

## 枸骨叶水提物对蟾蜍心肌收缩力的影响及其机制初探\*

刘峰<sup>▲</sup> 马庆坤 李艳芝 刘梅芳<sup>△</sup>

(济宁医学院药学院,日照 276826)

**摘要** 目的 研究枸骨叶水提物对蟾蜍心肌收缩力的影响及其机制。方法 采用煎煮法制备枸骨叶水提物。采用蛙心灌流法和 BL-420E 智能生物信号采集与处理系统,观察不同浓度枸骨叶水提物对离体蟾蜍心肌收缩力的作用、枸骨叶水提物对肾上腺素刺激以及不同钙离子浓度灌流条件下心肌收缩力的影响。结果 枸骨叶水提物在 0.1~1.6mg/ml 浓度范围内剂量依赖性抑制蟾蜍基础条件下心肌收缩力,最大效应可使心肌收缩力降低 55.12%;枸骨叶水提物对肾上腺素刺激条件下蟾蜍心肌收缩力亦有显著抑制作用,0.4mg/ml 枸骨叶水提物即可完全阻断肾上腺素的兴奋作用;枸骨叶水提物在不同钙离子浓度任氏液灌流条件下抑制率保持稳定,约为 20%。结论 枸骨叶水提物对基础条件下以及肾上腺素刺激条件下蟾蜍心肌收缩力均有显著抑制作用,其抑制率与浓度相关,与细胞外钙离子浓度无关,其作用机制可能与抑制心肌细胞  $\beta$  受体有关。

**关键词** 枸骨;水提物;离体蛙心;心肌收缩力;肾上腺素

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2016)08-275-05

### Effects of aqueous extract from leaves of *Ilex cornuta* Lindl on myocardial contractility of toad and the underlying mechanisms

LIU Feng, MA Qingkun, LI Yanzhi, LIU Meifang

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

**Abstract; Objective** To investigate the mechanism and effects of aqueous extract from leaves of *Ilex cornuta* Lindl on myocardial contractility of toad. **Methods** The method of decoction was adopted to prepare the aqueous extract from leaves of *Ilex cornuta* Lindl. By isolated frog heart perfusion and BL-420E data acquisition and analysis system the effects of different concentrations of aqueous extract on myocardial contractility were investigated under basal condition, epinephrine stimulated condition or different  $[Ca^{2+}]$  ringer's solution perfusion condition. **Results** Aqueous extract from leaves of *Ilex cornuta* Lindl could inhibit cardiac contractility, which had an obvious dose-effect relationship within the concentration from 0.1 mg/ml to 1.6mg/ml, and the maximal inhibitory rate was 55.12%. The excitatory effect of epinephrine on cardiac contractility could be significantly antagonized by aqueous extract, and 0.4mg/ml aqueous extract, a relatively small dose, could completely block the effect of epinephrine (0.1  $\mu$ g/ml). The inhibition rate of the aqueous extract was about 20%, even with the changed  $[Ca^{2+}]$  in the perfusion solution. **Conclusion** Aqueous extract from leaves of *Ilex cornuta* Lindl could inhibit the cardiac contractility in basal and epinephrine stimulated condition in an dose-dependent manner, which was uninfluenced by  $[Ca^{2+}]$  in the perfusion. The mechanism might be related to inhibiting  $\beta$ -receptors on hearts.

**Keywords:** *Ilex cornuta* Lindl; Aqueous extract; Isolated heart of toad; Cardiac contractility; Epinephrine

枸骨 (*Ilex cornuta* Lindl) 为冬青科冬青属植

物。枸骨作为一种传统的药用植物,在我国古今药物学著作中多有记载。唐代陈藏器《本草拾遗》载:“木肌白似骨,故云枸骨”<sup>[1]</sup>。枸骨根、枝、叶、果实和树皮均可入药,具有多种药用功效,能治疗风湿性关节炎、头痛、头晕、耳鸣和高血压等多种

