

阿福豆苷对家兔离体主动脉环的作用及其机制研究

杨竹雅^{1,2}, 卫莹芳², 马晓霞¹, 海青山¹ (1. 云南中医学院, 云南 昆明 650500; 2. 成都中医药大学药学院中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137)

摘要: **目的** 研究阿福豆苷(Afzelin)对家兔离体主动脉环的作用, 并探讨其可能的作用机制。**方法** 采用家兔离体主动脉环灌流模型, 观察阿福豆苷对基础状态和去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)预收缩主动脉环的作用, 并观察不同抑制剂对阿福豆苷舒张血管作用的影响。**结果** 阿福豆苷 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对基础状态下内皮完整的主动脉环的张力无影响; 对 NE 预收缩的主动脉环, 阿福豆苷在累积浓度 $3 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能剂量依赖性和内皮依赖性地舒张主动脉环, 并且该作用能分别被硝基-L-精氨酸甲酯(N-(omega)-nitro-L-arginine-methyl-ester, L-NAME)、亚甲蓝(methylene blue, MB)和吲哚美辛(indomethacine, Indo)预处理所抑制。**结论** 阿福豆苷 $3 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对主动脉具有内皮依赖性的舒张作用, 其舒张机制可能与一氧化氮-鸟苷酸环化酶-环磷酸鸟苷(NO-GC-cGMP)途径以及环氧合酶(COX)途径有关。

关键词: 阿福豆苷; 主动脉环; 血管舒张

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)04-0341-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.004

Effects and Mechanisms of Afzelin on Isolated Rabbit Aortic Rings

YANG Zhuya^{1,2}, WEI Yingfang², MA Xiaoxia¹, HAI Qingshan¹ (1. Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500 Yunnan, China; 2. The Administration of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicine, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137 Sichuan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Afzelin on isolated rabbit aortic rings and to explore the underlying mechanisms. **Methods** Isolated rabbit aortic rings perfusion model was established. The effect of Afzelin on the aortic rings in basal tension or in norepinephrine(NE)-induced contraction was observed. Three inhibitors were used to explore the mechanism. **Results** Cumulative administration of Afzelin ($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) had no effect on the vasomotion of aortic rings with endothelium in basal tension. The contracted arteries induced by NE could be dose-dependently and endothelium-dependently relaxed by Afzelin ($3 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), while the effect was inhibited after preincubation with N-(omega)-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME), methylene blue (MB) and indomethacin(Indo), respectively. **Conclusion** The results indicated that the endothelium-dependent relaxation effect of Afzelin ($3 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) might be associated with nitric oxide-guanylate cyclase-cyclic guanosine monophosphate(NO-GC-cGMP) pathway and cyclooxygenase(COX) pathway.

Keywords: Afzelin; Aortic rings; Vasodilation

厚朴叶为厚朴(*Magnolia officinalis* Rehd et Wils)的干燥叶。前期研究^[1]发现, 厚朴叶乙醇提取物的正丁醇萃取部位能舒张去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)预收缩离体家兔主动脉环, 但其作用物质基础和

作用机制尚不明确。阿福豆苷(Afzelin)为厚朴叶中黄酮类化合物的主要单体之一, 有较强的抗 1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)活性^[2]、抗恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)活性^[3]、体外抗血管紧张素活性^[4]和一定的

收稿日期: 2013-01-06

作者简介: 杨竹雅, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药品种、质量及生药学研究。Email: yangzy@yahoo.cn。通讯作者: 卫莹芳, 教授, 研究方向: 中药资源品质和开发利用研究。Email: wyfang6@163.com。

