

金粉蕨素对溶血性磷脂酰胆碱损伤血管内皮依赖性舒张功能的保护作用及机制

庹勤慧, 黄红林, 谢志忠, 郑兴, 廖端芳

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 金粉蕨素; 内皮细胞; 溶血性磷脂酰胆碱; 一氧化氮; 前列环素

[摘要] 为了观察金粉蕨素对溶血性磷脂酰胆碱损伤血管内皮依赖性舒张功能的保护作用及机制, 采用离体血管环张力实验法, 用金粉蕨素和溶血性磷脂酰胆碱共同孵育血管环, 发现乙酰胆碱诱导的血管舒张百分比由损伤时的 $16.1\% \pm 3.5\%$ 上升到 $42.1\% \pm 8.0\%$ 。一氧化氮合酶抑制剂 N- 硝基- L- 精氨酸和环氧酶抑制剂吲哚美辛可阻断金粉蕨素的保护作用。此外, 在培养的人脐静脉内皮细胞上, 采用 DGKC 法测定乳酸脱氢酶, 观察到金粉蕨素使内皮细胞乳酸脱氢酶含量由溶血性磷脂酰胆碱损伤时的 115.3 ± 48.3 IU/L 下降到 30.8 ± 5.4 IU/L。同样, N- 硝基- L- 精氨酸和吲哚美辛可阻断金粉蕨素的保护作用, 使乳酸脱氢酶释放分别恢复到 91.3 ± 27.6 IU/L 和 104.5 ± 15.7 IU/L。结果提示: 金粉蕨素保护血管内皮依赖性舒张功能可能与促进内皮细胞释放一氧化氮和前列环素有关。

[中图分类号] R972.6

[文献标识码] A

Protection of Onychin on Injury of Endothelium – Dependent Relaxion Induced by Lysophosphatidylcholine

DUO Qin- Hui, HUANG Hong- Lin, XIE Zhi- Zhong, ZHENG Xing, and LIAO Duan- Fang

(The Institute of Pharmacy Pharmacology, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan, China)

MeSH Onychin; Endothelial cells; Lysophosphatidylcholine; Nitric Oxide; Prostacyclin

ABSTRACT **Aim** To study the protective effects of Onychin on vascular endothelium- dependent relaxation relaxation damage induced by lysophosphatidylcholine(LPC). **Methods** The vasorelaxation responseto acetylcholine(ACh) were investigation in the rabbit thoracic aorta; The LDH level in conditioned media of cultured endothelial cells was measured by DGKC assay.

Results On the rabbit aortic rings, Onychin alone did not have effect on relaxation response to ACh and on contraction response to phenylephrine. LPC 4 mg/L significantly attenuated the endothelium- dependent relaxation of rabbit aortic rings as shown by decreasing the relaxation percentage from 39.1 ± 10.1 , 67.1 ± 9.6 and 76.7 ± 10.0 to 2.1 ± 1.0 , 10.0 ± 3.9 and 16.1 ± 3.5 response to 0.1, 1.0 and 3.0 $\mu\text{mol/L}$ ACh, respectively; Pretreatment of onychin 3 $\mu\text{mol/L}$ for 10 min markedly increase the relaxation percentage to 14.6 ± 2.6 , 32.2 ± 2.8 , 42.1 ± 8.0 . The effect of Onychin was blocked by nitric oxide synthase inhibitor N^o- nitro- L- arginine(N- L- A) and prostacyclin synthetase inhibitor indomethacin (maximal relaxation percentage: 22.4 ± 7.2 , 24.8 ± 2.3 vs 42.1 ± 7.9 to ACh 3 $\mu\text{mol/L}$). Furthermore, Onychin obviously decreased LPC- induced LDH release of cultured endothelial cells as shown by lowering LDH level from 115.3 ± 19.3 to 30.8 ± 5.4 IU/L. Both N- L- A and indomethacin also inhibited the effect of onychin on LDH release. **Conclusion** Onychin protects the endothelium- dependent relaxation against elicited- LPC injury with a mechanism related to the activation of nitric oxide and prostacyclin.

