

橙皮素对血管内皮细胞 NO 分泌功能的影响

许冬梅, 刘 雳, 程翼宇

(浙江大学药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 考察了橙皮素对人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) NO 分泌功能的影响, 探讨其作用机制. 为此采用 DAN 法测定 HUVECs 分泌 NO 的水平, 用人乳腺癌 MCF-7 细胞 (雌激素受体阳性) 促增殖实验和报告基因模型实验评价橙皮素的雌激素样活性. 结果显示在内源雌激素水平较低条件下, 橙皮素在 12.5~100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 能够促进 HUVECs 分泌 NO, 并呈剂量依赖性. 此作用能够被雌激素受体拮抗剂 ICI182,780 和放线菌素 D 阻断. 橙皮素与 E_2 同时作用时, HUVECs 分泌 NO 水平较两者单独作用时显著下降. 而在内源雌激素水平较高的条件下, 橙皮素抑制 HUVECs 分泌 NO. 橙皮素能够促进 MCF-7 细胞增殖, 并且能够被 ICI182,780 完全阻断, 同时, 橙皮素能够部分拮抗 E_2 对 MCF-7 细胞的促增殖作用. 另外, 橙皮素能够诱导 ER α 控制的报告基因表达. 从而可认为橙皮素属于雌激素受体部分激动剂, 对血管内皮细胞 NO 分泌功能具有调节作用, 其机理涉及雌激素受体信号途径和基因转录调节.

[关键词] 橙皮素, 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs), 一氧化氮, 雌激素受体

[中图分类号] R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2008)03-0096-04

Effect of Hesperetin on Release of Nitric Oxide From Endothelial Cells

Xu Dongmei, Liu Li, Cheng Yiyu

(Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Objective to investigate the effect of hesperetin on release of nitric oxide from cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and possible mechanism. Methods Fluorometric assay with 2,3-diaminonaphthalene (DAN) was employed to determine the concentration of nitrite in medium, indicating NO production from HUVECs. The modified MCF-7 cell proliferation assay and the reporter-gene assay were used to evaluate the estrogenic activity of hesperetin. Results at relative low level of endogenous estrogen, hesperetin (12.5~100 $\mu\text{mol/L}$) promoted the release of NO from HUVECs in a dose-dependent manner, which could be inhibited by ICI182,780 and actinomycin D. When HUVECs were treated with combination of hesperetin and E_2 , the level of NO released from HUVECs was lower than that of single treatment. Under high level of endogenous estrogen, hesperetin inhibited the release of NO from HUVECs. Hesperetin significantly promoted the proliferation of MCF-7 cells, which could be completely blocked by ICI182,780. Meanwhile, hesperetin appeared to compromise efficiency of E_2 . Also hesperetin activated estrogen receptor and induced the expression of Luciferase (reporter gene). Conclusion hesperetin can be classified as a partial agonist of estrogen-receptor and possess regulation activity on NO production from HUVECs. The possible mechanism involves in estrogenic activity and regulation of gene expression.

Key words hesperetin, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), nitric oxide, estrogen receptor

橙皮素 (hesperetin) 是一种黄烷酮类化合物, 多以糖苷形式存在于芸香科植物中, 在药材陈皮、枳壳、枳实、青皮中含量颇高, 是主要的药效活性成分之一, 其糖苷在人肠道菌群作用下水解生成橙皮素而发挥药效作用^[1]. 橙皮素具有抗氧化、抗血小板凝聚、降脂、舒张血管等作用^[2-5], 对心血管系统疾病有预防和治疗作用. 血管内皮细胞分泌的 NO 对维持心血管系统的正常生理功能具有积极作用^[6]. 橙皮素对心血管系统的保护作用可能与其调节内皮细胞 NO 分泌功能有关. 为证实上述推测, 本文考察了橙皮素对血管内

收稿日期: 2007-10-31

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2005CB523402).

