

物的 Black 法和重氮化比色法相比, 测试条件稳定可控, 线性范围宽, 灵敏度高, 结果准确可靠, 适用于肝微粒体等亚细胞组分中 UGTs 酶活性的定量测定。

联合用药在多种疾病的临床药物治疗中普遍存在, 药物相互作用对临床疗效和安全性的影响因此受到广泛关注。其中, 药物对代谢酶的诱导或抑制作用是导致药物相互作用问题重要因素之一。丹酚酸 A 是一种天然抗氧化剂候选药物, 本课题组在前期研究了该化合物的药理活性和作用机制, 并发现其不影响 CYP450 酶活性<sup>[10]</sup>。在此基础上, 本文进一步通过体内动物实验考察其对主要的 II 相结合代谢酶 UGTs 活性的影响。结果表明, SAA 对不同性别大鼠肝指数、肝微粒体蛋白浓度及肝微粒体 UGTs 酶活性均无显著影响, 提示 SAA 在联合用药的情况下因对 UGTs 诱导或抑制而出现药物-药物相互作用的潜在风险较小, 具有良好的安全性。

#### 参考文献:

- [1] Wallig MA. Toxicological highlight: glucuronidation and susceptibility to chemical carcinogenesis[J]. *Toxicological Sciences*, 2004, 78: 1-2.
- [2] Liu GT, Zhang TM, Wang BE, et al. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43: 147-152.
- [3] Fan HY, Fu FH, Yang MY, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A[J]. *Thromb Res*, 2010, 126: 17-22.
- [4] Fan HY, Yang L, Fu FH, et al. Cardioprotective effects of salvianolic acid A on myocardial ischemia reperfusion injury in vivo and in vitro [J/OL]. *eCAM*, 2012, doi: 10.1155/2012/508938.
- [5] Hou YY, Peng JM, Chao RB. Pharmacokinetic study of salvianolic acid A in rat after intravenous administration of Danshen injection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21: 598-601.
- [6] Shen Y, Wang XY, Xu LH, et al. Characterization of metabolites in rat plasma after intravenous administration of salvianolic acid A by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography ion trap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23: 1810-1816.
- [7] De EH, Yi Z, Xi JC, et al. Identification and characterization of human UDP-glucuronosyl transferases responsible for the in vitro glucuronidation of salvianolic acid A [J/OL]. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2012, doi: 10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-023.
- [8] Nobumitsu H, Hideto J, Toshiko TK. Determination of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 activity in human and rat liver microsomes by HPLC with UV detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 25: 65-75.
- [9] 傅柳松, 彭仁绣. 苯巴比妥诱导下大鼠肝微粒体药酶活性与膜流动性变化的相关性[J]. *药学报*, 1991, 26(8): 567-571.
- [10] Xu H, Guo HF, Zou XL, et al. Effects of Salvianolic acid A on liver cytochrome P450 in rats [C]. In: *Proceedings of 2009 International Conference of Natural Product and Traditional Medicine*. Xi'an, China. 2009, 422-425.

(编辑: 邓响潮)

## 茶色素在低钙及高钙浓度下对离体蟾蜍心肌收缩力的影响

董 帅<sup>1</sup>, 唐泽耀<sup>2</sup>, 张冬梅<sup>3</sup>, 宫德正<sup>3</sup>, 孙艺平<sup>3</sup>, 傅 雷<sup>3</sup> (1. 大连医科大学基础实验中心大学生创新实践基地, 辽宁 大连 116044; 2. 大连医科大学药学院, 辽宁 大连 116044; 3. 大连医科大学基础学院, 辽宁 大连 116044)

