

山楂总黄酮对大鼠离体血管功能的影响及其机制

姜建芳¹, 沈晓兰², 张宁³ (1. 杭州市第三人民医院, 杭州 310009; 2. 上海第二军医大学药物分析教研室, 上海 210000; 3. 上海徐汇区中心医院药械科, 上海 210000)

摘要: **目的** 研究山楂总黄酮对大鼠离体血管功能的影响, 并初步探讨其作用机制。**方法** 采用大鼠离体血管灌流模型, 观察山楂总黄酮对大鼠离体血管舒张和收缩功能的影响。**结果** 山楂总黄酮对大鼠离体血管具有浓度依赖性地舒张作用, 还可浓度依赖性地抑制苯肾上腺素、CaCl₂引起的血管收缩, 对无钙液中肾上腺素引起的血管收缩也有抑制作用。非选择性钾通道抑制剂、内向整流钾通道抑制剂可部分阻断山楂总黄酮引起的血管舒张作用。**结论** 山楂总黄酮对大鼠离体血管具有舒张作用, 该作用主要是通过抑制细胞外 Ca²⁺内流, 抑制细胞内贮 Ca²⁺释放, 以及激活非选择性钾通道和内向整流钾通道来实现的。

关键词: 山楂总黄酮; 血管舒张; 胸主动脉环

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)07-0614-04

Effects and Mechanisms of Hawthorn Flavonoids on Vessel Function in Isolated Rat Aortic Rings

JIANG Jianfang¹, SHEN Xiaolan², ZHANG Ning³ (1. Hangzhou Third People's Hospital, Hangzhou 310009, China; 2. Department of Drug-Analysis, The Second Military Medical University, Shanghai 210000, China; 3. Department of Drug and Equipment, Shanghai Xuhui Center Hospital, Shanghai 210000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects and mechanisms of hawthorn flavonoids on vessel function in isolated rat aortic ring. **METHODS** To observe the effect of hawthorn flavonoids on isolated rat vascular diastolic and systolic function by building isolated rat vascular perfusion model. **RESULTS** Hawthorn flavonoids produced a dose-dependent vasodilation with or without endothelium. Pre-incubation with hawthorn flavonoids could inhibit vessel contraction induced by phenylephrine in a concentration-dependent way. Hawthorn flavonoids inhibited phenylephrine-induced and CaCl₂-induced vasoconstriction in Ca²⁺-free medium. Pre-incubation with tetraethylammonium, a non-selective K⁺ channel blocker, and BaCl₂, an inward rectifier K⁺ channel blocker, partially antagonized the relaxation response induced by hawthorn flavonoids. **CONCLUSION** Hawthorn

作者简介: 姜建芳, 女, 主管药师

Tel: (0571)87823166

E-mail: jjf2000_2@yahoo.com.cn

flavonoids shows a endothelium-independent effect in isolated rat thoracic aortae mainly through blocking calcium influx and inhibiting intracellular calcium release, as well as opening non-selective K^+ channel and inward rectifier K^+ channel in the vascular smooth muscle cells.

KEY WORDS: hawthorn flavonoid; vasodilation; thoracic aortic ring

山楂是蔷薇科山楂属植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br 或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实, 具有消食化积、活血化瘀的功效。山楂中含有大量黄酮类成分, 主要有金丝桃苷、芦丁、槲皮素、牡荆素等^[1]。在欧洲, 山楂提取物广泛用于心衰、心绞痛、高血压的治疗。现代药理学研究表明, 山楂总黄酮具有强心^[2]、抗心律失常^[3]、降血脂^[4]和抗氧化^[5]等活性, 但其作用机制尚不十分明确。闵清等^[6]证实山楂总黄酮对异丙肾上腺素诱发的心肌缺血大鼠有保护作用。本研究观察山楂总黄酮对大鼠离体血管功能的影响, 并探讨其可能的作用机制, 为临床更好地应用山楂总黄酮预防和治疗相关疾病提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠, ♀ ♂ 各半, 实验动物质量合格证号: 0047093, 由上海西普尔-必凯试验动物有限公司提供, 体重 250~300 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 温暖通风条件下普通饲料喂养。

