

云南昭通天麻松弛血管平滑肌活性成分的筛选

张维明¹, 杨莲², 李秀芳^{2*}, 林青², 李国花², 魏文彬¹

(1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; 2. 云南中医学院药理教研室, 昆明 650500)

〔摘要〕 目的:观察天麻血管平滑肌松弛作用,明确其作用物质基础。方法:采用大鼠离体胸主动脉环灌注实验方法,对天麻血管平滑肌松弛作用进行考察,采用柱色谱法、光谱法(MS,NMR)对其活性成分进行了分离鉴定。结果:天麻能够显著抑制 KCl 引起的大鼠胸主动脉环收缩,从天麻乙酸乙酯提取物中分离并鉴定了 5 个酯溶性酚性成分(Ⅰ~Ⅴ):对羟基苯甲醛(Ⅰ)、对羟基苯甲醚(Ⅱ)、对羟基苯甲醇(Ⅲ)、4,4'-二羟基二苯基甲烷(Ⅳ)、4,4'-二羟基二苄醚(Ⅴ),明确了天麻的血管平滑肌松弛作用是这 5 个成分共同作用的结果。结论:天麻具有显著的血管平滑肌松弛作用,其作用主要由 5 个酯溶性酚性成分共同发挥。

〔关键词〕 天麻;血管平滑肌;活性成分;筛选

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2011)06-0157-04

Screening of Active Compounds from *Gastrodia elata* Blume
for Vascular Smooth Muscle Relaxation

ZHANG Wei-ming¹, YANG Lian², LI Xiu-fang^{2*}, LIN Qing², LI Guo-hua², WEI Wen-bin¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

〔Abstract〕 **Objective:**To study the vascular smooth muscle relaxation effect and explicit the material base of *Gastrodia elata* Blume. **Method:** Tension recording for rat isolated aortic artery was used to study the effect of vascular smooth muscle relaxation. Column chromatography and mass spectrography and nuclear magnetic resonance spectrometry were used to isolate and identify the active compounds of *G. elata* Blume. **Result:** *G. elata* Blume. could significantly inhibit the smooth muscle constriction of isolated aortic artery induced by KCl. Five esterified phenolic compounds(Ⅰ-Ⅴ) were isolated from *G. elata* Blume, such as p-hydroxybenz aldehyde(Ⅰ); p-hydroxybenzyl methylether(Ⅱ); p-hydroxybenzyl alcohol(Ⅲ); 4,4'-dihydroxydiphenyl methane(Ⅳ); 4,4'-dihydroxydibenzyl ether(Ⅴ). The results showed that the vascular smooth muscle relaxation effects were the result of the role of five compounds. **Conclusion:** The five esterified phenolic compounds(Ⅰ-Ⅴ) from *G. elata* Blume. play a combined role for vascular smooth muscle relaxation.

〔Key words〕 *Gastrodia elata* Blume; vascular smooth muscle; active compounds; screening

天麻为我国习用名贵中药材,主产于云南、四川、陕西等地,尤以云南昭通产者最为出名。课题组

前期研究结果提示,天麻乙酸乙酯提取物具有显著的回肠平滑肌松弛作用,其作用机制与钙离子通道

〔收稿日期〕 20101015(002)
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(30760305);云南省应用基础研究计划面上项目(2007C076M);云南省教育厅科学研究基金项目(09J0027)
〔第一作者〕 张维明,讲师,主要从事中药化学研究,Tel: 0871-5227721, 13577186599,E-mail:markzwm@ sina. com
〔通讯作者〕 * 李秀芳,讲师,主要从事中药药理与毒理研究,Tel:0871-5918134,13908856005,E-mail:sofinelxf@ 163. com

阻滞相关^[1],且天麻乙酸乙酯提取物对血管平滑肌也具有松弛作用^[2],但活性成分目前尚不清楚。本研究以云南昭通天麻为研究对象,采用药理活性筛选结合化学成分分离的方法,对天麻的血管平滑肌松弛作用活性成分进行了筛选研究,现将结果报告如下。

