

· 药理 ·

右归饮对老年肾虚证小鼠影响的蛋白质组学研究

李俊丽, 李湏, 刘铭福, 刘治中, 张杰*

(中国中医科学院基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 从蛋白质表达水平观察中药方剂右归饮对老年小鼠生理性肾虚证动物模型的影响。方法: 将昆明系雄性小鼠随机分为老年肾虚证模型组、右归饮(5.6 g·kg⁻¹, 1次/d 连续 ig 2 个月)组与青年正常对照组 3 组, 对其肝、肾、睾丸组织蛋白质提取液及血清分别进行蛋白质双向电泳并对电泳图谱进行分析, 找出右归饮调节纠正的蛋白质, 进行质谱分析鉴定和 Western-blot 验证。结果: 找到右归饮调节纠正的蛋白质点 22 个, 质谱鉴定出 17 种蛋白质。结论: 找到并鉴定了右归饮对老年小鼠生理性肾虚证动物模型调节纠正的 17 种蛋白质。

[关键词] 右归饮; 肾虚证; 蛋白质组学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0109-06

Proteomics Study on Effects of Youguiyin Decoction on Kidney-Deficiency Syndrome in Mice

LI Jun-li, LI Yun, LIU Ming-fu, LIU Zhi-zhong, ZHANG Jie*

(Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Youguiyin decoction on the mice with Kidney-Deficiency Syndrome in protein expression level. **Method:** Kunming male mice were randomly divided into three groups as follows: the kidney-deficiency model group, the Youguiyin group (5.6 g·kg⁻¹ daily for 2 months) and the youth normal group. The proteins in liver, kidney, testis tissue and serum of the mice were separated and analysed by two-dimensional gel (2-DE) to find the proteins regulated and corrected by Youguiyin. These proteins were identified by mass spectrograph. **Result:** Twenty two regulated and corrected protein spots were detected, and 17 proteins spots were identified. **Conclusion:** This paper screens and identifies 17 proteins regulated and corrected by Youguiyin decoction.

[Key words] Youguiyin decoction; kidney deficiency Syndrome; proteomics

右归饮出于《景岳全书》, 具有“温补肾阳, 填精益髓”的功效, 是公认的温补肾阳的经典方剂。本文运用蛋白质组学研究技术, 找出了右归饮将肾虚模型组与青年正常组表达差异的蛋白质调节纠正为青

年正常组所表达的蛋白质, 从蛋白质表达水平观察了右归饮对老年生理性肾虚证小鼠动物模型相关组织蛋白质表达的影响。

1 材料

1.1 动物 昆明系小鼠, 雄性, 购自军事医学科学院, 许可证号 SCXK(军)2007-004。

1.2 方剂组成及处理 右归饮: 由熟地黄 12 g, 山药 6 g, 山茱萸 3 g, 枸杞子 6 g, 炙甘草 5 g, 杜仲 6 g, 肉桂 4 g, 制附子 7 g(先煎)组成, 上述中药冷水浸泡 30 min, 煎煮 2 遍, 合并煎液, 浓缩为 100 mL。含生药 0.49 g·L⁻¹。

[收稿日期] 2011-07-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(7082068)

[第一作者] 李俊丽, 硕士研究生, Tel: 13810834116, E-mail: lijunli8574@163.com

[通讯作者] * 张杰, 研究员, 从事肾虚证本质的研究, Tel: 010-64014411-2505, E-mail: zhangjie0115@163.com

1.3 试剂 丙烯酰胺 (Arc)、甲叉双丙烯酰胺 (Bis)、三(羟甲基)氨基乙烷 (Tris)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、四甲基乙二胺 (TEMED)、过硫酸胺 (APS)、二硫苏糖醇 (DTT)、碘代乙酰胺 (IAA)、尿素均为 Sigma 公司; 硫脲为 Fluka 公司; 硫代硫酸钠、无水碳酸钠、乙醇、冰醋酸、甘氨酸均为国产分析纯; 固相 pH 梯度干胶条 (IPG dry strip PH3 ~ 10NL, 18 cm) 及其 IPG 缓冲液、蛋白酶抑制剂及蛋白酶标准及考马斯亮蓝均购自 GE 公司。

