

杜仲提取物直接或内皮依赖性地引起大鼠血管舒张

周萍¹, 王会平², 蒋惠娣^{1*} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 浙江大学医学院生理学教研室, 杭州 310058)

摘要:目的 研究杜仲不同溶剂提取物的舒血管作用并探讨其乙醇提取物的血管舒张机制。方法 大鼠胸主动脉环张力测定法。结果 在内皮完整血管, 杜仲水提物 (AQEO) 及醇提物 (ALEO) 均可显著降低 PE 诱发的血管张力, 但醇提物作用显著大于水提物, 醇提物的血管舒张活性显著高于其不同溶剂萃取物。杜仲醇提物对去内皮血管的舒张作用显著低于对内皮完整血管。L-N 硝基精氨酸甲酯 (L-NAME)、1H-[1, 2, 4] 草酸重氮 [4, 3-a] 喹噁啉 (ODQ)、吲哚美辛 (INDO) 可以显著降低 ALEO 的舒血管作用 ($P < 0.05$); 四乙氨 (TEA)、4-氨基吡啶 (4-AP) 对 ALEO 的作用无显著影响, 但格列苯脲 (glibenclamide) 可以明显削弱 ($P < 0.05$) ALEO 的血管舒张作用。ALEO 对无钙环境下肾上腺素 (PE) 引起的收缩有显著影响 ($P < 0.01$)。结论 杜仲乙醇提取物可以直接或内皮依赖性地引起血管舒张, 其机制既与 NO、PGI₂ 介导的途径有关, 也与其抑制电压依从性钙通道和激活 ATP 敏感钾通道有关。

关键词: 杜仲; 主动脉; 舒张; 机制

中图分类号: R282.710.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)03-0182-04

The Extracts of Cortex Eucommiae Induces both Directly and Endothelium-dependent Relaxation in Rat Thoracic Aorta

ZHOU Ping¹, WANG Hui-ping², JIANG Hui-di^{1*} (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; 2. Department of Physiology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the vasorelaxant effect of different solvent extracts from Cortex Eucommiae and vasorelaxant mechanism of ethanol extract from Cortex Eucommiae. **METHODS** The effects of Cortex Eucommiae extracts on the contraction of rat thoracic aorta were examined. **RESULTS** In the endothelium intact aorta ring, both aqueous and ethanol extracts of Cortex Eucommiae significantly relaxed the contraction of aorta rings induced by phenylephrine. Moreover, ethanol extract was more effective than the aqueous extract and different solvent extracts. The relaxation of ethanol extract on the endothelium-denuded aorta ring was significantly lower than on the endothelium intact aorta ring. N^G-nitro L-arginine methylester, 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo[4, 3-a] quinoxalin-1-one and indomethacin attenuated the effect of ALEO significantly, while tetraethylammonium and 4-aminopyrimidine did not. However,

作者简介: 周萍 (1972 -), 女, 讲师, 主要从事中药分析研究。联系地址: 云南省大理学院药学院分析化学与药物分析教研室, 邮编: 671000
Tel: (0872) 2257417

er, glibenclamide attenuated the effect of ALEO significantly. ALEO reduced the contraction elicited by PE in Ca^{2+} free medium. **CONCLUSION** The ethanol extract of Cortex Eucommiae can induce the relaxation of the aorta ring directly or through endothelium-dependent way. NO and PGI_2 may be involved in the endothelium-dependent way, inhibition of voltage-dependent and activation of ATP-sensitive K^+ channel contribute in part to the endothelium-dependent relaxation by ALEO.

KEY WORDS: Cortex Eucommiae; aorta; relaxation; mechanism

杜仲 (Cortex Eucommiae) 为杜仲科植物杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 的干燥树皮, 又名思仙、思仲、木棉, 主要含木脂素及其苷类、环烯醚萜类、酚类、甾类、有机酸类、多糖、氨基酸、微量元素及杜仲胶等^[1], 临床用于强壮筋骨、安胎、降压等。Charles 从中国产杜仲中分离得到了松脂醇二葡萄糖苷 (pinoresind diglucoside), 并证明其具有降血压作用^[2]。另有文献报道杜仲皮和叶水提物内皮依赖性舒张肾上腺素 (PE) 引发的血管收缩^[3]。笔者利用大鼠胸主动脉张力测定法, 首先比较了杜仲水及醇提取物的血管舒张作用, 而后比较了醇提取物的不同溶剂萃取物血管舒张作用的强弱, 最后考察了杜仲醇提取物的血管舒张机制, 为杜仲降压机制的阐明及其合理利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