\* [基金项目]第十四届“挑战杯”济宁医学院大学生课外学术科技作品重点项目

<sup>△</sup> [通信作者]刘梅芳, Email: lmf\_bjmu@163.com

<sup>▲</sup> 刘峰, 济宁医学院 2012 级药物制剂本科生

常见病<sup>[2]</sup>。枸骨叶是苦丁茶的主要成分。近代药理学研究表明,枸骨叶提取物具有明显的抑菌、抗氧化、降血糖、降血脂等多种药理作用<sup>[2]</sup>。民间还将其作为减肥饮料,亦用于治疗冠心病心绞痛和高血压症<sup>[3]</sup>。但是枸骨叶水提物在心血管方面的相关实验研究较少,且其对心肌收缩力的影响尚不明确。本文采用蛙心灌流法观察枸骨叶水提物对心肌收缩力的直接作用,并对其机制进行初步探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物和试剂

健康蟾蜍 24 只,雌雄不限,体重 40 ~ 60g,随机分成 3 组,每组 8 只,制备离体蛙心,分别用于研究枸骨叶水提物对于基础条件下,肾上腺素刺激条件下以及不同钙离子浓度灌流条件下心肌收缩力的影响。

枸骨叶水提物实验室自制,盐酸肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司),所用其他试剂均为分析纯。蛙心灌流所用任氏液有 3 种,低钙任氏液、正常钙任氏液、高钙任氏液( $\text{CaCl}_2$  浓度分别为 0.06、0.12 和 0.24mg/ml)。

### 1.2 仪器和设备

BS224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);FW135 型中药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);HH-S2 数显双孔恒温水浴锅(金坛市瑞华仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。FT-100 生物张力换能器、蛙心插管、BL-420E 生物智能实验系统均购自成都泰盟科技有限公司。其他实验用品均由济宁医学院药学院综合实验室提供。

### 1.3 方法

**1.3.1 枸骨叶水提物的制备** 采用煎煮法制备枸骨叶水提物<sup>[4]</sup>。枸骨叶采于济宁医学院日照校区本草园,将枸骨叶烘干,粉碎过 40 目筛备用。取干燥枸骨叶粉末 30g,加 500ml 蒸馏水浸泡 30min,煎煮 1h,药渣再加 500ml 蒸馏水,煮 2 次,每次 1h,合并 3 次煎液得到水煎液约 200ml<sup>[4]</sup>。将水煎液至于旋转蒸发皿内蒸发浓缩成棕红色浸膏,然后将浸膏至于坩埚中放于干燥箱内,40℃ 干燥成粉末。最后将水提物粉末收集于离心管中,置于 -20℃ 冰箱备用。实验前,首先用任氏液将水提物粉末配制成 10mg/ml 贮存液,然后用任氏液将其稀释成所需浓度的灌流液。

**1.3.2 离体蛙心灌流** 采用斯氏法制备离体蛙心标本<sup>[5]</sup>。为保证曲线的稳定性我们对传统斯氏蛙心灌流法作了一些改进<sup>[6]</sup>。蛙心离体后每 3min 更换一次新鲜任氏液,待收缩曲线稳定后进行相关药物的灌流实验。

为观察不同浓度枸骨叶水提物对基础条件下心肌收缩力的影响,将含有特定浓度枸骨叶水提物的任氏液加入蛙心插管中,观察加药前、后的心肌收缩力变化<sup>[6]</sup>。观察效应完毕后,更换 3 次任氏液,每次间隔 1min,待曲线恢复到正常水平后进行下一浓度组的灌流。为研究不同浓度枸骨叶水提物在肾上腺素刺激条件下心肌收缩力的影响,首先用含有 0.1 $\mu\text{g/ml}$  肾上腺素的任氏液进行灌流,观察效应后,换洗至正常水平,然后加入含有特定浓度枸骨叶水提物和 0.1 $\mu\text{g/ml}$  肾上腺素的任氏液进行灌流,比较两灌流组心肌收缩力的变化。为探讨枸骨叶水提物对心肌收缩力的影响与细胞外钙离子浓度之间的关系,首先用含有特定钙离子浓度的任氏液进行灌流,观察效应后,换洗至正常水平,然后加入含有 0.2mg/ml 枸骨叶水提物和特定钙离子浓度任氏液进行灌流,比较两灌流组心肌收缩力的差异。

