

[文章编号] 1007-3949(2010)18-06-0461-04

• 实验研究 •

槟榔碱对高糖诱导血管内皮依赖性舒张功能损伤的保护作用

王佑权¹, 周寿红²

(南华大学 1. 附属第二医院肿瘤外科, 2 医学院生理学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 槟榔碱; 高糖; 内皮依赖性舒张反应; 一氧化氮; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

[摘要] 目的 探讨槟榔碱对高糖诱导的内皮依赖性舒张功能损伤的保护作用及其可能的机制。方法 采用离体血管环灌流方法, 观察槟榔碱对高糖诱导的大鼠血管内皮依赖性舒张功能损伤的影响以及血管组织中一氧化氮和丙二醛含量以及超氧化物歧化酶活性的影响。同时, 观察 M 受体阻断剂阿托品和一氧化氮合酶抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯对槟榔碱作用的影响。结果 高糖 (44 mmol/L) 处理组显著降低了乙酰胆碱诱导的大鼠血管内皮依赖性舒张反应, 槟榔碱 (0.001、0.01 和 0.1 mmol/L) 以浓度依赖的方式抑制了高糖诱导的血管内皮依赖性舒张反应损伤。而阿托品和 N-硝基-L-精氨酸甲酯取消了槟榔碱的作用。高糖 (44 mmol/L) 处理组显著降低了血管组织中一氧化氮含量和超氧化物歧化酶活性而增加了血管组织中丙二醛含量, 槟榔碱 (0.1 mmol/L) 逆转了高糖的这种作用。结论 槟榔碱抑制了高糖诱导的血管内皮依赖性舒张功能损伤, 其机制可能与槟榔碱能激动 M 受体, 增加一氧化氮的释放, 抑制氧化应激有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Arecoline Prevents the Injury of Endothelium Dependent Relaxation Induced by High Glucose

WANG You-Quan¹, and ZHOU Shou-Hong²

(1 Department of Surgery, the Second Affiliated Hospital, 2 Department of Physiology, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Arecoline; High Glucose; Endothelium Dependent Relaxation; Nitric Oxide; Malonaldehyde; Superoxide Dismutase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of arecoline on the injury of endothelium dependent relaxation induced by high glucose of isolated thoracic aorta of SD rats and explore the potential mechanism. **Methods** Organ baths in thoracic aortic rings of SD rats were used to investigate the effect of different concentration arecoline on the injury of endothelium dependent relaxation induced by high glucose. The levels of nitric oxide (NO) and malonaldehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in the isolated thoracic aorta rings were measured. The M receptor inhibitor atropine and nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were used in the study. **Results**

Compared with the control group, endothelium dependent relaxation induced by acetylcholine of isolated thoracic aorta of SD rats was significantly decreased in high glucose group. The injury of endothelium dependent relaxation induced by high glucose was inhibited by arecoline in concentration-dependent manner. But the effect of arecoline was abolished by atropine and L-NAME. The levels of NO and the activity of SOD were decreased and the levels of MDA was increased in the isolated thoracic aorta rings by high glucose, but the effect of high glucose was reversed by arecoline. **Conclusion**

Arecoline prevents the injury of endothelium dependent relaxation induced by high glucose, which mechanisms may be related to activation of M receptor, increase of NO and inhibition of oxidative stress induced by arecoline.

