

元胡止痛方肠吸收液对大鼠离体胸主动脉环张力的影响

黄斌^{1,2}, 陈晓萌^{2,3}, 张迎春², 许海玉², 吴宏伟², 杨洪军^{2*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

[摘要] **目的:**观察元胡止痛方肠吸收液对大鼠离体胸主动脉环张力的影响,探讨中药体外药理实验的新方法。**方法:**采用外翻肠囊法制备元胡止痛方 0.25, 0.5, 1, 2 h 4 个时间点的肠吸收液;大鼠脱臼处死后迅速取出胸主动脉,用 $45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 对大鼠胸主动脉环进行预收缩,采用累积加样法加入肠吸收液,累计依次加样至 50, 100, 200, 400, 800, 1 600 μL ,分别观察各组肠吸收液在不同加样量下对大鼠胸主动脉环张力的影响,每组重复观察 6 次。**结果:**2 h 肠吸收液组随着加样量的增加血管舒张率逐渐增高,说明其血管舒张活性增强,并具有量-效关系;与空白组比较,累计加样至 200 μL 时有显著性差异 ($P < 0.05$),累计加样至 400, 800, 1 600 μL 时均有极显著性差异 ($P < 0.01$)。当累计加样量为 1 600 μL 时,上述 4 组的血管舒张率均明显增高,与空白组比较,0.5 h 组有显著性差异 ($P < 0.05$),1 h 组和 2 h 组均有极显著性差异 ($P < 0.01$),结果提示随着吸收时间的延长,肠吸收液的血管舒张活性明显增强,呈现时-效关系。**结论:**元胡止痛方的肠吸收液具有显著的血管舒张活性,并存在量-效关系和时-效关系。

[关键词] 元胡止痛方; 肠吸收液; 胸主动脉环; 活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0117-04

Effect of Intestinal Absorption Solution of Yuanhu Zhitong Preparation on the Tension of Rat Thoracic Aortic Ring

HUANG Bin^{1,2}, CHEN Xiao-meng^{2,3}, ZHANG Ying-chun²,
XU Hai-yu², WU Hong-wei², YANG Hong-jun^{2*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Southwest Jiaotong University, College of Life Science and Engineering, Chengdu 610031, China)

[Abstract] **Objective:** To observe *in vitro* effect of intestinal absorption solution of Yuanhu Zhitong preparation on the tension of rat thoracic aortic ring in order to provide new method for pharmacological experiments of traditional Chinese medicine *in vitro*. **Method:** Firstly, intestinal absorption solution of Yuanhu Zhitong preparation was prepared by everted gut sac method *in vitro* at 4 different time points (0.25, 0.5, 1, 2 h). The thoracic aortic was quickly removed after rats were sacrificed by dislocation. Then aortic rings were pre-contracted by KCl ($45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), and the tension of thoracic aortic ring was observed by adding different volumes (50, 100, 200, 400, 800, 1 600 μL) of the intestinal absorbed solution from Yuanhu Zhitong preparation, experiments were performed in six replicates ($n = 6$ per group). **Result:** The vasorelaxation rate was enhanced with the increased volumes of intestinal absorption solution at 2 h, the results indicated that the vasorelaxation was enhanced and a dose-effect relationship was found; Compared with control group of intestinal absorption solution without Yuanhu Zhitong preparation, when the volume of 200 μL was added, $P < 0.05$; when the volume of 400,

[收稿日期] 2011-12-19

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2008BAI51B03);中药质量控制技术国家工程实验室课题(655-30)

[第一作者] 黄斌,在读硕士,从事中药药理研究, Tel:13718406506, E-mail:lshuangbin@qq.com

[通讯作者] * 杨洪军,博士,研究员,从事中药新药设计的方法与技术研究, Tel:010-84035184, E-mail: hongjun0420@vip.sina.com

800, 1 600 μL was added, $P < 0.01$. When the volume of 1 600 μL was added, the vasorelaxation of 4 groups were all enhanced, compared with control group of intestinal absorption solution, there was statistical significance in 0.5 h group, $P < 0.05$; 1 h, 2 h group significance at $P < 0.01$, the results indicated that the vasorelaxation was also enhanced with the delayed absorption time of Yuanhu Zhitong preparation and a time-effect relationship was observed. **Conclusion:** The results show that the intestinal absorption solution of Yuanhu Zhitong preparation may have significant vasorelaxation activity with a manner of dose-effect and time-effect relationship.