通讯联系人: 刘 雳, 博士后, 研究方向: 中药与天然药物活性成分筛选和分析. E-mail: boltli@zju.edu.cn

— 96 —

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

皮细胞 NO 分泌功能的影响, 并对其作用机制进行初步探讨.

1 材料

1.1 药物与试剂

橙皮素由橙皮苷 (购自中国药品生物制品检定所) 酸水解后纯化制得 (HPLC 法测定, 纯度 > 98%). 雌二醇 (β -estradiol, E_2)、2,3-二氨基萘 (2,3-diaminonaphthalene, DAN)、内皮细胞生长因子 (endothelial cell growth supplement, ECGS)、活性碳和 MTT 均购于 Sigma 公司. 无酚红 M199 培养液、无酚红 DMEM 培养液、胎牛血清 (FBS)、胶原酶 I 均购于 Gibco 公司. IC1182,780 购自 Tocris 公司. A23187 和放线菌素 D 购于 CALBIOCHEM 公司.

1.2 使用的主要仪器

倒置相差显微镜 (Olympus 日本), ELX800 酶标仪 (Bio-Tek Instruments, Inc., 美国), Infinite F200 荧光及化学发光分析仪 (TECAN 公司, 瑞士), 5810R 冷冻离心机 (Eppendorf 德国).

2 方法

2.1 内皮细胞的分离与培养

参照 Jaffe^[7]提出的方法略加改进, 将 0.1% 胶原酶 I 注入人脐静脉, 消化收集得到人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs). 采用 M199 培养液, 含 10% FBS, 0.05 g/L ECGS, 50 U/mL 肝素钠、100 U/mL 青霉素和链霉素, 置于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养. 用鼠抗人第 VIII 因子抗体进行细胞免疫化学鉴定. 选择 2~4 代细胞进行实验.

2.2 血清去激素处理

FBS 用活性碳进行去激素处理^[8]. 活性碳与 FBS 混合, 低温振荡过夜. 然后离心、过滤、除菌, 即得到去除激素的 FBS (charcoal-stripped FBS, cFBS).

2.3 DAN 法测定 NO 的含量

取 5 μ L 细胞培养液, 用纯水稀释至 100 μ L, 然后加入 0.05 g/L DAN 10 μ L, 室温反应 10 min, 再加入 2.8 mol/L NaOH 20 μ L, 室温静置 20 min. 用荧光及化学发光分析仪测定, 激发波长为 380 nm, 发射波长为 450 nm. 以亚硝酸钠为对照品配制不同浓度的溶液, 制作标准曲线.

2.4 不同内源雌激素水平下橙皮素对内皮细胞 NO 分泌功能的影响

HUVECs 以每孔 1×10^5 /mL 的密度接种于明胶包被的 96 孔培养板, 每孔体积 200 μ L. 常规培养 2 d 使细胞完全汇合, 用 PBS 洗 1 遍, 分别用含 5% FBS 和 5% cFBS 的无酚红 M199 培养液对 HUVECs 进行培养. 然后分别加入 50 μ mol/L 橙皮素, 培养 24 h 后测定培养液中 NO 的水平.

2.5 橙皮素对血管内皮细胞 NO 分泌的促进作用

HUVECs 细胞接种于明胶包被的 96 孔培养板, 汇合后换成无酚红 M199 培养液 (含 5% cFBS) 继续培养 24 h, 然后加药处理.

分组: 空白组 (0.1% DMSO); A23187 组 (5 μ mol/L); E_2 组 (0.01 μ mol/L); 橙皮素给药组 (终浓度为 12.5, 25, 50, 100 μ mol/L); 橙皮素 + IC1182,780 组 (加入 0.1 μ mol/L IC1182,780 孵育 30 min 后加入 50 μ mol/L 橙皮素); 橙皮素 + E_2 组 (加入 0.01 μ mol/L E_2 孵育 30 min 后加入 50 μ mol/L 橙皮素); 橙皮素 + 放线菌素 D 组 (加入 0.8 μ mol/L 放线菌素 D, 孵育 30 min 后加入 50 μ mol/L 橙皮素). 各组设 6 个复孔. 培养 24 h 后, 分别测定培养液中 NO 水平.