2 方法

2.1 分组 昆明系雄性 18 月龄小鼠, 体重 55 ~ 65 g, 随机分为右归饮组和老年肾虚证模型组, 每组 20 只。右归饮组: 将右归饮以 $5.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (8 倍人用剂量), 1 次/d, 每灌服 6 d, 停药 1 d, 连续给药 2 个月。停止给药时, 小鼠达 20 月龄。老年肾虚模型组: 以同体积水 ig 小鼠, 方法同给药组。青年正常对照组: 选用 2 月龄小鼠为青年正常对照组, 体重 30 ~ 35 g。

2.2 动物取材及蛋白质提取 给药结束后, 取小鼠血清、肝、肾、睾丸组织, 置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。蛋白质提取: 分别快速取各组小鼠肝、肾、睾丸组织约 150 mg, 于液氮中迅速研磨。研磨后转入 Eppendorf 管中, 加入 0.5 mL 组织裂解液 [(Tris ($40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 尿素 ($7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 硫脲 ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 4% CHAPS (两性离子去污剂), 1% 二硫苏糖醇, 乙二胺四乙酸二钠 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)]。同时加入 1 × Cocktail (混合物) 蛋白酶抑制剂。将含裂解液的 Eppendorf 埋入冰中, 超声破碎, 3 ~ 4 s/次, 间隔 10 s 左右, 至溶液透明。加入 DNase I ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、RNase A ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 5 μL , $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min。 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min。血清去高峰蛋白处理: 选用德国 QIAGEN 生产的 Albumin and IgG Depletion 试剂盒处理血清高峰蛋白。取少量上清用 Bradford 法测定蛋白浓度, 其余上清 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 双向凝胶电泳 第一向等电聚焦 (IEF): 使用 pH 3 ~ 10, 18 cm IPG 预制胶条, 在 IPG 持胶槽中加入 7 μL DTT ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1.75 μL IPG 缓冲液 (pH 3 ~ 10), 组织蛋白提取物 (含 500 μg 蛋白), 最后加入重泡胀液 ($8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 4% CHAPS), 使总体积为 350 μL 。将 IPG 胶条置入持胶槽中于聚焦仪上进行等电聚焦电泳。电泳条件: 重泡胀 (不加电压) 1 h; 30 V 电压 10 h; 500 V, 2 000 V, 5 000 V 电压各 30 min; 最后稳定在 8 000 V 下进行, 总电压时

间积为 8 万 Vh。第二向 SDS-PAGE 使用自制凝胶在 Bio Rad Power Pad 1000 上进行电泳。第一向聚焦后的胶条, 分别在平衡 A 液 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris pH 8.8, $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝) 与平衡 B 液 (2.5% 碘乙酰胺, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris pH 8.8, $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝) 中各平衡 15 min。将平衡后的 IPG 胶条转移至 13% 的聚丙烯酰胺凝胶上端, 使 IPG 胶条与凝胶上端紧密贴合, 在一端加入凝胶电泳蛋白质对照品。电泳条件为: 每胶 20 mA 40 min 后再以每胶 30 mA 电泳, 直至溴酚蓝指示线到达凝胶底边处停止电泳。

2.4 考马斯亮蓝染色 电泳结束后, 取出胶版, 考马斯亮蓝染色液 (0.1%) 染色 1 h, 考马斯亮蓝脱色液 (7% 乙酸 5% 甲醇) 12 h。

2.5 凝胶图像分析 凝胶通过 UMAX Power Look 2100XL 扫描, 凝胶数据储存, 采用 Image Master 2D Platinum 6.0 软件进行凝胶的蛋白点检测、背景消减及匹配, 配合人工校正等方法, 以保证其过程的准确性。

2.6 质谱鉴定 切取目的蛋白质点送北京华大蛋白质组研发中心, 由 MALDI-TOF 质谱仪进行质谱分析, 获取蛋白样品的肽质量指纹图, 最后应用 Mascot 软件在人类蛋白质公共数据库 (NCBI) 中搜寻, 获得蛋白质的相关信息。

