

木兰脂素对离体大鼠胸主动脉环血管舒张机制 和大鼠肾细胞毒性作用

张洪平^{1*}, 田戈¹, 杨涛², 陈良¹, 姜敏¹

(1. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830011; 2. 渭南职业技术学院, 陕西 渭南 714000)

[摘要] **目的:**研究木兰脂素(magnolin, Mag)的舒张血管作用、作用机制和细胞毒性。**方法:**应用离体血管环技术观察 Mag 对大鼠胸主动脉环张力的作用,记录去氧肾上腺素(phenylephrine, PE, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)预收缩的离体大鼠胸主动脉环张力变化。采用一氧化氮合酶(eNOS)抑制剂 L-硝基精氨酸甲酯(L-NAME, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)预处理后观察 Mag 对血管环张力改变的影响,并用 MTT 方法观察对大鼠肾细胞(NRK)增殖的影响。**结果:**木兰脂素($0.1 \sim 1\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对 PE 预收缩的血管环具有浓度依赖的舒张作用,该舒张作用为内皮依赖性。50% 最大效应浓度(Half maximal effective concentration, EC_{50})为 $24.43 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthesis, eNOS)抑制剂-NG-硝基-L-精氨酸甲酯(NG-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, L-NAME, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)预处理可以抑制 Mag 对具内皮血管的舒张效应。木兰脂素($0.1 \sim 1\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 NRK 的相对增殖率在 84.17% 和 134.60%。**结论:**木兰脂素具有内皮依赖性舒张血管作用,其机制可能与内皮型一氧化氮合成酶激活有关,且没有肾细胞毒性。

[关键词] 血管舒张; 木兰脂素; 内皮型一氧化氮合酶; 细胞毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0209-04

[doi] 10.11653/syfyj2013230209

Vasodilatative Mechanism of Magnolin in Isolated Rat Thoracic Aorta and its Toxicity in Rat Renal Cells NRK

ZHANG Hong-ping^{1*}, TIAN Ge¹, YANG Tao², CHEN Liang¹, JIANG Min¹

(1. The Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Weinan Vocational Technical College, Weinan 714000, China)

[Abstract] **Objective:** To characterize vasodilatative effect of magnolin (Mag) on isolated rat thoracic aorta, elucidate its possible action mechanism, and its toxicity in rat renal cells NRK *in vitro*. **Method:** The thoracic aorta was isolated from male Sprague-Dawley (SD) rats and the isometric tension of aortic rings induced by phenylephrine (PE, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) were measured. To investigate the vasodilation effect of Mag on it were observed in the rings with endothelium intact or endothelium denuded. The rat renal cells NRK were cultured *in vitro* and MTT assay. **Result:** Mag ($0.1-1\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) produced concentration-dependent response, relaxations in PE-contracted aortic rings with endothelium. The half maximal effective concentration (EC_{50}) of Mag was $24.43 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The vasodilatative effect by Mag was not statistically inhibited by $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (L-NAME) in the preparations with endothelium. The relative growth rates (RGR) of Mag ($0.1-1\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) were between 84.17% and 134.60%. **Conclusion:** Magnolin causes relaxation of aortic ring through endothelium-dependent pathway. The mechanisms might be involved in eNOS. Magnolin is safe to rat renal cells NRK with concentration between $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

[Key words] vasodilatation; magnolin; endothelial nitric oxide synthesis; cytotoxicity

[收稿日期] 20130719(005)

[基金项目] 新疆医科大学博士(后)科研启动基金项目(2012102-5);新疆医科大学自治区级重点学科项目(XYDXK50780338)

[通讯作者] *张洪平, 博士, 副主任中药师, 从事心血管药理与炎症医学的科研与教学, Tel: 0991-5571923, E-mail: zhpings15@163.com

血管舒张功能障碍是导致原发性高血压的重要因素,其机制十分复杂。目前认为,血管舒张主要有内皮依赖和直接作用于平滑肌两条途径。内皮依赖的血管舒张主要是由血管内皮细胞生成的一氧化氮(nitric oxide, NO)、前列腺类物质和一些内皮衍生超极化因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF)调节^[1]。在血管内皮细胞内,内皮型一氧化氮合酶(eNOS)是生成 NO 的关键酶。NO 在内皮细胞生成后扩散到邻近的血管平滑肌细胞引起血管舒张^[2]。

