

忍冬藤提取物对兔离体肠平滑肌的舒张作用及其机制

王慧, 张海娟, 李志东

(临沂大学药学院, 山东临沂 276000)

摘要: 【目的】胃肠平滑肌过度收缩可引起腹痛腹泻等临床常见的疾病。目前, 临床上对治疗胃肠平滑肌过度收缩的药物主要以西药为主, 如钙离子通道阻断药硝苯地平 and 抗胆碱药阿托品等, 硝苯地平长期使用可引起负性肌力和负性传导的现象, 而阿托品由于其不良反应较大, 在临床应用受到一定的限制。因此, 开发具有有效防治胃肠平滑肌痉挛、低毒、低残留的天然中草药意义重大。试验以兔离体小肠平滑肌为研究对象, 利用丰富的忍冬藤资源, 研究忍冬藤提取物对兔离体小肠平滑肌收缩的影响, 并探讨其作用机制。【方法】采用兔离体小肠平滑肌试验, 应用 BL-420E 生物机能实验系统, 观察忍冬藤提取物对正常状态下兔离体小肠平滑肌自发性收缩的影响; 进而使用工具药乙酰胆碱、组胺和氯化钡致兔小肠痉挛性收缩后, 观察忍冬藤提取物对其痉挛性收缩的影响; 为研究忍冬藤提取物抑制兔离体小肠平滑肌收缩的作用机制, 应用 IP_3 受体阻断剂肝素 (HP)、肌浆网 ryanodine 受体阻断剂钆红 (RR) 和一氧化氮合酶抑制剂左旋硝基精氨酸甲酯 (L-NAME), 探明忍冬藤提取物对兔离体小肠平滑肌作用的机制。【结果】忍冬藤提取物可浓度依赖性抑制兔离体小肠平滑肌自发性收缩, 药物浓度在 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可显著抑制兔离体小肠平滑肌收缩的频率 ($P < 0.05$), 药物浓度在 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可极显著抑制兔离体小肠平滑肌收缩的振幅 ($P < 0.05$); 工具药乙酰胆碱、组胺和氯化钡可显著诱导兔小肠平滑肌收缩的振幅, 忍冬藤提取物可显著抑制由乙酰胆碱、组胺和氯化钡诱导的兔离体小肠平滑肌收缩的频率 ($P < 0.05$), 可极显著抑制兔离体小肠平滑肌收缩的振幅 ($P < 0.01$)。 IP_3 受体阻断剂肝素能增强忍冬藤提取物舒张兔离体小肠平滑肌收缩的作用 ($P < 0.01$), 而肌浆网 ryanodine 受体阻断剂钆红对忍冬藤提取物舒张兔离体小肠平滑肌的作用无明显影响 ($P > 0.05$)。左旋硝基精氨酸甲酯能够部分阻断忍冬藤提取物舒张兔离体小肠平滑肌收缩的作用 ($P < 0.01$)。【结论】忍冬藤提取物可显著抑制兔离体小肠平滑肌收缩的频率和振幅, 其机制可能与增加一氧化氮浓度, 抑制 IP_3 受体介导的内钙释放有关, 但对肌浆网 ryanodine 受体途径引起的内钙释放无关。

关键词: 忍冬藤提取物; 兔; 小肠平滑肌; 钙离子; 一氧化氮

Relaxed Effect of *Caulis Lonicerae* Extraction on Contraction of Intestinal Smooth Muscle of Rabbit *in Vitro* and Its Mechanism

WANG Hui, ZHANG HaiJuan, LI ZhiDong

(School of Pharmaceutical Sciences, Linyi University, Linyi 276000, Shandong)

Abstract: 【Objective】 Excessive gastrointestinal smooth muscle contraction cause abdominal pain and diarrhea diseases in clinical. Recently, Ca^{2+} channel blocker nifedipine and anticholinergic atropine are widely employed in the treatment of gastrointestinal excessive contraction. However, nifedipine has a potent negative inotropic and dromotropic effects with dose increase after long-term administration, and atropine has severe side-effects which highly limited its clinical utilization. Therefore, it is important to develop natural medicines with high activity, low toxicity and no residue. In this research, the effects of *Caulis lonicerae* extraction on spontaneous smooth muscle contractions in isolated rabbit small intestine were investigated and the possible

收稿日期: 2016-01-05; 接受日期: 2016-12-02

基金项目: 国家星火计划项目 (2013GA740080)、山东省科技发展计划项目 (2013GSF11909)