## 2 统计学方法

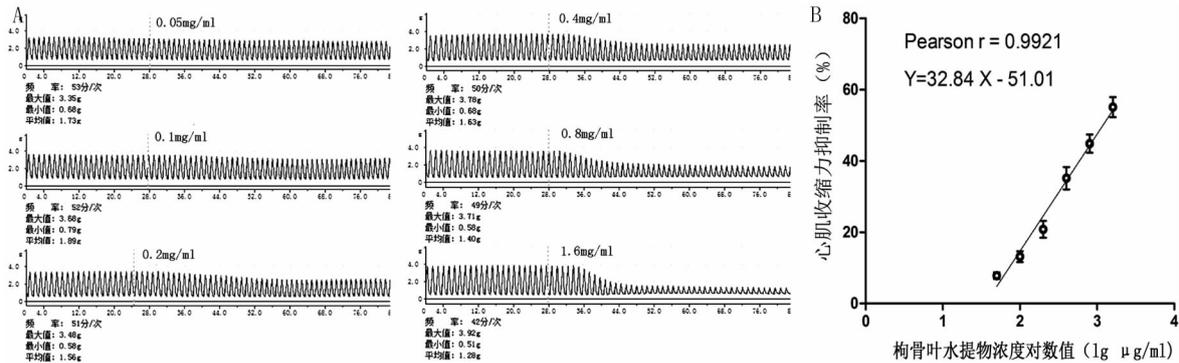
实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 PRISM 5.0 软件进行统计学分析。

## 3 结果

### 3.1 枸骨叶水提物对基础条件下蟾蜍心肌收缩力的影响

观察不同浓度枸骨叶水提物对基础条件下蟾蜍心肌的收缩力的影响。实验结果显示,各个浓度水提物灌流条件下心肌收缩力均有下降,且抑制作用随药物浓度增加而增强(见图 1A)。0.05mg/ml 水提物可以使心肌收缩力略有下降,但无统计学差异( $P > 0.05$ ),水提物浓度在 0.1 ~ 1.6mg/ml 范围可以使心肌收缩力显著下降( $P < 0.001$ ),下降率分别为 13.17%、20.80%、35.16%、44.87% 和 55.12%(见表 1)。为明确药物浓度与抑制率之间的关系,我们做了药物浓度对数值与心肌收缩力抑制率的相关性和回归分析,结果表明两者呈线性相关性( $P < 0.01$ ),回归方程为  $Y = 32.84X - 51.01$ (见图 1B)。说明枸骨叶水提物可以剂量依赖性

抑制蟾蜍心肌收缩力。



注:A 曲线为心搏曲线,虚线位置为加药线,枸骨叶水提取物浓度如图所示,比较加药前后心肌收缩力的变化(本组曲线来自于同一只蟾蜍)

B 以浓度对数值为横坐标,以抑制率为纵坐标,绘制散点图,并进行相关性分析, Pearson  $r = 0.9921, P < 0.01$ , 两者呈线性回归

图 1 不同浓度枸骨叶水提取物对基础条件下离体蟾蜍心肌收缩力的影响

表 1 不同浓度枸骨叶水提取物对基础条件下离体蟾蜍心肌收缩力的抑制作用 (n=8)

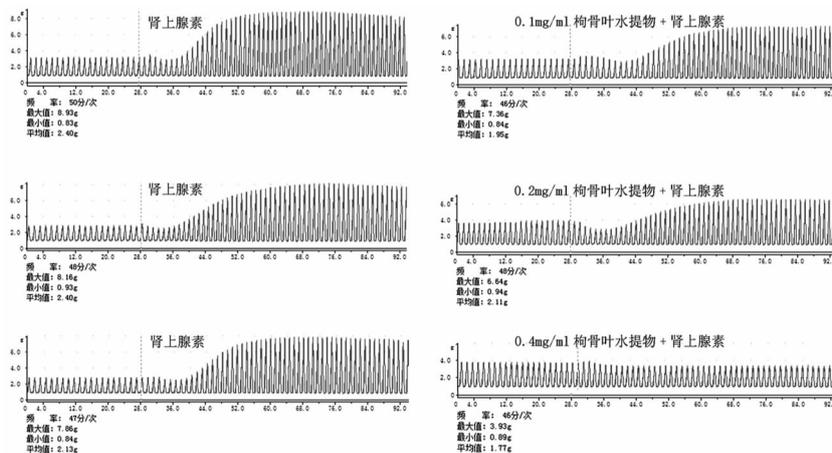
枸骨叶水提取物浓度 (mg/ml)	心肌收缩力/g		抑制率/%
	给药前	给药后	
0.05	4.73 ± 0.10	4.35 ± 0.12	7.82
0.1	4.68 ± 0.12	4.06 ± 0.09 *	13.17
0.2	4.52 ± 0.10	3.58 ± 0.12 *	20.80
0.4	4.75 ± 0.08	3.08 ± 0.15 *	35.16
0.8	4.63 ± 0.07	2.63 ± 0.10 *	44.87
1.6	4.55 ± 0.09	2.04 ± 0.09 *	55.12

