

二苯乙烯苷对同型半胱氨酸诱导的血管功能损伤的保护作用

秦巧红 张欣 贾敏

西安医学院基础与转化医学研究所

DOI:10.12238/jrm.v1i2.11489

[摘要] 目的：观察二苯乙烯苷对同型半胱氨酸诱导的血管损伤的保护作用。方法：采用离体器官段培养方法，以同型半胱氨酸和不同浓度的二苯乙烯苷共同处理血管段，用DMT Myograph动描计系统记录在K⁺、PE、5-HT缩血管物质的刺激下离体血管张力的变化；建立高同型半胱氨酸血症(HHcy)小鼠动物模型，随机分为对照组、HHcy模型组、二苯乙烯苷低剂量组(40mg/kg)、二苯乙烯苷中剂量组(80mg/kg)、二苯乙烯苷高剂量组(160mg/kg)共5组。治疗结束后，ELISA法检测血中Ang II、AD、NE、5-HT水平；病理组织学检查各组小鼠主动脉和微动脉血管形态结构、血管平滑肌纤维及胶原蛋白沉积情况。结果：不同浓度的二苯乙烯苷可显著抑制体外培养的血管平滑肌对缩血管物质的敏感性；二苯乙烯苷可降低HHcy模型小鼠血中Ang II的水平；二苯乙烯苷给药后，模型组小鼠主动脉、微动脉血管胶原纤维沉积减少，微动脉血管的弹力纤维增加。结论：二苯乙烯苷可降低Hcy引起血管平滑肌对缩血管物质的敏感性，抑制此类物质对血管的收缩作用，降低HHcy模型小鼠Ang II水平，还可改善HHcy引起的微动脉损伤，且其对微动脉的保护作用明显强于输送血管。

[关键词] 二苯乙烯苷；同型半胱氨酸；血管平滑肌；血管损伤

中图分类号：R541.6 **文献标识码：**A

Protective Effects of Stilbene Glycoside on Vascular Dysfunction Induced by Homocysteine

Qiaohong Qin Xin Zhang Min Jia

Institute of Basic and Translational Medicine, Xi'an Medical College

[Abstract] Objective: To investigate the protective effects of stilbene glycoside on vascular damage induced by homocysteine. Methods: Ex vivo organ segment culture method was adopted, where blood vessel segments were co-treated with homocysteine and various concentrations of stilbene glycoside. The DMT Myograph system was used to record changes in ex vivo vascular tension stimulated by vasoconstrictors such as K⁺, PE, and 5-HT. A mouse model of hyperhomocysteinemia (HHcy) was established and randomly divided into five groups: control group, HHcy model group, low-dose stilbene glycoside group (40 mg/kg), medium-dose stilbene glycoside group (80 mg/kg), and high-dose stilbene glycoside group (160 mg/kg). After treatment, ELISA was used to detect blood levels of Ang II, AD, NE, and 5-HT. Histopathological examination was performed to assess the morphological structure of aortic and arteriolar blood vessels, as well as the deposition of vascular smooth muscle fibers and collagen protein in each group. Results: Stilbene glycoside at different concentrations significantly inhibited the sensitivity of vascular smooth muscle cells to vasoconstrictors in vitro. It also reduced Ang II levels in the blood of HHcy model mice. After administration of stilbene glycoside, collagen fiber deposition decreased in the aorta and arterioles of model mice, while elastic fibers increased in arterioles. Conclusion: Stilbene glycoside can reduce the sensitivity of vascular smooth muscle to vasoconstrictors induced by Hcy, inhibit the vasoconstrictive effects of such substances, and lower Ang II levels in HHcy model mice. Additionally, it can improve microarterial damage caused by HHcy, with a significantly stronger protective effect on microarteries compared to larger blood vessels.

