

本文引用: 江雪露, 侯晓敏, 李东欢, 等. 杜鹃素通过激活 Kv7 通道舒张小鼠离体肺动脉[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(3): 192-200. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.03.002.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2026)34-03-0192-09

## 杜鹃素通过激活 Kv7 通道舒张小鼠离体肺动脉

江雪露<sup>1,2</sup>, 侯晓敏<sup>2,3</sup>, 李东欢<sup>1,2</sup>, 李 娴<sup>2,4</sup>, 任晓霞<sup>5</sup>, 郑志发<sup>6</sup>,  
刘永娥<sup>7</sup>, 张学凤<sup>6</sup>, 杨灵波<sup>6</sup>, 施熠炜<sup>8</sup>, 秦小江<sup>1,2,4</sup>

山西医科大学 1. 医学科学院, 2. 环境暴露血管疾病研究所, 3. 基础医学院, 4. 公共卫生学院, 山西省太原市 030001;  
5. 中日友好医院, 北京市 100020; 6. 山西省白求恩医院, 山西省太原市 030032; 7. 山西省煤炭中心医院,  
山西省太原市 030061; 8. 山西医科大学第一医院, 山西省太原市 030001

[摘要] [目的] 探究杜鹃素对不同收缩剂预刺激后小鼠离体肺动脉血管环的舒张作用, 以及该作用是否与 Kv7 通道有关。[方法] 利用血管张力测定系统, 测定肺动脉血管环的肌张力。首先检测  $10^{-8}$  mol/L 去甲肾上腺素 (NE) 或  $10^{-7}$  mol/L 5-羟色胺 (5-HT) 预收缩肺动脉后,  $10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  mol/L 杜鹃素的舒张作用。观察肺动脉内皮是否完整对杜鹃素舒张肺动脉血管环的影响。检测预先孵育杜鹃素 ( $RC_{50}$ , 60 min) 对 NE ( $10^{-10}$  ~  $10^{-7}$  mol/L) 和 5-HT ( $10^{-8}$  ~  $10^{-5}$  mol/L) 梯度收缩肺动脉的抑制作用。Fluo 4-AM 荧光钙离子探针实验检测杜鹃素对急性分离获得的小鼠肺动脉平滑肌细胞 (PASMC) 中  $[Ca^{2+}]_{in}$  的影响。观察 Kv7 通道阻滞剂 XE991  $1 \mu\text{mol/L}$  孵育 15 min 对杜鹃素梯度舒张肺动脉的影响。[结果] 杜鹃素 ( $10^{-6}$  ~  $10^{-4}$  mol/L) 能够显著舒张经 NE 或 5-HT 预收缩的肺动脉血管环 ( $P < 0.01$ ), 其舒张作用呈非内皮依赖性; 预先孵育杜鹃素 ( $RC_{50}$ , 60 min) 可显著减弱 NE 及 5-HT 所引发的肺动脉最大收缩反应 ( $P < 0.01$ ); Fluo 4-AM 实验表明, KCl 能够显著升高 PASMC 中的  $[Ca^{2+}]_{in}$ , 而  $RC_{50}$  杜鹃素对这一现象具有显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ ); 孵育 Kv7 通道阻滞剂 ( $1 \mu\text{mol/L}$  XE991, 15 min) 后, 杜鹃素对 NE 及 5-HT 预收缩小鼠肺动脉的舒张作用得到显著抑制 ( $P < 0.01$ )。[结论] 杜鹃素通过激活 Kv7 通道舒张小鼠离体肺动脉。

[关键词] 杜鹃素; 小鼠离体肺动脉环; 血管张力; 肺动脉平滑肌细胞; Kv7 通道

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

### Farrerol relaxes isolated mouse pulmonary arteries by activating Kv7 channels

JIANG Xuelu<sup>1,2</sup>, HOU Xiaomin<sup>2,3</sup>, LI Donghuan<sup>1,2</sup>, LI Xian<sup>2,4</sup>, REN Xiaoxia<sup>5</sup>, ZHENG Zhifa<sup>6</sup>, LIU Yong'e<sup>7</sup>, ZHANG Xuefeng<sup>6</sup>, YANG Lingbo<sup>6</sup>, SHI Yiwei<sup>8</sup>, QIN Xiaojiang<sup>1,2,4</sup>

1. Academy of Medical Science, 2. Environmental Exposures Vascular Disease Institute, 3. Basic Medical College, 4. School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 5. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100020, China; 6. Shanxi Bethune Hospital, Taiyuan, Shanxi 030032, China; 7. Shanxi Coal Central Hospital, Taiyuan, Shanxi 030061, China; 8. The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relaxation effect of farrerol on isolated mouse pulmonary artery (PA) rings pre-contracted with different vasoconstrictors, and to determine whether this effect is related to the Kv7 channels.

**Methods** The vascular tension was measured in pulmonary artery rings using wire myography. Firstly, the vasodilatory effects of farrerol at concentrations of  $10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  and  $10^{-4}$  mol/L were examined after pre-contraction of pulmonary arteries with  $10^{-8}$  mol/L norepinephrine (NE) or  $10^{-7}$  mol/L 5-hydroxytryptamine (5-HT). The influence of

[收稿日期] 2025-11-18

[修回日期] 2026-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (82204042); 国家自然科学基金面上项目 (82373622); 山西省科技创新人才团队 (青年) 项目 (202304051001038); 山西省科技合作交流专项项目 (区域合作项目) (202204041101022); 国家卫生健康委员会尘肺病重点实验室开放课题 (NHC202307); 山西省高等教育“百亿工程”科技引导专项 (BYJL067); 山西省科技厅自由探索类青年项目 (202203021222345)

[作者简介] 江雪露, 硕士研究生, 研究方向为天然产物的微血管药理作用, E-mail: 1187818948@qq.com. 通信作者秦小江, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为微血管病变机制及天然产物的保护作用, E-mail: sph@sxmu.edu.cn.

the presence or absence of PA endothelium on farrerol-induced relaxation of PA rings was observed. The inhibitory effect of pre-incubation with farrerol ( $RC_{50}$ , 60 min) on the graded contraction of PA induced by NE ( $10^{-10} \sim 10^{-7}$  mol/L) and 5-HT ( $10^{-8} \sim 10^{-5}$  mol/L) was measured. The effect of farrerol on intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in acute isolated mouse pulmonary arterial smooth muscle cell (PASMC) was detected using the Fluo 4-AM fluorescent calcium probe. Finally, the effect of the Kv7 channels blocker XE991 (1  $\mu$ mol/L, 15 min incubation) on farrerol-induced graded relaxation of pulmonary arteries was observed. **Results** Farrerol ( $10^{-6} \sim 10^{-4}$  mol/L) significantly relaxed PA rings pre-contracted with NE or 5-HT ( $P < 0.01$ ), and this relaxing effect was endothelium-independent. Pre-incubation with farrerol at concentration of  $RC_{50}$  for 60 min markedly attenuated the maximal contractions induced by both NE ( $10^{-10} \sim 10^{-7}$  mol/L) and 5-HT ( $10^{-8} \sim 10^{-5}$  mol/L). Furthermore, in PASMC loaded with Fluo 4-AM, farrerol ( $RC_{50}$ ) significantly inhibited the 30 mmol/L KCl-induced elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  ( $P < 0.01$ ). Pre-treatment with the blocker XE991 (1  $\mu$ mol/L 15 min) significantly attenuated farrerol-induced relaxation ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Farrerol relaxes isolated mouse PA by activating Kv7 channels.