1.2 药品和试剂

山楂总黄酮提取物由第二军医大学药学院提供; 苯肾上腺素(phenylephrine, PE)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)、四乙胺(tetraethylammonium, TEA)、蜂毒明肽(Apamin)、Iberiotoxin、 $BaCl_2$ 、格列苯脲均购自美国 Sigma 公司。

1.3 仪器

MPA2000 多导生理记录仪由上海奥尔科特生物科技有限公司生产。

2 实验方法

2.1 血管环的制备

健康 SD 大鼠腹腔注射 10%水合氯醛 300 $mg \cdot kg^{-1}$ 麻醉, 剪开胸腔, 迅速游离胸主动脉, 置于 Krebs-Henseleit (K-H) 缓冲液中漂洗。小心剪除血管周围的脂肪和结缔组织, 将主动脉剪成 2~3 mm 的血管环。用 2 个不锈钢钩子将血管环悬挂于预置 10 mL K-H 缓冲液的浴槽内, 钩子一端固定, 另一端通过张力换能器连接 MPA2000 多导生理记录仪。K-H 液中持续通以含 95% O_2 、5% CO_2 的混

合气体, 保持温度为 37 $^{\circ}C$ 。调节其基础张力至 2.0 g, 使血管环平衡 60 min, 期间每 15 min 换 1 次 K-H 液。在去内皮实验中用聚乙烯塑料管(型号 PE50)轻轻穿入血管, 在湿润的纱布上轻轻挤压旋转数次使血管机械去除内皮, 然后采用上述方法将血管环悬挂于浴槽内进行实验。

用高钾溶液(含 60 $mmol \cdot L^{-1}$ KCl)刺激血管收缩, 用 K-H 液冲洗 2~3 次; 待血管重新稳定后, 以高钾溶液再次刺激血管诱发血管的最大收缩, 持续 15~20 min 后冲洗 2~3 次。待血管环重新稳定后, 用 1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 苯肾上腺素(PE)收缩血管环达峰值, 加入乙酰胆碱(10 $\mu mol \cdot L^{-1}$), 通过血管舒张的程度检验血管内皮完整性, 舒张率>80%认为内皮完整。用 1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ PE 收缩血管环达峰值, 加入硝普钠(1 $\mu mol \cdot L^{-1}$), 检验血管平滑肌舒张功能。

2.2 山楂总黄酮对 PE 预收缩血管的作用

内皮完整和去内皮的血管环平衡后, 用 1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ PE 收缩血管环达到平台, 稳定后加入累积浓度的山楂总黄酮(0.3~3 $mg \cdot L^{-1}$), 观察山楂总黄酮对 PE 预收缩的血管的作用。

2.3 山楂总黄酮对 PE 引起的血管收缩作用的影响

去内皮的血管平衡后, 用不同浓度的山楂总黄酮(0.3, 1 和 3 $mg \cdot L^{-1}$)和空白对照(相同体积的溶剂)孵育 15 min, 加入累积浓度的 PE(1 $nmol \cdot L^{-1}$ ~100 $\mu mol \cdot L^{-1}$), 观察山楂总黄酮对累积浓度的 PE 引起的血管环收缩作用的影响。

2.4 山楂总黄酮对 $CaCl_2$ 引起的血管收缩作用的影响

去内皮的血管平衡后, 以无钙液(含 EGTA 1 $mmol \cdot L^{-1}$)预处理血管环 1 min, 用 1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的 PE 收缩血管 60 min 后, 以无钙液(无 EGTA, KCl 浓度为 30 $mmol \cdot L^{-1}$)冲洗血管环 20 min, 再用不同浓度山楂总黄酮(0.3, 1 和 3 $mg \cdot L^{-1}$)和空白对照孵育 30 min 后, 加入累积浓度的 $CaCl_2$ (0~2.5 $mmol \cdot L^{-1}$)使血管收缩, 观察山楂总黄酮对 $CaCl_2$ (0~2.5 $mmol \cdot L^{-1}$)引起的血管环收缩作用的影响。