SD 雄性大鼠 220 ~ 260 g, 由浙江省医科院实验动物中心提供。L-N 硝基精氨酸甲酯 (L-NAME)、1H-[1, 2, 4] 草酸重氮 [4, 3-a] 喹噁啉 (ODQ)、吲哚美辛 (INDO)、四乙氨 (TEA)、4-氨基吡啶 (4-AP)、格列苯脲 (glibenclamide)、乙酰胆碱 (Ach)、苯肾上腺素 (PE) 均购自 Sigma 公司。Krebs-Henseleit (KH) 液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: NaCl 118.3, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25.0, CaCl_2 2.5, 葡萄糖 5.5)。

杜仲购于浙江临安药材公司, 经浙江大学药学院中药系中药资源研究室徐娟华副教授鉴定。杜仲水提取物 (AQEO) 及醇提取物 (ALEO) 分别由生杜仲粗粉, 以水或 60% 乙醇回流提取三次, 合并滤液, 减压浓缩而得。

1.2 血管环的制备及杜仲提取物对 PE 预收缩血管张力的影响

大鼠主动脉环制备参照文献方法^[4], 以 LH-663 型传感器及 Powerlab 生物信号处理系统记录血管环张力, 以 Ach 检查血管内皮是否完整。经内皮检查后的血管环, 依用药顺序不同随机分为七组, 加 PE 使终浓度为 $10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 达收缩平台后, 采用累计加药法加入杜仲提取物, 加药间隔为 15 min, 记录血管张力变化曲线。

1.3 各种阻断剂对杜仲提取物作用的影响

取有或无内皮血管, 依用药顺序不同随机分为九组, 与 L-NAME ($10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、ODQ ($10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、INDO ($10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、TEA ($5 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、4-AP ($10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Glib ($10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 37°C 预孵育 30 min, 按上法测定杜仲提取物对 PE 预收缩血管张力的影响。

1.4 杜仲提取物舒血管作用与钙通道的关系

1.4.1 与电压依从性钙通道的关系 观察杜仲提取物对去内皮血管由高钾 ($6 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 引起血管张力的

变化。

1.4.2 与细胞内钙释放的关系 用无钙液冲洗去内皮血管环 4 ~ 5 次, 加入 PE, 此时引起的收缩记为 con1, 然后用正常 KH 液冲洗数次并孵育 30 min, 再以无钙液反复冲洗至平台, 在第 2 次加 PE 前 30 min 加或不加 ALEO $3.2 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 记录此时 PE 收缩的幅度 con2, 比较在有或无 ALEO 时, con2 / con1 值的差异。

1.5 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Student-t 检验和方差分析做统计学分析。

2 结果

2.1 杜仲提取物的舒血管作用

由图 1 可知, 杜仲水、醇提取物在内皮完整血管上均可剂量依赖性地减小 PE 预收缩血管张力, 且醇提取物作用显著大于水提取物。

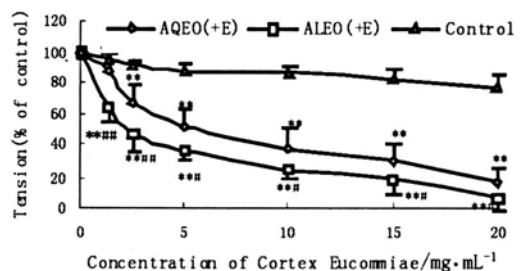


图 1 杜仲提取物对 PE 预收缩血管张力的影响

Fig 1 Effect of eucommia extracts on tension of the phenylephrine ($10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) precontracted aorta rings with endothelium (+E, $n=10$) of rat. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs AQEO group