联系方式: 王慧, Tel: 0539-8766716; Fax: 0539-8766716; E-mail: wys450@163.com

mechanism was explored. 【Method】 The *in vitro* intestine movement experiment, was conducted and the BL-420E biologic function analysis system was employed. The influences of *C. loniceræ* extraction on spontaneous contractions of the rabbit intestinal smooth muscle were measured. The effects of *C. loniceræ* extraction on spasmodic muscle contractions were measured by using acetylcholine (ACh), histamine (HA) and BaCl₂. The mechanism of *C. loniceræ* extraction was studied by using inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor antagonist (heparin, HP), ryanodine receptor antagonist (ruthenium red, RR) and a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor (Nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME). 【Result】 The results showed that the extraction of *Caulis loniceræ* extraction dose-dependently inhibited the spontaneous contraction of intestinal smooth muscle. *Caulis loniceræ* extraction, at the concentration of 7.5 g·L⁻¹, showed highly inhibition effects on the frequency of spontaneous contractions ($P < 0.05$). Meanwhile, at the concentration of 5 g·L⁻¹, significantly inhibition effects on the amplitude of spontaneous contractions ($P < 0.05$) were detected. ACh, HA and BaCl₂ significantly induced the amplitude of smooth muscle contractions, and *C. loniceræ* extraction notably inhibited the muscle contractions induced by ACh, HA and BaCl₂ ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). IP₃ receptor antagonist heparin could strengthen the relaxed effects of *C. loniceræ* extraction on intestinal smooth muscle, but ryanodine receptor antagonist ruthenium red had no effect on the relaxation of *C. loniceræ* extraction. L-NAME inhibited the relaxation of *C. loniceræ* extraction ($P < 0.01$). 【Conclusion】 The extraction of *C. loniceræ* inhibited the frequency and amplitude of intestinal smooth muscle contractions of rabbits *in vitro*. The mechanism may be related to the increase of NO concentration in intestinal smooth muscle, and the inhibiting intracellular Ca²⁺ released via IP₃ of sarcoplasmic reticulum.

Key words: extraction of *Caulis loniceræ*; rabbit; intestinal smooth muscle; calcium; nitric oxide

0 引言

【研究意义】仔猪腹泻因具有发病率高、死亡快的特点, 在养猪业危害中居首位^[1]。当由胃肠平滑肌运动异常引起的仔猪功能性腹泻时, 应使用调节肠管运动的药物, 如阿托品、胃复安等, 随着该类药物在临床上出现的诸多副作用^[2-5], 天然中草药在胃肠道疾病的应用中日渐显著。在兽医临床中忍冬藤常被用于急性细菌性痢疾和胃肠炎等病症^[6-8], 但其确切疗效及作用机制尚不明确。因此, 进行忍冬藤对兔肠平滑肌运动的作用及机制研究, 为该药在兽医临床中的应用提供坚实的理论基础。【前人研究进展】一般在医药上将金银花的干燥茎枝称为忍冬藤^[9], 和金银花一样具有抗菌消炎、清热解毒和止肠固痢的作用。《本草纲目》记载: “忍冬, 茎叶及花, 功用皆同”。现代研究证明, 忍冬藤与金银花具有相近的化学成分和药理活性^[10]。2003 年非典爆发流行时金银花每千克高达百元以上, 而忍冬藤一直没有被重视利用^[11]。宋士军等报道, 金银花提取液对兔小肠平滑肌运动具有显著抑制作用, 其作用机制可能是激动 β 受体, 抑制肌浆网释放钙离子和细胞外钙离子进入细胞内有关^[12]。作为和金银花药性相似、价格低廉、来源丰富的忍冬藤对动物胃肠道的调节作用及机理研究鲜见报道, 使其在防治畜禽消化道疾病的应用中受到一定限制。【本研究切入点】忍冬藤可以单方或复方出现用于治疗消化道疾病, 但其作用机制不明确。课题组前期研究表明, 将忍冬藤粉碎后添加到仔猪饲料中, 可有效防治

仔猪腹泻的发生, 其作用机制可能与抑制动物胃肠道运动有关。鉴于此, 本试验采用 BL-420E 生物机能实验系统, 研究忍冬藤提取物对兔小肠平滑肌运动的影响, 并使用不同工具药探明忍冬藤对动物胃肠平滑肌调控的机制。【拟解决的关键问题】开发忍冬藤的药用资源, 探明忍冬藤对动物胃肠道运动的调控机制, 为该药在防治动物消化道疾病的应用中提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验时间及地点

本试验于 2013 年 4 月至 2013 年 10 月在临沂大学药学院山东省鲁南中药材资源开发工程技术研究中心药理学实验室完成。

1.2 材 料

1.2.1 药品及来源 忍冬藤提取物不自制, 原料由山东省平邑县九间棚农业科技园忍冬藤种植基地提供; 氯化钡(批号: 20080410, 上海山浦化工有限公司); 乙酰胆碱(批号: 15917, Acros); 组胺(批号: H7125, Sigma); 肝素(heparin, HP 批号: H0200000, Sigma); 钌红(ruthenium red, RR 批号: SC-202328, Santan cruz); 左旋硝基精氨酸甲酯(nitro-L-arginine methylester, L-NAME 批号: N5751, Sigma)。

1.2.2 仪器及试剂 BL-420E 生物信号采集系统(成都泰盟科技有限公司); JH-2 型张力传感器(中国北京航天医学工程研究所产品); 水浴恒温振荡器(江苏金坛市医疗仪器厂); 台氏液(g·L⁻¹): NaCl 8.0, CaCl₂

0.2, KCl 0.2, MgCl₂ 0.1, NaHCO₃ 1.0, KH₂PO₄ 0.05, 葡萄糖 1.0。

1.2.3 试验动物 选择同批次新西兰大白兔 30 只, 雌雄各半, 体重在 (2.5±0.4) kg, 购自山东省农业科学院畜牧兽医研究所。

1.3 试验方法

1.3.1 忍冬藤提取物制备 准确称取忍冬藤 50 g, 加入 15 倍体积的 15%乙醇, 浸泡 30 min。之后加热至沸腾, 煎煮 3 次, 每次煎煮 1 h, 纱布过滤合并煎煮液。将煎煮液减压浓缩至 20—30 mL, 称量体积, 加入乙醇, 使含醇量达 60%。静置 24 h 后, 过滤, 滤液继续减压浓缩至无醇味, 收集滤液后冷冻干燥备用。

