

复方当归汤含药肠吸收液舒张血管平滑肌的研究

李文宏,潘琳娜,徐国良,余日跃,黄丽萍,刘波,彭彩霞
(江西中医学院,南昌 330006)

[摘要] 目的:研究复方当归汤含药肠吸收液舒张血管平滑肌的作用。方法:取大鼠小肠制成翻转囊,置于复方当归汤粗提液中温孵 2 h,取肠囊内 K-R 液即得复方当归汤含药肠吸收液。采用大鼠离体胸主动脉环灌流模型,观察累积浓度含药肠吸收液对基础状态、苯肾上腺素(PE)预收缩、氯化钾预收缩血管环的作用,并与硝苯地平比较。结果:复方当归汤含药肠吸收液对基础状态或氯化钾预收缩的血管环无明显影响;当含药肠吸收液中指标成分阿魏酸浓度累积达 2.48×10^{-3} , 4.96×10^{-3} , $9.92 \times 10^{-3} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可剂量依赖性抑制 PE 预收缩的血管环收缩 ($P < 0.05$)。硝苯地平对基础状态预收缩的血管环无明显影响;当浓度累积达 8.66×10^{-4} , 17.32×10^{-4} , $34.65 \times 10^{-4} \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可剂量依赖性抑制 PE 或氯化钾预收缩的血管($P < 0.05$,或 $P < 0.01$)。结论:复方当归汤含药肠吸收液对完整内皮的 PE 预处理的血管有舒张作用,含药肠吸收液可用于中药复方离体药效学研究。

[关键词] 复方当归汤;含药肠吸收液;胸主动脉环;体外药效学研究

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)11-0205-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.001 [网络出版时间] 2012-03-27 14:38

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1438.001.html>

Preliminary Study on the Relaxant Effect of Compound Danggui
Decoction-containing Intestinal Absorption on
Vascular Rings of Thoracic Aorta in Rats

LI Wen-hong, PAN Lin-na, XU Guo-liang, YU Ri-yue, HUANG Li-ping, LIU Bo, PENG Cai-xia

[收稿日期] 20111128(010)
[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 项目)(2010CB530603);江西中医学院博士启动基金课题
[第一作者] 李文宏,博士学位,副教授,从事中药药理心血管研究,Tel:0791-87118919

表 4 平胃舒胶囊对大鼠血清 GAS、
血浆 MOT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GAS /pg·m ⁻¹	MOT /pg·mL ⁻¹
对照	-	87.90 ± 40.00	141.03 ± 26.79
模型	-	54.37 ± 21.11	103.87 ± 32.75
平胃舒胶囊	3.3	59.92 ± 31.03	108.19 ± 43.19
	6.6	82.52 ± 34.92 ¹⁾	148.19 ± 55.16 ¹⁾
	13.2	83.28 ± 20.50 ¹⁾	146.48 ± 54.86 ¹⁾
雪胆胃肠丸	22	77.60 ± 26.11 ¹⁾	139.52 ± 35.90 ¹⁾
雷尼替丁	0.05	84.71 ± 16.68 ²⁾	146.09 ± 32.64 ²⁾

[参考文献]

[1] 何华,袁孝兵. 养胃舒颗粒对大鼠急性胃炎胃黏膜保护作用的实验研究[J]. 中医药临床杂志,2005,10(17):461.

[2] 徐叔云. 药理实验方法学.3 版[M]. 北京:人民卫生

出版社,2002:1331.

[3] 李旭楷,肖咏,韩坚,等. 胃舒散对实验性胃炎保护作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(6):47.

[4] 陈贺,张慧颖,刘禾,等. 联合化学刺激法所致大鼠慢性胃炎[J]. 实验动物科学,2010,27(1):23.

[5] 李艳,罗兴菊,陈骏,等. 胃萎消颗粒治疗大鼠慢性萎缩性胃炎的实验研究[J]. 中国医药导报,2011,9(25):5.

[6] 李翼,柴剑波,李胜志,等. 寒热方对消炎痛型胃溃疡寒、热证模型大鼠血清 GAS、MOT 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):170.

