

回药核心方油溶液对离体大鼠胸主动脉血管环的舒张作用及机制研究^Δ

张鹏^{1*}, 郝银菊², 任俊², 韩亮娟², 余建强², 张万年², 周茹^{2,3,4,5#} (1.宁夏医科大学总医院药剂科, 银川 750004; 2.宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 3.宁夏回药现代化工程技术研究中心, 银川 750004; 4.宁夏回医药协同创新中心, 银川 750004; 5.宁夏医科大学回医药现代化省部共建教育部重点实验室, 银川 750004)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3952-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.18

摘要 目的:研究回药核心方油溶液对离体大鼠胸主动脉血管环的舒张作用及机制,为其用于心血管疾病的治疗提供参考。方法:取出大鼠胸主动脉血管环后浸泡于克氏营养液(K-H)中,以 1×10^{-6} mol/L去甲肾上腺素(PE)或60 mmol/L氯化钾(KCl)致血管环收缩,采用生物信号采集分析系统测定0.020 4、0.040 8、0.061 2、0.081 6、0.102 0 mg/mL核心方油溶液对血管环的舒张作用,计算舒张率;分别以0.1 mmol/L一氧化氮合酶抑制剂左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)、环氧合酶抑制剂吲哚美辛(INDO)、钾离子通道阻滞剂格列本脲(Gli)孵育血管环20 min后,测定上述5种质量浓度核心方油溶液对PE预收缩血管环的舒张作用,计算舒张率;试验均以K-H溶液为空白对照。结果:与空白对照比较,0.020 4~0.102 0 mg/mL核心方油溶液对PE、KCl预收缩血管环均有明显的舒张作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且具有浓度依赖性。INDO预处理后可减弱核心方油溶液对PE预收缩血管环的舒张作用,舒张率较空白对照组差异无统计学意义($P > 0.05$);而Gli、L-NAME预处理不影响核心方油溶液对PE预收缩血管环的舒张作用,舒张率较空白对照组仍明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:核心方油溶液可呈浓度依赖性地舒张PE、KCl预收缩的胸主动脉血管环,其作用机制可能与激活环氧合酶途径有关。

关键词 回药;核心方油溶液;离体胸主动脉血管环;血管舒张;环氧合酶抑制剂;钾离子通道阻滞剂;一氧化氮合酶抑制剂

Study on the Diastolic Effect and Mechanism of Hui Medicine Hexin Oil Solution on Isolated Thoracic Aortic Vascular Rings of Rats

ZHANG Peng¹, HAO Yinju², REN Jun², HAN Liangjuan², YU Jianqiang², ZHANG Wannian², ZHOU Ru^{2,3,4,5} (1. Dept. of Pharmacy, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. Ningxia Modernization Engineering Technology Research Center for Hui Medicine, Yinchuan 750004, China; 4. Ningxia Collaborative Innovation Center for Hui Medicine, Yinchuan 750004, China; 5. Modernization Key Laboratory for Hui Medicine Co-founded by Ningxia Province and Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

- cosamine glycosylation of p65 aggravated the inflammation in both fibroblast-like synoviocytes stimulated by tumor necrosis factor- α and mice with collagen induced arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 1-8.
- [6] 汪永忠, 邓龙飞, 韩燕全, 等. 成纤维样滑膜细胞原代培养及其在类风湿关节炎治疗机制研究中的应用进展[J]. 中国药房, 2016, 27(7): 966-969.
- [7] Jia Q, Cheng W, Yue Y, et al. Cucurbitacin E inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokine production in human synoviocyte MH7A cells via suppression of PI3K/Akt/NF- κ B pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 884-890.
- [8] Zuo J, Xia Y, Li X, et al. Selective modulation of MAPKs contribute to the anti-proliferative and anti-inflammatory activities of 1, 7-dihydroxy-3, 4-dimethoxyxanthone in rheumatoid arthritis-derived fibroblast-like synoviocyte MH7A cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, doi: 10.1016/j.jep.
- [9] 贾庆运. 葫芦素E通过PI3K/Akt/NF- κ B信号通路抑制TNF- α 诱导的MH7A细胞炎症因子的分泌[D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [10] 蔡文虹, 孙保东, 张宝凤, 等. 原代类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞及成熟细胞系生长特性的比较[J]. 中国当代医药, 2012, 19(20): 8-9.
- [11] 林云斌. 昆母汤对RA滑膜成纤维细胞增殖及细胞因子表达的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [12] 王斌, 侯建平, 李敏, 等. 虎杖提取物对急性痛风性关节炎大鼠血清中PEG₂水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 9(1): 152-153.