1.3.2 兔离体小肠平滑肌标本的制备 取健康家兔, 禁食 24 h 后, 用木槌猛击兔头枕部致死。迅速沿腹中线打开腹腔, 每只兔取十二指肠同一肠段放入盛有混合气体的饱和台式液中, 洗净肠内容物。将其剪成 2—3 cm 的肠段作为实验标本。

1.3.3 肠管收缩活动的记录 打开 BL-420E 生物机能实验系统, 调零, 定标, 在一通道输入接口处安装张力换能器。调节恒温平滑肌槽, 使水温保持在 (37±0.5) °C, 将台式液加入预管内, 药物管加入 16 mL 台氏液。将标本一端固定于 L 型通气钩上, 另一端连接张力换能器, 持续通入混合气体 (96% O₂, 4% CO₂), 每秒 1—2 个气泡, 温度在 37 °C, 标准负荷 1 g, 平衡 1 h, 待肠管运动稳定后, 开始进行试验。

1.3.4 忍冬藤提取物对小肠平滑肌自主性收缩的影响 待肠管收缩稳定后, 累计加入忍冬藤提取物, 使终浓度分别为 2.5、5、7.5、10、12.5 g·L⁻¹, 加药间隔时间为 5 min, 对照组加入等量生理盐水, 观察忍冬藤提取物对家兔小肠自发性收缩的影响。记录忍冬藤提取物各浓度对小肠自发性收缩的频率和振幅, 并计算抑制率。

频率抑制率 (%) = (给药前平均频率 - 给药后平均频率) / 给药前平均频率 × 100%

振幅抑制率 (%) = (给药前平均振幅 - 给药后平均振幅) / 给药前平均振幅 × 100%

1.3.5 忍冬藤提取物对激动剂 (乙酰胆碱、组胺、氯化钡) 所致肠痉挛性收缩的影响 随机分为 4 组 (n=5), 乙酰胆碱+忍冬藤组、组胺+忍冬藤组、氯化钡+忍冬藤组、生理盐水+忍冬藤组。待肠管收缩稳定后, 各组分别给予乙酰胆碱 (1 μmol·L⁻¹)、组胺 (5 mg·L⁻¹)、氯化钡 (10 mg·L⁻¹), 对照组加入等量生

理盐水, 描记肠肌收缩的运动曲线, 再加入忍冬藤提取物 10 g·L⁻¹, 记录加入忍冬藤后收缩活动的频率和振幅, 计算抑制率。

1.3.6 HP、RR 和 L-NAME 预处理肠肌后对忍冬藤提取物舒张肠肌运动的影响 随机分为 4 组 (n=6), HP + 忍冬藤组、RR + 忍冬藤组、L-NAME+忍冬藤组、生理盐水+忍冬藤组。待肠管收缩稳定后, 各组分别给予 HP (50 mg·L⁻¹)、RR (10 μmol·L⁻¹)、L-NAME (100 μmol·L⁻¹), 孵育 15 min 后, 加入忍冬藤提取物 10 g·L⁻¹, 对照组加入等量生理盐水, 记录加入忍冬藤前后收缩活动的频率和振幅, 计算抑制率。

1.3.7 统计学处理 实验数据以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示, 采用 Origin 8.6 统计分析软件进行统计学分析, 组间差异比较采用单因素方差分析中的 LSD 方法。