[**KEY WORDS**] farrerol; isolated mouse pulmonary artery; vascular tension; pulmonary arterial smooth muscle cell; Kv7 channels

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是一种以肺动脉压力异常升高为特征的心血管疾病<sup>[1]</sup>, 其典型病理改变包括肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cell, PASMC) 和内皮细胞结构和功能改变、血管重塑、远端肺动脉阻塞等, 最终可造成右心衰竭<sup>[2]</sup>, 甚至导致患者死亡<sup>[3]</sup>。血管内皮功能障碍<sup>[4]</sup>、慢性炎症反应<sup>[5]</sup> 以及血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的异常增殖与迁移<sup>[6-7]</sup> 等, 不仅是 PH 的核心病理过程, 也在动脉粥样硬化的发生发展中起关键作用。杜鹃素是从中药满山红中分离提取的黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗菌和保护心血管的作用<sup>[8]</sup>。鉴于杜鹃素在保护心血管功能方面的潜在作用, 本研究聚焦于杜鹃素对不同收缩剂预收缩后小鼠离体肺动脉张力的改变及其作用机制。

探寻新型肺动脉舒张剂并明确其作用靶点, 对 PH 的防治至关重要。钾通道异常促进 PH 的发生发展<sup>[9]</sup>, 因此探究杜鹃素是否通过调控钾通道发挥作用, 成为一个合理的科学切入点。电压门控钾 (voltage-gated potassium, Kv) 通道广泛分布于平滑肌细胞, 在维持血管基础张力中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。抑制 Kv 通道可诱导平滑肌细胞去极化, 进而激活钙通道, 升高细胞质内钙离子浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ )<sup>[11]</sup>, 使平滑肌细胞收缩; 当钾通道开放时, 膜电位超极化, 关闭电压门控钙通道, 减少  $[Ca^{2+}]_i$  并引发血管舒张<sup>[11]</sup>。Kv7 通道是 Kv 家族的重要成员, 其功能障碍与高血压、心房颤动等多种心血管疾病密切相关<sup>[12]</sup>。在 PH 的病理状态下, 肺动脉 Kv7 通道的功能常发生特异性改变, 这提示 Kv7 通道与血管收缩和重塑过程直接相关<sup>[13]</sup>。研究表明, 激活 Kv7 通道可减少血管收缩力, 新型 Kv7 通道开放剂在临床前

模型中显示出显著的肺血管舒张效应<sup>[14]</sup>。本研究旨在探究 Kv7 通道在杜鹃素致小鼠肺动脉舒张中的作用, 为阐明杜鹃素舒张小鼠离体肺动脉的机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 购自山西医科大学实验动物中心, 12 h 光照、12 h 黑暗环境饲养。实验动物饲养及处理均符合《国家动物管理条例》, 且得到山西医科大学动物使用伦理委员会的批准 (批准号: SYDL2023036)。

### 1.2 药品与试剂

杜鹃素由山西医科大学药学院药物化学实验室合成, 纯度  $\geq 98\%$ 。氯化钾 (KCl), 每瓶 500 g (批号: G1819047), 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 购自天津金耀药业有限公司 (货号: H1202061)。5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 和乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 均购自美国 Sigma 公司 (货号分别为 3570963 和 3571875)。XE991 购自美国 AmBeed 公司 (货号: A931725)。细胞内钙离子测量试剂 (Fluo 4-AM special packaging) 购自日本 DOJINDO 化学研究所 (货号: VK853)。牛血清白蛋白购自北京索莱宝科技有限公司 (货号: A8010)。木瓜蛋白酶 (货号: 76216)、二硫苏糖醇 (货号: D0632)、胶原蛋白酶 F (货号: C7926)、胶原蛋白酶 H (货号: COLLH-RO) 均购自美国 Sigma 公司。鼠源抗  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白单克隆抗体 (mouse anti- $\alpha$  smooth muscle actin monoclonal antibody) 和 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG

H&L(goat anti-mouse IgG H&L/FITC)均购自北京Bioss 生物技术有限公司(货号分别为 Bsm-33187M 和 Bs-0296G-FITC)。

### 1.3 溶液

(1)K-H 液组成(mmol/L):118 NaCl,4.7 KCl,1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1.2 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,25 NaHCO<sub>3</sub>,11 Glucose,5 HEPES,2.5 CaCl<sub>2</sub>。(2)60 mmol/L KCl 溶液组成(mmol/L):89.9 NaCl,60 KCl,1.2 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,11 Glucose,5 HEPES,2.5 CaCl<sub>2</sub>。(3)细胞分离液的组成成分(mmol/L):85.0 NaCl,5.0 KCl,15.0 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,25.0 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,1.0 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,4.0 NaHCO<sub>3</sub>,5.0 Glucose。(4)细胞酶解液 I 的组成成分:1.0 g/L 牛血清白蛋白、0.5 g/L 木瓜蛋白酶、1.0 g/L 二硫苏糖醇加入细胞分离液中。(5)细胞酶解液 II 的组成成分:1.0 g/L 牛血清白蛋白、0.7 g/L 胶原蛋白酶 F、0.3 g/L 胶原蛋白酶 H 加入细胞分离液中。

### 1.4 仪器

微血管张力检测仪(DMT620 M)购自丹麦 Danish Myo Technology A/S 公司;pH 计(PB-10)和精密天平(BS124 S)购自德国 Sartorius 公司。