**摘要:** **目的** 观察不同浓度茶色素(Tea pigment, TP)溶液在低钙和高钙条件下对离体蟾蜍心肌收缩力和心率的影响。**方法** 50 只蟾蜍随机分为正常任氏液组, 任氏液+茶色素组, 低钙任氏液+茶色素组, 高钙任氏液+茶色素组。采用斯氏法制备离体蛙心灌流标本。正常任氏液组离体蟾蜍心脏只灌流任氏液, 任氏液+茶色素组在离体蟾蜍心脏灌流任氏液中加入茶色素溶液, 低钙任氏液+茶色素组在离体蟾蜍心脏灌流低钙任氏液中加入茶色素溶液, 高钙任氏液+茶色素组在离体蟾蜍心脏灌流高钙任氏液中加入茶色素溶液。通过蟾蜍心室外加药, 利用心室收缩波动, 心室吸收药物的方法给药, 心室外容积固定为 1.0 mL, 分别以不同浓度的茶色素进行灌流, 每次加入茶色素后记录 40 min。应用 BL-420F 生物机能实验系统记录离体蟾蜍心肌收缩曲线, 并进行心肌收

收稿日期: 2013-03-07

作者简介: 董帅, 女, 五年制临床医学学生。通讯作者: 傅雷, 高级实验师, 研究方向: 循环和肾脏生理。Email: leifu382@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81200155); 2011 年辽宁省大学生科技创新项目。

缩力和心率的统计学分析。**结果** 在低钙条件下, 灌流茶色素溶液浓度为  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 心肌收缩力开始增强, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 在高钙条件下, 灌流  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  茶色素时, 心肌收缩力受到抑制, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 在低钙任氏液条件下, 一定浓度的茶色素对离体蟾蜍心脏活动有明显的兴奋作用, 而在高钙任氏液条件下则茶色素对心肌收缩力有明显的抑制作用。

**关键词:** 茶色素; 离体蟾蜍心脏; 低钙; 高钙; 心肌收缩力

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)06-0561-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.009

### Influence of Tea Pigments on Isolated Toad Myocardial Contraction Under Conditions of Lower Calcium and Higher Calcium

DONG Shuai<sup>1</sup>, TANG Zeyao<sup>2</sup>, ZHANG Dongmei<sup>3</sup>, GONG Dezheng<sup>3</sup>, SUN Yiping<sup>3</sup>, FU Lei<sup>3</sup> (1. Creative and Practical Base for Undergraduates, Fundamental Experimental Center, Dalian Medical University, Dalian 116044 Liaoning, China; 2. Pharmacy College, Dalian Medical University, Dalian 116044 Liaoning, China; 3. Preclinical Medicine College, Dalian Medical University, Dalian 116044 Liaoning, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of different concentrations of tea pigments on isolated toad myocardial contraction under lower calcium condition and under higher calcium condition. **Methods** Fifty toads were randomly divided into Ringer solution control group, normal Ringer solution+ tea pigments group, lower calcium Ringer solution +tea pigments group, and higher calcium Ringer solution +tea pigments group. The perfusion specimens of isolated frog heart were prepared by Si's method. The isolated frog hearts in the four groups were given reperfusion with the corresponding solution according to the grouping method. The toad ventricle muscle contraction wave was recorded for 40 min after tea pigments administration outside the ventricle with the fixed volume of 1.0 mL. The myocardial contractility and heart rate were analyzed statistically by application of BL-420F biological and functional experimental system. **Results** Under lower calcium condition, myocardial contractility started to increase significantly after reperfusion with tea pigments at  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ). Under higher calcium condition, myocardial contractility was inhibited significantly after reperfusion with tea pigments at  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Isolated toad cardiac activity is increased obviously by certain concentration of tea pigments under lower calcium condition, and then is inhibited by certain concentration of tea pigments under higher calcium condition.

**Keywords:** Tea pigments; Isolated toad heart; Lower calcium; Higher calcium; Myocardial contractility

茶色素(Tea pigment)是英国人 Roberts 在 1959 年首先从绿茶中提取的一类水溶性酚性色素。国内临床资料报道证实, 茶色素有防癌抗癌、防紫外线照射、抗动脉粥样硬化、防治高血脂症、增强免疫、抗血栓、抗氧化等多种药理功能<sup>[1]</sup>, 但茶色素对离体蟾蜍心肌收缩力的作用目前尚无报道。因此, 本研究观察不同浓度茶色素(Tea pigment, TP)溶液在低钙和高钙条件下对离体蟾蜍心肌收缩力和心率的影响, 以期阐明其部分作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 中华蟾蜍 50 只, 雌雄兼有, 体质量 80 ~

