

苗药黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位对离体蛙心功能的影响[△]

杨婉珠^{1*}, 刘育辰^{1#}, 杨虹^{1,2}, 刘刚¹, 王迪¹(1.贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2.贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)19-2650-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.19.12

摘要 目的:研究黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位对离体蛙心功能的影响,并对其可能的作用机制进行初步考察。方法:采用斯氏蛙心插管法制备离体蛙心标本,分别用任氏液(空白对照)和质量浓度为1.74、3.48 mg/mL的黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位进行灌流,用BL-420生物机能实验系统记录离体心脏的心率和心肌收缩力变化,以考察黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位对离体蛙心功能的影响。先分别用10 mg/L的阿托品、异丙肾上腺素20 μL或1 μL低钙(每1 000 mL纯水中含CaCl₂ 0.06 g)、高钙(每1 000 mL纯水中含CaCl₂ 0.24 g)任氏液进行灌流,然后再分别加入1.74 mg/mL的黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位,用BL-420生物机能实验系统记录离体心脏的心肌收缩力变化;并取用任氏液(空白对照)和质量浓度为1.74、3.48 mg/mL的黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位灌流后的心肌组织,测定其中Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶和乙酰胆碱酯酶(AChE)活性,以考察黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位影响心脏功能的可能作用机制。结果:加入质量浓度为1.74、3.48 mg/mL黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位后,蛙心的心肌平均收缩力较空白对照明显降低($P < 0.001$),但心率的变化不明显($P > 0.05$)。随着细胞外Ca²⁺浓度的逐渐增大,黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位对离体蛙心收缩的抑制作用也逐渐增大;加入阿托品、异丙肾上腺素后,黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位对离体蛙心收缩的抑制作用有所降低;经过1.74、3.48 mg/mL黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位灌流后的蛙心心肌组织中Na⁺-K⁺-ATP酶活性较空白对照改变不明显($P > 0.05$),但Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性明显升高($P < 0.05$)、AChE活性明显降低($P < 0.05$)。结论:黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位可抑制离体蛙心的收缩活动,具有一定的负性肌力作用;其作用机制可能与提高心肌组织中Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性,抑制AChE活性,同时阻断细胞膜上Ca²⁺通道,兴奋M受体和阻断β受体有关。

关键词 苗药;黑骨藤醇提物;乙酸乙酯部位;离体蛙心;心肌收缩力

Effects of Ethyl Acetate Part from Ethanol Extract of Miao Medicine *Periploca forrestii* on Cardiac Function of Isolated Frog Heart

YANG Wanzhu¹, LIU Yuchen¹, YANG Hong^{1, 2}, LIU Gang¹, WANG Di¹ (1.College of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China; 2.College of Basic Medicine, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of ethyl acetate part from the ethanol extract of *Periploca forrestii* on cardiac function of isolated frog heart, and to primarily investigate its potential mechanism. METHODS: The isolated frog heart samples were prepared by using the intube method of steinmann. The Ren's solution (blank control), 1.70 mg/mL and 3.48 mg/mL ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* were used to perfuse the sample. The BL-420 biological function experimental system was used to record the changes in heart rate and myocardial contractility. The effects of ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* on cardiac function of isolated frog heart were investigated. After perfused with 10 mg/L atropine, 20 μL isoproterenol, 1 μL low calcium (per 1 000 mL pure water contain 0.06 g CaCl₂), high calcium Ren's solution (per 1 000 mL pure water contain 0.24 g CaCl₂), adding 1.74 mg/mL ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii*, the changes of myocardial contractility in isolated hearts were recorded by BL-420 biological function experimental system. Myocardial tissue was collected after perfused with Ren's solution (blank control) and ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* with 1.74 and 3.48 mg/mL. The activity of Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase and AChE were detected to investigate the potential mechanism of the effects of ethyl acetate extract from ethanol extract of *P. forrestii* on cardiac function. RESULTS: Compared with blank control, mean myocardial contractility was significantly decreased ($P < 0.001$) after adding 1.74, 3.48 mg/mL ethyl