[Key words] Stilbene glycoside; Homocysteine; Vascular smooth muscle; Vascular injury

人血浆中同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)正常浓度为 $5\sim 10\mu\text{mol/L}$, 当血中 $\text{Hcy}\geq 15\mu\text{mol/L}$ 时可被诊断为高同型半胱氨酸血症(Hyperhomocysteinemia, HHcy)^[1]。HHcy主要是因为参与Hcy、维生素B12及叶酸代谢的酶缺乏, 患者表现为智力低下、骨质疏松、血管损伤和其他并发症^[2]。目前有研究表明, HHcy是许多心脑血管疾病发生发展的独立危险因素, 包括中风、血管性痴呆^[3-4], 冠状动脉粥样硬化、高血压、缺血性心血管疾病^[5]等。目前, 临床常用的治疗手段是补充叶酸, 或合用B族维生素^[6], 但是近年来对其临床使用的效果备有争议^[7]。因此, 寻找新的治疗HHcy的药物, 特别是同时具有保护Hcy诱导的血管功能损伤作用的药物具有必要性。二苯乙烯苷(2, 3, 5, 4'-tetrahydroxysilbene-2-O- β -D-glucoside, TSG)是中药何首乌中的标志性有效组分, 其在以往的研究中表现出很好的抗炎抗氧化、保护血管内皮细胞、抑制血管平滑肌细胞的表型转化、抗血小板聚集、抗动脉粥样硬化、降血压等药理活性^[8-13], 但二苯乙烯苷对同型半胱氨酸诱导的血管功能损伤是否有保护作用却没有明确的研究。本文中, 我们基于高同型半胱氨酸血症小鼠模型, 探讨了二苯乙烯苷对同型半胱氨酸诱发血管损伤的保护作用, 以进一步挖掘二苯乙烯苷的血管保护功能药理活性。

1 材料与仪器

1.1 实验药物及试剂

二苯乙烯苷(由空军军医大学药理学系提供, 纯度 $\geq 98\%$, 批号: 20150412); 苯肾上腺素(Phenylephrine, PE)(批号: MKBR 1565V)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)(批号: 091M516 3V)、乙酰胆碱(Acetylcholine, Ach)(批号: BCBG2401V)、DL-同型半胱氨酸(DL-Homocysteine, DL-Hcy)(批号: BCBR8252V), 均购自美国Sigma公司; 氯化钾(Potassium chloride, KCl)(批号: F20170519), 购自国药集团化学试剂有限公司; 青链霉素双抗(批号: J180017)、DMEM/High Glucose培养基(批号: AE29422280), 曲拉通(Triton X-100)(批号: 20160612)均购自美国Gibco公司; Mouse Adrenaline ELISA Kit(批号: 201609SW06MMC)、Mouse Norepinephrine ELISA Kit盒(批号: 201608SW28MHQ)、Mouse 5-HT ELISA Kit(批号: 201608SW29MLJ)、Mouse Ang II ELISA Kit(批号: 201609SW04MUP)均购自上海鑫乐生物科技有限公司。

1.2 实验动物

Sprague-Dawley大鼠, 雄性280g~320g, 购自西安交通大学实验动物中心[SCXK(陕)2012-003]; C57BL/6小鼠, 雄性18g~22g, 购自空军军医大学实验动物中心[SCXK(军)2012-0007]。所有试验用动物饲养于西安医学院实验动物中心, 给予普通动物饲料, 自由饮水, 12小时明/暗交替、控制湿度40%~70%、室温19~26℃、换气次数10~20次/小时、噪音 ≤ 60 分贝。所有涉动物的实验均经西安医学院伦理委员会审核批准(XYLS2018085)。

1.3 仪器

Mygraph微血管张力检测仪(丹麦DMT620M); 二氧化碳细胞培养箱(美国Thermoscientific); 生理记录仪(澳大利亚Adinstruments Power Lab); 倒置相差显微镜、体视解剖显微

镜(日本奥林巴斯); 石蜡切片机(德国徕卡); 酶标仪(美国通用); 台式低温冷冻离心机(德国Eppendorf)。

2 方法

2.1 离体血管培养

SD大鼠CO₂窒息法处死动物, 解剖镜无菌操作取肠系膜, 从动脉血管起始用1mL无菌注射器端注入0.1%的Triton X-100冲洗管腔, 以便去除血管内皮细胞, 将肠系膜上动脉分离取出后剪成1~1.5mm血管段, 无菌条件下置于冰上。培养条件: 24孔板内加入DMEM培养基及配制好的二苯乙烯苷无菌母液(计算其终浓度分别为0mol/L, 10^{-4} mol/L, $10^{-3.5}$ mol/L, 10^{-3} mol/L), 同时每孔再加入Hcy母液(终浓度为100 $\mu\text{mol/L}$), 另设空白对照组。每孔三段血管, 每组设4复孔。37℃、5%CO₂细胞培养箱中孵育24小时后收集血管段, 进行后续指标检测。