基金项目: 科技部“十一五”国家科技支撑计划项目(2009BA184B03)。

抗炎活性^[5]。但阿福豆苷对血管作用的研究尚属空白。本研究首次观察阿福豆苷对离体家兔主动脉环的作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 阿福豆苷(本实验室自制,纯度 $\geq 95\%$);硝基-L-精氨酸甲酯盐酸盐(N-(omega)-nitro-L-arginine-methyl-ester, L-NAME, 瑞士 adamas-beta 公司,批号: P05210);亚甲蓝(methylene blue, MB, 瑞士 adamas-beta 公司,批号: P10571);吲哚美辛肠溶片(indomethacine, Indo, 昆明振华制药厂,批号: 20110101);重酒石酸去甲肾上腺素注射液(norepinephrine, NE, 上海禾丰制药有限公司,批号: 091201);溴化乙酰胆碱(acetylcholine, ACh, 国药集团化药试剂有限公司,批号: WF20050225);K-H 生理液(NaCl 6.92 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.28 g, KH₂PO₄ 0.16 g, MgSO₄ 0.29 g, NaHCO₃ 2.1 g, 葡萄糖 2.0 g, 溶于 1 L 双蒸水中);二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO, 天津市博迪化工有限公司,分析纯)。

1.2 动物 家兔,昆明医学院实验动物中心,动物合格证号: SCXK (滇)2011-0004,体质量 1.8~2.5 kg,雌雄不拘。

1.3 仪器 Powerlab 生物机能信号系统(Powerlab-8sp AD Instruments),澳大利亚埃德公司;混合气体(95 %O₂+5 %CO₂),昆明氧气有限公司。

1.4 家兔离体主动脉环的制备 家兔猛击头部致昏迷后,迅速取出胸主动脉,放置于盛有 K-H 液的培养皿中,并持续通入 95 %O₂+5 %CO₂ 混合气体,除去血管周围的脂肪和结缔组织后制成长约 0.4 cm 的动脉环,用棉签插入血管腔轻轻旋转和前后移动,以除去内皮;将血管环套在两个 L 型的金属针上,一端固定于浴槽底部,另一端连接张力换能器,通过张力换能器与 Powerlab 系统相连,记录血管收缩与舒张。将安装好的动脉环置于盛有 20 mL K-H 液的恒温浴槽中,恒温 37 ℃,持续通入 95 %O₂+5 %CO₂ 混合气体。调整静息张力(5.0±1.0) g,稳定 2 h,期间每 20 min 换液 1 次,使血管恢复活性并适应离体环境。

检验主动脉环内皮活性:待动脉环稳定后,浴槽中加入 10 μmol·L⁻¹ 的 NE,收缩达峰值 15 min 后,加入 10 μmol·L⁻¹ 的 ACh,若加入 ACh 后使 NE 预收缩的主动脉环舒张 60 %~90 %,可认为内皮完整,反之,则认为内皮被去除^[6]。

1.5 阿福豆苷对离体主动脉环基础张力的影响 主动脉环稳定后,按浓度梯度依次累积加入阿福豆苷试液,使灌流液中终浓度为 1×10⁻⁶, 3×10⁻⁶, 1×10⁻⁵, 3×10⁻⁵, 1×10⁻⁴, 3×10⁻⁴, 1×10⁻³ mol·L⁻¹,空白对照组给予等加液量的 DMSO,记录其张力变化。

$$\text{舒张率}(\%) = \frac{\text{加受试药前张力} - \text{加受试药后张力}}{\text{加受试药前张力}} \times 100\%$$

1.6 阿福豆苷对 NE 预收缩的内皮完整和去除内皮的主动脉环张力的影响 主动脉环稳定后,以 NE(10 μmol·L⁻¹) 诱发最大收缩幅度为 100 %,按浓度梯度依次累积加入阿福豆苷试液,使灌流液中终浓度为 1×10⁻⁶, 3×10⁻⁶, 1×10⁻⁵, 3×10⁻⁵, 1×10⁻⁴, 3×10⁻⁴, 1×10⁻³ mol·L⁻¹,空白对照组给予等加液量的 DMSO,记录其张力变化。

$$\text{舒张率}(\%) = \frac{\text{收缩剂诱导后张力} - \text{加受试药后张力}}{\text{收缩剂诱导后张力}} \times 100\%$$

1.7 L-NAME 对阿福豆苷作用的影响 内皮完整的主动脉环用 L-NAME(10 μmol·L⁻¹) 预处理 30 min 后,再用 NE(10 μmol·L⁻¹) 预收缩血管达稳定后,加入阿福豆苷(1×10⁻⁴ mol·L⁻¹),观察主动脉环张力。

