

霉茶黄酮对大鼠离体胸主动脉环的影响

王桂红¹, 曾晶², 田先翔^{2,3}, 谭永霞^{2,3}, 吴勇², 朱珺², 郑国华^{2,3*}

¹湖北中医药大学国医堂, 武汉 430061; ²湖北中医药大学药学院;

³湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065

摘要:用离体大鼠胸主动脉血管环为研究对象, 经生物信号采集系统采集并分析血管环张力变化, 观察霉茶总黄酮、二氢杨梅素、杨梅素对静息血管的影响以及它们对去甲肾上腺素(NA)所致的缩血管反应的影响。研究发现霉茶总黄酮、二氢杨梅素、杨梅素均可浓度依赖性增加血管环静息张力; 霉茶总黄酮能使 NA 缩血管的量-效曲线非平行右移并降低其效能(E_{max}); 二氢杨梅素、二氢杨梅素与杨梅素的混合物有与霉茶总黄酮相似的效应; 二氢杨梅素与杨梅素合用使 NA 收缩血管的 E_{max} 降低, 明显强于二者单独使用; 当二氢杨梅素与杨梅素浓度比为 10:1 时, 拮抗 NA 缩血管的效应最佳。结果显示霉茶总黄酮对静息血管有剂量依赖性收缩作用但能明显拮抗 NA 缩血管效应, 二氢杨梅素与杨梅素对 NA 诱导血管收缩反应有协同增效作用且最佳协同比例为 10:1。

关键词:霉茶总黄酮; 二氢杨梅素; 杨梅素; 胸主动脉环

中图分类号: R932

文献标识码: A

Effect of *Ampelopsis megalophylla* Flavonoids on Thoracic Aorta Rings of Rats

WANG Gui-hong¹, ZENG Jing², TIAN Xian-xiang^{2,3}, TAN Yong-xia^{2,3}, WU Yong², ZHU Huan², ZHENG Guo-hua^{2,3*}

¹Hubei University of Chinese Medicine GuoYi Hall, Wuhan 430061, China; ²Hubei University of Chinese Medicine Pharmacy

Faculty; ³Hubei University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Chinese Medicine Resource

and Compound Prescription, Ministry of Education, Wuhan 430065, China

Abstract: To study the effect of total flavonoids of *Ampelopsis megalophylla*, dihydromyricetin and myricetin on thoracic aorta rings of rats, a biological signal collection and analytical system was applied to observe the tension of resting thoracic aorta rings and the dose-effect curve of the contractile response induced by noradrenaline (NA). The results showed that *A. megalophylla* flavonoids, dihydromyricetin and myricetin can increase the tension of resting thoracic aorta rings in a dose-dependent manner. The total flavonoids of *A. megalophylla* shifted the dose-effect curve of the contractile response induced by NA to the right and decreased their maximal efficiency (E_{max}). The similar effects were also observed in dihydromyricetin and the mixture of dihydromyricetin and myricetin, wherein the mixture lowered much more E_{max} than either of the two isolets applied individually. In particular, the mixture comprising of dihydromyricetin and myricetin with concentration ratio of 10:1 showed better effect. In conclusion, flavonoids of *A. megalophylla* induced dose-dependent contraction in isolated thoracic aorta rings in rats and can significantly noncompetitively antagonize NA induced contraction of rat aortic rings. In addition, dihydromyricetin and myricetin synergistically antagonize NA induced contraction of vascular rings with optimal ratio of 10:1.