[7] 沈鸿,张英华,田甲丽,等. 胃舒安胶囊对动物实验性胃溃疡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):174.

[责任编辑 古云侠]

(Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate relaxant effect of Compound Danggui decoction (DGD) -containing intestinal absorption on vascular rings of thoracic aorta in rats. **Method:** The everted gut sac was prepared using intestinal of rats, then was immersed into the crude extractive solution of compound DGD, the K-R solution inside the sac was collected as the intestinal absorption of DGD after 2 hours incubation. The study was performed with the model of rat isolated thoracic aorta rings in organ bath. The effect of accumulated DGD on aorta rings in resting tension, or pre-constricted with KCl, or pre-constricted with phenylephrine (PE) was observed, and were compared with nifedipine. **Result:** DGD had no significant effects on aorta rings in resting tension or pre-constricted with KCl. When the concentration ration of ferulic acid in DGD was cumulated to 2.48×10^{-3} , 4.96×10^{-3} , $9.92 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, it caused concentration-dependent relaxation while aorta rings were pre-constricted with PE. Nifedipine had no significant effects on aorta rings in resting tension, when the concentration ration of nifedipine was cumulated to 8.66×10^{-4} , 17.32×10^{-4} , $34.65 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, it caused concentration-dependent relaxation while aorta rings were pre-constricted with PE, or pre-constricted with KCl. **Conclusion:** Intestinal absorption of compound DGD can relax the rat thoracic aorta rings with endothelium. The results indicate that intestinal absorption containing drugs may be used to pharmacodynamic study *in vitro*.

[Key words] Compound Danggui decoction; drug intestinal absorption; thoracic aorta rings; pharmacodynamic study *in vitro*

目前,多数中药复方都存在作用机制不清、药效物质不明的窘境,成为制约其现代化的瓶颈之一。体外药理研究有条件严格可控、干扰少、重复性好等优点,在药物的活性筛选,毒性评价,深入的细胞、分子药理等研究中起重要作用^[1]。中药复方体外药理研究方法主要有直接添加法和血清药理学法,但都不能真实反映复方的体内药效物质,因而干扰大、可能出现假阳性结果。因此,寻找更客观、准确的体外药理研究方法,是中药复方现代化研究中亟待解决的关键问题之一。体外药物肠吸收法是研究西药和中药(包括单体、有效部位及复方)吸收动力学的经典方法,能够较好地反映药物的体内吸收过程,最近有运用该方法探讨中药复方基础研究的探索^[2-3]。中药复方经肠吸收后,其肠吸收液含有复方吸收入体内的成分,且无内源性或外源性干扰成分,用于体外实验是否能客观、准确地反映复方的体内作用?这一问题有待系统、深入地探讨。本实验拟以复方当归汤含药肠吸收液为对象,通过观察对大鼠离体胸主动脉环灌流模型的基础状态、苯肾上腺素或氯化钾预收缩血管环的作用,初步探讨中药复方含药肠吸收液用于体外药理实验的可行性。

1 材料

1.1 药物及试剂 复方当归汤:由当归、川芎、红花按 1:1:1 组成,药材均购自江西黄庆仁堂大药房,由江西中医学院付小梅副教授鉴定,符合《中国药典》

(2005 年版)规定,按药典方法自提,制备成含生药量为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液备用;复方当归汤肠吸收液,取大鼠小肠,将肠腔面翻转后结扎一端使成囊状,肠囊内加 K-R 液,置于盛有复方当归汤粗提液的恒温、通氧麦氏浴槽,温孵 2 h 后取肠囊内 K-R 液即得。其中以阿魏酸为检测成分,测得同一批次 6 段肠管含药肠吸收液中阿魏酸的平均质量浓度为 $0.124 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;氯化乙酰胆碱(Ach,阿拉丁公司,批号 21250);苯肾上腺素(PE, Sigma 公司,批号 109K1528);硝苯地平(中国食品药品检定研究所,批号 100338-201103,临时用 K-H 液配成 $0.015 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$);K-H 液: $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 含(g) NaCl 120, KCl 4.7, NaH_2PO_4 1.18, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2, CaCl_2 2.5, NaHCO_3 24.5, 葡萄糖 11.1, EDTA 0.03, 调 pH 至 7.4。K-R 液: $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 含(g) NaCl 129, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 5.0, 葡萄糖 3.0, 调 pH 至 7.4。