### 1.5 小鼠肺动脉离体血管环的分离制备及活性检测

参照课题组前期方法进行实验<sup>[15]</sup>。麻醉处死健康 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,剪下心肺置于 4 ℃ pH=7 的 K-H 液中,于显微镜下,用眼科剪和眼科镊去除小鼠肺部静脉及组织,分离出小鼠肺动脉,剪取长约 2 mm 的小鼠肺动脉,用两根直径为 25 μm 的钨丝穿过动脉环,固定于微血管张力测定仪上。固定好的小鼠肺动脉环置于 37 ℃、95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 连续鼓泡的 K-H 液中,每 15 min 更换一次 K-H 液,待血管张力稳定后,加入 60 mmol/L KCl 判断血管活性,收缩力可稳定达到 ≥2 mN 的肺动脉视为活性达标,可用于后续实验。

单位面积血管张力的计算方法如下。调节浴槽的螺旋纽,使两根钨丝平行靠近,且初始距离为零,读取此时螺旋测微尺上的数值并记录为 D<sub>1</sub>(μm)。逆时针旋转螺旋测微尺(每 2 min 调节 1 次),牵拉血管环,读取并记录 LabChart 软件上的张力值 F<sub>i</sub>(mN)和螺旋测微尺读数 D<sub>i</sub>(μm)。两根钨丝之间的直线距离 X<sub>i</sub>=D<sub>i</sub>-D<sub>1</sub>。血管环内周长为血管环内侧的周长,不包含钨丝所占长度,所以 IC<sub>i</sub>=4r+2X<sub>i</sub>=50+2X<sub>i</sub>。单位长度血管张力 T<sub>i</sub>(mN/mm)=F<sub>i</sub>/2L,其中 L(mm)为通过体视显微镜目镜测微尺直接测得的血管环的长度。本实验以血管张力/血管壁侧面积(mN/mm<sup>2</sup>)表示单位面积血管壁所承受的张

力,其计算公式如下:单位面积血管张力(mN/mm<sup>2</sup>)=F<sub>i</sub>/(IC<sub>i</sub>×L×10<sup>-3</sup>)。

### 1.6 不同收缩剂预收缩后杜鹃素对小鼠肺动脉张力的作用

分离并制备小鼠肺动脉,验证活性后,使用 10<sup>-8</sup> mol/L NE 或 10<sup>-7</sup> mol/L 5-HT 分别预收缩肺动脉,诱导肺动脉至最大收缩且保持平稳,达到平台期。实验组按照浓度梯度累计加入不同浓度杜鹃素(10<sup>-6</sup>、3×10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>、3×10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup> mol/L),溶剂对照组加入等量 DMSO,以上每个实验组使用小鼠均为 6 只。以各收缩剂诱导的最大稳定收缩为 100% 建立浓度-舒张曲线,记录加入不同浓度杜鹃素和等量 DMSO 后预收缩小鼠肺动脉血管张力的变化,研究杜鹃素对预收缩 C57BL/6J 小鼠肺动脉单位面积血管张力的作用。记录并比较各浓度杜鹃素引起的舒张幅度,并构建杜鹃素的浓度-舒张幅度效应曲线。杜鹃素舒张率(%)=(1-加入杜鹃素后肺动脉舒张至平台期的单位面积张力/收缩剂诱导血管环最大单位面积收缩)×100%。

### 1.7 内皮是否完整对杜鹃素舒张小鼠肺动脉血管环的影响

在固定肺动脉血管环时,使用两根钨丝穿过血管环,在血管内壁上轻轻摩擦钨丝,以机械方式去除内皮。60 mmol/L KCl 使血管收缩至平台期后,加入 10 μmol/L ACh,若肺动脉舒张能力达到 80% 及以上,则认为内皮仍保留完整,若血管舒张能力 < 10%,认为血管内皮已完全去除。

使用 10<sup>-8</sup> mol/L NE 或 10<sup>-7</sup> mol/L 5-HT 分别预收缩肺动脉,诱导其收缩至平台期,使用不同浓度杜鹃素(10<sup>-6</sup>~10<sup>-4</sup> mol/L)分别梯度舒张内皮完整(endothelium-intact, Endo<sup>+</sup>)和去内皮(endothelium-denuded, Endo<sup>-</sup>)的肺动脉,分别检测各浓度杜鹃素对 Endo<sup>+</sup>和 Endo<sup>-</sup>肺动脉舒张幅度的影响,以各收缩剂诱导的最大稳定收缩为 100% 建立浓度-舒张曲线。

### 1.8 预先孵育杜鹃素对 C57BL/6J 小鼠肺动脉血管环收缩的影响

利用 GraphPad Prism 10.1.2 软件,选择剂量-反应-抑制(dose-response-inhibition)模型进行非线性拟合分析,具体模型为“log(inhibitor) vs. 归一化响应——可变斜率”[log(inhibitor) vs. normalized response-variable slope],绘制横坐标为杜鹃素对数浓度(单位:μmol/L)、纵坐标为舒张百分比的剂量-

效应曲线,计算得到杜鹃素半数舒张浓度( $RC_{50}$ )值,用于后续实验。

将验证过活性的血管环分成两组进行实验,实验组用  $RC_{50}$  杜鹃素预先孵育 60 min,再加入不同浓度的 NE( $10^{-10}$ 、 $3 \times 10^{-9}$ 、 $10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-7}$  和  $10^{-7}$  mol/L) 或 5-HT( $10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-7}$ 、 $10^{-7}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  和  $10^{-5}$  mol/L) 梯度收缩小鼠肺动脉;对照组在不孵育杜鹃素的情况下,直接加入不同浓度 NE 或 5-HT 梯度收缩小鼠肺动脉,记录并比较各浓度收缩剂引起的收缩张力,用血管收缩张力/血管壁侧面积( $mN/mm^2$ )表示单位面积血管壁所承受的收缩张力,并构建各收缩剂的浓度-收缩张力/血管壁侧面积效应曲线。

### 1.9 两步酶解法急性分离获取小鼠原代 PSMC 及其免疫荧光鉴定

采用两步酶解法急性分离<sup>[16]</sup>获取小鼠原代 PSMC。第一步:将分离获得的肺动脉转移至装有 1 mL 细胞酶解液 I 的离心管中,37 °C 恒温水浴,持续均匀地通入  $O_2$ ,定时 30 min,观察血管状态,直至血管变得蓬松。第二步:将肺动脉转移至装有细胞酶解液 II(37 °C,0.7 mL)的离心管中,37 °C 恒温水浴,酶解 3 min,直至血管变细,组织分散。离心管中继续加入 37 °C 的细胞分离液至 1 mL,约 1~2 min 后,血管变得更细,组织愈发松散,用胶头滴管反复轻柔地吹打血管,使细胞吹落。随后迅速将 4 °C 细胞分离液加入至离心管中,直至加满,终止酶解反应。800 r/min 离心 6 min,弃上清,保留 2 mL 细胞悬液,再次加满 4 °C 细胞分离液,再次离心,尽可能去除残余的细胞酶解液和细胞骨架。吸取 200  $\mu$ L 最终获取的细胞液至 96 孔板中,待细胞贴壁后进行后续实验。