2.5 山楂总黄酮对 PE 敏感的细胞内贮 Ca^{2+} 释放的影响

去内皮的血管平衡后, 以无钙液(含 EGTA 1

mmol·L⁻¹)预处理去内皮的血管环 1 min, 不同浓度山楂总黄酮(0.3, 1 和 3 mg·L⁻¹)和空白对照预孵 15 min 后, 加入累积浓度的 PE(1 nmol·L⁻¹~100 μmol·L⁻¹), 观察山楂总黄酮在无钙液中对累积浓度 PE 引起的血管环收缩的影响。

2.6 不同拮抗剂预处理对山楂总黄酮血管舒张作用的影响

分别用非选择性钾通道抑制剂 TEA(10 mmol·L⁻¹)、大电导钙敏感钾通道(BK_{Ca})抑制剂 Iberiotoxin (0.1 μmol·L⁻¹)、内向整流钾通道(K_{IR})抑制剂 BaCl₂ (30 μmol·L⁻¹)、小电导钙敏感性钾通道(SK_{Ca})抑制剂 Apamin (0.1 μmol·L⁻¹)、ATP 敏感性钾通道(K_{ATP})抑制剂格列苯脲(3 μmol·L⁻¹)、以及空白对照孵育 10 min 后, 加入 1 μmol·L⁻¹ PE 使血管收缩达到平台, 分别加入山楂总黄酮 3 mg·L⁻¹, 观察不同亚型的钾通道抑制剂对山楂总黄酮舒张血管作用的影响。

2.7 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 Student's 非配对 *t* 检验, 多组间比较采用 ANOVA, *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 山楂总黄酮对 PE 预收缩血管的影响

山楂总黄酮对 PE 预收缩的去内皮和有内皮的血管均具有舒张作用, 并呈浓度依赖性。去内皮和有内皮的血管两组之间差异无统计学意义, 说明山楂总黄酮对血管的舒张作用不依赖于血管内皮。结果见图 1。

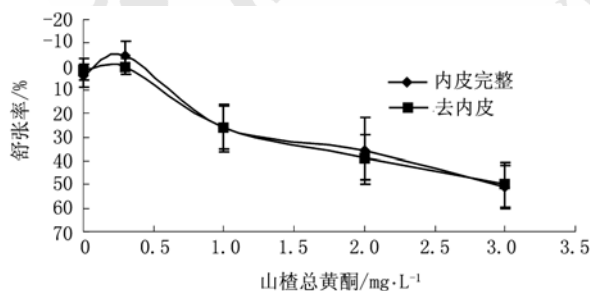


图 1 山楂总黄酮对内皮完整和去内皮的血管的舒张作用
Fig 1 The vasodilation of hawthorn flavonoids in complete endothelial vessels and endothelium-depriving vessels

3.2 山楂总黄酮对 PE 引起的血管收缩作用的影响

预先用不同浓度的山楂总黄酮(空白对照, 0.3, 1 和 3 mg·L⁻¹)孵育, 可浓度依赖性地抑制 PE 诱发的去内皮主动脉血管环的收缩, 最大收缩率分别为(94.2±4.25)%, (81.8±6.76)%, (52±8.34)%

和(10.1±4.44)%。与对照组相比, 中、高剂量山楂总黄酮(1 和 3 mg·L⁻¹)可显著抑制 PE 诱发的血管环收缩(*P*<0.01)。结果见图 2。

