在浴槽中分别加入Indo 10⁻⁵ mol·L⁻¹, L-NAME 10⁻⁴ mol·L⁻¹, ODQ 10⁻⁵ mol·L⁻¹孵育30 min后,加入5×10⁻⁶ mol·L⁻¹ PE在收缩达到坪值后,以累积加药法依次加入牛蒡根水提物0.075~15 g·L⁻¹,记录牛蒡根水提物作用的量效曲线。

2.5 TEA预处理对牛蒡根水提物舒血管作用的影响 取E+的血管环,在浴槽中分别加入TEA 10⁻⁴ mol·L⁻¹孵育15 min后,加入5×10⁻⁶ mol·L⁻¹ PE,在收缩达到坪值后,以累积加药法依次加入牛蒡根水提物0.075~15 g·L⁻¹,记录牛蒡根水提物作用的量效曲线。

2.6 牛蒡根水提物对KCl 40 mmol·L⁻¹引起血管收

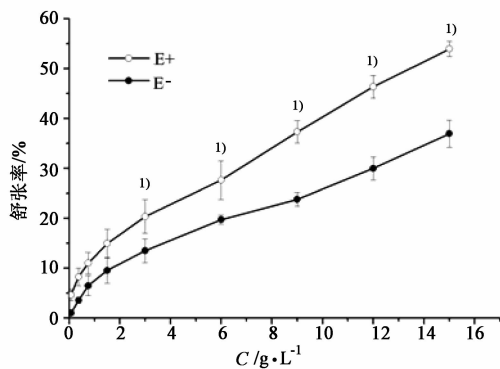
缩的影响 取 E + 的血管环,在浴槽中加入 KCl 40 mmol·L⁻¹,在收缩达到坪值后,以累积加药法依次加入牛蒡根水提取物 0.075 ~ 15 g·L⁻¹,记录牛蒡根水提取物作用的量效曲线。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件及 Origin 作图软件进行数据图形处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,方差齐性采用 LDS 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对离体主动脉环基础张力的影响 牛蒡根水提取物 0.075 ~ 15 g·L⁻¹对 E + /E - 的主动脉环的基础张力均无显著性影响,二者各浓度下对血管舒张率几近于零。

3.2 对 PE 预收缩 E - 和 E + 血管的作用 牛蒡根水提取物 0.075 ~ 15 g·L⁻¹可使 PE 预收缩的 E + 的主动脉环舒张,并呈现浓度依赖性。对去内皮(E-)动脉环 PE 预收缩后的血管张力也具有明显的舒张效应,亦呈现浓度依赖性,在 3 ~ 15 g·L⁻¹范围对 E + 舒张效应明显强于 E-($P < 0.05$),见图 1。



1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ (图 2 ~ 4 同)

图 1 牛蒡根水提取物对 PE 预收缩去内皮(E-)和内皮完整(E+)血管环的作用($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 ODQ, L-NAME, Indo 预处理对牛蒡根水提取物血管环舒张效应的影响 为了解牛蒡根水提取物的血管舒张作用途径,实验采用 E + 的血管环,分别选用一氧化氮合成酶抑制剂 L-NAME 10⁻⁴ mol·L⁻¹、环鸟苷酸合酶抑制剂 ODQ 10⁻⁵ mol·L⁻¹和环氧合酶抑制剂 Indo 10⁻⁵ mol·L⁻¹,观察牛蒡根水提取物对血管的舒张效应,结果 L-NAME 能明显抑制牛蒡根水提取物对血管的舒张作用($P < 0.01$),ODQ 也使牛蒡根水提取物对 PE 预收缩的血管的舒张作用显著性减弱($P < 0.05$),但 Indo 10⁻⁵ mol·L⁻¹预处理后牛蒡根水提取物对 PE 预收缩的血管产生舒张的作用无显著性影响,见图 2。

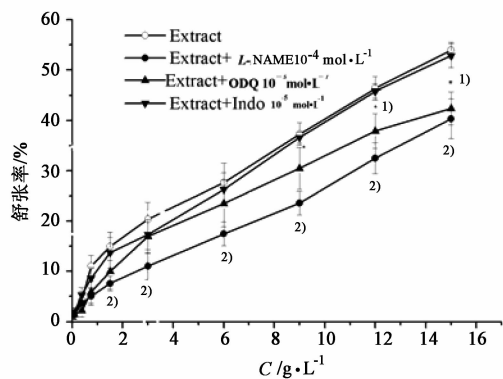


图 2 ODQ, L-NAME, Indo 预处理对牛蒡根水提取物血管环舒张效应的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4 TEA 预处理对牛蒡根水提取物血管环舒张效应的影响 采用 E + 的血管环, Ca²⁺依赖性 K⁺通道阻断剂 TEA 10⁻⁴ mol·L⁻¹预处理后,牛蒡根水提液舒张 PE 预收缩血管的作用被显著性增强,见图 3。