[**Key words**] Yuanhu Zhitong preparation; intestinal absorption solution; aortic ring; activity

中药化学成分复杂,直接用中药提取物进行体外药理实验,除了有效成分外,很多杂质,如鞣质,电解质等,或是药物的酸碱度都可能会对体外的细胞、器官或组织等产生一些不必要的影响^[1]。20 世纪 90 年代,日本学者提出血清药理学,用达到稳态的含药血清进行体外药理实验,被中医药学者广泛接受。然而,含药血清经过体内过程后,其药物含量降低,有效成分可能发生变化或更加复杂,增加了质控难度^[2]。而且,血清中非药物影响的、本身固有的多种生物活性物质可能会影响体外实验模型的建立^[3-4],影响离体细胞的生物活性^[5],最终影响实验结果,甚至导致假阳性或假阴性结果^[6]。

在药代动力学领域中,外翻肠囊法主要用于研究药物的吸收程度和速度,肠吸收液中存在一定量的药物成分,已是不争的事实。但基于含药肠吸收液进行药理活性评价,尚未见报道。本课题组前期研究表明,元胡止痛方的体内入血成分与肠吸收液中成分种类较一致。

本研究采用元胡止痛方的肠吸收液,观察其对大鼠离体胸主动脉环张力的影响,旨在探讨采用肠吸收液是否可以用于进行中药复方体外活性的评价,最终为中药药理学的体外实验方法提供一个可行的途径。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠,雄性,体重(250 \pm 10) g,由北京大学医学部实验动物科学部提供,合格证号 SCXK(京)2006-0008。

1.2 试剂 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),NaCl(北京化工厂,批号 20090621),KCl(国药集团化学试剂有限公司,批号 F20080716),NaHCO₃(国药集团化学试剂有限公司,批号 20100716),NaH₂PO₄(天津市科密欧化学试剂开发中心,批号 030828),MgCl₂(国药集团化学试剂有限公司,批号 10012892),无水 CaCl₂(国药集团化学试剂有限公司,批号 F20100527),无水 MgSO₄(国药集团化学试剂有限公司,批号 F20100715),KH₂PO₄(北京化学

试剂公司,批号 030517),葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司,批号 20101229),以上试剂均为分析纯。

1.3 药材 延胡索产于浙江杭州、白芷产于河北安国,均购自河北省安国中药材有限公司,经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定,延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang. 的干燥块茎。白芷为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根。

1.4 仪器 ALC-M 型组织-器官水浴-记录系统(上海奥尔科特生物科技有限公司),BP110S 型电子分析天平(Sartorius 公司),KH3200E 型超声波清洗器(昆山和创超声仪器有限公司)。

1.5 缓冲液的配制

1.5.1 Tyrode 缓冲液配制 NaCl 8.0 g, KCl 0.28 g, NaHCO₃ 1.0 g, NaH₂PO₄ 0.05 g, MgCl₂ 0.1 g 溶于 500 mL 蒸馏水中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;CaCl₂ 0.2 g 溶于 500 mL 蒸馏水中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;用时二者均匀混合,加入葡萄糖 1.0 g 即得^[7]。

1.5.2 Krebs-Henseleit (K-H) 液配制 储备液 A 液: NaCl 6.896 g, MgSO₄ 0.144 g, KH₂PO₄ 0.163 g, NaHCO₃ 2.1 g, KCl 0.35 g; B 液: 葡萄糖 1.915 g; C 液: CaCl₂ 0.277 g。各加双蒸水溶解定容到 100 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用时先加 1 650 ~ 1 670 mL 双蒸水,再加 B 液,再加 A 液至 850 ~ 870 mL 左右,摇匀后,滴加 C 液,定容到 2 000 mL^[8]。

2 方法

2.1 元胡止痛方供试液的制备 称取白芷 200 g 和延胡索 400 g,粉碎过筛,用 4 倍量 70% 乙醇回流提取 2 h,冷却,过滤,得滤液。依次提取 2 次,合并滤液,减压浓缩至 60 mL,用台氏液稀释至含生药 0.16 g \cdot mL⁻¹,得元胡止痛方供试液,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。使用前于室温自然解冻。

2.2 不同时间点的元胡止痛方肠吸收液制备 将实验前禁食 12 h 的大鼠称重后,断颈椎处死,沿腹

中线和腹白线分别剪开皮肤与肌肉。迅速取出小肠,自胃幽门以下 10 cm 开始向下量取 14 cm 为肠段一;间隔 10 cm 量取 14 cm 为肠段二;再间隔 10 cm 量取 14 cm 为肠段三;最后从回盲瓣以上 5 cm 开始向上取 14 cm 为肠段四。将剪下的肠管放入 0 ℃ 台氏液中冲洗,至无肠内容物为止。将自制硅胶套管软端插入肠管用丝线结扎,小心将肠道翻转。用 0 ℃ 台氏液冲洗内表面,将另一端用丝线结扎成囊状^[9]。麦氏浴管中预先加入 25 mL 元胡止痛方供试液,通入混合气体(95% O₂ 和 5% CO₂),37 ℃ 恒温。在肠管中注入 2 mL 台氏液,将肠管放入麦氏浴管中。在 0.25,0.5,1,2 h 分别收集各组的肠囊内所有液体,每只动物 4 根肠段的液体各自合并为 1 个肠吸收液样品。肠吸收液样品放入干净的 EP 管中,-20 ℃ 保存待用。