细胞贴壁后弃去培养基,加入 PBS 液清洗 3 次,加入 4% PFA 溶液室温固定。弃去固定液,用 PBS 液清洗后加入 0.2% Triton X-100 溶液透化。弃去透化液,PBS 液清洗后,加入 10% 山羊血清溶液室温封闭。弃去封闭液,加入 PBS 液稀释的特异性一抗鼠源抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(稀释比例 1:200),湿盒中 4 °C 过夜孵育。次日回收一抗,PBS 液洗涤后,加入 PBS 液稀释的特异性二抗 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG H&L(稀释比例 1:500),避光室温孵育。回收二抗,PBS 液洗涤后加入 DAPI 溶液,室温孵育。弃去 DAPI 溶液,加入少量 PBS 液,荧光倒置显微镜下观察并拍照。

### 1.10 Fluo 4-AM 荧光探针检测杜鹃素对 PSMC 中 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

采用 Fluo 4-AM 荧光探针对 PSMC 进行  $[Ca^{2+}]_i$  测定。待 PSMC 贴壁后,避光加入 5  $\mu$ mol/L 钙离子荧光指示剂 Fluo 4-AM,在 37 °C 条件下孵育 30 min,随后用正常培养液洗涤去除多余染料。30 mmol/L KCl 刺激后加入  $RC_{50}$  杜鹃素,分别记录初始状态下、30 mmol/L KCl 刺激后以及加入杜鹃素后 PSMC 的荧光强度。使用尼康 TE2000-5 倒置荧光显微镜(日本)以 10 帧/min 频率采集图像,激发波长 488 nm,发射波长 >510 nm。结果以相对荧光密度( $F/F_0$ ,细胞内荧光/背景荧光)表示。

### 1.11 Kv7 通道在杜鹃素舒张肺动脉血管环中的作用

为了深入探究杜鹃素舒张小鼠离体肺动脉的作用靶点,采用 Kv7 通道特异性阻滞剂 XE991 进行干预<sup>[17]</sup>。60 mmol/L KCl 验证肺动脉血管活性后,使用  $10^{-8}$  mol/L NE 或  $10^{-7}$  mol/L 5-HT 预收缩小鼠肺动脉血管环至平台期,实验组加入 Kv7 通道阻滞剂 XE991 1  $\mu$ mol/L 孵育 15 min,随后使用不同浓度杜鹃素梯度舒张肺动脉;对照组加入等量 DMSO 孵育 15 min,再加入浓度梯度的杜鹃素舒张肺动脉。记录两组加入不同浓度杜鹃素后小鼠肺动脉血管张力的变化,以各收缩剂诱导的最大稳定收缩为 100% 建立浓度-舒张曲线。

### 1.12 统计学分析方法

所有实验结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 26.0 进行统计学分析,组间均数比较采用单因素方差分析及重复测量方差分析,两两均数比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。应用 GraphPad Prism 10.1.2 计算得出  $RC_{50}$ ,并应用 GraphPad Prism 10.1.2 作图,图中的误差棒均表示标准差。实验中  $n$  表示小鼠数量。

## 2 实验结果

### 2.1 不同收缩剂预收缩后,杜鹃素均可梯度舒张小鼠离体肺动脉血管环

$10^{-8}$  mol/L NE 和  $10^{-7}$  mol/L 5-HT 分别预收缩小鼠肺动脉至平台期后,不同浓度杜鹃素( $10^{-6}$  ~  $10^{-4}$  mol/L)对肺动脉均存在舒张作用;与溶剂对照组相比, $10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  以及  $10^{-4}$  mol/L 杜鹃素对肺动脉的舒张作用均具有统计学差异( $P < 0.01$ )。分别以  $10^{-8}$  mol/L NE 和  $10^{-7}$  mol/L 5-HT 诱导的最大稳

定收缩为 100% (此时舒张为 0%),  $10^{-4}$  mol/L 杜鹃素可使 NE 预收缩的小鼠肺动脉血管张力减少 85.54% ( $P < 0.01$ ; 图 1A 和 1B), 使 5-HT 预收缩的

小鼠肺动脉血管张力减少 84.92% ( $P < 0.01$ ; 图 1C 和 1D)。杜鹃素可梯度舒张不同收缩剂预收缩的肺动脉血管环。

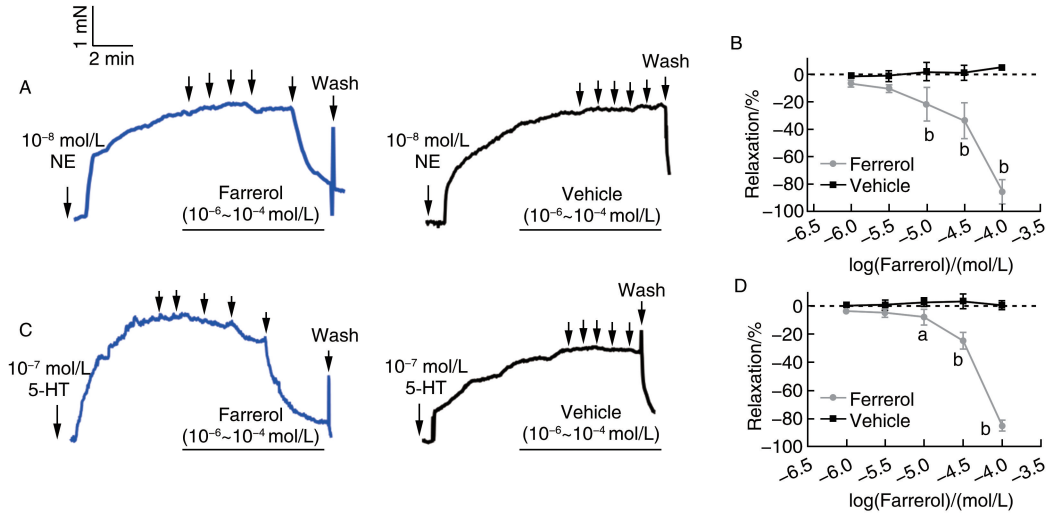


图 1. 杜鹃素对 NE 或 5-HT 预收缩小鼠肺动脉的舒张作用

A 为杜鹃素及溶剂舒张 NE 预收缩小鼠肺动脉的原始轨迹图; B 为统计分析 NE 预收缩后杜鹃素对肺动脉的舒张率 ( $n=6$ ); C 为杜鹃素及溶剂舒张 5-HT 预收缩小鼠肺动脉的原始轨迹图; D 为统计分析 5-HT 预收缩后杜鹃素对肺动脉的舒张率 ( $n=6$ )。a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与溶剂对照组相比。