1.2 仪器 PowerLab 多通道生理记录系统(含离体器官测定仪),澳大利亚 AD Instruments Pty Ltd; Agilent 1200 HPLC(四元泵、自动进样器、DAD 检测器)美国 Agilent 公司,ZH 数字式超级恒温浴槽,淮北正华生物仪器设备有限公司;麦氏浴槽等。

1.3 动物 SD 大鼠, $(180 \pm 20) \text{ g}$,雌雄不拘,江西中医学院实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(赣)2006-0001。

2 方法

2.1 肠外翻模型的制备 SD 大鼠实验前禁食 12 h,自由饮水。2% 戊巴比妥腹腔麻醉,小心将大鼠肠管与肠系膜剥离,将肠管置于冰浴上操作,分别切取空肠、回肠各 10 cm。将上述肠道用 37 ℃ K-R 液冲洗至无内容物,在不损伤肠管的情况下,剥离肠表面的脂肪及血管。将肠腔面向外翻出,用 K-R 液冲洗后将一端结扎,使之形成囊状肠管。向肠囊内注入 2 mL 空白 K-R 液,将其放入已有 K-R 液的麦氏浴槽中,保持 37 ℃ 恒温,并向浴槽中通入 95% O₂ 和 5% CO₂,平衡 5 min 后,将麦氏浴槽中的 K-R 液倒出,待用。

2.2 复方当归肠吸收液的制备 肠管平衡后,向麦氏浴槽中注入 37 ℃ 恒温的含生药 1 g·mL⁻¹ 复方当归汤药液 20 mL,同时开始计时,肠管中加入的 2 mL K-R 液,温孵 2 h 后取出小肠,收集肠管中的缓冲液即得含药肠吸收液,备用。

2.3 血管环的制备 取 SD 大鼠,用钝器击晕后,迅速开胸、分离出胸主动脉,置于 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气预饱和的 4 ℃ K-H 液中。去除血管周围的脂肪及结缔组织,将动脉剪成 2~3 mm 的血管环。血管环用两根不锈钢微型挂钩贯穿血管官腔,下方固定,上方以一细钢丝连于张力换能器。将血管环水平悬挂于预置 10 mL K-H 液的浴管内,37 ℃ 恒温,持续充以 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体。血管环平衡 60 min,期间每 20 min 换液 1 次,并调节静息张力 2 g。用 6×10⁻² mol·L⁻¹ KCl 的 K-H 液重复刺激 3 次,以诱发血管的最大收缩幅度。

实验用 BL-420F 计算机生物信号记录分析系统记录血管的张力变化,分别以末次 KCl (6×10⁻² mol·L⁻¹),PE (1×10⁻⁶ mol·L⁻¹) 刺激引起的最大收缩幅度为 100%,所得数据用百分比表示。

2.4 复方当归汤肠吸收液对基础状态血管环的影响 用累积加药法,分次加入 50, 50, 100, 200, 400 μL 药液,以每次加药血管张力达坪值后,才加入下一浓度。实验组 (n=8) 共加入复方当归肠吸收液 5 次,使浴管内阿魏酸终浓度分别达 6.2×10⁻⁴, 1.24×10⁻³, 2.48×10⁻³, 4.96×10⁻³, 9.92×10⁻³ g·L⁻¹,观察含药肠吸收液对血管环的作用。硝苯地平对照组 (n=8) 共加入硝苯地平液 5 次,使浴管内药物终浓度分别达 2.17×10⁻⁴, 4.33×10⁻⁴, 8.66×10⁻⁴, 17.32×10⁻⁴, 34.65×10⁻⁴ mmol·L⁻¹;空白对照组 (n=8) 以 K-H 液累积加入。以血管环张力的变化率来表示。