2.6 MCF-7 细胞促增殖实验

人乳腺癌 MCF-7 细胞株 (雌激素受体阳性) 培养于含 10% FBS, 1% (V/V) 非必需氨基酸、100 U/mL 青霉素和链霉素的 DMEM 培养液中, 置于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养. MCF-7 细胞以每孔 2.5×10^4 /mL 的密度接种于 96 孔培养板, 每孔体积为 200 μ L, 常规培养 2 d 使细胞完全贴壁. 然后换成无酚红 DMEM 培养液 (含 10% cFBS) 继续培养. 2 d 后换为含药培养液. 分组: 空白组 (未接种细胞); 阴性对照组 (0.1% DMSO); 阳性对照组 (E_2 , 0.01 μ mol/L); 橙皮素给药组 (终浓度为 50 μ mol/L); 橙皮素 + IC1182,780 组; 橙皮素 + E_2 组 (给药方法同上), 各组设 6 个复孔. 继续培养 72 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT

10 μL, 置细胞培养箱中孵育 4 h 吸掉上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 用酶标仪在 550 nm 波长处测定吸光度. 结果以增殖率表示:

增殖率 (%) = (给药组 A 值 - 空白组 A 值) / (阴性对照组 A 值 - 空白组 A 值) × 100%.

2.7 报告基因模型实验

宿主细胞骨肉瘤细胞 U-20S 以每孔 8 000 的细胞数量接种于 96 孔培养板. 24 h 后细胞覆盖率达到 80% 以上进行转染. 转染按照生产商 (Roche) 的说明书进行, 每孔加入 ERα 表达质粒、ERE-Luciferase 报告基因质粒和 GFP 表达质粒 (内标), 总量为 50 ng 加入转染混合物 24 h 后换液, 加入不同浓度橙皮素 (终浓度为 6.25、12.5、25、50 μmol/L) 或者 E₂ (0.01 μmol/L). 各组设 4 个复孔, 并且 DMSO 终浓度相等且低于 0.2%. 培养 24 h 后, 裂解细胞, 按照生产商 (Promega) 的说明书分别测定 Luciferase 活力和 GFP 荧光强度. 结果以 Luciferase 活力与 GFP 荧光强度的比值表示.

2.8 数据分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示. 组间数据比较采用 *t* 检验.

3 结果

3.1 橙皮素对人脐静脉内皮细胞 NO 分泌水平的影响

如表 1 所示, 在不同的细胞培养条件下, 橙皮素对内皮细胞 NO 分泌功能的影响截然不同. 在含 dFBS 的培养条件下, 橙皮素能够促进 HUVECs 分泌 NO; 而在含常规 FBS (内源雌激素水平较高) 的培养条件下, 橙皮素不但不能促进内皮细胞分泌 NO, 反而使 NO 的水平降低.

3.2 橙皮素对血管内皮细胞 NO 分泌的促进作用

如表 2 所示, 在低水平内源雌激素条件下, 钙离子载体 A23187 和 E₂ 均能够明显提高 HUVECs 分泌 NO 的水平. 橙皮素在 12.5~100 μmol/L 浓度范围内, 也能够促进 HUVECs 分泌 NO, 并呈剂量依赖性. 雌激素受体拮抗剂 ICI182 780 能够抑制橙皮素对 HUVECs 分泌 NO 的促进作用. 但橙皮素与 E₂ 共同作用于细胞时, HUVECs 分泌 NO 水平较两者单独作用时反而显著下降 (*P* < 0.05), 说明二者产生拮抗作用, 与 3.1 的现象相一致. 放线菌素 D 是一种基因转录抑制剂, 能够抑制橙皮素对 HUVECs 分泌 NO 的促进作用.