1 材料

1.1 药物及试剂 天麻:购自云南省昭通天麻研究所,由陈顺芳副教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Blume. 的干燥块茎;其余化学试剂为市售分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;Krebs-Henseleit (K-H) 营养液内含 NaCl:118.0 mmol·L⁻¹, KCl:4.7 mmol·L⁻¹, CaCl₂:1.25 mmol·L⁻¹, MgSO₄:1.2 mmol·L⁻¹, NaHCO₃:25.0 mmol·L⁻¹, KH₂PO₄:1.2 mmol·L⁻¹, Glucose:10.0 mmol·L⁻¹。

1.2 动物 SD 大鼠,清洁级,雌性,体重 280~300 g,购于四川省医学科学院实验动物研究所,生产许可证号 SCXK(川)2004-16,动物饲养于云南中医学院实验动物中心,清洁级环境。

1.3 仪器 SQG-4 型四腔器官浴槽系统(浴槽体积 5 mL),成都仪器厂;BL-420F 生物机能实验系统:成都泰盟科技有限公司;柱层析用硅胶(200~300 目)、薄层层析用硅胶(10~40 μm),青岛海洋化工厂生产;化学试剂均为工业品重蒸;BRUKER AM-400 MHz 超导核磁共振仪(TMS 内标);AutoSpec Premier P776 双聚焦三扇型磁质谱仪。

2 方法

2.1 天麻提取分离及鉴定

2.1.1 天麻乙酸乙酯提取部位的制备 天麻生药粗粉(2 kg),用 95% 的乙醇浸泡 6 h,连续回流提取 3 次,回流提取时间为每次 3 h。获得总提取物 G1 后,减压浓缩得到深褐色糖浆状醇提物,取 G1 用蒸馏水溶解,加入石油醚反复萃取至石油醚层无色,合并几次萃取的石油醚层,回收石油醚,得到天麻提取物石油醚部分;剩余水层加入乙酸乙酯反复萃取至乙酸乙酯层无色,合并几次萃取的乙酸乙酯层,回收乙酸乙酯,得到天麻乙酸乙酯提取部位 G2。

2.1.2 G2 硅胶柱色谱分离 取 2.1.1 制得的部分 G2 上硅胶柱色谱分离,用环己烷-乙酸乙酯溶剂系统梯度洗脱(100:1~10:1),经反复硅胶柱层析结合薄层层析,分离得到化合物 I~Ⅷ。

2.1.3 结构鉴定 采用核磁共振及质谱对化合物

I~V 进行了结构鉴定。化合物 VI~Ⅷ量较少尚不够进行结构鉴定及活性研究。

2.2 活性考察

2.2.1 大鼠胸主动脉环的制备 取 SD 大鼠,ip 水合氯醛麻醉,迅速取出胸主动脉,置于 4℃ 的 K-H 营养液中,去除血管周围脂肪及结缔组织,制成约 3 mm 长的血管环^[3-4]。血管环悬挂于含有 5 mL 的 K-H 液浴槽中,恒温 37℃,持续通入 95% O₂ + 5% CO₂ 的混合气体。血管环两端分别连于张力传感器和浴槽底部的不锈钢丝,使用 BL-420F 生物机能实验系统记录。最适负荷为 2 g,每隔 15 min 换液 1 次,平衡 1 h 后开始实验。

