

某些中药中黄酮化合物强心作用机制的研究

贺师鹏 魏莫愁 裴印权 王晓阳
(北京医学院)

本文实验表明: 黄酮的强心作用性质与 ISO 有所不同, 并证实其作用与心肌 β 受体关系不大, 所试十种黄酮对心肌 PDE 都有抑制作用, 但它们对 cAMP-PDE 抑制作用比 cGMP-PDE 要强, 也证明槲皮素能提高心肌细胞内 cAMP 水平, 而对 cGMP 含量无影响。因此黄酮强心作用可能是通过抑制心肌细胞内 cAMP-PDE 活性的结果。

关键词: 黄酮类化合物 强心作用 磷酸二酯酶 cAMP cGMP β 受体

黄酮类化合物是广泛存在于中草药内的一类有效成分, 具有多方面的药理作用, 以强心、降压、扩张冠脉、降血脂等作用最为突出。过去有人认为它可能与 ATP 酶作用有关, 但近年来的研究认为它有抑制磷酸二酯酶的作用^[1~4]。本文进一步探索它的强心作用机制。

一、材料与方法

1. 药品、试剂

(1) 所试的 10 种黄酮类化合物除芹甙元系人工合成外, 其余均是中药中提纯的纯品, 化学结构已确定。

(2) 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤(MIX)为美国 Sigma 公司产品; 硫酸异丙肾上腺素(ISO) 为上海第十一药厂产品; 心得安(pro)为北京制药厂产品。

(3) cGMP 抗血清由本室按 steiner^[5]方法免疫产生; cAMP 抗血清由北京肿瘤所细胞室提供; ¹²⁵I-TME-scGMP 由本室标记。

(4) 磷酸二酯酶的提取, 是将家兔处死后迅速取出心脏, 用冷冻生理盐水漂洗, 在 4℃ 下用组织捣碎机(10000rpm)捣碎, 并制成匀浆, 在低温高速离心机(13000rpm)离心 20 分钟, 上清液以 50% 饱和度硫酸铵沉淀蛋白, 沉淀经透析后即得部分提纯的酶制剂。酶蛋白按 Lowry 法定量。

2. 方法

(1) 离体蟾蜍心脏活动测定 以八木氏法制取离体蟾蜍心脏标本, 多次以任格氏液换洗后, 直接在记纹鼓上记录心率、输出量、收缩振幅。待稳定后, 分别加入一定浓度的药物, 再连续记录心脏活动 15 分钟, 对比给药前后心脏活动。

(2) 磷酸二酯酶活力测定 由兔心肌提取的 PDE, 以一步水解后纸电泳分离水解产物法测定 PDE 的活力, 具体方法见文献[6]。

(3) 心脏组织 cAMP、cGMP 含量测定 用放射免疫测定法测定心脏组织 cAMP、cGMP 含量, 方法如下:

① 样品制备: 离体蟾蜍心脏标本, 在任氏液中稳定 1~2 小时后, 剪取一侧心室肌 20~30mg 迅速投入冰冻的 10% TCA 2ml 中匀浆 (给药前组)。剪后的心脏标本, 以所试的药液灌流, 灌流管不时添加药液以维持灌流, 作用 15 分钟后, 再剪取另一侧心室肌 20~30mg 迅速在冰冻的 10% TCA 2ml 中匀浆, 每份匀浆液离心后取上清液, 然后以三倍水饱和的乙醚重复三次将 TCA 萃取干净, 萃取后的水溶液置 65℃ 水浴上吹干, 测定前加 1ml 醋酸钠缓冲液溶解, 分别取 0.1ml 溶解液测定 cAMP 或 cGMP。回收率约 85% 左右。

② cAMP 含量测定: 在 0.3ml pH4.75 的醋酸钠缓冲液中含有乙酰化 ³H-cAMP、标准 cAMP 或样品抗血清 (1:4500), 4℃ 冰浴保温 2 小时后, 用微孔薄膜分离抗原-抗体复合物, 薄膜烘干后, 置闪烁液中测量放射性。

③ cGMP 含量测定: 在 0.3ml pH4.75 的醋酸钠缓冲液中含 ¹²⁵I-TME-scGMP、乙酰化的标准 cGMP 或样品、抗血清 (1:60000), 4℃ 保温 18 小时后, 用 5% A 蛋白试剂分离抗原-抗体复合物, 用 γ 计数器测量放射性。

二、结 果

1. 槲皮素、芹甙元对离体蟾蜍心脏的强心作用

1994 年第 2 期

· 41 ·

以离体蟾蜍心脏测定其强心作用。槲皮素、芹甙元的强心作用出现慢,一般在加药 5~10 分钟后作用才达到高峰,作用持久,不易冲洗掉。在其明显加强心肌收缩时,舒张期延长及输出量增加,但对心率无影响。3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(MIX)是已知较强的 PDE 的抑制剂,黄酮类化合物的强心作用特点与 MIX 完全一致。它们的结果如图 1。

