

王星茹,杨泽熔,武莉,等. 基于 Kv7 离子通道探讨木犀草素对大鼠胸主动脉血管环的舒张作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(6): 84-92.

Wang XR, Yang ZR, Wu L, et al. Dilation effect of luteolin in rat thoracic aortic rings based on Kv7 ion channels [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(6): 84-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.06.009

基于 Kv7 离子通道探讨木犀草素对大鼠胸主动脉血管环的舒张作用

王星茹¹, 杨泽熔¹, 武莉¹, 邓文娟¹, 宋豪瑞¹, 陈朝阳^{3*}, 李卫萍^{1,2*}

(1.山西医科大学汾阳学院药理学教研室,山西 汾阳 032200;

2.代谢性心血管疾病研究厅市共建山西省重点实验室培育基地,山西 汾阳 032200;

3.山西医科大学实验动物中心,太原 030001)

【摘要】 目的 探讨木犀草素(luteolin, Lut)对去除内皮的离体大鼠胸主动脉(denuded-endothelium rat thoracic aorta, DRTA)血管环的舒张作用,以及该作用机制是否与 Kv7 通道有关。**方法** 用离体组织灌流肌张力检测系统检测 DRTA 血管环的张力,用 60 mmol/L KCl 或 0.3 μ mol/L U46619 预收缩 DRTA 血管环,观察木犀草素在 1、3、10、30、100、300 μ mol/L 时对血管环的舒张作用,以及加入 4-AP (3 mmol/L)、XE-991 (3 μ mol/L)、ML213 (1 μ mol/L)对木犀草素舒张血管环的影响;用 RT-qPCR 检测胸主动脉组织中 *KCNQ1-KCNQ5* 基因的表达,并观察木犀草素对 *KCNQ1-KCNQ5* 基因表达的影响;Western blot 检测不同浓度木犀草素对 DRTA 组织 Kv7.1 和 Kv7.4 蛋白表达的影响。**结果** (1)木犀草素对 60 mmol/L KCl 和 0.3 μ mol/L U46619 预收缩的 DRTA 血管环的最大舒张百分率分别是 (97.67 $\pm$ 8.51)% 和 (98.42 $\pm$ 9.76)%,且该舒张作用具有浓度依赖性 ($P<0.05$);(2)4-AP (3 mmol/L)能显著抑制 10、30、100 μ mol/L 木犀草素对 DRTA 血管环的舒张作用 ($P<0.05$);XE-991 (3 μ mol/L)能显著抑制 30、100 μ mol/L 木犀草素对 DRTA 血管环的舒张作用 ($P<0.05$);ML213 (1 μ mol/L)能显著增加木犀草素在 3、10、30 μ mol/L 时对 DRTA 血管环的舒张作用 ($P<0.05$);(3)在正常 DRTA 组织中, Kv7 通道各亚型的基因表达量由高到低依次为: *KCNQ1>KCNQ5>KCNQ4>KCNQ3>KCNQ2*,其中 *KCNQ1* 的表达量最多;(4)木犀草素在 3、10、30、100 μ mol/L 时可显著增加 *KCNQ1* 的表达 ($P<0.05$);在 1、3、10、30、100 μ mol/L 时可显著增加 *KCNQ2* 的表达 ($P<0.05$),在 3、10、30、100 μ mol/L 时可显著增加 *KCNQ3* 的表达 ($P<0.05$),在 10、30、100 μ mol/L 时可显著增加 *KCNQ4* 的表达 ($P<0.05$),但是木犀草素在 1、3、10、30、100 μ mol/L 时对 *KCNQ5* 的表达无显著影响 ($P>0.05$);(5)木犀草素在 3、10、30、100 μ mol/L 时可显著增加 DRTA 血管 Kv7.1 蛋白的表达 ($P<0.05$);木犀草素在 10、30、100 μ mol/L 时可显著增加 DRTA 血管 Kv7.4 蛋白的表达 ($P<0.05$)。**结论** 木犀草素舒张 DRTA 血管环可能与其增强 *KCNQ1-4* 的 mRNA 水平及增加 Kv7.1 和 Kv7.4 通道蛋白的表达有关。

【关键词】 木犀草素;大鼠胸主动脉;舒张;Kv7 离子通道

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 06-0084-09

【基金项目】 吕梁市引进高层次科技人才重点研发项目 (2022RC28);山西省实验动物资源共享服务平台能力提升项目 (YDZJSX2022B009);山西省大学生创新项目 (20231802)。

【作者简介】 王星茹 (1995—),女,在读硕士研究生,研究方向:心血管药理学。E-mail:240508982@qq.com

【通信作者】 李卫萍 (1978—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究领域:心血管生理与药理。E-mail:liweiping0929@163.com

陈朝阳 (1972—),男,硕士,教授,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:ccytcn@163.com

* 共同通信作者

Dilation effect of luteolin in rat thoracic aortic rings based on Kv7 ion channels

WANG Xingru¹, YANG Zerong¹, WU Li¹, DENG Wenjuan¹, SONG Haorui¹, CHEN Chaoyang^{3*}, LI Weiping^{1,2*}

(1. Department of Pharmacology, Shanxi Medical University Fenyang College, Fenyang 032200, China.

