

引用格式:

徐海云, 王帅帅, 谭成杰, 胡菊芳, 陈小军. 钩吻醇提取物对兔离体肠肌的舒张作用及其机制[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(4): 461-465.

XU H Y, WANG S S, TAN C J, HU J F, CHEN X J. Relaxed effect of *Gelsemium elegans* Benth extraction by ethanol on intestinal smooth muscle of rabbit in vitro and its mechanism[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2020, 46(4): 461-465.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



钩吻醇提取物对兔离体肠肌的舒张作用及其机制

徐海云^{1,2}, 王帅帅^{1,2#}, 谭成杰^{1,2}, 胡菊芳¹, 陈小军^{1,2*}

(1.湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省兽药工程中心, 湖南 长沙 410311)

摘要:采用 BL-420E 生物机能实验系统, 观察钩吻醇提取物对兔离体肠肌自主收缩及对工具药乙酰胆碱(Ach)、BaCl₂ 和组胺(HA)所致痉挛性收缩的影响, 并探讨肌浆网 Ryanodine 受体阻断剂钆红(GdCl₃)、三磷酸肌醇(IP₃)受体阻断剂肝素钠(HP)和一氧化氮合酶抑制剂左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)对钩吻醇提取物作用的影响。结果表明: 终质量浓度 0.16~0.64 mg/mL 钩吻醇提取物可剂量依赖性抑制离体肠肌自主收缩频率和张力; 终质量浓度 0.32 mg/mL 钩吻醇提取物对 BaCl₂、HA 诱导的离体肠肌收缩频率和张力具有显著抑制作用($P < 0.05$), 对 Ach 诱导的离体肠肌的收缩频率具有显著抑制作用($P < 0.05$), 对张力有极显著抑制作用($P < 0.01$); RR、HP 和 L-NAME 对经钩吻醇提取物预处理的离体肠肌的收缩频率和张力分别表现为无影响、显著增强和显著拮抗($P < 0.05$)。

关键词: 兔; 离体肠肌; 钩吻醇提取物; 舒张作用; 工具药; 阻断剂; 抑制剂

中图分类号: S816.7; S859.79^{†7} 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2020)04-0461-05

Relaxed effect of *Gelsemium elegans* Benth extraction by ethanol on intestinal smooth muscle of rabbit in vitro and its mechanism

XU Haiyun^{1,2}, WANG Shuaishuai^{1,2#}, TAN Chengjie^{1,2}, HU Jufang¹, CHEN Xiaojun^{1,2*}

(1.College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Engineering Research Center of Veterinary Drugs of Hunan Province, Changsha, Hunan 410311, China)

Abstract: In this experiment, the BL-420E biological function experiment system was used to investigate the effect of *Gelsemium elegans* Benth extraction by ethanol(GEBEE) on the independent contraction of isolated intestinal muscles in rabbits and the spasmodic contraction induced by Ach, BaCl₂ and HA, and to explore the effect of sarcoplasmic reticulum Ryanodine receptor blocker RR, IP₃ receptor blocker HP and nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on GEBEE. The results showed that 0.16-0.64 mg/mL of GEBEE could inhibit the voluntary contraction frequency and tension of isolated rabbit intestinal muscles in a dose-dependent manner. The 0.32 mg/mL of GEBEE significantly inhibited the contraction frequency and tension of isolated rabbit intestinal muscles induced by BaCl₂ and HA($P < 0.05$) and the contraction frequency of isolated rabbit intestinal muscles induced by Ach($P < 0.05$), while highly significantly inhibited the contraction tension of isolated rabbit intestinal muscles induced by Ach($P < 0.01$). For the contraction frequency and tension of isolated rabbit intestinal muscles pretreated with GEBEE, RR, HP and L-NAME showed no effect, significant enhancement and significant antagonism($P < 0.05$), respectively.