近年研究表明银杏叶提取物中的黄酮类化合物有明显的抗氧化和清除自由基作用, 能阻滞氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-

LDL)的产生, 并通过释放一氧化氮使血管松弛和保护血管内皮, 对脑动脉硬化性疾病有满意的疗效^[1,2]。金粉蕨素(Onychin, Ony)是从湖南永洲采集到的中国蕨科(Sinopteraceae)金粉蕨属(Onychin Ching)栗柄金粉蕨(Onychin Incidum)植物中提取的新型二氢黄酮甙(flavanone glycoside), 该化合物7位取代基具有较大的空间位阻而3位碳原子及C环无取代, 对母核具有保护作用^[3]。其独特的结构决定

[基金项目] 卫生部资助课题(981345), 湖南省中医药科研基金重点课题(项目号 2000006), 湖南省教委资助课题(项目号 98B100)

[作者简介] 庹勤慧, 1974 年出生, 湖南常德市人, 在读硕士研究生。廖端芳, 1959 年出生, 湖南沅江市人, 教授, 湖南省学位委员会委员, 为本文通讯作者, E- mail: dfliao@hotmail.com。

其药理活性比同类化合物更稳定,我们推测金粉蕨素应比银杏叶提取物有更强的药理活性,更具有开发价值。为此,本文探讨了金粉蕨素对血管内皮依赖性舒张功能的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

苯肾上腺素(Phenylephrine, PE)、N-硝基-L-精氨酸(N^ω-nitro-L-arginine, N-L-A)、吲哚美辛(indomethacin, IND)购自Sigma公司, M199培养基为GIBCO USA产品,新生牛血清为杭州四季青生物工程研究所产品,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒为德国Entronic GmbH公司产品,金粉蕨素为本实验室提取(纯度>98%), 0.1 mol/L母液用二甲基亚砜(DMSO)溶解,依次用双蒸水稀释,二甲基亚砜最终浓度<0.01%。氯化乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)等为市售分析纯。

1.2 离体血管环的制备和舒张比值测定

参照本室所建方法^[4],取兔胸主动脉,剪成长约4 mm血管环,置于37℃克氏液中(5% CO₂, 95% O₂),取静息张力5 g平衡90 min,在苯肾上腺素(终浓度为1 μmol/L)预收缩的基础上,观察ACh(0.01、0.1、1、3 μmol/L)诱导的舒张百分比。然后冲洗3~5遍,再作如下分组处理: 正常对照组,继续平衡30 min; ④溶血性磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)损伤组,加入LPC(4 mg/L)孵育30 min; ④金粉蕨素组,加入金粉蕨素(3 μmol/L)孵育30 min(在预实验中,我们采用1 μmol/L、3 μmol/L、10 μmol/L、30 μmol/L和100 μmol/L不同浓度的金粉蕨素,发现3 μmol/L金粉蕨素的效应接近最大,10 μmol/L时效应达坪值,金粉蕨素>100 μmol/L时,作用消失,故本试验选用金粉蕨素浓度为3 μmol/L); 金粉蕨素保护组,在加入LPC前10 min加入金粉蕨素; N-L-A或吲哚美辛抑制组,分别加入N-L-A(100 μmol/L)或吲哚美辛(10 μmol/L)孵育10 min,再加入金粉蕨素孵育10 min,然后加入LPC(4 mg/L)孵育30 min。在上述各组继续用PE预收缩的基础上,观察ACh诱导的舒张百分比。

1.3 细胞培养液中乳酸脱氢酶测定

自武汉大学细胞馆藏中心购人脐静脉内皮细胞,待细胞生长融合后加入适量0.25%胰蛋白酶消化,并以5×10⁷个/L密度铺种于24孔板,24 h左右待内皮细胞融合后,作如下处理: 正常对照组,不加任何药物; ④LPC损伤组,每孔含LPC 30 mg/L;

④Ony+ LPC组,在加入LPC前10 min加入金粉蕨素(3 μmol/L); N-L-A或吲哚美辛抑制组,在加入LPC和金粉蕨素前10 min加入N-L-A(100 μmol/L)或吲哚美辛(10 μmol/L)。待LPC作用30 min后,取培养液按文献[5]应用HITACHI TIT全自动生化分析仪采用DGKC法测定LDH含量。