Figure 1. Relaxing effect of farrerol on mouse pulmonary arteries precontracted with NE or 5-HT

### 2.2 内皮是否完整对杜鹃素舒张小鼠离体肺动脉的影响

$10^{-8}$  mol/L NE 和  $10^{-7}$  mol/L 5-HT 分别预收缩小鼠肺动脉至平台期后, 杜鹃素对 Endo<sup>+</sup> 和 Endo<sup>-</sup> 的肺动脉均有梯度舒张作用。  $10^{-8}$  mol/L NE 预收缩后, 杜鹃素对 Endo<sup>+</sup> 和 Endo<sup>-</sup> 肺动脉的最大舒张率分

别为 92.42% 和 87.42%;  $10^{-7}$  mol/L 5-HT 预收缩后, 杜鹃素对 Endo<sup>+</sup> 和 Endo<sup>-</sup> 肺动脉的最大舒张率分别为 85.43% 和 81.38%。提示, 无论内皮是否存在, 杜鹃素均可舒张肺动脉, 且舒张作用差异无显著性 ( $P > 0.05$ ; 图 2)。

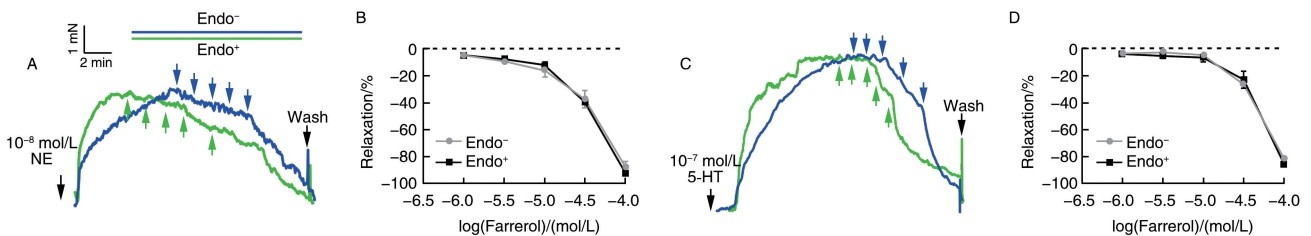


图 2. 内皮是否完整对杜鹃素舒张小鼠离体肺动脉的影响

A 为 NE 预收缩后杜鹃素 ( $10^{-6} \sim 10^{-4}$  mol/L) 梯度舒张 Endo<sup>+</sup> 和 Endo<sup>-</sup> 肺动脉的原始轨迹图; B 为统计分析 NE 预收缩后 Endo<sup>+</sup> 组与 Endo<sup>-</sup> 组中杜鹃素对肺动脉的舒张率 ( $n=6$ ); C 为 5-HT 预收缩后杜鹃素 ( $10^{-6} \sim 10^{-4}$  mol/L) 梯度舒张 Endo<sup>+</sup> 和 Endo<sup>-</sup> 肺动脉的原始轨迹图; D 为统计分析 5-HT 预收缩后 Endo<sup>+</sup> 组与 Endo<sup>-</sup> 组中杜鹃素对肺动脉的舒张率 ( $n=6$ )。

Figure 2. Effect of endothelial integrity on farrerol-induced relaxation of isolated mouse pulmonary arteries

### 2.3 预先孵育杜鹃素对不同浓度 NE 和 5-HT 梯度收缩小鼠肺动脉的影响

根据不同浓度杜鹃素对肺动脉的舒张率, 生成

浓度-舒张非线性拟合曲线, 利用 GraphPad Prism 10.1.2 软件分析得到杜鹃素半数舒张浓度 ( $RC_{50}$  值) 近似 35  $\mu$ mol/L, 因此选择 35  $\mu$ mol/L 浓度进行

杜鹃素预先孵育后的梯度收缩实验。未孵育杜鹃素直接加入不同浓度梯度的 NE ( $10^{-10} \sim 10^{-7}$  mol/L) 或 5-HT ( $10^{-8} \sim 10^{-5}$  mol/L) 可梯度收缩小鼠肺动脉,

而用 35  $\mu\text{mol/L}$  杜鹃素孵育 60 min 后, NE 及 5-HT 诱导的梯度收缩均被显著抑制, 最大收缩幅度分别降低约 58.3% 和 71.8% ( $P < 0.01$ ; 图 3)。

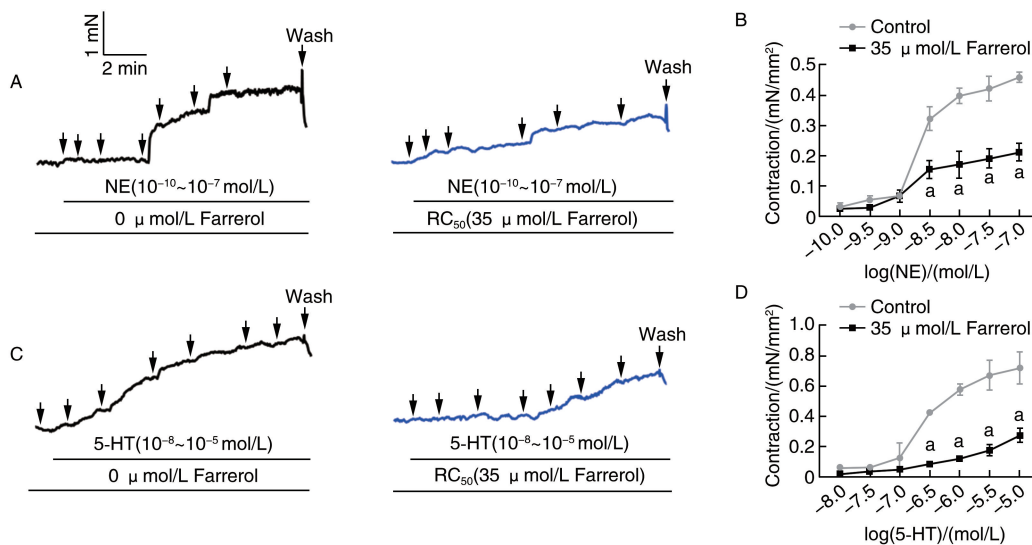


图 3. 预先孵育杜鹃素对不同浓度 NE 和 5-HT 梯度收缩小鼠肺动脉的抑制作用

A 为预先孵育杜鹃素后 NE 梯度收缩小鼠肺动脉的原始轨迹图; B 为统计分析未孵育杜鹃素组 (对照组) 与  $\text{RC}_{50}$  杜鹃素孵育组 NE 梯度收缩肺动脉的情况 ( $n=6$ ); C 为预先孵育杜鹃素后 5-HT 梯度收缩小鼠肺动脉的原始轨迹图; D 为统计分析未孵育杜鹃素组 (对照组) 与  $\text{RC}_{50}$  杜鹃素孵育组 5-HT 梯度收缩肺动脉的情况 ( $n=6$ )。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组相比。