2.2.2 G2 及 5 个化合物对 KCl 预收缩大鼠胸主动脉环张力的影响^[5] 大鼠胸主动脉环置于 4℃ 的 K-H 营养液中平衡 1 h 后,用终浓度 6×10⁻² mol·L⁻¹ 的 KCl 预刺激两次,冲洗,换液,平衡 15 min,加入终浓度 6×10⁻² mol·L⁻¹ 的 KCl 使收缩达到最大值,然后在浴槽中分别加入生药量相同的(终浓度 800 g·L⁻¹ 均按等生药量及各化合物在 G2 中的提取率计算而得)天麻乙酸乙酯提取部位 G2 及化合物 I~V,记录主动脉环张力的变化,计算血管舒张率。

$$\text{舒张率} = [\text{KCl 预收缩血管环张力(g)} - \text{血管环张力(g)}] / \text{KCl 预收缩血管环张力(g)} \times 100\%$$

3 统计学方法 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS13.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析法。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

4 结果

4.1 结构鉴定 分离并鉴定了 5 个酯溶性酚性成分(I~V)。

化合物 I:淡黄色针状结晶(石油醚-丙酮),分子式, C₇H₅O₂; ESI-MS m/z : 121 [M-H]⁻; ¹H-NMR (MeOD) δ: 9.77 (1H, s), 7.78 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 6.92 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5); ¹³C-NMR (MeOD) δ: 130.3 (s, C-1), 165.2 (s, C-4), 133.4 (d, 2C, C-2, 6), 116.9 (d, 2C, C-3, 5), 192.8 (d, C-7)。以上数据与文献报道^[6-7] 的对羟基苯甲醛(*p*-hydroxybenz aldehyde)数据相符。

化合物 II:无色针状结晶(石油醚-丙酮),分子式 C₈H₁₀O₂; ESI-MS m/z : 137 [M-H]⁻; ¹H-NMR (MeOD) δ: 7.15 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 6.76 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 4.34 (2H, s, CH₂OH),

3.32(3H,s,OCH₃);¹³C-NMR(MeOD)δ:130.0(C-1),158.3(s,C-4),130.6(d,C-2,C-6),116.0(d,C-3,C-5),75.5(t,C-7,CH₂OH),57.8(s,C-8,OCH₃)。以上数据与文献报道^[6]的对羟苄基甲醚(*p*-hydroxybenzyl methylether)数据相符。

化合物Ⅲ:白色粉末,易溶于水及丙酮,分子式C₇H₈O₂;EI-MS *m/z*:124[M⁺];¹H-NMR δ:4.49(2H,s,CH₂OH),7.17(2H,d,*J*=8.4 Hz,H-3,5),6.75(2H,d,*J*=8.4 Hz,H-2,6),¹³C-NMR δ:157.9(s,C-1),133.5(s,C-4),129.8(d,C-3,5),116.1(d,C-2,6),65.1(t,-CH₂)。以上数据与文献报道^[6]的对羟基苯甲醇(*p*-hydroxybenzyl alcohol)数据相符。

化合物Ⅳ:淡黄色针状结晶(石油醚-丙酮),分子式C₁₃H₁₂O₂;EI-MS *m/z*:200[M⁺];¹H-NMR(MeOD)δ:6.96(4H,d,*J*=8.4 Hz),6.68(4H,d,*J*=8.4 Hz),3.76(2H,s,CH₂);¹³C-NMR(MeOD)δ:156.4(C-1,C-1'),41.1(t,C-7),134.2(C-4,C-4')116.0(d,C-2,C-6,d,C-2',C-6'),130.6(d,C-3,C-5,C-3',C-5')。以上数据与文献报道^[9]的4,4'-二羟基二苄基甲烷(4,4'-dihydroxydiphenyl methane)数据相符。

化合物Ⅴ:淡黄色针状结晶(石油醚-丙酮),分子式C₁₄H₁₄O₃;EI-MS *m/z*:230[M⁺];¹H-NMR(MeOD)7.16(4H,d,*J*=8.0 Hz),6.77(4H,d,*J*=8.0 Hz),4.39(4H,s,CH₂),¹³C-NMR(MeOD)δ:158.2(s,C-1,C-1'),130.2(s,C-4,C-4'),72.6(t,C-7,C-7'),116.1(d,C-2,C-6,C-2',C-6'),130.9(d,C-3,C-5,C-3',C-5')。以上数据与文献报道^[10]的4,4'-二羟基二苄醚(4,4'-dihydroxydibenzyl ether)数据相符。