1.8 MB 对阿福豆苷作用的影响 内皮完整的主动脉环用 MB(10 μmol·L⁻¹) 预处理 30 min 后,再用 NE(10 μmol·L⁻¹) 预收缩血管达稳定后,加入阿福豆苷(1×10⁻⁴ mol·L⁻¹),观察主动脉环张力。

1.9 Indo 对阿福豆苷作用的影响 内皮完整的主动脉环用 Indo(10 μmol·L⁻¹) 预处理 30min 后,再用 NE(10 μmol·L⁻¹) 预收缩血管达稳定后,加入阿福豆苷(1×10⁻⁴ mol·L⁻¹),观察主动脉环张力。

1.10 统计学处理方法 所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性,组间比较采用 *t* 检验,方差不齐,组间比较采用 *t'* 检验,检验结果以 *P* < 0.05 视为差异有显著性意义,*P* < 0.01 视为差异有极显著性意义。

2 结果

2.1 阿福豆苷对主动脉环基础张力的影响 累积给予阿福豆苷 1×10⁻⁶~1×10⁻³ mol·L⁻¹ 对基础状态的内皮完整血管环张力无明显影响,与空白对照组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1。

2.2 阿福豆苷对 NE 预收缩的主动脉环张力的影响 阿福豆苷在 3×10⁻⁶~1×10⁻³ mol·L⁻¹ 终浓度范围内对 NE 预收缩的内皮完整的主动脉环有明显的剂量依赖性舒张作用(*P* < 0.01);但在该剂量范围内,对去除内皮的 NE 预收缩的主动脉环无舒张作用(*P* > 0.05),并且去除内皮组与内皮完整组之间主动脉环舒张作

表 1 阿福豆苷对内皮完整的主动脉环基础张力的影响($n=8$)
Table 1 Effects of the Afzelin on vasomotion of rabbit aortic rings with endothelium(+E) in basal tension

空白对照组(DMSO)		阿福豆苷组	
终浓度 / $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$	舒张率 / %	终浓度 / $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	舒张率 / %
1.0	-0.25 ± 0.02	1×10^{-6}	0.62 ± 0.02
1.7	-0.35 ± 0.01	3×10^{-6}	1.88 ± 0.02
2.4	-0.17 ± 0.02	1×10^{-5}	2.02 ± 0.03
3.0	-0.90 ± 0.02	3×10^{-5}	1.76 ± 0.02
3.7	-0.51 ± 0.02	1×10^{-4}	2.09 ± 0.02
4.4	-1.14 ± 0.03	3×10^{-4}	1.81 ± 0.03
5.1	0.21 ± 0.04	1×10^{-3}	1.52 ± 0.03

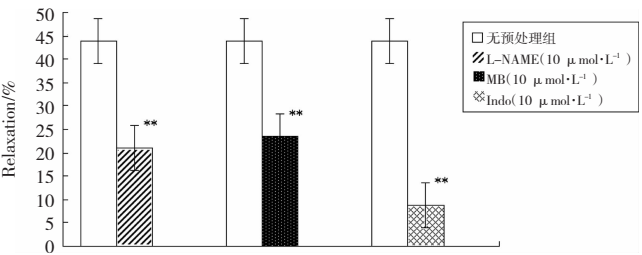
用比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。因此推测阿福豆苷舒张血管作用与内皮有关, 见表 2。

表 2 阿福豆苷对 NE 预收缩主动脉环张力的影响($n=8$)
Table 2 Relaxation effects of Afzelin on isolated rabbit aortic rings with endothelium(+E) or without endothelium(-E) induced by NE