Key words: flavonoids of *Ampelopsis megalophylla*; dihydromyricetin; myricetin; thoracic aorta rings

霉茶收载于《湖北中草药志》, 其原植物为葡萄科蛇葡萄属大叶蛇葡萄 (*Ampelopsis megalophylla* Diels et. Gilg), 民间于夏季采摘其嫩枝叶, 置沸水中稍烫一下, 即时捞起, 沥干水分, 摊放于通风处吹干, 至表面出现星点白霜时即可烘干收藏, 称为霉

茶^[1]。霉茶总黄酮为霉茶茎叶乙酸乙酯部位的主要提取物, 其黄酮类化合物主要成分有二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷、槲皮素、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷等^[2,3]。有整体动物实验研究表明, 霉茶总黄酮有降压作用, 对心脏有保护作用^[4], 但对其具体成分作用的研究, 以及其血管的作用研究较少。本试验初步探讨了霉茶总黄酮及其主要成分对离体大鼠胸主动脉环的作用, 现将研究结果报道如下。

1 仪器与材料

1.1 仪器

生物信号采集系统(BL-420F,成都泰盟)、超级恒温器(HW-1000,成都泰盟)、肌张力换能器(JH-2,5 g,北京航天)、离体组织器官恒温灌流系统(HV-4,成都泰盟)、pH计(PHS-3C,上海精密科学仪器有限公司)、电子天平(FA2104N,上海菁海仪器有限公司)、微量移液器。

1.2 药物与试剂

霉茶总黄酮由湖北中医药大学中药药剂研究室提供,从大叶蛇葡萄[产于湖北恩施地区,经湖北中医药大学药学教研室陈科力教授鉴定为葡萄科蛇葡萄属植物大叶蛇葡萄(*Ampelopsis megalophylla* Diels et. Gilg)的干燥茎叶]提取,其制备过程为霉茶粉末,乙醇提取,加入壳聚糖醋酸,上大孔树脂柱,70%乙醇洗脱,干燥,粉碎过80目筛,得霉茶总黄酮粉末。其中总黄酮含量为71.45%,二氢杨梅素含量为61.82%,杨梅素含量为5.29%。二氢杨梅素标准品、杨梅素标准品(均为上海融禾医药有限公司,纯度达98%以上),去甲肾上腺素注射液(NA,上海禾丰制药有限公司,批号:121203),其他化学试剂均为化学纯,K-H液(mmol/L,NaCl 118,KCl 4.7,CaCl₂ 2.5,KH₂PO₄ 1.2,MgSO₄ 1.2,NaHCO₃ 25.0,Glucose 11.1,pH 7.40,临用现配)。

1.3 动物

雄性SD大鼠30只,体重180~200 g,7周龄,湖北省实验动物研究中心提供,许可证号SCXK(鄂)2008-0005。

2 实验方法

2.1 血管环的制备

大鼠脱颈椎处死,迅速取胸主动脉,置于4℃通以95% O₂+5% CO₂混合氧的K-H液中,小心去除血管周围脂肪组织和筋膜,将血管剪成约3~4 mm宽的血管环,避免过度牵拉,保证血管内皮的完整性。将血管环放入含37℃ K-H液的浴槽内,持续通以混合氧,将静息张力调至2.0 g,平衡2 h,期间每15 min换液一次。用多通道生物信号采集系统实时记录血管张力,所用药物的浓度均以浴槽内最终浓度计。

2.2 霉茶总黄酮、二氢杨梅素、杨梅素对大鼠胸主动脉环静息张力的影响

血管环经平衡稳定后,按累计加样法加入不同

浓度的霉茶总黄酮(3×10^{-4} 、 9×10^{-4} 、 3×10^{-3} 、 9×10^{-3} 、 3×10^{-2} 、 9×10^{-2} mg/mL),加药间隔为6 min,记录血管张力变化。二氢杨梅素、杨梅素加样方法同霉茶总黄酮,其浓度为霉茶总黄酮中所含质量浓度。