^Δ 基金项目: 国家科技支撑计划课题(No.2013BAI11B07); 宁夏回族自治区科技攻关计划项目(No.2012); 大学生创新/创业计划项目(No.201510752008)

* 副主任药师。研究方向: 临床药学。电话: 0951-6743353。E-mail: 13895182622@163.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 心脑血管药理学。电话: 0951-6980192。E-mail: zhour-ru926@163.com

(收稿日期: 2017-03-04 修回日期: 2017-07-14)

(编辑: 林静)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the diastolic effect and mechanism of Hui medicine Hexin oil solution on isolated thoracic aortic vascular rings of rats, and provide reference for its treatment for cardiovascular diseases. METHODS: Thoracic aortic vascular rings of rats were taken and then soaked in Kelvin's nutrient solution (K-H). Using 1×10^{-6} mol/L norepinephrine (PE) or 60 mmol/L potassium chloride (KCl) for inducing the contraction of vascular rings, biological signal acquisition and analysis system was used to determine the diastolic effect and mechanism of Hexin oil solution with concentrations of 0.020 4, 0.040 8, 0.061 2, 0.081 6, 0.102 0 mg/mL on vascular rings, and diastolic rate was calculated. After culturing vascular rings by 0.1 mmol/L nitric oxide synthase inhibitor *L*-nitro-arginine methyl ester (*L*-NAME), cyclooxygenase inhibitor indomethacin (INDO), and potassium ion channel blocker glibenclamide (Gli) for 20 min, the diastolic effects of above-mentioned 5 mass concentrations of Hexin oil solution on the contraction of vascular rings pre-contracted by PE were determined, and diastolic rate was calculated. The test was based on K-H solution as blank control. RESULTS: Compared with blank control, Hexin oil solution with concentration of 0.020 4-0.102 0 mg/mL had obvious diastolic effect on the contraction of vascular rings induced by PE and KCl ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), showing concentration-dependent relationship. INDO pre-treatment can relieve the diastolic effect of Hexin oil solution on vascular rings pre-contracted by PE; and compared with blank control group, the diastolic rate had no statistical significance ($P > 0.05$). While the pre-treatment of Gli, *L*-NAME did not affect the diastolic effect of Hexin oil solution on vascular rings pre-contracted by PE; and compared with blank control group, diastolic rate was obviously increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: Hexin oil solution can concentration-dependently conduct the relaxation of thoracic aortic vascular rings pre-contracted by PE, KCl. The mechanism may be associated with activation of cyclooxygenase pathway.

KEYWORDS Hui medicine; Hexin oil solution; Isolated thoracic aorta vascular ring; Vasodilation; Cyclooxygenase inhibitors; Potassium channel blockers; Nitric oxide synthase inhibitors

脑卒中是急性脑循环障碍所致的局限性或全面性脑功能缺损综合征,或称急性脑血管事件。脑卒中是目前危害人类健康的重要疾病之一,在世界范围内已成为第二大死亡原因和残疾的首要原因,其具有高发病率、高复发率、高致残率和高致死率的特点^[1]。不同类型的脑卒中治疗方式不同,但由于一直缺乏有效的治疗手段,目前认为预防是最好的措施。而高血压是导致脑卒中的重要可控性危险因素,因此,降压治疗对预防脑卒中的发病和复发尤为重要。

回族医药“四性学说”“真一七行论”独特的理论体系已被社会广泛认可,在宁夏地区已有数百年的传承与发展^[2]。临床上回药以复方剂应用为主,以运用香药为特色。核心方油溶液是取中药材海狗肾、没药、红花、萆薢、肉桂各 12 g 和胡椒 6 g,与辅料压片制成饮片,用一定溶剂提取有效成分,蒸去大部分溶剂,调整浓度后制成的油溶液。其主药为富含动植物挥发油的香药,通过“理气调性”“芳香开窍”“散结化痰”等特色治疗原理,激发人体自身的调理与再生之潜能^[3]。依据回医理论,核心方油溶液可能对脑卒中有对症治疗作用。故本研究通过观察核心方油溶液对大鼠离体脑主动脉血管环张力的影响,并结合不同抑制剂处理后其张力的变化,探讨核心方油溶液对大鼠血管环的作用及可能机制,为该溶液临床用于治疗心脑血管疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BL-420E 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);Powerlab 生物信号采集分析系统(宁夏医科大学药理学实验室提供);HSS-1B 数字式超级恒温泵(成都仪器厂)。