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81860700, No.81560618, No.U1812403);贵州省科技厅合作计划项目(No.黔科合LH字[2015]7279号);贵州省科学技术厅-中药现代化科技产业研究开发专项项目(No.黔科合ZY字[2013]3003号);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No.QZYY2017-114);贵州省国内一流建设学科项目(No.黔教研发[2017]85号);贵阳中医学院科研项目(No.贵中医科学院内[2017]90号)

* 硕士研究生。研究方向:中药及民族药化学及中药新药。E-mail:1585443523@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药及民族药资源分类鉴定与质量控制。E-mail:790441561@qq.com

acetate part form ethanol extract of *P. forrestii*, but had no significant on heart rate ($P>0.05$). With the increase of extracellular Ca^{2+} concentration, the inhibitory effect of ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* on isolated frog heart contraction also increased gradually. After adding atropine and isoproterenol, the inhibitory effect of the ethyl acetate part form ethanol extract of *P. forrestii* on isolated frog heart contraction decreased to some certain. The activity of $Na^+-K^+-ATPase$ in cardiac tissue was not significantly changed ($P>0.05$), the activity of $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase$ was significantly increased ($P<0.05$), and the activity of AChE was significantly decreased ($P<0.05$) after perfused with 1.74, 3.48 mg/mL ethyl acetate part form ethanol extract of *P. forrestii*. CONCLUSIONS: The ethyl acetate part from the ethanol extract of *P. forrestii* can inhibit the contractile activity of the isolated frog heart and has a certain negative inotropic effect. The mechanism may be related to the increase of $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase$ activity, inhibition of AChE activity, blocking of calcium channel in the cell membrane, the activation of M receptor and blocking of β receptor.

KEYWORDS Miao medicine; Ethanol extract of *P. forrestii*; Ethyl acetate part; Isolated frog heart; Myocardial contractility

黑骨藤(*Periploca forrestii* Schltr.)为萝藦科植物黑龙骨的干燥根或全株^[1],又名黑龙骨、滇杠柳等,性热,味苦,具有活血、通经、祛风、强心、解毒等作用,主治肢体麻木疼痛、跌打损伤、月经不调等症,苗族民间广泛将其用于治疗闭合性软组织损伤、风湿与类风湿等疾病^[2]。黑骨藤中主要含有强心苷类、C21甾类、多糖类、黄酮类和三萜皂苷类等成分^[3-7]。已有研究表明,黑骨藤有抗类风湿性关节炎、强心以及抗肿瘤等活性^[8-13]。目前,黑骨藤对心脏活性的研究报道极少。本研究拟通过离体蛙心心脏灌流实验,初步探讨黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位对离体蛙心心率和心肌收缩力的影响,并对其作用机制进行初步探讨,以期为苗药黑骨藤在治疗心血管系统疾病中发挥新作用奠定基础,也为黑骨藤的进一步开发利用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

蛙类通用实验器械、肌张力换能器、BL-420生物机能实验系统(四川成都泰盟科技有限公司);FA2204B电子天平(上海天美天平仪器有限公司);SB-4200DTD超声清洗仪(宁波新怡超声设备有限公司);N-1300旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);HH-S2恒温水浴锅(河南金博仪器制造有限公司);L600台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);DNM-9606酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司)。

1.2 药品与试剂

黑骨藤药材于2018年3月购自贵州省贵阳市南明区花果园药材市场,经贵州中医药大学魏升华教授鉴定为萝藦科杠柳属植物黑骨藤(*P. forrestii* Schltr.)的干燥根,药材样品保存于贵州中医药大学植物化学实验室;盐酸异丙肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司,批号:41170303,规格:2 mL:1 mg);硫酸阿托品注射液(河南润弘制药股份有限公司,批号:161001001,规格:1 mL:0.5 mg);乙酰胆碱酯酶(AChE)试剂盒(批号:

20190228)、腺苷三磷酸(ATP)酶试剂盒(批号:20190723)、总蛋白定量试剂盒(批号:20190309)均购自南京建成生物工程研究所;任氏液、低钙任氏液(1 000 mL纯水中含 $CaCl_2$ 0.06 g,其余成分同任氏液)、高钙任氏液(1 000 mL纯水中含 $CaCl_2$ 0.24 g,其余成分同任氏液)由贵州中医药大学基础医学院生理实验室按照标准配方自制;实验所用试剂均为分析纯。

1.3 动物

牛蛙84只,♀♂兼备,体质量300~400 g,精神状态良好,购自贵州中医药大学动物所。

2 方法

2.1 黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位的制备

称取黑骨藤药材粗粉6 kg,按料液比1:8(kg/L)加入70%乙醇加热回流提取3次,每次提取时间为3 h,纱布趁热过滤,合并3次过滤液,在60℃、-0.08 MPa下减压浓缩回收溶剂,得浸膏。将浸膏用温水适量混悬,将混悬液依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、水饱和正丁醇进行萃取,合并相应萃取液,减压浓缩回收溶剂,然后于70℃水浴上蒸干,分别得石油醚(56 g)、氯仿(21.136 g)、乙酸乙酯(85.348 g)、正丁醇(249.068 g)和水(113 g)共5个萃取部位浸膏。取乙酸乙酯部位浸膏适量,加入任氏液,在功率为400 W、频率为40 kHz下超声15 min溶解,制备成所需质量浓度,溶液需用现配。

2.2 动物分组

将84只牛蛙随机分为空白对照组、黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位低剂量组、黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位高剂量组、阿托品+黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位低剂量组、异丙肾上腺素+黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位低剂量组、低钙任氏液+黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位低剂量组、高钙任氏液+黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位低剂量组7个组,每组12只。其中,阿托品的给药浓度为10 mg/L,黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位低、高剂量组的给药浓度分别为1.74、3.48 mg/mL(以浸膏量计,折合生药量分别为0.12、

0.24 g)。

2.3 离体蛙心标本的制备

采用斯式蛙心插管法^[14]。取牛蛙,破坏脑和脊髓,背位固定于蛙板上暴露心脏,在左、右主动脉下穿一线,将心脏翻至头端,在背面结扎前后腔静脉,在左主动脉下穿一线,距动脉圆锥2~3 mm处结扎,再从左右主动脉下方穿一线打活结留作固定插管用。持眼科剪在动脉圆锥前端处向心脏剪一斜口,将盛有任氏液的蛙心插管由此口插入心室腔内,连同近旁血管一起结扎固定,将心脏离体,任氏液反复冲洗心室内余血,至插管内灌流液完全澄清无色,然后保持插管内的灌流液为1 mL,划线作标记。蛙心经蛙心夹和丝线与张力换能器相连,丝线保持垂直。用BL-420生物机能实验系统记录心肌收缩曲线。

2.4 给药

向制备好的各组蛙心插管内均先加入1 mL任氏液,蛙心自主活动,待心肌收缩曲线稳定后,描记收缩曲线,作为各组给药前数据。然后,空白对照组加入100 μ L任氏液,描记5 min收缩曲线,作为给药后数据;黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低、高剂量组分别加入1.74 mg/mL或3.48 mg/mL黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位100 μ L,描记5 min收缩曲线,作为给药后数据;阿托品/异丙肾上腺素+黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组先加入10 mg/L的阿托品或异丙肾上腺素20 μ L,描记5 min收缩曲线,再加入1.74 mg/mL黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位100 μ L,描记5 min收缩曲线,然后加入1.74 mg/mL的黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位100 μ L,描记5 min收缩曲线,作为给药后数据。每次加药前取出等量灌流液,以保证心室外容积固定为1 mL。

2.5 指标检测

2.5.1 心率、心肌平均收缩力 应用BL-420生物机能实验系统记录离体蛙心的心肌收缩曲线,统计每组离体蛙心给药前后的速率、心肌平均收缩力变化,并计算心肌平均收缩力抑制率[心肌平均收缩力抑制率(%)=(给药前心肌平均收缩力-给药后心肌平均收缩力)/给药前心肌平均收缩力 \times 100%]。