2.2 杜仲乙醇提取物血管舒张作用与血管内皮的关系

图 2 为杜仲乙醇提取物在内皮完整及去内皮血管上对 PE 诱发的血管收缩的作用差异, 由该图可知, 杜仲乙醇提取物对内皮完整血管的作用显著强于去内皮血管。

2.3 杜仲乙醇提取物的不同溶剂萃取物舒血管作用差异

将杜仲乙醇提取物回收乙醇后依次用乙酸乙酯 (Ethyl acetate)、正丁醇 (1-Butanol) 萃取, 萃取物及剩余水溶性部分 (water remained) 经减压旋转蒸发至干, 比较上述各部分引起血管张力减小的程度, 结果见图 3, 各部分 IC_{50} 分别为 (9.49 ± 2.4) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (20.17 ± 4.0) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (13.72 ± 2.5) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由图 3 及计算的 IC_{50} 可知, 各萃取物及剩余水溶性部分, 均可显著降低血管张力, 但各部分作用均小于乙醇总提取物 [$\text{IC}_{50} = (2.31 \pm 0.45) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$]。

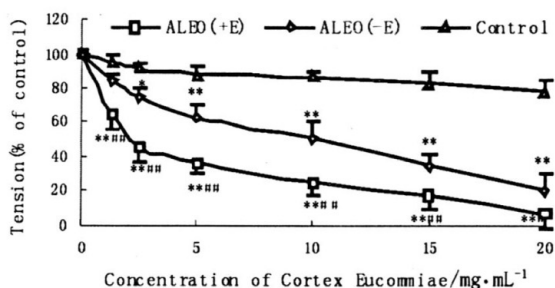


图 2 杜仲乙醇提取物对 PE 预收缩血管张力的影响

Fig 2 Effect of ethanol extract of eucommia on tension of the phenylephrine ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) precontracted aorta rings with endothelium (+E, $n=10$) or without endothelium (-E, $n=10$) of rat. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Aleo(-E) group

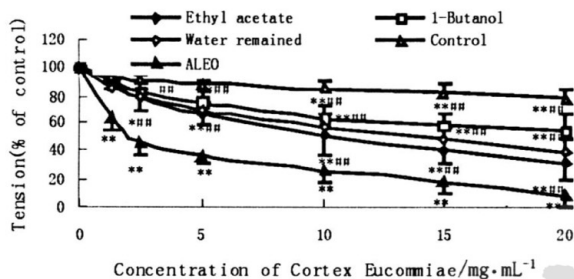


图 3 杜仲乙醇提取物的不同溶剂萃取物对 PE 预收缩血管张力的影响

Fig 3 Effect of different solvent extracts of eucommia extract by ethanol on tension of the phenylephrine ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) precontracted aorta rings with endothelium (+E, $n=10$) of rat. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Aleo group

2.4 L-NAME、ODQ 及 NDO 对杜仲醇提取物舒血管作用的影响

如图 4-A、4-B、4-C 所示,在有内皮血管上, L-NAME、ODQ、NDO 均可以显著降低杜仲醇提取物对 PE 预收缩血管的舒张作用。

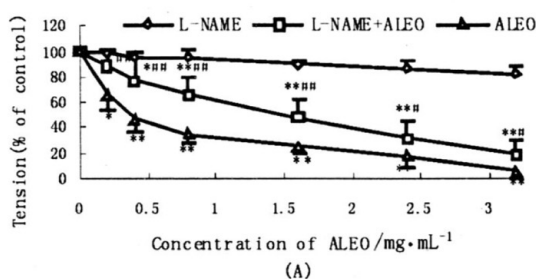
2.5 K⁺ 通道阻断剂对杜仲醇提取物血管作用的影响

图 5 显示了各种钾通道抑制剂对杜仲醇提取物血管舒张作用的影响。由图可知,在 Ca^{2+} 激活的 K^+ 通道 (K_{Ca}) 抑制剂 TEA、电压敏感型 K^+ 通道 (K_{v}) 抑制剂 (4-AP) 存在下,杜仲醇提取物的舒血管作用没有显著变化,而非特异 K_{ATP} 抑制剂 glibenclamide 则可显著降低 Aleo 的舒血管作用。