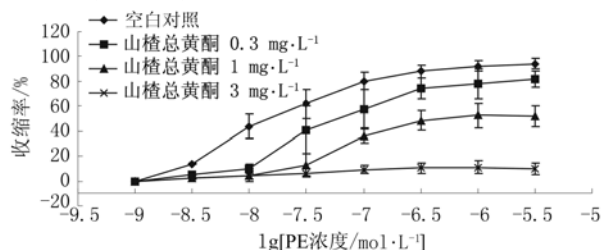


图 2 山楂总黄酮对 PE 引起的血管收缩的影响

Fig 2 Effect of hawthorn flavonoids on vasoconstriction induced by PE

3.3 山楂总黄酮对 CaCl₂ 引起的血管收缩作用的影响

山楂总黄酮可浓度依赖性的抑制 CaCl₂ 引起的血管收缩。结果见图 3。

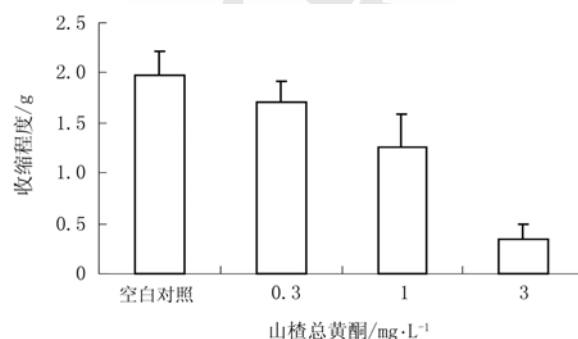


图 3 山楂总黄酮对 CaCl₂ 引起的去内皮血管的收缩的影响

Fig 3 Effect of hawthorn flavonoids on vasoconstriction of endothelial vascular by CaCl₂

3.4 山楂总黄酮对 PE 敏感的细胞内贮 Ca²⁺ 释放的影响

山楂总黄酮可浓度依赖性的抑制无钙液中 PE 引起的血管收缩, 说明山楂总黄酮可抑制 PE 敏感的细胞内贮 Ca²⁺ 释放。结果见图 4。

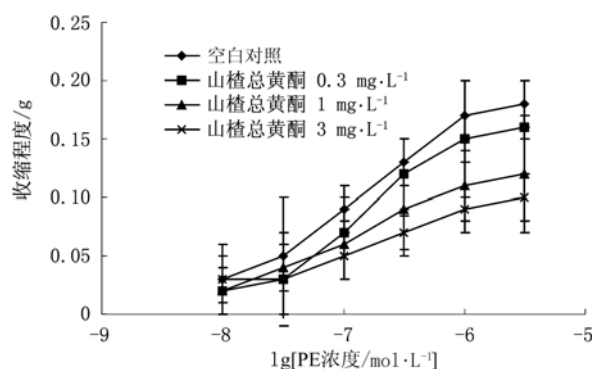


图 4 山楂总黄酮对 PE 敏感的细胞内贮 Ca²⁺ 释放的影响

Fig 4 Effect of hawthorn flavonoids to PE sensitive Ca²⁺ release intracellular storage

3.5 不同钾通道抑制剂预处理对山楂总黄酮引起的血管舒张作用的影响

非选择性钾通道抑制剂 TEA 和 K_{IR} 抑制剂 $BaCl_2$ 可部分阻断山楂总黄酮诱导的血管舒张 ($P<0.05$), 而 SK_{Ca} 抑制剂 Apamin、 BK_{Ca} 抑制剂 Iberitoxin 及 K_{ATP} 抑制剂格列苯脲对山楂总黄酮诱导的血管舒张均无影响。结果见图 5。

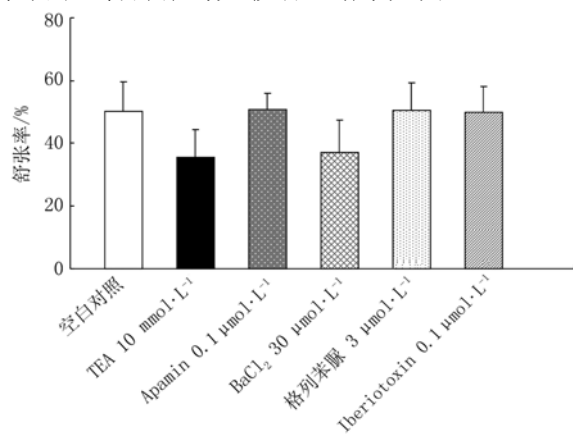


图 5 不同 K^+ 通道抑制剂对山楂总黄酮 ($3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 舒张血管作用的影响

Fig 5 Effect of hawthorn flavonoids ($3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) on vasodilation with different K^+ channel inhibitors

