

汉黄芩素增强乙酰胆碱对大鼠胸主动脉血管的舒张作用研究

瞿晶田¹, 王家龙^{2*}, 邓震亭¹, 王玉明³, 张冬璇⁴

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381

2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053

3. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193

4. 中国人民解放军第254医院, 天津 300142

摘要:目的 探讨汉黄芩素增强乙酰胆碱对大鼠胸主动脉血管的舒张作用及其作用机制。方法 实验分为对照组和加药组, 加药组使用含有不同浓度汉黄芩素的 DMEM/F12 培养基作用; 对照组使用含有与加药组相同体积二甲基亚砜(DMSO)的 DMEM/F12 培养基作用。汉黄芩素孵育大鼠心脏微血管内皮细胞 24 h, MTT 法检测细胞活力; 硝酸还原酶法检测细胞上清 NO 含量; ELISA 法检测细胞内皮型一氧化氮合酶(eNOS)蛋白表达。汉黄芩素孵育大鼠胸主动脉环 24 h, 去甲肾上腺素(1×10^{-6} mol/L)收缩血管后应用乙酰胆碱(1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L)舒张血管, 检测血管张力变化。结果 与对照组比较, 汉黄芩素处理细胞后, 各组细胞活力没有显著变化。与对照组比较, 汉黄芩素(5、20 μ mol/L)显著促进 NO 的产生($P < 0.01$), 但亚硝基左旋精氨酸甲酯(L-NAME)可以抑制汉黄芩素的这种作用($P < 0.01$)。汉黄芩素(0.5、5、20 μ mol/L)可以浓度相关性地促进心脏微血管内皮细胞 eNOS 蛋白表达, 与对照组比较, 汉黄芩素产生的 eNOS 蛋白水平差异非常显著($P < 0.01$)。乙酰胆碱(1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L)能够浓度相关性地舒张离体大鼠胸主动脉环。与对照组比较, 汉黄芩素(20 μ mol/L)孵育血管 24 h, 能显著增加乙酰胆碱对大鼠胸主动脉血管环的舒张程度, 降低胸主动脉血管环的收缩率($P < 0.01$ 、0.05)。结论 汉黄芩素可能通过促进血管内皮细胞 eNOS 蛋白表达和 NO 产生这一途径增强乙酰胆碱对血管的舒张作用。

关键词: 汉黄芩素; 血管舒张; 一氧化氮; 心脏微血管内皮细胞; 乙酰胆碱

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)01-0011-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.01.003

Vasodilation of thoracic aorta in rats of wogonin by enhancement of acetylcholine

QU Jing-tian¹, WANG Jia-long², DENG Zhen-ting¹, WANG Yu-ming³, ZHANG Dong-xuan⁴

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

3. College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

4. Chinese PLA No. 254 Hospital, Tianjin 300142, China

Abstract: Objective To study the effect of wogonin induced by acetylcholine on the vasodilation of rat thoracic aorta and explore its mechanism. **Method** The experiments were divided into control group and medication group. The medication group was treated with DMEM/F12 medium containing different concentrations of wogonin, while the control group was treated with DMEM/F12 medium containing the same volume of DMSO as the medication group. Rat cardiac microvascular endothelial cells were incubated with wogonin treated for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay, NO content was measured by nitrate reductase assay, and eNOS protein expression was detected by ELISA method. The thoracic aortic rings of rats were incubated with wogonin treated for 24 h, NE (1×10^{-6} mol/L) was used to constrict blood vessels, and the acetylcholine (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , and 1×10^{-5} mol/L) was used to relax blood vessels to detect the changes of vascular tension. **Results** Compared with the control group, there was no significant changes of the cell viability in each group after treatment with wogonin. Compared with the control group, wogonin (5, 20

收稿日期: 2018-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81603648, 81803829)

作者简介: 瞿晶田, 男, 硕士, 从事中药临床药学研究。E-mail: 285045073@qq.com

*通信作者 王家龙, 男, 硕士, 从事中药药理与代谢研究。E-mail: footprintprint66@163.com

$\mu\text{mol/L}$) significantly promoted NO production ($P < 0.01$), but L-NAME could inhibit the effect of wogonin ($P < 0.01$). Wogonin (0.5, 5, 20 $\mu\text{mol/L}$) could promote eNOS protein expression in cardiac microvascular endothelial cells in a concentration-dependent manner. Compared with the control group, the level of eNOS protein produced by wogonin was significantly different ($P < 0.01$). Acetylcholine (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , and 1×10^{-5} mol/L) could dilate isolated rat thoracic aortic rings in a concentration-dependent manner. Compared with the control group, wogonin (20 $\mu\text{mol/L}$) incubated for 24 h significantly increased the relaxation of the thoracic aortic rings and decreased the contraction rate of the thoracic aortic rings in rats ($P < 0.01$, 0.05). **Conclusion** Wogonin may enhance vasodilation of acetylcholine by promoting expression of eNOS protein and NO production in vascular endothelial cells. **Key words:** wogonin; vasodilation; NO; cardiac microvascular endothelial cell; acetylcholine

