

益智仁中二苯基庚烷类化合物的血管生成抑制活性

高晓平¹, 陈丽晓², 殷志琦³, 蒋玲玲¹, 林清华³, 何明芳^{1*}(¹南京工业大学药学院, 南京 210009; ²南京师范大学生命科学学院, 南京 210023;³中国药科大学中药学院, 南京 210009)

摘要 探讨益智仁中两个已知二苯基庚烷类化合物 Yakuchinone A 和 Yakuchinone B 以及结构类似物姜黄素 (curcumin) 的血管生成抑制活性。采用了转基因荧光斑马鱼为体内实验动物模型, 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 为体外实验模型, 评价了上述 3 个化合物的活性及毒性。以血管生成抑制指数 (AI) 代表化合物的活性与毒性之比。结果表明, 无论是体外实验还是体内实验, 姜黄素的血管生成抑制作用最强而毒性最低, Yakuchinone A 次之, Yakuchinone B 抑制活性最低而毒性最强。因此, 姜黄素为三者中最佳的血管生成抑制剂。

关键词 血管生成; 斑马鱼; 人脐静脉内皮细胞; 姜黄素; 二苯基庚烷化合物; Yakuchinone A; Yakuchinone B

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2015)01–0085–04

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20150112

Inhibition of diarylheptanoids from *Alpinia oxyphylla* on angiogenesisGAO Xiaoping¹, CHEN Lixiao², YIN Zhiqi³, JIANG Lingling¹, LIN Qinghua³, HE Mingfang^{1*}

¹School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009; ²College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023; ³School of Traditional Chinese Medicine, Chinese Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract This study investigated the anti-angiogenic activities of two diarylheptanoids, together with a structure analogue, curcumin. The activity and toxicity of these three compounds were compared using transgenic zebrafish as *in vivo* model and human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) as *in vitro* model. Anti-angiogenic index (AI) was used as the ratio between LC₅₀ and EC₅₀. The results suggested that in both *in vitro* and *in vivo* assay, curcumin exerted the most potent anti-angiogenic effect but with lowest toxicity among these compounds; Yakuchinone A was the second potent; Yakuchinone B has the lowest activity but with the highest toxicity in all three compounds. Taken together, curcumin was the best angiogenic inhibitor in these three diarylheptanoids.

Key words angiogenesis; zebrafish; HUVEC; curcumin; diarylheptanoid; Yakuchinone A; Yakuchinone B

This study was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2011796); and the New Teacher Fund from Chinese Ministry of Education (No. 20123221120005)

血管生成是指新生血管从已有血管分支生成的过程, 这个现象既发生在生理过程中, 如胚胎发育、伤口愈合, 同时也与一些疾病相关, 如肿瘤生长、类风湿性关节炎、糖尿病性视网膜病变^[1]。自从 1970 年代初期, Folkman^[2] 提出肿瘤的生长与转移和血管生成密切相关后, 大量的研究表明, 抑制血管生成是抗肿瘤治疗的一种新策略。2004 年 FDA 批准了第 1 个肿瘤血管生成抑制剂贝伐单抗

(商品名: Avastin) 上市, 目前已有 10 多个血管生成抑制剂正在进行临床试验。

天然药物是抗肿瘤药物的一个重要来源, 目前已经有许多中药的有效成分被报道具有血管生成抑制作用, 如雷公藤甲素^[3]、大黄蒽醌^[4]、槲皮素^[5]、靛玉红^[6]等。益智仁是姜科植物益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 的干燥成熟果实, 用于治疗消化不良、腹泻、肾虚及记忆力衰退。益智仁含有的主

* 收稿日期 2014-10-20 * 通信作者 Tel: 025–83172108 E-mail: mingfanghe@njtech.edu.cn

基金项目 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK2011796); 教育部博士点新教师基金资助项目 (No. 20123221120005)

要化学成分有油脂、黄酮类、二苯基庚烷类和倍半萜类成分。有研究表明,从益智仁的乙酸乙酯可溶物中分离得到的两个二苯基庚烷类成分 Yakuchinone A 和 B,可以抑制 DMBA-TPA 诱导的小鼠皮肤癌的产生,并推断该作用与它们的抗炎因子的活性有关^[7]。在本研究的抗血管生成中药筛选的前期研究中发现,益智仁乙酸乙酯提取物在体内和体外模型中均具有血管生成抑制活性^[8]。为了进一步探索益智仁血管生成抑制作用的物质基础,本研究对益智仁乙酸乙酯部位进行分离,也得到了两个已知的二苯基庚烷化合物 Yakuchinone A 和 B,采用体外 HUVEC 实验和体内斑马鱼模型,对 Yakuchinone A、B 以及它们的结构类似物姜黄素的血管生成抑制活性进行研究,同时评估了它们的毒性。