2.3 霉茶总黄酮对NA缩血管反应的影响

每条血管环首先测不同浓度NA的缩血管效应,制作NA的剂量-效应曲线。浴槽中NA的浓度为1 nmol/L的1、3、10、30、100、300、1000……的倍数依次给药,记录各浓度下NA收缩胸主动脉环的幅度,直至增加剂量而胸主动脉环收缩不再增强为止,以此反应幅度作为100%效应(E_{max}),并以该量效曲线为对照曲线。然后用K-H液换液,冲洗血管环,待血管环恢复到初始张力后,平衡30 min,向浴槽内分别加入霉茶总黄酮(63、126、315 mg/L)孵育40 min,按照上述方法记录加入不同浓度NA后血管环张力的变化,分别求出给药前后NA各浓度的反应百分率。加入等容量K-H液为空白对照。

2.4 二氢杨梅素、杨梅素及二者合用对NA缩血管反应的影响

分别配制与126 mg/L霉茶总黄酮中所含相同质量浓度二氢杨梅素(77.8 mg/L)、杨梅素(7.6 mg/L)及两者合用的标准品溶液。实验方法同2.3,观察霉茶总黄酮、二氢杨梅素、杨梅素单独使用及两者合用时对离体血管的作用。

2.5 二氢杨梅素、杨梅素不同配伍比例对NA缩血管反应的影响

分别配制1:1.5:1、10:1(原比)、20:1二氢杨梅素、杨梅素标准品混合溶液。实验方法同2.3,观察比较不同配伍比例的二氢杨梅素、杨梅素对离体血管的作用,确定最佳配伍比例。

2.6 数据统计

利用SPSS 19软件对实验数据进行统计学分析。各组的最大反应率结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 实验结果

3.1 对大鼠胸主动脉环静息张力的影响

累计加入霉茶总黄酮、二氢杨梅素、杨梅素均能使血管环张力呈浓度依赖性升高(图1A)。在等生药浓度下二氢杨梅素收缩血管环作用最为明显,且强于霉茶总黄酮对血管环作用(图1B),二者引起血管环静息张力变化有显著统计学差异。

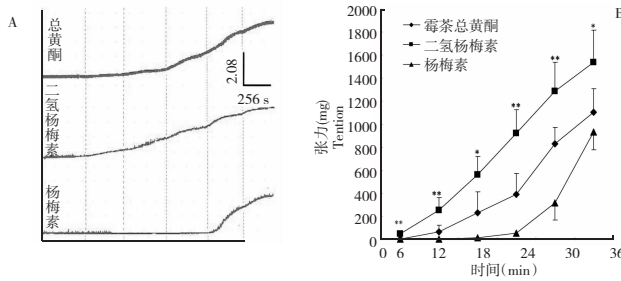


图1 霉茶总黄酮、二氢杨梅素、杨梅素对大鼠胸主动脉环静息张力的影响 (n=6)

Fig. 1 Effect of *A. megalophylla* flavonoids, dihydromyricetin and myricetin on basic tension of rat thoracic aorta rings (n=6) 与总黄酮相比, * P<0.05, ** P<0.01. A: 霉茶总黄酮、二氢杨梅素、杨梅素对静息状态血管张力作用的实验记录; B: 霉茶总黄酮、二氢杨梅素、杨梅素对静息状态血管张力的量效曲线。

Note: compared with total flavonoid, * P<0.05, ** P<0.01. A: Records from experiments illustrating the effect of increasing dose of *A. megalophylla* flavonoids, dihydromyricetin and myricetin on the aorta rings; B: Pooled data of mean normalized vessel tension obtained from dose response curves of *A. megalophylla* flavonoids, dihydromyricetin and myricetin on the aorta rings.