3.3 橙皮素对 MCF-7 细胞增殖的影响

如表 3 所示, E₂ 促进 MCF-7 细胞增殖的活性最强, 橙皮素在 50 μmol/L 的浓度水平下也能够明显促进 MCF-7 细胞增殖. ICI182 780 能够完全拮抗橙皮素的这个作用. 另外, 橙皮素与 E₂ 共同作用对 MCF-7 细胞的促增殖作用较两者单独作用时显著减弱 (*P* < 0.01).

表 1 不同内源雌激素水平下橙皮素对内皮细胞 NO 分泌功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

Table 1 Effect of hesperetin on NO production from HUVECs under different levels of endogenous estrogen ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

	FBS		dFBS	
	空白	橙皮素 (50 μmol/L)	空白	橙皮素 (50 μmol/L)
NO ₂ ⁻ / (μmol/L)	2.63 ± 0.51	1.78 ± 0.11 ^f	2.17 ± 0.09	2.55 ± 0.19 ^g

与同组空白组比较: * *P* < 0.05

表 2 橙皮素对 HUVEC 分泌 NO 的促进作用 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

Table 2 Promotion effect of hesperetin on NO production from HUVECs ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

组别	浓度 / (μmol/L)	NO ₂ ⁻ / (μmol/L)
空白	—	1.77 ± 0.15
A23187	5	3.26 ± 0.17 [*]
E ₂	0.01	3.29 ± 0.86 [*]
橙皮素	12.5	2.75 ± 0.40 [*]
	25	3.01 ± 0.28 [*]
	50	3.28 ± 0.29 [*]
	100	4.12 ± 0.41 [*]
橙皮素 + ICI182 780	50 + 0.1	1.85 ± 0.06 ^Δ
橙皮素 + E ₂	50 + 0.01	2.17 ± 0.18 ^Δ
橙皮素 + 放线菌素 D	50 + 0.8	1.90 ± 0.07 ^Δ

与空白对照组比较: * *P* < 0.05; * * *P* < 0.01

与橙皮素 (50 μmol/L) 组比较: Δ *P* < 0.05

表 3 橙皮素的雌激素样活性研究 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

Table 3 Study of estrogenic activity of hesperetin ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

组别	浓度 / (μmol/L)	增殖率 / %
阴性对照	—	100.0 ± 4.8
E ₂	0.01	201.1 ± 7.8 [*]
橙皮素	50	190.2 ± 6.3 [*]
橙皮素 + ICI182 780	50 + 0.1	106.2 ± 4.0 ^{ΔΔ}
橙皮素 + E ₂	50 + 0.01	138.6 ± 6.3 [*] ΔΔ

与对照组比较: * * *P* < 0.01

与橙皮素 (50 μmol/L) 组比较: ΔΔ *P* < 0.01

表 4 橙皮素对雌激素受体的激活作用 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 4)

Table 4 Hesperetin induced the expression of reporter gene controlled by ERα ($\bar{x} \pm s$, *n* = 4)

组别	浓度 / (μmol/L)	Luciferase 活力 / GFP 荧光强度
E ₂	0.01	4.68 ± 0.30
橙皮素	6.25	1.15 ± 0.08
	12.5	1.83 ± 0.09
	25	2.44 ± 0.30
	50	3.64 ± 0.44

3.4 橙皮素对雌激素受体的激活作用

如表 4 所示, E_2 能够激活 $ER\alpha$, 诱导 $ER\alpha$ 控制的报告基因表达升高. 橙皮素在 $6.25 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内也能够激活 $ER\alpha$, 且呈剂量依赖性.