2.7 Western blot 验证蛋白表达 提取小鼠肾组织总蛋白, 用 Bradford 法检测蛋白含量, 使用 BIO RAD Mini-PROTEIN 凝胶电泳仪, 样品加样量为 30 μg , 电泳 1.5 h 后取胶, 用 BIO RAD 转膜仪进行湿转。转膜时滤纸、PVDF 膜、胶的位置为: 滤纸-胶-PVDF 膜-滤纸; 转膜条件: 14 V $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜过夜。转完后放入 Tris-NaCl 中清洗 10 min 转入 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 孵一抗室温 2 h, 取出后 PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 孵二抗室温 2 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。然后, 在 PVDF 膜上加入 ECL Plus 底物溶液, 用 Image Quant 400 凝胶成像仪测化学发光, 用 Image Master Total lab V2.00 软件分析, 所得像素密度数据以直方图表示。

3 结果

3.1 双向凝胶电泳与图像分析 经 Image Master 2D Platinum 6.0 软件分析, 在相同条件下识别的蛋白质点个数肝组织为 ($1\ 484 \pm 32$) 个, 肾组织为

(1 301 ± 28) 个,血清为(318 ± 34) 个,睾丸组织为(1 027 ± 21) 个。以 3 倍差异表达做为标准,共检测出右归饮将肾虚模型组非正常表达的蛋白质调节纠正为正常表达的蛋白质点为 22 个,图 1 为各组织蛋白质表达图谱,图 2 为各组肝组织中右归饮所调节纠正的蛋白质点比较。

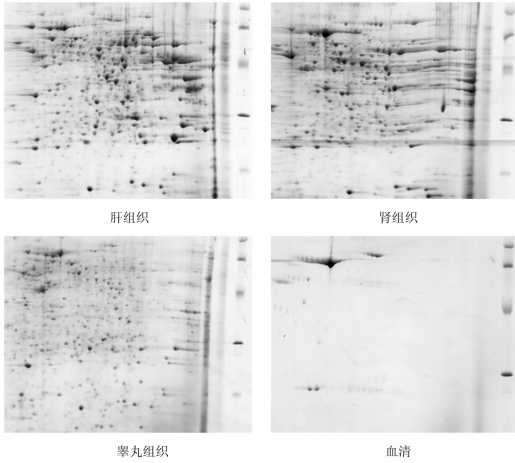
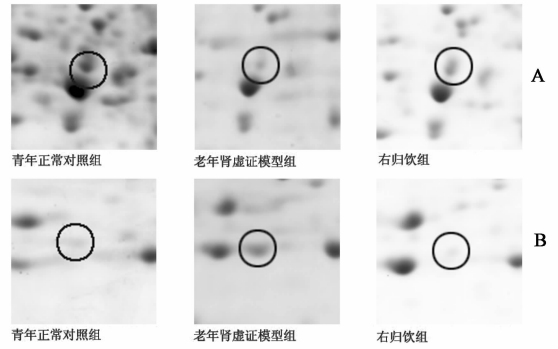


图 1 各组织蛋白质表达图谱

3.2 右归饮所调节纠正的蛋白质点质谱鉴定 对所调节纠正的 22 个蛋白质点进行酶解、质谱分析得到 PMF 图谱后,查询 NCBI nr 20100928 数据库,其中



A. 老年肾虚证模型肝组织中弱表达的蛋白质点

B. 老年肾虚证模型肝组织中强表达的蛋白质点

图 2 各组肝组织中右归饮所调节纠正的蛋白质点比较

5 个点由于数据搜索的蛋白的分数不具有统计学意义而未得到鉴定(分数 ≥ 64 分具有统计意义,覆盖率为实验所得到的氨基酸序列与蛋白数据库中的氨基酸序列匹配,匹配时所覆盖整个序列的百分比),因此,17 个蛋白质点得到鉴定(表 1)。图 3 为 7 号蛋白质点的肽质量指纹图谱,检索 NCBI nr 20100928 数据库显示为 peroxiredoxin 4,图 4 为 7 号蛋白质点的分数直方图,直方图显示 7 号蛋白质 peroxiredoxin 4 的得分为 114 分。

