

丹酚酸 B 与甘草酸对大鼠门静脉灌流压力的影响

周 航^{1,2} 王思轩² 张 涛² 徐雪雁^{1,2} 吴 琨² 贾 旭² 陈 明² 李澎涛² 蔡大勇^{1,2}

摘要 目的 观察甘草酸与丹酚酸 B 对离体大鼠门静脉的舒缩作用。方法 Wistar 大鼠肝动脉, 门静脉和肝静脉插管。经肝动脉冲净肝内存血液, 灌流状态下游离肝脏; 苯肾上腺素预收缩恒流门脉, 生物机能实验系统观察甘草酸与丹酚酸 B 对门静脉灌流压的影响, Prism-4 非线性可变斜率回归计算半效浓度。结果 甘草酸对苯肾上腺素收缩门脉舒张作用的半效浓度 $1.5556 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, 提示其直接舒张作用为治疗门脉高压的药理机制之一。丹酚酸 B 对苯肾上腺素收缩门脉具有收缩作用, 半效浓度为 $1.4639 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$; 提示其间接调控作用参与对门脉高压的协同治疗。结论 在恒流测压模式下, 甘草酸对离体门脉具有舒张作用, 而丹酚酸 B 具有收缩作用。

关键词 门静脉; 灌流; 离体; 大鼠; 甘草酸; 丹酚酸 B

Effects of Salvianolic Acid B and Diammonium Glycyrrhizinate on Portal Pressure in Rats ZHOU Hang, WANG Si-xuan, ZHANG Tao, et al Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing (100193)

ABSTRACT Objective To study the relaxant effects of glycyrrhizinate and salvianolic acid B on rat portal vein *in vitro*. Methods Healthy female Wistar rats were canalized from hepatic artery, portal vein and hepatic vein *in vitro*. Remained blood in liver was eliminated with heparinized Krebs-Henseleit solution through hepatic artery, then the liver was isolated under infusing manner. Being constricted with phenylephrine and relaxed with acetylcholine, and infused with glycyrrhizinate or salvianolic acid B, the portal pressures of infused rat livers were consistently monitored by BL-420S physiological experiment system. The median effective concentration (EC_{50}) of the two agents were analyzed with non-linear various slope regression using Prism-4 software. Results EC_{50} of glycyrrhizinate in relaxing the phenylephrine-contracted portal was $1.5556 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, suggesting one of the mechanism of action of diammonium glycyrrhizinate for the treatment of portal hypertension was direct relaxation. Salvianolic acid B showed constrictive action on the phenylephrine-retracted portal vein, the EC_{50} was $1.4639 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, indicating that its indirect control action was took part in the portal hypertension therapy synergistically. Conclusion Under the mode with both controlizd-velocity and monitored pressure, glycyrrhizinate showed relaxation and salvianolic acid B showed constriction on portal pressure *in vitro*.

KEYWORDS portal vein; infusion; rat; diammonium glycyrrhizinate; salvianolic acid B

针对高发病和高死亡的慢性肝病^[1], 甘草酸^[2]和丹酚酸 B^[3]为中医复方疗效的主要有效单体。门脉高压机能调节^[3]是有效单体协同防治门脉高压的基础^[4]。前期实验验证了有效单体对化学性^[4]和免疫性^[5]肝硬化模型门脉高压症的协同疗效^[6]。以恒流测压的门脉灌流模式^[7], 门脉具有苯肾上腺素升压而乙酰胆碱降压的基本规律^[8]。本研究观察到甘草酸

直接舒张门脉防治门脉高压症, 丹酚酸 B 间接调控门脉防治门脉高压症, 为中药单体的临床应用奠定了药理学基础。

材料与方法

1 动物 SPF 成年 Wistar 大鼠, 体重 200 ~ 250g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 正常饮食喂养。

2 仪器设备 主要设备包括灌流系统的主要仪器。BE-420[†] 生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司)。HX-1050 恒温循环器 (成都泰盟科技有限公司)。BTO₁ 蠕动泵 (北京信康亿达科技有限公司)。

基金项目: 国家重大基础研究项目 (No. G2000056905); 国家自然科学基金基金资助 (No. 30873464H2903); 教育部重点研究项目 (No. 108019)

作者单位: 1. 中国医学科学院/中国协和医科大学药用植物研究所 (北京 100193); 2. 北京中医药大学

通讯作者: 蔡大勇, Tel: 010-62899771, E-mail: dycal@implad.ac.cn

95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体(北京市北氧特种气体研究所有限公司)。Sartorius 电子分析天平。