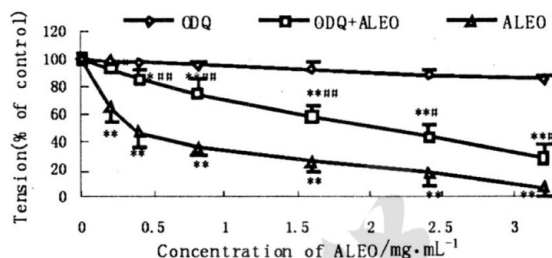
2.6 杜仲醇提取物舒血管作用与钙通道的关系

从图 6 可知,杜仲醇提取物对高钾引起的血管收缩具有显著的抑制作用,说明 Aleo 可以通过抑制电压依从性钙通道而舒张血管。

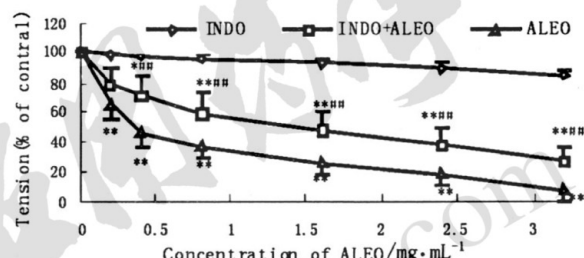
图 7 为在无钙环境下,两次加入 PE 引起的血管张力变化之比,在第 2 次加 PE 前加或不加杜仲醇提取物, con2/con1 分别为 18.4 ± 4.4 ($n=8$) 和 48.0 ± 3.8 ($n=8$),两者有



(A)



(B)



(C)

图 4 L-NAME (A)、ODQ (B)、NDO (C) 对杜仲醇提取物舒血管作用的影响

Fig 4 Effect of $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-NAME (A, $n=8$), $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ODQ (B, $n=8$) and $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NDO (C, $n=7$) on Aleo-induced relaxation in the endothelium-intact aorta rings. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Aleo group

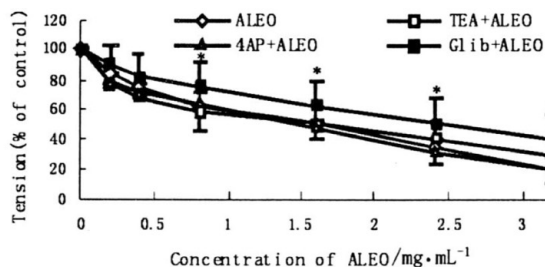
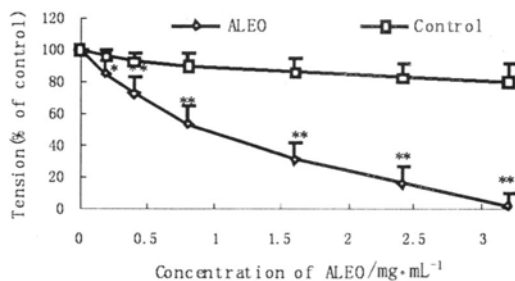


图 5 TEA、4-AP 和 glibenclamide 对 Aleo 引起的去内皮血管舒张作用的影响

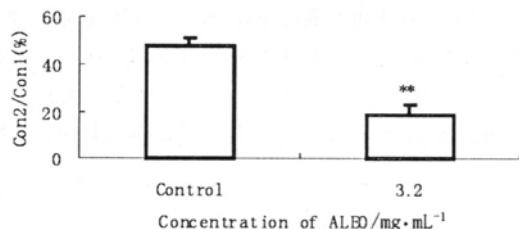
Fig 5 Effect of TEA ($5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 4-AP ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and glibenclamide ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on Aleo-induced relaxation in the endothelium-denuded aorta ring. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Aleo group

统计学差异 ($P < 0.01$), 提示杜仲醇提取物舒血管作用与阻断细胞内钙释放有关。



ALEO对高钾引起血管收缩的影响

Fig 6 Effect of ALEO on KCl ($6 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) induced contraction on endothelium-denuded aorta ring. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control



无钙环境下 ALEO对 PE引起的血管收缩的影响

Fig 7 Effect of ALEO on PE ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) induced contraction on endothelium-denuded aorta ring in the Ca^{2+} -free KH solution. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=8$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