2. Department of Metabolic Cardiovascular Disease Research, the Key Laboratory of Shanxi Province, Fenyang 032200.

3. Laboratory Animal Center of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Objective To investigate the vasodilatory effect of luteolin on isolated denuded-endothelium rat thoracic aorta (DRTA) vascular rings, and the mechanistic role of the Kv7 ion channel. **Methods** The tension of DRTA vascular rings was measured using an *ex vivo* tissue perfusion muscle-tone detection system. DRTA vascular rings were pre-contracted with 60 mmol/L KCl or 0.3 μ mol/L U46619, and the effect of luteolin on vascular-ring relaxation was observed at 1, 3, 10, 30, 100 and 300 μ mol/L. The effects of 4-AP, XE-991, and ML213 on luteolin-induced vasodilation were also observed. The effect of luteolin on *KCNQ1-KCNQ5* expression in the thoracic aorta was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. Expression levels of Kv7.1 and Kv7.4 proteins in the DRTA were detected by Western blot. **Results** (1) The luteolin-induced maximum vasodilation rates in DRTA pre-contracted with 60 mmol/L KCl and 0.3 μ mol/L U46619 were (97.67 $\pm$ 8.51)% and (98.42 $\pm$ 9.76)%, respectively. The vasodilation effect was concentration-dependent ($P<0.05$). (2) 4-AP (3 mmol/L) significantly reduced the vasodilatory effect of luteolin on DRTA vascular rings at 10, 30, and 100 μ mol/L ($P<0.05$), and XE-991 (3 μ mol/L) significantly reduced the effect of luteolin at 30 and 100 μ mol/L ($P<0.05$), while ML213 (1 μ mol/L) significantly enhanced the vasodilatory effect of luteolin at 3, 10, and 30 μ mol/L ($P<0.05$). (3) The relative gene expression levels of each subtype of Kv7 channel in normal DRTA were *KCNQ1* > *KCNQ5* > *KCNQ4* > *KCNQ3* > *KCNQ2*, with *KCNQ1* being the most highly expressed. (4) Luteolin significantly enhanced the expression levels of *KCNQ1* at 3, 10, 30, and 100 μ mol/L, *KCNQ2* at 1, 3, 10, 30, and 100 μ mol/L ($P<0.05$), *KCNQ3* at 3, 10, 30, and 100 μ mol/L, and *KCNQ4* at 10, 30, and 100 μ mol/L ($P<0.05$), but did not significantly enhance the expression of *KCNQ5* at 1, 3, 10, 30, or 100 μ mol/L ($P>0.05$). (5) Luteolin significantly increased the expression of Kv7.1 protein in DRTA at 3, 10, 30, and 100 μ mol/L ($P<0.05$) and the expression of Kv7.4 at 10, 30, and 100 μ mol/L ($P<0.05$). **Conclusions** Luteolin-induced dilation of DRTA vascular rings may be related to the enhanced gene expression of *KCNQ1-4* and increased expression of Kv7.1 and Kv7.4 channel proteins.

【Keywords】 luteolin; rat thoracic aorta; dilation; Kv7 ion channels

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

木犀草素(luteolin, Lut)属于黄酮类化合物,已有研究表明木犀草素有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和神经保护等作用^[1-4]。本课题组前期研究发现,木犀草素能抑制某些血管收缩剂对大鼠冠脉血管的收缩作用^[5],接下来进一步研究了木犀草素对大鼠胸主动脉血管的作用及其机制。木犀草素舒张大鼠胸主动脉血管的作用机制较为复杂,目前对内皮依赖性的舒张作用研究较多,而非内皮依赖性的作用及其机制尚缺乏足够的证据。本研究主要从电压依赖性钾通道(voltage-gated K⁺ channels, Kv)的 Kv7 亚型探讨木犀草素对血管的非内皮依赖性作用机制。

钾通道是体内分布最广泛且有极其重要生理功能的离子通道。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)钾通道的活动对膜电位起调控作用。有研究表明, Kv 通道在大鼠胸主动脉张力调节中具有十分重要的作用, Kv 通道蛋白是钾通道中最大和最多样的家族,具有 12 个已知的亚家族(Kv1-Kv12), Kv7 通道是其中的一个亚家族^[6]。Kv7 通道在许多组织中发挥着重要生理作用,已有研究表明,在健康状态或者疾病状态, Kv7 通道都是血管张力的关键调节因子^[7],而 Kv7 通道由 *KCNQ* 基因编码, *KCNQ* 基因家族有 5 个已知成员^[8]: *KCNQ1-KCNQ5*、Kv7.1-Kv7.5 通

道分别由 *KCNQ1-KCNQ5* 基因编码,本研究旨在探索木犀草素对去除内皮的大鼠胸主动脉(denuded-endothelium rat thoracic aorta, DRTA)血管环是否具有舒张作用以及该作用是否与 *Kv7* 通道有关。

1 材料和方法

1.1 实验动物

30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体质量 270~320 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2024-0001],所有实验动物饲养于山西医科大学汾阳学院实验中心标准化动物房内[SYXK(京)2024-0010],大鼠适应性喂养 1 周后用于实验,饲养期间可自由获得饲料和水。动物实验通过山西医科大学汾阳学院动物伦理委员会批准(2025004),实验研究过程中严格遵守替代、减少、优化的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

木犀草素(Lut, HPLC $\geq$ 98%)(上海麦克林生化科技有限公司, L812409),木犀草素的配制:称量木犀草素粉末 0.0858 g,溶于 1 mL 二甲基亚砜(DMSO)中,即得到木犀草素母液浓度为 3×10^{-1} mol/L,置于-20℃冰箱避光保存备用,后续实验根据浓度需要进行稀释。乙酰胆碱(acetylcholine, A6625)、血栓素 A_2 类似物(9,11-dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxy prostaglandin $F_{2\alpha}$, U46619, D8174)、4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-AP, 275875)、10,10-双(4-萘甲基)-9(10H)-蒽酮(XE-991, X2254)、N-(2,4,6-三甲基苯基)-双环[2.2.1]庚烷-2-酰胺(N-(2,4,6-trimethylphenyl)-bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamide, ML213, SML0611)均由 sigma 奥德里奇(上海)贸易有限公司提供; β -actin、*KCNQ1*、*KCNQ2*、*KCNQ3*、*KCNQ4*、*KCNQ5* 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;NaCl(A501218)、KCl(A501159)、CaCl₂(A501330)、MgCl₂·6H₂O(A601336)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES, A100511)、D-glucose(A501991)均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供;TRIzol™ Reagent(北京聚合美生物科技有限公司, MF034);无酶无菌水(北京索莱宝科技有限公司, R1600);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time,