2 结果

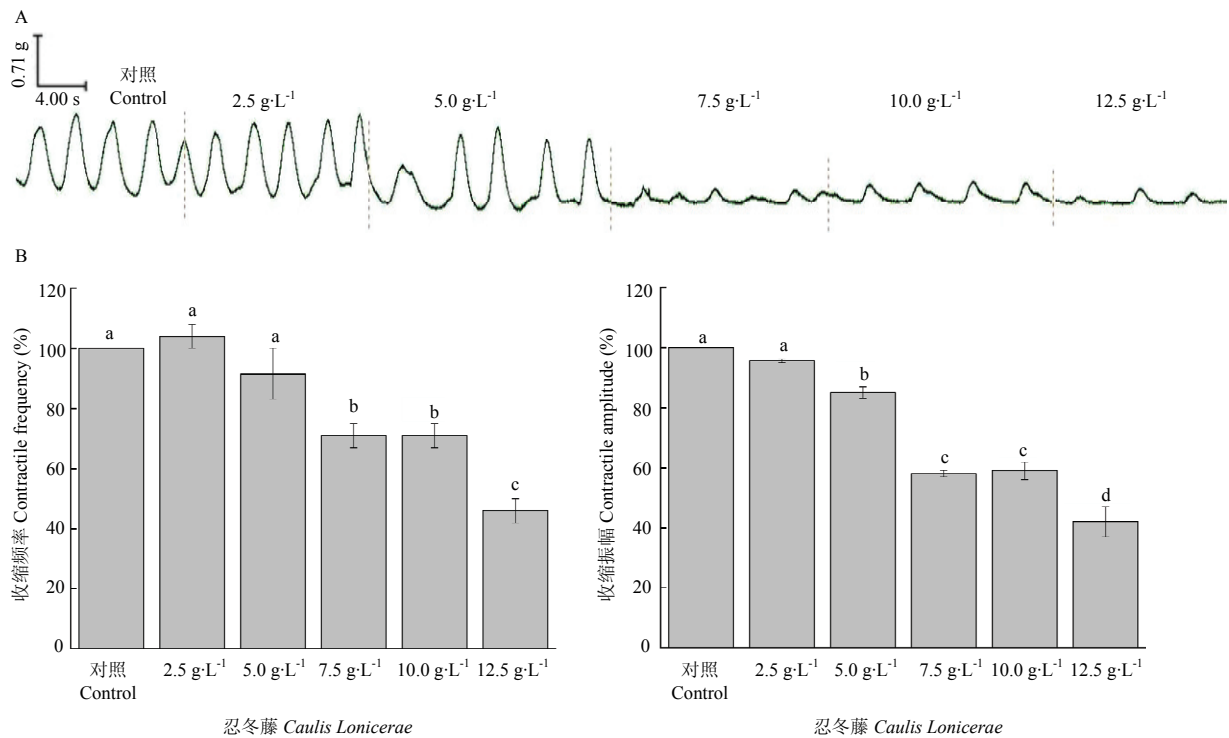
2.1 忍冬藤提取物对兔离体肠平滑肌自发性收缩的影响

2.5—12.5 g·L⁻¹ 忍冬藤能剂量依赖性抑制兔小肠平滑肌收缩, 忍冬藤在较低浓度时对肠肌收缩的频率和振幅均无影响, 随着药物浓度的增加, 对肠肌收缩的抑制作用增强, 与对照组相比, 药物浓度在 7.5 g·L⁻¹ 以上时对肠肌收缩的频率抑制率具有显著差异 ($P < 0.05$), 药物浓度在 5 g·L⁻¹ 以上时对振幅抑制率具有显著差异 ($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 忍冬藤对乙酰胆碱、组胺、BaCl₂ 诱导肠肌收缩后的影响

2.2.1 忍冬藤对乙酰胆碱诱导肠平滑肌收缩的抑制作用 1 μmol·L⁻¹ 乙酰胆碱可明显增强肠平滑肌运动波形, 使肠肌收缩振幅增加 (27.5 ± 2.5) %, 与对照组相比, 具有极显著差异 ($P < 0.01$), 但对收缩频率无影响。加入 10 g·L⁻¹ 的忍冬藤后, 可明显降低乙酰胆碱诱导的肠肌运动波形, 并对收缩频率的抑制具有显著差异 ($P < 0.05$); 对收缩振幅的抑制具有极显著差异 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.2.2 忍冬藤对组胺诱导肠平滑肌收缩的抑制作用 5 mg·L⁻¹ 组胺可明显增强肠平滑肌运动波形, 使收缩振幅增加 (11 ± 1) %, 与对照组相比, 具有显著差异 ($P < 0.05$), 对收缩频率无影响。10 g·L⁻¹ 忍冬藤对组胺诱导的肠平滑肌运动的波形具有抑制作用, 对收缩频率具有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 对收缩振幅具有极显著抑制作用 ($P < 0.01$, 图 3)。

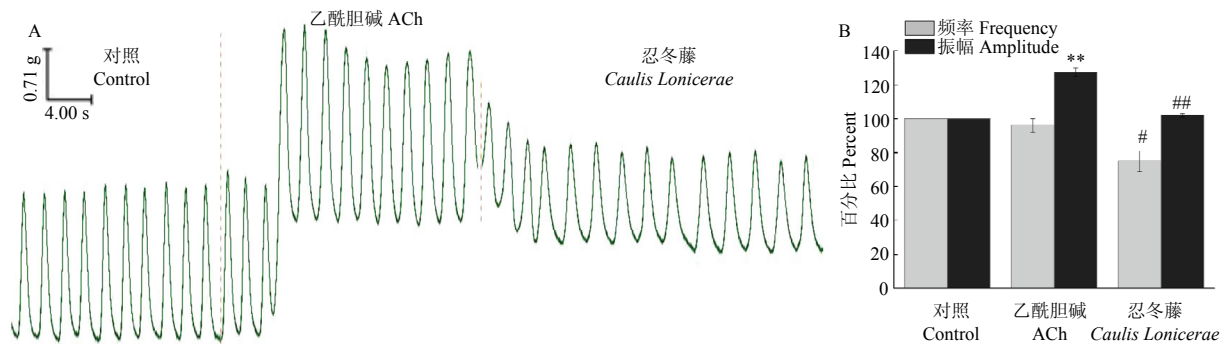


A: 不同浓度忍冬藤对兔小肠平滑肌运动波形的影响; B: 忍冬藤对兔小肠平滑肌运动的频率(左)和振幅(右)的影响。柱状图上方小写英文字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)

A: Representative tracings of the effect of different concentrations of *C. loniceræ* on spontaneous contraction. B: Effect of *C. loniceræ* on the frequencies (left) and amplitude (right) of spontaneous contraction. Bars with different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$)

图 1 忍冬藤对兔小肠平滑肌运动的影响

Fig.1 Effect of the *C. loniceræ* on intestinal smooth muscle motility



A: 忍冬藤对乙酰胆碱诱导的肠肌运动波形的影响; B: 忍冬藤对乙酰胆碱诱导的肠肌收缩的频率和振幅的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. 对照。# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ VS. 乙酰胆碱