100 g, 由大连医科大学实验动物中心提供, 选择北方 7 ~ 10 月开展本实验。动物随机分为正常任氏液组, 任氏液 + 茶色素组, 低钙任氏液 + 茶色素组和高钙任氏液 + 茶色素组。其中低钙任氏液 + 茶色素组又分为低钙任氏液 + 茶色素( $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )组、低钙任氏液 + 茶色素( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )组和低钙任氏液 + 茶色素( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )组, 每组 10 只。

**1.2 试剂及仪器** 茶色素, 大连理工大学化工学院李楠教授馈赠, 江西绿色制药有限公司生产并鉴定, 鉴定 TP 纯度以游离儿茶素计 36.27 %, 批号: 20100920<sup>[2]</sup>。将 10 mg 茶色素粉末用 1 mL 的蒸馏水溶解, 配制成  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的茶色素溶液, 分瓶冷藏

储存;任氏液,1000 mL 蒸馏水中含 NaCl 6.50 g, KCl 0.14 g, CaCl<sub>2</sub> 0.12 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.20 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01 g;低钙任氏液,1000 mL 蒸馏水中含 CaCl<sub>2</sub> 0.06 g,其余成分同任氏液;高钙任氏液,1000 mL 蒸馏水中含 CaCl<sub>2</sub> 0.24 g,其余成分同任氏液。BL-420F 生物机能实验系统和张力换能器,成都泰盟科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 模型复制<sup>[3]</sup> 取 1 只蟾蜍破坏其脑和脊髓后,仰卧位固定于蛙板上,剪开胸壁,暴露心脏,在两个主动脉球上端向心脏方向剪一斜向的切口,将盛有少量任氏液的玻璃蛙心插管先插向动脉球,随后在心收缩期插向心室,将其中一根线结扎并固定;另一根线远离静脉窦结扎其余的动静脉。若插管的管尖游离在蟾蜍的心室内,则见管中液面随着心搏而升降。将心脏和静脉窦一起剪下,吸去管内的血液,并用任氏液反复冲洗心室内的血液,然后在蛙心套管内加入 1.0 mL 任氏液。

1.3.2 检测指标 将玻璃蛙心插管的上端用试管夹固定于铁支架台上,将蛙心夹上的丝线连接与张力换能器的弹簧片上,换能器的输出线与计算机的输入接口相连。待蟾蜍心脏插管稳定 1 h 左右,采用计算机描记心肌收缩曲线,应用 BL-420F 生物机能实验系统记录蟾蜍的心肌收缩曲线,心室外容积固定为 1.0 mL,调整张力换能器与蟾蜍心脏之间连线的张力至 2 g 左右,固定放大器灵敏度,时间常数和滤波等参数<sup>[3]</sup>。

1.3.3 给药方法 正常任氏液组离体蟾蜍心脏只灌流任氏液,其余各组在任氏液或高钙任氏液或低钙任氏液基础上加入茶色素溶液。通过蟾蜍心室外加药,并利用心室收缩波动,心室内吸收药物的方法给药。心室外容积固定为 1.0 mL,每次加入 20 μL 茶色素溶液前需先取出 20 μL 灌流液,加入茶色素后记录 40 min 内心搏曲线。

1.4 统计学处理方法 所有数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,应用 SPSS19.0 统计软件,组间进行 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 茶色素对正常任氏液和高钙任氏液离体蟾蜍心肌收缩力和心率的影响 见表 1。正常对照组蟾蜍离体蛙心灌流标本在适宜条件下且在 2 h 内心肌收缩力和

心率基本上无显著性变化(*P* > 0.05)。在任氏液中加入 20 μL 浓度为 10 mg·mL<sup>-1</sup> 的茶色素时,心室外浓度为 200 μg·mL<sup>-1</sup> 后,心肌收缩力在加药前后分别是 (2.58 ± 0.04)g 和 (2.53 ± 0.03)g (*P* > 0.05)。当蟾蜍离体蛙心灌流标本任氏液更换为高钙任氏液稳定后,在高钙任氏液中加入 20 μL 浓度为 10 mg·mL<sup>-1</sup> 的茶色素,即心室外浓度为 200 μg·mL<sup>-1</sup> 后,心肌收缩力在加药后心肌收缩力开始抑制,平均降至波谷的时间为 10 min。心肌收缩力给药前后比较,差异有统计学意义 (*P* < 0.01);蟾蜍离体蛙心灌流标本的心率在任氏液或高钙任氏液加药前后均无显著变化,差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。