RR047A)、TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus, RR820A)购自 TaKaRa;细胞裂解液(P0013)、蛋白酶抑制剂(PMSF, ST506)由碧云天生物技术有限公司提供;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(AR0146)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(变性)(5×)(P0015 L)、超敏 ECL 化学发光即用型底物(AR117I)均由武汉博士德生物科技有限公司提供;Western blot 所用 β -actin 抗体(AC038)、*KCNQ1*(A2174)抗体由武汉爱博泰克生物技术有限公司提供;*KCNQ4* 抗体(爱必信(上海)生物技术有限公司, abs146622);Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)(abcam, A6205718)。肌张力检测使用 HV-4 离体组织器官恒温灌流系统(北京博医时代科技医疗有限公司);Powerlab 张力换能器(ADInstruments 公司);LabChart 8.0 系统软件(ADInstruments 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 离体血管环制备

大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后放血,取出胸主动脉,放于提前预冷的氧饱和 4℃正常 HEPES 溶液中,HEPES 溶液组成:144 mmol/L NaCl、5.8 mmol/L KCl、2.5 mmol/L CaCl₂、1.2 mmol/L MgCl₂·6H₂O、5 mmol/L HEPES、11 mmol/L D-glucose, pH=7.40。使用眼科剪沿管壁分离血管周围的组织直至组织分离干净,将分离好的血管剪成 0.5~1 cm 的小段备用。去除血管内皮:用眼科镊缠绕棉絮轻轻摩擦血管内皮 2~3 次,机械去除血管内皮,用 ACh 检验血管内皮是否去除,用 1 μ mol/L PE 预收缩血管达到平台时,加入 10 μ mol/L ACh 舒张血管,若舒张百分比<10%,则认为内皮去除。舒张百分比=ACh 舒张幅度/PE 收缩幅度 $\times$ 100%^[9]。将制备好的胸主动脉血管环悬挂在含有 10 mL 正常 HEPES 液的肌张力测定仪浴管内,持续通入氧气,使 pH=7.40。在 37℃的条件下稳定 1 h,1 h 后调节基础张力至 1.5 g,再平衡稳定 1 h,浴槽内每间隔 15 min 更换 1 次 HEPES 溶液。连续两次用 60 mmol/L KCl 刺激血管环,血管收缩幅度相差不超过 10%,认为血管环反应良好,可以进行后续实验。

1.3.2 木犀草素对血管环的肌张力试验

用 60 mmol/L KCl 或 0.3 μ mol/L U46619 预

收缩去内皮的血管环,当收缩达到平台后,累积加入木犀草素,使其浓度分别为 1、3、10、30、100、300 $\mu\text{mol/L}$,对照组加入等体积含相应溶剂的 HEPES 溶液,观察木犀草素对血管的舒张作用。

1.3.3 Kv 通道抑制剂、Kv7 通道抑制剂和 Kv7 通道激动剂对木犀草素舒张血管的影响试验

大鼠胸主动脉去除内皮,用 0.3 $\mu\text{mol/L}$ U46619 预收缩血管环,当收缩达到平台后,累积加入木犀草素,使其浓度分别为 1、3、10、30、100、300 $\mu\text{mol/L}$,建立浓度-舒张曲线,该曲线作为平行对照;另取去除内皮的大鼠胸主动脉血管环,用 U46619 预收缩血管环,当收缩达到平台时,分别加入 Kv 通道抑制剂 4-AP (3 mmol/L)、Kv7 通道抑制剂 XE-991 (3 $\mu\text{mol/L}$) 和 Kv7 通道激动剂 ML213 (1 $\mu\text{mol/L}$),当血管收缩再次达平台时,累积加入木犀草素,使木犀草素的浓度分别为 1、3、10、30、100、300 $\mu\text{mol/L}$,检测血管环的肌张力。血管舒张反应应用血管张力百分比(相对各自 0.3 $\mu\text{mol/L}$ U46619 引起的血管收缩)表示。

1.3.4 RT-qPCR

实验首先检测了 *KCNQ1-KCNQ5* 在正常去内皮大鼠胸主动脉中的表达量,然后检测木犀草素对 *KCNQ1-KCNQ5* mRNA 水平的影响,实验分 6 组:对照组、木犀草素 1 $\mu\text{mol/L}$ 、木犀草素 3 $\mu\text{mol/L}$ 、木犀草素 10 $\mu\text{mol/L}$ 、木犀草素 30 $\mu\text{mol/L}$ 、木犀草素 100 $\mu\text{mol/L}$ 实验组。实验组分别用含 1、3、10、30、100 μmol 木犀草素的 HEPES 溶液孵育,对照组用含相应溶剂的 HEPES 溶液孵育,

每 30 min 更换 1 次溶液。提取总 RNA,RT-qPCR 检测 *KCNQ1-KCNQ5* 的 mRNA 表达情况。*KCNQ* 基因的相对表达水平以管家基因 $\beta\text{-actin}$ 为参照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。引物序列如表 1。

