松节提取物及其成分 SJ-2 对牛肾上腺髓质细胞中的儿茶酚胺的分泌与合成的抑制作用

作者：*XiaoJia Li[a]，Takafumi Horishita[b], Yumiko Toyohira[a], Hui Shao[c], Jie Bai[c], Haixia Boc, Xinbo Song[d], Shin Ishikane[a], Yukari Yoshinaga[a], Noriaki Satoh[e], Masato Tsutsui[f], Nobuyuki Yanagihara[a]*

a 日本北九州市八幡西区产业医科大学药理学系
b 日本北九州市八幡西区产业医科大学麻醉学系
c 日本大阪德润药学研究所
d 中国天津中医药大学，天津医药集团
e 日本北九州市八幡西区产业医科大学共享研究中心
f 日本冲绳西原町琉球大学医学部

文章相关信息：
于 2016 年 12 月 25 日收稿
于 2017 年 3 月 13 日以修订形式收稿
于 2017 年 3 月 24 日采用

【关键词】

肾上腺髓质细胞，儿茶酚胺的分泌与合成，松节，烟碱乙酰胆碱受体离子通道，SJ-2

【摘要】

由于树皮增殖而形成于马尾松、油松表面的松节提取物为马尾松、油松树皮提纯而成，作为一种针对关节疼痛、风湿症、神经痛、痛经等疾病的中药止痛药已投入使用。在这里，我们将研究松节提取物及其有效成分对人工培养的牛肾上腺髓质细胞儿茶酚胺的合成与分泌的影响。我们发现，松节提取物（0.0003%-0.0005%）及其分泌物之一 SJ-2（5-羟基-3-甲氧基-反式-二苯乙烯）（0.3-100 μM）对儿茶酚胺（乙酰胆碱促分泌素）的分泌有着浓度依赖性抑制作用，而除 SJ-2 以外的其他三种松节提取物成分不能产生该抑制作用。与对儿茶酚胺分泌的影响作用类似，松节提取物（0.0003%-0.0005%）和 SJ-2（5-羟基-3-甲氧基-反式-二苯乙烯）（0.3-100 μM）同样可抑制乙酰胆碱介导的 Ca^{2+}的涌入、儿茶酚胺的分泌以及酪氨酸羟化酶的活性，并具有一定剂量依赖性。也会在不同的浓度状态下抑制受到乙酰胆碱促进作用的 Ca^{2+}的涌入。它们也会抑制由乙酰胆碱促进的 C 儿茶酚胺的分泌以及酪氨酸羟化酶的活性。在表达 α3β4 烟碱乙酰胆碱受体的爪蟾卵母细胞中，松节提取物（0.0003%-0.0005%）和 SJ-2（5-羟基-3-甲氧基-反式-二苯乙烯）（0.3-100 μM）直接抑制了由乙酰胆碱介导的当前反应。当前的发现表明：SJ-2 以及松节的提取物通过抑制牛肾上腺髓质细胞中的烟碱乙酰胆碱受体离子通道，进而抑制乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的合成与分泌。©编者注，该文章受 Elsevier.B.V 保护，代表《日本药理学社会》，可访问 http://creativecommons.org/lisnece/by-nc-nd/4.0/

【介绍】

马尾松或油松的树干或树枝等部位可因虫害等损伤造成树皮增殖从而形成松节。松节中有效的药用成分已经作为针对关节疼痛、风湿症、神经痛、痛经等疾病的中药止痛药被投入使用。研究表明：发烟硫酸酯的氧化物能够帮助处于有意识状态下的豚鼠拮抗组胺诱发的支气管收缩[2]。从松针油中提取的一种名为α-蒎烯的天然化合物能够抑制肝癌细胞的生长[3]。

人体中含量丰富的儿茶酚胺包括肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺，它们都是由苯丙氨酸和酪氨酸为原料合成。儿茶酚胺主要产生于肾上腺髓质中的嗜铬细胞、交感神经系统节后纤维以及中枢神经系统中，对心率、血压、血糖水平的调节以及维持交感神经系统的作用具有重要意义[4]。

肾上腺髓质细胞来自胚胎神经嵴，和交感神经节后神经元有许多共同的属性。在人工培育的牛肾上腺髓质细胞中，有至少三种不同的离子通道涉及儿茶酚胺的分泌[5]，它们包括烟碱乙酰胆碱受体离子通道、电压依赖性钠离子通道以及电压依赖性钙离子通道。乙酰胆碱通过烟碱乙酰胆碱受体离子通道促进钠离子、钙离子的涌入以及接下来的儿茶酚胺的分泌。藜芦定和高钾对电压依赖性钠离子、钙离子通道产生刺激，进而促进细胞中儿茶酚胺的分泌。另一方面，受乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的分泌与酪氨酸羟化酶的活性相关联，是人工培育的牛肾上腺髓质细胞[7]儿茶酚胺生物合成的速率限制步骤[6]。肾上腺髓质细胞是研究药物对儿茶酚胺合成与分泌作用的良好模型[8, 9]。

已有研究表明，松节提取物不仅有止痛和抗肿瘤的效果，还具有溶解胆结石的功效[10]。西伯利亚松（新疆五针松）的松节提取物具有消炎的功效[11]。 然而，松节对交感神经系统的药理功效未经过研究。在当前的课题中，我们对松节以及松节提取物对儿茶酚胺的分泌与合成的影响进行了研究，发现松节的提取物以及其成分之一 SJ-2 可通过抑制牛肾上腺髓质细胞中的烟碱乙酰胆碱受体离子通道，进而抑制乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的合成与分泌。

1 材料及方法

1.1 试剂

氧化克雷伯思磷酸盐缓冲液，其成分如下（mmol/L）：153NaCl，5.6KCL，1.1 $MgSO_4$，2.2 $CaCl_2$，0.85NaH_2PO_4，2.15$NaHPO_4$，10 葡萄糖（pH 7.4）。使用的药物和试剂如下：日本东京日水制药株式会社提供的基础培养基，日本大阪 Nitta 株式会社提供的胶原酶，瑞士格拉韦萨诺细胞文化科技公司提供的小牛血清。儿茶酚胺和藜芦定由美国密苏里州圣路易斯斯蒂格玛公司提供;$^{45}CaCl_2$，$^{22}NaCl$,L-[1-^{14}C]酪氨酸由美国马萨诸塞州波士顿珀金埃尔默有限公司提供。

1.2 松节乙醇提取物的提取和净化

油松的松节采购于中国河北省安国市。SJ-2（5-羟基-3-甲氧基-反式-二苯乙烯），SJ-3(豆甾-5-烯-3-醇)，SJ-4(苯酚，3 - [(1E)-2-(4-羟基苯基)乙烯基] -5-甲氧基)和 SJ-16（15-羟

基脱氢松香酸）通过高效液相色谱法从松节中提取出来。将烤和粉碎后的松节粉末溶解在纯净水中，借助纤维膜过滤掉其中的宏观杂质。通过用石油醚提取将滤液集中。最终的提取物被溶解在 95%的乙醇中作为松节的提取物在本课题中使用。通过硅胶柱色谱法在松节提取物（100g）中得出 11 馏分（Fr. A1-11），通过硅胶柱色谱法在馏分 A1（15.4g）中得出 5 馏分（Fr.A1-1-5）。通过葡聚糖甲醇在馏分 A1-3（2.8g）中提纯出 SJ-2（5-羟基-3-甲氧基-反式-二苯乙烯）（500mg）。馏分 A2 通过硅胶柱色谱法被进行分离，得出 6 馏分。借助再结晶的方法在 Fr.A2-5(20mg)获取 SJ-3(豆甾-5-烯-3-醇)（11mg）。借助葡聚糖甲醇在馏分 A2-7（50mg）中提取 SJ-4(苯酚，3－[(1E)-2-(4-羟基苯基)乙烯基]-5-甲氧基)（20mg）。通过硅胶柱色谱法将馏分 A5（11g）进行分离，得出 12 馏分（Fr. A2-1-12）。借助葡聚糖甲醇在馏分 A5-12（45mg）中提取 SJ-16（15-羟基脱氢松香酸）（7mg）。通过快原子轰击质谱法、高分辨电喷雾质谱法以及量子回旋共振质谱法确定了 SJ-2，SJ-3，SJ-4 和 SJ-16 的分子量。SJ-2，SJ-3，SJ-4 和 SJ-16 的结构确定为 5-羟基-3-甲氧基-反式-二苯乙烯（后文图三中显示了以上成分的结构）。在正式进行操作之前，松节提取物 SJ-2 和其他成分被溶解在 100%浓度的二甲基亚砜中并在反应介质中进行稀释，以确保二甲基亚砜的浓度除非特殊要求，误差不超过 0.5%。

1.3 牛肾上腺髓质细胞的提取和初步培育

根据已有的方法[12]，牛肾上腺腺体和牛肾上腺髓质细胞是通过胶原酶的消化作用获得的。细胞以 4×10^6/皿，或 10^6/孔的密度接种于培养皿或 24 孔板中。

1.4 人工培育牛肾上腺髓质细胞中儿茶酚胺的分泌

根据现有资料对儿茶酚胺进行测量。[12]在 37° C 的条件下，分别以有无松节（0.0001-0.0005%）、SJ-2（0.3-100μM）以及其他成分（10μM）的状态下对细胞进行十分钟的预培养，再分别在有无松节、SJ-2 以及其他成分同时有无各种促分泌剂的条件下对细胞（10^6/盘）进行培养。对培养基中的儿茶酚胺分泌浓度（去甲肾上腺素和肾上腺素）进行检测[12]。

1.5 $^{45}Ca^{2+}$通过细胞涌入

在 37° C 的条件下，分别在有无松节提取物（0.0001-0.0005%）、SJ-2（0.3-100μM）的状态下对细胞进行十分钟的预培养之后，细胞在克雷伯思磷酸盐缓冲液中，在 37° C 的条件下，分别以有无 300μM 乙酰胆碱以及松节（0.0001-0.0005%）、SJ-2（0.3-100μM）的状态下进行培养。根据现有实验成果[5]，观测到了 $^{45}Ca^{2+}$的涌入。

1.6 细胞中 ^{14}C 儿茶酚胺在[^{14}C]酪氨酸中进行的合成

为了对 ^{14}C 儿茶酚胺的合成进行观测，在 10 分钟的预培养过后，在 37° C 的条件下，细胞（4×10^6/皿）分别以有无各种浓度的松节（0.0001-0.0005%）、SJ-2（0.3-100μM）以及 300μM 乙酰胆碱的状态下被置于 20μM L-[U-^{14}C]酪氨酸（1.0μCi）克雷伯思磷酸盐缓冲液进行

了 20 分钟的培养。利用 C-25 离子交换树脂柱将细胞中的 ^{14}C 儿茶酚胺进行分离并记录它的放射值[7]。

1.7 酪氨酸羟化酶活性

在 10 分钟的预培养过后，在 37° C 的条件下，有无松节（0.0001-0.0005％）、SJ-2（0.3-100 μM）以及 300 μM 乙酰胆碱的细胞被分别放置于补充了 18 μM L-[1-^{14}C]酪氨酸（0.2 μCi 的）克雷伯思磷酸盐缓冲液中。10 分钟后观测到酪氨酸羟化酶通过细胞吸收了 $^{14}CO_2$ 并记录它的放射值。[9]

1.8 爪蟾卵母细胞中 α3β4 烟碱乙酰胆碱的表现以及电生理学记录

先前的研究已经展示了爪蟾卵母细胞的分离和显微注射[9]。詹姆斯.W.帕特里克博士为我们提供了带有 α3 和 β4 鼠烟碱乙酰胆碱神经元亚基编码的互补 DNA。日本弓道责任有限公司提供了成年雌性非洲爪蟾卵母细胞。烟碱乙酰胆碱及 α3 和 β4 亚基以相同的比率（10-20ng/50nL）同时注射进了爪蟾卵母细胞中，其电生理学记录在注射后的两到六天后显现出。根据已有的实验，每个卵母细胞都被分别放置于一个 100 μl 的记录室中，每分钟灌注 2ml 包含 10 μM 阿托品的细胞外林格氏液（110mMNaCl, 2.5mMKCL 10MmHEPES, 1.8mMBaCl,pH7.5）[9]。我们发现松节或 SJ-2 的效果可以达到相同浓度的乙酰胆碱的最大效果（EC_{50}=0.2mM）的 50％。

1.9 统计分析

所有试验均以一式两份或一式三份的形式进行，每个实验均至少重复 3 次。数值都以均数±标准误表示。误差间的区别和意义都通过方差分析进行估计。如果方差分析后得出 F 值，将使用进行多重比较的 Turkey 法来确定各组之间的差异。如果 P<0.05 便认定数值存在统计差异。统计分析借助 Windows 5.0 版 PRISM 进行。

2 结果

松节提取物对肾上腺髓质细胞基础儿茶酚胺分泌及不同途径介导的儿茶酚胺分泌均存在抑制作用。主要的及其他各种促分泌儿茶酚胺的分泌存在抑制作用。

烟碱乙酰胆碱受体的激动剂乙酰胆碱导致相应的儿茶酚胺的分泌效率提高(17.76±0.22)%（图 1）。如果细胞与 0.001％的松节接触达到 10 分钟，由乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的分泌降低到(14.14±0.62)%。藜芦定（电压依赖性钠离子通道激活剂）、56mMMK^+（可使细胞膜去极化并激活电压依赖性钙离子通道）介导儿茶酚胺的分泌量分别占总分泌量的(27.13±0.41)%和(14.72±0.60)%，而 0.001％的松节对基础儿茶酚胺的分泌及藜芦定、56mMMK^+所介导的儿茶酚胺的分泌无明显影响。

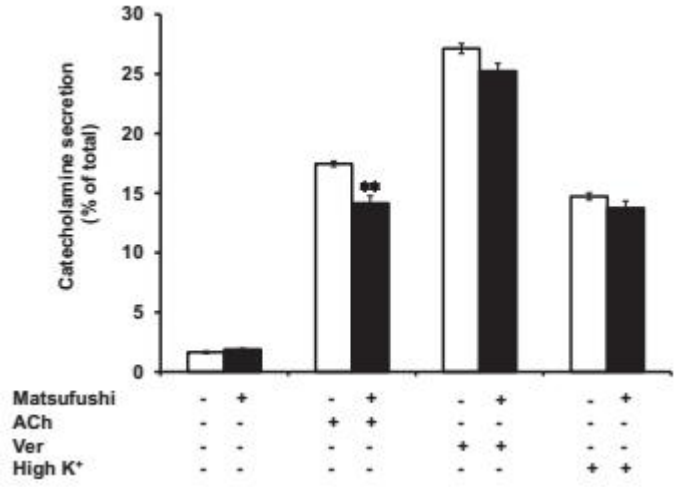


图 1 在人工培育的牛肾上腺髓质细胞中松节提取物对不同途径儿茶酚胺分泌(catecholamine secretion)的影响。生理促分泌素促进作用的儿茶酚胺分泌(catecholamine secretion)的影响。将细胞分别在有无松节提取物（Matsufushi）（0.001%）状态下进行预培养后，再在 37° C 的条件下分别以有无松节提取物（0.001%）、乙酰胆碱(Ach)（300μM）、藜芦定(Ver)（100μM）及 56mM K^+(High K^+)的状态对细胞（10^6/皿）进行十分钟的培养。分泌到容器中儿茶酚胺以其占细胞中总体儿茶酚胺量的百分比表示。每个独立实验在重复进行三次后得出数值，数值以均值加减标准误表示。

不同浓度的松节提取物对乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的分泌以及 56mMK^+涌入的影响

我们对不同浓度的松节提取物对乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的分泌以及 56mMK^+涌入的影响进行了观察发现，不同浓度的松节提取物对受乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的分泌均起到了显著的抑制作用，（图 2 A）不同浓度的松节提取物同样可抑制乙酰胆碱介导的 $^{45}Ca^{2+}$的涌入（图 2 B）并呈剂量依赖性。松节在儿茶酚胺分泌过程以及 $^{45}Ca^{2+}$的涌入中的半抑制浓度分别是 0.0025%和 0.0013%。

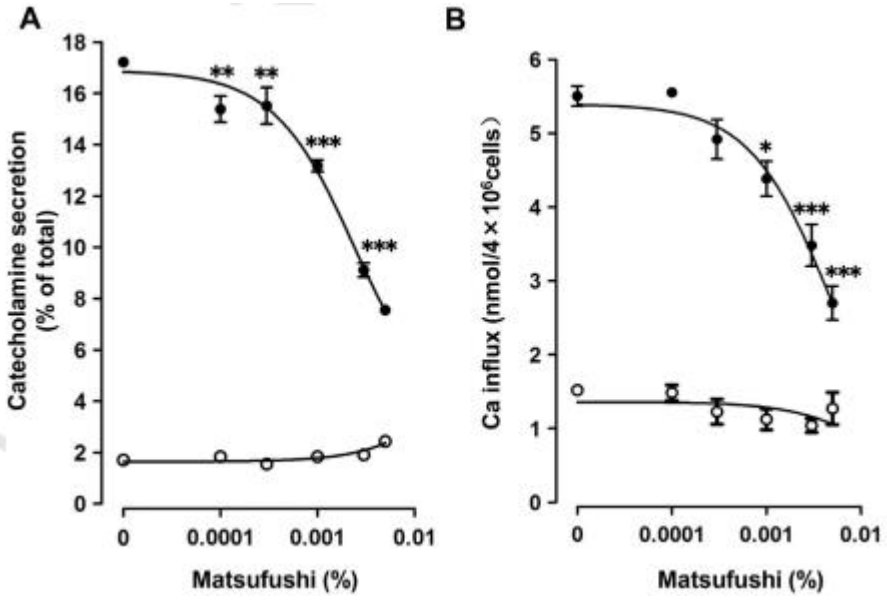


图 2 松节提取物对儿茶酚胺分泌（A）以及 $^{45}Ca^{2+}$涌入（B）的影响。（A）将细胞分别在有无松节提取物（0.003-0.005%）的状态下进行预培养后，在 37° C 的条件下，让细胞分别在有无松节提取物

（0.003-0.005%）的状态下与乙酰胆碱（300μM）进行十分钟的反应。分泌到培养皿中儿茶酚胺以其占细胞中总体儿茶酚胺量的百分比表示。（B）10 分钟的预培养后，在 37° C 的条件下，让细胞分别在有无松节提取物（0.003-0.005%）的状态下与乙酰胆碱（300μM）及 1.5μCi $^{45}Cacl^{2}$进行五 5 分钟的反应。观测 $^{45}Ca^{2+}$的涌入并以 nmol/4×10^{6}细胞的形式记录。每个独立实验在重复进行 3 次后得出数值，数值以均值加减标准误表示。

1.1. 在松节提取物中分离出的四种成分的结构

在松节中提取出了 SJ-2，SJ-3，SJ-4 以及 SJ-16 四种成分。结构见图 3。

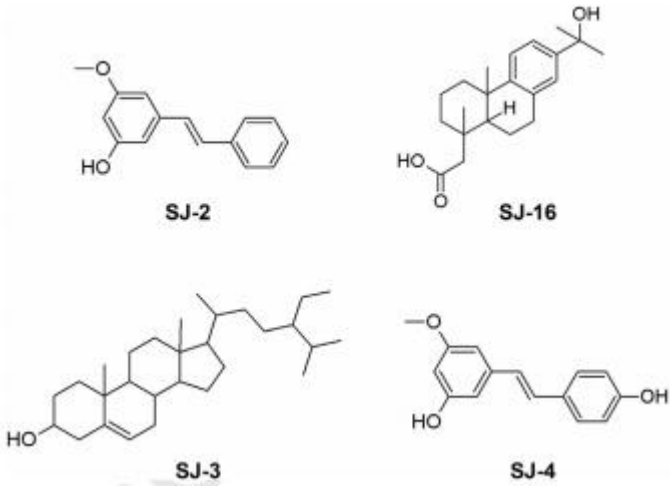


图 3 SJ-2、SJ-3、SJ-4 及 SJ-16 的化学结构

1.2. 松节中的四种成分对乙酰胆碱介导儿茶酚胺的分泌的影响

细胞与松节各个成分或各成分混合物接触 10 分钟后发现,SJ-2 和成分混合物对乙酰胆碱介导儿茶酚胺的分泌[占儿茶酚胺总体的（14.58±0.18）%]起到了强烈的抑制作用，分别导致儿茶酚胺的分泌效率降低到原先总体水平的（8.39±0.32）%和（6.40±0.15）%，而其他 3 种成分对儿茶酚胺的分泌几乎不存在影响（图 4）。

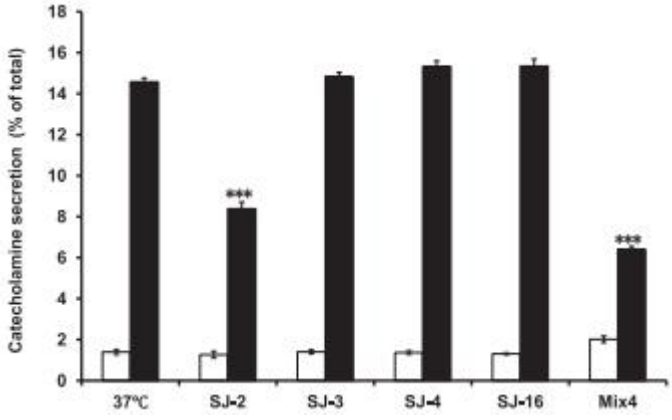


图 4 在人工培育的牛肾上腺髓质细胞中，SJ-2，SJ-3，SJ-4，SJ-16 以及它们的混合物对受乙酰胆碱促进作用的儿茶酚胺的分泌的影响。将细胞以有无 SJ-2（10μM）、SJ-3（10μM）、SJ-4（10μM）、SJ-16（10μM）以及它们的混合物（Mix4）的状态下进行十分钟预培养后，

再在 37° C 的条件下分别以有无这四种成分以及它们的混合物的状态下进行十分钟的培养。分泌到容器中儿茶酚胺以其占细胞中总体儿茶酚胺量的百分比表示。每个独立实验在重复进行三次后得出数值，数值以均值加减标准误表示。

1.3. SJ-2 对乙酰胆碱介导儿茶酚胺的分泌及 $^{45}Ca^{2+}$ 涌入的浓度抑制曲线

细胞与 SJ-2（0.3-100μM）接触后，乙酰胆碱介导儿茶酚胺的分泌受到了明显的抑制（图 5 A），SJ-2 也对乙酰胆碱介导的 $^{45}Ca^{2+}$ 的涌入剂量依赖性的抑制作用（图 5 B）。SJ-2 在儿茶酚胺的分泌以及 $^{45}Ca^{2+}$ 的涌入中的半抑制浓度分别被确定为是 10.3μM 和 10.0μM。

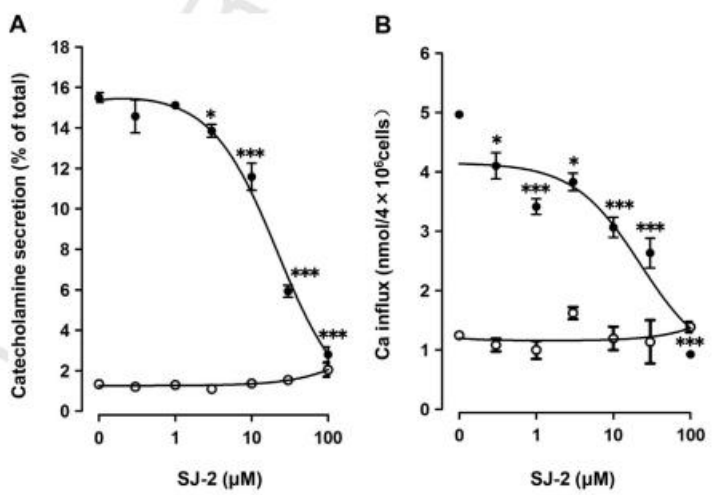


图 5　SJ-2 对受乙酰胆碱促进作用的儿茶酚胺分泌(A)以及 $^{45}Ca^{2+}$ 涌入（B）的影响。（A）将细胞分别在有无 SJ-2（0.03-100μM）的状态下进行预培养后，在 37° C 的条件下，让细胞分别在有无 SJ-2（0.03-100μM）的状态下与乙酰胆碱（300μM）进行十分钟的反应。分泌到容器中儿茶酚胺以其占细胞中总体儿茶酚胺量的百分比表示。（B）十分钟的预培养后，在 37° C 的条件下，让细胞分别在有无 SJ-2（0.03-100μM）的状态下与乙酰胆碱（300μM）及 1.5μCi $^{45}Cacl^{2}$ 进行五分钟的反应。观测 $^{45}Ca^{2+}$ 的涌入并以 nmol/4×10^{6} 个的形式记录。每个独立实验在重复进行三次后得出数值，数值以均值加减标准误表示。

1.4. 松节提取物及 SJ-2 对爪蟾卵母细胞通过α3β4 烟碱乙酰胆碱受体起作用的乙酰胆碱介导作用影响

如图 6 AC 所示，松节提取物和 SJ-2 显著的抑制了乙酰胆碱介导 Na^{+} 电流，且抑制作用可逆。松节提取物（0.00003%-0.001%）（图 6 C）和 SJ-2（1-100μM）（图 6 D）的半抑制浓度分别是 0.00019%和 3.12μM。

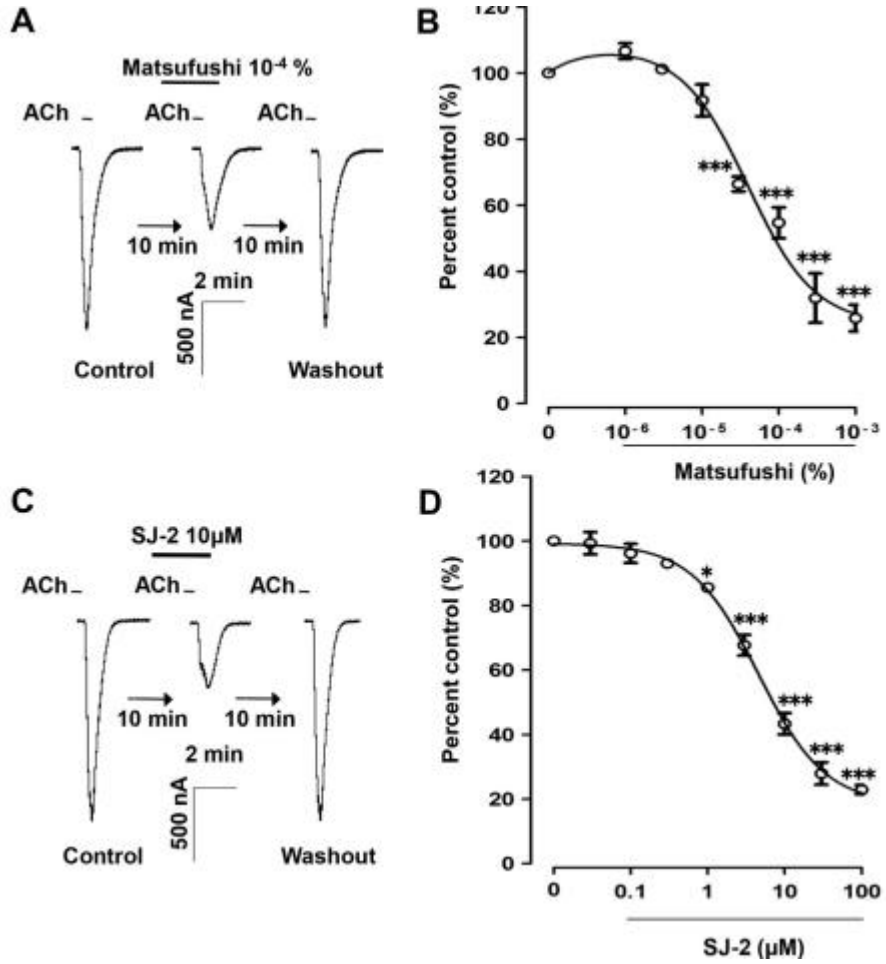


图 6 在表达 α 3 β 4 烟碱乙酰胆碱受体的爪蟾卵母细胞中，松节提取物及 SJ-2 对内乙酰胆碱介导的电流峰值的影响。在记录了控制电流后对松节提取物（图 6A）以及与 SJ-2 接触的卵母细胞（图 6C）的电流进行记录。十分钟后获得流出电流。松节提取物（0.0001%）及 SJ-2（10 μM）可逆的抑制了乙酰胆碱介导的 EC50（0.2mM）的电流。图 6 B、D 分别表示了松节提取物（0.0001%）及 SJ-2（10 μM）抑制作用的剂量-效应曲线。每个独立实验在重复进行三次后得出数值，数值以均值加减标准误表示。

1.5. 松节提取物及 SJ-2 对 ^{14}C 儿茶酚胺的合成以及酪氨酸羟化酶活性的抑制作用

在牛肾上腺髓质细胞中，乙酰胆碱（300 μM）可以将以[^{14}C]酪氨酸为原料合成 ^{14}C 儿茶酚胺的作用效率提升两倍。细胞与松节提取物（0.001%和 0.003%浓度）和 SJ-2（10 μM、30 μM）接触后，乙酰胆碱对 ^{14}C 儿茶酚胺合成的促进作用受到抑制。SJ-2 对基础 ^{14}C 儿茶酚胺的合成起到了抑制作用。

松节提取物（0.001%，0.003%）和 SJ-2（10 μM，，30 μM）也抑制了乙酰胆碱介导的酪氨酸羟化酶的活性。SJ-2 也轻微地抑制了主要酶的活性。

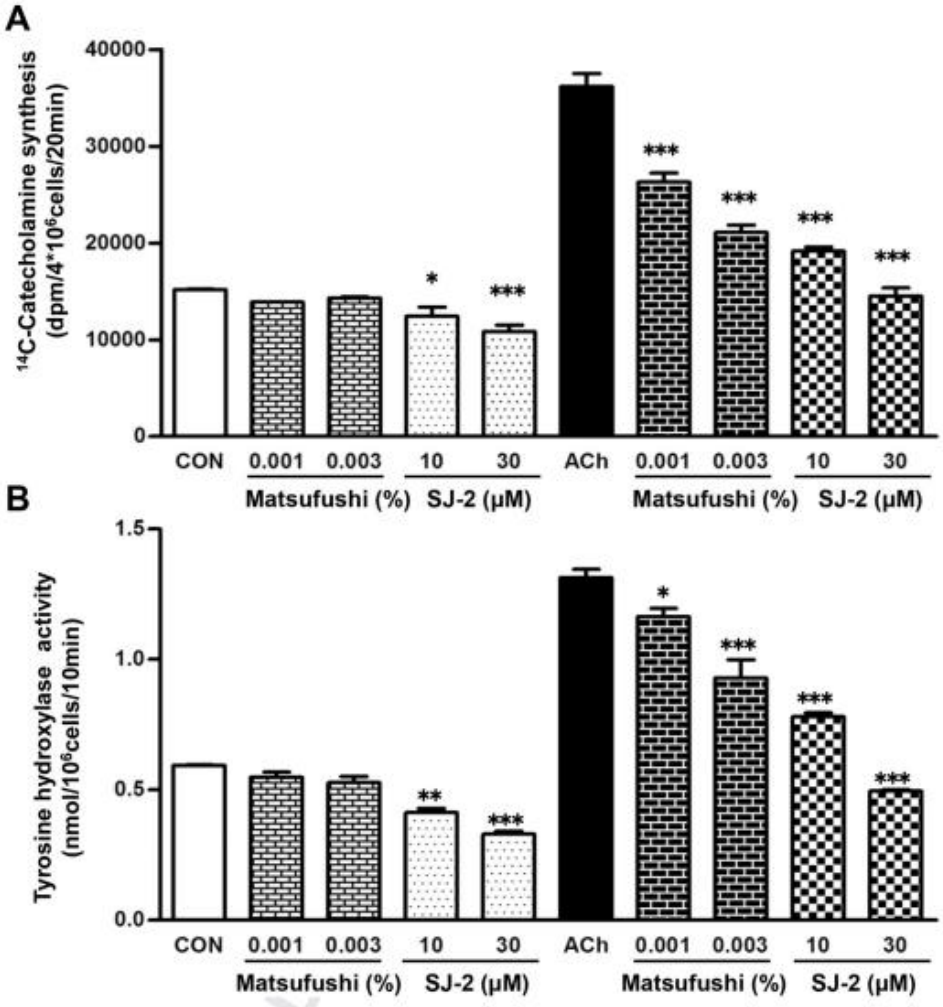


图 7 ^{14}C 松节提取物及 SJ-2 对儿茶酚胺在[14C]酪氨酸中进行的合成（A）和酪氨酸羟化酶的活性（B）的抑制作用。将细胞分别在有无松节提取物和 SJ-2 状态下进行预培养后，在 37° C 的条件下，让细胞（4×106/皿）分别在有无松节提取物（0.001%，0.003%）和 SJ-2（10 μM、30 μM）以及有无 300 μM 乙酰胆碱的状态下与 L-[U-14C]酪氨酸（20 μM，1 μCi）进行二十分钟的培养，后观测形成的 14C 儿茶酚胺(B)。将细胞分别在有无松节提取物（0.001%，0.003%）和 SJ-2（10 μM、30 μM）状态下进行十分钟预培养后，在 37° C 的条件下，让细胞（106/盘）分别在有无松节提取物（0.001%，0.003%）和 SJ-2（10 μM、30 μM）以及有无 300 μM 乙酰胆碱的状态下与 L-[U-14C]酪氨酸（18 μM，0.2 μCi）进行二十分钟的培养，后观测酪氨酸羟化酶活性(B)。每个独立实验在重复进行三次后得出数值，数值以均值加减标准误表示

3 讨论

松节是由松树表面损伤导致树皮增殖而产生。在当前的研究中，我们研究了松节提取物以及其成分 SJ-2、SJ-3、SJ-4 以及 SJ-16 对儿茶酚胺的分泌以及 $^{45}Ca^{2+}$ 涌入的影响。我们证实了在人工培育的牛肾上腺髓质细胞中，松节提取物以及 SJ-2 抑制了乙酰胆碱介导儿茶酚胺的分泌与合成，而除 SJ-2 以外的其他三种成分不存在该作用。据我们所知，这是松节提取物及其成分 SJ-2 对儿茶酚胺系统的抑制作用的首个直接证据。

3.1 松节提取物及其成分 SJ-2 对乙酰胆碱介导儿茶酚胺分泌的抑制作用

在肾上腺髓质细胞中，松节提取物明显地抑制了乙酰胆碱介导儿茶酚胺的分泌。而非由藜芦定或 56mMK^+所介导的儿茶酚胺分泌。我们既往研究[5]表明，乙酰胆碱和藜芦定分别激活了烟碱乙酰胆碱受体离子通道和电压依赖性钠离子通道，接下来 Na^+, Ca^{2+}依次涌入，最后儿茶酚胺分泌。另外，56mMK^+使细胞膜去极化并激活电压依赖性钙离子通道。在当前的研究中，松节提取物对由藜芦定或 56mMK^+介导的儿茶酚胺分泌影响甚微。因此，松节似乎是抑制了烟碱乙酰胆碱受体离子通道，而非电压依赖性钠离子通道或电压依赖性钙离子通道。松节提取物及其成分 SJ-2 对乙酰胆碱介导的 Ca^{2+}涌入和儿茶酚胺的分泌有着浓度依赖性抑制作用。Ca^{2+}作为连结者在刺激-分泌偶联中扮演着重要的角色[13]。根据这些发现，似乎可以判定松节提取物及 SJ-2 通过抑制乙酰胆碱介导的 Ca^{2+}的涌入抑制儿茶酚胺的分泌。

3.2 SJ-2 对烟碱乙酰胆碱受体离子通道的抑制作用的结构-活性关系

我们使用了在松节提取物中分离出的四种成分，在这其中，只有 SJ-2 具有抑制烟碱乙酰胆碱受体离子通道的功能。SJ-2 和 SJ-4 在结构上相似。SJ-4 在第四个碳原子上有一个羟基，而 SJ-2 在相同位置上没有羟基。通过他们在结构上的差异可以判断出，SJ-4 第四个碳原子上的羟基在黄酮醇苷与烟碱乙酰胆碱受体进行反应时促进了立体定向干扰。另一方面，我们之前提到过一种名为白藜芦醇的葡萄多酚，它可以抑制乙酰胆碱、藜芦定以及 56mMK^+（IC_{50}=20.4,11.0,62.8）[9]介导的儿茶酚胺的分泌。白藜芦醇的化学结构与 SJ-2 和 SJ-4 非常相似，而白藜芦醇在第三四五个碳原子上拥有三个羟基。然而，我们仍需要更多的信息以明确 SJ-2 的抑制作用与离子通道的功能间的结构关系。

3.3 在具有α3β4 烟碱乙酰胆碱受体的爪蟾卵母细胞中，松节提取物及 SJ-2 对乙酰胆碱介导的内向电流的抑制模式

为了研究松节提取物及 SJ-2 抑制乙酰胆碱介导的儿茶酚胺分泌以及 $^{45}Ca^{2+}$涌入的机制，我们观测了它们在具有α3β4 烟碱乙酰胆碱受体的爪蟾卵母细胞中，对乙酰胆碱介导的内向电流的直接影响。松节提取物及 SJ-2 对 Na^+电流涌入产生了直接的浓度依赖性抑制作用，这表示松节提取物及 SJ-2 通过抑制烟碱乙酰胆碱受体，从而抑制肾上腺髓质细胞中乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的分泌以及 Ca^{2+}涌入。

3.4 松节提取物及 SJ-3 对儿茶酚胺合成以及酪氨酸羟化酶活性的抑制作用

在牛肾上腺髓质细胞中，松节提取物及 SJ-2 抑制了乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的合成以及乙酰胆碱介导的酪氨酸羟化酶的活性。众所周知，Ca^{2+}作为连结者在刺激-分泌偶联中扮演着重要的角色[7]。本研究发现松节提取物及SJ-2通过抑制烟碱乙酰胆碱受体离子通道抑制了 $^{45}Ca^{2+}$ 涌入。因此可以得出，在人工培育牛肾上腺髓质系中，松节提取物及 SJ-2 通过抑制 Ca^{2+}涌入抑制了乙酰胆碱介导的儿茶酚胺合成以及酪氨酸羟化酶的活性。

3.5 松节提取物及 SJ-2 在乙酰胆碱系统中的病理学意义

尽管松节提取物及 SJ-2 的人类血清浓度仍然未知，但马尾松树皮提取物（140 μg/ml=0.014%）对海拉细胞具有抗转移作用[14]。另外，新疆五针松的乙醇提取物（100 μg/ml=0.01%）在 HepG2 细胞的油酸诱导脂肪变性中显示出了抗氧化及减少脂肪生成的作用。在体内研究中，300mg/kg 的新疆五针松松油提取物显示出了抗炎作用[11]。在不久的将来，我们将会明确，当前研究中的 SJ-2 物质是否能为人类健康做出贡献。

尽管儿茶酚胺对中枢神经系统以及交感神经系统正常功能的调节起到重要作用，严重和长期的压力会导致它们大量释放，导致多种心血管疾病，如高血压、动脉粥样硬化、冠心病以及心脏衰竭[4,16]。有研究表明，慢性心脏衰竭与儿茶酚胺循环增加所导致的交感神经系统过度激活有关[4,17]。此外，应激性肾上腺激素对通过激活 G 蛋白偶联的 CAMP-PKA 及 β 2 阻遏蛋白介导的信号通路，使 p53 基因水平下降，最终导致 DNA 的损伤[18]。

我们近期的回顾性研究[16]表明，大豆异黄酮、川陈皮素、柑橘提取物黄酮[20]，以及一种从淫羊藿属植物中提取出的天然黄酮醇苷、淫羊藿[21]，在人工培育的牛肾上腺髓质细胞中均能够起到抑制乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的合成与分泌的作用。该发现可以为“松节提取物及其成分 SJ-2 能够抑制由严重疾病或情绪激动（可促进内脏神经中乙酰胆碱的分泌）引起的乙酰胆碱系统的过分活跃”这一观点提供支持。为确认这一可能性，将来还需要进行更多的体内试验。

总之，本研究证实在肾上腺髓质中，松节提取物及其成分 SJ-2 通过抑制烟碱乙酰胆碱受体离子通道抑制了乙酰胆碱介导的儿茶酚胺的合成与分泌。该现象在交感神经中也可能存在。

利益冲突声明：

作者声明：文章内容不存在利益冲突

鸣谢：

日本学术振兴协会提供的科学研究补助金（25460135,26350170）、健康劳动科学研究补助金（160701-1），日本大阪德润有限公司为本研究提供支持。

附录 A 补充资料：

文章相关补充资料可访问 http://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2017.03.006.

参考：

1. Jiangsu New Medical College. *Traditional Chinese Medicine Dictionary*, vol. 1. Shanghai People's Publishing House; 1977:1252 [text in Chinese].

2. . Bermudez J, Burgess MF, Cassidy F, Clarke GD. Activity of the oxidation of products oleum terebinthinae "Landes" on guinea pig airway smooth muscle in vivo and in vireo. *Arzneimittelforschung.* 1987,37:1258-1262

3. Chen W, Liu Y, Li M, et al. Anti-tumor effect of α-pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *J Pharmacol Sci.* 2015;127: 332-338

4. Wesfall TC, Westfall DP. Adrenergic agonist and antagonists. In: Brunton LL, Chabner BC, Knollmann BC,

eds. *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed. NY: McGraw-Hill; 2011:277-330

5. Wada A, Takara H, Izumi F, Kobayashi H, Yanagihara N. Influx of ^{22}Na through acetylcholine receptor-associated Na channels: relationship between ^{22}Na influx, ^{45}Ca influx and secretion of catecholamines in cultured bovine adrenal medulla cells*. Neuroscience.* 1984;15;283-292

6. Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis.*J Biol Chem*. 1964;239:2910-2917.

7. Yanagihara N, Wada A, Izumi F. Effects ofa2-adrenergic agonists on carbachol-stimulated catecholamine synthesis in cultured bovine adrenal medullary cells. *Biochem Pharmacol.* 1987;36(22):3823-3828.

8. Toyohira Y, Kubo T, Watanabe M, et al. Selective blockade of nicotinic acetyl-choline receptors by pimobendan, a drug for the treatment of heart failure: reduction of catecholamine secretion and synthesis in adrenal medullary cells. *Schmiedeb Arch Pharmacol.* 2005;371:107-113.

9. Shinohara Y, Toyohira Y, Ueno S, Liu M, Tsutsui M, Yanagihara N. Effects of resveratrol, a grape polyphenol, on catecholamine secretion and synthesis in cultured bovine adrenal medullary cells. *Biochem Pharmacol.* 2007;74;1608-1618

10. Sakagami H, Ikeda M, Unten S, et al. Antitumor activity of polysaccharide fractions from pine cone extract of Pinus parviflora Siebs. et Zucc. *Anticancer Res*. 1978;7;1153-1159.

11. Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Makarova MN. Anti-inflammatory effect of Pinus sibirica oil extract in animal models .*J NatMed*. 2008;62:436-440.

12. Yanagihara N, Isosaki M, Ohuchi T, Oka M. Muscarinic receptor-mediated in-crease in cyclic GMP level in isolated bovine adrenal medullary cells. *FEBS Lett*. 1979;105:296-298.

13. Douglas WW, Rubin RP. Mechanism of nicotinic action at the adrenal me-dulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature.* 1961;192:1087-1089

14. Wu DC, Li S, Yang DQ, Cui YY. Effects of Pinus massoniana bark extract on the adhesion and migration capabilities of HeLa cells. *Fitoterapia.* 2011;828:1202-1205.

15. Hwang YJ, Wi HR, Kim HR, Park KW, Hwang KA. Pinus densiflora Sieb. et Zucc. alleviates lipogenesis and oxidative stress during oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Nutrients.* 2014;6:2956-2972.

16. Yanagihara N, Zhang H, Toyohira Y, et al. New insights into the pharmaco-logical potential of plant flavonoids in the catecholamine system. *J Pharmacol Sci.* 2014;124:123-128.

17. Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Anti-b1-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J Clin Investig*. 2004;113:1379-1382.

18. Hara MR, Kovacs JJ, Whalen EJ, et al. A stress response pathway regulates DNA damage through β2-adrenoreceptors and β-arrestin-1. *Nature*. 2011;477:

19. Liu M, Yanagihara N, Toyohira Y, Tsutsui M, Ueno S, Shinohara Y. Dual effects of daidzein, a soy isoflavone, on catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *Endocrinology*. 2007;148:5348-5354.

20. Zhang H, Toyohira Y, Ueno S, et al. Dual effects of nobiletin, a citrus poly-methoxy flavone, on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells*. J Neurochem.* 2010;1 14:1030-1038.

21. Li X, Toyohira Y, Horisita T, et al. Ikarisoside A inhibits acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis by suppressing nicotinic acetylcholine receptor-ion channels in cultured bovine adrenal medullary cells. *Schmiedeb Arch Pharmacol.* 2015;388;1259-1269.