

远志水提取物对家兔心肌收缩力 及心房尿钠肽分泌的影响

崔昊震¹, 刘丽萍^{2*}

(1. 延边大学中医学院临床基础教研室, 吉林 延吉 133000;

2. 延边大学基础医学院生理学教研室, 吉林 延吉 133000)

[摘要] **目的:**观察远志水提取物对家兔心肌收缩力及心房尿钠肽分泌的影响。**方法:**采用家兔离体搏动心房灌流模型,观察远志水提取物对家兔心肌收缩力及心房尿钠肽分泌的影响。环磷酸腺苷(cAMP)和心房尿钠肽(ANP)含量的测定均采用放射免疫法。**结果:**远志水提取物可使家兔的心房每回搏出量、搏动压和灌流液中 cAMP 流出量比给药前呈现剂量依赖性递增趋势($P < 0.05$)。同时,它还可以明显地抑制 ANP 的分泌($P < 0.01$)。在阻断 β -肾上腺素受体(β -adrenoreceptor, β -AR)及选择性阻断 β_1 -AR 时能显著抑制远志水提取物对心肌收缩力的增强作用($P < 0.05$);而选择性阻断 β_2 -AR 时无任何影响。此外,阻断 L-型 Ca^{2+} 通道及选择性抑制蛋白激酶 A(PKA)的活性能明显抑制远志水提取物对心肌收缩力的增强作用($P < 0.05$)。**结论:**远志水提取物主要通过影响 β_1 -AR-cAMP- Ca^{2+} 信号传导途径增强心肌收缩力,并对 ANP 分泌具有抑制作用。

[关键词] 远志水提取物; 心肌收缩力; 尿钠肽; β_1 -肾上腺素受体-cAMP- Ca^{2+} 信号传导途径

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)09-0256-04

[doi] 10.11653/syfyj2013090256

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130220.1120.015.html>

[网络出版时间] 2013-02-20 11:20

Aqueous Extract of *Polygala tenuifolia* Willd on Atrial Dynamics and ANP Secretion in Beating Rabbit Atria

CUI Hao-zhen¹, LIU Li-ping^{2*}

(1. Department of Clinic and Basic Medicine, Yanbian University College
of Traditional Chinese Medicine, Yanji 133000, China;

2. Department of Physiology, Yanbian University College of Basic Medicine, Yanji 133000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of aqueous extract of *Polygala tenuifolia* (APT) on myocardial contractility and atrial natriuretic peptide (ANP) secretion in beating rabbit atria. **Method:** The APT-induced changes in atrial dynamics, cAMP efflux and ANP secretion were determined in perfused beating rabbit atria. The changes of cAMP and ANP were measured by radioimmunoassay. **Result:** APT increased atrial stroke volume, pulse pressure and cAMP efflux in a concentration-dependent manner with inhibition of ANP secretion in beating rabbit atria. The APT-induced positive inotropic effect was significantly blocked by pretreatment with blockade of β and β_1 -adrenoceptors (AR) ($P < 0.05$) but not β_2 -AR. Furthermore, the APT-induced changes in myocardial contractility were attenuated by inhibition of L-type Ca^{2+} channel and protein kinase A (PKA) activation with no changes in cAMP efflux. **Conclusion:** APT could increase atrial dynamics via β_1 -AR-cAMP-

[收稿日期] 20121107(593)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(3026003);延边大学科技发展计划项目(601010055)

[第一作者] 崔昊震,讲师,博士,从事中药药理学研究, Tel:18744339308, E-mail: cuihaozhen@ybu.edu.cn

[通讯作者] *刘丽萍,副教授,博士,从事运动生理学研究, Tel:13704380601, E-mail: liuliping@ybu.edu.cn

Ca²⁺ signaling and decreases ANP secretion in beating rabbit atria.

