



# 原花青素舒张家兔离体肺动脉的研究

张团笑<sup>1</sup>, 牛彩琴<sup>2\*</sup>, 蓝海涛<sup>1</sup>, 刘红<sup>1</sup>, 敬华娥<sup>1</sup>

(1. 川北医学院 生理学教研室, 四川 南充 637007;

2. 川北医学院 中西医临床医学系, 四川 南充 637007)

**[摘要]** 目的:研究葡萄籽提取物原花青素(PC)对家兔离体肺动脉血管的舒张作用及机制。方法:采用家兔离体肺动脉平滑肌标本,以去甲肾上腺素(NA)预收缩后,给予PC(0.625,1.25,2.5 mg·L<sup>-1</sup>),观察其舒张血管的量效关系;并分为对照组、PC组、PC+吲哚美辛(1×10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>)、PC+普萘洛尔(1×10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>)、PC+左旋硝基精氨酸(1×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>)、PC+甲烯蓝(1×10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>)和PC+去内皮细胞7组,探讨PC舒张血管的机制;用PC(20 mg·L<sup>-1</sup>)温育标本后,观察PC对NA(1×10<sup>-8</sup>~1×10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>),KCl(6.3~100 mmol·L<sup>-1</sup>)和CaCl<sub>2</sub>(1×10<sup>-5</sup>~1×10<sup>-2</sup> mol·L<sup>-1</sup>)量效曲线的影响。结果:PC能明显舒张肺动脉血管,并有量效关系( $r=0.69, P<0.01$ );去除血管内皮、L-NNA或MB可抑制PC的舒张作用,但吲哚美辛和普萘洛尔无影响;PC能压低NA,KCl和CaCl<sub>2</sub>的量效收缩曲线,三者的pD<sub>2</sub>分别由对照的(7.57±2.41),(1.74±1.19),(3.72±1.88)降低为(6.47±1.42),(1.07±1.12),(3.17±1.55);PC也能抑制NA引起的第I时相收缩,对CaCl<sub>2</sub>引起的第II时相收缩无影响。结论:PC舒张肺动脉的作用是内皮依赖性,且与NO/cGMP介导有关;也可能是拮抗ROC和PDC通道,降低胞浆Ca<sup>2+</sup>而舒张血管。

**[关键词]** 原花青素;肺动脉环;内皮细胞;Ca<sup>2+</sup>

原花青素(procyanidins,PC)是广泛存在于植物界中的一类多酚化合物,由不同数量的儿茶素或表儿茶素缩合而成。它在葡萄属植物种子中含量很高,葡萄类产品如红葡萄酒富含PC,有报道PC能降低冠心病、高血压等心血管疾病的发生<sup>[1]</sup>,尽管如此,常规应用葡萄酒预防心血管疾病还存在很多问题。为探讨PC对心血管疾病的影响,采用家兔离体肺动脉环恒温灌流法,观察PC对去甲肾上腺素(noradrenaline,NA)、KCl预收缩血管张力的影响,并探讨其作用机理,为PC进入临床的应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

清洁级健康家兔12只,体重2.5~3.0 kg,雌雄不拘,由兰州生物制品研究所提供,合格证号:医动字第14-004号。

### 1.2 药物与试剂

原花青素购自天津市尖峰天然产物研究开发

公司,批号20020930;多酚≥95.6%,双蒸水配制成1.25,2.5和5.0 g·L<sup>-1</sup>浓度备用。乙酰胆碱acetylcholine(Ach)和普萘洛尔propranolol(Prop)均为北京第二制药厂产品;左旋硝基精氨酸N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine(L-NNA)和吲哚美辛Indomethacin(Indo)均为Sigma产品;甲烯蓝methylene blue(MB)为Merc产品;无Ca<sup>2+</sup>Krebs-Henseleit(K-H)液用0.25 mmol·L<sup>-1</sup>EDTA代替CaCl<sub>2</sub>;其他试剂均为分析纯。

### 1.3 主要仪器

离体恒温灌流肌槽(兰州大学化学系玻璃仪器厂);IBM电脑,内置Biolap410(BL-410)智能型生物信号处理系统(成都泰盟电子有限公司);张力传感器(JH-2,中国北京航天医学工程研究所)。

## 2 方法

### 2.1 标本制备

健康家兔12只,猛击头致昏后,迅速取出肺动脉,放置于盛有K-H液培养皿中,并持续通入95% O<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>混合气体,剔除结缔组织后制成长2.5~3.0 mm动脉环<sup>[2]</sup>,置于37℃恒温的灌流肌槽中,持续通有95% O<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>混合气体,经张力换能器将其张力变化输入电脑,用BL-410系统记录实验数据,给予2.0 g的前负荷。每20 min更换1次