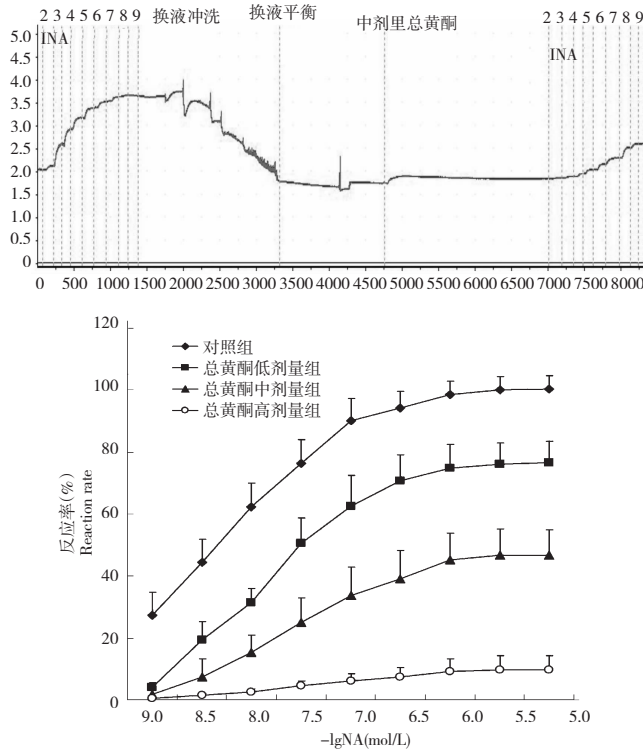


图2 霉茶总黄酮对 NA 缩血管反应的作用 (n=6)

Fig. 2 Dose-effect curve showing the effect of total flavonoids of *A. megalophylla* on NA-induced vasoconstriction (n=6)

A: 中剂量霉茶总黄酮对 NA 缩血管反应作用的实验记录; B: 霉茶总黄酮对 NA 缩血管量效曲线的影响
A: Records from experiments illustrating the effect of flavonoids of *A. megalophylla* (126 mg/L) on the NA-induced vasoconstriction of rat aorta rings;
B: Pooled data of mean vessel tension obtained from NA of dose-effect curve on the aorta rings

3.2 霉茶总黄酮对 NA 缩血管反应的作用

低、中、高剂量的霉茶总黄酮均可使离体血管环 NA 量-效曲线非平行右移, E_{max} 分别降低至 $76.60 \pm 6.89\%$ ($P < 0.01$)、 $46.77 \pm 8.14\%$ ($P < 0.01$)、 $9.61 \pm 4.64\%$ ($P < 0.01$), E_{max} 降低程度随霉茶总黄酮浓

度升高而升高, 显示霉茶总黄酮对 NA 呈非竞争性拮作用, 且存在剂量依赖性(图2)。

3.3 二氢杨梅素、杨梅素及二者合用对 NA 缩血管反应的作用

二氢杨梅素可使 NA 量-效曲线非平行右移,

E_{\max} 降低至 $83.09 \pm 8.23\%$ ($P < 0.01$), 呈非竞争性拮抗作用, 但拮抗程度弱与总黄酮中剂量组 ($P < 0.01$)。杨梅素单独使用 E_{\max} 为 $99.71 \pm 8.76\%$ ($P > 0.05$) 无明显拮抗作用, 但与二氢杨梅素合用后明显可加强二氢杨梅素对 NA 缩血管反应的抑制作用, E_{\max} 降低至 $61.58 \pm 7.13\%$, 与二氢杨梅素组相比差异有显著性 ($P < 0.01$), 显示杨梅素与二氢杨梅素有协同增效作用 (图 3)。

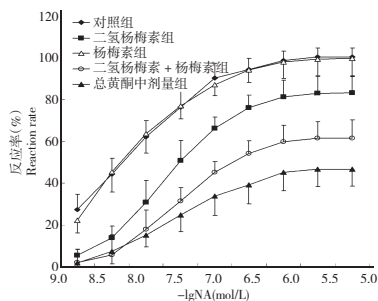


图 3 二氢杨梅素与杨梅素的协同作用 ($n = 6$)

Fig. 3 Pooled data of mean vessel tension obtained from NA of dose-effect curve on the aorta rings by mixture of dihydromyricetin and myricetin ($n = 6$)