3 试剂与药品 主要试剂包括对照品和中药单体,其他试剂购于北京化学试剂公司。(1)KH 液:储备液 A 液:6.896 g NaCl, 0.144 g MgSO₄, 0.163 g KH₂PO₄, 2.1 g NaHCO₃, 0.35 g KCl;B 液:1.915 g Glucose;C 液:0.277 g CaCl₂。各加双蒸水溶解定容到 100 mL,4.0 ℃ 保存备用。用时先加 1 650 ~ 1 670 mL 双蒸水,再加 B 液,再加 A 液至 850 ~ 870 mL 左右,摇匀后,滴加 C 液,定容到 2 000 mL。上述药品均由北京国药化学试剂公司提供。(2)肝素钠:由江苏常州市光明生物化学研究所提供。(3)盐酸苯肾上腺素(CAS61-76-7, FW203.67):购买于 SIGMA-ALORICH。(4)盐酸乙酰胆碱(CAS60-31-1, FW181.67):购买于 SIGMA-ALORICH。(5)甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate, C₄₂H₆₈O₁₆, CAS 471-53-4 结构号, MW 857.01):由中国科学院上海药物研究所提取、半合成处理、纯化和鉴定。(6)丹酚酸 B(salvianolic acid B, CAS568-72-9, C₃₆H₃₀O₁₆, MW718.62):由中国科学院上海药物研究所提取、半合成处理、纯化和鉴定。

4 灌流系统 参考 Feletou M 等^[8]方法建立大鼠离体肝脏的门脉灌流,以流速压力曲线的半效压力流速(3.800 mL/min)为恒定速度(即前负荷),灌流循环总容积为 500.0 mL。大鼠体重均衡,随机分为 4 组;按设计流程分别灌流每组各只大鼠。

5 舒缩基准 以苯肾上腺素或乙酰胆碱分别收缩或舒张门静脉压力曲线的半效浓度设定为离体门脉灌流的舒缩基准和预收缩状态。

6 观察指标 以“肝脏系数”为动物质控指标,以“灌流压力”为探索指标。(1)肝脏系数:动物灌流前 36 h 禁食 12 h 后,称量体重(BW);灌流完成撤出插管后,称量肝脏重量(LW);按 LW/W × 100 计算每 100 g 体重的肝脏系数(HI)。(2)灌流压力:在恒流和预收缩状态稳定后,分别加入终浓度为 10⁻¹⁴ ~ 10⁻⁴ mol/L 的甘草酸或者丹酚酸 B,每个浓度平衡 5 min 后记录 5 个 60 s 时程的平均压力数据,连续 5 次取平均数值;计算药物浓度导致压力变化百分比。灌流全程 180 min,肝脏质地均匀,大体形态存活。

7 统计学方法 采用 t 检验比较浓度间差异。Prism-4 非线性可变斜率回归获得浓度-压力变化的曲线及方程式,计算半效浓度及 95% 的可信区间。

结 果

1 各组 BW、LW 及 HI 比较(表 1) 各指标各

组间比较,差异均无统计学意义(P>0.05)。

表 1 各组 BW、LW 及 HI 比较 (x±s)

组别	n	BW(g)	LW(g)	HI
苯肾上腺素	7	226.44±21.13	9.42±1.29	3.98±0.58
乙酰胆碱	7	225.43±31.83	9.06±1.31	4.33±0.72
甘草酸	15	231.38±18.68	8.59±1.25	3.71±0.41
丹酚酸 B	7	228.43±31.83	9.31±1.24	4.12±0.63

2 苯肾上腺素对门静脉的收缩作用(表 2) 苯肾上腺素收缩门脉,导致压力升高数值,相对于前负荷增加百分比(效能单位),量效方程 $Y = 0.1988 + 0.3135 \div [1 + 10^{(-6.35-0.6367X)}]$ ($r = 0.9701, P < 0.01$),收缩半效浓度及其 95% 可信区间为(1.06 × 10⁻¹⁰) mol/L 和 (2.6508 × 10⁻¹²) mol/L ~ (4.2550 × 10⁻⁹) mol/L。