[收稿日期] 2009-07-03

[基金项目] 四川省教育厅重点项目(08ZA109)

[通信作者] \*牛彩琴, Tel: (0817) 2242262, E-mail: niucaiqin@126.com



K-H液(37℃),温育平衡1.5~2.0h。加入 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ach后若血管舒张大于60%<sup>[3]</sup>,视为内皮完整,否则为去内皮的。

## 2.2 分组及处理

**2.2.1 PC对NA预收缩血管张力的影响** 记录静息动脉环张力后,用KCl  $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 刺激达峰值,然后用K-H液冲洗,重复3次,以诱发血管环的最大收缩幅度。待血管环重新稳定后,用 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NA收缩至最大值,以此为100%效应。向浴槽中累积加入0.625,1.25和2.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,记录PC的量效曲线,计算其舒张率(%);并以等量生理盐水(NS)和 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ach作为对照。冲洗后在不同的浴槽中分别加入 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  L-NNA, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MB, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Indo, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Prop温育15min或去除内皮细胞后,加入 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NA收缩至最大,再累积加入PC观察动脉环的变化。

### 2.2.2 PC对NA,KCl和CaCl<sub>2</sub>量效曲线的影响

在去除内皮细胞的情况下,向浴槽分别累积加入NA( $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),KCl( $6.3 \sim 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )或CaCl<sub>2</sub>( $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )后,测量并计算其收缩率(%),此为对照组;冲洗后加入PC( $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )温育15min后,再做NA,KCl和CaCl<sub>2</sub>的量效曲线,方法同对照组。

**2.2.3 PC对NA和CaCl<sub>2</sub>双时相曲线的影响** 将标本置于无Ca<sup>2+</sup> K-H液的浴槽中温育30min后,加入 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NA收缩至最大值,再加入 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CaCl<sub>2</sub>描记最大反应,记录其张力(g),此为对照组;冲洗后向浴槽中加入 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PC温育15min后,再重复上述方法。

## 2.3 观测指标

血管舒张率(%) = (正常效应值-药物效应

值)/正常效应值;血管收缩率(%) = (效应值-前负荷值)/(最大效应值-前负荷值);血管收缩张力(g) = 效应值-前负荷值;亲和力指数(pD<sub>2</sub>) = -logK<sub>D</sub> = log(1/K<sub>D</sub>)。

## 2.4 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0软件进行方差分析或t检验,以P<0.05为有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 PC对NA预收缩血管张力的影响

PC可显著舒张内皮完整的肺动脉环,并有剂量依赖关系( $r = 0.69, P < 0.01$ );且 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PC( $69.68 \pm 10.67$ )%与 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ach( $65.23 \pm 10.88$ )%的舒张作用相似。用L-NNA,MB温育或去除内皮细胞后,PC舒张血管的作用明显减弱;但Indo和Prop对PC的舒张作用无影响(表1)。

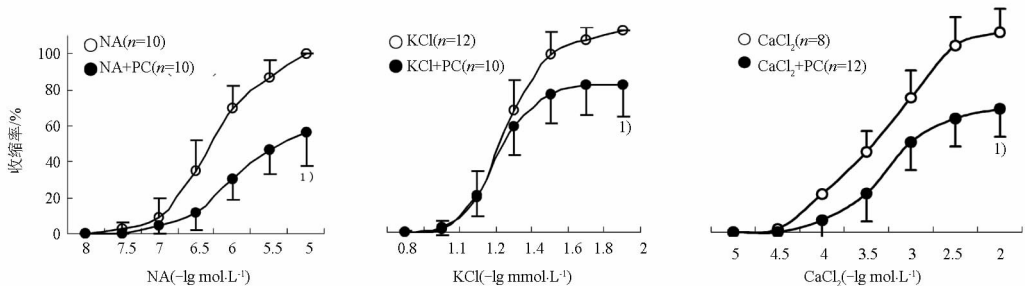
表1 拮抗剂对PC舒张血管作用的影响( $\bar{x} \pm s$ ) %

组别	n	PC/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
		0.625	1.25	2.50
NS	8	4.65 ± 2.19	7.21 ± 3.06	12.54 ± 3.83
PC	10	14.01 ± 7.1 <sup>1)</sup>	56.84 ± 13.52 <sup>1)</sup>	69.68 ± 10.67 <sup>1)</sup>
PC + Indo	8	13.45 ± 6.90	46.93 ± 17.15	62.78 ± 14.44
PC + Prop	8	8.59 ± 4.35	40.99 ± 14.29	68.55 ± 12.23
PC + Denud	8	4.22 ± 1.09 <sup>2)</sup>	9.50 ± 2.27 <sup>2)</sup>	12.79 ± 6.08 <sup>2)</sup>
PC + L-NNA	8	3.20 ± 2.40 <sup>2)</sup>	8.17 ± 3.47 <sup>2)</sup>	14.73 ± 6.04 <sup>2)</sup>
PC + MB	8	1.85 ± 2.61 <sup>2)</sup>	9.18 ± 3.88 <sup>2)</sup>	12.25 ± 4.00 <sup>2)</sup>