汉黄芩素是一种存在于多种天然植物中的黄酮类成分, 具有广泛的心血管保护作用, 对动脉粥样硬化、血管炎、血栓等疾病具有潜在的治疗作用^[1-4]。安全性评价证明汉黄芩素具有很高的安全性^[5]。本课题组前期研究发现汉黄芩素具有快速的舒张血管作用, 其作用机制可能与抑制血管平滑肌细胞外钙内流和内钙释放相关^[6]。汉黄芩素还具有修复 H_2O_2 所致内皮细胞损伤的作用^[7]。因此汉黄芩素对血管舒缩的调控作用仍然需要更加深入的研究。本研究以大鼠心脏微血管内皮细胞和胸主动脉环为研究对象, 探讨汉黄芩素的血管舒张活性, 并考察了其发挥作用的可能机制。

1 仪器与材料

DMEM/F12 培养基 (货号 SH30023) 购于 Hyclone 公司; MTT 增殖毒性试剂盒 (货号 G020-1)、一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (货号 A012) 购于南京建成生物工程研究所; 大鼠内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) ELISA 检测试剂盒 (货号 Im-E30338) 购于上海康朗生物科技有限公司。

汉黄芩素购于天津万象恒远科技有限公司 (质量分数 > 98%; 批号 20181078); 去甲肾上腺素 (货号 N109573)、乙酰胆碱 (货号 A111014) 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 胎牛血清 (货号 10099-141) 购于 Gibco 公司; 一氧化氮合酶抑制剂亚硝基左旋精氨酸甲酯 (L-NAME) (货号 IL0320) 购于北京索莱宝科技有限公司。

3~4 周龄 SD 大鼠, 购于北京斯贝福生物技术有限公司, 动物使用许可证号 SCXK(京)2016-002。

2 方法

2.1 细胞培养

取 3~4 周龄 SD 大鼠, 断颈处死, 打开胸腔, 取出心脏, 剪下心脏左心室, 将左心室剪碎成 1 mm^3 碎块, 组织碎块经 PBS 清洗后放入离心管, 加入消化液, 37°C 水浴摇床消化 1 h; 再加入等体积 0.1% 胰酶消化 10 min; 加入 FBS 终止胰酶反应, 吸管轻

轻吹打至液体浑浊; 消化液经 100 目细胞筛滤过, 滤液离心 5 min, 弃上清, 保留细胞沉淀。用培养基重悬细胞, 接种于培养皿中。于 37°C , 5% CO_2 恒温培养箱中静置培养, 24 h 后更换新鲜培养基, 以后每 3 天换液 1 次, 细胞长满后待用。细胞经 CD31/vWF 免疫荧光鉴定, 纯度可达 90% 以上。细胞实验所用培养基为 DMEM/F12, 加入体积分数为 10% 的胎牛血清、1% 的青链霉素。细胞融合至 80%~90% 时进行传代。

2.2 分组

实验分为加药组和对照组, 加药组使用含有不同浓度汉黄芩素的 DMEM/F12 培养基作用细胞; 对照组使用含有与加药组相同体积的二甲基亚砜 (DMSO) 的 DMEM/F12 培养基作用细胞。

2.3 MTT 法检测细胞活力

取生长状态良好的心脏微血管内皮细胞, 并以 1×10^5 /孔将细胞接种于 96 孔板内。使用含有不同浓度 (1、5、10、50 $\mu\text{mol/L}$) 汉黄芩素的培养基作用细胞 24 h 后, 采用 MTT 法对细胞活力进行检测, 酶联免疫检测仪在 590 nm 下测定吸光度值。通过比较细胞活力的变化判断浓度范围内药物对细胞的毒性, 以选择合适给药浓度进行后续实验。

2.4 硝酸还原酶法检测 NO

以 1×10^6 /孔将细胞接种于 96 孔板内, 使用含有 0.5、5、20 $\mu\text{mol/L}$ 汉黄芩素的培养基作用细胞 24 h 后, 采用硝酸还原酶法对各组细胞培养上清液中 NO 进行检测。检测步骤按试剂盒说明书进行, 酶联免疫检测仪在 550 nm 下测定吸光度值。另外 L-NAME 组另加入 L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$)^[8] 以考察对 NO 产生的抑制作用。