1.2 药品与试剂

核心方油溶液(宁夏医科大学药学院药剂实验室提供,批号:20150413,规格:0.204 mg/mL);去氧肾上腺素(PE,上海禾丰制药有限公司,批号:07150801);四乙胺(上海谱诺泰化工有限公司,批号:20110817);吲哚美辛(INDO,上海振生物医药有限公司,批号:20110520);格列本脲(Gli)、左旋-硝基-精氨酸甲酯(*L*-NAME)均购自上海将来实业股份有限公司(批号:075K1376、51298-62-5);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD 大鼠,♂,体质量 220~320 g,由宁夏医科大学动物实验中心提供,实验动物生产许可证号:XYXK(宁)2005-0001。

2 方法

2.1 大鼠胸主动脉离体血管环的制备

20% 乌拉坦(5 mL/kg) ip 麻醉大鼠,沿胸部正中切开,分离胸主动脉。将取下的胸主动脉迅速移入通有 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体的克氏营养液(K-H)中。小心剔除血管周围的脂肪及结缔组织,剪成 3~4 mm 长的血管环^[4-5],悬挂于 37 °C 预热、容量为 10 mL 的水浴槽内^[6],一端用 m 型钩固定,另一端通过张力换能器连接生物信号采集分析系统。持续通以 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体,调节静息张力为 2.0 g,每 20 min 换 K-H 液 1 次,37 °C 下稳定 1 h^[7]。用 KCl 刺激血管环收缩值达峰值(即血管环的收缩张力不再变化),K-H 液冲洗,重复 3 次,以诱发血管环的最大收缩幅度。用 1×10^{-6} mol/L 的 PE 预收缩血管环,待张力稳定后加入 1×10^{-5} mol/L 乙酰胆碱(ACh),待血管舒张达 80% 以上,可认为内皮完整。

2.2 核心方油溶液对基础状态血管环的作用

将大鼠离体胸主动脉血管环在 37 °C 的水浴槽(容

量为10 mL)内稳定1 h,用累积给药法^[8],每隔2 min往水浴槽中加入核心方油溶液1次,每次加药0.1 mL,使灌流液中核心方油溶液的累积质量浓度分别为0.020 4、0.040 8、0.061 2、0.081 6、0.102 0 mg/mL,作为核心方油溶液组,通过张力换能器反映出的张力观察血管环张力变化;另以K-H液代替核心方油溶液累积加入,作为空白对照组。根据加入药物后的血管张力幅度/PE或KCl诱发最大收缩幅度×100%计算各组的舒张率,绘制累积质量浓度-血管舒张率曲线。试验重复6次。

2.3 核心方油溶液对PE或KCl预收缩血管环的舒张作用

将血管环在37℃水浴槽内稳定1 h后,将试验分为核心方油溶液组和空白对照组。核心方油溶液组加入 1×10^{-6} mol/L的PE 0.1 mL或60 mmol/L的KCl 0.2 mL预收缩,然后每隔2 min往水浴槽中加入核心方油溶液0.1 mL,使核心方油溶液累积质量浓度分别为0.020 4、0.040 8、0.061 2、0.081 6、0.102 0 mg/mL,通过张力换能器反映出的张力观察血管环的张力变化;以K-H液代替核心方油溶液累积加入作为空白对照组。按“2.2”项下方法计算舒张率。试验重复6次。

2.4 L-NAME、Gli和INDO对核心方油溶液舒张血管环的影响

分别以0.1 mmol/L的L-NAME、Gli和INDO孵育血管环20 min,然后以 1×10^{-6} mol/L的PE 0.1 mL预收缩血管环。按照“2.2”项下方法加药并计算舒张率。试验重复6次。

2.5 统计学方法

采用SPSS 16.0软件进行统计分析。采用单因素方差分析和独立样本t检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 核心方油溶液对离体大鼠胸主动脉血管环基础张力的影响结果

与空白对照组比较,在不同质量浓度下核心方油溶液组大鼠离体血管舒张率差异无统计学意义($P > 0.05$),说明核心方油溶液对正常血管环没有舒张作用,结果见图1。

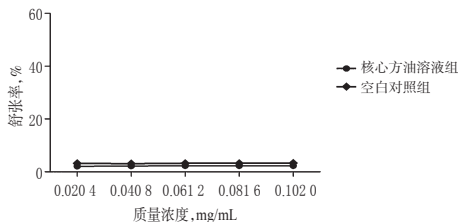
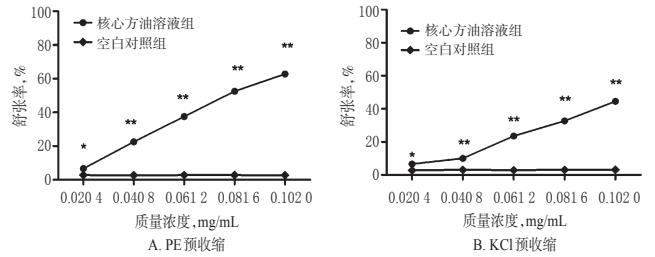