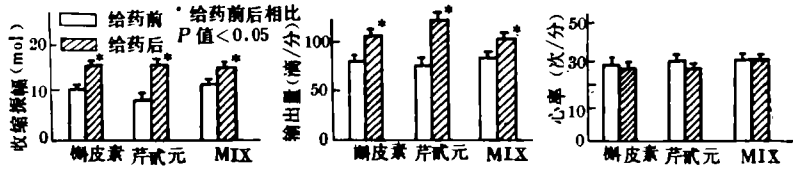


图 1 黄酮类化合物对离体心脏的影响

2. 槲皮素、芹甙元等黄酮的强心作用与心肌β受体的关系

先以 0.78μM ISO 兴奋蟾蜍心脏。在作用达到高峰时加入 11.6μM pro, 此时 ISO 的作用完全被阻断, 出现了 pro 对心肌的抑制作用, 如果此时再加入 2.34μM ISO, 对 pro 的抑制作用无对抗作用, 但是, 在此情况下, 若加入 0.4mM 槲皮素或 0.45mM 芹甙元, 则会出现心肌收缩力加强, 输出量增加等现象。如改用 MIX, 也出现和黄酮一样的效应, 所以黄酮类化合物的强心作用可能与β受体关系不大, 而是与抑制磷酸二酯酶活性有关。结果见表 1。

表 1 黄酮类化合物对蟾蜍离体心脏的作用

实 验 组	标 本 数	心率(次/分)	输出量(滴/分)	收缩振幅(mm)
		$\bar{X} \pm S, E$	$\bar{X} \pm S, E$	$\bar{X} \pm S, E$
正常	6	36±4	94±12	10±1
正常+ISO		45±3	152±27	27±2
正常+ISO+pro		33±4	87±11	12±1
正常+ISO+pro+槲皮素		36±3	160±29*	18±1*
正常	5	40±3	95±12	14±2
正常+ISO		46±2	127±2	24±2
正常+ISO+pro		35±4	64±5	13±2
正常+ISO+pro+芹甙元		35±3	135±15*	25±3*
正常	5	38±2	96±8	17±2
正常+ISO		49±5	132±16	27±3
正常+ISO+pro		28±3	61±5	11±1
正常+ISO+pro+MIX		32±2	106±12*	22±3*

* 黄酮组与正常组相比时 $P < 0.05$

3. 黄酮类化合物对心肌磷酸二酯酶的抑制作用

所试的十种黄酮类化合物均用 0.5% 二甲亚砜的缓冲溶液溶解, 并用 0.5% 二甲亚砜缓冲液作空白对照, 结果见表 2。十种黄酮类化合物对 PDE 都有一定的抑制作用, 其中芹甙元的抑制作用最强, 它比 MIX 强 15 倍, 而 MIX 是已知 PDE 抑制剂中最强之一。所试的十种黄酮对 cAMP 的 PDE 的抑制作用都比茶碱要强, 而茶碱是最常用的 PDE 抑制剂。不仅如此, 这些黄酮对 cAMP-PDE 和 cGMP-PDE 的抑制作用存在着明显的差异, 如果用 $I_{50}cAMP/I_{50}cGMP$ 比值作为这种差异的指标, 由表 2 可知, 它们对心肌 PDE 的比值都小于 1, 可见这些黄酮对 cAMP-PDE 抑制作用都比 cGMP-PDE 要强。

4. 槲皮素对蟾蜍心肌细胞 cAMP、cGMP 含量的影响

用三种剂量(43μM, 110μM, 660μM)的槲皮素溶液灌流离体蟾蜍心脏, 结果见图 2。小剂量(43μM)槲皮素作用时, 心肌中 cAMP 升高 13%, 与对照组相比, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。中剂量(110μM)时, 心肌中 cAMP 升高 43%, 与对照组相比有明显差异 ($P < 0.05$)。大剂量(660μM)时, 心肌中 cAMP 升高值与中剂量组相近, 说明处于饱和了。可是, 这三个剂量对心肌中 cGMP 含量都未见升高, 这似乎说明槲皮素对心肌中 cGMP-