1.3.5 Western blot 试验

收集新鲜雄性 SD 大鼠胸主动脉组织,去除内皮,用含有木犀草素的 HEPES 溶液恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,实验共分 6 组,分别为对照组、1、3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素组,对照组用含相应溶剂的 HEPES 溶液孵育,每 30 min 更换 1 次溶液。孵育结束,提取总蛋白,检测蛋白表达量。具体步骤如下:用眼科剪将组织剪碎,加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂 PMSF(比例为 100 : 1),用玻璃研杵进行研磨后,转移至 Ep 管,超声裂解 20 min,12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,取上清,进行 BCA 浓度测定;加入上样(5 $\times$ SDS PAGE loading buffer)缓冲液加热至 100 $^{\circ}\text{C}$ 使蛋白变性。之后进行电泳电转,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗(Kv7.1 抗体按 1 : 500 稀释的,稀释后浓度为 0.0017 mg/mL,Kv7.4 抗体按 1 : 500 稀释的,稀释后浓度为 0.002 mg/mL),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日洗膜,室温孵育二抗 Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)2 h,洗膜,用 ECL 发光液进行显色曝光。利用图像分析软件 Image J 1.53 t 进行灰度值分析,以 $\beta\text{-actin}$ 蛋白的表达作为参照,分析不同分组蛋白条带灰度值。

1.4 统计学方法

用 SPSS 20.0 进行统计分析。GraphPad

表 1 各基因 RT-qPCR 的引物序列
Table 1 Primer sequences of RT-qPCR for each gene

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
<i>KCNQ1</i>	F:CGTGGTTGTAGCCTCTATGTTGTC R:AGGATCTGAAGGAAGCGGATACCC
<i>KCNQ2</i>	F:AACACTTTGAGAAACGGCGGAATC R:GTCGCTGCGTGAGAGGTTACTAG
<i>KCNQ3</i>	F:GGTACATCGGCTTCCTGACACTC R:TTCATTTCCTCTCCTTGGGCATCC
<i>KCNQ4</i>	F:GCTGTTGGGATCGGTGCTCTAC R:GGCATAGGAGGAGAAGTCAGAGTTG
<i>KCNQ5</i>	F:GCAGACAAGCATCGGTAGGTGAC R:GGTTCGGTCGTTGAAGCTCCAG
$\beta\text{-actin}$	F:TGTCACCAACTGGGACGATA R:GGGGTCTTGAAGGTCTCAAA

Prism 6.0 软件进行作图, 计量资料用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 各实验分组先进行正态分布检验和方差齐性检验, 符合正态分布和方差齐性时, 采用双因素方差分析或单因素方差分析(One-way ANOVA), 各组数据均符合正态分布且具有方差齐性, 组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD法), $P<0.05$ 认为具有显著性差异。用 Logistic 法将量效关系曲线直线化, 求出舒张 50% 时所需的药物浓度(RC_{50})。

2 结果

2.1 木犀草素对 KCl 或 U46619 预收缩的 DRTA 血管环的影响

大鼠胸主动脉血管环去除内皮后, 用 60

mmol/L KCl 预收缩血管环。与对照组相比, 木犀草素在 10、30、100、300 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著舒张预收缩的血管环($P<0.001$), 且随着浓度的增加, 木犀草素对血管的舒张呈浓度依赖性增加, 而木犀草素在 1、3 $\mu\text{mol/L}$ 时对该血管无显著舒张作用($P>0.05$) (表 2); 如表 3 所示, 用 0.3 $\mu\text{mol/L}$ U46619 预收缩去内皮胸主动脉血管环, 与对照组相比, 木犀草素在 30、100 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著舒张预收缩的血管环($P<0.001$), 而在 1、3、10 $\mu\text{mol/L}$ 时对该血管无显著舒张作用($P>0.05$)。对于 60 mmol/L KCl 引起的预收缩, 木犀草素的 RC_{50} (50% 舒张浓度) 为 69.45 $\mu\text{mol/L}$; 对于 0.3 $\mu\text{mol/L}$ U46619 引起的预收缩, 木犀草素的 RC_{50} 为 56.00 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 2 木犀草素对 KCl 预收缩的 DRTA 血管环的舒张作用($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Vasorelaxation effect of luteolin on the endothelium-denuded rings of thoracic aorta pre-contracted with KCl in rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

木犀草素/ ($\mu\text{mol/L}$) Luteolin	舒张百分比(% of KCl) Relaxation (% of KCl)		F	P
	木犀草素组	对照组		
	Lut group	Control group		
1	-0.860±1.050	-0.070±0.050	0.054*	0.817*
3	-0.640±1.840	-0.020±0.260	0.033*	0.856*
10	13.200±6.790	-0.220±0.640	15.280*	<0.001*
30	23.250±9.830	0.350±0.810	44.530*	<0.001*
100	64.970±14.170	0.820±1.080	349.400*	<0.001*
300	97.670±8.510	1.540±1.220	784.500*	<0.001*
F	270.600	0.076*	F=131.000#, P<0.001#	
P	<0.001*	0.996*		

注: #:交互效应的 F 统计量和 P 值; *:单独效应的 F 统计量和 P 值。
Note. #: F-statistic and P-value of the interaction effect. *, F-statistic and P-value of individual effects.