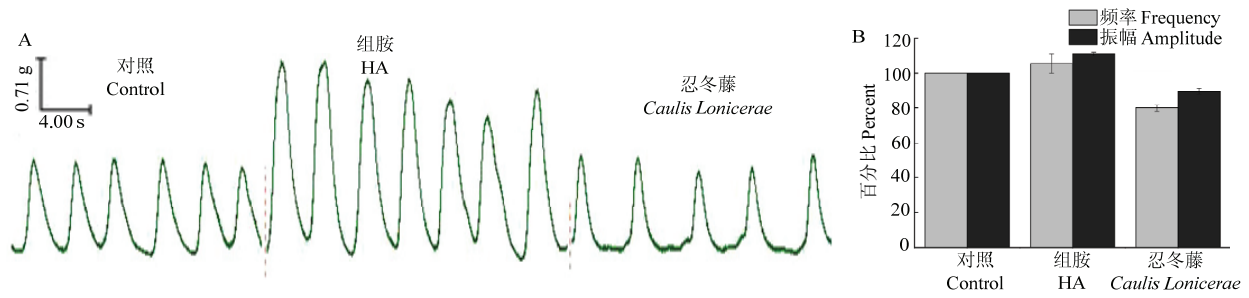
A: Tracings illustrating the effect of *C. loniceræ* on acetylcholine (ACh) induced smooth muscle motility; B: Effect of *C. loniceræ* on the frequency and amplitude of intestinal muscle contractions induced by ACh. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. Control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ VS. ACh

图 2 忍冬藤对乙酰胆碱诱导的肠平滑肌收缩的影响

Fig.2 Effect of *C. loniceræ* on intestinal smooth muscle contractions induced by acetylcholine

2.2.3 忍冬藤对 BaCl_2 诱导肠平滑肌收缩的抑制作用
 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BaCl_2 可明显增强肠平滑肌运动波形, 使肠平滑肌收缩频率增加 8%, 振幅增加 14%, 与对照组

相比, BaCl_2 对收缩振幅的增强具有极显著差异 ($P < 0.01$)。 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 忍冬藤可显著抑制由 BaCl_2 诱导的肠肌收缩的频率和振幅(图 4)。

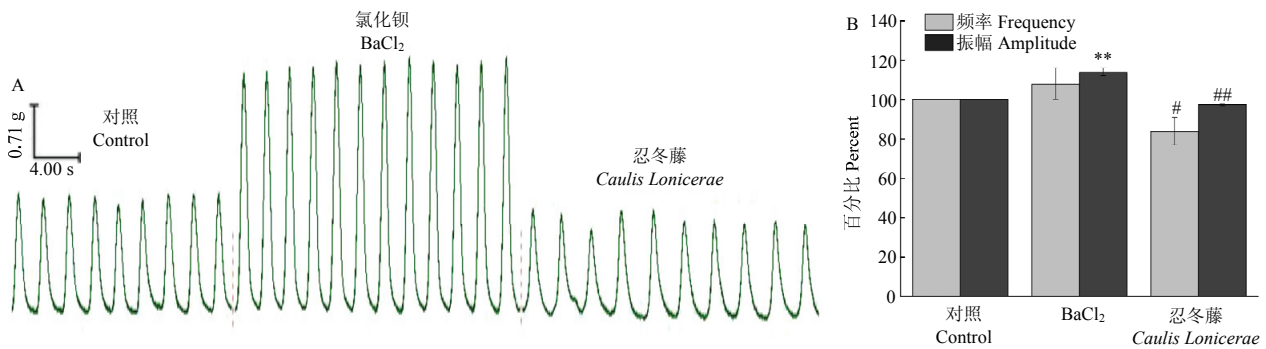


A: 忍冬藤对组胺诱导的肠肌运动波形的影响; B: 忍冬藤对组胺诱导的肠肌收缩的频率和振幅的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. 对照. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ VS. 组胺

A: Tracings illustrating the effect of *C. loniceræ* on histamine (HA) induced smooth muscle motility; B: Effect of *C. loniceræ* on the frequency and amplitude of intestinal muscle contractions induced by HA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. Control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ VS. HA

图 3 忍冬藤对组胺诱导的肠平滑肌收缩的影响

Fig.3 Effect of *C. loniceræ* on intestinal smooth muscle contractions induced by histamine



A: 忍冬藤对氯化钡诱导的肠肌运动波形的影响; B: 忍冬藤对氯化钡诱导的肠肌收缩的频率和振幅的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. 对照. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ VS. 氯化钡。

A: Tracings illustrating the effect of *C. loniceræ* on BaCl₂ induced smooth muscle motility; B: Effect of *C. loniceræ* on the frequency and amplitude of intestinal muscle contractions induced by BaCl₂. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. Control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ VS. BaCl₂.

图 4 忍冬藤对氯化钡诱导的肠平滑肌收缩的影响

Fig.4 Effect of *C. loniceræ* on intestinal smooth muscle contractions induced by BaCl₂