表 1 茶色素在正常任氏液和高钙任氏液条件下对离体蟾蜍心肌收缩力和心率的影响( $\bar{x} \pm s$ , *n*=10)

Table 1 Influence of tea pigments on myocardial contraction and heart beats under normal condition and higher calcium condition

| 组别     | 茶色素浓度<br>/μg·mL <sup>-1</sup> | 给药前         |                        | 给药后           |                        |
|--------|-------------------------------|-------------|------------------------|---------------|------------------------|
|        |                               | 心肌收缩力/g     | 心率/次·min <sup>-1</sup> | 心肌收缩力/g       | 心率/次·min <sup>-1</sup> |
| 正常任氏液组 | 200                           | 2.58 ± 0.04 | 36.2 ± 0.2             | 2.53 ± 0.03   | 36.3 ± 0.4             |
| 高钙任氏液组 | 200                           | 6.30 ± 0.41 | 36.1 ± 0.24            | 3.22 ± 0.07** | 36.2 ± 0.22            |

注:与正常任氏液组比较, \*\**P* < 0.01。

2.2 茶色素对低钙任氏液灌流离体蟾蜍心肌收缩力和心率的影响 见表 2。正常蟾蜍离体蛙心灌流标本在灌流任氏液 1 h 后,换等量的低钙任氏液灌流,在低钙任氏液灌流稳定的情况下加各种浓度的茶色素,观察和记录心肌收缩力的变化。在低钙任氏液中加入茶色素心肌收缩力开始兴奋,心肌收缩力平均升至波峰的时间为 30 min。在低钙任氏液中加入茶色素使心室外浓度为 50 μg·mL<sup>-1</sup> 后心肌收缩力在加药前后比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05);在心室外茶色素

表 2 茶色素对低钙任氏液条件下离体蟾蜍的心肌收缩力和心率的影响( $\bar{x} \pm s$ , *n*=10)

Table 2 Influence of tea pigments on myocardial contraction and heart beats under normal condition and lower calcium condition

| 组别     | 茶色素浓度<br>/μg·mL <sup>-1</sup> | 给药前         |                        | 给药后           |                        |
|--------|-------------------------------|-------------|------------------------|---------------|------------------------|
|        |                               | 心肌收缩力/g     | 心率/次·min <sup>-1</sup> | 心肌收缩力/g       | 心率/次·min <sup>-1</sup> |
| 正常任氏液组 | 50                            | 2.56 ± 0.04 | 35.9 ± 0.04            | 2.59 ± 0.06   | 36.2 ± 0.36            |
|        | 100                           | 2.6 ± 0.03  | 35.8 ± 0.07            | 2.58 ± 0.05   | 36.7 ± 0.43            |
|        | 200                           | 2.58 ± 0.04 | 36.2 ± 0.2             | 2.53 ± 0.03   | 36.3 ± 0.4             |
| 低钙任氏液组 | 50                            | 0.87 ± 0.04 | 35.9 ± 0.33            | 1.72 ± 0.04*  | 35.6 ± 0.21            |
|        | 100                           | 1.16 ± 0.03 | 36.5 ± 0.49            | 2.26 ± 0.04** | 36.3 ± 0.33            |
|        | 200                           | 0.9 ± 0.06  | 35.8 ± 0.12            | 2.32 ± 0.07** | 36.2 ± 0.13            |

注:与正常任氏液组比较, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01。

浓度为  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  给药前后心肌收缩力比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 在心室外茶色素  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  给药前后心肌收缩力比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 蟾蜍离体蛙心灌流标本的心率在低钙任氏液加药前后均无显著变化 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