空白对照组(DMSO)		内皮完整组		去除内皮组	
终浓度 / $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$	舒张率 / %	终浓度 / $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	舒张率 / %	终浓度 / $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	舒张率 / %
1.0	1.08 ± 0.03	1×10^{-6}	4.64 ± 0.03	1×10^{-6}	1.91 ± 0.03
3.0	3.25 ± 0.03	3×10^{-6}	$12.11 \pm 0.55^{**}$	3×10^{-6}	$5.53 \pm 0.05^{\#}$
10.0	6.49 ± 0.03	1×10^{-5}	$24.40 \pm 0.11^{**}$	1×10^{-5}	$9.86 \pm 0.06^{\#}$
13.0	12.63 ± 0.04	3×10^{-5}	$35.96 \pm 0.12^{**}$	3×10^{-5}	$15.25 \pm 0.06^{\#}$
19.0	17.48 ± 0.05	1×10^{-4}	$43.80 \pm 0.11^{**}$	1×10^{-4}	$20.78 \pm 0.06^{\#}$
39.0	22.18 ± 0.11	3×10^{-4}	$48.38 \pm 0.11^{**}$	3×10^{-4}	$25.12 \pm 0.07^{\#}$
114.0	28.88 ± 0.15	1×10^{-3}	$50.31 \pm 0.09^{**}$	1×10^{-3}	$32.52 \pm 0.07^{\#}$

注: 与空白对照组比较, $^{**}P < 0.01$; 与内皮完整组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

2.3 L-NAME、MB 和 Indo 对阿福豆苷作用的影响
用 L-NAME($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、MB($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 Indo($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 分别预处理主动脉环后, 均能抑制阿福豆苷($1 \times 10^{-4} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的血管舒张作用($P < 0.01$), 见图 1。



注: 与无预处理组比较: $^{**}P < 0.01$ 。

图 1 不同抑制剂对阿福豆苷($1 \times 10^{-4} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)血管舒张作用的影响($n=8$)

Figure 1 Effects of blockers on ressel relaxation of Afzelin ($1 \times 10^{-4} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

3 讨论

本研究首次报道阿福豆苷对 NE 预收缩的家兔离体主动脉环的活性作用。阿福豆苷(终浓度 $\geq 3 \times 10^{-6} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能剂量依赖性地使 NE 预收缩的主动脉环张力下降, 通过对其舒张作用机制的初步研究发现, 阿福豆苷舒张血管的作用为内皮依赖性, 一氧化氮合成酶(NOS)抑制剂 L-NAME($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、鸟苷酸环化酶(GC)抑制剂 MB($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和环氧合酶(COX)抑制剂 Indo($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)均能抑制该作用。

血管内皮细胞是一个十分活跃的代谢及内分泌器官, 能合成、释放舒张和收缩因子, 调控血管平滑肌细胞的舒张和收缩, 以维持血管壁一定的紧张度或改变血管口径, 调节血流量。1980 年 Furchgott 和 Zawadzki 发现 ACh 引起的血管平滑肌舒张与血管内皮释放的因子有关^[7], 后证明为血管内皮舒张因子(EDRF)^[8]。EDRF 是一种能强烈扩张血管的物质, 其以 L-精氨酸(L-Arg)为底物, 通过内皮细胞激活 NOS, 生成和释放 NO, 从而舒张血管平滑肌^[9-10]。阿福豆苷舒张血管的作用与内皮有关, 可能是通过刺激内皮源性 NO 增加而舒张血管。为了进一步证明此机制, 本研究用 L-NAME 预处理后再观察其舒张血管作用, 发现阿福豆苷的舒张血管作用明显降低, 接近于对去除内皮离体主动脉环的舒张强度, 提示阿福豆苷确实是作用于血管内皮细胞, 诱导内皮细胞释放 NO; 同时, 阿福豆苷的舒张血管作用也能被 MB 抑制, MB 为 GC 抑制剂, 同时也能使 NO 失活^[11], 表明阿福豆苷可能是通过 NO-GC-cGMP 途径来舒张血管^[12]。

内皮依赖的另一个舒血管物质是前列环素(PGI_2), 血管内皮细胞摄取花生四烯酸(AA), 或由磷脂酶 A 催化生成 AA, 先经环氧合酶代谢途径生成内过氧化物(PGH_2)^[13], 再经前列环素合成酶作用生成 PGI_2 ^[14]。 PGI_2 通过与细胞膜上的前列环素受体(IP)结合, 激活 GC, 使细胞内 cAMP 含量升高, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 下降, 血管平滑肌松弛, 血管舒张^[15]。本研究发现, 用 Indo 抑制 COX 后可显著抑制阿福豆苷的血管舒张作用, 提示阿福豆苷可能激活环氧合酶途径引发血管舒张效应。