2.3 大鼠胸主动脉环制备^[10] 取 SD 雄性大鼠,颈部脱臼,剪开胸腔,迅速取出胸主动脉条,放置于 4 ℃ K-H 液中,小心剥去附在胸主动脉的脂肪及结缔组织,横切成 2~3 mm 长的血管环。将血管环悬挂于预置 5 mL K-H 液的浴槽中,恒定温度(37.0 ± 0.2) ℃,持续通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体。血管环的一端固定,另一端经张力换能器连接 ALC-M 离体组织器官实验系统,记录实验过程中张力的变化。稳定过程先以 0 g 张力开始,维持 30 min 后调节其基础张力至 1 g,平衡 1 h,期间每隔 15 min 更换一次 K-H 液。主动脉环稳定后,用 KCl(45 mmol·L⁻¹)刺激,待收缩幅度稳定后用 K-H 液洗脱,以激发最大收缩并使血管收缩状态更稳定。

2.4 分组 取雄性 SD 大鼠 15 只,随机分成 5 组,每组 3 只,每只制备胸主动脉环 2 个。在麦氏浴管中加入 25 mL 元胡止痛方供试液,按不同吸收时间分为 0.25,0.5,1,2 h 共 4 组;空白组在麦氏浴管中加入 25 mL 空白 Tyrode 缓冲液。实验重复 6 次。

2.5 大鼠胸主动脉环的收缩和舒张功能的测定

表 1 元胡止痛方肠吸收液不同时间点对大鼠离体胸主动脉环张力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

累计加样量	不同组别肠吸收液的血管舒张率/%				
	空白	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h
50 μL	-7.78 ± 4.47	-6.29 ± 2.79	-4.19 ± 4.21	-5.90 ± 5.58	-5.08 ± 9.04
100 μL	-11.95 ± 6.44	-9.77 ± 4.00	-6.13 ± 7.10	-6.60 ± 6.76	-4.84 ± 10.15
200 μL	-13.17 ± 7.46	-12.55 ± 6.1 ³⁾	-6.87 ± 8.33	-6.10 ± 7.02	1.78 ± 11.39 ¹⁾
400 μL	-14.13 ± 7.91	-13.10 ± 8.16 ⁴⁾	-5.69 ± 8.47 ⁴⁾	-0.20 ± 8.90 ^{1,3)}	17.48 ± 12.1 ²⁾
800 μL	-14.96 ± 7.85	-10.35 ± 9.76 ⁴⁾	-1.42 ± 7.01 ⁴⁾	13.59 ± 8.02 ^{2,4)}	49.18 ± 16.27 ²⁾
1 600 μL	-10.54 ± 8.37	-5.25 ± 10.80 ⁴⁾	9.85 ± 4.98 ^{1,4)}	41.34 ± 9.98 ^{2,4)}	83.57 ± 7.63 ²⁾

注:与空白肠吸收液组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 2 h 肠吸收液组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

血管环用 K-H 液清洗数次,使其保持基础张力。然后用 KCl(45 mmol·L⁻¹)诱发最大收缩幅度为 100%,主动脉环稳定后,采用累积加样法在浴槽中加入肠吸收液,累计依次加样至 50,100,200,400,800,1 600 μL,每 10 min 加入 1 次,分别观察各组肠吸收液在不同加样量下对大鼠胸主动脉环张力的影响。实验结果以肠吸收液的血管张力舒张幅度与 KCl 诱发最大收缩幅度之间的比率作血管舒张反应的量-效曲线;药物引起的收缩幅度均以第 2 次 KCl(45 mmol·L⁻¹)引起的最大收缩幅度为相对标准值,用百分比表示。

2.6 统计分析 采用 SPSS 18.0.0 统计软件,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据采用单因素方差分析进行统计, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