木兰脂素是从辛夷中提取的一种木脂素^[3]。研究发现,木兰脂素具有抗过敏^[4]、抗炎^[5]和对肾缺血再灌注损伤的保护作用^[6-7]。既往研究证实辛夷二氯甲烷提取物对离体大鼠胸动脉环具有非内皮依赖性的血管舒张作用^[8]。木兰脂素是否具有类似的舒张血管作用?本实验旨在通过观察木兰脂素大鼠离体胸动脉环舒张作用和对大鼠肾细胞增殖的影响,探讨木兰脂素的舒张血管机制和细胞毒性,为木兰脂素进一步开发提供实验依据和支持。

1 材料

1.1 动物和细胞 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(250~300 g)为雄性,清洁级,由新疆医科大学动物中心提供。动物饲养于新疆医科大学动物中心标准环境,动物使用许可证号为 SYXK(新)2011-0004。大鼠肾细胞株 NRK 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 药品和试剂 氯化乙酰胆碱(acetylcholine chloride Ach,批号 BCBC9786V),去氧肾上腺素(phenylephrine, PE,批号 100701V),NG-硝基-L-精氨酸甲酯(NG-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, L-NAME,批号 1418459V),Foskolin,四噻唑蓝(MTT,批号 AM0973),RPMI1640 培养基干粉(批号 SLBD8746),NaHCO₃(生物试剂,批号 SLBF3957V)均购自 Sigma 公司,青链霉素混合液(批号 1266328,购自 Life technologies),胎牛血清(FBS,特级,批号 GVG0077,赛默飞世尔试剂有限公司,除 Foskolin 外,其他试剂均用无菌双蒸水溶解。木兰脂素(magnolin, Mag,批号 11031132,上海同田生物技术股份有限公司)。Magnolin 和 Foskolin 用二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解,对照组已证明最高浓度 DMSO(1:400)对血管张力无影响。其他化学试剂均为分析纯,购自天津市红岩化学试剂厂。

1.3 仪器 离体血管功能测定系统(成都泰盟

生物科技有限公司),二氧化碳培养箱(美国赛默飞世尔科技有限公司),Multiskan Spectrum 150 型酶标仪[赛默飞世尔科技(芬兰)有限公司]。

2 方法

2.1 大鼠胸主动脉环的制备^[9] 大鼠断颈致死,迅速打开胸腔取出胸主动脉,立即放入 Krebs-Henseleit(K-H)液中并置于冰上,去除动脉周围结缔组织后,统一切割成 3 mm 长的动脉环。分别保留内皮和去除内皮,置于 37 °C 恒温浴槽中,持续通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体。动脉环一端固定于张力支撑杆上,另一端连接张力换能器,用 BL-420 生物信号记录分析系统记录血管的等张收缩力。调整动脉环静息负荷 2 g,每 20 min 换 K-H 液 1 次,稳定 90 min,实验前应用 60 mmol·L⁻¹ KCl 收缩 2 次,收缩良好的血管环用于实验。

2.2 血管内皮功能检测^[8] 用 Ach 检验血管内皮的活性。用 1 μmol·L⁻¹ PE 预收缩血管环,待反应达到平衡后以 0.01~10 μmol·L⁻¹ Ach 舒张血管,最后加入 1 μmol·L⁻¹ Foskolin 使其达到 100% 舒张。以 0.1 μmol·L⁻¹ Ach 舒张达到 15%~20%,1 μmol·L⁻¹ Ach 达到 60%,10 μmol·L⁻¹ Ach 达到 80% 以上为内皮完好;以对 Ach 几乎没有舒张反应为内皮被破坏判断标准。