表 1 右归饮所调节纠正的蛋白质点质谱鉴定

序号	蛋白质名称	组织来源	分数	等电点/相对分子质量	覆盖率/%	模型组变化情况
1	2-hydroxyacyl-CoA lyase 1	肝	146	5.86/46 588	41	↓
2	fibrinogen beta chain precursor	肝	236	6.68/55 402	55	↓
3	unnamed protein product	肝	291	6.37/54 415	44	↓
4	arginase-1	肝	175	6.51/34 957	72	↓
5	fructose-1,6-bisphosphatase 1	肝	192	6.15/37 288	65	↓
6	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	肝	107	6.09/27 955	62	↓
7	peroxiredoxin 4	肝	114	5.76/23 594	36	↓
8	alcohol dehydrogenase	肾	143	6.90/36 792	57	↓
9	myosin-6	肾	73	5.57/224 225	15	↑
10	fibrinogen beta chain precursor	肾	104	6.68/55 402	34	↓
11	enol protein	肾	163	5.86/40 099	63	↓
12	isocitrate dehydrogenase 1	肾	195	5.98/42 962	70	↓
13	sorbitol dehydrogenase	肾	139	6.56/38 795	57	↓
14	heat shock protein 70-2	睾丸	156	5.51/69 966	36	↑
15	phosphoglycerate kinase 2	睾丸	140	6.36/45 223	44	↑
16	vitamin D-binding protein	血清	166	5.26/54 647	51	↑
17	unnamed protein product	血清	196	5.49/67 031	47	↑

3.3 Western blot 验证肝脏 peroxiredoxin4 蛋白和肾脏 sorbitol dehydrogenase 蛋白表达 peroxiredoxin4

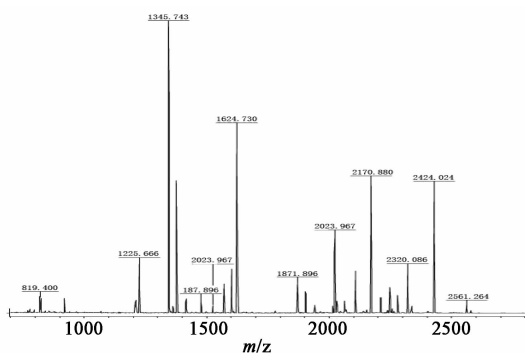


图 3 7 号蛋白质点 peroxiredoxin 4 的质量指纹图谱

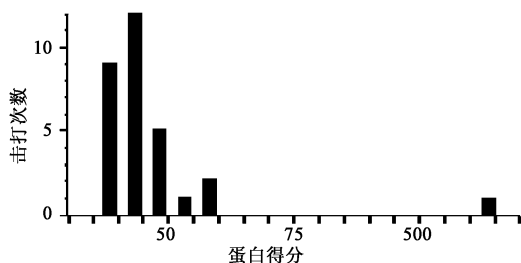
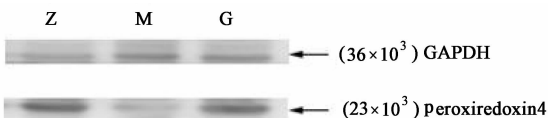


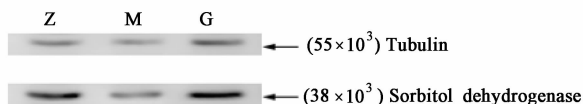
图 4 7 号蛋白质点 peroxiredoxin 4 的分数直方图

蛋白在每组小鼠肝脏中均有表达,在老年肾虚模型组表达水平较低,明显低于青年正常对照组和左归饮组,说明老年肾虚证小鼠体内 peroxiredoxin4 蛋白表达较低,经右归饮调节后其表达恢复正常,这与凝胶分析和质谱分析结果相符(图 5)。sorbitol dehydrogenase 蛋白在每组小鼠肾脏中均有表达,在老年肾虚模型组表达水平较低,明显低于青年正常对照组和右归饮组,说明老年肾虚证小鼠体内 sorbitol dehydrogenase 蛋白表达较低,经右归饮调节后其表达恢复正常,这与凝胶分析和质谱分析结果相符(图 6)。