表 3 木犀草素对 U46619 预收缩的 DRTA 血管环的舒张作用($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Vasorelaxation effect of luteolin on the endothelium-denuded rings of thoracic aorta pre-contracted with U46619 in rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

木犀草素/ ($\mu\text{mol/L}$) Luteolin	舒张百分比(% of U46619) Relaxation (% of U46619)		F	P
	木犀草素组	对照组		
	Lut group	Control group		
1	-1.960±1.790	-3.760±1.820	0.224	0.639
3	0.020±8.090	-1.200±2.750	0.103	0.750
10	1.930±8.390	-0.260±0.710	0.330	0.569
30	17.605±10.700	0.400±0.890	20.540	<0.001*
100	98.420±9.760	0.920±1.180	565.000	<0.001*
F	217.200	0.469	F=102.500#, P<0.001#	
P	<0.001*	0.758*		

注: #:交互效应的 F 统计量和 P 值; *:单独效应的 F 统计量和 P 值。
Note. #: F-statistic and P-value of the interaction effect. *, F-statistic and P-value of individual effects.

2.2 4-AP、XE-991、ML213 对木犀草素舒张 DRTA 血管环的影响

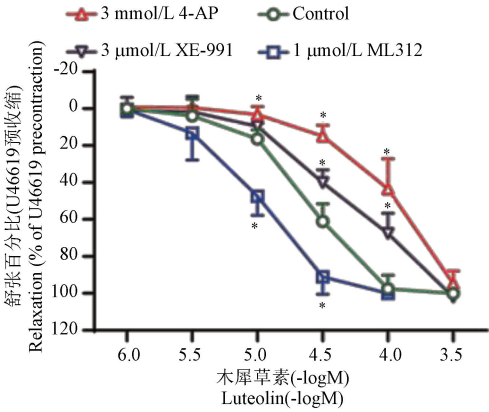
该实验中 4-AP 是 K_v 通道的抑制剂, XE-991 是 $K_v7.1$ - $K_v7.5$ 的抑制剂, ML213 是 $K_v7.2$ 、 $K_v7.4$ / $K_v7.5$ 的激动剂。如图 1 和表 4 所示, 3 mmol/L 4-AP 能显著抑制木犀草素在 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 时对 DRTA 血管环的舒张作用 ($P < 0.01$); XE-991 能显著抑制木犀草素在 30、100 $\mu\text{mol/L}$ 时对 DRTA 血管环的舒张作用 ($P < 0.01$), 但抑制的幅度均小于 3 mmol/L 4-AP; ML213 能显著增加木犀草素在 10、30 $\mu\text{mol/L}$ 时对 DRTA 血管环的舒张作用 ($P < 0.01$)。该结果提示, 木犀草素对 DRTA 血管环的舒张作用可能与 K_v7 通道有关。

2.3 DRTA 血管组织中 K_v7 通道亚型的 mRNA 表达情况

RT-qPCR 检测 $KCNQ1$ 、 $KCNQ2$ 、 $KCNQ3$ 、 $KCNQ4$ 、 $KCNQ5$ mRNA 的相对表达量, 如图 2 所示, K_v7 亚型的表达量由高到低依次为 $KCNQ1 > KCNQ5 > KCNQ4 > KCNQ3 > KCNQ2$, 其中 $KCNQ1$ 的表达量最多, $KCNQ2$ 的表达量最少。

2.4 木犀草素对 DRTA 血管组织 $KCNQ1$ 、 $KCNQ2$ 、 $KCNQ3$ 、 $KCNQ4$ 、 $KCNQ5$ mRNA 表达的影响

如图 3 结果显示, 与对照组相比, 木犀草素在 1 $\mu\text{mol/L}$ 时对 $KCNQ1$ 表达无显著影响 ($P > 0.05$), 在 3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著增加 $KCNQ1$ 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 但 3、10、30、100

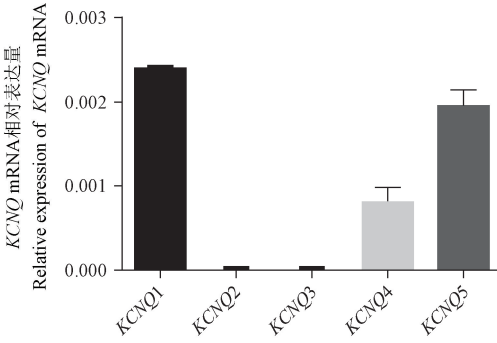


注: 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 4-AP、XE-991、ML213 对木犀草素引起的 DRTA 血管环舒张的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Effect of 4-AP, XE-991, ML213 on luteolin-induced DRTA vasorelaxation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



注: $KCNQ$ 基因的相对表达以管家基因 β -actin 为参照。

图 2 $KCNQ$ 在 DRTA 组织中的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Relative expression of $KCNQ$ genes were calculated relative to housekeeping gene β -actin.

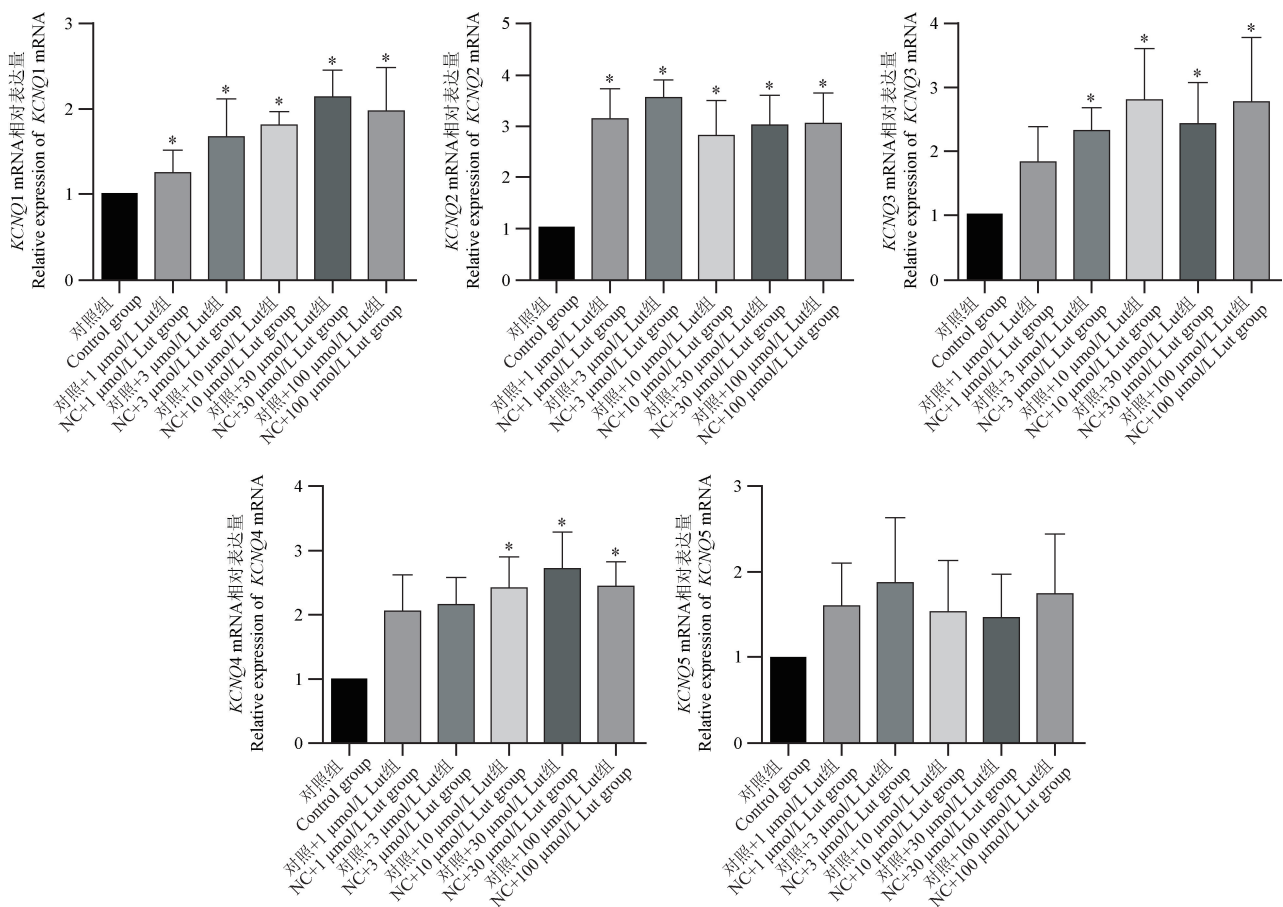
Figure 2 Expression of $KCNQ$ in DRTA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 4 4-AP、XE-991 和 ML213 对木犀草素引起的 DRTA 血管环舒张的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 4 Effects of 4-AP, XE-991 and ML213 on luteolin-induced vasodilation in DRTA ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

木犀草素/($\mu\text{mol/L}$) Luteolin	对照组 Control group	4-AP(3 mmol/L)	XE-991(3 $\mu\text{mol/L}$)	ML213(1 $\mu\text{mol/L}$)
1	0.16 $\pm$ 2.95	0.96 $\pm$ 3.47	0.94 $\pm$ 7.07	0.32 $\pm$ 4.04
3	3.89 $\pm$ 9.07	0.62 $\pm$ 4.98	1.70 $\pm$ 8.36	13.18 $\pm$ 14.63
10	16.30 $\pm$ 4.88	3.12 $\pm$ 4.25**	9.56 $\pm$ 1.69	47.33 $\pm$ 10.30**
30	61.00 $\pm$ 9.55	14.84 $\pm$ 5.85**	40.08 $\pm$ 6.91**	91.00 $\pm$ 9.44**
100	97.50 $\pm$ 7.31	43.44 $\pm$ 16.32**	67.58 $\pm$ 11.03**	99.95 $\pm$ 0.99
300	100.00 $\pm$ 0.00	94.70 $\pm$ 6.88	101.90 $\pm$ 2.98	—

注: 与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$.



注:为了比较 *KCNQ1*、*KCNQ2*、*KCNQ3*、*KCNQ4* 和 *KCNQ5* 基因的相对表达,将 *KCNQ* 值归一化到对照组。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 木犀草素对 DRTA 血管组织 *KCNQ1*、*KCNQ2*、*KCNQ3*、*KCNQ4* 和 *KCNQ5* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. For comparison, the value of *KCNQ1*, *KCNQ2*, *KCNQ3*, *KCNQ4* and *KCNQ5* genes normalized to control group. Compared with control group, * $P < 0.05$.

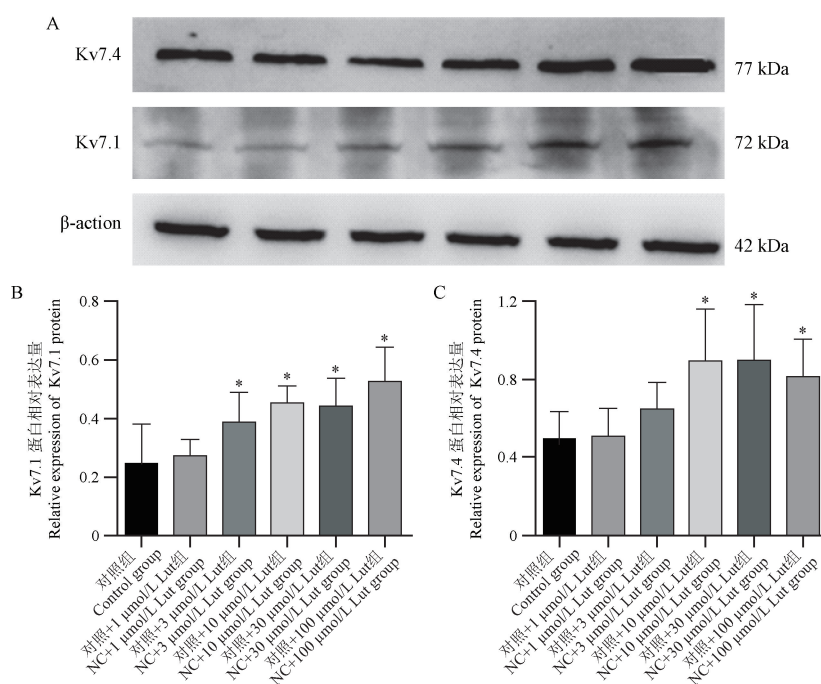
Figure 3 Effect of luteolin on *KCNQ1*, *KCNQ2*, *KCNQ3*, *KCNQ4* and *KCNQ5* mRNA in DRTA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$\mu\text{mol/L}$ 组之间无显著差异 ($P > 0.05$); 与对照组相比,木犀草素在 1、3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著增加 *KCNQ2* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$),但 1、3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 组之间无显著差异 ($P > 0.05$); 与对照组相比,木犀草素在 1 $\mu\text{mol/L}$ 时 *KCNQ3* 表达无显著影响 ($P > 0.05$),在 3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著增加 *KCNQ3* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$),但 3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 组之间无显著差异 ($P > 0.05$); 与对照组相比,木犀草素在 1、3 $\mu\text{mol/L}$ 时对 *KCNQ4* 表达无显著影响 ($P > 0.05$),在 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著增加 *KCNQ4* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$),但 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 组之间无显著差异 ($P > 0.05$); 与对照组相比,木犀

草素在 1、3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 时对 *KCNQ5* 基因表达均无显著影响 ($P > 0.05$)。

2.5 Western blot 检测木犀草素对 DRTA 血管组织 Kv7.1、Kv7.4 蛋白表达的影响

由于在大鼠胸主动脉血管上 *KCNQ2* 和 *KCNQ3* 的表达较少,且木犀草素对 Kv7.5 mRNA 表达无显著影响,因此接下来主要检测了木犀草素对 DRTA 血管组织中 Kv7.1 和 Kv7.4 蛋白的表达情况。结果显示,木犀草素在 3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著增加 DRTA 血管组织 Kv7.1 蛋白的表达 (图 4, $P < 0.05$); 木犀草素在 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著增加 DRTA 血管组织 Kv7.4 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。



注:A:Western blot 结果;B、C:Kv7.1、Kv7.4 蛋白相对表达的统计图。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图4 木犀草素对大鼠 DRTA 血管组织中 Kv7.1 和 Kv7.4 通道蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. A, Western blot result. B/C, Relative expression levels of Kv7.1 and Kv7.4 proteins. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 4 Effect of luteolin on Kv7.1 and Kv7.4 channel proteins in DRTA ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

自上世纪 50 年代以来,木犀草素对心血管的作用逐渐成为研究的热点。木犀草素作用于各种信号转导通路和靶标,显示出多种对心血管有益的作用。木犀草素可舒张 U46619 预收缩的猪冠状动脉^[10],但并没有进行具体机制的研究。李佳朋等^[11]发现木犀草素可舒张大鼠肠系膜上动脉,该作用与受体操纵性钙通道和电压依赖性钙通道有关,但与钾通道似乎无关。已有研究表明,木犀草素对大鼠胸主动脉血管的舒张作用与一氧化氮合酶 NOs 有关^[12],说明木犀草素舒张血管的作用与 NO 有关,而木犀草素舒张血管的作用与多种因素有关,如杨耀等^[13]研究发现木犀草素舒张大鼠胸主动脉血管有非内皮依赖性的作用,本实验想进一步研究木犀草素舒张血管的作用是否与 Kv 通道及其亚型有关,结果发现,Kv7 通道抑制剂可显著减弱木犀草素对 DRTA 的舒张作用,Kv7 通道激动剂可显著增强木犀草素对 DRTA 的舒张作用,提示 Kv7 通道可能参与了木犀草素对 DRTA 血管环的舒张作用。钾通道在调节血管平滑肌收缩及血管张力中具有重要作用,

激活血管平滑肌上的钾通道,可引起细胞膜超极化,从而引起血管舒张。血管平滑肌上主要存在 4 种钾通道,Kv 通道是其中的一种。Kv 通道蛋白是钾通道中最大和最多样的家族,具有 12 个已知的亚家族(Kv1-Kv12),Kv7 通道是其中的一个。而 Kv7 通道由 *KCNQ* 基因编码,*KCNQ* 基因家族有 5 个已知成员:*KCNQ1-KCNQ5*、Kv7.1-Kv7.5 通道分别由 *KCNQ1-KCNQ5* 基因编码。在血管平滑肌上存在 Kv7 通道的亚型^[8],但是在大鼠胸主动脉上的表达情况未见详细报道。本研究中检测了 *KCNQ1-KCNQ5* 的表达情况,发现 *KCNQ1*、*KCNQ4*、*KCNQ5* 在大鼠胸主动脉的表达量相对较多,这与 MANI 等^[14]发现的人动脉平滑肌上的表达情况相一致。

为了进一步探究 Kv7 通道参与木犀草素引起的大鼠胸主动脉舒张的可能性,本研究检测了木犀草素对 DRTA 血管组织的 *KCNQ1*、*KCNQ2*、*KCNQ3*、*KCNQ4*、*KCNQ5* 的 mRNA 表达情况。结果显示,木犀草素可不同程度地增加 *KCNQ1*、*KCNQ2*、*KCNQ3*、*KCNQ4* 的 mRNA 表达,但是对 *KCNQ5* 的表达没有显著影响。由于 *KCNQ2*、*KCNQ3* 基因在 DRTA 血管组织中表达较低,因

此,接下来主要检测了木犀草素对 DRTA 血管组织 Kv7.1、Kv7.4 蛋白的表达,结果发现,木犀草素可不同程度地增加 DRTA 血管组织 Kv7.1 蛋白和 Kv7.4 蛋白的表达。基于以上结果,推测木犀草素对 DRTA 血管环的舒张作用可能与 Kv7.1 和 Kv7.4 通道蛋白的表达增强有关。

本研究采用 DRTA 血管组织作为研究对象,主要探索木犀草素对胸主动脉血管平滑肌层的作用,平滑肌细胞超极化时,引起血管舒张,可起到降低血压或缓解血管痉挛的作用。据文献报道,在平滑肌细胞中,Kv7 通道表达增多或激活时,钾离子外流,能使细胞膜超极化,会降低电压门控钙通道的开放,使细胞外钙内流减少,引起血管舒张^[15]。实验证实了木犀草素可增加 Kv7.1 和 Kv7.4 通道蛋白的表达,因此推测木犀草素舒张 DRTA 血管环与 Kv7.1 和 Kv7.4 的表达增多有关。Kv7.1、Kv7.4 通道蛋白或可作为高血压和血管痉挛的潜在治疗靶点,木犀草素或可作为高血压和血管痉挛的潜在治疗药物。本研究主要明确了木犀草素对 DRTA 血管环具有舒张作用,且该作用与 Kv7 通道有关,而 Kv7 通道的功能可能与 KCNE 及钙调蛋白等的调节有关,具体作用机制将在后续进行研究。

参考文献:

- [1] VONGTHIP W, NILKHET S, BOONRUANG K, et al. Neuroprotective mechanisms of luteolin in glutamate-induced oxidative stress and autophagy-mediated neuronal cell death [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 7707.
- [2] OYAGBEMI A A, AKINRINDE A S, ADEBIYI O E, et al. Luteolin supplementation ameliorates cobalt-induced oxidative stress and inflammation by suppressing NF- κ B/Kim-1 signaling in the heart and kidney of rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2020, 80: 103488.
- [3] KOU J J, SHI J Z, HE Y Y, et al. Luteolin alleviates cognitive impairment in Alzheimer's disease mouse model via inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent neuroinflammation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(4): 840-849.
- [4] 钟烨, 王超, 徐博, 等. 木犀草素对甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞侵袭迁移的影响及其机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(12): 32-37.
ZHONG Y, WANG C, XU B, et al. Effect of luteolin on the invasion and migration of papillary thyroid carcinoma TPC-1 cells and its mechanism [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(12): 32-37.
- [5] LI W, DONG M, GUO P, et al. Luteolin-induced coronary arterial relaxation involves activation of the myocyte voltage-gated K⁺ channels and inward rectifier K⁺ channels [J]. *Life Sci*, 2019, 221: 233-240.
- [6] SAHINTURK S, DEMIREL S, ISBIL N, et al. Potassium channels contributes to apelin-induced vasodilation in rat thoracic aorta [J]. *Protein Pept Lett*, 2022, 29(6): 538-549.
- [7] MONDEJAR-PARREÑO G, PEREZ-VIZCAINO F, COGOLLUDO A. Kv7 channels in lung diseases [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 634.
- [8] GREENWOOD I A, OHYA S. New tricks for old dogs: KCNQ expression and role in smooth muscle [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156(8): 1196-1203.
- [9] 彭小勇, 周远群, 张紫森, 等. 血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠模型建立及其血管功能变化的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(7): 880-886.
PENG X Y, ZHOU Y Q, ZHANG Z S, et al. Vascular function in a heterozygous mouse model with conditional knockout of connexin 43 in vascular endothelial cells [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(7): 880-886.
- [10] ROBERTS R E, ALLEN S, CHANG A Y, et al. Distinct mechanisms of relaxation to bioactive components from chamomile species in porcine isolated blood vessels [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(3): 797-805.
- [11] 李佳朋, 梁晓莉, 张湛睿, 等. 木犀草素对大鼠肠系膜上动脉舒张作用的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(9): 1257-1261.
LI J P, LIANG X L, ZHANG Z R, et al. Effects of luteolin on the relaxation of superior mesenteric artery in rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2023, 39(9): 1257-1261.
- [12] QIAN L B, WANG H P, CHEN Y, et al. Luteolin reduces high glucose-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aorta by reducing oxidative stress [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61(4): 281-287.
- [13] 杨耀, 陈波, 梁凯伦, 等. 蒙花苷与木犀草素联用对离体血管的舒张作用及其机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(7): 1370-1375.
YANG Y, CHEN B, LIANG K L, et al. Relaxation effect of buddleoside combined with luteolin on isolated vessels *in vivo* and its mechanism [J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(7): 1370-1375.
- [14] MANI B K, BYRON K L. Vascular KCNQ channels in humans; the sub-threshold brake that regulates vascular tone? [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162(1): 38-41.
- [15] BALDWIN S N, SANDOW S L, MONDEJAR-PARREÑO G, et al. Kv7 channel expression and function within rat mesenteric endothelial cells [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 598779.

[收稿日期]2024-12-28