2.3 内皮对木兰脂素血管舒张作用的影响 内皮完整和去除内皮血管环加入 1 μmol·L⁻¹ PE 预收缩血管达稳定后,逐步累积加入 Mag(0.1, 1, 10, 100, 1 000) μmol·L⁻¹,前一个剂量达平衡后再给下一个剂量,最后加入 1 μmol·L⁻¹ Foskolin 至最大舒张,并以此作为 100% 舒张,记录浓度舒张曲线。

2.4 L-NAME 干预对 Mag 血管舒张作用的影响 内皮完整血管环用一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 100 μmol·L⁻¹ 预处理 15 min 后,再用 1 μmol·L⁻¹ PE 预收缩达稳定后,再逐步累积加入 Mag 各浓度观察血管张力变化,并以 1 μmol·L⁻¹ Foskolin 引起的最大舒张作为 100% 舒张。

2.5 MTT 法测定木兰脂素对肾细胞毒性的影响^[10] 大鼠 NRK 细胞株以含 10% FBS 和 100 U·mL⁻¹ 青霉素,100 mg·L⁻¹ 链霉素的 RPMI1640 培养液在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养。接种细胞至 96 孔板(2×10⁴ 个/孔)培养过夜,Mag 用 DMSO 溶解,用不含血清 RPMI1640 培养液稀释成 0.1, 1, 10, 100, 1 000 μmol·L⁻¹ 5 个剂量(DMSO 最终浓度 < 1%),同时设置正常对照孔和空白调零孔,每组设 8 个复孔。培养 24 h 后,在 200 μL 的体系上加入 MTT 溶

液(PBS配制, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) $10\ \mu\text{L}$,继续培养4 h,弃上清后,加入 $150\ \mu\text{L}$ DMSO,待结晶完全溶解后,酶标仪测 $490\ \text{nm}$ 处吸光度(A),按下列公式计算细胞相对增殖率 RGR (relative growth rate)。毒性分级见表 1。

$$\text{RGR} = (\text{给药组 A} - \text{空白组 A}) / (\text{正常对照组 A} - \text{空白组 A}) \times 100\%$$

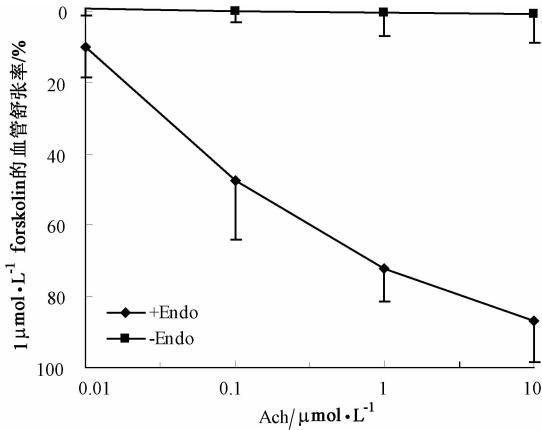
表 1 美国药典中细胞相对增殖率与细胞毒性分级关系^[11]

相对增殖率/%	细胞毒性等级
≥ 100	0
≥ 80	1
≥ 50	2
≥ 30	3
≥ 0	4

2.6 数据处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本比较采用 *t* 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 乙酰胆碱对血管舒张作用的影响 Ach 在 $0.01 \sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内对内皮完整的大鼠离体胸主动脉环均具有浓度依赖性舒张作用。当 Ach 浓度为 $0.1, 1, 10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,血管舒张率分别达 $47.67\% \pm 16.30\%$, $72.29\% \pm 9.22\%$, $86.79\% \pm 11.51\%$ 。非去内皮组血管内皮完好;当 Ach 为最大浓度时,去内皮组血管的舒张率为 $0.94\% \pm 7.76\%$ 。去内皮组血管内皮去除干净,两组血管环活性均符合实验要求,见图 1。