2.2 血管张力检测

PSS缓冲液加入5mL槽中, 持续通气, 预热至37℃。将2.1方法孵育的血管段套在浴槽中的L形的钢针上, 开始持续记录血管段张力。以依次0.5毫牛顿(mN)步进的方式调整预张力至2.0mN, 稳定2h后, 用含60mmol/LKCl的KPSS缓冲液检验血管活性, 两次血管收缩值均超过2.0mN可用于后续实验。从低浓度开始, 以累加法将KCl、PE、5-HT依次加入浴槽, 记录血管段收缩的幅值, 每一浓度下当收缩曲线达最高效能后才可加入下一浓度。

2.3 建立小鼠HHcy模型

C57bl/6雄性小鼠50只, 体质量16~20g, 随机分组, 每组10只。①对照组: 按0.1mL/10g灌胃给予蒸馏水; ②HHcy模型组: 一天两次皮下注射DL-Hcy(1.2mmol/kg); ③HHcy+二苯乙烯苷1组: 二苯乙烯苷40mg/kg灌胃; ④HHcy+二苯乙烯苷2组: 二苯乙烯苷80mg/kg灌胃; ⑤HHcy+二苯乙烯苷3组: 二苯乙烯苷160mg/kg灌胃, 连续处理28天^[17], 实验期间给予实验动物普通饮食及自由饮水。依据文献报道, 所造HHcy小鼠模型血浆Hcy水平类似于人类严重HHcy^[14-15]。

2.4 酶联免疫吸附实验(ELISA)

给药结束后, 各组小鼠眶后静脉丛取血, 肝素抗凝, 1800rpm离心15分钟, 取上清。ELISA法检测肾上腺素(Adrenaline, AD)、去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)、5-羟色胺(5-HT)、血管紧张素II(Ang II)水平。

2.5 主动脉及肠系膜上动脉组织形态学评价

2.5.1 HE染色

取各小鼠主动脉和肠系膜上动脉, 4%多聚甲醛固定24h后, 常规石蜡包埋切片, HE染色。胞核染色呈蓝色, 胞质染色呈红色。倒置显微镜下观察组织形态、采集图像、分析。

2.5.2 masson染色

取各小鼠主动脉和肠系膜上动脉, 4%多聚甲醛固定24h。常规石蜡包埋后切片, masson染色。胶原纤维染色呈蓝色; 肌纤维染色呈红色; 胞核染色呈蓝黑色。倒置显微镜下观察组织形态、采集图像、分析。

2.5.3 间苯二酚品红染色

取各小鼠主动脉和肠系膜上动脉, 4%多聚甲醛固定24h。常规石蜡包埋切片, 间苯二酚品红染色。弹力纤维染色呈紫红色, 胶原纤维染色呈红色, 背景染色呈黄色。倒置显微镜下观察组织形态、采集图像、分析。

2.6 统计学分析

采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)对实验数据进行统计, 采用单因素样本方差分析结合Dunnett's进行统计学分析, $P < 0.05$ 具有统计学差异。用SPSS 20.0统计软件进行分析。

3 结果

3.1 二苯乙烯苷对Hcy诱发的血管平滑肌收缩的抑制作用

Hcy可增加血管平滑肌对KCl、PE及5-HT的敏感性($P < 0.01$, 见图1A、B、C蓝线), 二苯乙烯苷可显著抑制Hcy诱发的血管平滑肌对上述缩血管物质的高敏感性, 表现出舒血管作用($P < 0.01$, 见图1A、B、C彩色线)。这提示, 二苯乙烯苷对Hcy诱发的血管收缩有明显的舒张作用。