本实验研究发现, 在低钙任氏液条件下, 茶色素对离体蟾蜍心肌收缩力明显增强, 并且随浓度的增加; 在高钙任氏液条件下, 茶色素对离体蟾蜍心肌收缩力表现为抑制作用, 这可能是茶色素在低钙和高钙条件下对蟾蜍心肌收缩力的一种双向调节<sup>[4-5]</sup>。在正常情况下, 低钙和高钙条件对蟾蜍的心肌收缩是有不同影响的, 低钙会使蟾蜍心肌收缩受到抑制, 高钙会使心肌活动兴奋。临床上有低钙和高钙条件诱发患者死亡的报道<sup>[6-7]</sup>, 因此本实验可为茶色素在临床心血管合理用药方面提供一定的参考依据。茶色素是茶叶中以儿茶素为代表的多酚类化合物氧化耦联产生的一种水溶性、小分子、酚性氧化聚合物水溶性色素物, 是茶黄素类 (theaflavins)、茶红素类 (thearubigins)、茶褐素的混合物, 其中茶红素是茶色素的主体成分, 其含量占茶色素总量的 85 % 以上<sup>[8]</sup>。据报道<sup>[9]</sup>, 茶黄素具有抗血凝、促纤溶、降血黏、防止血小板黏附和聚集、加快血液代谢、提高血液细胞携氧能力的作用; 茶红素可升高血清中高密度脂蛋白、降低血脂和血清中低密度脂蛋白, 并具有对逆转录病毒的逆转录酶及各种细胞的 DNA 和 RNA 聚合酶活性的抑制作用, 还具有溶解血管沉积物的作用; 茶褐素具有增加血管韧性和弹性、修复血管内膜、防治高血压、治疗糖尿病的作用。

本实验测定用蒸馏水配制的茶色素 ( $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 提取液中的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $0.20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 远比正常任氏液中  $\text{Ca}^{2+}$   $0.93\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度低, 说明茶色素引起离体蟾蜍心肌收缩力的增加并非是由于茶色素中

$\text{Ca}^{2+}$  引起的, 而有可能是茶色素中的其他成分单独或联合起作用。通常情况下细胞外液中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下降或增高可以触发心肌细胞收缩对  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性增强, 这与本实验观察到的现象基本相符, 即茶色素对离体蟾蜍心肌收缩力的兴奋作用在低钙条件下最低浓度为  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 在高钙条件下茶色素对离体蟾蜍心肌收缩力的抑制作用最低浓度为  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 但在正常条件下茶色素浓度为  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  心肌收缩力无显著变化, 推测茶色素对离体蟾蜍心肌细胞在低钙或高钙条件下等异常条件下的双向调节作用比在正常情况下对茶色素的敏感性更高, 同时在低钙条件下比在高钙条件下更敏感, 这些可能与茶色素在心肌细胞膜上的钙通道调控有关。

(致谢: 感谢大连理工大学化工学院李楠教授免费提供茶色素)

### 参考文献:

- [1] 吕虎, 华萍, 余继红, 等. 茶色素药理作用研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(9): 745-749.
- [2] 富丽, 韩国柱, 李楠, 等. 茶色素体外抗氧化作用研究[J]. 医药导报, 2012, 31(5): 562-564.
- [3] 傅雷, 关升, 王冬梅, 等. 蜂王浆对低钙条件下离体蟾蜍心脏心率和心肌收缩力的影响[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30: 44-46.
- [4] 曾辉. 中医双向调节学说浅探[J]. 吉林中医药, 2005, 25(10): 3-5.
- [5] 段煜, 张俊, 战丽彬, 等. 胃肠调节类中西药对胃肠道平滑肌的双向调节作用, 医学与哲学[J]. 2011, 32(1): 52-54.
- [6] 颜永红, 马瑛恒. 老年人低钙引起心力衰竭一例[J]. 中华老年医学杂志, 2003, 22(2): 97-99.
- [7] 倪李伟, 许峰, 任海珠, 等. 服用高钙速诱发心衰死亡一例[J]. 刑事技术, 1998, 4: 45-46.
- [8] 罗永明, 李治光. 茶色素的化学成分研究[J]. 中成药, 2012, 33(12): 1066-1067.
- [9] 邵翔, 杨浩, 余国华. 茶提取物在心血管疾病中的应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(14): 1917-1919.

(编辑: 邓响潮)

欢迎订阅 《中药新药与临床药理》, 邮发代号: 46-210