图1 不同质量浓度核心方油溶液对大鼠离体胸主动脉血管环的舒张作用

Fig 1 Diastolic effect of Hexin oil solution with different mass concentrations on isolated thoracic aortic vascular rings of rats

3.2 核心方油溶液对PE或KCl预收缩血管环舒张作用的影响结果

0.020 4~0.102 0 mg/mL核心方油溶液对PE或KCl预收缩血管环均有较好的舒张作用,且具有明显的量效关系。与空白对照组比较,在不同质量浓度下,核心方油溶液组大鼠离体血管环的舒张率均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见图2。



注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图2 不同质量浓度核心方油溶液对PE或KCl预收缩胸血管环的舒张作用

Fig 2 Diastolic effect of Hexin oil solution with different mass concentrations on vascular rings precontracted by PE or KCl

3.3 核心方油溶液对L-NAME、Gli、INDO预处理后的PE预收缩血管环舒张作用的影响结果

L-NAME、Gli预处理后,核心方油溶液对PE预收缩血管环仍有较好的舒张作用;与空白对照组比较,在不同质量浓度下核心方油溶液组血管环舒张率均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示L-NAME、Gli对核心方油溶液舒张血管无明显抑制作用。而INDO预处理后,核心方油溶液对PE预收缩血管环的舒张作用不明显;与空白对照组比较,在不同质量浓度下核心方油溶液组血管环舒张率差异无统计学意义($P > 0.05$),提示INDO预处理对核心方油溶液舒张血管有明显的抑制作用,结果见图3。

4 讨论

核心方中的芳香开窍药胡椒、萆薢中的胡椒碱可以缩小大鼠中动脉阻塞(MCAO)面积,改善MCAO大鼠梗死后神经功能缺损,具有一定的脑保护作用;并且胡椒碱可抑制MCAO大鼠缺血半暗带内的细胞凋亡,这一过程可能与抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3蛋白的表达有关^[9]。肉桂中的肉桂醛对缺血脑组织中的Toll样受体4(TLR4)、肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)、转录核因子 κ B(NF- κ B)表达的抑制程度与其对脑保护作用及抗炎损伤作用一致,提示肉桂醛有可能通过抑制TLR4/TRAF6/NF- κ B炎症通路,从而减轻缺血脑组织的过度炎症反应来实现缺血后的脑保护作用^[10]。以上结果均提示,核心方油溶液对缺血性脑疾病有较好的疗效。

血管平滑肌上主要有两种钙通道,即受体操作性钙通道(ROC)和电压依赖性钙通道(VDC)^[11],其分别可被

用与K⁺通道无关。

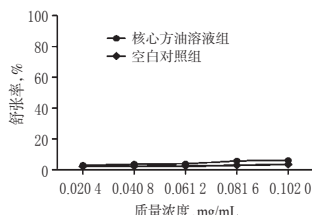
综上所述,核心方油溶液对正常大鼠胸主动脉血管环无影响;对KCl或PE预收缩的血管环有浓度依赖性的舒张作用;eNOS抑制剂L-NAME和K⁺通道阻滞剂Gli都不能抑制核心方油溶液对PE预收缩血管环的舒张作用,而COX抑制剂INDO则可以抑制核心方油溶液对PE预收缩血管环的舒张作用,提示其舒张血管环的作用与eNOS和K⁺通道无关,与激活COX有关。但核心方油溶液舒张血管的更多作用机制有待进一步研究。