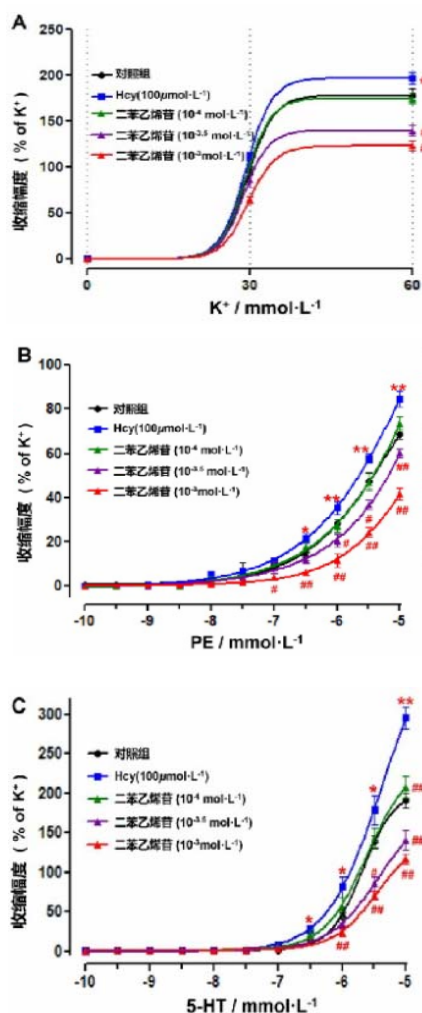


图1 二苯乙烯苷对Hcy诱发的血管平滑肌收缩的抑制作用
($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

注: 与对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与Hcy组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

3.2 二苯乙烯苷对HHcy小鼠血中缩血管物质水平的影响

HHcy模型组小鼠血中Ang II水平显著升高($P < 0.01$, 见图2A), 而AD水平却明显下降($P < 0.01$, 图2B), 对NE和5-HT的影响并不明显($P > 0.05$, 见图2C、D); 二苯乙烯苷40、80、160mg/kg给药4周后可显著降低HHcy小鼠血中Ang II水平, 升高AD水平。这提示, 二苯乙烯苷可降低HHcy模型小鼠血中Ang II的水平。

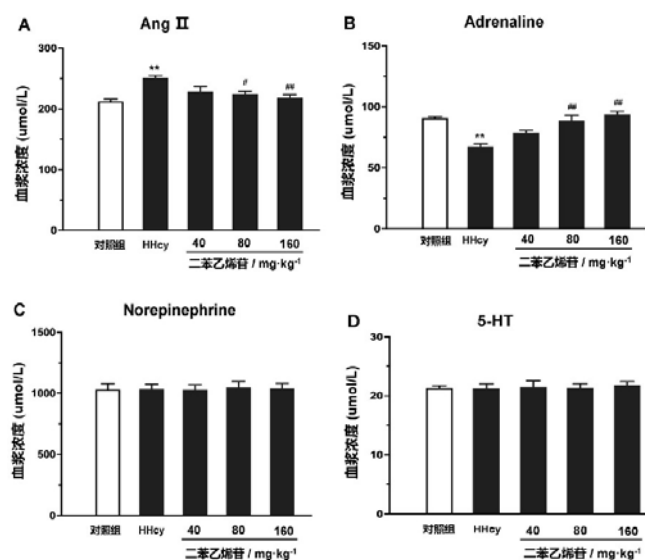


图2 二苯乙烯苷对HHcy小鼠血中缩血管物质水平的影响

注: 与对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

3.3 二苯乙烯苷对HHcy模型小鼠主动脉损伤的保护作用

二苯乙烯苷对HHcy模型小鼠主动脉损伤的保护作用: ①HE染色发现: HHcy模型组小鼠的主动脉与对照组相比, 血管中膜的平滑肌细胞增殖并扩张至内膜(见图3B1红色箭头标示); ②masson染色发现: HHcy模型组小鼠主动脉肌纤维与胶原纤维沉积增多(见图3B2红色箭头标示); ③间苯二酚碱性品红染色发现, HHcy模型组小鼠主动脉弹力纤维排列不规则, 血管外膜胶原纤维沉积增多(见图3B3红色箭头标示)。二苯乙烯苷160mg/kg给药后可使主动脉胶原纤维沉积明显减少, 弹力纤维排列规则(见图3E)。病理组织学检查结果提示, 二苯乙烯苷对HHcy引起的血管组织损伤有一定的保护作用, 因此对血管舒缩功能障碍具有改善作用, 这可能与其扩血管、对抗血管痉挛作用有关。