以 KCl(45 mmol·L⁻¹)为预收缩药,观察不同时间点的肠吸收液对血管的舒张作用,结果见表 1 和图 1。从图 1 中可看出,累计加样量少于或等于 200 μL 时,所有的肠吸收液样品均未表现明显的舒张血管活性;累计加样量为 400 μL 时,2 h 的肠吸收液表现明显的舒张血管活性;当累计加样量为 1 600 μL 时,0.25,0.5,1,2 h 组的血管舒张率分别为(-5.25 ± 10.80)%,(9.85 ± 4.98)%,(41.34 ± 9.98)%和(83.57 ± 7.63)%,说明随着吸收时间的延长,肠吸收液血管舒张活性逐步增强,并具有时-效关系;2 h 组在累计加样量分别为 50,100,200,400,800,1 600 μL 时,血管舒张率依次为(-5.08 ± 9.04)%,-4.84 ± 10.15%,(1.78 ± 11.39)%,(17.48 ± 12.1)%,(49.18 ± 16.27)%,(83.57 ± 7.63)%,说明随加样量的增加,肠吸收液的血管舒张活性增强,并具有量-效关系。以上结果表明,元胡止痛方的肠吸收液具有显著的血管舒张活性,并存在量-效关系和时-效关系。

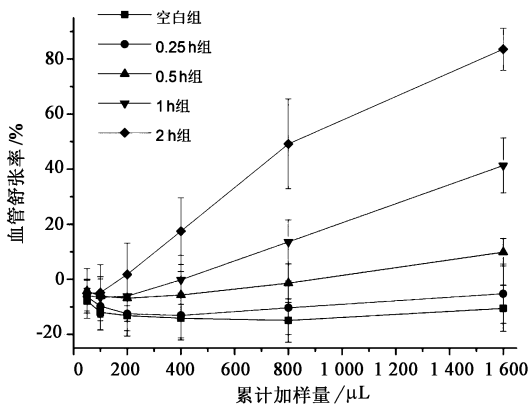


图 1 元胡止痛方肠吸收液对大鼠离体胸主动脉环张力的影响

4 讨论

本实验结果显示,不同时间点制备的元胡止痛方肠吸收液血管舒张活性不同,0.25 h 组未显示出活性,0.5 h 组、1 h 组、2 h 组均显示出活性,并且每一组均具有量-效关系。可见,肠吸收液用于体外药理活性评价,可排除未被吸收的成分的干扰,药理结果比较稳定,且重复性较好。

目前,中药体外药理实验缺乏一种行之有效的办法。无论是直接添加法还是血清药理学方法,都存在难以弥补的缺陷,而本研究应用肠吸收液进行体外药理实验的方法克服了二者的不足。首先,采用肠吸收液既可排除提取物中杂质对离体组织、细胞活性的影响,又可解决血清中生物活性物质的干扰问题。另一方面,血清药理学需确立给药方案、采血方案、血清灭活等繁琐的步骤,且最佳采血时间难以确定,而采用肠吸收液进行体外药理活性评价简单易操作。其次,元胡止痛方有效成分辨识研究显示,肠吸收成分与入血成分种类较一致(待发表),说明体外与体内实验具有一定的相关性。此外,外

翻肠囊法操作简单、成本较低,便于推广应用。

本实验结果提示,应用肠吸收液进行中药体外药理实验可获得稳定药理结果,并且可重复性强,可成为一种新的中药及其复方体外药理活性评价方法,在中药体外活性评价及机制研究、有效成分辨识、中药材及中成药的质量评价等方面具有应用前景。

[参考文献]

- [1] 黄臣虎,陆茵,高骁君,等. 中药血清药理学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):266.
- [2] 许炜茹,林洪生,陈信义,等. 中药复方体外药理研究的思考[J]. 中华中医药学刊,2011,29(1):55.
- [3] 包金凤,刘国卿. 中药血清药理学的方法学研究概述[J]. 药学进展,2000,24(2):89.
- [4] 周明眉,杨奎,姜远平,等. 中药血清药理学的方法学研究反应体系中含药血清加入量的研究[J]. 中药药理与临床,1998,14(6):43.
- [5] 刘成海. 中药复方体外药理研究思考[J]. 中药新药与临床药理,2000,11(1):53.
- [6] 赵万红,曹永孝,袁泽飞. 中药血清药理学的方法学探讨[J]. 中药新药与临床药理,2002,13(2):122.
- [7] 李晓宇,周尔君,顾圣莹,等. 荷叶碱大鼠肠道吸收特性研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(18):1417.
- [8] 周航,王思轩,张涛,等. 丹酚酸 B 与甘草酸对大鼠门静脉灌注压力的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2010,30(10):1084.
- [9] 韩国柱. 中草药药代动力学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1998:144.
- [10] 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):644.

[责任编辑 聂淑琴]