血管内皮细胞功能紊乱与糖尿病血管并发症以及动脉粥样硬化等心脑血管疾病密切相关^[1-3]。高血糖是导致血管内皮细胞功能损伤的主要原因^[4-5]。在高糖环境下, 内皮细胞氧化应激增加导

致细胞因子合成及活性的改变是糖尿病血管病变发病机制之一^[6-7]。槟榔碱是槟榔果中含量最为丰富的生物碱之一, 具有驱虫、杀菌、促小肠蠕动和食物消化、抗血栓形成、抗动脉粥样硬化等作用^[8-10]。近年来研究发现槟榔碱能改善 2 型糖尿病糖、脂代谢紊乱, 但其作用机制尚不明^[11-13]。本研究旨在观察槟榔碱对体外高糖环境诱导的离体血管内皮依赖性舒张功能损伤的保护作用, 并对其可能机制进行探讨。

[收稿日期] 2010-04-05 [修回日期] 2010-06-03

[作者简介] 王佑权, 硕士, 主治医师, 研究方向为病理生理学, E-mail 为 youqw@163.com。通讯作者周寿红, 博士, 讲师, 研究方向为心血管生理学, E-mail 为 zhoushouhong@126.com。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

槟榔碱、新福林、乙酰胆碱、硝普钠、N-硝基-L-精氨酸甲酯 (N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)、氯化钾和阿托品均为 Sigma 公司产品。D-葡萄糖、甘露醇、NaCl、NaHCO₃ 等其他无机试剂均为国产分析纯。一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒购自南京建成生物工程公司。BCA 蛋白定量试剂购自 Pierce 公司。BL420F 生物信号采集处理系统 (成都泰盟); 雄性 SD 大鼠 (南华大学实验动物学部提供)。

1.2 离体动脉环实验设计与分组

实验分: 对照组: 血管环用 KH 液孵育 6 h
④高糖组: 血管环用含 D-葡萄糖 (44 mmol/L) 的 KH 液孵育 6 h 诱导血管内皮功能的损伤^[4, 14]; ⑤甘露醇组: 血管环用含甘露醇 (44 mmol/L) 的 KH 液孵育 6 h
⑥槟榔碱单独处理组: 血管环用含槟榔碱 (0.1 mmol/L) 的 KH 液孵育 6 h
⑦不同浓度槟榔碱和 D-葡萄糖共同处理组: 血管环用含槟榔碱 (0.000 1、0.001、0.01 和 0.1 mmol/L) 和 D-葡萄糖 (44 mmol/L) 的 KH 液共同孵育 6 h
⑧阿托品组: 血管环先用阿托品 (0.1 mmol/L) 预处理 30 min 后, 再用含槟榔碱 (0.1 mmol/L) 和 D-葡萄糖 (44 mmol/L) 的 KH 液共同孵育 6 h
⑨L-NAME 组: 先用 L-NAME (0.1 mmol/L) 预处理 30 min 后, 血管环再用含槟榔碱 (0.1 mmol/L) 和 D-葡萄糖 (44 mmol/L) 的 KH 液共同孵育 6 h。

1.3 离体动脉环的制备和血管张力的测定

清洁级成年雄性 SD 大鼠脱颈椎处死, 迅速剥取胸主动脉, 放入预冷的 KH 液中, 清除周围结缔组织, 取长约 3 mm 的血管环, 固定于加有 KH 液的恒温 (37℃) 浴槽中, 持续通入含 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体。通过 BL420E 生物信息采集处理系统记录胸主动脉张力的变化。1.0 g 前负荷下平衡 1 h 每 15 min 换液一次。稳定后用 100 mmol/L 的 KCl 预刺激, 以激发最大收缩, 检查血管活性。1 μmol/L 的新福林预收缩后, 用 10 μmol/L 的乙酰胆碱舒张胸主动脉以检查血管内皮的完整性。各组大鼠胸主动脉环分别进行乙酰胆碱和硝普钠介导的舒张反应测定。动脉舒张反应以血管舒张最小张力占新福林 (10⁻⁶ mol/L) 预收缩时引起的最大收缩张力的百分比表示^[15]。并计算各剂量反应曲线的半数抑制浓度 (IC₅₀), 以其负对数值 (PD₂) 表示。