1.4 统计学处理

所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据经微电脑作 χ^2 检验或方差分析后进行t检验校正。

2 结果

2.1 金粉蕨素对血管环舒缩功能的直接作用

先用PE(1 μmol/L)预收缩血管环,用金粉蕨素替代ACh制备舒张效应曲线,发现不同浓度的金粉蕨素(10⁻⁷~10⁻³ mol/L)对血管环没有直接的舒张作用;用金粉蕨素替代PE收缩血管环,发现不同浓度的金粉蕨素(10⁻⁷~10⁻³ mol/L)对血管环也没有直接的收缩作用。

2.2 金粉蕨素对溶血性磷脂酰胆碱损伤主动脉舒张功能的影响

从图1(Figure 1)可见,血管环与LPC共同孵育30 min后,对ACh的舒张反应性明显降低。不同浓度的ACh(0.1、1、3 μmol/L)诱导的血管舒张百分比由正常时的39.1%±10.1%、67.1%±9.6%、76.7%±10.0%分别减少为2.1%±1.0%、10.0%±3.9%、16.1%±3.5%,加入金粉蕨素3 μmol/L,舒张百分比分别达14.6%±2.6%、32.2%±2.8%和42.1%±8.0%,说明金粉蕨素可对抗LPC导致的血管舒张功能损伤(表1, Table 1)。但在加入金粉蕨素前加入N-L-A(100 μmol/L)或吲哚美辛(10 μmol/L),最大舒张百分比分别下降到22.4%±7.2%和24.8%±2.3%(图2, Figure 2),说明金粉蕨素的保护作用可被N-L-A或吲哚美辛阻断。

表1 金粉蕨素对不同浓度乙酰胆碱(μmol/L)诱导的血管舒张功能的影响

Table 1 Protective effect of Onychin on different concentration ACh (μmol/L) induced relaxation of aorta in vitro ($\bar{x} \pm s$, %)

Groups	0.01	0.1	1	3
Control	5.3±0.3	39.1±10.1	67.1±9.6	76.7±10.0
LPC	2.12±0.1	2.12±1.0 ^a	10.0±3.9 ^a	16.1±3.5 ^a
Ony+ LPC	7.8±0.8	14.6±2.6 ^b	32.2±2.8 ^c	42.1±8.0 ^c

a: $P < 0.01$, compared with control group, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, compared with LPC group.

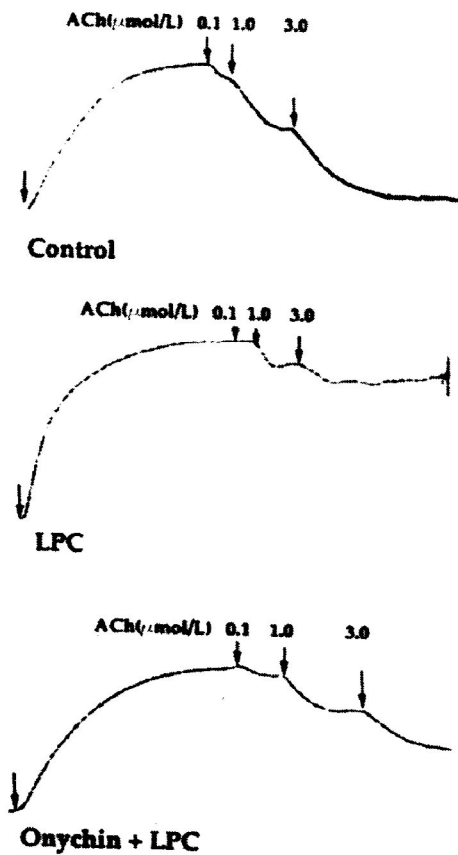


图1 金粉蕨素对溶血性磷脂酰胆碱抑制 ACh 诱导的血管舒张功能影响的原始曲线图

Figure 1 Original curves of ACh- induced relaxation of rabbit aortic ring in present of LPC or/ and Onychin