3.4 二苯乙烯苷对HHcy模型小鼠微动脉损伤的保护作用

二苯乙烯苷对HHcy模型小鼠微动脉损伤的保护作用: ①HE染色发现: HHcy模型组小鼠微动脉与对照组相比, 微动脉血管平滑肌细胞排列不规则, 血管内膜破裂损伤严重(见图4B1红色箭头标示); ②masson染色发现: HHcy模型组小鼠微动脉肌纤维与胶原纤维含量减少, 肌层损伤严重(见图4B2红色箭头标示); ③间苯二酚碱性品红染色发现: HHcy模型组小鼠微动脉的弹力纤维断裂、损伤严重(见图4B3红色箭头标示)。二苯乙烯苷80、160mg/kg给药后可显著改善HHcy引起的微动脉损伤, 增加微动脉胶原纤维含量, 使弹力纤维排列规则(见图4E)。病理组织学

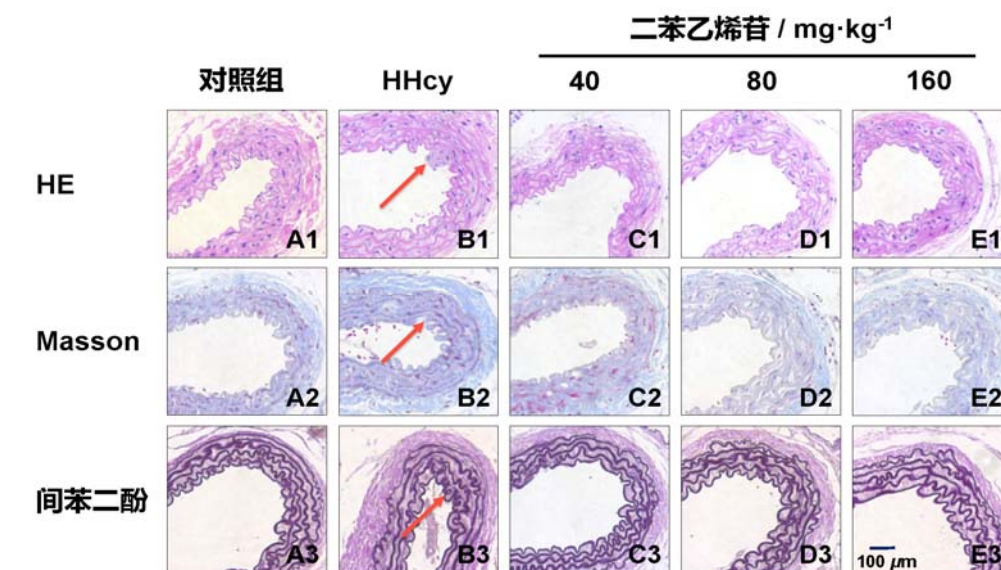


图3 小鼠主动脉病理组织检查(×200)