1.4 血管组织中一氧化氮含量的测定

取长约 4 cm 的血管环, 按上述实验分组, 每组 6 个血管环 (分别来自 6 只不同的 SD 大鼠), 孵育结束后取出血管环, 滤纸上吸干水份, 称重, 用电动玻璃匀浆器制成 10% 组织匀浆, 匀浆离心 (3 000 r/min, 10 min) 后, 取上清液, 保存于 -20℃ 冰箱。取不同组血管匀浆的上清液 100 μL, 按试剂盒说明分别检测 NO₂⁻ 的浓度, 以此代表 NO 的含量。按 BCA 蛋白定量试剂盒说明进行蛋白定量。

1.5 血管组织中超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的测定

取不同组血管组织匀浆的上清液 100 μL, 按试剂盒说明分别检测超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性和丙二醛的含量。按 BCA 蛋白定量试剂盒说明进行蛋白定量。

1.6 统计学处理

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析及 *t* 检验, 用 SPSS 14.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖和槟榔碱对乙酰胆碱介导的大鼠胸主动脉环内皮依赖性舒张反应的影响

与对照组相比, 高糖 (44 mmol/L) 处理显著降低了乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张反应 ($P < 0.05$), 表现为浓度-舒张效应曲线右上移位, PD₂ 值显著降低 (5.70 ± 0.35 比 7.19 ± 0.47 , $P < 0.05$); 单独槟榔碱处理显著增加了乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张反应 ($P < 0.05$), 表现为浓度-舒张效应曲线右下移位, PD₂ 值比对照组显著增加 (8.41 ± 0.74 , $P < 0.05$); 而甘露醇组乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张反应和 PD₂ 值与对照组间差异无显著性 (7.20 ± 0.53 , $P > 0.05$ 图 1)。

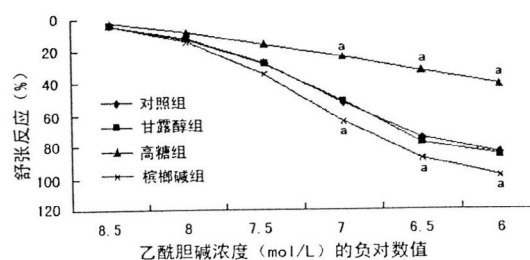


图 1 高糖和槟榔碱对乙酰胆碱介导的 SD 大鼠胸主动脉环舒张反应的影响 ($n = 6$) a 为 $P < 0.05$ 与对照组相比。

2 2 高糖和槟榔碱对硝普钠介导的 SD 大鼠胸主动脉环非内皮依赖性舒张反应的影响

各组动脉环对硝普钠介导的舒张反应(图 2)和 PD₂ 值差异均无显著性(对照组、甘露醇组、高糖组和单独槟榔碱处理组的 PD₂ 值分别为: 7.12 ± 0.76、7.20 ± 0.52、7.15 ± 0.41 和 7.17 ± 0.63)。

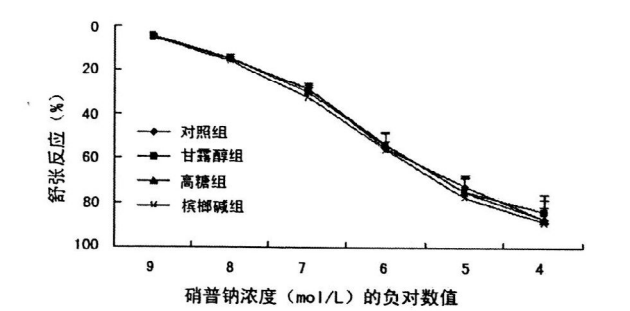


图 2 高糖和槟榔碱对硝普钠介导的 SD 大鼠胸主动脉环舒张反应的影响 (n = 6)

2 3 槟榔碱对高糖诱导的大鼠胸主动脉环内皮依赖性舒张反应损伤的影响

与高糖组比, 槟榔碱处理组浓度依赖性地增加了乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张反应, 表现为浓度-舒张效应曲线右下移(图 3), PD₂ 值增加(表 1)。