4 讨论

本研究表明, 山楂总黄酮对内皮完整和去内皮的血管环均具有舒张作用, 提示其舒张血管的作用不依赖于内皮。

PE 诱导的血管收缩一方面通过作用于 α_1 肾上腺素受体, 激活磷脂酶 C, 产生三磷酸肌醇, 刺激平滑肌细胞内贮钙的释放; 另一方面, 通过激活细胞膜上的受体操纵性钙通道和磷酸化电压依赖性钙通道使细胞外钙内流^[7]。因此, PE 通过细胞内游离钙浓度的增加而使血管收缩。

血管在预加入 EGTA 的无钙 K-H 液中孵育后, 再加入 PE, 此时引起的血管收缩是通过磷酸肌醇途径, 使内质网贮存的 Ca^{2+} 释放引起的^[8]。本实验中, 山楂总黄酮可浓度依赖性的抑制无钙液中 PE 引起的血管收缩, 说明山楂总黄酮可抑制细胞内贮 Ca^{2+} 的释放。血管在预加入高浓度 K^+ 的无钙 K-H 液中孵育, 此时细胞膜处于除极状态, 电压依赖性钙通道处于活化状态, 再加入 CaCl_2 , 此时所引起的血管收缩主要是细胞外 Ca^{2+} 内流引起的^[9]。本实验观察到, 在此条件下, 山楂总黄酮能抑制 CaCl_2

引起的血管收缩, 说明山楂总黄酮具有抑制细胞外 Ca^{2+} 流入细胞内的作用。

直接激活血管平滑肌细胞上的钾通道可使细胞膜超极化, 抑制 Ca^{2+} 通过电压依赖性钙通道进入细胞内, 从而抑制血管收缩^[10]。从本实验可以看出, 非选择性钾通道抑制剂 TEA 和 K_{IR} 抑制剂 $BaCl_2$ 可部分阻断山楂总黄酮引起的血管舒张作用, 而 BK_{Ca} 抑制剂 Iberitoxin、 SK_{Ca} 抑制剂 Apamin、 K_{ATP} 抑制剂格列苯脲对山楂总黄酮引起的血管舒张无影响。说明山楂总黄酮引起的血管舒张有一部分是通过激活非选择性钾通道和内向整流钾通道而实现的。

综上所述, 山楂总黄酮对大鼠离体血管具有舒张作用, 该作用不依赖于血管内皮, 主要通过通过抑制细胞外 Ca^{2+} 内流, 抑制细胞内贮 Ca^{2+} 释放, 以及激活非选择性钾通道和内向整流钾通道来实现。

REFERENCES

- [1] CHANG Q, ZUO Z, HARRISON F, et al. Hawthorn [J]. J Clin Pharmacol, 2002, 42(6): 605-612.
- [2] AWANG D V C, FUGH-BERMAN A. Herbal interactions with cardiovascular drugs [J]. J Cardiovasc Nurs, 2002, 16(4): 64-70.
- [3] MUELLER A, LINKE W, ZHAO Y, et al. Crataegus extract prolongs action potential duration in guinea-pig papillary muscle [J]. Phytomedicine, 1996, 3(3): 257-261.
- [4] ZHANG Z, HO W K K, HUANG Y, et al. Hawthorn fruit is hypolipidemic in rabbits fed a high cholesterol diet [J]. J Nutr, 2002, 132(1): 5-10.
- [5] ZHANG Z, CHANG Q, ZHU M, et al. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits [J]. J Nutr Biochem, 2001, 12(3): 144-152.
- [6] MIN Q, BAI Y T, YU W, et al. Protective effect and the mechanisms of Crataegi Folium Flavonoids on myocardial ischemia in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2011, 28(2): 95-99.
- [7] BOLTON T B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle [J]. Physiol Rev, 1979, 59(3): 606-718.
- [8] NOGUERA M A, D'OCON M P. Different and common intracellular calcium-stores mobilized by noradrenaline and caffeine in vascular smooth muscle [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 1992, 345(3): 333-341.
- [9] ZHANG C, WANG X H, ZHONG M F, et al. Mechanisms underlying vasorelaxant action of astragaloside IV in isolated rat aortic rings [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007, 34(5/6): 387-392.
- [10] JACKSON W F. Potassium channels in the peripheral microcirculation [J]. Microcirculation, 2005, 12(1): 113-127.

收稿日期: 2011-03-14