Z. 青年正常对照组;M. 老年肾虚证模型组;G. 右归饮组

图 5 各组 peroxiredoxin4 蛋白的表达



Z. 青年正常对照组;M. 老年肾虚证模型组;G. 右归饮组

图 6 各组 sorbitol dehydrogenase 蛋白的表达

4 讨论

肾虚证是中医典型的证候,中医认为老年生理

性肾虚动物模型一般属肾阴、阳两虚型,对老年肾虚证确有疗效的经典方剂有出自《景岳全书》的右归饮,它具有“温补肾阳、填精益髓”的功效,因此右归饮与老年生理性肾虚证当属方证相应。方证相应指的就是一个方剂的功效和方剂内的药味及其配伍与其所对应的证之间存在着高度的统一性和针对性^[1]。因此,右归饮是老年生理性肾虚证的有效方,该方必定具有将肾虚证状态下的物质表达状况调节至正常状态下物质表达状况的功能。

本课题运用蛋白质组学研究技术,选用老年小鼠为肾虚证动物模型,选用温补肾阳的右归饮为相应方剂对老年小鼠肾虚证动物模型进行干预。取各组动物相关的组织脏器做蛋白质双向电泳。将青年正常组、肾虚模型组和肾虚模型给药组动物各组织脏器的电泳图谱进行分析与比较,找出右归饮将肾虚模型组与青年正常组表达差异的蛋白质调节纠正为青年正常组所表达的蛋白质,从蛋白质表达水平观察了右归饮对老年生理性肾虚证小鼠动物模型相关组织蛋白质的影响。

实验结果表明,右归饮所调节纠正的蛋白质主要有参与物质代谢的蛋白质、抗氧化蛋白、分子伴侣蛋白、结合蛋白、未知蛋白质等。

本实验说明肾阳虚动物出现糖代谢障碍,主要表现在 α -烯醇化酶、果糖 -1,6-二磷酸酯酶、异柠檬酸脱氢酶、磷酸甘油酸激酶、二氢硫辛酰胺脱氢酶表达异常。果糖 -1,6-二磷酸酯酶 (Fructose-1,6-bisphosphatase) 是糖原异生代谢途径中重要的关键酶。在二价金属离子 Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} 存在下,催化果糖-1,6-二磷酸 (Fru-1,6-P2) 水解成果糖-6-磷酸 (Fru-6-P) 和无机磷酸的反应。 α -烯醇化酶 (Enol), 能促使 2-磷酸甘油酸脱水向磷酸烯醇式丙酮酸的转化,同时也在糖异生过程中催化逆向反应^[2]。 α -烯醇化酶存在于大多数组织内,是糖酵解过程的限速酶。磷酸甘油酸激酶 (phosphoglycerate kinase PGK) 主要功能是参与糖酵解,在糖酵解第 2 个阶段的第 2 步,它催化 1,3-二磷酸甘油酸 (1,3-diphosphoglycerate) 转变成 3-磷酸甘油酸 (3-phosphoglycerate 3-PG),在这过程中消耗 1 分子的 ADP,产生 1 分子的 ATP^[3-4]。异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydmgense, IDH) 主要参与三羧酸循环,被认为是三羧酸循环的限速酶,负责催化异柠檬酸氧化脱羧成 α -酮戊二酸^[5]。这些参与酶在肾阳

虚模型动物体内的表达量异常,说明肾阳虚证动物糖代谢障碍,这可能与肾阳虚证的畏寒肢冷等虚寒之象产生有关。

Prx4 属于抗氧化蛋白超家族,广泛存在于原核生物和真核生物中。哺乳动物的 Prx 家族包括 6 个成员:Prx 1,2,3,4,5,6^[6]。6 个成员的同源性比较结果表明:Prx1-4 的同源性相对较高;Prx 5 与其他成员的同源性约为 10% 左右,没有显著的相似性;而 Prx 6 与另外 4 个成员的同源性相对较低,约为 40% 左右。Prx 4 的 N 一端含有分泌信号,该蛋白在内质网中合成后被转运至细胞外。因此,在内质网和细胞外基质可以检测到该蛋白。Prx 4 定位于细胞浆,有膜结合型和分泌型 2 种类型,分泌型 Prx 4 被认为是细胞膜相关氧化酶,膜结合型 Prx 4 被认为或许与氧化酶活性没有相关性^[7]。Prx4 具有抗氧化、刺激细胞增殖与分化、参与细胞信号转导及保护其他蛋白的氧化等功能。