注:与NS比较<sup>1)</sup>P<0.01;与PC相比<sup>2)</sup>P<0.01。

### 3.2 PC对NA,KCl和CaCl<sub>2</sub>量效曲线的影响

PC能压低NA,KCl和CaCl<sub>2</sub>的量效收缩曲线,其最大值分别降为( $55.94 \pm 18.32$ )%, ( $73.28 \pm 15.93$ )%, ( $61.75 \pm 9.81$ )%,  $n = 10, P < 0.01$ ;且其pD<sub>2</sub>分别由对照的( $7.57 \pm 2.41$ ), ( $1.74 \pm 1.19$ ), ( $3.72 \pm 1.88$ )降为( $6.47 \pm 1.42$ ), ( $1.07 \pm 1.12$ ), ( $3.17 \pm 1.55$ )(图1)。



与对照组(NS)比较<sup>1)</sup>P<0.01。

图1 PC对NA,KCl和CaCl<sub>2</sub>量效曲线的影响



### 3.3 PC对NA和CaCl<sub>2</sub>双时相曲线的影响

PC能明显抑制无钙液中NA引起的第I时相收缩[对照组(2.48±0.24)g,PC温育组(1.60±0.16)g,n=10,P<0.01],而对CaCl<sub>2</sub>诱发的第II时相收缩无影响[对照组(1.52±0.14)g,PC温育组(1.20±0.11)g,n=10]。

## 4 讨论

Preuss H G等<sup>[4]</sup>认为PC能降低大鼠因年龄增加而升高的收缩压。在血管内皮完好的情况下,PC与Ach相似,可舒张NA预收缩的动脉环,并有浓度依赖性。血管内皮细胞生成EDRF等<sup>[5-6]</sup>即NO,通过可溶性鸟苷酸环化酶受体激活血管平滑肌内的鸟苷酸环化酶,使cGMP浓度升高,引起胞浆内Ca<sup>2+</sup>的降低而舒张血管<sup>[7]</sup>。用NOS抑制剂L-NNA和鸟苷酸环化酶抑制剂MB或去除内皮细胞后,发现PC舒张血管的作用明显减弱,说明其舒张血管效应是内皮依赖性的,且与NO/cGMP介导途径有关。

血管内皮细胞使胞内cAMP含量增加而舒张血管,通过环氧酶抑制剂吲哚美辛温育动脉环后,PC舒张血管的作用无明显改变,说明PC舒张血管作用与前列腺素无关。血管平滑肌细胞的β肾上腺素能受体也参与血管舒张,实验中用β肾上腺素能受体阻断剂普萘洛尔温育后,发现PC舒张血管环的作用与β肾上腺素能受体也无关。

胞浆中游离Ca<sup>2+</sup>是引起平滑肌收缩的关键物质。NA和高K<sup>+</sup>分别通过受体依赖性钙通道(ROC)和电压依赖性钙通道(PDC),使细胞外Ca<sup>2+</sup>内流和肌浆网Ca<sup>2+</sup>释放增加,从而升高胞浆中Ca<sup>2+</sup>,引起血管收缩。PC能使NA的量效曲线右移;也能抑制无钙液中NA诱发的第I时相收缩(依内钙性收缩),说明PC能非竞争性的拮抗ROC,减少IP<sub>3</sub>的生成,抑制肌浆网Ca<sup>2+</sup>的释放,降低胞内Ca<sup>2+</sup>而使血管舒张。

细胞外K<sup>+</sup>升高,使钾通道受到抑制<sup>[8]</sup>,引起细胞膜去极化,从而使电压依赖性的钙通道开放,细胞外Ca<sup>2+</sup>内流,导致平滑肌收缩。本实验通过PC温育无内皮的血管环后,抑制了KCl和CaCl<sub>2</sub>的量效收缩曲线;说明PC能非竞争性的拮抗电压依赖性的钙通道(PDC),减少细胞外Ca<sup>2+</sup>内流而使血管舒张。Kim等<sup>[9]</sup>从山楂中提取的PC通过四乙铵敏感性的K<sup>+</sup>通道,缓解离体大鼠血管的紧张性。与本

实验的结果有所不同,可能与提取PC的原料以及所用的实验动物和条件不同有关。但又有报道<sup>[10-12]</sup>葡萄籽原花青素与维拉帕米相似可能与其阻滞钙内流,减轻细胞内钙超载对心肌的损伤,尽管是对心肌的研究,但提示PC有拮抗钙通道,降低细胞内Ca<sup>2+</sup>的作用。至于心肌细胞膜的钙通道与血管平滑肌细胞膜的钙通道是否一致,PC抑制的钙通道是否为同一类通道,其详细机制还有待于进一步的研究。