表 1 不同浓度槟榔碱对高糖诱导的内皮依赖性舒张反应曲线的半数抑制浓度的负对数值

分 组	PD ₂ 值
高糖组	5.67 ± 0.31
0.0001 mmol/L 槟榔碱组	5.87 ± 0.38
0.001 mmol/L 槟榔碱组	6.35 ± 0.51 ^{ab}
0.01 mmol/L 槟榔碱组	7.14 ± 0.54 ^{ac}
0.1 mmol/L 槟榔碱组	8.21 ± 0.67 ^{ad}

a 为 $P < 0.05$ 与高糖组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 0.0001 mmol/L 槟榔碱组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 0.001 mmol/L 槟榔碱组比较; d 为 $P < 0.05$ 与 0.01 mmol/L 槟榔碱组比较。

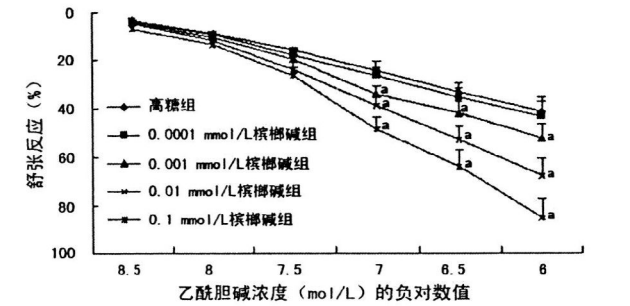


图 3 槟榔碱对高糖诱导的大鼠胸主动脉环内皮依赖性舒张反应损伤的影响 (n = 6) a 为 $P < 0.05$ 与高糖组相比。

2 4 阿托品和 N-硝基-L-精氨酸甲酯对槟榔碱作用的影响

与高糖和槟榔碱 (0.1 mmol/L) 共处理组相比, M 受体阻断剂阿托品取消了槟榔碱对高糖诱导的胸主动脉环内皮依赖性舒张反应损伤的保护作用 ($P < 0.05$); 同样, 一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 也取消了槟榔碱对高糖诱导的胸主动脉环内皮依赖性舒张反应损伤的保护作用 ($P < 0.05$, 图 4)。

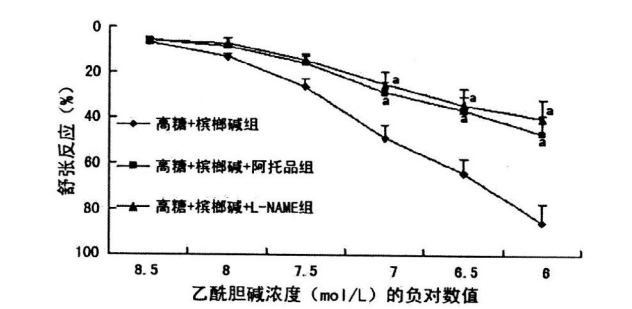


图 4 阿托品和 L-NAME 对槟榔碱作用的影响 (n = 6) a 为 $P < 0.05$ 与高糖 + 槟榔碱组相比。

2 5 槟榔碱和高糖对血管组织中一氧化氮和丙二醛含量以及超氧化物歧化酶活性的影响

与对照组相比, 高糖处理显著降低了血管组织中 NO 的含量 ($P < 0.05$), 槟榔碱处理则显著增加了血管组织中 NO 的含量 ($P < 0.05$), 甘露醇组血管组织中 NO 含量则无显著改变 ($P > 0.05$); 与高糖组相比, 高糖和槟榔碱 (0.1 mmol/L) 共处理组血管组织中 NO 含量显著增加 ($P < 0.05$, 表 2)。