Keywords: rabbit; intestinal smooth muscle; *Gelsemium elegans* Benth extraction by ethanol; relaxed effect; tool medicine; blocker; inhibitor

收稿日期: 2019-05-21

修回日期: 2019-09-02

基金项目: 国家重点研发计划专项(2017YFD0501403); 国家自然科学基金项目(31572563)

作者简介: 徐海云(1995—), 女, 新疆阿克苏人, 硕士研究生, 主要从事兽医药理学研究, 2762615882@qq.com; #并列第一作者, 王帅帅(1994—), 男, 山东滨州人, 硕士研究生, 主要从事兽医药理学研究, m15165558513@163.com; *通信作者, 陈小军, 副教授, 主要从事植物功能成分药理研究, xj92e2@163.com

钩吻(*Gelsemium elegans* Benth)又名胡蔓藤、大茶药、断肠草等。据其产地可分为2类:一类是美洲钩吻,主产地在美洲;另一类主产地在亚洲,如中国的浙江、福建、广东、广西、湖南、贵州、云南等地^[1]。适当剂量的钩吻对牛、猪、羊等有增肥作用,广东、广西、福建等地常将钩吻称为猪人参,伴饲以促进猪生长^[2]。本课题组在预试验中发现,将一定剂量的钩吻醇提取物(GEBEE)添加到饲料中,可有效防治仔猪腹泻。

腹泻与各种原因导致的胃肠蠕动过快和胃肠内液体过多密切相关。平滑肌收缩依赖于细胞内 Ca^{2+} 浓度,而细胞内 Ca^{2+} 浓度取决于内钙释放和外钙流入,外钙流入需钙通道的开放。 $BaCl_2$ 是非受体作用的有毒化合物,是临床药理试验中常用作研究胃肠运动的工具药,可直接刺激胃肠黏膜促进胞内 Ca^{2+} 释放而诱导胃肠平滑肌收缩^[3];乙酰胆碱(Ach)作为神经递质,能激动平滑肌上的M受体,M受体耦联G蛋白,促进肌浆网内第二信使三磷酸肌醇(IP₃)和二酰基甘油水平升高,进而引起 Ca^{2+} 释放和底物蛋白磷酸化,激发平滑肌产生收缩效应^[4];组胺(HA)作用于肠平滑肌上的H₁受体,打开细胞膜上的 $Na^+-K^+-Ca^{2+}$ 通道,使细胞膜去极化,从而使电压依赖性钙通道开放, Ca^{2+} 内流,胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高而引起肠肌收缩^[5-6]。

钩吻抗腹泻作用是否与抑制胃肠蠕动有关,尚少见报道。本研究中,利用BL-420E生物机能系统观察钩吻醇提取物对兔离体肠肌运动的影响,并利用相关工具药研究钩吻醇提取物对兔离体肠肌运动调控的机制,以期为更好地开发钩吻提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物

同批次健康家兔30只(雌雄各半),体质量为2.5~3.0 kg,购自湖南斯莱克景达生物科技有限公司。

1.1.2 主要供试药品

钩吻醇提取物由湖南泰谷生物科技股份有限公司提供,其总生物碱含量为6.44%。工具药:乙酰胆碱(Ach,批号为D1708B46022)和组胺(HA,批号为Y14J8J39911)为上海源叶生物科技有限公司产

品;氯化钡($BaCl_2$,批号为20170823)为上海山浦化工有限公司产品;钨红(RR,批号为170720)为上海如吉生物科技发展有限公司产品;左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME,批号为20171032)和肝素钠(HP,批号为704D023)为北京索莱宝生物科技有限公司产品。

1.1.3 主要试剂及仪器

台式液中 $NaCl$ 、 $CaCl_2$ 、 KCl 、 $MgCl_2$ 、 $NaHCO_3$ 、 KH_2PO_4 、葡萄糖的质量浓度分别为8.0、0.2、0.2、0.1、1.0、0.05、1.0 g/L。BL-420E生物机能试验系统为成都泰盟科技有限公司产品;JH-2型张力传感器为中国北京航天医学工程研究所产品;水浴恒温振荡器为江苏金坛市医疗仪器厂产品。

1.2 方 法

1.2.1 兔离体肠肌的制备

将家兔禁食不禁水24 h后,猛击兔头枕部处死,用剪刀快速打开腹腔,取出十二指肠,置于装有4℃台氏液的玻璃培养皿中,轻轻洗净肠内容物,并沿肠壁剥离肠系膜,将其剪成2~3 cm的肠段,备用。