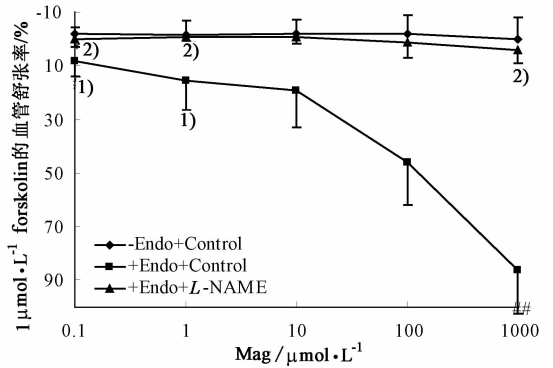
+ Endo 代表内皮完整组; -Endo 代表去内皮组

图 1 乙酰胆碱对 PE 预收缩具内皮和去内皮血管环舒张的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 内皮对木兰脂素血管舒张作用的影响 Mag 在 $0.1 \sim 1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内对内皮完整的大鼠离体胸主动脉环具有浓度依赖性舒张作用。

Mag 对内皮完整组与去内皮组血管之间的舒张具有统计学差异,内皮完整组血管的最大舒张效率 (E_{max}) 为 $86.08\% \pm 16.30\%$;而去内皮组血管 E_{max} 为 $0.26\% \pm 8.24\%$ 。这些数据说明 Mag 的血管舒张作用具有内皮依赖性,见图 2。

3.3 L-NAME 对 Mag 血管舒张作用的影响 内皮完整组血管环用 L-NAME ($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预处理,与未用 L-NAME 处理的血管环相比, Mag 引发的血管舒张作用明显减弱,两组数据比较有明显的差异 ($P < 0.01$)。L-NAME 处理组 E_{max} $4.05\% \pm 5.16\%$;未处理组 E_{max} $86.08\% \pm 16.30\%$,说明 Mag 血管舒张作用与 eNOS 激活有关,见图 2。



+ Endo + Control 代表内皮完整组; -Endo + Control 代表去内皮组;
+ Endo + L-NAME 代表内皮完整

L-NAME 干预组, + Endo + Control 与 -Endo + Control 比较

¹⁾ $P < 0.01$; + Endo + L-NAME 与 + Endo + Control 比较²⁾ $P < 0.01$

图 2 内皮和 L-NAME 对 PE 预收缩血管舒张的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4 木兰脂素对大鼠肾细胞 NRK 生长的影响 大鼠肾细胞 NRK 细胞株用 $0.1 \sim 1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Mag 孵育 24 h 后,各组细胞的相对增殖率 RGR 在 ($84.17\% \pm 1.27\%$) 到 ($134.60\% \pm 39.78\%$),均大于 80% ,按照《美国药典》细胞毒性评价标准,木兰脂素毒性评价在 $0 \sim 1$ 级,表明 Mag 在 $0.1 \sim 1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内对 NRK 细胞属于无毒性,见表 2。

表 2 木兰脂素对肾细胞 NRK 生长情况的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

木兰脂素/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	相对增殖率/%	细胞毒性等级
0.1	86.15 ± 10.55	1
1	90.42 ± 11.54	1
10	84.17 ± 1.27	1
100	100.69 ± 27.16	0
1 000	134.60 ± 39.78	0