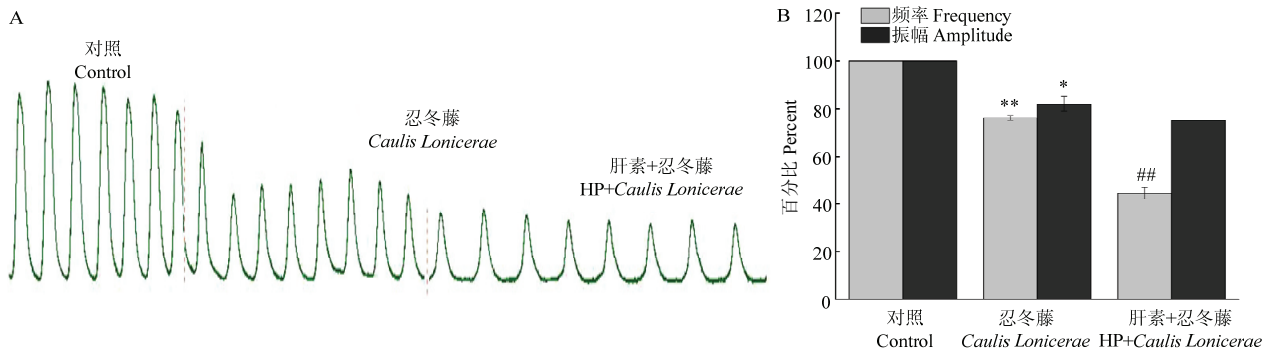
2.3 HP、RR、L-NAME 预处理对忍冬藤舒张肠平滑肌的影响

10 g·L⁻¹ 忍冬藤可显著抑制肠平滑肌收缩的频率和振幅, 50 mg·L⁻¹ 的 IP₃ 受体阻断剂肝素 (heparin, HP) 预孵育后, 可增强忍冬藤舒张肠平滑肌的作用, 对肠平滑肌收缩频率由(76±3)%减为 44.5%($P < 0.01$, 图 5)。

与忍冬藤比较, 肌浆网 ryanodine 受体阻断剂 RR (10 μmol·L⁻¹) 预孵育后对忍冬藤舒张肠平滑肌的作用无明显影响 ($P > 0.05$, 图 6)。一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME (100 μmol·L⁻¹) 预孵育后, 可极显著增加忍冬藤舒张肠平滑肌运动的振幅 ($P < 0.01$, 图 7)。

3 讨论

胃肠平滑肌痉挛可引起腹痛、腹泻等临床常见的疾病。研究表明, 胃肠平滑肌上主要存在某些受体 (M 胆碱能受体、组胺受体和 5-HT 受体等) 和离子通道 (钙离子通道、钾离子通道和钠离子通道) [13-15]。神经递质乙酰胆碱主要通过突触后膜的两大受体系统发挥其生理作用, 即烟碱型受体 (N 受体) 和毒蕈碱型受体 (M 受体), 其中广泛分布于胃肠平滑肌, 并对其具有调控作用的为 M 胆碱能受体。乙酰胆碱激动 M 受体, 可使细胞内第二信使三磷酸肌醇 (IP₃) 和二酰甘油 (DG) 浓度上升, 进而引起细胞内钙离子释放, 浓度增加而产生收缩反应 [16]。组胺可作用于分布在胃

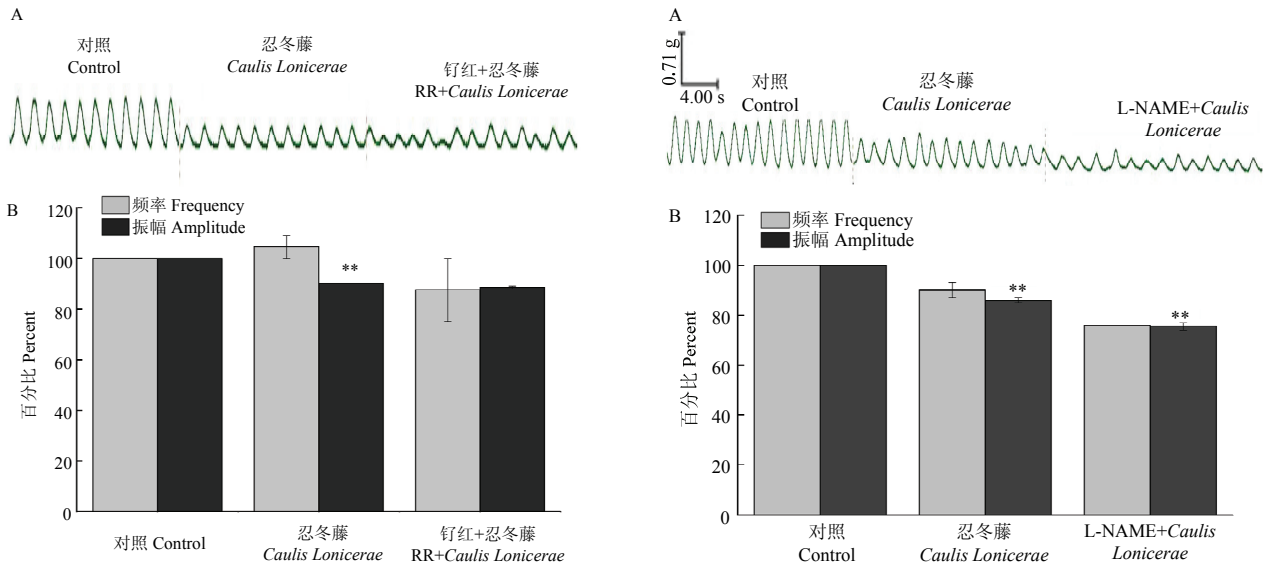


A: 肝素对忍冬藤作用后的肠肌运动波形的影响; B: 肝素对忍冬藤作用后肠肌收缩的频率和振幅的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. 对照。# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ VS. 忍冬藤

A: Tracings illustrating the effect of heparin (HP) on *C. loniceræ* relaxed smooth muscle motility; B: Effect of HP on the frequency and amplitude of intestinal muscle contractions inhibited by *C. loniceræ*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. Control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ VS. *C. loniceræ*

图 5 肝素对忍冬藤抑制肠平滑肌收缩的影响

Fig.5 Effect of HP on intestinal smooth muscle contractions inhibited by *C. loniceræ*



A: 钨红对忍冬藤作用后的肠肌运动波形的影响; B: 钨红对忍冬藤作用后肠肌收缩的频率和振幅的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. 对照