2.5 ELISA 法检测 eNOS 蛋白

以 1×10^6 /孔将细胞接种于 96 孔板内, 使用含有不同浓度 (0.5、5、20 $\mu\text{mol/L}$) 汉黄芩素的培养基作用细胞 24 h 后, 采用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 法对各组细胞 eNOS 蛋白表达进行检测。

检测步骤按试剂盒说明书进行,酶联免疫检测仪在450 nm下测定吸光度值。

2.6 大鼠胸主动脉环张力检测

断头处死大鼠,迅速开胸,无菌条件下,分离剪取胸主动脉,小心去除血管周围结缔组织,剪成4 mm的血管环。各组血管环使用20 $\mu\text{mol/L}$ 汉黄芩素孵育24 h,悬挂于Radnoti组织器官灌流系统,应用Maclab AID生物记录软件对血管张力进行检测。各组基础张力为2.0 g,动脉环稳定不小于90 min。平衡后各组加入1 $\mu\text{mol/L}$ 去甲肾上腺素刺激血管收缩,然后加入累积浓度的 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L乙酰胆碱舒张血管。Krebs试液的组成:NaCl 118 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, MgSO_4 1.2 mmol/L, KH_2PO_4 1.2 mmol/L, NaHCO_3 25 mmol/L, CaCl_2 1.3 mmol/L, D-葡萄糖 10 mmol/L。

2.7 统计学方法

各组数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件进行统计分析,两组之间比较用 t 检验。

3 结果

3.1 汉黄芩素对大鼠心脏微血管内皮细胞活力的影响

与对照组比较,汉黄芩素处理细胞后,各组细胞活力没有显著变化,提示汉黄芩素对大鼠心脏微血管内皮细胞活力无影响,见表1。

表1 汉黄芩素对大鼠心脏微血管内皮细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 1 Effect of wogonin on viability of rat cardiac microvascular endothelial cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	浓度/($\mu\text{mol L}^{-1}$)	细胞活力/%
对照	—	100.00 $\pm$ 0.79
汉黄芩素	1	99.41 $\pm$ 0.09
	5	98.62 $\pm$ 0.35
	10	98.22 $\pm$ 0.23
	50	97.71 $\pm$ 0.25

3.2 汉黄芩素对心脏微血管内皮细胞NO的影响

汉黄芩素(0.5、5、20 $\mu\text{mol/L}$)孵育心脏微血管内皮细胞24 h后,可以浓度相关性地促进心脏微血管内皮细胞NO的产生。与对照组比较,汉黄芩素(5、20 $\mu\text{mol/L}$)显著促进NO的产生,差异非常显著($P<0.01$),但L-NAME可以抑制汉黄芩素的这种作用($P<0.01$),见表2。

表2 汉黄芩素对大鼠心脏微血管内皮细胞NO产生的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 2 Effect of wogonin on NO in rat cardiac microvascular endothelial cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	NO/($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
		无L-NAME	L-NAME
对照	—	39.89 $\pm$ 2.07	37.23 $\pm$ 1.52
汉黄芩素	0.5	40.73 $\pm$ 2.81	39.29 $\pm$ 1.76
	5	52.43 $\pm$ 4.17**	40.46 $\pm$ 2.13##
	20	55.91 $\pm$ 6.02**	40.84 $\pm$ 3.12##

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与同一剂量无L-NAME组比较:

$P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs no added L-NAME group at the same concentration

3.3 汉黄芩素对心脏微血管内皮细胞eNOS蛋白表达的影响

汉黄芩素(0.5、5、20 $\mu\text{mol/L}$)可以浓度相关性地促进心脏微血管内皮细胞eNOS蛋白的表达,与对照组比较,汉黄芩素产生的eNOS蛋白水平差异非常显著($P<0.01$),见表3。

表3 汉黄芩素对大鼠心脏微血管内皮细胞eNOS蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 3 Effect of wogonin on eNOS protein expression in rat cardiac microvascular endothelial cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	浓度/($\mu\text{mol L}^{-1}$)	eNOS蛋白/(ng L^{-1})
对照	—	409.38 $\pm$ 5.67
汉黄芩素	0.5	460.63 $\pm$ 9.00**
	5	495.49 $\pm$ 7.97**
	20	525.34 $\pm$ 9.81**

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

3.4 汉黄芩素对乙酰胆碱舒张血管作用的影响

乙酰胆碱(1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L)能够浓度相关性地舒张离体大鼠胸主动脉环。与对照组比较,汉黄芩素(20 $\mu\text{mol/L}$)孵育血管24 h能显著增加乙酰胆碱对大鼠胸主动脉血管环的舒张程度,降低胸主动脉血管环的收缩率($P<0.01$ 、 0.05),见表4。