与对照组相比, 高糖处理显著增加了血管组织中丙二醛的含量, 而降低了血管组织中 SOD 的活性 (均 $P < 0.05$), 槟榔碱组和甘露醇组血管组织中丙二醛的含量和 SOD 活性则无显著改变 ($P > 0.05$); 与高糖组相比, 高糖和槟榔碱 (0.1 mmol/L) 共处理组血管组织中丙二醛的含量显著降低 ($P < 0.05$), SOD 活性显著增加 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 槟榔碱和高糖对血管组织中一氧化氮和丙二醛含量以及超氧化物歧化酶活性的影响 (n = 6)

分 组	NO (mmol/g)	丙二醛 (μmol/g)	SOD (kU/g)
对照组	4.56 ± 0.55	6.73 ± 0.73	178.24 ± 23.71
甘露醇组	4.63 ± 0.41	6.64 ± 1.24	172.35 ± 30.55
高糖组	1.75 ± 0.12 ^a	10.47 ± 1.93 ^a	87.15 ± 12.46 ^a
槟榔碱组	6.82 ± 0.96 ^a	6.01 ± 0.68	192.47 ± 28.31
高糖 + 槟榔碱组	4.78 ± 0.51 ^b	6.86 ± 0.57 ^b	176.42 ± 22.94 ^b

a 为 $P < 0.05$ 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$ 与高糖组相比。

3 讨论

内皮细胞功能紊乱是糖尿病微血管和大血管并发症的主要原因,而高血糖是造成内皮细胞功能紊乱的重要原因。临床发现糖尿病病人易出现血管内皮损伤。本实验发现高糖环境能显著降低乙酰胆碱介导的血管内皮依赖性舒张反应,而相同浓度的甘露醇没有损伤血管内皮依赖性舒张反应,这说明高糖环境损伤了内皮的功能,而这种损伤与渗透压的改变无关。但高糖环境对硝普钠引起的非内皮依赖性舒张反应没有明显的影响,这说明高糖环境没有损伤平滑肌的功能。槟榔碱以浓度依赖的方式抑制了高糖所诱导的血管内皮依赖性舒张反应损伤,同时槟榔碱也直接导致了血管内皮依赖性舒张。

内皮细胞中 NO 是以 L-精氨酸为底物在一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的作用下产生的。NO 还是一种重要的血管舒张因子,能激活血管平滑肌内的鸟苷酸环化酶,使 cGMP 浓度升高,游离 Ca^{2+} 浓度降低,导致血管舒张。研究显示槟榔碱能刺激内皮细胞分泌 NO,舒张血管^[16-17]。我们的结果显示高糖处理显著降低了血管组织中 NO 的含量,而槟榔碱抑制了高糖的这种作用。同时一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 也取消了槟榔碱对高糖诱导的胸主动脉环内皮依赖性舒张反应损伤的保护作用。这些结果表明槟榔碱抑制高糖诱导的血管内皮依赖性舒张反应损伤,可能是通过增加 NO 的产生而实现的。

研究显示槟榔碱为 M 受体的激动剂,内皮细胞上 M 受体激动后可以激活 NOS 而导致 NO 的产生^[18]。本研究发现 M 受体阻断剂阿托品也同样取消了槟榔碱对高糖诱导的胸主动脉环内皮依赖性舒张反应损伤的保护作用。因此槟榔碱抑制高糖诱导的血管内皮依赖性舒张反应损伤,可能是通过激动内皮细胞上 M 受体,增加 NO 的产生而实现的。

氧化应激是机体在遭受有害刺激后,产生了过量的活性氧簇,超出了系统对其消除能力,过剩的活性氧对细胞的 DNA、蛋白质、脂质等造成巨大的损伤。活性氧可以攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,并因此形成脂质过氧化物,其代谢产物丙二醛是一种有害物质^[19]。糖尿病患者体内的高糖环境是导致机体产生氧化应激的重要原因。本实验发现高糖处理显著增加了血管组织中丙二醛的含量而降低了血管组织中 SOD 的活性,而槟榔碱处理抑制了高糖的这种作用。这些说明槟榔碱抑制了高糖诱导的氧