3 讨论

本实验结果显示,杜仲水、醇提取物均可以浓度依赖性抑制内皮完整血管由 PE 引起的血管收缩,且醇提取物的作用显著大于水提取物,提示,以乙醇为溶剂的对血管舒张活性成分的提取效果更佳。本实验结果还显示,乙醇提取物在去内皮血管上仍能显著降低 PE 诱发的血管张力提高,但其作用显著低于内皮完整血管,提示,杜仲乙醇提取物的血管舒张作用具有直接或内皮依赖性。文献报道,杜仲水提物的血管舒张作用为内皮依赖性,可能是以水为溶剂时,非内皮依赖性舒张成分未被提取,而本试验采用含水乙醇提取,能提取水溶性及脂溶性舒血管成分。

一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 能显著削弱杜仲醇提物对内皮完整血管由 PE 预收缩血管的舒张作用。在内皮完整血管,血管内皮细胞中的 NO 合酶 (eNOS) 可以催化 L-arginine 生成 NO, NO 进入血管平滑肌细胞 (VSMC), 作用于可溶性鸟苷酸环化酶 (SGC), 促使 cGMP 生成, 引起血管舒张^[5]。NOS 抑制剂 L-NAME, SGC 抑制剂 ODQ 可以削弱 ALEO 的作用, 推测 ALEO 可能通过 NO 介导途径舒张血管。此外, 内皮细胞还可产生前列环素 (PGI_2), PGI_2 作用于 VSMC 生成 cAMP 而舒张血管, 本研究显示, 前列环素合成酶抑制剂 INDO 能削弱 ALEO 的作用, 提示 PGI_2 参与 ALEO 的舒血管作用。

PE 通过促进细胞内钙释放和细胞外钙内流而引起血管

收缩^[6]。ALEO 对无钙环境下 PE 引起的收缩有显著影响, 提示 ALEO 发挥舒血管作用与抑制细胞内钙释放有关。

KCl 通过细胞膜去极化而激活电压依从性钙通道^[7], ALEO 显著对抗高钾引起的血管收缩, 提示其具有抑制电压依从性钙通道作用。血管平滑肌上主要存在 ATP 敏感 K^+ 通道 (K_{ATP}), Ca^{2+} 激活的 K^+ 通道 (K_{Ca}), 电压敏感型 K^+ 通道 (K_{V}) 和内向整流型 K^+ 通道 (K_{IR}), 其抑制剂分别为 glibenclamide、TEA、4-AP 等^[8]。研究显示: 4-AP、TEA 对 ALEO 的血管舒张作用无显著影响, glibenclamide 可以显著降低 ALEO 的作用, 提示杜仲醇提物的血管舒张作用还与其激活 K^+ 通道有关。

此外, 为了确定杜仲血管舒张作用的活性部位, 我们将杜仲醇提取物依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取, 比较萃取前、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物以及萃取后剩余的水溶性部分的舒血管作用, 发现各部分均有显著的舒血管作用, 而以萃取前, 即杜仲醇提取物的舒血管作用最强。由此推测, 杜仲药材中不同极性的成分可能均具有血管舒张作用。

参考文献

- [1] LIU N, LI K C, LIU C S. Advances in research of *Eucommia ulmoides* Oliv. in China and abroad [J]. Med J Southwest Natl Def China (西南国防医药), 2002, 5(12): 449.
- [2] CHARLES J S, RAVIKUMAR P, HUANG Fuchin, et al. Separation and Synthesis of pinoresinol diglucoside from *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. J Am Chem Soc, 1976, 98(17): 5412.
- [3] KWAN C Y, CHEN C X, DEYAMA T, et al. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action [J]. Vasc Pharmacol, 2004, 40: 229.
- [4] KUBOTA Y K, TANAKA N K, UMEGAKI K, et al. Ginkgo biloba extract-induced relaxation of rat aorta is associated with increase in endothelium intracellular calcium level [J]. Life Sci, 2001, 69(20): 2327.
- [5] MARIN J, Rodriguez-Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions [J]. Pharmacol Ther, 1997, 75(2): 111.
- [6] NELSON M T, QUAYLE J M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle [J]. Am J Physiol, 1995, 268(4 Pt 1): C799.
- [7] XIONG Z, SPERELIS J N. Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cell [J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 268: C799.
- [8] FERRER M, MARIN J, ENCABO A, et al. Role of K^+ channels and sodium pump in the vasodilation induced by acetylcholine, nitric oxide, and cyclic GMP in the rabbit aorta [J]. General Pharmacol, 1999, 33(1): 35.

收稿日期: 2006-09-25