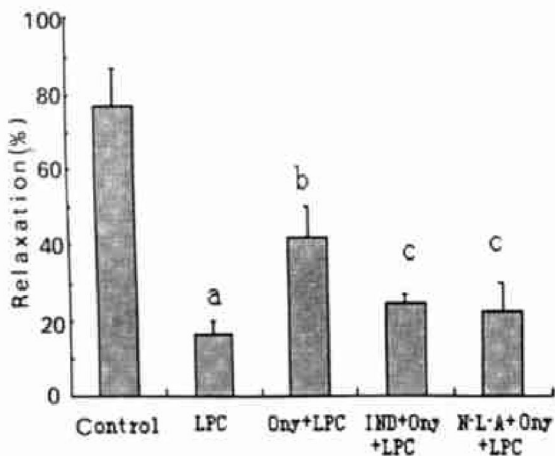


图2 金粉蕨素对血管最大舒张功能的影响与一氧化氮和前列环素的关系

Figure 2 The relation between Onychin and NO, PGI₂ on ACh- induced maximum relaxation of aorta in vitro($\bar{x} \pm s$).

a: $P < 0.05$, compared with control, b: $P < 0.01$, compared with LPC, c: $P < 0.01$, compared with Ony+ LPC

2.3 金粉蕨素对溶血性磷脂酰胆碱损伤内皮细胞的影响

培养人脐静脉内皮细胞与 LPC 作用 30 min 后, 其培养液中 LDH 含量明显增多, 由正常时的 44.8 ± 9.7 IU/L 升高到 115.3 ± 19.3 IU/L, 加入金粉蕨素使内皮细胞释放 LDH 减少为 30.8 ± 5.4 IU/L, 说明金粉蕨素能保护内皮细胞免受 LPC 损伤。N- L- A 和吲哚美辛同样可阻断金粉蕨素的保护作用 (表 2, Table 2)。

表2 金粉蕨素对内皮细胞释放乳酸脱氢酶的影响

Table 2 Effect of Onychin on LDH release of endothelial cell ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	LDH(IU/L)
Control	6	44.8 ± 9.7
LPC	8	115.3 ± 19.3 ^a
Ony+ LPC	8	30.8 ± 5.4 ^b
N- L- A+ Ony+ LPC	6	91.3 ± 27.6 ^c
IND+ Ony+ LPC	6	104.5 ± 15.7 ^c

a: $P < 0.05$, compared with control group, b: $P < 0.01$, compared with LPC group, c: $P < 0.01$, compared with Ony+ LPC group.

3 讨论

金粉蕨素是我室从蕨科金粉蕨属栗柄金粉蕨植物中提取、分离的新型二氢黄酮甙单体化合物, 初步研究显示金粉蕨素具有较强心血管药理活性, 可抑制大鼠心肌缺血/再灌注损伤和抑制高脂性新西兰兔动脉粥样硬化的形成(论文另发), 经与黄酮类化学结构及药理作用机制比较, 我们推测金粉蕨素的心血管药理作用可能与其保护血管内皮功能有关。本研究采用离体血管环和培养内皮细胞, 发现金粉蕨素确实能明显对抗 LPC 造成的血管舒张功能损伤, 保护 ACh 诱导的血管内皮依赖性舒张, 降低内皮细胞乳酸脱氢酶的释放。

一氧化氮(nitric oxide, NO) 和前列环素(prostacyclin, PGI₂) 是内皮细胞合成释放的重要舒血管活性物质, 二者既是反应内皮细胞功能的重要指标, 又是内皮细胞自我抗损伤的内源性保护因子, 二者均具有消除氧自由基和抗氧化损伤的功能^[6,7]。金粉蕨素能明显对抗 LPC(ox- LDL 的主要成分) 所诱导的血管内皮依赖性舒张功能的降低, 且这一作用可被一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS) 抑制剂 N- L- A 和环氧酶抑制剂吲哚美辛所阻断, 提示金粉蕨素的作用与其保护血管内皮释放小分子活性物质 NO 和 PGI₂ 有关。为了进一步证实金粉蕨素保护血