1.2.2 肠肌收缩活动的记录

根据BL-420E生物机能实验系统操作说明书,并参照王慧等^[7]的方法进行操作,待肠肌收缩稳定后,开始试验。

1.2.3 钩吻醇提取物对兔离体肠肌收缩影响的测定

除GEBEE用0.2%乙醇溶解外,其余试剂均以台氏液溶解。待肠管收缩稳定后,分别先后加入台氏液和0.2%乙醇作为正常对照组(CK)和溶剂对照组(CK1)。然后用微量加样器往药槽加入GEBEE,每次0.05 mL,加药间隔时间为5 min,累计加入终质量浓度分别为0.16、0.32、0.48、0.64 mg/mL(分别记为T1、T2、T3、T4组)。每组5个重复。记录肠肌的收缩频率和平均张力,并参照王慧等^[7]的方法计算抑制率,结果采用张力百分比和频率百分比表示。

1.2.4 钩吻醇提取物对 $BaCl_2$ 、Ach、HA致肠肌痉挛性收缩影响的测定

将兔离体肠随机分为3组: $BaCl_2$ +GEBEE、Ach+GEBEE、HA+GEBEE。每组5个重复。分别记录肠肌的正常收缩频率和张力作为给药前对照,

然后 3 组分别加入终质量浓度 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BaCl_2 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ach、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HA，当肠肌收缩稳定后，记录肠肌的收缩频率和平均张力，再加入 0.32 mg/mL GEBEE，记录肠肌的收缩频率和平均张力，并计算张力百分比和频率百分比。

1.2.5 RR、HP 和 L-NAME 对钩吻醇提取物抑制离体肠肌影响的测定

将离体肠肌随机分为 3 组：GEBEE+RR、GEBEE+HP、GEBEE+L-NAME。每组 5 个重复。待肠肌收缩稳定，分别记录肠肌的正常收缩频率和张力作为给药前对照，随后 3 组均加入 0.32 mg/mL GEBEE，待肠肌收缩稳定后记录肠肌的收缩频率和张力，再分别加入 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ RR、50 mg/L HP、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ L-NAME 作用 10 min，记录肠肌的收缩频率和平均张力，并计算张力百分比和频率百分比。

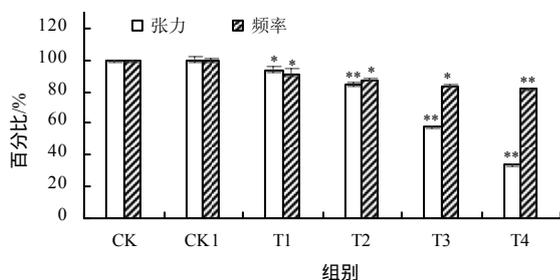
1.2.6 统计分析

运用 GraphPad Prism 5 进行数据统计学分析，采用单因素方差分析中的 LSD 法比较组间差异。

2 结果与分析

2.1 溶剂和钩吻醇提取物对兔离体肠肌运动的影响

由图 1 可知，溶剂对照组离体肠肌的收缩频率和张力与正常对照组间的差异均无统计学意义，说明用 0.2%乙醇溶解 GEBEE 对后续的试验无影响。与 CK 相比，0.16 mg/mL GEBEE 显著抑制肠肌张力($P < 0.05$)，0.32~0.64 mg/mL GEBEE 极显著抑制肠肌张力($P < 0.01$)；0.16~0.48 mg/mL GEBEE 显著抑制肠肌收缩频率($P < 0.05$)，0.64 mg/mL GEBEE 极显著抑制收缩频率($P < 0.01$)。



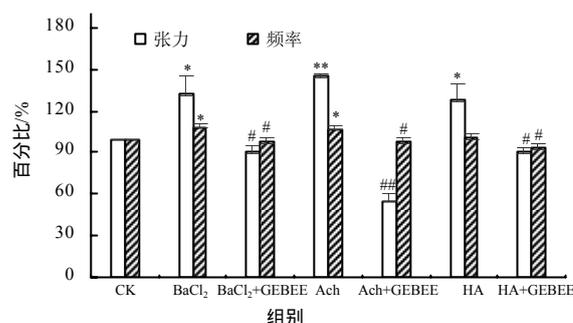
与CK相比，“*”和“**”分别示 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。