参考文献:

[1] 杨竹雅, 卫莹芳, 周志宏, 等. 厚朴叶中具血管舒张作用的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(3): 298-302.
[2] Almeida AP, Miranda MMFS, Simoni IC, et al. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of persea americana (Lau-

- raceae) leaf infusion[J]. Phytotherapy Research, 1998, 12: 562-567.
- [3] Liu Y, Murakami N, Ji H, et al. Antimalarial flavonol glycosides from euphorbia hirta[J]. Pharmaceutical Biology, 2007, 45(4): 278-281.
- [4] Hansen K, Adersen A, Smitt UW, et al. Angiotensin converting enzyme(ace) inhibitory flavonoids from erythroxylum laurifolium[J]. Phytomedicine, 1996, 2(4): 313-317.
- [5] Yen CT, Hsieh PW, Hwang TL, et al. Flavonol glycosides from muehlenbeckia platyclada and their anti-inflammatory activity[J]. Chem. Pharm Bull, 2009, 57 (3): 280-282.
- [6] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1100.
- [7] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine[J]. Nature, 1980, 288: 373-376.
- [8] Furchgott RF. The Role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs[J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1984, 24: 175-197.
- [9] Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor[J]. Nature, 1987, 327: 524-526.
- [10] Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action [J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1178: 153-175.
- [11] Martin W, Villani GM, Jothianandan D, et al. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1985, 232: 708-716.
- [12] Masaki E, Kondo I. Methylene blue, a soluble guanylyl cyclase inhibitor, reduces the sevoflurane minimum alveolar anesthetic concentration and decreases the brain cyclic guanosine monophosphate content in rats[J]. Anesth Analg, 1999, 89: 484-489.
- [13] Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, et al. A enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation [J]. Nature, 1976, 263: 663-665.
- [14] Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions[J]. Physiological Reviews, 1999, 79 (4): 1193-1226.
- [15] Wise H, Jones RL. Focus on prostacyclin and its novel mimetics[J]. Trends Pharmacol Sci, 1996, 17: 17-21.

(编辑: 梁进权)

罗氏内异方含药血清对子宫内膜异位症合并不孕患者腹腔液细胞的影响

史云¹, 伍海鹰², 何金洋³, 陶莉莉¹ (1. 广州中医药大学第一附属医院妇科, 广东 广州 510405; 2. 广州市妇女儿童医疗中心妇科, 广东 广州 510400; 3. 广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 探讨罗氏内异方对子宫内膜异位症合并不孕患者腹腔液细胞的影响。**方法** 分离、培养子宫内膜异位症不孕患者腹腔液细胞, 采用罗氏内异方与内美通含药血清刺激 6 h, 荧光定量聚合酶链反应测定血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血管内皮生长因子受体 1(FLT-1)与血管内皮生长因子受体 4(FLT-4) mRNA 表达水平的变化。**结果** 与生理盐水组比较, 罗氏内异方高剂量组 TNF- α mRNA 显著降低($P < 0.01$), 高、中剂量组 VEGF mRNA 均显著降低($P < 0.01$), 高、中、低剂量组 FLT-1 mRNA 均显著降低($P < 0.05$); 高、中剂量组 FLT-4 mRNA 均显著降低($P < 0.01$)。**结论** 罗氏内异方治疗轻型子宫内膜异位症不孕症的机制可能是通过降低患者腹腔液细胞 VEGF、TNF- α 、FLT-1、FLT-4 mRNA 的表达, 改善腹腔内环境而实现的。

关键词: 罗氏内异方; 子宫内膜异位症; 不孕症; 腹腔液细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)04-0344-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.005

Influence of Serum Containing *Luoshi Neiyi* Recipe on Peritoneal Fluid Cells in Endometriosis Complicated with Infertility Patients

SHI Yun¹, WU Haiying², HE Jinyang³, TAO Lili¹ (1. Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of

收稿日期: 2013-02-25

作者简介: 史云, 女, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 中医药调节女性生殖障碍的临床与实验研究。Email: zysyun@163.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(83018)。