管内皮的作用,我们采用培养的血管内皮细胞 LPC 损伤模型,观察到金粉蕨素可明显对抗 LPC 所致的内皮细胞乳酸脱氢酶释放增加,同样用 N- L- A 和吲哚美辛预先抑制一氧化氮合酶和 PGI₂ 合成酶可阻断金粉蕨素的保护作用。初步说明 NO/NOS 和 PGI₂/ 环氧化酶两条途径均参与金粉蕨素的血管内皮保护作用。文献[8~ 10] 报道上述两条途径分别由 cGMP 和 cAMP 介导,同时又存在互相作用,金粉蕨素调节这两条信号通路的详细机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Maitra I, Marcocci L, Droy- Lefaix MT, et al. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761 [J]. *Biochem Pharmacol*, 1995, **49**(11): 1 649- 653
- [2] Kanowski S, Hermann WM, Stephan K, et al. Proof of efficacy of the Ginkgo bioba special extract in outpatients sufering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi- infact dementia [J]. *Pharmacopsychiatra*, 1996, **29** (1): 47
- [3] Yunlong X, Isao K, Yunbao M. A cytotoxic flavanone glycoside from *Onychium japonicum*: Structure of Onychin [J]. *Phytochemistry*, 1993, **33**(2): 510- 518
- [4] Chen JX, Chen WZ, Huang HL, et al. Protective effects of Ginkgo biloba extract against lysophosphatidylcholine- induced vascular endothelial cell damage [J]. *中国药理学报*, 1998, **19**(4): 359- 363
- [5] Werns GA. Proposal of standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37 degrees CIV lacatate dehydrogenase (L- Lactate: NAD+ oxidoreductase, EC1. 1. 1. 27) [J]. *Eur JU Chin Chem Chin Biochem*, 1992, **30**: 787- 792
- [6] Liao DF, Chen X. Prostacyclin- mediated protection by angiotensin- converting enzme inhibitors against iniurv of aortic endothelium by free radicals [J]. *Cardioscience*, 1992, **3**(2): 79- 84
- [7] 廖端芳, 陈剑雄, 黄红林, 等. 丙丁酚对自由基损伤内皮细胞的保护作用与一氧化氮的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1994, **2**: 67- 71
- [8] Bobadilla, Lugo RA. Prostaglandin and nitric oxide interactions in rat aorta [J]. *Proc West Pharmacol Soc*, 1998, **41**: 91- 92
- [9] Minhas S, Eardley I, Joyce AD, et al. The effect of cyclic GMP on rabbit corporal smooth muscle tone and its modulation by cyclo- oxygenase products [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acias*, 2000, **62**(3): 153- 160
- [10] Nakajing M. Aging decrease the production of PGI₂ in rat aortic endothelial cells [J]. *Exp Gerontol*, 1997, **32**(6): 685- 693
- (此文 2000- 09- 30 收到, 2001- 02- 25 修回)
(此文编辑 朱雯霞)

·消息·

中国病理生理学会 2001 年学术活动计划

会议名称	时间	地点	负责人、联系人及地址
1. 炎症发热感染低温专业委员会第八次学术交流	8 月	成都	陆大祥, 广州暨南大学(510632)
2. 中医病理生理专业委员会第八次学术会议	8 月	成都	黄启福, 北京中医药大学(100029)
3. 第三届海峡两岸心血管科学研讨会 (中国病理生理、生理、药理学会, 中华医学会和高血压同盟联合主办)	9 月	庐山	孙 瑛, 中国医科院基础所(100005)
4. 第二届国际缺氧和肺部疾病病理生理会议	9 月	重庆	高钰琪, 第三军医大学病生教研室(400038)
5. 第二届中日国际病理生理学术会议	9 月	待定	唐佩弦, 军事医学科学院基础所(100850); 吴立玲, 北京大学医学部生理和病理生理室(100083)
6. 中专教育委员会第八次学术会议	10 月	武汉	武汉卫生学校(430030)
7. 第八届肿瘤专业委员会学术会议	10 月	大连	钱振超, 大连医科大学病生教研室(116027)
8. 第八届休克专业委员会学术会议	10 月	重庆	金春华, 第一军医大学病生教研室(510515)
9. 全国心血管临床基础会议	12 月	北京	李小鹰, 解放军总医院(100853)
10. 动脉硬化专业委员会学术会议	7 月	烟台威海	胡维诚, 山东医科大学病生教研室(250012)