注:与给药前相比, \*  $P < 0.001$

进一步观察了枸骨叶水提取物对肾上腺素刺激条件下的心肌收缩力的影响。枸骨叶水提取物在 0.1 ~ 1.6mg/ml 范围内对心肌收缩力具有显著性抑制作用,所以本组实验中我们选取了 3 个较小浓度 (0.1、0.2、0.4mg/ml) 进行灌流实验。结果显示 0.1 ~ 0.4mg/ml 枸骨叶水提取物均能抑制肾上腺素刺激引起的心肌收缩力增强 (见图 2)。0.1mg/ml 枸骨叶水提取物可以部分抑制肾上腺素的抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 抑制率为 32.86%; 0.2mg/ml 枸骨叶水提取物的抑制作用更加显著 ( $P < 0.001$ ), 抑制率达 61.14%, 而 0.4mg/ml 枸骨水提取物则可完全阻断肾上腺素对心肌的兴奋作用 ( $P < 0.001$ )。见表 2。

### 3.2 枸骨叶水提取物对肾上腺素刺激条件下蟾蜍心肌收缩力的影响

肾上腺素是对心脏正性调节的主要激素。我们



注:曲线为心搏曲线,虚线位置为加药线,A、B、C 分别代表了 0.1 mg/ml、0.2 mg/ml 和 0.3 mg/ml 枸骨叶水提取物对肾上腺素刺激条件下心肌收缩力的影响

图 2 枸骨叶水提取物对肾上腺素刺激条件下蟾蜍心肌收缩力的影响

表 2 不同浓度枸骨叶水提取物对肾上腺素刺激条件下蟾蜍心肌收缩力的影响 (n=8)

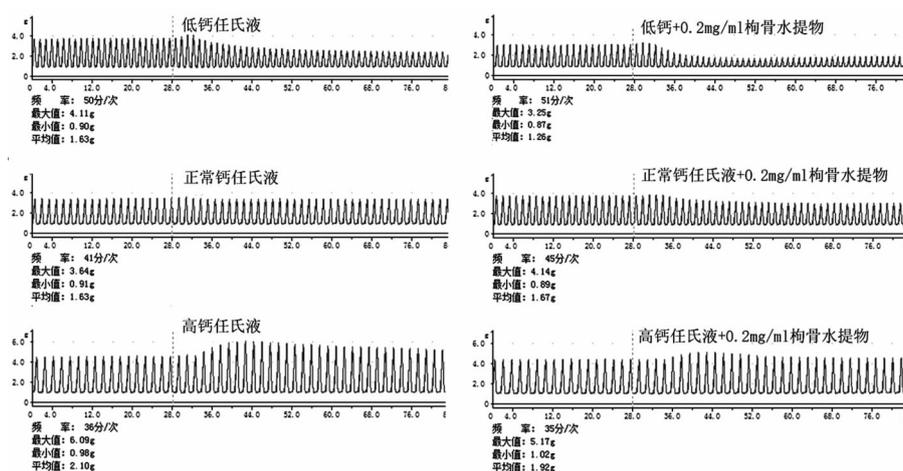
枸骨叶水 提取物浓度 (mg/ml)	心肌收缩力/g			抑制 率/%
	正常对照	肾上腺素	枸骨 & 肾上腺素	
0.10	3.62 ± 0.21	7.87 ± 0.24	6.47 ± 0.23 *	32.86
0.20	3.46 ± 0.18	7.46 ± 0.40	5.02 ± 0.19 **	61.14
0.40	3.34 ± 0.15	7.35 ± 0.32	3.32 ± 0.18 **	100.46