4 讨论

本文采用了灵敏度高、稳定可靠的 DAN 法测定血管内皮细胞分泌 NO 的水平, 考察了橙皮素对体外培养的 HUVECs 分泌 NO 功能的影响. 研究发现: 在含有普通 FBS 的培养体系中, 橙皮素抑制内皮细胞分泌 NO; 在含有 cFBS 的培养体系中, 橙皮素能够促进内皮细胞分泌 NO, 说明橙皮素对血管内皮细胞 NO 分泌的影响依赖于体系中内源雌激素水平. 进一步研究发现, 在低水平内源雌激素条件下, 橙皮素在 $12.5 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内能够促进内皮细胞分泌 NO, 且呈量效关系. 雌激素受体拮抗剂 ICI182 780 和基因转录抑制剂放线菌素 D 均能够完全抑制橙皮素的这个作用, 说明其活性可能与雌激素受体激活及基因转录调节有关. 此外, 橙皮素能够拮抗 E_2 对内皮细胞分泌 NO 的促进作用.

MCF-7 细胞促增殖实验和报告基因模型实验结果表明, 橙皮素能够激活雌激素受体及其调控的基因表达, 具有较强的雌激素样活性. 同时, 橙皮素与 E_2 产生拮抗作用, 说明橙皮素属于雌激素受体部分激动剂.

雌激素对心血管系统具有保护作用. 近年来, 研究发现雌激素通过提高内皮型一氧化氮合酶的活性, 调节血管内皮细胞分泌 NO 的水平, 是其发挥心血管保护作用的主要作用机理之一, 并且与其抗动脉粥样硬化的作用密切相关^[9]. 植物雌激素是一类植物来源的具有雌激素活性的物质, 某些植物雌激素已被发现具有调节血管内皮细胞 NO 分泌功能的作用^[10], 与雌激素相比其作用具有一定的选择性. 橙皮素在不同内源雌激素水平下对内皮细胞 NO 分泌功能的不同调节作用提示我们, 橙皮素可能有利于绝经期妇女血管内皮功能的改善. 绝经期妇女体内雌激素水平下降, 带来一系列的病理生理改变, 特别是心血管疾病的发病率显著上升, 摄入橙皮素可能降低心血管系统疾病的发生率. 同时, 橙皮素具有雌激素样活性, 可能减轻雌激素替代疗法带来的副作用.

综上所述, 橙皮素对血管内皮细胞的 NO 分泌功能具有调节作用, 其作用机理涉及雌激素受体信号途径和基因转录调节. 同时, 橙皮素是一种雌激素受体部分激动剂. 因此, 在内源雌激素水平较高时, 对 HUVECs 分泌 NO 有一定的抑制作用; 而在内源雌激素水平较低时, 能促进 HUVECs 分泌 NO.

[参考文献]

- [1] Lee N K, Choi S H, Park S H, et al. Antiallergic activity of hesperidin is activated by intestinal microflora [J]. *Pharmacology* 2004, 71 (4): 174-180.
- [2] Hirata A, Murakami Y, Shoji M, et al. Kinetics of radical scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression [J]. *Anticancer Res* 2005, 25 (5): 3367-3374.
- [3] Jin Y R, Han X H, Zhang Y H, et al. Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC-gamma2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity [J]. *Atherosclerosis* 2007, 194 (1): 144-152.
- [4] Cha J Y, Cho Y S, Kim J, et al. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats [J]. *Plant Foods Hum Nutr* 2001, 56 (4): 349-358.
- [5] Omallo F, Alvarez E, Basaran H, et al. Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004, 370 (6): 452-463.
- [6] Ignarro L J, Cirino G, Casini A, et al. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999, 34 (6): 879-886.
- [7] Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest* 1973, 52 (11): 2745-2756.
- [8] Payne J, Jones C, Lakhani S, et al. Improving the reproducibility of the MCF-7 cell proliferation assay for the detection of xenoestrogens [J]. *Sci Total Environ* 2000, 248 (1): 51-62.
- [9] 穆军升, 朱洪生. 一氧化氮和雌激素的关系在心血管病中的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2002, 23 (2): 113-115.
- [10] 相启森, 周俊, 王冬, 等. 植物雌激素活性成分及生理功能研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2006, 34 (10): 2038-2039, 2042.

[责任编辑: 孙德泉]