4 讨论

本研究结果表明,木兰脂素对离体大鼠胸内皮

完整主动脉环有浓度依赖性舒张作用,而对去内皮血管环没有舒张作用。因此,木兰脂素所致的血管舒张可能具有内皮依赖性,其通过作用于内皮系统而发挥作用。

外周血管舒张的机制主要有两种:一是血管内皮依赖性,另一是血管内皮非依赖性。血管内皮依赖性扩张主要由内皮生成的血管舒张物质扩散到相邻的平滑肌细胞导致血管舒张,如 NO、前列环素(PGI₂)和 EDHF。正常内皮细胞具有抗凝血、抗炎和抑制血管增生和维持血管张力平衡的功能,这些功能都与 NO 有关。在诸如高血压、动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、糖尿病等疾病中,内皮细胞功能障碍是造成血管舒张功能丧失,炎症和血栓形成的共同病理基础。NO 生物利用度降低是导致内皮功能紊乱的一个重要因素。NO 是一种气体信息分子,由 NOS 催化合成,在内皮细胞中大量存在的 eNOS。正常生理条件下,血管内皮细胞中的 NO 主要源于 eNOS,在内皮生成后,扩散到平滑肌细胞作用于可溶性鸟苷酸环化酶生成环磷酸鸟苷(cGMP),进而引起血管舒张^[2]。内皮细胞环氧化酶是一个重要的酶,它以花生四烯酸为底物催化合成前列环素 H₂(PGH₂),后者进而在 PGI₂ 合酶的催化作用下生成 PGI₂。PGI₂ 通过受体作用激活腺苷酸环化酶而提高平滑肌细胞内环磷酸腺苷(cAMP)含量,进而激活蛋白激酶 A(PKA)导致血管舒张^[12]。还有一类 EDHF 可通过血管平滑肌上的钾离子通道开放,引起细胞膜的超极化而关闭钙离子通道,造成小的阻力血管舒张,有关 EDHF 的化学本质还存在争议^[13]。针对木兰脂素内皮依赖性作用特点,笔者首先检测了 NO/cGMP 的介入情况,L-NAME 是 eNOS 的抑制剂,它可以与 eNOS 结合抑制 NO 的合成,进而影响下游的信号通路^[14]。笔者观察分别用 L-NAME 预处理对木兰脂素舒张作用的影响,发现 L-NAME 可抑制木兰脂素的血管舒张作用,表明木兰脂素舒张作用可能与 eNOS 激活有关。由于在大鼠胸主动脉不存 COX/PGI₂ 通路,因此,笔者没有对血管舒张的另一条通路 COX/PGI₂ 进行考察,木兰脂素是否作用于该途径有待进一步探索。

综上所述,木兰脂素具有内皮依赖性的血管舒张作用,其作用机制可能与 eNOS 激活有关。本研究结果与前期报道的辛夷二氯甲烷提取物可能通过抑制外钙内流和胞质内钙外流干扰胞质内钙离子平衡的方式舒张血管不同^[8]。通过高效液相色谱仪检测发现辛夷二氯甲烷提取物中不含有木兰脂素(该数据没

有发表)。本实验还发现在一定的浓度范围内木兰脂素对大鼠肾细胞 NRK 没有毒性。这些实验结果为木兰脂素进一步开发提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] Thomas D Giles, Gary E Sander, Bobby D Nossaman, et al. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins [J]. J Clin Hypertens, 2012, 14(4): 198.
- [2] Bian K, Doursout M F, Murad F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases [J]. J Clin Hypertens, 2008, 10(4): 304.
- [3] 马玉良, 韩桂秋. 辛夷中木脂素成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(2): 102.
- [4] 李小莉, 张永忠. 木兰脂素抗炎、抗过敏作用的实验研究 [J]. 中草药, 2002, 33(11): 1014.
- [5] Kim J Y, Lim H J, Lee D Y, et al. *In vitro* anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(3): 937.
- [6] 李军辉, 王峰, 汪年松, 等. 木兰脂素对肾缺血再灌注损伤大鼠 P-选择素表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(7): 586.
- [7] 李军辉, 王峰, 向海燕, 等. 木兰脂素对肾缺血再灌注损伤大鼠 Toll 样受体 4 表达的影响 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(4): 536.
- [8] 张洪平, 李亚娟, 章丹丹, 等. 辛夷二氯甲烷提取物对离体大鼠胸主动脉环的舒张作用及其机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(9): 1689.
- [9] 凌霜, 张洪平, 章丹丹, 等. 桑枝不同溶剂提取物对血小板聚集、血管舒张及巨噬细胞活化的不同作用 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 3024.
- [10] 潘一峰, 章丹丹, 凌霜, 等. 南刘寄奴总黄酮体外抗血管炎症的机制分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2597.
- [11] The United States Pharmacopeial Convention. USP 29-NF 24 [M]. USA: The United States Pharmacopeial Convention, 1999: 2525.
- [12] Brock T G, McNish R W, Mare P G. Arachidonic is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E₂ [J]. J Bio Chem, 1999, 274(17): 11660.
- [13] Edwards G, Dora K A, Gardener M J, et al. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries [J]. Nat, 1998, 396(19): 269.
- [14] Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, et al. Characterization of ¹H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4, 3-a] quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase [J]. Mol Pharmacol, 1996, 50(1): 1.

[责任编辑 聂淑琴]