[Key words] *Polygala tenuifolia*; myocardial contractility; ANP secretion; β_1 -AR-cAMP-Ca²⁺ signaling pathway

远志是远志科植物细叶远志或卵叶远志的干燥根,其主要成分由三萜皂苷类、糖脂类、吡啶类及少量生物碱、香豆素等^[1]构成。此药始载于《神农本草经》,具有益智安神、消痰驱肿之功效。现代药理研究证明,远志具有良好的抗痴呆^[2-3]、抗抑郁^[4]、抑菌抗炎^[5]、镇咳祛痰^[6]及抗心肌缺血^[7]等作用。至今尚无远志对心脏肌力及内分泌调节的相关报道。本实验采用离体搏动心房灌流模型,观察和探讨远志水提取物对家兔心肌收缩力及尿钠肽分泌的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性大白耳家兔体重为(2.0 ± 0.2) kg。由延边大学实验动物科提供,合格证号 SCXK(吉)2003-0005。

1.2 药物 远志购自延吉市中医院,由延边大学医学院许龙泉教授鉴定为远志科植物细叶远志 *Polygala tenuifolia* Willd。远志水提取物:取远志 500 g 浸泡,煎煮 2 次,每次加入 10 倍水,煎煮 2 h,2 次滤液混匀,浓缩、冻干,得黄褐色粉末状物 10.15 g,得率为 2.03%,储存于 -20 °C 冰箱备用。

1.3 试剂 普萘洛尔 [propranolol]、地尔硫卓 (diltiazem)、KT5720 (Sigma 公司); CGP 20712 和 ICI 118,551 (英国 Tocris 公司); HEPES 缓冲液 (pH 7.4),其组成如下 (mmol · L⁻¹): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, 葡萄糖 10, HEPES 10; 0.1% 胎牛血清白蛋白 (Sigma 公司); ANP 检测试剂盒 (北京北方生物技术研究所)。

1.4 仪器 RM6240C 生物记录系统 (成都仪器厂), DFM-96 型 γ 计数器 (合肥众成机电技术公司), TDL-5000B 型低温离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 心房灌流模型 实验室自备。该模型主体为透明聚乙烯套管 (外径为 4 mm),其下方固定被剥离的左心房。套管的两侧各埋藏一根细管,同时还包含一条可用于电刺激的白金电极。左侧细管用于灌流缓冲液,而右侧则与压力感受器相连,用于测定心房搏动压的变化。实验过程中每次收集 2 min 内的灌流液,用于测定环磷酸腺苷 (cAMP) 和尿钠肽 (ANP) 含量的变化。

2.2 手术操作过程 家兔用乌拉坦 (20 mg · kg⁻¹) 麻醉,迅速开胸,取出心脏,剥离其左侧部分,并固定在 Cho 等^[8]研制的心房灌流模型上。同时给予 1.3 Hz 的电刺激 (电刺激时间 0.3 ms; 电压 30 ~ 40 V) 以维持左心房搏动,并用氧饱和的 HEPES 缓冲液行心房持续灌流。灌流约 60 min 心房搏动可达到稳定状态。

2.3 实验步骤

2.3.1 待心房搏动稳定后,经过 3 个正常组循环 (每 12 min 定为 1 个实验循环),处理高、中、低 3 种不同剂量的远志水提取物 (0.3, 0.1, 0.03 g · L⁻¹) 2 个循环。

2.3.2 经过 1 个正常组循环后,先处理 0.1% -AR 阻断剂普萘洛尔 (1 μ mol · L⁻¹) 或 β_1 -AR 受体阻断剂 CGP 20712 (0.3 μ mol · L⁻¹) 或 β_2 -AR 受体阻断剂 ICI 118,551 (0.3 μ mol · L⁻¹) 2 个循环,在阻断剂存在的情况下继续处理远志水提取物中剂量组 (0.1 g · L⁻¹) 2 个循环。

2.3.3 经过 1 个对照组循环后,先处理 L-型 Ca²⁺ 通道阻断剂地尔硫卓 (5 μ mol · L⁻¹) 2 个循环,在地尔硫卓存在的情况下再处理远志水提取物 (0.1 g · L⁻¹) 2 个循环。