参考文献

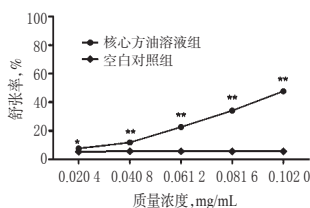
- [1] 徐添.脑卒中发病与预后的前瞻性队列研究[D].苏州:苏州大学,2014.
- [2] 牛阳.牛阳回回药方研究[M].银川:黄河出版传媒集团阳光出版社,2010:116-117.
- [3] 李婷婷,董琳,陈国霆,等.回药治疗脑卒中方剂收集整理[J].中国中药杂志,2013,38(14):2412-2415.
- [4] 张博男,储金秀,韩淑英.荞麦花叶总黄酮的舒张血管作用及其机制[J].中国药理学通报,2010,26(7):952-956.
- [5] 赵壮琴.儿茶酚胺对大鼠离体血管环张力的作用及机制的研究[D].太原:山西医科大学,2013.
- [6] 范俊强.pH对大鼠离体胸主动脉环血管张力的影响及机制[D].太原:山西医科大学,2012.
- [7] 张珊珊.SPT对离体大鼠胸主动脉环和血管平滑肌细胞电流的影响[D].太原:山西医科大学,2013.
- [8] 陈媛,任俊杰,武冬梅,等.氨基吡啶对预收缩大鼠胸主动脉血管的作用及其机制探讨[J].中西医结合心脑血管病杂志,2009,7(12):1443-1446.
- [9] 郑显东.胡椒碱对大鼠局灶性脑缺血神经保护作用[D].石家庄:河北医科大学,2009.
- [10] 赵景茹.肉桂醛对局灶性脑缺血小鼠的脑保护作用及相关机制研究[D].石家庄:河北医科大学,2015.
- [11] Takeuchi M, Watannabe J, Horiguchi S, et al. Interaction between L-type C²⁺ channels and sarcoplasmic reticulum in the regulation of vascular tone in isolated rat small arteries[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, 36(5):548-554.
- [12] 王红娟,马欣,白宇飞,等.大豆黄酮血管舒张作用与血管内皮的关系[J].中国药理学通报,2005,21(8):946-949.
- [13] Repoort RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP[J]. *Circ Res*, 1983, 52(3):352-357.
- [14] Vaandrager AB, Dejonger HR. Signalling by cGMP-dependent protein kinases[J]. *Mol Cell Biochem*, 1996, 157(12):23-30.
- [15] Nellson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle[J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(4 Pt 1):C799-822.
- [16] Jackson WF. Ion channels and vascular Tone[J]. *Hypertension*, 2000, 35(1Pt 2):173-178.

(收稿日期:2017-04-18 修回日期:2017-08-12)

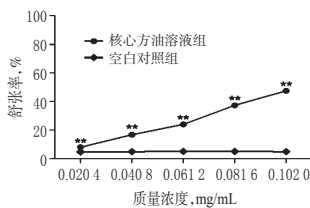
(编辑:林 静)



A. INDU 预处理



B. Gli 预处理



C. L-NAME 预处理

注:与空白对照组比较, *P<0.05, **P<0.01

Note: vs. blank control group, *P<0.05, **P<0.01

图3 不同质量浓度核心方油溶液对L-NAME、INDO、Gli预处理后的PE预收缩血管环的舒张作用

Fig 3 Diastolic effect of Hexin oil solution with different mass concentrations on vascular rings pre-contracted by PE after L-NAME, INDO, Gli pre-treatment

PE和KCl激活,使细胞外Ca²⁺内流增加,引起血管收缩。KCl诱导的血管收缩,其机制主要是使VDC开放,细胞外Ca²⁺内流,从而增加细胞内Ca²⁺的浓度。激活的ROC引起细胞外Ca²⁺内流和细胞内Ca²⁺释放,使细胞质内游离Ca²⁺浓度升高,从而收缩血管平滑肌^[12]。本研究中,核心方油溶液对KCl、PE预收缩血管环具有舒张作用,提示其舒张血管的作用可能与Ca²⁺通道有关,降低Ca²⁺内流是核心方油溶液舒张血管的机制之一。

内皮细胞释放的血管舒张物质在血管平滑肌张力的调节过程起重要的作用^[13]。NO是内皮源性的松弛因子,在内皮细胞NO合酶(eNOS)的作用下,由精氨酸合成释放进入平滑肌细胞,作用于可溶性鸟苷酸环化酶,促使环磷鸟嘌呤核苷(cGMP)的生成,cGMP通过抑制肌球蛋白轻链激酶舒张血管^[14]。本研究结果显示,用eNOS抑制剂L-NAME预孵育内皮完整血管环,对核心方油溶液舒张血管作用无显著影响,说明核心方油溶液舒张血管的作用与eNOS无关。内皮细胞中环氧化酶(COX)中起潜在的催进作用,内皮依赖性收缩可被非选择性COX抑制剂所阻滞。用COX抑制剂INDO孵育血管环后,发现核心方油溶液舒张血管环的作用受到明显抑制,说明其舒张血管的作用与COX有关。

K⁺通道活性的改变可使动脉平滑肌细胞膜电位去极化或超极化,是参与动脉血管舒缩调节的重要机制^[15-16]。为了解核心方油溶液的舒张血管作用和K⁺的关系,本研究观察了K⁺通道阻滞剂Gli对核心方油溶液舒张血管环作用的影响。结果显示,Gli预孵育后,对核心方油溶液舒张血管环的作用无明显影响,说明其舒张血管环的作