化应激。

综上所述,槟榔碱抑制了高糖诱导的血管内皮功能的损伤,其机制可能与槟榔碱激动内皮细胞上 M 受体,增加 NO 的产生以及槟榔碱减少脂质过氧化物的生成,抑制氧化应激有关。

[参考文献]

- [1] Tzimalos K, Athyros VG, Karagiannis A, et al. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010; **20** (2): 140-146.
- [2] Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction [J]. *Circulation*. 2009; **120** (13): 1266-286.
- [3] Wendler O, Landwehr P, Bandner-Risch D, et al. Vasoreactivity of arterial grafts in the patient with diabetes mellitus: investigations on internal thoracic artery and radial artery conduits [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2001; **20** (2): 305-311.
- [4] Wang SX, Xiong XM, Song T, et al. Protective effects of cariporide on endothelial dysfunction induced by high glucose [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005; **26** (3): 329-333.
- [5] Singh H, Brindle NP, Zaman VA. High glucose and elevated fatty acids suppress signaling by the endothelium protective ligand angiotensin-1 [J]. *Microvasc Res*. 2010; **79** (2): 121-127.
- [6] Madsen-Bouterse SA, Zhong Q, Mohammad G, et al. Oxidative damage of mitochondrial DNA in diabetes and its protection by manganese superoxide dismutase [J]. *Free Radic Res*. 2010; **44** (3): 313-321.
- [7] Matsumoto T, Noguchi E, Ishida K, et al. Metformin normalizes endothelial function by suppressing vasoconstrictor prostanooids in mesenteric arteries from OLETF rats: a model of type 2 diabetes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; **295** (3): 1165-176.
- [8] 张伟,周寿红,凌红艳,等. 槟榔碱抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的小鼠巨噬细胞炎症因子表达及其机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17** (4): 269-272.
- [9] 山丽梅,张锦超,赵艳玲,等. 槟榔碱抗动脉粥样硬化分子机制的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2004; **20** (2): 146-151.
- [10] 何昌浩,夏国瑾,李桂玲,等. 槟榔碱与灭螺药物合用的增效作用研究 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 1999; **11** (4): 21.
- [11] Chempakam B. Hypoglycaemic activity of arecoline in betel nut *Areca catechu* L. [J]. *Indian J Exp Biol*. 1993; **31** (5): 474-475.
- [12] 姚起鑫,元竹青,王光,等. 槟榔碱改善 2 型糖尿病大鼠糖、脂代谢紊乱 [J]. *中国药理学通报*, 2009; **25** (11): 1477-478.
- [13] 元竹青,姚起鑫,王光,等. 槟榔碱对 2 型糖尿病大鼠胰腺 β 细胞 PDX-1 mRNA 表达的影响 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2010; **30** (1): 14-19.
- [14] Wang SX, Lin LY, Hu M, et al. Na^+/H^+ exchanger inhibitor prevented endothelial dysfunction induced by high glucose [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005; **45** (6): 586-590.
- [15] 卢青,柯庆. 甲基莲心碱对兔离体脑基底动脉收缩的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003; **11** (4): 322-324.
- [16] 李明,彭解英,庞丹琳,等. 槟榔碱对血管内皮细胞增殖和分泌 NO 的影响 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2008; **24** (11): 662-664.
- [17] Kuo FC, Wu DC, Yuan SS, et al. Effects of arecoline in relaxing human umbilical vessels and inhibiting endothelial cell growth [J]. *J Perinat Med*. 2005; **33** (5): 399-405.
- [18] 梁宁霞,衣兰娟,田琳,等. 槟榔碱促结肠平滑肌细胞收缩及对胞内钙离子浓度的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2006; **14** (7): 676-681.
- [19] Thangjam GS, Kondaiah P. Regulation of oxidative-stress responsive genes by arecoline in human keratinocytes [J]. *J Periodontol Res*. 2009; **44** (5): 673-682.

(此文编辑 许雪梅)