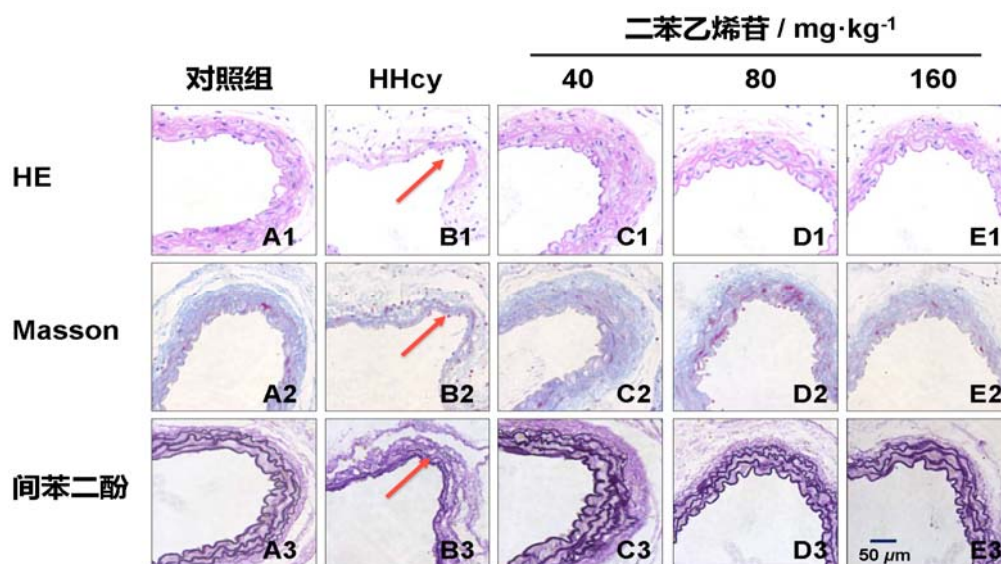


图4 小鼠肠系膜上动脉病理组织检查(×400)

检查结果提示，二苯乙烯苷可逆转HHcy引起的微动脉血管的损伤，其对微动脉血管内膜及平滑肌的保护作用明显强于输送血管，这可能与其抗血管损伤、抗动脉硬化作用有关。

4 讨论

同型半胱氨酸(Hcy)是蛋氨酸代谢过程中形成的一种含硫氨基酸，具有细胞毒性。当血中Hcy>15 μmol/L被称为高同型半胱氨酸血症(HHcy)。HHcy是心血管疾病重要独立危险因素^[16]，但机制不详。VSMC增殖是Hcy引起心血管疾病的病理学基础。血中增高的Hcy一方面可直接作用于血管内膜，刺激其分泌炎症介质，引起血管内皮功能紊乱^[17]；另一方面其也可直接作用于血管平滑肌细胞，刺激其增殖、转化，引起血管重构、血管平滑肌舒缩功能障碍^[18]。在本研究中，我们选择离体血管培养的方法，在体外观察Hcy对血管平滑肌舒缩功能的影响，发现Hcy可显著增加血

管平滑肌对KCl、PE、5-HT的敏感性，引起血管平滑肌高反应性；二苯乙烯苷对Hcy诱发的上述血管收缩反应有明显的舒张作用。

肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)在维持正常的心血管功能方面起着关键作用，其中Ang II是RAS系统中主要的生物活性物质，AngII急性升高可引起水/盐平衡和血管舒缩功能，调节血压；而AngII慢性刺激则可引起血管内皮功能障碍、促进血管平滑肌细胞迁移、增生和肥大^[19-20]。有文献报道，Hcy可通过激活AngII1型受体促进血管外膜成纤维细胞迁移，加重血管损伤，诱发动脉粥样硬化和高血压^[21, 22]。但是否会影响AngII的释放尚没有明确的结论。我们建立了HHcy小鼠模型，HHcy组小鼠血中Ang II的水平显著升高，二苯乙烯苷给药后可降低Ang II的水平；病理组织学检查各组小鼠的主动脉和微动脉损伤情况，发现二苯乙烯苷对HHcy引起的血管组织损伤有一定的保

护作用,使主动脉及微动脉的胶原纤维沉积明显减少,并使微动脉弹力纤维排列规则,且对微动脉的舒缩功能障碍具有改善作用,这可能与其扩血管、对抗血管痉挛作用有关。

综上所述,二苯乙烯苷可降低Hcy引起血管平滑肌对缩血管物质的敏感性,抑制此类物质对血管的收缩作用,降低HHcy模型小鼠Ang II水平,还可改善HHcy引起的微动脉损伤,减少胶原纤维沉积并阻止弹力纤维断裂,且其对Hcy诱导的微动脉损伤的保护作用明显强于输送血管。

[基金项目]

陕西省科技厅项目2023-JC-YB-753; 陕西省教育厅重点实验室22JS038; 西安医学院校级科技创新团队2021TD06。

[参考文献]

[1] Cesari M, Rossi GP, Sticchi D, et al. Is homocysteine important as risk factor for coronary heart disease[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005;15:140-147.

[2] Maron BA, Loscalzo J. The treatment of hyperhomocysteinemia[J]. *Annu Rev Med*. 2009;60:39-54.

[3] Qin X, Huo YH. Type hypertension, stroke and diabetes in China: Opportunities for primary prevention[J]. *J Diabetes*. 2016;8(1):38-40.