2.3.4 经过 1 个正常组循环后,先处理选择性蛋白激酶 A 阻断剂 KT5720 (3 μ mol · L⁻¹) 2 个循环,在 KT5720 存在的情况下再处理远志水提取物 (0.1 g · L⁻¹) 2 个循环。

2.4 指标检测

2.4.1 心房搏出量 通过观察心房舒缩活动过程中透明套管水柱的变化,并进行相关换算测得。

2.4.2 心房搏动压 心房灌流装置中用于测定心房搏动压的细管通过 YPJ01 型压力换能器 (成都仪器厂) 连接 RM6240C 生物记录系统实时记录心房搏动压。

2.4.3 cAMP, ANP 含量 用放免试剂盒 (北京北方生物技术研究所生产) 进行测定。

2.5 统计学处理 用 Prism 统计软件进行处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用非配对 *t* 检验进行分析, *P* < 0.05 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 对家兔心肌收缩力及 ANP 分泌的影响 与对

对照组比较,远志水提取物在高、中、低剂量(0.3, 0.1, 0.03 g·L⁻¹)时均能明显地增加心肌收缩力和 cAMP 流出量,且呈剂量依赖性递增($P < 0.05$)。此外,远志还能显著抑制心房 ANP 的分泌,且抑制程度随着给药浓度的增高而逐渐增加($P < 0.05$)。实验结果显示,远志可不同程度的增强心肌收缩力,并抑制 ANP 分泌,其中远志 0.1 g·L⁻¹对强心及抑制 ANP 效果最好。见表 1。

3.2 β -受体阻断剂对远志的强心作用及 ANP 分泌的影响 非选择性 β -AR 阻断剂普萘洛尔 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能明显抑制远志 0.1 g·L⁻¹对心肌收缩力的增强作用($P < 0.05$);选择性 β_1 -AR 阻断剂 CGP 20712 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能显著性抑制远志 0.1 g·L⁻¹

的强心作用($P < 0.05$);而选择性 β_2 -AR 阻断剂 ICI 118,551 却无任何效应。此外,3 种 β -AR 阻断剂均不能改变远志对 ANP 分泌的抑制效应。见表 2。

3.3 L-型 Ca²⁺通道及 PKA 阻断剂对远志水提取物的强心作用及 ANP 分泌的影响 L-型 Ca²⁺通道阻断剂地尔硫卓 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 PKA 阻断剂 KT5720 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 均能显著性地抑制远志 0.1 g·L⁻¹对心肌收缩力的增强作用($P < 0.05$)。此外,地尔硫卓能增加心房 ANP 分泌,并可部分阻断远志 0.1 g·L⁻¹对 ANP 分泌的抑制作用($P < 0.05$);KT5720 则不能改变中药提取物对 ANP 分泌的抑制效应。见表 3。

表 1 远志水提取物对家兔心房搏出量、搏动压、cAMP 流出量及 ANP 分泌量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量 /g·L ⁻¹ | 心房搏出量 / $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ | 心房搏动压 /mmHg | cAMP 流出量 / $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ | ANP 分泌量 / $\text{ng}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ |
|----|-----------------------|---|---------------------------|--|---|
| 对照 | - | 442.65 ± 29.86 | 3.39 ± 0.13 | 0.78 ± 0.09 | 19.45 ± 2.14 |
| 远志 | 0.03 | 507.06 ± 30.03 ¹⁾ | 3.80 ± 0.15 ¹⁾ | 1.05 ± 0.13 ¹⁾ | 15.46 ± 0.78 ¹⁾ |
| | 0.1 | 573.12 ± 34.15 ²⁾ | 4.26 ± 0.17 ²⁾ | 1.59 ± 0.20 ²⁾ | 12.03 ± 1.34 ²⁾ |
| | 0.3 | 627.03 ± 40.38 ³⁾ | 4.73 ± 0.14 ³⁾ | 2.93 ± 0.14 ³⁾ | 9.52 ± 0.62 ³⁾ |