本实验发现,PC可引起肺动脉血管舒张,可能是内皮依赖性,且与NO/cGMP介导有关;也可能是通过拮抗ROC和PDC通道,抑制Ca<sup>2+</sup>内流和释放,降低细胞内Ca<sup>2+</sup>引起血管舒张。

### [参考文献]

- [1] Nuttall S L, Kendall M J, Bombardelli E, et al. An evaluation of the antioxidant activity of a standardized grape seed extract, Leucoselect[J]. Clin Pharm Ther, 1998, 23(5):358.
- [2] 张团笑,牛彩琴,胡建民,等.原花青素舒张家兔主动脉和降低动脉血压的研究[J].中国中药杂志,2008,33(14):1720.
- [3] Nyhan D, Gaine S, Hales M, et al. Pulmonary vascular endothelial responses are differentially modulated after cardiopulmonary bypass[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1999, 34(3):518.
- [4] Preuss H G. Chromium, Zinc, and Grape seed extract (Flavonoids) can overcome age-related increases in SPB normotensive rats[J]. J Am Coll Nutr, 1997, 16(5):43.
- [5] Shan L M, Wang H. Pharmacological characteristics of the endothelial target for acetylcholine induced vascular relaxation[J]. Life Sci, 2002, 70(11):1285.
- [6] Feletou M, Vanhoutte P M. The alternative: EDHF[J]. Mol Cell Cardiol, 1999, 31(1):15.
- [7] Qi Y M, Yang D J, Duan X, et al. Endomorphins inhibit contractile responses of rat thoracic aorta rings induced by phenylephrine and angiotensin II in vitro[J]. 中国药理学报, 2002, 23(1):40.
- [8] 姜雨鸽,汪海.血管平滑肌钾通道及其调节因素[J].中国药理学通报,2002,8(5):494.
- [9] Kim S H, Kang K W, Kim K W, et al. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta[J]. Life Sci, 2000, 67(2):121.
- [10] 汪晨净,高明堂,时小燕.原花青素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学,2003,(2):175.
- [11] 张小郁,李文广,高明堂.葡萄籽中原花青素对心肌细胞的保护作用[J].中药药理与临床,2001,7(6):8.
- [12] 凌智群,谢笔钧,江涛.莲房原花青素对大鼠实验性心肌缺血的保护作用[J].中国药理学通报,2001,7(6):687.



## Vasorelaxant effects of procyanidins on rabbit pulmonic ring *in vitro*

ZHANG Tuanxiao<sup>1</sup>, NIU Caiqin<sup>2</sup>, LAN Haitao<sup>1</sup>, LIU Hong<sup>1</sup>, JING Hua<sup>1</sup>

(1. Department of Physiology, North sichuan Medical College, Nanchong 637007, China;

2. Department of Clinical in Chinese and Western Medicine, Nanchong 637007, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the vasorelaxant effect of procyanidin (PC) extracted from grape seeds on rabbit thoracic pulmonic rings *in vitro*. **Method:** Rabbits thoracic pulmonic rings were isolated, pre-contracted with noradrenalin (NA) and their responses to different concentrations of PC were investigated. The effects of endothelium and different signaling pathway inhibitors on PC-induced relaxation, including nitric oxide synthase inhibitor *N*<sup>ω</sup>-nitro-*L*-arginine (*L*-NNA), methylene blue (MB), prostaglandin synthase inhibitor Indomethacin (Indo) and blockage of the adrenergic  $\beta$ -receptor Propranolol (Prop), were also assessed. **Result:** PC change the resting tension of rabbit's pulmonic rings but caused an obvious dose-dependent relaxation in  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NA precontracted pulmonic rings ( $r = 0.69$ ,  $P < 0.01$ ). The relaxant effect of PC was significantly reduced by removal of endothelium or by treatment with either  $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  *L*-NNA or  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MB, but not by treatment with prostaglandin synthase inhibitor or blockage of the adrenergic  $\beta$ -receptor. In addition, PC ( $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) dropped the dose-effect curves of NA, KCl and respectively on pulmonic rings denuded endothelium; PC can also inhibit the vasoconstriction caused by NA in the first phase, but has no impact on the constriction induced by  $\text{CaCl}_2$  in the second phase. **Conclusion:** PC has an endothelium-dependent vasorelaxation on isolated rabbit's pulmonic rings, which is possibly mediated by nitric oxide (NO) pathways and blockage of receptor operated and voltage dependent calcium channels.

[**Key words**] procyanidin; pulmonic ring; endothelium cell; calcium channel

[责任编辑 张宁宁]