$$X = (\text{基值} - \text{给药后值}) / \text{基值} \times 100\%$$

2.5 复方当归汤肠吸收液对 PE 预收缩血管环的影响 实验组与硝苯地平对照组以 1×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的 PE 预收缩血管环,采用累积加药法,具体方法如 2.4 所述,观察复方当归汤含药肠吸收液对血管环的作用。空白对照组以 K-H 液累积加入。以测得的血管环张力变化值与 PE 预收缩血管张力变化值之比来表示。

$$X = (\text{坪值} - \text{给药后值}) / (\text{坪值} - \text{基值}) \times 100\%$$

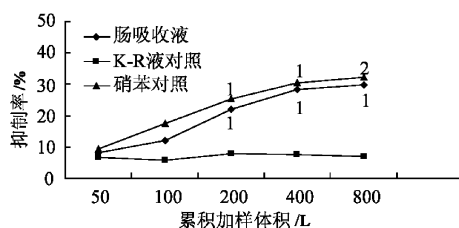
2.6 复方当归肠吸收液对 KCl 预收缩的血管环的影响 用 6×10⁻² mol·L⁻¹ 的 KCl 代替 1×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的 PE 预处理动脉环,具体方法同 2.4。

2.7 数据统计 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 统计软件处理,两组间比较采用 *t* 检验进行显著性检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 复方当归汤肠吸收液对基础状态血管环的影响 在基础状态下,各浓度复方当归汤肠吸收液对血管环无明显作用,硝苯地平对血管环亦无明显影响。

3.2 复方当归汤肠吸收液对 PE 预收缩血管环的影响 复方当归汤肠吸收液可对抗 PE 所致内皮完整血管的收缩,当浴槽中指标成分阿魏酸终浓度累加到 2.48×10⁻³, 4.96×10⁻³, 9.92×10⁻³ g·L⁻¹ 时可产生明显的血管舒张作用,平均抑制率分别为 21.90%, 28.33%, 29.94% (*P* < 0.05),呈剂量依赖性增强,且与累积浓度达 8.66×10⁻⁴, 17.32×10⁻⁴, 34.65×10⁻⁴ mmol·L⁻¹ 的硝苯地平相比无明显差异。见图 1。



与 K-R 液空白对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 (图 2 同)

图 1 复方当归汤肠吸收液对 PE 预收缩血管环的作用

3.3 复方当归汤肠吸收液对 KCl 预收缩的血管环的影响 各浓度复方当归汤肠吸收液对 KCl 预收缩的血管环无对抗作用,与 K-R 对照组比较无统计学差异;当浓度累积达 17.32×10⁻⁴, 34.65×10⁻⁴ mmol·L⁻¹ 时,硝苯地平可舒张 KCl 预收缩的血管环,与 K-R 对照组比较有明显差异 (*P* < 0.05, *P* < 0.01),且呈剂量依赖性增强,结果见图 2。