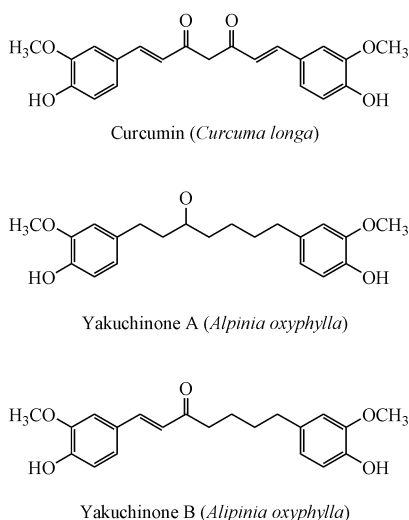


Figure 1 Chemical structures of curcumin, Yakuchinone A and B

1 材料

1.1 试剂

姜黄素对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司,货号:08511);Yakuchinone A、B 为本课题组从益智仁中分离纯化得到,波谱数据与文献报道一致^[9],纯度经检测大于 98% (3 个化合物结构式见图 1);二甲亚砜(DMSO,美国 Sigma-Aldrich 公司,货号:D8418);内皮细胞生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 II (VRI,美国默克公司,货号 676481);细胞计数试剂盒(CCK-8,日本同仁化学研究所);EGM-2 培养基(美国 Lonza 公司,货号 CC-3162)。Matrigel 基质胶(美国 BD 公司)。

1.2 仪器

Synergy HT 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);IX71 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);SMZ645 体视显微镜(日本 Nikon 公司);Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司);GraphPad Prism 5 数据分析软件(美国 Graph Pad 软件公司)

1.3 细胞和动物

人脐静脉内皮细胞(HUVEC,美国 Lonza 公司,货号 CC-2257);斑马鱼野生型及 Tg(fli-1;EGFP)转基因型成鱼(南京大学模式动物研究所,品系为 Tubingen)。

2 方法

2.1 HUVEC 细胞毒性实验

将 HUVEC 细胞用 EGM-2 培养,种入 96 孔板,每孔 3 000 个细胞,于 CO₂ 培养箱中贴壁培养 12 h。弃去上清液,加入含有不同浓度药物的 EGM-2 培养液,每孔 200 μL。DMSO 的最终浓度控制在小于 0.1%。以含有 0.1% DMSO 的细胞孔为对照组。以仅含培养基不含细胞的孔作为空白组。每个浓度重复 3 个孔。在 CO₂ 培养箱中孵育 72 h 后,加入 CCK-8 试剂,每孔 10 μL,继续培养 2 h。将 96 孔板摇匀,放入酶标仪中,在 450 nm 波长下,测定各个孔的吸收度(A),以对照组细胞存活率为 100%,计算各药物浓度组的细胞存活率。存活率(%) = (A_{treated} - A_{blank}) / (A_{control} - A_{blank}) × 100。用 GraphPad Prism 5 软件统计出 3 个药物的半数致死浓度(LC₅₀)。

2.2 HUVEC 小管形成实验

向 48 孔板中均匀地铺上 Matrigel 基质胶,每孔 100 μL,然后放入 CO₂ 培养箱中 45 min 使其凝固。取出 48 孔板,每孔加入含有 2 × 10⁴ 细胞的 EGM-2 培养基 50 μL,并且加入不同浓度的药物 50 μL 以及 0.1% DMSO,孵育 12 h。用倒置显微镜放大 100 倍拍照。小管的长度用 Image Pro Plus 软件定量。选择 4 个随机的区域进行拍照定量。以对照组细胞小管的长度为 100%,计算各药物浓度组的小管长度的相对百分率,并用 GraphPad Prism 5 软件统计出 3 个药物的半数有效浓度(EC₅₀)。

2.3 斑马鱼血管生成抑制实验

采用转基因荧光斑马鱼 Tg(fli-1;EGFP)的鱼

卵,在受精后 24 h(24 hpf)用镊子去除卵膜,加入 24 孔板,每孔 50 只。鱼卵培养液为 0.2 g/L 海盐,每孔 1 mL。每孔加入不同浓度的药物,以 0.1% DMSO 为对照组。将 24 孔板放入恒温箱,控制温度为 28.5 ℃,孵育 48 h,至胚胎 72 hpf 时取出,在荧光显微镜下观察体节间血管(ISV)的形成情况,只要产生一根及以上的 ISV 形成受阻即判定该鱼血管生成受抑制。计算血管生成受抑制的鱼卵占该组全部存活鱼卵的百分比为抑制率,对照组血管生成受抑制的鱼卵为 0。能产生 50% 的鱼卵发生 ISV 形成受抑制的浓度即为该药物的 EC_{50} 。用 GraphPad Prism 5 软件统计出 3 个药物的 EC_{50} 。药物作用期间不喂食。