图 1 加入不同浓度 GEBEE 后兔离体肠肌的张力百分比和频率百分比

Fig.1 The percent rate of the tension and frequency of isolated rabbit intestinal muscles after adding different concentrations of GEBEE

2.2 钩吻醇提取物对 BaCl_2 和 Ach 与 HA 致肠肌痉挛性收缩的影响

由图 2 可知，与 CK 相比，12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BaCl_2 可显著增强肠肌收缩频率和张力($P < 0.05$)，加入 0.32 mg/mL GEBEE 对 BaCl_2 诱导的肠平滑肌收缩频率和张力具有显著抑制作用($P < 0.05$)；1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ach 可极显著增加离体肠肌的收缩张力($P < 0.01$)，显著增加收缩频率($P < 0.05$)，加入 0.32 mg/mL GEBEE 对 Ach 诱导的离体肠肌的收缩频率具有显著抑制作用($P < 0.05$)，对张力有极显著抑制作用($P < 0.01$)；4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HA 可显著增强离体肠肌的收缩张力($P < 0.05$)，对收缩频率无显著影响($P > 0.05$)；加入 0.32 mg/mL GEBEE 对 HA 诱导的离体肠肌的收缩张力及频率具有显著抑制作用($P < 0.05$)。



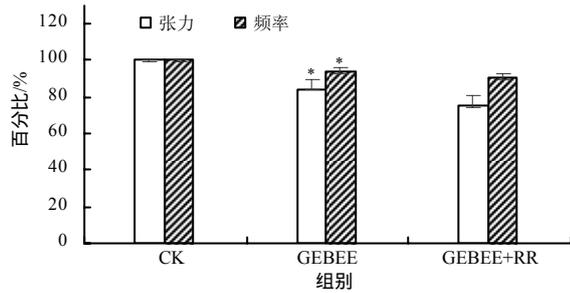
工具药与CK相比，“*”和“**”分别示 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ ；工具药+GEBEE与工具药相比，“#”和“##”分别示 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。

图 2 加入 GEBEE 后 BaCl_2 和 Ach 与 HA 诱导的兔离体肠的张力百分比和频率百分比

Fig.2 The percent rate of the tension and frequency of isolated rabbit intestinal muscles induced by BaCl_2 , Ach and HA after adding GEBEE

2.3 RR 和 HP 与 L-NAME 对钩吻醇提取物抑制兔离体肠肌收缩的影响

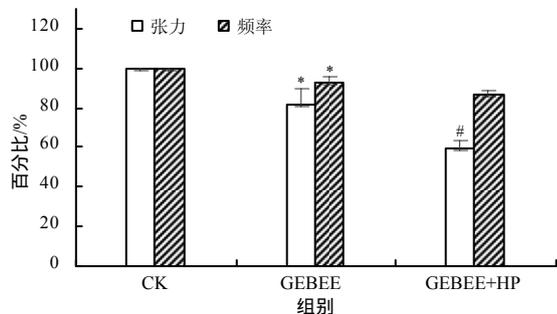
由图 3、图 4 和图 5 可知，0.32 mg/mL GEBEE 对离体肠肌的收缩频率及张力具有显著抑制作用($P < 0.05$)；10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ RR 对钩吻醇提取物抑制小肠平滑肌收缩张力及频率无显著影响($P > 0.05$)；50 mg/L HP 能显著增强钩吻醇提取物对肠肌张力的抑制作用($P < 0.05$)，对抑制肠肌收缩频率无显著性影响($P > 0.05$)；100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ L-NAME 能显著拮抗钩吻醇提取物对肠肌张力和频率的抑制作用($P < 0.05$)。



GEBEE与CK相比, “*”示 $P < 0.05$ 。

图3 加入RR后钩吻醇提取物作用的肠肌的张力百分比和频率百分比

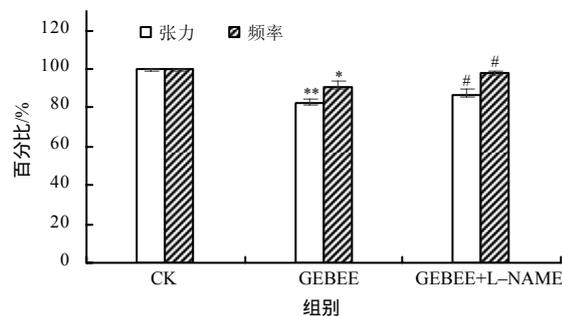
Fig.3 The percent rate of the tension and frequency of isolated rabbit intestinal muscles induced by GEBEE after adding RR