A: Tracings illustrating the effect of ruthenium red (RR) on *C. loniceræ* relaxed smooth muscle motility; B: Effect of RR on the frequency and amplitude of intestinal muscle contractions inhibited by *C. loniceræ*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. Control

图 6 钨红对忍冬藤抑制肠平滑肌收缩的影响

Fig. 6 Effect of RR on intestinal smooth muscle contractions inhibited by *C. loniceræ*

A: L-NAME 对忍冬藤作用后的肠肌运动波形的影响; B: L-NAME 对忍冬藤作用后肠肌收缩的频率和振幅的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. 对照

A: Tracings illustrating the effect of L-NAME on *C. loniceræ* relaxed smooth muscle motility; B: Effect of L-NAME on the frequency and amplitude of intestinal muscle contractions inhibited by *C. loniceræ*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. Control

图 7 L-NAME 对忍冬藤抑制肠平滑肌收缩的影响

Fig. 7 Effect of L-NAME on intestinal smooth muscle contractions inhibited by *C. loniceræ*

肠平滑肌上的 H_1 受体, 以打开细胞膜上允许 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 通透的离子通道, 导致细胞膜去极化, 进而使电压依赖性钙通道开放, 胞内游离钙离子浓度增高, 从而引起胃肠平滑肌收缩^[17]。氯化钡可通过直接刺激胃

肠粘膜, 引起胃肠平滑肌细胞内钙离子释放诱导收缩^[18]。本试验结果表明, 忍冬藤提取物能浓度依赖性抑制肠平滑肌的自发性收缩, 并显著抑制由乙酰胆碱、组胺和氯化钡诱导的肠平滑肌痉挛性收缩。

因乙酰胆碱、组胺和氯化钡引起肠平滑肌痉挛性收缩都与细胞内钙离子浓度增多有关,故推测忍冬藤抑制肠平滑肌痉挛性收缩与降低细胞内钙离子浓度有关。肠平滑肌收缩所需的钙离子主要来源于细胞外通过电压依赖性钙离子通道进入的钙离子和细胞肌浆网内三磷酸肌醇受体和雷诺定受体释放的钙离子,当胞内 Ca^{2+} 浓度达到一定水平 ($1\text{--}50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 时,与肌钙蛋白或肌调蛋白结合,触发平滑肌收缩^[19-20]。为此本试验进一步进行了忍冬藤提取液对内钙释放的影响。

细胞内释放的钙离子主要来自于肌浆网,肌浆网内释放的钙离子主要通过三磷酸肌醇受体 (IP_3) 和雷诺定受体 (ryanodine) 来完成。当这些受体被激活后,可引起肌浆网内钙离子释放,从而引起细胞内钙离子浓度增加,诱导平滑肌收缩^[21-22]。忍冬藤可能通过三磷酸肌醇受体或雷诺定受体途径来完成其对肠平滑肌运动的抑制作用。为此,本试验进行了 IP_3 受体阻断剂肝素 (HP) 和雷诺定受体阻断剂钌红 (RR) 预处理下,忍冬藤对肠平滑肌的作用。结果显示,预先应用 IP_3 受体阻断剂 HP 可显著减弱忍冬藤对肠平滑肌收缩的振幅 ($P<0.01$),而预先应用雷诺定受体阻断剂 RR 后,对忍冬藤舒张肠平滑肌的作用无影响 ($P>0.05$),由此推断, IP_3 受体途径受到抑制,引起细胞内钙离子释放减少可能介导忍冬藤舒张肠平滑肌的作用,但雷诺定受体途径并未介导忍冬藤对肠平滑肌的舒张作用机制。

据报道,神经递质 NO 通过激活平滑肌细胞内的鸟苷酸环化酶,使胞质内 cGMP 浓度增高,钙离子浓度下降,诱导胃肠平滑肌的舒张^[23-25]。本试验采用 NO 合酶抑制剂 L-NAME 预处理肠平滑肌细胞,忍冬藤舒张平滑肌作用明显减弱 ($P<0.01$),表明忍冬藤对肠平滑肌的抑制作用可能与 NO 浓度有关,但其下游的鸟苷酸环化酶有无影响尚需进一步研究。

4 结 论

通过忍冬藤对兔小肠平滑肌运动的影响研究,表明忍冬藤可浓度依赖性抑制自发性肠平滑肌收缩,并对乙酰胆碱、组胺和氯化钡诱导的肠平滑肌痉挛具有显著抑制作用; IP_3 受体阻断剂 HP 和 NO 合酶抑制剂 L-NAME 预处理后可显著增强忍冬藤的舒张作用,而雷诺定受体阻断剂钌红并没有影响忍冬藤的舒张作用。由此得出忍冬藤抑制兔肠平滑肌收缩的作用机制可能为增加小肠平滑肌 NO 浓度,抑制 IP_3 受体介导

的内钙释放,最终使细胞内钙离子浓度降低,平滑肌舒张而达到对肠平滑肌的解痉作用。忍冬藤对动物肠平滑肌运动具有显著的舒张作用,因此,该药在胃肠功能紊乱性疾病的应用中,具有广阔的开发前景。