2.5.2 心肌Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、AChE活性检测 取空白对照组、黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低、高剂量组蛙的心肌组织,液氮保存。根据测试盒说明书操作,测定组织中蛋白浓度,并检测Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶和AChE活性。

2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0统计学软件进行数据处理分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间酶活性差异采用单因素方差分析和LSD检验,组内给药前后的速率、心肌收缩力变化采用配对 t 检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位对离体蛙心心率、心肌平均收缩力的影响

在任氏液灌流下,往制备好的蛙心套管中加入任氏液后,离体蛙心心率和心肌平均收缩力无明显变化($P > 0.05$)。加入1.74 mg/mL或3.48 mg/mL的黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位后,离体蛙心心率变化不大或略减慢,差异均无统计学意义($P > 0.05$);但心肌收缩曲线呈现典型的下降趋势,心肌平均收缩力明显降低($P < 0.001$),1.74、3.48 mg/mL黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位对离体蛙心的心肌平均收缩力抑制率分别达到47.89%和54.42%。黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位灌流蛙心的心肌收缩曲线见图1~图3,黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位对离体蛙心心率和心肌平均收缩力的影响结果见表1、表2。

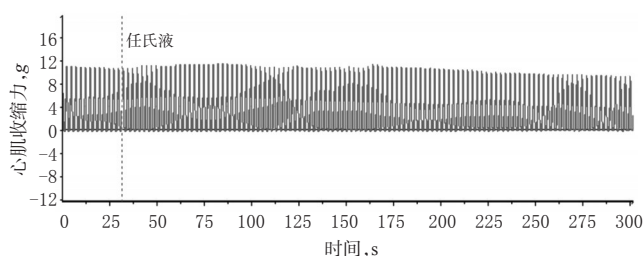


图1 任氏液灌流蛙心的心肌收缩曲线

Fig 1 Myocardial contraction curve of frog heart after perfused with Ren's solution

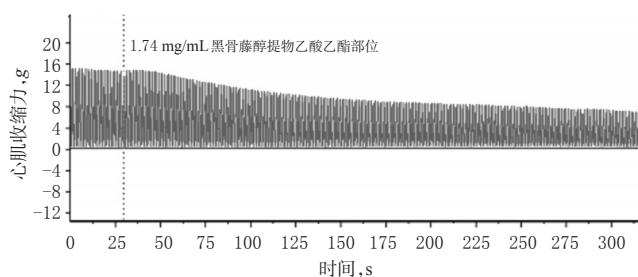


图2 低剂量黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位灌流蛙心的心肌收缩曲线

Fig 2 Myocardium contraction curve of frog heart after perfused with low dose of ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii*

3.2 黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位在阿托品、异丙肾上腺素作用下对离体蛙心心肌平均收缩力的影响

在任氏液灌流下,加入阿托品后,离体蛙心的心肌平均收缩力无明显变化($P > 0.05$);之后再加入1.74 mg/mL的黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位,离体蛙心的心肌平均收缩力明显降低($P < 0.001$),其对心肌平均收缩力的抑制率为35.60%。在任氏液灌流下,加入异丙肾上腺素后,离体蛙心的心肌平均收缩力显著升高($P < 0.05$);之后再加入1.74 mg/mL的黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位,离体蛙心的心肌平均收缩力又显著降低($P <$

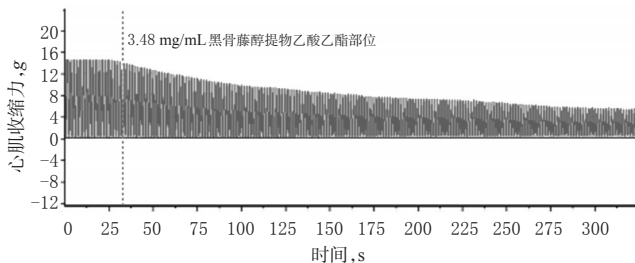


图3 高剂量黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位灌流蛙心的心肌收缩曲线

Fig 3 Myocardium contraction curve of frog heart after perfused with high dose ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii*