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与远志低剂量组比较²⁾ $P < 0.05$;与远志中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 β, β_1, β_2 -AR 阻断剂对远志水提取物强心作用及 ANP 分泌的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/g·L ⁻¹ | 心房搏出量/ $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ | 心房搏动压/mmHg | ANP 分泌量/ $\text{ng}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ |
|-------------|----------------------|--|-----------------------------|--|
| 对照 | - | 478.36 ± 23.82 | 3.67 ± 0.15 | 22.47 ± 2.57 |
| 普萘洛尔 | 1 | 391.02 ± 21.24 ¹⁾ | 3.12 ± 0.17 ¹⁾ | 23.37 ± 3.53 |
| 普萘洛尔 + 远志 | 1 + 0.1 | 416.22 ± 28.19 ¹⁾ | 3.21 ± 0.16 ¹⁾ | 12.52 ± 1.74 ^{1,2)} |
| CGP 20712 | 0.3 | 428.58 ± 25.67 ¹⁾ | 3.23 ± 0.15 ¹⁾ | 22.71 ± 3.12 |
| CGP + 远志 | 0.3 + 0.1 | 439.41 ± 23.35 ¹⁾ | 3.32 ± 0.12 ¹⁾ | 13.02 ± 2.62 ^{1,3)} |
| ICI 118,551 | 0.3 | 436.17 ± 24.22 ¹⁾ | 3.31 ± 0.18 ¹⁾ | 23.67 ± 2.83 |
| ICI + 远志 | 0.3 + 0.1 | 568.34 ± 22.57 ^{1,4)} | 4.12 ± 0.17 ^{1,4)} | 12.84 ± 1.93 ^{1,4)} |

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与普萘洛尔组比较²⁾ $P < 0.05$;与 CGP 组比较³⁾ $P < 0.05$;与 ICI 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。普萘洛尔、CGP 20712、ICI 剂量单位均为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 3 L-型 Ca²⁺通道及 PKA 阻断剂对远志强心作用及 ANP 分泌的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/g·L ⁻¹ | 心房搏出量/ $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ | 心房搏动压/mmHg | ANP 分泌量/ $\text{ng}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ |
|-------------|---------------------------|--|---------------------------|--|
| 对照 | - | 483.59 ± 24.02 | 3.74 ± 0.13 | 24.21 ± 2.26 |
| 地尔硫卓 | 5 | 196.52 ± 23.24 ¹⁾ | 1.31 ± 0.15 ¹⁾ | 35.42 ± 1.67 ¹⁾ |
| 地尔硫卓 + 远志 | 5 + 0.1 | 207.22 ± 28.39 ¹⁾ | 1.45 ± 0.16 ¹⁾ | 34.02 ± 2.76 ¹⁾ |
| KT5720 | 3 | 427.33 ± 25.12 ¹⁾ | 3.18 ± 0.13 ¹⁾ | 25.06 ± 1.86 |
| KT5720 + 远志 | 3 + 0.1 g·L ⁻¹ | 438.63 ± 26.15 ¹⁾ | 3.27 ± 0.16 ¹⁾ | 26.41 ± 2.03 |

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。地尔硫卓、KT5720 剂量单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

β -AR 存在于心肌细胞膜上,对心肌收缩-舒张

活动起至关重要的作用。 β -AR 被激活,能增强腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)的活性,进而升高心

肌细胞内 cAMP 水平,最终提高 Ca^{2+} 浓度,引起心肌收缩力的增强。近期研究发现, β -AR 一般可分为 3 种亚型: β_1 、 β_2 和 β_3 ^[9]。其中 β_1 和 β_2 -AR 在心肌细胞膜上共存,且激活不同的信号途径,两者之中又以 β_1 -AR 系统为主要作用部位^[10-11]。 β_1 和 β_2 -AR 均与膜上的三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白相连,激活 AC 活性,引起 cAMP 及 Ca^{2+} 浓度的增高。此外,cAMP 作为细胞内第二信使对心脏肌力及 ANP 的分泌起主要调节作用。细胞内 cAMP 水平增高,能激活 PKA 的活性,对细胞膜上的 L-型 Ca^{2+} 通道起磷酸化作用,进而增加细胞外 Ca^{2+} 内流,提高心肌收缩力。本实验结果显示,远志水提取物能增加家兔心房搏出量、搏动压和 cAMP 流出量,并呈剂量依赖性递增。远志的强心作用在广泛阻断 β -AR 及选择性阻断 β_1 -AR 时出现被抑制,而选择性阻断 β_2 -AR 受体则不受任何影响。另外,在阻断 L-型 Ca^{2+} 通道或蛋白激酶 A(PKA)活性的情况下,远志的强心作用明显地出现被抑制现象。因此,本研究认为远志水提取物对心肌收缩力的增强作用可能与心肌细胞的 β_1 -AR-cAMP- Ca^{2+} 信号传导途径有关。