References

- [1] FARZAN A, KIRCANSKI J, DELAY J, SOLTES G, SONGER J G, FRIENDSHIP R, PRESCOTT J F. An investigation into the association between *cpb2* encoding clostridium perfringens type A and diarrhea in neonatal piglets. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2013, 77(1):45-53.
- [2] JAILWALA J, IMPERIALE T F, KROENKE K. Pharmacologic treatment of the irritable bowel syndrome: a systematic review of randomized controlled trials. *Annals of Internal Medicine*, 2000, 133(2): 136-147.
- [3] ZHOU S, ZHANG L P, ZHAO D M, FENG G Y, SONG X D, ZHANG T, HUANG F. The effects of Weichangshu tablet on intracellular Ca^{2+} concentration in cultured rat gastrointestinal smooth muscle cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2011, 67: 265-273.
- [4] XU G N, YANG K, XU Z P, ZHU L, HOU L N, QI H, CHEN H Z, CUI Y Y. Protective effects of anisodamine on cigarette smoke extract-induced airway smooth muscle cell proliferation and tracheal contractility. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012, 262(1): 70-79.
- [5] YAMAGIWA T, AMINO M, MORITA S, YAMAMOTO R, SAITO T, INOKUCHI S. A case of torsades de pointes induced by severe QT prolongation after an overdose of eperisone and triazolam in a patient receiving Nifedipine. *Clinical Toxicology*, 2010, 48(2):149-152.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, I 部[S]. 北京:化学工业出版社, 2000:133.
Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*, I Volume [S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000:133. (in Chinese)
- [7] SEELINGER G, MERFORT I, SCHEMP C M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Medica*, 2008, 74(14):1667-1677.
- [8] REINDERS R D, BIESTERVELD S, BIJKER P. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 in a model apple juice medium with different concentrations of proline and caffeic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(62) 863-2866.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, I 部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005:133.

- Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*, I volume [S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005:133. (in Chinese)
- [10] LIM T K. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. *Fruits*, 2014, 7:656-680.
- [11] 吴德峰, 王丽辉, 黄玉树, 翁顺太, 张明新, 何玉峰. 忍冬藤作为肉鸡饲料添加剂的促生长和免疫作用研究. *家畜生态学报*, 2007, 28(3):23-28.
- WU D F, WANG L H, HUANG Y S, WONG S T, ZHANG M X, HE Y F. Studies on enhancing immunity and raising productivity of meat chicks by feed additive of honeysuckle rattan. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2007, 28(3):23-28. (in Chinese)
- [12] 宋士军, 李芳芳, 徐瑛, 张丽华, 袁芳, 张翼. 金银花和黄芩对家兔小肠平滑肌收缩和电活动的影响. *中国应用生理学杂志*, 2009, 25(3): 344-348.
- SONG S J, LI F F, XU Y, ZHANG L H, YUAN F, ZHANG Y. Effects of *Honeysuckle Flower* and *Scutellaria Baicalensis Georgi* on contraction and electric activity of rabbit small intestine smooth muscle. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2009, 25(3): 344-348. (in Chinese)
- [13] SANDERS K.M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterology and Motility*, 2008, 20(1): 39-53.
- [14] WANG H, YIN G H, YU C H, WANG Y S, SUN Z L. Inhibitory effect of sanguinarine on PKC-CPI-17 pathway mediating by muscarinic receptors in dispersed intestinal smooth muscle cells. *Research in Veterinary Science*, 2013, 95(3):1125-1133.
- [15] UNNO T, KWON S C, OKAMOTO H, IRIE Y, KATO Y, MATSUYAMA H, KOMORI S. Receptor signaling mechanisms underlying muscarinic agonist-evoked contraction in guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 2003, 139, 337-350.
- [16] EHLERT F J, OSTROM R S, SAWYER G W. Subtypes of the muscarinic receptor in smooth muscle. *Life Sciences*, 1997, 61(18): 1729-1740.
- [17] BOLTON T B, CLARK J P. Effects of histamine, high Potassium and carbochol on K efflux from longitudinal muscle of guinea-Pig intestine. *The Journal of Physiology*, 1981, 320:347.
- [18] 韩坚, 陈孝健. 离体肠管实验的研究概况. *中医药导报*, 2008, 14(3):94-97.
- HAN J, CHEN X J. Study overview of invisible spectro intestine experiment. *Guiding Journal of TCM*, 2008, 14(3):94-97. (in Chinese)
- [19] BOLTON T B, PRESTWICH S A, ZHOLOS A V, GORDIENKO D V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annual Review of Physiology*, 1999, 61:85-115.
- [20] 张佳, 邵正威, 高雅, 王巧云. 槲皮素对兔离体肠平滑肌的舒张作用及其机制. *中国应用生理学杂志*, 2013, 29(2):162-165.
- ZHANG J, SHAO Z W, GAO Y, WANG Q Y. Influences of quercetin on contraction of small intestine smooth muscle of rabbits in vitro and its mechanism. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2013, 29(2):162-165. (in Chinese)
- [21] BOLTON T B, GORDIENKO D V, PUCOVSKY V, PARSONS S, POVSTYAN O. Calcium release events in excitation-contraction coupling in smooth muscle. *Novartis Foundation Symposium*, 2002, 24(6):154-168.
- [22] MCCARRON J G, CHALMERS S, BRADLEY K N, MACMILLAN D, MUIR T C. Ca^{2+} microdomains in smooth muscle. *Cell Calcium*, 2006, 40:461-493.
- [23] FREI E, HUSTER M, SMITAL P, SCHLOSSMANN J, HOFMANN F, WEGENER J W. Calcium-dependent and calcium-independent inhibition of contraction by cGMP/cGKI in intestinal smooth muscle. *American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology*, 2009, 297:G834-G839.
- [24] HOFMANN F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280:1-4.
- [25] MURTHY K S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annual Review of Physiology*, 2006, 68:345-374.

(责任编辑 林鉴非)