3.4 二氢杨梅素、杨梅素不同配伍比例对 NA 缩血管反应的作用

不同混合比例 (1:1、5:1、10:1、20:1) 二氢杨梅素与杨梅素对 NA 收缩血管环的效应呈非竞争性拮抗作用, 拮抗程度不同, 其 E_{\max} 分别为对照的 $82.61 \pm 6.00\%$ 、 $74.74 \pm 8.39\%$ 、 $61.58 \pm 7.13\%$ 、 $81.94 \pm 7.00\%$ (图 4)。研究显示, 霉茶总黄酮中原始比例 (即 10:1) 非竞争性拮抗 NA 的缩血管环作用效果最好。

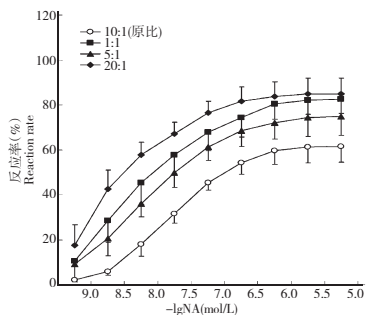


图 4 二氢杨梅素、杨梅素不同比例混合对 NA 量效曲线的影响 ($n = 6$)

Fig. 4 Pooled data of mean vessel tension obtained from NA of dose-effect curve on the aorta rings on the different ratio mixture of dihydromyricetin and myricetin ($n = 6$)

4 讨论

随着黄酮类化合物成为天然植物活性成分的研究热点, 作为民间饮品的霉茶及其总黄酮逐步受到人们的重视。近年来有人认为其黄酮类化合物具有降血糖、降血压、抗肿瘤等作用, 本单位多个课题组开展相关研究, 发现该类化合物有一定的抗高血压作用^[4], 其活性物质及作用靶点成为一个重要的研究热点。

血压是由心输出量和外周血管阻力两个基本因素决定的, 降低外周阻力和/或心输出量可使血压下降。外周血管阻力主要取决于血管管径和血液粘度, 血管管径的大小是由血管收缩和舒张过程共同协调的, 其生理过程十分复杂, 主要是内皮和平滑肌受外源性和内源性物质的刺激引起。血管平滑肌的收缩——舒张受 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 等多种离子活动的调节^[5]。本实验研究表明霉茶总黄酮、二氢杨梅素、杨梅素均可引起血管静息张力剂量依赖性增加, 其结果与杨宝峰等^[6]所做二氢杨梅素收缩离体犬颈动脉环的研究结果一致。后者认为其机制与外钙内流导致细胞内钙浓度升高有关。另有学者通过膜片钳实验, 证实杨梅素可激活 L 型钙通道^[7]。我们的研究表明, 霉茶总黄酮、二氢杨梅素均对 NA 引起血管平滑肌收缩有拮抗作用。NA 为 α 受体激动剂, 以钙活性钙离子释放方式诱发细胞内贮存钙释放, 通过激动受体使受体操纵性 Ca^{2+} 通道 (ROC) 开放引起外钙内流, 前者占优势^[8]。有研究^[9]认为二氢杨梅素能阻断电压依赖的钙通道 (PDC) 和受体激活的钙通道 (ROC), 从而对抗 NA 收缩血管的反应。本实验结果显示: 霉茶总黄酮及其含有的二氢杨梅素对静息状态下的血管有一定的收缩作用, 但对处于收缩状态的血管 (由 NA 激发) 有一定的松弛作用。综合上述分析, 它们的作用机理可能与影响不同的 Ca^{2+} 通道有关。但舒张痉挛的血管可能是其降压作用机制之一。

本研究还发现霉茶总黄酮拮抗 NA 收缩血管作用比二氢杨梅素强, 因此作者推测霉茶总黄酮中除二氢杨梅素外还有其他成分共同起作用。本实验发现二氢杨梅素与杨梅素联合应用拮抗 NA 诱导血管收缩作用强于二者单独应用, 提示二氢杨梅素与杨梅素对拮抗 NA 收缩血管效应有协同增效作用; 且其拮抗 NA 诱导血管收缩的最佳配伍比为 10:1, 这个比例与霉茶总黄酮中比例相当。