Figure 3. Inhibitory effect of pre-incubated farrerol on NE- and 5-HT-induced concentration-dependent in mouse pulmonary arteries

#### 2.4 急性分离获取的小鼠原代 PSMC 的免疫荧光鉴定

图 4 为两步酶解法急性分离获取的小鼠原代 PSMC 的鉴定结果。图中绿色荧光表示细胞质中平滑肌特异性蛋白  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 呈强阳性表达; 细胞核由 DAPI 复染呈蓝色荧光。上述特征表明, 所获细胞具有典型的平滑肌细胞表型, 可鉴定为 PSMC 用于后续实验。

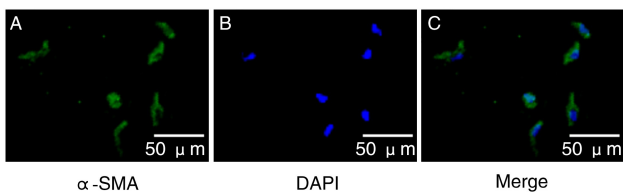


图 4. 小鼠原代 PSMC 的免疫荧光鉴定结果

A 为血管平滑肌特异性蛋白  $\alpha$ -SMA 染色; B 为细胞核染色; C 为  $\alpha$ -SMA 与 DAPI 的 Merge 图。

Figure 4. Immunofluorescence identification of primary mouse PSMC

#### 2.5 Fluo 4-AM 荧光探针检测杜鹃素对细胞中 $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ 的影响

采用 Fluo 4-AM 钙离子探针实验检测  $\text{RC}_{50}$  杜鹃素 (35  $\mu\text{mol/L}$ ) 对静息状态下及 30 mmol/L KCl 刺激后小鼠 PSMC 中  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  的影响。结果表明, 30 mmol/L KCl 可显著增强小鼠 PSMC 中荧光强度, 升高  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ ; 加入 35  $\mu\text{mol/L}$  杜鹃素后, PSMC 中荧光强度迅速减弱, 表明杜鹃素显著降低了小鼠 PSMC 中  $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$  ( $P < 0.01$ ; 图 5)。

#### 2.6 Kv7 通道在杜鹃素舒张肺动脉血管环中的作用

在未加入 XE991 干预的对照组中, 杜鹃素可使 NE 和 5-HT 预收缩的小鼠肺动脉舒张率分别达到 88.52% 和 88.74%。然而, 加入 1  $\mu\text{mol/L}$  XE991 15 min 后, 杜鹃素可使 NE 预收缩的小鼠肺动脉舒张率减少至 44.55% ( $P < 0.01$ ; 图 6A 和 6B), 使 5-HT 预收缩的小鼠肺动脉舒张率减少至 63.70% ( $P < 0.01$ ; 图 6C 和 6D)。与对照组相比, XE991 干预后, 杜鹃素对 NE 及 5-HT 预收缩小鼠肺动脉的舒张作用显著减弱 ( $P < 0.01$ )。

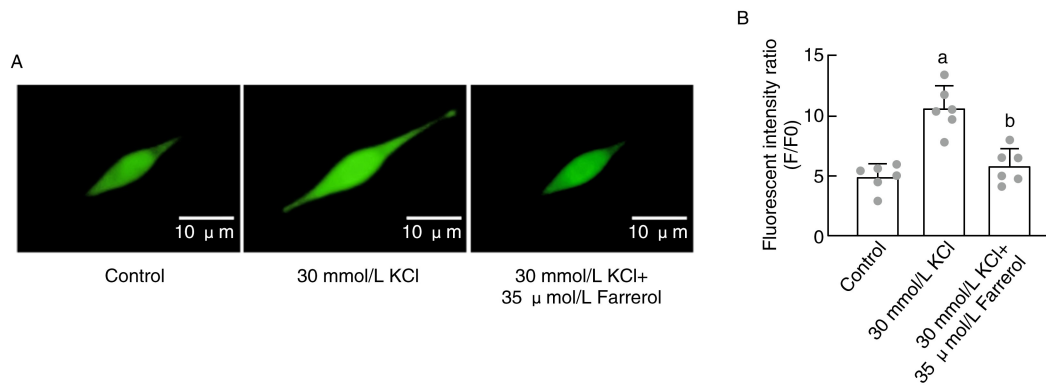


图 5. Fluo 4-AM 荧光探针检测杜鹃素对细胞中  $[Ca^{2+}]_in$  的影响

A 为静息状态下加入 30 mmol/L KCl 后,以及在 30 mmol/L KCl 的基础上加入 35  $\mu$ mol/L 杜鹃素情况下 PASCs 荧光图; B 为荧光强度数据统计图( $n=6$ )。a 为  $P<0.01$ , 与对照组相比; b 为  $P<0.01$ , 与 30 mmol/L KCl 组相比。

Figure 5. Effect of farrerol on  $[Ca^{2+}]_in$  in PASCs detected by Fluo 4-AM fluorescence probe