HSP70 是热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)家族中的重要一员,是生物细胞中含量最高,诱导性最强热休克蛋白。HSP70 提高细胞对应激原的耐受性。HSP70 通过分子伴侣作用,可与细胞内变性蛋白质结合,促进变性蛋白质的修复、降解和清除。HSP70 可抑制热休克、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、单核细胞、氧化应激等诱导的细胞凋亡^[8]。阻断或抑制 HSP70 可诱导细胞凋亡,而 HSP70 的高表达则能抑制细胞凋亡^[9-10]。HSP70 具有抗氧化作用,被誉为“细胞内具有抗氧化能力的急性期蛋白”^[11]。HSP70 可抑制白细胞介素-1(IL-1),TNF- α 等炎症介质的表达,抑制细胞因子介导的炎症反应,起到非特异性免疫保护作用^[12-13]。此外,HSP70 在抗感染免疫、肿瘤免疫、自身免疫中也具有重要作用。本次研究结果显示,肾阳虚证小鼠组织中 HSP70 显著升高,可能是肾阳虚证状态下,各种刺激引起机体的应激反应,从而出现 HSP70 高表达,以提高机体的应激耐受能力。说明热休克蛋白与肾阳虚证的发生、发展具有密切关系。

研究结果显示,肾阳虚证的标志蛋白质还有维生素结合蛋白。维生素 D 结合蛋白(vitamin D binding protein, DBP)是一种可以增强中性粒细胞趋化活性、活化巨噬细胞的血清蛋白,并参与炎症过程^[14-15]。DBP 主要合成于肝脏,是属于白蛋白超家族中的一种结合蛋白^[16],除了作为维生素 D 在体内的蛋白结合物和载体,它还具有肌动蛋白清除功能、

参与组织感染及损伤的应答机制,加强补体 C5a 介导的趋化活性等。

综上所述,本实验应用蛋白质组学研究技术,找出了右归饮将肾虚模型组与青年正常组表达差异的蛋白质调节纠正为青年正常组所表达的蛋白质,从蛋白质表达水平观察了右归饮对老年生理性肾虚证小鼠相关组织蛋白质的影响,并根据这些蛋白质的功能初步探讨了肾阳虚证的发生机制。右归饮还可调节纠正其他组织脏器中的何种蛋白质及这些蛋白质在肾阳虚证的作用机制还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 金海浩. 中医学的方证相应论[J]. 黑龙江中医药, 2005(1):44.
- [2] Pancholi V. Multifunctional a-enolase: its role in diseases [J]. CMLS, 2001, 58(7): 902.
- [3] Watson, Walker, Shaw, et al. Sequence and structure of yeast phosphoglycerate kinase [J]. EMBO J, 1982, (1):1635.
- [4] Fujii, Krietsch, Yoshida. A single amino acid substitution (Asp leads to Ash) in a phosphoglycerate kinase variant (PGK Munchen) associated with enzyme deficiency [J]. J Biol Chem, 1980(255):6421.
- [5] Chen R D, Gddal P. Structure, function and regulation of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenases in higher plants and in other organisms [J]. Plant Physiol Biochem, 1990, 28:411.
- [6] Shen C, Nathan C. Nonredundant antioxidant defense by multiple two-cysteine peroxiredoxins in human prostate cancer cells [J]. Mol Med, 2002, 8(2):95.
- [7] Fujii J Y Ikeda. Advances in our understanding of peroxire-doxin, a muhifunctional, mammalian redox protein [J]. Redox Rep, 2002, 7(3):123.
- [8] Mosser D D, Caron A W, Bourget L, et al. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17:5317.
- [9] Caminsi A, Diez-fernandez C, Prieto P. Cell expression of heat shock proteins in dog neutrophils after oxidative stress [J]. Toxicology in Vitro, 1999, 13:437.
- [10] Oehler R, Pusch E, Zellner M, et al. Cell lype-specific variations in the induction of hsp70 in human leukocytes by fever like whole body hyperthermia [J]. Cell Strewss & Chaperones, 2001, 6:306.