2.4 斑马鱼毒性实验

取 24 hpf 野生型斑马鱼鱼卵,用镊子去除卵膜,放入 24 孔板中,每孔 20 只。鱼卵培养液为 0.2 g/L 海盐,每孔 1 mL。每孔加入不同浓度的药物,以 0.1% DMSO 为对照组。将 24 孔板放入恒温箱,控制温度为 28.5 ℃,孵育 48 h,至胚胎 72 hpf 时取出,在体视显微镜下观察每孔鱼卵的死亡情况(以心脏停止跳动判定为死亡)。以对照组斑马鱼卵存活率为 100%,计算各药物浓度组的鱼卵相对存活率,并用 GraphPad Prism 5 软件统计出 3 个药物的 LC_{50} 。药物作用期间不喂食,如果发现 有死鱼及时捞出。

3 结 果

3.1 对 HUVEC 的细胞毒作用

3 种化合物对 HUVEC 的细胞毒性 LC_{50} 见表 1,细胞毒性由强到弱依次为 Yakuchinone B、姜黄素、Yakuchinon A。

3.2 对 HUVEC 小管形成的抑制作用

3 种二苯基庚烷类化合物对 HUVEC 小管形成的均有抑制作用见图 2, EC_{50} 见表 1。

3.3 体外 HUVEC 实验中的血管生成抑制指数

为了比较这 3 个化合物的血管生成抑制作用,本研究计算其在体外 HUVEC 实验中的血管生成抑制指数($AI = LC_{50}/EC_{50}$)。AI 越大,说明药物的血管生成抑制作用越强,或者毒性越小。AI 越小,说明药物的血管生成抑制作用越弱,或者毒性越

大。3 种二苯基庚烷类化合物的 AI 计算见表 1。结果表明,姜黄素在体外 HUVEC 实验中具有最强的血管生成抑制作用。

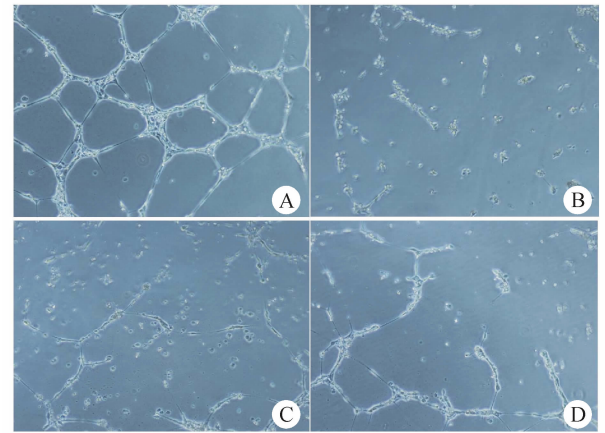


Figure 2 Inhibitory effects of curcumin, Yakuchinone A and B on HUVEC tube formation
HUVECs were seeded on Matrigel and then treated with 0.1% DMSO (A), curcumin 10 $\mu\text{mol/L}$ (B), Yakuchinone A (C), and Yakuchinone B (D) for 12 h

Table 1 *In vitro* anti-angiogenic effect of three diarylheptanoids in HUVEC

Compd.	$LC_{50}/(\mu\text{mol/L})$	$EC_{50}/(\mu\text{mol/L})$	AI
Curcumin	11.7	6.8	1.72
Yakuchinone A	16.9	26	0.65
Yakuchinone B	6.7	27	0.25

$AI = LC_{50}/EC_{50}$

3.4 对斑马鱼的毒性作用

3 种化合物对斑马鱼的 LC_{50} 见表 2。结果表明,姜黄素的毒性与 Yakuchinon B 相当,均高于 Yakuchinone A。

3.5 对斑马鱼的血管生成抑制作用

3 种二苯基庚烷类化合物对斑马鱼的 ISV 形成的均有抑制作用见图 3, EC_{50} 见表 2。

3.6 斑马鱼模型中的血管生成抑制指数

为了比较这 3 个化合物的血管生成抑制作用,本研究计算其在斑马鱼模型中的 AI。AI 越大,说明药物的血管生成抑制作用越强,或者毒性越小。AI 越小,说明药物的血管生成抑制作用越弱,或者毒性越大。3 种二苯基庚烷类化合物的 AI 见表 2。结果表明,姜黄素在体内实验中具有最强的血管生成抑制作用。