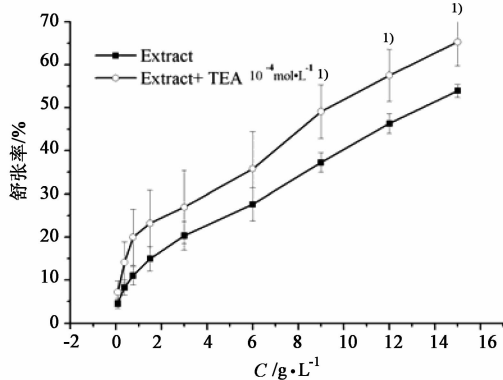


图 3 TEA 10⁻⁴ mol·L⁻¹预处理对牛蒡根水提取物血管环舒张效应的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.5 牛蒡根水提取物对 KCl 40 mmol·L⁻¹预收缩血管环的作用 40 mmol·L⁻¹的 KCl 预收缩血管后,牛蒡根水提取物能舒张 KCl 预收缩的 E + 的动脉环,并呈现浓度依赖性,但比对 PE 预收缩血管的作用弱($P < 0.01$),见图 4。

4 讨论

本实验结果表明,在离体条件下,牛蒡根水提取物对 PE 和 KCl 预收缩的内皮完整动脉环都具有舒张作用,但对 PE 预收缩的内皮完整动脉环的舒血管作用明显强于对 KCl 的作用。

牛蒡根水提取物对 PE 引起的血管环收缩具有明显的舒张作用。PE 诱导的血管收缩主要作用机制在于其能与 α -肾上腺素受体作用,通过激活磷脂酶 C,产生三磷酸肌醇,最终刺激平滑肌细胞内钙的释放,增加细胞内游离钙浓度;也可通过激活细胞膜上的受体操纵性钙通道和磷酸化电压依赖性钙通

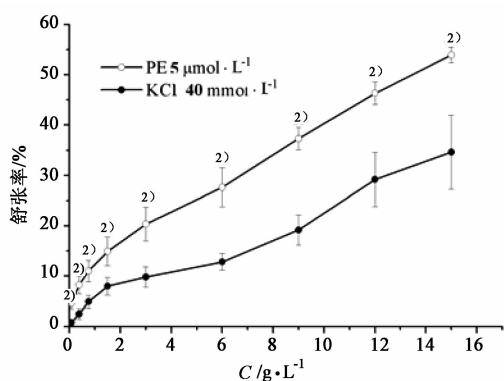


图4 牛蒡根水提物对 KCl 40 mmol·L⁻¹ 预收缩内皮完整血管环的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

道使细胞外钙内流,引起细胞内游离钙浓度增加,通过这两种途径使细胞内钙浓度增高从而产生血管收缩^[3-4]。牛蒡根水提物对 PE 引起的血管环收缩具有明显的舒张作用。说明牛蒡根水提物可以抑制 PE 引起的细胞内钙离子浓度升高导致的平滑肌收缩作用发挥其舒张血管的作用。

高钾的作用主要在于引起平滑肌细胞去极化,激活细胞膜上存在的电压依赖的钙通道,引起细胞外钙离子内流,产生收缩,同时细胞外钙离子的内流也诱导了细胞内敏感钙池的钙释放,即所谓的钙诱导的钙释放,升高细胞内钙,引发血管平滑肌收缩^[5-6]。牛蒡根水提物对高钾诱导的血管收缩具有舒张作用,说明牛蒡根水提物可能通过抑制 KCl 诱导的膜电压依赖钙通道激活,减少细胞外钙离子的内流发挥其舒张血管的作用。

血管去内皮后牛蒡根水提物舒血管作用明显减弱,提示其舒张血管作用既有内皮依赖性又有内皮非依赖性。内皮依赖性舒血管作用的主要机制在于内皮细胞通过释放一氧化氮(NO)^[2,7],激活血管平滑肌细胞的可溶性鸟苷酸环化酶(sGC),引起环磷酸鸟苷(cGMP)升高,从而产生舒血管作用^[8]。cGMP 主要通过 cGMP 依赖性蛋白激酶使钙内流减少,增加钙 ATP 酶对钙的摄取或直接作用于收缩蛋白去磷酸化而使血管舒张^[9]。本研究中,一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 和鸟苷酸环化酶抑制剂 ODQ

也可抑制牛蒡根水提取物的舒血管作用,这些结果进一步说明牛蒡水提物舒张血管作用明显具有内皮依赖性。因此,牛蒡根水提物能引起血管发生内皮依赖性和非内皮依赖性的舒张作用。其作用机制可能涉及促进血管内皮 NO 释放和血管平滑肌细胞的 Ca²⁺ 激活。

[参考文献]

- [1] 叶挺梅,徐和靖,汪洋,等. 菊米提取液舒张血管作用及其机制研究[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(4):44.
- [2] Palmer R M, Ferrige A G, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium Derived relaxing factor [J]. Nature, 1987, 327(6122):524.
- [3] 韩启德,文允镒. 血管生物学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997:74.
- [4] Xiong Z, Sperelakis N. Regulation of L type calcium channels of vascular smooth muscle cells [J]. J Mol Cell Cardiol,1995,27(1):75.
- [5] Takeuchi M, Watanabe J, Horiguchi S, et al. Interaction between L-type Ca²⁺ channels and sarcoplasmic reticulum in the regulation of vascular tone in isolated rat small arteries [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2000, 36(5):548.
- [6] 陈慧,黄勇,兰燕宇,等. 荭叶心通软胶囊对家兔离体血管条的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):141.
- [7] Moncada S, Palmer R M, Higgs E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology [J]. Pharmacol Rev,1991,43(2):109.
- [8] Apapoplrt R M, Murad F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP [J]. Circ Res, 1983, 52(3):352.
- [9] Vaandrager A B, Jonge H R. Signalling by cGMP-dependent protein kinases [J]. Mol Cell Biochem, 1996,157(1/2):23.

[责任编辑 李玉洁]