表1 黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位对离体蛙心心率的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 1 Effects of ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* on heart rate of isolated frog heart ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	萃取物质量浓度, mg/mL	心率, 次/min	
		给药前	给药后
空白对照组		30.2 ± 7.1	30.0 ± 7.0
黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组	1.74	33.3 ± 13.3	33.3 ± 11.9
黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位高剂量组	3.48	29.8 ± 12.3	30.1 ± 12.8

表2 黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位对离体蛙心心肌平均收缩力的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 2 Effects of ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* on the average contractile force of isolated frog heart ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	萃取物质量浓度, mg/mL	心肌平均收缩力, g		抑制率, %
		给药前	给药后	
空白对照组		3.16 ± 0.75	2.85 ± 0.70	
黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组	1.74	3.68 ± 2.27	1.68 ± 1.12***	47.89
黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位高剂量组	3.48	3.14 ± 2.07	1.64 ± 1.33***	54.42

注:与给药前比较, *** $P < 0.001$

Note: vs. before administration, *** $P < 0.001$

0.01), 其对心肌平均收缩力的抑制率为35.72%。而仅加入1.74 mg/mL的黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位, 其对离体蛙心心肌平均收缩力的抑制率为47.89%。通过以上三组对比发现, 加入阿托品或异丙肾上腺素后, 再加入1.74 mg/mL的黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位对离体蛙心心肌平均收缩力的抑制率, 与仅加入1.74 mg/mL的黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位相比均明显降低。低剂量黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位在阿托品/异丙肾上腺素作用下灌流蛙心的心肌收缩曲线见图4、图5, 心肌平均收缩力测定结果见表3。

3.3 黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位在低钙、高钙任氏液状态下对离体蛙心心肌平均收缩力的影响

在正常、低钙、高钙任氏液灌流下, 分别往制备好的蛙心套管中加入1.74 mg/mL的黑骨藤醇提取物乙酸乙酯

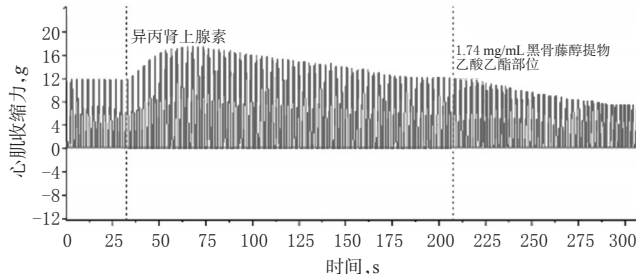


图4 低剂量黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位在异丙肾上腺素作用下灌流蛙心的心肌收缩曲线

Fig 4 Myocardium contraction curve of frog heart after perfused with low dose ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* under the action of isoproterenol

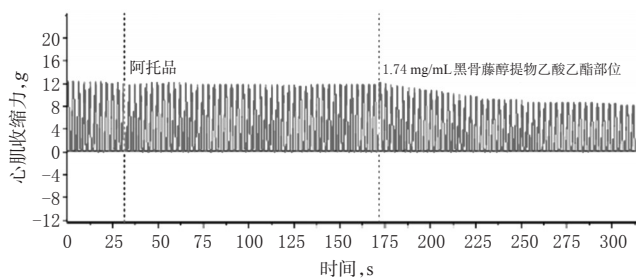


图5 低剂量黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位在阿托品作用下灌流蛙心的心肌收缩曲线

Fig 5 Myocardium contraction curve of frog heart after perfused with low dose ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* under the action of atropine