4 讨论

本研究发现汉黄芩素孵育心脏微血管内皮细胞24 h,可以浓度相关性地促进心脏微血管内皮细胞NO的产生和eNOS蛋白的表达。大鼠胸主动脉血

表4 汉黄芩素对乙酰胆碱舒张血管作用的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)Table 4 Effects of wogonin on acetylcholine-induced vasorelaxation in rat endothelium-denuded aortic rings ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	剂量/($\mu\text{mol L}^{-1}$)	血管张力收缩率/%			
		1×10^{-8} mol/L 乙酰胆碱	1×10^{-7} mol/L 乙酰胆碱	1×10^{-6} mol/L 乙酰胆碱	1×10^{-5} mol/L 乙酰胆碱
对照	—	100.87 ± 0.98	96.73 ± 0.53	75.98 ± 9.48	59.63 ± 6.45
汉黄芩素	20	$95.91 \pm 1.31^{**}$	$84.66 \pm 5.90^*$	$56.73 \pm 8.46^*$	$46.25 \pm 8.23^*$

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

管环实验研究显示, 汉黄芩素具有增强乙酰胆碱舒张血管的作用。一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 能够抑制汉黄芩素促 NO 产生的作用。

血管内皮细胞产生和释放的 NO 对血管张力的调控具有重要作用。从内皮释放的 NO 作用于血管平滑肌细胞, 使血管平滑肌细胞内 cGMP 含量增加, 被激活的 cGMP 相关性蛋白激酶可以开放相关钾离子通道, 诱导血管平滑肌细胞的超极化, 进而抑制电压依赖型钙离子通道的开放, 发挥对血管的舒张作用。L-NAME 为非选择性一氧化氮合酶抑制剂, 能够抑制 NO 的产生^[9]。本研究发现汉黄芩素可以促进心脏微血管内皮细胞 NO 产生和 eNOS 蛋白的表达, 具有增强乙酰胆碱舒张大鼠胸主动脉血管的作用, 并且一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 能够抑制汉黄芩素促 NO 产生的作用, 但其发挥作用的具体分子机制仍需要进一步研究。

研究表明汉黄芩素能够剂量相关性地激活雌激素受体 ER α 和 ER β ; 使用人脐静脉细胞融合细胞 EA.hy926 研究发现, 其具有促进 ER α 基因和蛋白表达的作用, 且可通过雌激素受体 ER α 可促进细胞 NO 的产生^[10]。那么汉黄芩素是否能够通过雌激素受体促进心脏微血管内皮细胞 NO 产生和 eNOS 蛋白表达, 发挥舒张离体胸主动脉血管的作用, 以及其发挥作用的具体分子机制如何, 需要更加深入的研究。

综上所述, 汉黄芩素可能通过促进血管内皮细胞 eNOS 蛋白表达和 NO 产生这一途径增强乙酰胆碱对血管的舒张作用。

参考文献

[1] Wang J, Li K, Li Y, et al. Mediating macrophage

immunity with wogonin in mice with vascular inflammation [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8434-8440.

[2] Huang Y, Luo X, Li X, et al. Wogonin inhibits LPS-induced vascular permeability via suppressing MLCK/MLC pathway [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015(72): 43-52.

[3] Lee W, Ku S K, Bae J S. Anti-inflammatory effects of baicalin, baicalein, and wogonin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 110-125.

[4] Ku S K, Bae J S. Antithrombotic activities of wogonin and wogonoside via inhibiting platelet aggregation [J]. *Fitoterapia*, 2014(98): 27-35.

[5] Qi Q, Peng J, Liu W, et al. Toxicological studies of wogonin in experimental animals [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(3): 417-422.

[6] Qu J T, Zhang D X, Liu F, et al. Vasodilatory effect of wogonin on the rat aorta and its mechanism study [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(12): 1873-1878.

[7] Akinyi M, Gao X M, Li Y H, et al. Vascular relaxation induced by eucommiae ulmoides Oliv. and its compounds oroxylin A and wogonin: implications on their cytoprotection action [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(10): 3164-3180.

[8] 薛瑾, 屈会化, 赵琰, 等. 三草降压汤含药血清对人脐静脉内皮细胞活性及 NO 分泌的影响 [J]. *中医学报*, 2014, 29(6): 763-765.

[9] 杨宝林, 伍校琼, 罗明英, 等. L-NAME 对人脐静脉内皮细胞 VE-cadherin 表达的影响 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2012, 30(4): 412-416.

[10] Oche B, Chen L, Ma Y K, et al. Cryptotanshinone and wogonin up-regulate eNOS in vascular endothelial cells via ER α and down-regulate iNOS in LPS stimulated vascular smooth muscle cells via Er β [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(2): 249-258.