GEBEE与CK相比, “*”示 $P < 0.05$; GEBEE+HP与GEBEE相比, “#”示 $P < 0.05$ 。

图4 加入HP后钩吻醇提取物作用的肠肌的张力百分比和频率百分比

Fig.4 The percent rate of the tension and frequency of isolated rabbit intestinal muscles induced by GEBEE after adding HP



GEBEE与CK相比, “*”和“**”分别示 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$; GEBEE+L-NAME与GEBEE相比, “#”示 $P < 0.05$ 。

图5 加入L-NAME后钩吻醇提取物作用的肠肌的张力百分比和频率百分比

Fig.5 The percent rate of the tension and frequency of isolated rabbit intestinal muscles induced by GEBEE after adding L-NAME

3 结论与讨论

胃肠平滑肌挛缩可致腹痛腹泻。本研究中, 终质量浓度 0.16~0.64 mg/mL 钩吻醇提取物对兔离体肠肌自发性收缩张力与频率有明显剂量依赖性抑制效应, 可能是临床上钩吻有效防治仔猪腹泻的原因之一。钩吻具有抗炎^[8]、增强免疫^[9]、改善肠道形态、调整盲肠菌群^[10]等作用, 防治腹泻可能是钩吻多种药理作用的综合发挥。本研究结果表明, 钩吻醇提取物可拮抗 BaCl₂、Ach 和 HA 所致肠肌痉挛性收缩作用, 推测钩吻醇提取物对肠肌的舒张作用可能与阻断 M 受体和 H₁ 受体有关, 具有钙通道阻滞作用, 能抑制胞外 Ca²⁺内流, 亦可抑制胞内 Ca²⁺释放。

本研究中, 相同浓度钩吻醇提取物处理的不同肠肌, 其收缩张力和频率具有一定的差异, 这可能是由于不同离体肠段试验时离体时长差异所致, 这与王慧等^[7]、罗学娅等^[11]的研究结果一致。胞内 Ca²⁺的释放是通过肌浆网内 IP₃ 受体和 Ryanodine 受体完成^[12], 为进一步研究钩吻醇提取物对内钙释放的影响, 观察了 IP₃ 受体阻断剂 HP 和 Ryanodine 受体阻断剂 RR 对钩吻醇提取物预处理肠肌后的影响。结果显示, IP₃ 受体阻断剂 HP 可显著增强钩吻醇提取物对离体肠肌张力的抑制作用($P < 0.05$); Ryanodine 受体阻断剂 RR 对钩吻醇提取物舒张离体肠肌的作用无明显影响($P > 0.05$)。由此推断, 钩吻醇提取物可能介导了 IP₃ 受体途径, 抑制了胞内 Ca²⁺的释放, 但与 Ryanodine 受体途径所引起的胞内 Ca²⁺释放无关。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, Ca²⁺浓度下降, 诱导胃肠平滑肌舒张^[13]。NO 合酶抑制剂 L-NAME 可以降低组织中 NO 浓度^[14]。本研究结果表明, L-NAME 可显著拮抗钩吻醇提取物舒张平滑肌的作用($P < 0.05$), 表明钩吻醇提取物对肠平滑肌的抑制作用可能与 NO 途径有关, 但对其下游的鸟苷酸环化酶有无影响尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 张振, 乐意, 刘力, 等. 马钱科植物钩吻(*Gelsemium elegans*)的化学研究[J]. 贵州大学学报(自然科学版), 2013, 30(2): 28-32.
ZHANG Z, LE Y, LIU L, et al. Chemical studies on alkaloids from *Gelsemium elegans*[J]. Journal of Guizhou University(Natural Sciences), 2013, 30(2): 28-32.