3 乙酰胆碱对门静脉的舒张作用(表 2) 乙酰胆碱舒张门脉,导致压力降低数值,相对于苯肾上腺素收缩状态下的压力变化百分比(效能单位),其量效方程 $Y = -0.7103 + 1.1051 \div [1 + 10^{(1.134-0.0824X)}]$ ($r = 0.9701, P < 0.01$),舒张半效浓度及 95% 可信区间为 1.72 × 10⁻¹⁴ mol/L 和 5.9083 × 10⁻³⁰ ~ 50.05 mol/L。其中,在半效浓度的舒张效能为降低苯肾上腺素收缩后压力的 15.775%。

表 2 苯肾上腺素、乙酰胆碱收缩门脉压力比较 (x±s)

对数浓度	苯肾上腺素 (n=7)	乙酰胆碱 (n=7)
-14	-	-0.15±0.13
-13	-	-0.19±0.12
-12	0.21±0.19	-0.25±0.10
-11	0.26±0.16	-0.31±0.07
-10	0.36±0.18	-0.35±0.08
-9	0.42±0.24	-0.38±0.08
-8	0.55±0.37	-0.44±0.12
-7	0.52±0.37	-0.47±0.14
-6	0.47±0.24	-

4 甘草酸对对门静脉的舒张作用(表 3) 甘草酸降低苯肾上腺素收缩门脉压力 6.91% ~ 36.21%,量效方程 $Y = -0.3694 + 0.2993 \div [1 + 10^{(4.2807+0.4860X)}]$ ($r = 0.9979, P < 0.01$),半效舒张浓度及其 95% 可信区间为 1.5556 × 10⁻⁹ mol/L 和 7.5356 × 10⁻¹⁰ mol/L ~ 3.2111 × 10⁻⁹ mol/L。相对于乙酰胆碱半效舒张效应为“降低苯肾上腺素收缩后压力的 15.775%”而言,甘草酸达到其舒张效应的 43.83% ~ 229.53%。

5 丹酚酸 B 对门脉的收缩作用(表 3) 丹酚酸 B 升高苯肾上腺素收缩门脉压力为 50.26% ~ 242.21%,量效方程 $Y = 0.4855 + 2.2065 \div [1 + 10^{(-2.7544-0.3118X)}]$ ($r = 0.9987, P < 0.01$),半效收缩浓度及 95% 的可信区间为 1.4639 × 10⁻⁹ mol/L, 4.8115

$\times 10^{-10}$ mol/L $\sim 4.4538 \times 10^{-9}$ mol/L。相对于乙酰胆碱半效舒张效应为“降低苯肾上腺素收缩后压力的 15.775%”而言,丹酚酸 B 收缩效应是达到其舒张效应的(−318.63%)~(−1535.42%)。

表 3 甘草酸降低和丹酚酸 B 升高苯肾上腺素收缩门脉压力的作用 ($\bar{x} \pm s$)

对数浓度	甘草酸(n=15)		丹酚酸 B(n=7)	
	效能单位	相对效应	效能单位	相对效应
-14	-	-	0.5026 ± 0.5880	-3.1863 ± 3.7274
-13	-	-	0.6388 ± 0.6824	-4.0492 ± 4.3259
-12	-0.0691 ± 0.0587	0.4383 ± 0.3722	0.7069 ± 0.6463	-4.4812 ± 4.0971
-11	-0.0940 ± 0.0673	0.5956 ± 0.4268	0.8137 ± 0.5924	-5.1581 ± 3.7551
-10	-0.1270 ± 0.0806	0.8049 ± 0.5111	1.1937 ± 1.1333	-7.5668 ± 7.1844
-9	-0.1715 ± 0.0795	1.0871 ± 0.5038	1.5185 ± 1.2619	-9.6260 ± 7.9993
-8	-0.2704 ± 0.1705	1.7140 ± 1.0810	1.8816 ± 1.4152	-11.9275 ± 8.9713
-7	-0.3263 ± 0.1772	2.0688 ± 1.1232	2.2614 ± 1.9039	-14.3352 ± 12.0690
-6	-0.3456 ± 0.1572	2.1906 ± 0.9962	2.4221 ± 1.9893	-15.3542 ± 12.6105
-5	-0.3738 ± 0.1579	2.3697 ± 1.0009	-	-
-4	-0.3621 ± 0.1571	2.2953 ± 0.9960	-	-