注:抑制率=(肾上腺素-枸骨&肾上腺素)/(肾上腺素-正常对照) × 100%

与肾上腺素灌流组相比, \*P < 0.01, \*\*P < 0.001

### 3.3 钙离子浓度对枸骨叶水提取物条件下蟾蜍心肌收缩力抑制作用的影响

心肌细胞肌质网不发达,对细胞外的钙离子具有依赖性。细胞外的钙离子浓度增加,会导致心肌收缩力增强。我们观察了枸骨叶水提取物在不同钙离子浓度任氏液灌流条件下对心肌收缩力的影响。为了得到较为满意的抑制效果,我们选取 0.2mg/ml 枸骨叶水提取物进行后续灌流实验。结果表明,在低、中、高 3 种钙离子浓度任氏液灌流条件下 0.2mg/ml 枸骨叶水提取物对蟾蜍心肌收缩力均有抑制作用(见图 3,表 3)。抑制率分别为 19.06%、21.01% 和 19.74%,抑制率之间无统计学差异(P > 0.05)。表明枸骨叶水提取物对心肌收缩力的抑制效果不受细胞外钙离子浓度的影响。见表 3。



图注:曲线为心搏曲线,虚线位置为加药线,A、B、C 分别代表了 0.2mg/ml 枸骨叶水提取物在低钙、正常钙和高钙 3 种任氏液灌流条件下对心肌收缩力的影响

图 3 不同钙离子浓度灌流条件下枸骨水提取物对心肌收缩力的抑制作用

表 3 不同钙离子浓度任氏液灌流条件下枸骨叶水提取物对心肌收缩力的影响 (n=8)

灌流液中 氯化钙浓度 (mg/ml)	心肌收缩力(100%于基础灌流值) 枸骨叶水提取物 0.2mg/ml		
	给药前	给药后	抑制率/%
0.16	81.87 ± 2.99	66.27 ± 2.56	19.06 ± 0.96
0.12	99.98 ± 2.75	78.06 ± 3.12	21.01 ± 1.92
0.24	123.82 ± 2.98	99.17 ± 1.97	19.74 ± 1.69

注:采用单因素方差分析,3 组灌流条件下抑制率比较, P > 0.05

## 4 讨论

枸骨是一味传统中药,在民间使用历史悠久,具有多种功效。据不完全统计,含有枸骨的中药类药品专利已有 10 多项,因此枸骨作为中草药资源具有较好的开发前景<sup>[2]</sup>。虽然枸骨叶在民间用于治疗冠心病、心绞痛和高血压症<sup>[3]</sup>,但是相关药理

学研究较少,而且其对心肌收缩力的影响尚不明确。有文献报道枸骨叶水提取物能增加离体豚鼠心脏的冠脉流量,心率略有减慢,心肌收缩力略有加强,但是无统计学意义<sup>[4]</sup>。另有文献报道从枸骨叶中分离得到的单体化合物枸骨苷 4 对脑垂体后叶素诱发的大鼠心肌缺血有一定保护作用,不影响豚鼠离体的心率、冠脉流量,但可显著降低心肌收缩力<sup>[6]</sup>。蛙心灌流实验是研究心脏活动的经典方法<sup>[7]</sup>。本文采用斯氏蛙心灌流法观察枸骨叶水提取物对蟾蜍心肌收缩力的直接作用,并对其机制进行初步探讨。

本文首次证明枸骨叶水提取物具有很强的负性肌力作用,其不仅可以浓度依赖性抑制基础条件下蟾蜍心肌收缩力,而且能够以较低的浓度(0.4 mg/ml)完全抑制肾上腺素刺激引起的心肌收缩力增

强。这提示枸骨叶水提物内含有非常强的生物活性物质,这种物质可能具有  $\beta$  受体拮抗剂的作用。钙离子是心肌细胞电活动和机械活动的关键离子,我们进一步观察枸骨水提物对心肌的抑制作用与灌流液中钙离子浓度之间的关系<sup>[9-10]</sup>。本文结果显示,在低钙、高钙以及正常钙离子浓度任氏液灌流液条件下其抑制率均在 20% 左右。因此枸骨叶水提物对心肌收缩力的抑制作用并不受细胞外钙离子浓度的影响。

我们的研究表明枸骨叶水提物可以显著抑制心肌收缩力,这可能是其降低血压的原因之一。此外,我们发现枸骨叶水提物对心肌收缩力的抑制作用不受细胞外钙离子浓度的影响,其作用机制可能与阻断  $\beta$  受体有关。本文为枸骨叶在心血管方面的应用提供了实验依据,对于促进枸骨中药材的开发和综合利用具有重要意义。