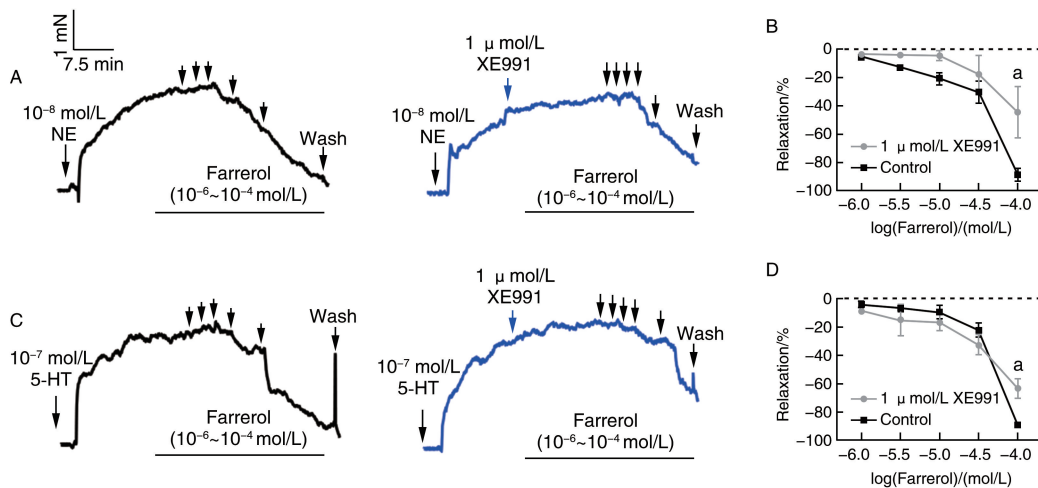


图 6. Kv7 通道在杜鹃素舒张肺动脉血管环中的作用

A 为 NE 预收缩后,未加入 XE991 组(对照组)以及 1  $\mu$ mol/L XE991 预先孵育 15 min 对杜鹃素梯度舒张小鼠肺动脉的原始轨迹图; B 为统计分析 NE 预收缩后对照组与 XE991 干预组中杜鹃素对肺动脉的舒张率( $n=6$ ); C 为 5-HT 预收缩后,未加入 XE991 组(对照组)以及 1  $\mu$ mol/L XE991 预先孵育 15 min 对杜鹃素梯度舒张小鼠肺动脉的原始轨迹图; D 为统计分析 5-HT 预收缩后对照组与 XE991 干预组中杜鹃素对肺动脉的舒张率( $n=6$ )。a 为  $P<0.01$ , 与对照组相比。

Figure 6. Role of Kv7 channels in farrerol-induced relaxation of mouse pulmonary artery rings

### 3 讨论

PH 发病率约占全球总人数 1%, 在 65 岁以上老年群体中占比更高<sup>[18]</sup>。据预测, 2050 年全球 PH 患病例数将会翻倍, 死亡人数增加 70%<sup>[19]</sup>。长期 PH 可增加动脉粥样硬化风险, 给患者和社会带来较大负担<sup>[5]</sup>, 因此深入研究 PH 的病理机制, 寻找关键的作用靶点及离子通道, 对缓解日益严重的 PH 相关心血管疾病至关重要。

杜鹃素是从杜鹃属植物中提取的黄酮类化合物, 可人工合成, 具有多种生物活性, 如抗氧化、抗

炎、抗菌和血管保护作用等<sup>[8]</sup>。课题组前期研究表明, 杜鹃素对大鼠离体主动脉具有舒张作用<sup>[20]</sup>, 可减轻大鼠主动脉病变, 其作用机制包括: 抑制肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)激酶及平滑肌蛋白 22 $\alpha$  (smooth muscle protein 22-alpha, SM22 $\alpha$ ) 的 mRNA 及蛋白表达, 上调  $\alpha$ 1D 肾上腺素受体基因表达, 降低血管紧张素 II 诱导的肌球蛋白磷酸酶靶向亚基 1 和 MLC 磷酸化水平<sup>[21]</sup>, 提示具有一定的抗动脉粥样硬化潜力。已有研究表明, 杜鹃素不仅对大鼠主动脉有较好的保护作用, 亦可改善高盐饮食所致的冠状动脉重塑<sup>[22]</sup>。此外, 杜鹃素可通过增强

Kv1.5 和 Kv2.1 的表达,抑制尼古丁所致的 PASMC 增殖<sup>[23]</sup>,提示杜鹃素预防和/或治疗 PASMC 增殖性疾病的巨大潜能。本研究首先检测了杜鹃素对小鼠离体肺动脉张力的作用,结果发现,杜鹃素可梯度舒张  $10^{-8}$  mol/L NE 和  $10^{-7}$  mol/L 5-HT 预刺激的小鼠离体肺动脉,且内皮存在与否不影响杜鹃素对肺动脉的舒张作用,半数舒张浓度 ( $35 \mu\text{mol/L}$ ) 杜鹃素预先孵育 60 min 可显著抑制 NE 及 5-HT 对小鼠离体肺动脉的梯度收缩作用;而且钙离子探针实验也发现,30 mmol/L KCl 可显著增强  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ ,加入杜鹃素后,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  迅速降低。上述结果均说明杜鹃素对肺动脉有一定的舒张作用,提示其可能在 PH 的防治中发挥一定疗效。

Kv7 通道与调节心血管疾病密切相关。环氧合酶抑制剂塞来昔布、双氯芬酸和甲氯芬那酸等具有开放 Kv7 通道的作用,这些药物可明显降低心血管疾病发病率<sup>[24]</sup>。新型 Kv7 通道开放剂 URO-K10 在离体肺动脉及 PH 模型中均显示出强效舒张作用,证明靶向 Kv7 通道是较好的治疗策略<sup>[14]</sup>。PH 的治疗药物通过刺激 cGMP 或 cAMP 信号通路发挥作用。研究发现,cGMP 可作为上游靶点介导 Kv7 通道开放,进而抑制下游的电压门控钙通道,减少钙离子内流,最终降低  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ ,达到舒张血管的作用<sup>[17]</sup>。此外,相关研究进一步聚焦 Kv7 亚型。研究发现,在缺氧模型的 PH 大鼠中,虽然总钾电流减少,但 Kv7 电流,尤其是 Kv7.1、Kv7.4 和 Kv7.5 亚型,对肺动脉舒张的调控作用反而变得更为关键<sup>[25]</sup>。

本研究探讨了天然产物杜鹃素对肺动脉的保护作用与 Kv7 通道的关联。研究结果显示,使用 Kv7 通道特异性阻滞剂 XE991 干预后,杜鹃素对预收缩小鼠肺动脉的舒张作用显著减弱,这不仅证实了杜鹃素对小鼠肺动脉的舒张效应,还将其舒张作用机制与肺动脉平滑肌上的 Kv7 通道联系起来,为理解杜鹃素的心血管作用提供了新的分子视角。本研究仍存在一定的局限性。首先,本研究在离体组织水平进行药理学实验,阐明杜鹃素对肺动脉血管环的直接作用靶点,但它并不能完全模拟杜鹃素在完整机体内的真实代谢、分布过程以及长期效应,仍需动物实验进一步验证。其次,本研究目前仅聚焦于肺动脉组织层面的功能学证据,尚未从细胞层面深入探究,因此我们在后续的实验中将进一步探究具体的 Kv7 通道亚型 (Kv7.1、Kv7.4 和 Kv7.5) 在杜鹃素舒张肺动脉中的作用。本研究探究了以杜