表3 黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位在阿托品、异丙肾上腺素作用下对离体蛙心心肌平均收缩力的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 3 Effects of ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* on average myocardium contractile force of isolated frog heart under the action of atropine and isoproterenol ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	萃取物质量浓度, mg/mL	心脏平均收缩力, g			抑制率, %
		给药前	给阿托品/异丙肾上腺素后	给黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位后	
黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组	1.74	3.68 ± 2.27		1.68 ± 1.12***	47.89
阿托品+黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组	1.74	3.39 ± 0.84	3.09 ± 0.84	2.18 ± 0.84**	35.60
异丙肾上腺素+黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组	1.74	3.49 ± 0.86	3.90 ± 1.01*	2.24 ± 0.86**	35.72

注:与给药前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Note: vs. before administration, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

部位后, 离体蛙心的心肌平均收缩力与给药前比较均明显降低($P < 0.001$), 且随着细胞外钙离子浓度的增大, 黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位对离体蛙心心肌平均收缩力的抑制率逐渐升高。低剂量黑骨藤醇提取物乙酸乙酯

部位在低钙、高钙任氏液状态下灌注蛙心的心肌收缩曲线见图6、图7,心肌收缩力测定结果见表4。

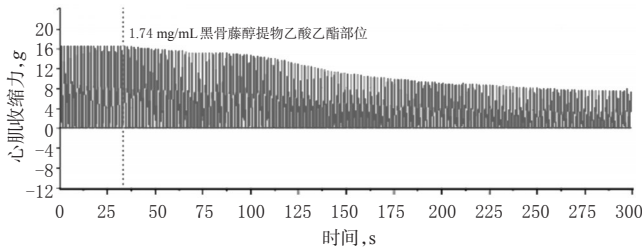


图6 低剂量黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位在高钙任氏液状态下灌注蛙心的心肌收缩曲线

Fig 6 Myocardium contraction curve of frog heart after perfused with low dose ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* under the action of high calcium Ren's solution

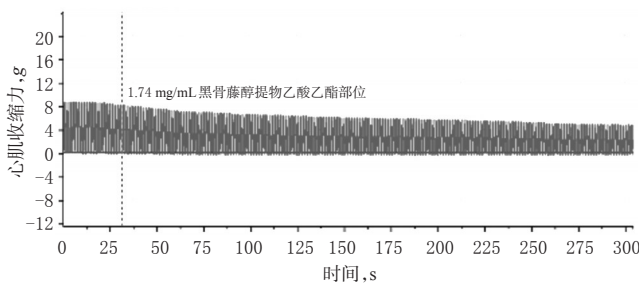


图7 低剂量黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位在低钙任氏液状态下灌注蛙心的心肌收缩曲线

Fig 7 Myocardium contraction curve of frog heart after perfused with low dose ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* under the action of low calcium Ren's solution

表4 黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位在低钙、高钙任氏液状态下对离体蛙心心肌平均收缩力的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 4 Effects of ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* on average myocardium contractile force of isolated frog heart under the action of low Ren's calcium and high Ren's calcium solution ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	萃取物质量浓度,mg/mL	心肌平均收缩力,g		抑制率,%
		给药前	给药后	
黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组	1.74	3.68±2.27	1.68±1.12***	47.89
低钙任氏液+黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组	1.74	3.30±0.79	1.93±0.60***	41.36
高钙任氏液+黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组	1.74	5.73±1.92	2.13±0.74***	62.90

注:与给药前比较,*** $P<0.001$

Note:vs. before administration,*** $P<0.001$

3.4 黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位对离体蛙心心肌组织中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性、AChE活性的影响

加药后,与空白对照组比较,黑骨藤醇提取物乙酸乙

酯部位低、高剂量组离体蛙心的心肌组织中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性均没有明显变化($P>0.05$),但 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),AChE活性均明显降低($P<0.05$),黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位对离体蛙心心肌组织中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶和AChE活性的影响结果见表5。