**参考文献:**

[1] 江苏省植物研究所. 新华本草纲要-第三册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990:148.  
 [2] 彭国全,杨冬梅. 枸骨的药用功效与保健作用[J]. 江西农业学报,2011,23(6):79-82,85. DOI:10.3969/j.

issn.1001-8581.2011.06.025.  
 [3] 杨卫华,赵玉丛. 中药枸骨叶化学成分和药理作用的研究进展[J]. 医药世界,2007(3):103-105.  
 [4] 朱莉芬,李美珠,钟伟新,等. 苦丁茶的心血管药理作用研究[J]. 中药材,1994,17(3):37-40.  
 [5] 张艳霞. 生理学实验指导[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.  
 [6] 刘梅芳,刘世东. 蛙心灌流实验中心肌收缩力不稳定的原因分析与对策[J]. 生物学通报,2015,50(7):45-47.  
 [7] 李维林,吴菊兰,任冰如,等. 枸骨中 3 种化合物的心血管药理作用[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(3):6-10. DOI:10.3969/j. issn. 1674-7895. 2003. 03. 002.  
 [8] 付锋,张海锋,高峰. 离体心脏灌流系统今昔谈[J]. 生理科学进展,2010,41(3):238-233.  
 [9] 董帅,唐泽耀,张冬梅,等. 茶色素在低钙及高钙浓度下对离体蟾蜍心肌收缩力的影响[J]. 中药新药与临床药理,2013,24(6):561-564.  
 [10] 马英淇,张冬梅,李壮,等. 鹿茸在正常和低钙条件下对离体蟾蜍心肌收缩力和心率影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(7):40-42.

(收稿日期 2015-12-12)

(上接第 274 页)

的可能;专利内容主要通过阅读摘要来判断是否相关。由于水平限制,可能有些判断不准确。另外,本文只是针对专利数量,未对专利质量进行分析和判断。因此,存在一定的限制,使得分析结果还有商榷的余地。

**参考文献:**

[1] 刘佳佳,董旻,方曙. 国外专利分析工具的比较研究[J]. 现代图书情报技术,2007(2):67-74. DOI:10.3969/j. issn. 1003-3513. 2007. 02. 015.  
 [2] 张帆,肖国华,张娴. 专利地图典型应用研究[J]. 科技管理研究,2008,28(2):190-193. DOI:10.3969/j. issn. 1000-7695. 2008. 02. 068.  
 [3] 熊伟. 基因芯片技术在生命科学研究中的应用进展及前景分析[J]. 生命科学仪器,2010,8(2):32-36. DOI:10.3969/j. issn. 1671-7929. 2010. 02. 009.  
 [4] 汪传雷,王艳,李从春. 基于专利地图的物流识别标识技术创新研究[J]. 中国科技论坛,2014(10):28-34. DOI:10.3969/j. issn. 1002-6711. 2014. 10. 006.

[5] 滕晓坤,肖华胜. 基因芯片与高通量 DNA 测序技术前景分析[J]. 中国科学(C 辑:生命科学),2008(10):891-899.  
 [6] 侯巧玲,傅文奇. 韩国专利战略的特点分析[J]. 科技情报开发与经济,2006,16(11):174-175. DOI:10.3969/j. issn. 1005-6033. 2006. 11. 098.  
 [7] 韩国科学技术院. [EB/OL]. (2015/06/11). <http://baike.baidu.com/>  
 [8] 国际专利分类表. [EB/OL]. (2015/02/02). <http://www.sipo.gov.cn/wxfw/zlwxggfw/zsyd/bzyfl/gjzfl/>  
 [9] 田美慧,杨洪一. 基因芯片技术在诊断微生物学中的研究进展及应用[J]. 黑龙江农业科学,2015(7):168-170,171. DOI:10.11942/j. issn1002-2767. 2015. 07. 0168.  
 [10] 彭爱东,朱小聪. 基于专利地图的专利分析实证研究--以 6 所农业类高校申请专利为例[J]. 江西农业学报,2010,22(6):188-193. DOI:10.3969/j. issn. 1001-8581. 2010. 06. 061.

(收稿日期 2016-02-11)