罗布麻叶提取物对离体大鼠胸主动脉环的舒张作用

付剑江¹, 吕红², 杨华生¹, 尹小英¹, 郑洋滨¹, 罗永明^{1*}

(1. 江西中医学院药学院, 南昌 330004;

2. 江西中医学院现代教育技术中心, 南昌 330004)

[摘要] 目的:研究罗布麻叶提取物(extracts from leaves of *Apocynum venetum*, ELA)对离体大鼠胸主动脉环的作用及其可能的机制。方法:采用累积加药法,观察 ELA 对苯肾上腺素(PE)预收缩的主动脉环张力的影响;观察 hemoglobin, 亚甲基蓝(MB)预处理对 ELA 扩血管作用影响;观察左旋硝基精氨酸甲酯盐酸盐(L-NAME), 甲基异硫脲硫酸盐(SMT)预处理对 ELA 的扩血管作用的影响;观察四乙胺(TEA), 4-氨基吡啶(4-AP)和格列苯脲(GLB)对 ELA 的血管舒张作用的影响;采用 Ca^{2+} 剥夺和复加法,观察 ELA 对细胞内钙释放和外钙内流所引起的血管环收缩反应的作用。结果:ELA 可显著舒张 PE 预收缩的主动脉环,低浓度下($1 \times 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-4}$) $g \cdot mL^{-1}$ 为内皮依赖性作用,而高浓度下($3 \times 10^{-4}, 1 \times 10^{-3}$) $g \cdot mL^{-1}$ 则为内皮非依赖性舒张。低浓度下($1 \times 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-4}$) $g \cdot mL^{-1}$, ELA 的扩血管作用可被 Hemoglobin, MB ($P < 0.05$) 和 L-NAME, SMT ($P < 0.05$) 阻断。高浓度下($3 \times 10^{-4} \sim 3 \times 10^{-3}$) $g \cdot mL^{-1}$, ELA 可显著抑制细胞内钙释放和细胞外钙内流 ($P < 0.05$); 钾通道阻滞剂 TEA, 4-AP 和格列苯脲可不同程度地阻断 ELA 扩血管作用。结论:ELA 可剂量依赖性的舒张 PE 预收缩的胸主动脉环,呈现低浓度下内皮依赖、高浓度下内皮非依赖的特点。低浓度下 ELA 的血管舒张作用可能与 NO 释放有关,高浓度下其作用需要 Ca^{2+} , K^{+} 通道参与。

[关键词] 罗布麻叶提取物;胸主动脉环;血管舒张作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0114-06

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111017.0939.002 **[网络出版时间]** 2011-10-17 9:39

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111017.0939.002.html>

Vasodilator Responses of Extracts from Leaves of *Apocynum venetum* on Thoracic Aorta of Rats

FU Jian-jiang¹, LV Hong², YANG Hua-sheng¹, YING Xiao-ying¹, ZHENG Yang-bin¹, LUO Yong-ming^{1*}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

[收稿日期] 20110514(010)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2010CB530603);国家科技重大专项(重大新药创制,2009ZX09310-005)

[第一作者] 付剑江,博士,副教授,从事分子药理学研究, Tel: 791-7118919, E-mail: jianjiang_fu@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 罗永明,博士,教授,从事天然产物活性成分研究, Tel: 791-7118919, E-mail: loym@163.com

- [11] Polla B S. A role for heat shock protein in inflammation? [J]. Immunol Today, 1988, 9 (5):134.
- [12] Multhoff G. Heat shock proteins in immunity [J]. Handb Exp Pharmacol, 2006, 172, 279.
- [13] Wang H R, Ryan M, Mestri R. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I- κ B degradation and NF- κ B nuclear translocation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 231 (2):257.
- [14] Trujillo G, Kew R R. Platelet-derived thrombospondin-1 is necessary for the vitamin D-binding protein (Gc-globulin) to function as a chemotactic cofactor for C5a [J]. Immuno, 2004, 173:4130.
- [15] Gumireddy K, Damodar C, Swamy N, et al. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates DBP-maf-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages [J]. Cell Biochem, 2003, 90(1):87.
- [16] While P, Cooke N. The mull functional properfies and characteristics of Vitamin D-binding protein [J]. Trends Endocrinol Metab, 2000, 11:320.

[责任编辑 何伟]