讨 论

在“恒流测压”的肝脏门静脉的灌流模式下^[8],本研究观察了苯肾上腺素、乙酰胆碱、甘草酸及丹酚酸 B 舒缩门脉的药理作用。

本研究结果显示,中药单体对离体门静脉有舒缩作用。苯肾上腺素通过门脉平滑肌细胞存在 α_1 受体及其 cAMP 途径收缩门脉,乙酰胆碱通过门脉内皮细胞 NO 释放及其 cGMP 途径舒张门脉。甘草酸直接舒张门脉,参与了复方治疗门脉高压的协同机制;甘草酸二铵对门脉的舒张机制在于直接阻断内皮平滑肌细胞之间缝隙连接^[8]和提高细胞色素 P450 相关性血管内皮一氧化氮合酶活性^[9]。丹酚酸 B 收缩门脉,间接调控参与复方治疗门脉高压的协同机制。最近筛选到丹酚酸 B、大黄素、槲皮素、黄芩素和黄芩甙具有抗肝纤维化作用^[10];丹酚酸 B 收缩门脉可能与门脉张力正常有关。

本实验研究建立了恒流测压的门脉灌流模式,可广泛应用于门脉调控生理、病理生理和药理研究,尤其是对中药单体的药效学评价。既往认为胶原纤维沉积导致门脉高压不可逆,本实验发现甘草酸或丹酚酸 B 可调节门脉压力,为复方疗效研究奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Roberts SE, Goldacre MJ, Yeates D. Trends in mortality after hospital admission for liver cirrhosis in an English population from 1968 to 1999 [J]. Gut, 2005, 54 (11): 1615-1621.

[2] 秦刚,施光峰,宋艳艳,等.甘草酸二铵治疗慢性乙型肝炎 3201 例荟萃分析[J].中华传染病杂志,2005,23 (5):333-337.

Qin G, Shi GF, Song YY, et al. Meta-analysis of document on diammonium glycyrrhizinate in treatment of patients with chronic hepatitis B [J]. Chin J Infect Dis, 2005, 23(5):333-337.

[3] 刘昉,叶峰,邱根全,等.不同剂量丹参酮 II A 及丹参注射液治疗肝硬化的临床观察[J].第四军医大学学报,2009,30(7):658-660.

Liu Y, Ye F, Qiu GQ, et al. Clinical study on treatment of cirrhosis by different dosages of salvianolic acid B and Salvia Injection [J]. J Fourth Milit Med Univ, 2009, 30 (7):658-660.

[4] 许永乐,蔡大勇,唐朝枢. CCl_4 导致肝硬化和门脉高压的机制[J].世界华人消化杂志,2005,13(2):235-238.

Xu YL, Cai DY, Tang CS. Pathogenesis of cirrhotic portal hypertension induced with CCl_4 [J]. World Chin J Digestol, 2005, 13(2):235-238.

[5] 刘树锋,蔡大勇,李澎湃,等.优化甘参复方抗肝纤维化组分配伍的研究[J].中华中医药杂志,2005,20 (6):373-375.

Liu SF, Cai DY, Li PT, et al. Study on compatibility of Ganshen Decoction in moderate hepatic fibrosis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2005, 20(6):373-375.

[6] 任丽薇,张晓晶,邓秀兰,等.门脉高压波形特征的观察方法及其影响因素[J].北京中医药大学学报,2006,29(12):840-843.

Ren LW, Zang XJ, Deng XL, et al. Wave characteristics of portal pressure and their affected factors [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2006, 29(12):840-843.

[7] 邓秀兰,王青青,张晓晶,等.甘草次酸配伍丹参酮防治大鼠免疫性肝纤维化的作用机制[J].中国药师,2007,10(8):741-744.

Deng XL, Wang QQ, Zhang XJ, et al. Effective mechanisms of glycyrrhetic acid with salvianolic acid B on immunological hepatic fibrosis in rat [J]. China Pharmacist, 2007, 10(8):741-744.

[8] Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now [J]? Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006; 26(7):1215-1225.

[9] Yada T, Shimokawa H, Morikawa K, et al. Role of Cu, Zn-SOD in the synthesis of endogenous vasodilator hydrogen peroxide during reactive hyperemia in mouse mesenteric microcirculation *in vivo* [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(3):H441-H448.

[10] Hu Q, Noor M, Wong YF, et al. *In vitro* anti-fibrotic activities of herbal compounds and herbs [J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(10):3033-3041.

(收稿:2009-11-06 修回:2010-07-07)