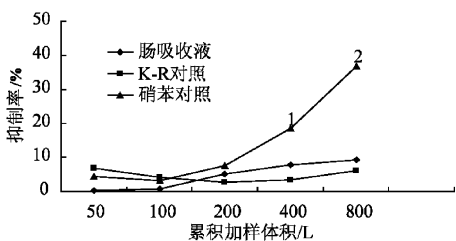


图 2 复方当归汤肠吸收液对 KC1 预收缩血管环的作用

4 讨论

目前,中药复方体外药理研究方法主要有直接添加法和血清药理学法。直接添加法缺乏复方的体内代谢物或机体反应物等实际有效成分,机体非吸收物质、粗提物理化性质等都可对离体实验带来干扰。血清药理学法涉及血清这一复杂体系,存在酶、纤溶、补体、激肽等内源性生物活性物质,因而会对离体系统带来较大干扰;此外,不同种属、年龄的动物,不同的给药剂量、采血时间等,均导致血清中含药成分质量不尽相同,加之血清药物浓度较低,上述因素均会影响该方法的重复性、结果的准确性。近年来,出现了脑脊液药理学方法,然而,由于脑脊液量少、获取不易,仅限于体外神经药理研究^[4-5]。由此可知,现有体外药理研究方法的缺陷,制约了中药复方作用机制及物质基础的阐明,因此,探索新型科学的体外药理研究方法是中药复方现代化研究亟待解决问题。基于上述思考,本课题组提出了以中药复方含药肠吸收液为对象,探讨用于体外药理研究的可行性。采用离体小肠吸收法来模拟中药复方的体内吸收过程,并制备中药复方的含药肠吸收液,该体系能较好地反映其进入体内的化学成分;制备条件可严格控制,重复性好。含药肠吸收液去除了复方的非吸收成分及其他杂质,消除了粗提物的渗透压、pH 等干扰离体体系的理化因素,也无含药血清的复杂血清及其他内源性成分的污染,因而更便于观察和追踪药物的吸收过程,可较为清楚地认识复方中主要有效成分及活性部位;含药量较高,实验表明复方当归汤肠吸收液单一有效成分阿魏酸浓度可达 $10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,可基本满足各种体外药效学研究对药物浓度的要求,且用药量与药液浓度有很好的换算关系。将中药复方含药肠吸收液用于体外药效实验研究,应该干扰更少、结果更准确可靠。

血管平滑肌细胞上钙通道主要有 ROCC 和 VDCC,分别为 PE 和高钾去极化所激活^[6]。实验表明,硝苯地平可对抗 PE 和高钾所致内皮完整血管环的收缩,与文献报道一致,表明该方法是可靠的。文献表明^[7-8],硝苯地平属难溶性药物,实验时溶于

无水乙醇、双蒸水稀释后使用,对血管环收缩有很强的抑制作用,为避免乙醇带来的干扰,本实验未用无水乙醇助溶,可能是导致硝苯地平血管环收缩抑制率偏低的原因。复方当归汤由当归、川芎、红花组成,具有扩张血管、降低血压等作用。研究表明,当归挥发油、藁本内酯等成分能扩张外周血管,该作用与兴奋胆碱和组胺受体等有关。川芎的扩张血管作用与其有效成分阿魏酸的 α -受体阻断作用相关。红花也有扩张血管作用,与 α -受体阻断有关。实验表明,复方当归汤肠吸收液对 KC1 预收缩的血管环无影响,说明其扩张血管作用与钙离子通道无关;含药肠吸收液对 PE 预收缩的血管环有明显的舒张作用,表明该作用与 α 受体阻滞有关。实验结果与文献报道相一致,表明复方当归汤肠吸收液用于离体血管环试验能较客观、准确地反映其扩张血管的作用及机制,初步证明中药复方含药肠吸收液用于体外药效学研究是可行性的。

[参考文献]

- [1] Starughan D W, Fentem J H, Balls M. Replacement alternative and complementary *in vitro* methods in Pharmaceutical research[M]. Academic Press Inc, 1997: 1.
- [2] 谭晓斌,贾晓斌,陈彦,等.从肠吸收屏障网络进行中药基础研究的思路及探索[J].中草药,2009,40(10):1520.
- [3] 武晓群,陈斌,黄厚才,等.基于肠吸收屏障网络的中药成分相互作用与配伍机理研究[J].新中医,2010,42(9):102.
- [4] 梅建勋,张伯礼,陆融.采用脑脊液药理学方法对中药影响星形胶质细胞神经营养作用的观察[J].中药材,2000,23(8):467.
- [5] 郭建文,何迎春,陈绍宏,等. Beagle 犬含药脑脊液干预急性脑出血体外细胞模型时间窗的实验研究[J].中药材,2005,28(10):927.
- [6] 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):C 1523.
- [7] 刘确,关永源,曾进胜,等.硝苯地平 and 环匹阿尼酸对易卒中型肾性高血压大鼠血管平滑肌收缩功能的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,1996,10(1):34.
- [8] 林默君,关永源,贺华.硝苯地平 and SK&F 96365 对 cyclopiazonic acid 触发的大鼠主动脉血管环收缩效应的影响[J].福建医科大学学报,2000,34(1):1.

[责任编辑 聂淑琴]