心脏不仅是泵血器官,同时还具有内分泌功能。研究表明,心肌收缩力的变化与 ANP 的分泌关系密切,而此种机制与心肌细胞膜内的 cAMP 水平和 Ca^{2+} 浓度变化有紧密的联系。据部分研究报告表明,cAMP 水平和 Ca^{2+} 浓度的增高能抑制心房肌细胞对 ANP 的分泌功能^[12-13]。本实验中发现地尔硫卓在阻断 L-型 Ca^{2+} 通道时,能显著性增加心房 ANP 的分泌;而远志对 ANP 分泌的抑制作用却在阻断 L-型 Ca^{2+} 通道后,出现明显减弱的现象。说明远志具有抑制 ANP 分泌的作用,而此种机制与经 L-型 Ca^{2+} 通道而内流的 Ca^{2+} 浓度变化有关。

综上所述,远志具有增强心肌收缩力的作用,其作用机制主要与 β_1 -AR-cAMP- Ca^{2+} 信号传导途径密切相关;它还具有抑制 ANP 分泌的功能,而此作用与 L-型 Ca^{2+} 通道引起的细胞内 Ca^{2+} 浓度变化有关。远志水提取物成分比较复杂,其具体的药效成分及作用机制还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 刘大伟,康利平,马百平. 远志化学及药理作用的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(1): 32.
- [2] 余兴华,李滔,李长伟. 远志清脑颗粒对拟痴呆模型小鼠学习记忆的影响及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):185.
- [3] 王丹,张红英,兰艳. 远志水提取物对小鼠学习记忆力及血液学指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(5):188.
- [4] 孙艳,谢婷婷,王东晓,等. 中药远志对慢性应激抑郁大鼠 BDNF 及其受体 Trkb mRNA 表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2009,29(6):1199.
- [5] 孙桂波,邓响潮,李楚华. 远志皂苷对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中药材, 2007, 30(8):991.
- [6] Hong T, Jin G B, Yoshino G, et al. Protective effects of Polygala root in experimental TNBS-induced colitis in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2002,79(3):341.
- [7] 郭健龙,沈志斌. 远志皂苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 黑龙江医药,2005,18(4):263.
- [8] Cho K W, Kim S H, Kim C H, et al. Mechanism basis of atrial natriuretic peptide secretion in beating atria; atrial stroke volume and ECF translocation[J]. Am J Physiol, 1995,268(5 Pt 2): 1129.
- [9] Bylund D B, Eikenberg D C, Hieble J P, et al. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors[J]. Pharmacol Rev, 1994, 46,121.
- [10] Brodde O E, Michel M C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart [J]. Pharmacol Rev, 1999, 51(4): 651.
- [11] 郑铭,韩启德,肖瑞平. 心脏中不同及肾上腺受体亚型的信号体系及其病理生理意义[J]. 生理学报, 2004,56(1):1.
- [12] Cui X, Wen J F, Jin J Y, et al. Protein kinase-dependent and -independent cAMP inhibition of ANP release in beating rabbit atria[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2002, 282(5):1477.
- [13] Wen J F, Cui X, Ahn J S, et al. Distinct roles for L- and T-type channels in regulation of atrial ANP release [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(6): 2879.

[责任编辑 何伟]