4.2 G2及5个化合物对KCl预收缩大鼠胸主动脉环张力的影响 天麻提取物G2及化合物Ⅰ~Ⅴ以对KCl预收缩的大鼠胸主动脉环均有显著舒张作用,5个化合物中以化合物Ⅰ作用最强(与其他4个化合物相比*P*<0.05或*P*<0.01),化合物Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ,Ⅴ间比较差异均无显著性意义,详见表1。

5 讨论

目前一般认为,天麻素(gastrodin)是天麻的重要活性成分,国家药典中天麻质量标准的制定也主要以天麻素含量作为重要的参考指标,然而,多项关于天麻素药理研究的报道显示,仅以天麻素作为活性指标尚不能全面反映与天麻传统功效相关的药理

表1 G2及5个化合物对KCl预收缩大鼠胸主动脉环张力的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	终浓度 /g·L ⁻¹	KCl 预收缩 张力/g	药后张力 /g	舒张率 /%
空白	-	1.40 ± 0.16	1.42 ± 0.16	0.00 ± 0.00
G2	11.50	1.25 ± 0.25	0.13 ± 0.12	90.25 ± 9.08 ²⁾
Ⅰ	9.48	1.47 ± 0.20	0.24 ± 0.17	84.09 ± 10.33 ²⁾
Ⅱ	13.96	1.67 ± 0.27	0.86 ± 0.25	48.97 ± 8.62 ^{2,4)}
Ⅲ	16.44	1.65 ± 0.23	0.73 ± 0.12	55.62 ± 3.76 ^{2,4)}
Ⅳ	9.94	1.64 ± 0.35	1.10 ± 0.43	35.13 ± 13.80 ^{2,4)}
Ⅴ	7.06	1.66 ± 0.29	0.70 ± 0.36	59.12 ± 16.99 ^{2,3)}

注:与空白组相比¹⁾*P*<0.05,²⁾*P*<0.01;与Ⅰ相比³⁾*P*<0.05,⁴⁾*P*<0.01。

活性,如天麻原药材中提取的天麻素及人工合成天麻素均无明显镇静安定作用^[11];在我们前期的研究中,天麻素也未表现出抗血小板聚集的活性^[12]等,因此,从目前的研究资料来看,与天麻传统功效相关的活性成分可能还另有他物。本实验从血管平滑肌松弛作用的角度,对天麻用于高血压、改善脑供血不足等疾病治疗的物质基础进行了研究,结果显示,云南昭通天麻乙酸乙酯提取物G2对KCl预收缩的大鼠胸主动脉环有明显的舒张作用,且其作用为5个化合物共同作用的结果,其中以化合物Ⅰ活性最强。高钾去极化可激活血管平滑肌上的电压依赖性钙通道(VDC),本实验的结果提示天麻舒张血管的作用可能与5个化合物抑制血管平滑肌细胞膜上VDC的钙离子内流有关。详细机制还值得进一步深入的研究。

[致谢] MS,NMR由中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室邱明华教授代测。

[参考文献]

[1] 淤泽溥,李秀芳,李文军,等.天麻提取物对回肠平滑肌的舒张作用及其机制研究[J].云南中医学院学报,2005,28(3):15.

[2] 孙衍鲲,郑妍研,李相融,等.不同产地天麻乙酸乙酯提取物对大鼠胸主动脉环张力的影响[J].云南中医学院学报,2007,30(5):36.

[3] 金红峰,周云连,陈云龙,等.石斛对大鼠胸主动脉环的舒张作用[J].中国中药杂志,2003,28(11):1060.

[4] 曾靖,李良东,邱峰,等.大豆苷元对家兔胸主动脉条收缩的影响[J].中药材,2005,28(11):1024.