- [2] 李玉美. 中药钩吻的研究现状[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(20): 8638-8639.
LI Y M. Research situation of *Gelsemium elegans*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(20): 8638-8639.
- [3] 官福兰. 陈皮、枳壳对胃肠运动作用规律和分子机理的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2002.
GUAN F L. Study of the action rule and molecular mechanism Chenpi and Zhiqiao on gastrointestinal movement[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2002.
- [4] 周华, 宋洁, 胡金兰, 等. 平滑肌细胞上的钙库操纵性通道[J]. 生理科学进展, 2005, 36(4): 369-371.
ZHOU H, SONG J, HU J L, et al. Store-operated channels on smooth muscle cells[J]. Progress in Physiological Sciences, 2005, 36(4): 369-371.
- [5] 郭晨云, 李卓玉, 袁静明. 乙酰胆碱受体结构与功能的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2002(4): 40-43.
GUO C Y, LI Z Y, YUAN J M. The recent advances of the structure and function of acetylcholine receptor[J]. Journal of Chinese Biotechnology, 2002, 22(4): 40-43.
- [6] 宋士军, 李芳芳, 张丽华, 等. 何首乌对家兔小肠平滑肌收缩活动和电活动的影响[J]. 河北医科大学学报, 2007, 28(2): 85-88.
SONG S J, LI F F, ZHANG L H, et al. Effect of radix *Polygonum multiflorum* on construction and electric activity of rabbit small intestine smooth muscle[J]. Journal of Hebei Medical University, 2007, 28(2): 85-88.
- [7] 王慧, 张海娟, 李志东. 忍冬藤提取物对兔离体肠平滑肌的舒张作用及其机制[J]. 中国农业科学, 2017, 50(2): 372-379.
WANG H, ZHANG H J, LI Z D. Relaxed effect of *Caulis lonicerae* extraction on contraction of intestinal smooth muscle of rabbit *in vitro* and its mechanism[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(2): 372-379.
- [8] 张楨, 刘光明, 肖怀, 等. 钩吻吲哚生物碱化学成分研究[J]. 中草药, 2011, 42(2): 222-225.
ZHANG Z, LIU G M, XIAO H, et al. Chemical constituents from *Gelsemium elegans*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(2): 222-225.
- [9] 张冬英, 袁慧, 刘亚林. 钩吻对肉鸡免疫功能的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2004, 30(6): 538-541.
ZHANG D Y, YUAN H, LIU Y L. Effect of *Gelsemium elegans* Benth on immune function of broilers[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2004, 30(6): 538-541.
- [10] 陈小军, 王宇, 王帅帅, 等. 钩吻提取物对生长猪生长性能、肠道形态和盲肠菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(9): 3626-3633.
CHEN X J, WANG Y, WANG S S, et al. Effects of *Gelsemium elegans* extracts on growth performance, intestinal morphology and caecal microflora in growing pigs[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(9): 3626-3633.
- [11] 罗学娅, 伦永志, 潘可学, 等. 纳豆枯草杆菌培养滤液对家兔离体肠平滑肌的作用[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(7): 786-789.
LUO X Y, LUN Y Z, PAN K X, et al. Effects of culture filtrate of *Bacillus subtilis* natto on isolated intestinal smooth muscle of rabbits[J]. Chinese Journal of Microecology, 2014, 26(7): 786-789.
- [12] 戴芸. 钙离子在胃肠平滑肌收缩机制中的作用[J]. 国外医学(消化系疾病分册), 2002, 22(1): 17-20.
DAI Y. The role of calcium in the contraction mechanism of gastrointestinal smooth muscle[J]. Foreign Medical Sciences(Section of Digestive Disease), 2002, 22(1): 17-20.
- [13] 张佳, 邵正威, 高雅, 等. 槲皮素对兔离体肠平滑肌的舒张作用及其机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2013, 29(2): 162-165.
ZHANG J, SHAO Z W, GAO Y, et al. Influences of quercetin on contraction of small intestine smooth muscle of rabbits *in vitro* and its mechanism[J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2013, 29(2): 162-165.
- [14] 贾晓宁, 李家栋, 邵正威, 等. 芒柄花素对兔离体肠平滑肌舒张作用的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(8): 2174-2176.
JIA X N, LI J D, SHAO Z W, et al. Influences of formononetin on contraction of small intestine smooth muscle of rabbits *in vitro*[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2014, 34(8): 2174-2176.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳正