

山核桃叶总黄酮及其单体化合物对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移的抑制作用

沈嫣婧¹, 朱学鑫¹, 蒋福升¹, 金波¹, 丁滨¹, 陆金健², 丁志山^{1*}

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053;

2. 澳门大学中华医药研究院, 中药质量研究国家重点实验室(澳门大学), 澳门 999078)

[摘要] 目的: 研究山核桃叶总黄酮及其 4 种单体化合物球松素查尔酮、松属素、白杨素、汉黄芩素对血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 增殖和迁移的作用。方法: 组织贴块法培养大鼠胸主动脉 VSMC。调细胞密度 $2.0 \times 10^4/\text{mL}$, 血清饥饿处理后用 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 诱导增殖 12 h。调细胞密度 $6.0 \times 10^4/\text{mL}$, 用 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 诱导迁移 12 h。均给予 $12.5 \sim 62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 总黄酮, $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 球松素查尔酮、松属素、白杨素、汉黄芩素作用 12 h。用细胞计数法检测 VSMC 增殖, 伤口愈合实验检测 VSMC 迁移。结果: $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 总黄酮可剂量依赖性地显著抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 球松素查尔酮、白杨素和汉黄芩素对 Ang II 诱导的 VSMC 增殖有微弱抑制。 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 总黄酮, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 球松素查尔酮、松属素、白杨素、汉黄芩素均能剂量依赖性地显著抑制 Ang II 诱导的 VSMC 迁移。其中总黄酮、白杨素、汉黄芩素的效果优于松属素和球松素查尔酮。结论: 山核桃叶总黄酮能有效抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖和迁移; 白杨素、汉黄芩素、松属素和球松素查尔酮对 Ang II 诱导的 VSMC 迁移的抑制作用强于对其诱导的 VSMC 增殖的抑制作用。

[关键词] 山核桃叶总黄酮; 血管紧张素 II; 血管平滑肌细胞; 增殖; 迁移

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0119-04

[doi] 10.11653/syjf2014010119

Inhibitory Effects of Total Flavonoids and Pure Compounds from Leaves of *Carya cathayensis* on Angiotensin II-induced Proliferation and Migration in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

SHEN Yan-jing¹, ZHU Xue-xin¹, JIANG Fu-sheng¹, JIN Bo¹, DING Bin¹, LU Jin-jian², DING Zhi-shan^{1*}

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao 999078, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of total flavonoids from the leaves of *Carya cathayensis* and their four monomer compounds, namely pinostrobin chalcone, pinocembrin, chrysin and wogonin on angiotensin II (Ang II)-induced proliferation and migration in rat vascular smooth muscle cells (VSMC). **Method:** VSMC were primary cultured by tissue sticking method. VSMC proliferation was induced by $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II for 12 h after treatment of serum starvation at the initial density of $2.0 \times 10^4/\text{mL}$. VSMC migration was induced by $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II for 12 h at the initial density of $6.0 \times 10^4/\text{mL}$. Both of them were treated with

[收稿日期] 20130603(005)

[基金项目] 国家自然科学基金(81303258); 浙江省大学生科技创新活动计划资助项目(2012R410057); 浙江省医药卫生一般研究计划(2012KYB136)

[第一作者] 沈嫣婧, 硕士, 从事中药抗肿瘤研究, Tel: 13486181702, E-mail: syj24@126.com

[通讯作者] * 丁志山, 博士, 教授, 从事中药学研究, Tel: 0571-86613666, E-mail: zjtcmdzs@163.com

12.5-62.5 mg·L⁻¹ total flavonoids, 10-50 mg·L⁻¹ pinostrobin chalcone, pinocembrin, chrysin and wogonin for 12 h. Cell proliferation was measured by direct counting the cells and cell migration was determined using the wound healing assay, respectively. **Result:** 12.5 mg·L⁻¹ total flavonoids significantly inhibited Ang II-induced VSMC proliferation in a dose dependent manner while 50 mg·L⁻¹ pinostrobin chalcone, chrysin and wogonin slightly inhibited Ang II-induced VSMC proliferation. 12.5 mg·L⁻¹ total flavonoids, 10 mg·L⁻¹ pinostrobin chalcone, pinocembrin, chrysin and wogonin significantly inhibited Ang II-induced VSMC migration in a dose dependent manner. Among them, the total flavonoids, chrysin and wogonin showed a higher inhibitory effect compared with those of pinocembrin and pinostrobin chalcone. **Conclusion:** The total flavonoids from the leaves of *C. cathayensis* can effectively inhibit Ang II-induced VSMC proliferation and migration, while their four monomer compounds present better suppressive activities on Ang II-induced migration than those of proliferation in VSMC.

[**Key words**] total flavonoids from the leaves of *Carya cathayensis*; angiotensin II; vascular smooth muscle cells; proliferation; migration

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种动脉壁的慢性炎症性疾病, 是许多心血管疾病发病率和死亡率的常见原因。AS 斑块形成涉及脂类代谢障碍、血管内皮细胞损伤、血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 增殖和迁移、血小板黏集等多种因素。其中 VSMC 异常增殖和迁移是 AS、高血压病等心血管疾病的共同的病理性改变^[1], 在 AS 斑块形成过程中发挥重要作用。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统中主要的活性肽产物, 具有生长因子和细胞因子样特性。Ang II 有增强 VSMC 增殖和迁移的作用, 并可激发其表达与分泌多种炎症细胞因子、生长因子和细胞外基质蛋白, 进而促进斑块形成, 在 AS 发生发展过程中起着重要作用^[2]。

黄酮是一类存在于自然界的、具有 2-苯基色原酮结构的化合物, 具有心血管保护、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗炎镇痛、肝保护等多种药理作用^[3]。在调节心血管系统功能方面, 黄酮可降低血压、抗脂质过氧化、抗心律失常、保护心肌、影响血液流变学和血小板聚集等^[4-5]。不少植物黄酮也具有舒张血管平滑肌、保护血管内皮细胞功能和抑制 VSMC 增生等作用^[6]。

山核桃是一种落叶乔木, 属核桃科山核桃属, 是浙江省临安地区最主要的经济林木, 产量丰富。目前对山核桃的研究主要集中在果皮, 山核桃叶作为植物的重要组织, 其经济价值尚未被发现。作者结合现代化学分离、纯化、鉴定等技术, 从山核桃落叶中提取出总黄酮, 并进一步得到球松素查尔酮、松属素、白杨素、汉黄芩素等多种单体化合物。本实验旨在研究这些黄酮类物质对 Ang II 诱导的 VSMC 增殖和迁移的抑制作用。

1 材料

1.1 动物 6 只 6 周龄雄性 SD 大鼠, 体重 (150 ± 10) g。由浙江中医药大学动物实验中心提供。动物质量合格证号 SCXK(沪)2008-0033。

1.2 药物 山核桃叶总黄酮 (纯度 > 70%), 球松素查尔酮、松属素、白杨素、汉黄芩素占总黄酮的比例分别为 77.5%, 9.7%, 7.3%, 0.7%。由浙江中医药大学生命科学院分子遗传研究所制备^[7]。

1.3 试剂 RPMI-1640 培养液 (13050904, 吉诺生物医药技术有限公司), 无支原体胎牛血清 (130407, 浙江天杭生物科技有限公司), 胰蛋白酶 (2242B80, 杭州宏博生物工程有限公司), 二甲基亚砜 (20120323, 天津市永大化学试剂有限公司), Ang II (P121114-ZC051480, 吉尔生化有限公司), α -肌动蛋白免疫组化试剂盒 (07F19BN, 武汉博士德生物技术有限公司)。

1.4 仪器 ECLIPSE Ti-DH 型荧光倒置显微镜 (日本尼康公司), HEPA CLASS100 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司), SW-CJ-1F 型超净工作台 (苏净集团安泰公司); LD4-2A 型低速离心机 (北京医用离心机厂), AR1140 型电子天平 (美国奥豪斯公司)。

2 方法

2.1 VSMC 培养和鉴定 采用组织贴块法培养 VSMC。无菌条件取出大鼠胸主动脉, D-hanks 液冲洗剥离外层脂肪组织。用组织剪将所取主动脉剪碎成大约为 1 mm³ 的碎块, 平铺于培养瓶中。将植块面翻转, 加入含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 培养液不与组织块接触, 置于培养箱培养 2 h 后轻轻翻转培养瓶, 使液面与细胞接触。培养 3~6 d, 至有少许细胞从组织边缘游离出来, 拍照记录, 并补充培养液。待镜下细胞呈“峰-谷”状生长时, 进行

传代培养。采用免疫细胞化学染色法鉴定 VSMC 的特异性肌动蛋白 α -肌动蛋白。

2.2 分组及处理 ①空白组:未加入药物;②Ang II 组:加入 Ang II ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$);③处理组:加入 Ang II ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和不同浓度总黄酮或单体化合物。总黄酮质量浓度为 $12.5 \sim 62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 球松素查尔酮、松属素、白杨素、汉黄芩素均为 $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上②③干预时间均为 12 h。

2.3 山核桃叶总黄酮及其单体对 Ang II 诱导的 VSMC 增殖的抑制作用 选择 3 ~ 5 代 VSMC, 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化制备细胞悬液,调细胞密度 $2.0 \times 10^4/\text{mL}$,接种于 24 孔板中,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 于 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 条件下培养。24 h 后各组换用含 1% FBS 的 RPMI 1640 并分别处理如下:空白组不加 Ang II;其余各组加 Ang II,终浓度为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。12 h 后处理组加入不同浓度总黄酮或单体化合物,作用 12 h 后收集细胞,镜下计数。

2.4 山核桃叶总黄酮及其单体对 Ang II 诱导的 VSMC 迁移的抑制作用 取第 3 ~ 5 代 VSMC, 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化制备细胞悬液,调细胞密度 $6.0 \times 10^4/\text{mL}$,接种于 24 孔板中,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 于 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 条件下培养。24 h 后用 $100 \mu\text{L}$ 枪头在每个孔中划出基本相同的宽度并拍照记录,设为 0 点。除空白组外每孔加入 Ang II 使其终浓度为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,作用 12 h 后拍照记录。处理组加入不同浓度的总黄酮或单体化合物,作用 12 h 后拍照记录并计算迁移面积。

2.5 统计学处理 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。用单因素方差分析进行统计学处理,组间差异的比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 VSMC 培养 倒置相差显微镜下观察,细胞为梭形、长梭形,排列成放射状,呈典型“峰-谷”状生长现象(图 1)。经鉴定,VSMC 的纯度 $>95\%$,绿色荧光代表 VSMC α -肌动蛋白阳性细胞(图 2)。

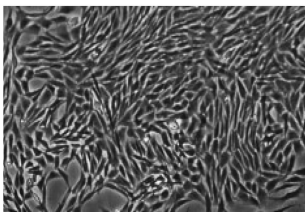


图 1 大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞 ($\times 100$)

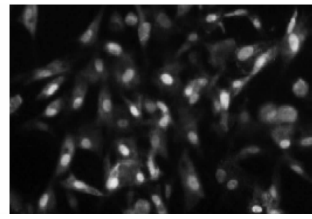


图 2 大鼠胸主动脉 VSMC α -肌动蛋白(免疫细胞化学染色, $\times 100$)

3.2 山核桃叶总黄酮及其单体对 Ang II 诱导的 VSMC 增殖的抑制作用 所示,与正常对照组比较,Ang II 诱导的 VSMC 增殖能力显著升高 ($P < 0.01$)。与 Ang II 组比较,山核桃叶总黄酮可剂量依赖性显著抑制 VSMC 的增殖 ($P < 0.01$);单体化合物对 VSMC 增殖能力的抑制作用较弱,仅球松素查尔酮、白杨素和汉黄芩素在高浓度下对 VSMC 的增殖有微弱抑制 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 山核桃叶总黄酮及其单体对 Ang II 诱导 VSMC 增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

成分	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Ang II $/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞数目 $/\times 10^4$
总黄酮	-	-	3.6 ± 0.28
	-	100	$4.6 \pm 0.48^{1)}$
	12.5	100	$3.6 \pm 0.36^{3)}$
	37.5	100	$3.0 \pm 0.42^{3)}$
	62.5	100	$2.4 \pm 0.64^{3)}$
球松素查尔酮	-	-	3.7 ± 0.28
	-	100	$4.7 \pm 0.33^{1)}$
	10	100	4.6 ± 0.42
	20	100	4.6 ± 0.49
	30	100	$4.4 \pm 0.60^{2)}$
松属素	-	-	3.6 ± 0.31
	-	100	$4.9 \pm 0.43^{1)}$
	10	100	4.8 ± 0.51
	20	100	4.7 ± 0.56
	30	100	4.7 ± 0.61
白杨素	-	-	3.8 ± 0.36
	-	100	$4.9 \pm 0.42^{1)}$
	10	100	4.8 ± 0.49
	20	100	4.7 ± 0.61
	30	100	$4.5 \pm 0.53^{2)}$
汉黄芩素	-	-	3.5 ± 0.24
	-	100	$4.7 \pm 0.36^{1)}$
	10	100	4.6 ± 0.38
	20	100	4.5 ± 0.45
	30	100	$4.4 \pm 0.56^{2)}$

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 Ang II 组比较²⁾ $P < 0.05$,
³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 山核桃叶总黄酮及其单体对 Ang II 诱导的 VSMC 迁移的抑制作用 如表 2 所示,与正常对照

组比较, Ang II 诱导的 VSMC 迁移能力显著升高 ($P < 0.01$)。与 Ang II 组比较, 不同浓度山核桃叶总黄酮及其 4 个单体化合物(汉黄芩素、白杨素、松属素和球松素查尔酮) 均能剂量依赖性地显著抑制 VSMC 的迁移能力 ($P < 0.01$)。

表 2 山核桃叶总黄酮及其单体
对 Ang II 诱导 VSMC 迁移的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

成分	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Ang II /nmol·L ⁻¹	迁移面积 /cm ²
总黄酮	-	-	3.62 ± 0.15
	-	100	7.10 ± 0.20 ¹⁾
	12.5	100	5.54 ± 0.22 ³⁾
	37.5	100	4.96 ± 0.18 ³⁾
	62.5	100	3.76 ± 0.14 ³⁾
球松素查尔酮	-	-	3.62 ± 0.21
	-	100	7.24 ± 0.18 ¹⁾
	10	100	7.12 ± 0.27 ³⁾
	20	100	6.16 ± 0.23 ³⁾
	30	100	5.86 ± 0.17 ³⁾
松属素	-	-	3.62 ± 0.15
	-	100	6.88 ± 0.19 ¹⁾
	10	100	6.77 ± 0.24 ³⁾
	20	100	5.69 ± 0.28 ³⁾
	30	100	5.40 ± 0.21 ³⁾
白杨素	-	-	3.62 ± 0.24
	-	100	7.60 ± 0.28 ¹⁾
	10	100	6.78 ± 0.19 ³⁾
	20	100	3.33 ± 0.23 ³⁾
	30	100	2.14 ± 0.17 ³⁾
汉黄芩素	-	-	3.62 ± 0.15
	-	100	7.18 ± 0.21 ¹⁾
	10	100	5.28 ± 0.18 ³⁾
	20	100	3.56 ± 0.26 ³⁾
	30	100	1.67 ± 0.19 ³⁾

4 讨论

AS 是以进行性脂质沉积、纤维组织增生和炎性细胞浸润为特征的累及全身大、中型弹性和肌性动脉的慢性疾病^[8]。VSMC 作为构成血管内膜的主要成分, 在血管壁的病理变化和 AS 的发生发展过程中起着重要作用^[9]。研究证实多种中药通过调节脂质代谢、保护血管内皮细胞、抑制脂质过氧化、抑制血管平滑肌增殖、调节增殖与凋亡之间的平衡、抗炎反应等一系列途径和环节, 干预和治疗由 As 病变所引起的心脑血管疾病。Ang II 在 VSMC 增殖、迁移以及 AS 的发生发展过程中处于关键地位。Ang II 通过与 VSMC 细胞膜上的 AT1 受体结合刺激其合成并分泌多种细胞因子和生长因子, Ang II 与多种因子相互作用, 启动不同的信号转导途径, 从而

促进 VSMC 增殖和迁移^[10]。

本研究以体外培养的大鼠胸主动脉 VSMC 为模型, 采用 Ang II 诱导 VSMC 增殖和迁移, 观察不同浓度的山核桃叶总黄酮及其 4 个单体化合物对 VSMC 增殖和迁移能力的影响。Ang II 诱导的 VSMC 增殖和迁移能力明显高于对照组, 说明 Ang II 能明显促进 VSMC 增殖和迁移。与 Ang II 组比较, 不同浓度山核桃叶总黄酮能明显抑制 VSMC 的增殖能力且呈明显剂量依赖性。汉黄芩素、白杨素、松属素和球松素查尔酮单独作用对 VSMC 的增殖抑制作用微弱, 说明山核桃叶总黄酮中的几个单体化合物之间可能存在协同抗增殖作用, 也有可能存在其他化合物发挥与总黄酮相当的抗增殖作用。与 Ang II 组比较, 不同浓度山核桃叶总黄酮及其 4 个单体化合物均能明显抑制 VSMC 的迁移能力。

鉴于山核桃叶总黄酮在抑制 Ang II 诱导的 VSMC 增殖和迁移的显著作用, 值得进一步深入研究其作用机制, 为抗 AS 天然药物的发现提供更多理论支撑。值得指出的是, 作者所利用材料为山核桃落叶, 传统上均作为废弃物丢弃, 因此如能进一步开发这一产品, 将具有重要的经济效益和社会效益。

[参考文献]

[1] 关德明. 动脉粥样硬化形成机制研究进展[J]. 哈尔滨医科大学学报, 1999, 33(6): 502.

[2] 程训民. 血管紧张素 II 对血管平滑肌细胞增殖的调节作用[J]. 心血管病学进展, 1998, 19(5): 301.

[3] 何春霞, 王爱英, 古丽江, 等. 黄酮类化合物的药理学作用研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2011, 11: 131.

[4] 陈玲玲. 葛根素作用研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(2): 140.

[5] 张晓丹, 刘婧, 张伟兵, 等. 灯盏花素心血管药理及临床研究进展[J]. 中国药业, 2007, 16(21): 1.

[6] 刘蕊. 黄酮类化合物的药理作用研究进展[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(2): 234.

[7] 朱学鑫, 李伟平, 俞燕, 等. 山核桃叶总黄酮制备[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1): 147.

[8] 张运. 动脉粥样硬化研究的当前问题[J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(9): 785.

[9] Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, et al. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles [J]. Cardiovascular Research, 2012, 95(2): 194.

[10] 景涛, 何国祥, 刘建平, 等. 血管紧张素 II 及其受体在血管平滑肌细胞迁移中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(2): 143.

[责任编辑 聂淑琴]