鹃素为代表的天然产物在靶向 Kv7 通道治疗 PH 方面的巨大应用前景,提示杜鹃素值得作为一种有潜力的候选药物用于 PH 相关疾病的防治。

#### [参考文献]

- [1] KANWAR M K, TEDFORD R J, THENAPPAN T, et al. Elevated pulmonary pressure noted on echocardiogram: a simplified approach to next steps[J]. *J Am Heart Assoc*, 2021, 10(7): e017684.
- [2] 郑卫峰,王皓,范彩逢,等. 分次逐级经皮腔内球囊肺动脉瓣成形术在治疗慢性血栓栓塞性肺动脉高压患者中的临床疗效及安全性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(5): 412-418.  
ZHENG W F, WANG H, FAN C F, et al. Clinical efficacy and safety of sequential balloon pulmonary angioplasty in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension [J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(5): 412-418.
- [3] BISSERIER M, KATZ M G, BUENO-BETI C, et al. Combination therapy with STAT3 inhibitor enhances SERCA2a-induced BMPR2 expression and inhibits pulmonary arterial hypertension[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9105.
- [4] OCHOA M T, LEPPERT C, RICCHI B, et al. Epigenetic reprogramming drives endothelial dysfunction via neuropilin-1 in pulmonary hypertension[J]. *Mol Med*, 2025, 31(1): 336.
- [5] LIU S F, NAMBIAR VEETIL N, LI Q, et al. Pulmonary hypertension: linking inflammation and pulmonary arterial stiffening[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 959209.
- [6] 陈薇,张梦洁,冯荣,等. 低氧诱导因子在心血管疾病中的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(1): 72-78.  
CHEN W, ZHANG M J, FENG R, et al. Research progress of hypoxia inducible factors in cardiovascular diseases[J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(1): 72-78.
- [7] DABRAL S, NOH M, WERNER F, et al. C-type natriuretic peptide/cGMP/FoxO3 signaling attenuates hyperproliferation of pericytes from patients with pulmonary arterial hypertension[J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 693.
- [8] QIN X, XU X, HOU X, et al. The pharmacological properties and corresponding mechanisms of farrerol: a comprehensive review[J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 9-16.
- [9] REDEL-TRAUB G, SAMPSON K J, KASS R S, et al. Potassium channels as therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(10): 1341.
- [10] DAGHBOUCHE-RUBIO N, LÓPEZ-LÓPEZ J R, PÉREZ-GARCÍA M T, et al. Vascular smooth muscle ion channels in essential hypertension[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1016175.
- [11] JACKSON W F. Kv channels and the regulation of vascular smooth muscle tone [J]. *Microcirculation*, 2018, 25(1): e12421.

- [12] NIEVES-CINTRÓN M, SYED A U, NYSTORIAK M A, et al. Regulation of voltage-gated potassium channels in vascular smooth muscle during hypertension and metabolic disorders[J]. *Microcirculation*, 2018, 25(1): e12423.
- [13] MONDÉJAR-PARREÑO G, MORAL-SANZ J, BARREIRA B, et al. Activation of Kv7 channels as a novel mechanism for NO/cGMP-induced pulmonary vasodilation [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(13): 2131-2145.
- [14] VILLEGAS-ESGUEVILLAS M, CHO S, VERA-ZAMBRANO A, et al. The novel KV7 channel activator UROK10 exerts enhanced pulmonary vascular effects independent of the KCNE4 regulatory subunit [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 114952.
- [15] QIN X, HOU X, XU X, et al. Down-regulation of connexin 43 contributes to structure and function of pulmonary artery in nicotine-administered mice [J]. *Toxicol Lett*, 2023, 377: 1-13.
- [16] GILBERT G, DUCRET T, MARTHAN R, et al. Stretch-induced  $Ca^{2+}$  signalling in vascular smooth muscle cells depends on  $Ca^{2+}$  store segregation [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103(2): 313-323.
- [17] AL-CHAWISHLY M, LOVELAND O, GURNEY A M. Kv7 channels in cyclic-nucleotide dependent relaxation of rat intra-pulmonary artery [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(3): 429.
- [18] HUMBERT M, KOVACS G, HOEPER M M, et al. 2022 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2023, 61(1): 2200879.
- [19] QIU J Y, QIU L H, HUANG S S, et al. Pulmonary arterial hypertension: a long-standing and nonnegligible burden over three decades [J]. *Sci Bull (Beijing)*, 2025, 70(11): 1766-1769.
- [20] 秦小江, 侯晓敏, 李青山. 杜鹃素对大鼠离体主动脉搏的舒张作用及机制 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2012, 10(4): 457-458.
- [21] QIN X J, HOU X M, LI Q S. Vasorelaxant effect of DJS on rat isolated aorta and its underlying mechanism [J]. *Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis*, 2012, 10(4): 457-458.
- [22] QIN X, HOU X, ZHANG K, et al.  $\alpha$ 1D-adrenoceptor involves the relaxation effect of farrerol in rat aortic vascular smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 853: 169-183.
- [22] 秦小江, 杨晓宇, 许欣荣, 等. 杜鹃素对高盐膳食致冠状动脉重构的影响及机制 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(9): 939-943.
- [22] QIN X J, YANG X Y, XU X R, et al. Effect and mechanism of farrerol in coronary artery remodeling induced by high-salt diet [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2022, 38(9): 939-943.
- [23] 侯晓敏, 张明升, 秦小江. 杜鹃素通过增强 Kv1.5 和 Kv2.1 表达抑制尼古丁所致的肺动脉平滑肌细胞增殖 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(7): 1276-1282.
- [23] HOU X M, ZHANG M S, QIN X J. Farrerol inhibits Nicotine-induced proliferation of pulmonary vascular smooth muscle cells by enhancing Kv1.5 and Kv2.1 expression [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2019, 35(7): 1276-1282.
- [24] 张璇, 刘灵, 焦晓翠, 等. Kv7 钾离子通道在血管平滑肌中的表达及功能 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(4): 457-460.
- [24] ZHANG X, LIU L, JIAO X C, et al. Expression and functional role of Kv7 channels in vascular smooth muscle [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2013, 29(4): 457-460.
- [25] MONDÉJAR-PARREÑO G, BARREIRA B, CALLEJO M, et al. Uncovered contribution of Kv7 channels to pulmonary vascular tone in pulmonary arterial hypertension [J]. *Hypertension*, 2020, 76(4): 1134-1146.
- (此文编辑 许雪梅)