[4] Zhou F, Hou D, Wang Y, et al. Evaluation of H-type hypertension on prevalence and its influence on the risk of increased carotid intima-media thickness among a high-risk stroke population in Hainan Province, China[J]. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(35):e21953.

[5] Zhang ZY, Gu X, Tang Z, et al. Homocysteine, hypertension, and risks of cardiovascular events and all-cause death in the Chinese elderly population: a prospective study[J]. *J Geriatr Cardiol*. 2021;18(10):796-808.

[6] Narin F, Narin N, Akcakus Me, et al. The effect of folic acid, vitamin B6 and vitamin B12 on the homocysteine levels in rabbits fed by methionine-enriched diets[J]. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2002;198(2):99-105.

[7] Finsterer J. Low risk of ischaemic stroke in hyperhomocysteinemia[J]. *Lancet Neurol*. 2017;16(9):682-683.

[8] Jing Zhao, Yuan Liang, Fan Song, et al. TSG Attenuates LPC-Induced Endothelial Cells Inflammatory Damage Through Notch Signaling Inhibition[J]. *IUBMB Life*. 2016;68(1):37-50.

[9] Dong Q, Xing W, Fu F, et al. Tetrahydroxystilbene Glucoside Inhibits Excessive Autophagy and Improves Microvascular Endothelial Dysfunction in Prehypertensive Spontaneously Hypertensive Rats[J]. *Am J Chin Med*. 2016;44(7):1-20.

[10] Yi B, Nguyen MC, Won MH, et al. Arginase Inhibitor 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside activates endothelial nitric oxide synthase and improves vascular function[J]. *Planta Med*. 2017;83(3-04):210-216.

[11] Yao W, Huang C, Sun Q, et al. Tetrahydroxystilbene

glucoside protects against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction via regulating vimentin cytoskeleton and its colocalization with ICAM-1 and VCAM-1[J]. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(5):1442-1454.

[12] Yao W, Sun Q, Huang L, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside inhibits TNF- α -induced migration of vascular smooth muscle cells via suppression of vimentin[J]. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94(2):155-160.

[13] Duan J, Han X, Ling S, et al. Aortic Remodelling Is Improved by 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside Involving the Smad3 Pathway in Spontaneously Hypertensive Rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:789027.

[14] Chen Y, Zhang H, Liu E, et al. Homocysteine regulates endothelin type B receptors in vascular smooth muscle cells[J]. *Vascular Pharmacology*. 2016;87:100-109.

[15] Hieronim, Jakubowski. Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease[J]. *Physiol Rev*. 2019;99(1):555-604.

[16] Kaplan P, Tatarkova Z, Sironova MK, et al. Homocysteine and Mitochondria in Cardiovascular and Cerebrovascular Systems[J]. *Int J Mol Sci*. 2020;18;21(20):7698.

[17] Fang P, Zhang D, Cheng Z, et al. Hyperhomocysteinemia Potentiates Hyperglycemia-Induced Inflammatory Monocyte Differentiation and Atherosclerosis[J]. *Diabetes*. 2014;63(12):4275-4290.

[18] Tan H, Shi C, Jiang X, et al. Hyperhomocysteinemia promotes vascular remodeling and fibrosis in carotid vein graph in mice[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19: 958-966.

[19] Cau SB, Bruder-Nascimento A, Silva MB, et al. Angiotensin-II activates vascular inflammasome and induces vascular damage[J]. *Vascul Pharmacol*. 2021;139:106881.

[20] Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, et al. Angiotensin II and serotonin potentiate endothelin-1-induced vascular smooth muscle cell proliferation. Benedict CR[J]. *J Hypertens*. 2001;19(4):731-9.

[21] Li T, Yu B, Liu Z, et al. Homocysteine directly interacts and activates the angiotensin II type I receptor to aggravate vascular injury[J]. *Nat Commun*. 2018;9(1):11.

[22] Zhu Z, Li S, Jia Y, et al. Homocysteine promotes migration of adventitial fibroblasts via angiotensin II type 1 receptor activation to aggravate atherosclerosis[J]. *Gen Physiol Biophys*. 2022;41(6):535-547.

作者简介:

秦巧红, 女, 西安医学院基础与转化医学研究所。

*通讯作者:

贾敏, 女, 西安医学院基础与转化医学研究所副教授。