综上所述,霉茶总黄酮对血管的作用是多种物质共同作用的结果,其中二氢杨梅素与杨梅素对血管有协同作用,可能是其主要有效成分,这为今后二氢杨梅素、杨梅素配伍的合理性提供了一定的依据,但是二氢杨梅素、杨梅素之间协同作用的具体机制以及相关的信号传导途径还很不明确,尚需进一步探索。

参考文献

- Health Bureau of Hubei Province(湖北省卫生局). Hubei Chinese herbal medicine, second volumes (湖北中草药志·第二册). Wuhan: Hubei people's Publishing House, 1982: 1078.
- Zheng GH(郑国华), Zhang BH(张宝徽), Xu J(许洁). Studies on the chemical constituents of Meicha. *Chin Med Mat(中药材)*, 2006, 29: 1310.
- Zheng GH(郑国华), Yang J(杨娟), Feng QL(冯其麟). Studies on the chemical constituents of Meicha(II). *Chin Med Mat(中药材)*, 2009, 32: 370.
- Wang GH(王桂红), Liu D(刘丹), Jiang JF(姜金凤), et al. Meicha sustained release tablet of renal hypertension in blood pressure and the impact of physical activity. *Chin Arc Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2009, 27: 546.
- Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular issues. *Pharm Rev*, 1995, 47: 387.
- Yang BF(杨宝峰), Niu HL(牛慧莉), Pan ZW(潘振伟), et al. Dihydromyricetin exerted its vasoconstrictive effects by increasing intracellular Ca^{2+} in isolated canine carotid artery. *Chin Pharm Bull(中国药理学通报)*, 2007, 22: 1437.
- Fabio Fusi, Giampietro Sgaragli, Simona Saponara. Mechanism of myricetin stimulation of vascular L-type Ca^{2+} Current. *J Pharm Exp Ther*, 2005, 313: 790.
- Kudoh A, Kudoh E, Katagai H, et al. Nor epinephrine induced inositol 1,4,5-trisphosphate formation in atrial myocytes is regulated by extracellular calcium, protein kinase C, and calmodulin. *Jpn Heart J*, 2003, 44: 547.
- Liu YZ(刘英姿), Yang YX(杨迎欣), Zhou XX(周雪仙). Study on calcium channel blocking effect of Dihydromyricetin on isolated rabbit aortic strips. *Hunan Guiding J TCMP(湖南中医药导报)*, 2002, 1: 686.
- Yu X, Wang W, Yang M. Antioxidant activities of compounds isolated from *Dalbergia odorifera* T. Chen and their inhibition effects on the decrease of glutathione level of rat lens induced by UV irradiation. *Food Chem*, 2007, 104: 715-720.
- Wang W, Weng X, Cheng D. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *Food Chem*, 2000, 71: 45-49.
- Im NK, Choi JY, Oh H, et al. 6,4'-dihydroxy-7-methoxyflavanone inhibits osteoclast differentiation and function. *Bio Pharm Bull*, 2013, 36: 796-801.
- Liu RX(刘荣霞). Studies on the quality control and metabolism of *Dalbergia Odorifera*. Shenyang Pharmaceutical University(沈阳药科大学), PhD. 2005.
- Piccinelli AL, Campo Fernandez M, Cuesta-Rubio O, et al. Isoflavonoids isolated from *Cuban propolis*. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 9010-9016.
- Chen D, Song Y L, Nie C X, et al. Chemical constituents from *Aquilaria sinensis*(Lour.) Gilg. *J Chin Pharm Sci*, 2012, 21: 88-92.
- Ogata T, Yahara S, Hisatsune R, et al. Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera* II. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38: 2750-2755.
- Lotti C, Campo Fernandez M, Piccinelli AL, et al. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 2209-2213.
- Ellman GL, Courtney KD, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7: 88-95.

(上接第 859 页)