表2 黄酮类化合物对PDE的抑制作用

黄酮化合物	*I ₅₀ ($\bar{X} \pm S$, E)(μ M)		I ₅₀ cAMP/ I ₅₀ cGMP	黄酮化合物	*I ₅₀ ($\bar{X} \pm S$, E)(μ M)		I ₅₀ cAMP/ I ₅₀ cGMP
	cAMP-PDE	cGMP-PDE			cAMP-PDE	cGMP-PDE	
黄豆甙元	43 $\pm$ 0.6	79 $\pm$ 1	0.54	木犀草素-T-葡萄糖甙	6.8 $\pm$ 0.2	12.8 $\pm$ 0.1	0.53
葛根素	200 $\pm$ 3	1458 $\pm$ 25	0.14	槲皮素	5.0 $\pm$ 0.2	128 $\pm$ 2	0.04
芹甙元	1.14 $\pm$ 0.01	9.6 $\pm$ 0.2	0.12	芦丁	106 $\pm$ 10	391 $\pm$ 5	0.27
金合欢素	38 $\pm$ 0.8	77 $\pm$ 2	0.49	异槲皮甙	49 $\pm$ 2	211 $\pm$ 5	0.23
金合欢素-T-鼠李葡萄糖甙	5.4 $\pm$ 0.1	12.2 $\pm$ 0.2	0.44	茶碱	229 $\pm$ 6	502 $\pm$ 8	0.46
木犀草素	24 $\pm$ 1	35 $\pm$ 3	0.67	MIX	18 $\pm$ 6	135 $\pm$ 8	0.13

I₅₀: 每一化合物抑制 PDE 50% 活性所需要的剂量。

PDE 是不敏感的。在此剂量范围内槲皮素对 cAMP-PDE 有相当好的选择性抑制作用。

三、讨 论

黄酮的强心作用是众所周知的,但是,过去对它的作用机制不十分清楚。本实验结果表明黄酮的强心作用性质与 ISO 有些不同。黄酮的强心作用出现缓慢;在其加强心肌收缩的同时,使舒张期延长;搏出量增加,但心率不变。当以心得安完全阻断 ISO 的作用下,若加入槲皮素等黄酮,又会出现心肌收缩力加强,输出量增加等强心作用,这说明此强心作用可能与心肌 β 受体关系不大。本实验结果还表明,所试的十种黄酮对心肌 PDE 都有抑制作用,但是它们对心肌 cAMP-PDE 的抑制都比 cGMP-PDE 的抑制作用要强。

而且在一定剂量的槲皮素作用下,心肌细胞内 cAMP 含量提高 43%,但 cGMP 含量却没有变化,说明槲皮素等黄酮对心肌细胞中 cAMP-PDE 具有选择性抑制作用。因此可以认为,槲皮素等黄酮类化合物的强心作用可能与抑制心肌细胞中 cAMP-PDE 的活性,从而提高细胞内 cAMP 水平有关。

*: 四川中药研究所

参 考 文 献

- [1] A. Beretz et al., *Experientia*, 34, 1045(1978).
- [2] A. Beretz et al., *Biochem. Pharmacol.*, 28, 535 (1979).
- [3] J. E. Ferrell et al., *Molecular Pharmacology*, 16, 556 (1980).
- [4] 贺师鹏等, 北京医学院学报, 14, 3, 253(1982).
- [5] A. L. Steiner et al., *J. Biol. Chem.*, 247, 1106 (1972).
- [6] 贺师鹏等, 生物化学与生物物理进展, 3, 42(1982).

A study on the mechanism of cardiac action of flavonoids obtained from some Chinese traditional drugs

He Shipeng Wei Mochou Pei Yinquan Wang Xiaoyang
(Beijing Medical College)

Keywords: flavonoids cardiotonic action phosphodiesterase cAMP cGMP β -receptors

简讯

第三次全国活化分析会议征文通知

由北京有色金属研究总院承办的第三次全国活化分析会议定于84年秋季在山东省青岛市召开。会议欢迎下述论文: (1)新的活化分析方法、仪器设备和装置。(2)方法之间,准确度方面和标准参考物之间的比较。(3)在线或离线计算机数据处理。(4)活化分析及其他核分析方法在各领域中的应用。提交论文请一式两份,于84年6月30日前寄送筹备组。

1984年第2期

· 43 ·

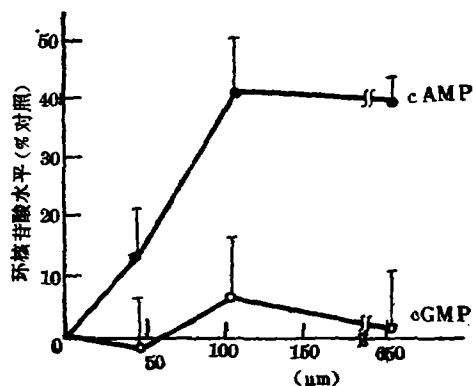


图2 槲皮素的剂量与心肌细胞中cAMP、cGMP含量变化