表5 黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位对离体蛙心心肌组织中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶和AChE活性的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 5 Effects of ethyl acetate part from ethanol extract of *P. forrestii* on the activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ and AChE in isolated frog heart myocardium ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	萃取物质量浓度,mg/mL	$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶,U/mg	$\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶,U/mg	AChE,U/mg
空白对照组	-	0.42±0.24	1.50±0.17	0.26±0.01
黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组	1.74	0.67±0.31	2.09±0.64 ^Δ	0.22±0.04 ^Δ
黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位高剂量组	3.48	0.67±0.38	2.35±0.43 ^{ΔΔ}	0.22±0.03 ^Δ

注:与空白对照组比较,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$

Note:vs. blank control group,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$

4 讨论

在本研究中,蛙心心肌收缩前后的负荷保持在相对恒定的水平,排除了人为因素的影响。据空白对照组结果可知,任氏液对蛙心的心率和心肌收缩力影响不显著,这排除了溶剂对试验结果的影响。前期预试验结果显示,当黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位灌注质量浓度达到1.74 mg/mL时,开始抑制蛙心心肌收缩力,故本研究以1.74 mg/mL为低剂量,其2倍量3.48 mg/mL为高剂量。

在心肌细胞膜上,M受体兴奋或β受体被阻断,都可以使心脏心肌收缩力减弱^[15]。本研究结果显示,阿托品+黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组和异丙肾上腺素+黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组与黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位低剂量组相比,离体蛙心心肌平均收缩力的抑制率均明显下降。而阿托品为M受体阻断药,异丙肾上腺素为β受体激动药,提示加入黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位后能拮抗阿托品阻断心脏M受体以及异丙肾上腺素激动心脏β受体,这初步说明黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位可以兴奋M受体、阻断β受体,从而起到降低心肌收缩力的作用。

Ca^{2+} 是心脏活动不可或缺的离子,在心肌的兴奋-收缩耦联过程中扮演着极其重要的角色。由于心肌细胞的肌浆网不发达,储 Ca^{2+} 能力差,易受细胞外离子浓度的影响,所以,细胞外 Ca^{2+} 内流的量对细胞内 Ca^{2+} 浓度影响很大^[15]。本研究用正常、低钙、高钙3种任氏液进行灌注,发现随着任氏液中 Ca^{2+} 浓度的增加,心肌平均收缩力逐渐升高,且心肌平均收缩力的抑制率随着任氏液中 Ca^{2+} 浓度的增加而增大;但在加入1.74 mg/mL的黑骨藤

醇提取物乙酸乙酯部位后,心肌平均收缩力又开始降低($P<0.001$)。通过3种任氏液灌注结果的对比,说明黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位有明显的降低心肌收缩力的作用,其作用机制可能与阻断心肌细胞膜上的 Ca^{2+} 通道,抑制 Ca^{2+} 内流,从而减少细胞膜内 Ca^{2+} 浓度有关。

Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP酶是细胞膜上的 Ca^{2+} 泵,其可以水解ATP,使细胞内 Ca^{2+} 泵到细胞外,以维持细胞内相对较低的 Ca^{2+} 浓度,这是维持细胞稳态的重要机制之一,也是细胞功能得以正常发挥的基础^[16]。本研究结果表明,黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位作用于离体蛙心后,心肌组织中 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP酶活性升高,且在本研究质量浓度范围内,给药的质量浓度越高, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP酶活性越高。 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP酶活性升高后会引起 Ca^{2+} 泵功能增强,水解ATP能力增强,致使细胞内 Ca^{2+} 外排增多,细胞内 Ca^{2+} 浓度下降,而使心肌收缩力减弱。

乙酰胆碱是胆碱能神经末梢释放的一种神经介质,AChE是乙酰胆碱代谢过程中的分解酶,其活性高低可以反映药物对胆碱能神经功能的改善作用的强弱^[17]。当神经末梢受刺激引起兴奋时,释放乙酰胆碱,与胆碱能受体结合,发挥神经-肌肉的兴奋传递作用。随后,乙酰胆碱立即被AChE水解而失去作用。在这个过程中,如果AChE的活性受到抑制,就会发生乙酰胆碱过剩而聚集,从而引起胆碱能神经过度兴奋而抑制心脏活动。本研究结果显示,黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位作用于离体蛙心后,心肌组织中AChE活性明显降低($P<0.05$),说明黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位可抑制AChE活性,致使胆碱能神经兴奋而抑制心脏活动,降低心肌收缩力。