[5] 李志东,张明升,梁月琴.牛磺酸的非内皮依赖性舒血管作用机制[J].中国中药杂志,2009,34(3):332.

酒大黄对动脉粥样硬化兔血脂和 NO
及主动脉 iNOS 表达的影响

陈俊红¹,陈俊荣^{2*},牟兆新²,宋翠荣²,王欣²,王国明²

(1. 中国石油天然气集团公司中心医院,河北 廊坊 065000; 2. 沧州医学高等专科学校,河北 沧州 061001)

[摘要] **目的:**探讨酒大黄对实验性动脉粥样硬化(AS)兔血脂、血清一氧化氮(NO)含量及主动脉诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响。**方法:**将健康雄性新西兰兔 32 只随机分为 4 组($n=8$):空白对照组(N 组)、AS 模型组(M 组)、酒大黄低剂量组(L 组)和酒大黄高剂量组(H 组),常规高脂饮食建立动脉粥样硬化模型。治疗给药 12 周,全自动生化分析仪检测血清脂蛋白的表达水平,硝酸还原酶法检测家兔血清 NO 水平,免疫组织化学法检测主动脉组织 iNOS 蛋白表达,半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测兔主动脉组织 iNOS mRNA 的表达。**结果:**12 周末与模型组相比,酒大黄低、高剂量组血清总胆固醇(TC),低密度脂蛋白(LDL),血清 NO 含量明显下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$),高密度脂蛋白(HDL)明显升高($P<0.01$),酒大黄高剂量组甘油三酯(TG)水平显著降低($P<0.01$)。主动脉组织 iNOS 组化染色及 iNOS mRNA 的表达均明显减弱($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论:**酒大黄干预能抑制 AS 兔主动脉 iNOS 及其 mRNA 的过度表达,减少 NO 的产生,降低血脂,有利于延缓动脉粥样硬化进程。

[关键词] 酒大黄;动脉粥样硬化;血脂;一氧化氮;诱导型一氧化氮合酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0160-05

Effects of Prepared Rhei Radix et Rhizoma with Wine on Serum Lipid,
Nitric Oxide and Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase
in Aorta of Atherosclerotic Rabbits

CHEN Jun-hong¹,CHEN Jun-rong^{2*},MU Zhao-xin²,SONG Cui-rong²,WANG Xin²,WANG Guo-ming²

(1. China National Petroleum Corporation Central Hospital, Langfang 065000, China;

2. Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate possible mechanisms of the intervention effects of prepared Rhei Radix

[收稿日期] 20100907(009)

[基金项目] 河北省科技攻关计划项目(07276423)

[第一作者] 陈俊红,医学硕士,中医副主任医师,现从事中药抗动脉硬化研究,Tel:0316-2073864,E-mail:zkbcjh@126.com

[通讯作者] * 陈俊荣,Tel:0317-5507813,E-mail:czyzkkk@yahoo.com.cn

[6] 周俊,浦湘渝,杨雁宾.新鲜天麻的九种酚性成分[J].科学通报,1981,26(18):1118.

[7] 肖永庆,李丽,游小琳.天麻有效部位化学成分研究[J].中国中药杂志,2002,27(1):35.

[8] Taguchi H, Yosioka I, Yamasaki K, et al. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29(1):55.

[9] 周俊,杨雁宾,杨崇仁.天麻的化学研究 I,天麻化学成分分离和鉴定[J].化学学报,1979,37(3):183.

[10] Taguchi H, Yosioka I, Yamasaki K, et al. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29(1):55.

[11] 黄俊华,王桂莲.天麻注射液及天麻甙药理作用的初步研究[J].中国医学科学院学报,1985,7(5):399.

[12] 林青,李秀芳,李文军,等.天麻提取物对血小板聚集的影响[J].中国微循环,2006,10(1):33.

[责任编辑 聂淑琴]