综上所述,黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位达到一定浓度后能降低离体蛙心心肌收缩力,具有一定的负性肌力作用。其作用机制一方面可能与升高 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP酶活性,同时抑制 Ca^{2+} 内流,从而减少细胞膜内 Ca^{2+} 浓度有关;另一方面,可能与黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位有抑制AChE活性,初步兴奋M受体,阻断 β 受体的作用有关。但由于黑骨藤中化学成分复杂多样,且本研究仍处于离体实验研究阶段,其具体的作用机制需进行体内动物实验或对黑骨藤醇提取物乙酸乙酯部位进行纯化后进一步研究。

参考文献

[1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[M].贵阳:贵州科技出版社,2003:381.
[2] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,1986:2388.

[3] FENG J,ZHAO W. Complete ^1H and ^{13}C -NMR assignments of four new oligosaccharides and two new glycosides from *Periploca forrestii*[J]. *Magn Reson Chem*, 2009, 47(8):701-705.
[4] 甘秀海,周欣,赵超,等.黑骨藤化学成分的研究[J].中草药,2009,40(5):708-710.
[5] 徐冉,张援虎,赵延涛.黑骨藤化学成分的研究[J].中国药理学杂志,2011,46(11):823-825.
[6] 赵珊,张宝,熊丹丹,等.苗药黑骨藤的化学成分研究[J].中草药,2017,48(8):1513-1518.
[7] 甘秀海,周欣,赵超,等.黑骨藤化学成分及药理作用研究进展[J].广东化工,2012,39(9):20-21.
[8] 李雪峰,刘育辰,刘刚,等.苗药黑骨藤化学成分及药理作用研究进展[J].中成药,2018,40(4):904-912.
[9] LEI C, JINSONG L, XUAN K, et al. The therapeutic effects of *Periploca forrestii* Schltr. stem extracts on collagen-induced arthritis by inhibiting the activation of Src/NF- κ B signaling pathway in rats[J]. *J Ethnopharmacology*, 2017.DOI:10.1016/j.jep.2017.03.005.
[10] LIANG Q, CHEN H, ZHOU X, et al. Optimized microwave-assisted extraction combined ultrasonic pretreatment of flavonoids from *Periploca forrestii* Schltr. and evaluation of its anti-allergic activity[J]. *Electro Phoresis*, 2017, 38(8):1113-1121.
[11] LEI C, LI JS, XUAN K, et al. Chemical profiling and the potential active constituents responsible for wound healing in *Periploca forrestii* Schltr.[J]. *J Ethnopharmacology*, 2018.DOI:10.1016/j.jep.2018.04.023.
[12] 邓士贤,王德成,王懋德,等.滇杠柳的强心作用[J].药学学报,1964,11(2):75-79.
[13] 刘育辰,刘丽苹,刘刚,等.苗药黑骨藤多指标的含量测定及聚类分析[J].中国药房,2018,29(12):1636-1639.
[14] 程允相,石卫州,林国彪,等.桂郁金醇提取物和水提取物对离体蛙心的影响[J].时珍国医国药,2012,23(2):290-292.
[15] 齐梁煜,黄月维,黄春阳,等.王不留行总黄酮对离体蛙心心肌收缩力和心率的影响[J].中国医院药学杂志,2016,36(10):805-806.
[16] 周智兴,傅颖媛.黄芩苷对白色念珠菌细胞周期和钙镁ATP酶活性的影响[J].山东医药,2007,47(33):34-36.
[17] 马俊俏,吴勇,周俊璇,等.益智仁挥发油对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用研究[J].中国药房,2018,29(22):3074-3078.

(收稿日期:2019-02-26 修回日期:2019-07-15)

(编辑:林静)