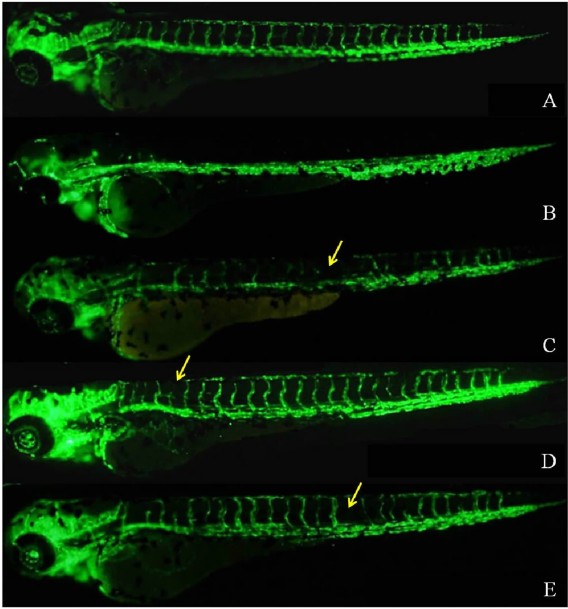


Figure 3 Inhibitory effects on zebrafish intersegmental vessel (ISV) formation at 72 hpf treated by 0.1% DMSO (A), VEGF receptor kinase inhibitor (VRI) 300 nmol/L (B), curcumin 10 $\mu\text{mol/L}$ (C), Yakuchinone A 10 $\mu\text{mol/L}$ (D) and Yakuchinone B 10 $\mu\text{mol/L}$ (E) VRI served as a positive control. Yellow arrows indicate the interruption of zebrafish ISVs formation

Table 2 *In vivo* anti-angiogenic effect of three diarylheptanoids in zebrafish

Compd.	LC ₅₀ /($\mu\text{mol/L}$)	EC ₅₀ /($\mu\text{mol/L}$)	zAI
Curcumin	35.6	1.3	27.4
Yakuchinone A	93.7	5.2	18
Yakuchinone B	41	9.8	4.2

4 讨 论

斑马鱼是一种小型热带鱼,是研究发育生物学、遗传学、环境毒理学等学科的重要模式生物^[10]。人类血管生成过程中起重要作用的基因,如 VEGF、KDR、FLT1、ANGPT1、ANGPT2、TIE1、TIE2 等在斑马鱼中的表达模式与哺乳动物非常相似^[11-12]。另外,斑马鱼模型还具有体积小、饲养方便、产卵数量多、加药简便、鱼卵早期透明等优势。因此,已经成为血管生成抑制剂筛选的重要模型。

由于体外细胞实验容易产生脱靶效应(off-target effect),此外不能很好地分辨化合物的毒性,因此大大降低了药物筛选的有效命中率。本研究利用抑制指数(AI)这一指标,将 3 个二苯基庚烷类化合物的活性与毒性进行平行比较,能够更加客观地反应化合物真实的血管生成抑制作用。本研究的体外实验和体内实验所得到的血管生成抑制

指数排序结果一致,即姜黄素的抑制作用最强,毒性最低;其次是 Yakuchinone A,抑制作用最弱、毒性最大的是 Yakuchinone B。

对二苯基庚烷类化合物的血管生成抑制活性进行构效关系研究,还需要进一步积累结构多样性的此类化合物。本研究结果表明,二苯基庚烷类化合物可能是益智仁乙酸乙酯部位产生血管生成抑制作用的物质基础。

参 考 文 献

[1] Finley SD, Chu LH, Popel AS. Computational systems biology approaches to anti-angiogenic cancer therapeutics[J]. *Drug Discov Today*,2014. doi:10.1016/j.drudis.2014.09.026.

[2] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. *N Engl J Med*,1971,**285**:1182-1186.

[3] He MF, Huang YH, Wu LW, *et al*. Triptolide functions as a potent angiogenesis inhibitor[J]. *Int J Cancer*,2010,**126**(1):266-278.

[4] He ZH, He MF, Ma SC, *et al*. Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives[J]. *J Ethnopharmacol*,2009,**121**(2):313-317.

[5] Zhao D, Qin C, Fan X, *et al*. Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis in larval zebrafish and human umbilical vein endothelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*,2014,**723**:360-367.

[6] Alex D, Lam IK, Lin Z, *et al*. Indirubin shows anti-angiogenic activity in an *in vivo* zebrafish model and an *in vitro* HUVEC model[J]. *J Ethnopharmacol*,2010,**131**(2):242-247.

[7] Chun KS, Park KK, Lee J, *et al*. Inhibition of mouse skin tumor promotion by anti-inflammatory diarylheptanoids derived from *Alpinia oxyphylla* Miquel (Zingiberaceae)[J]. *Oncol Res*,2002,**13**(1):37-45.

[8] He ZH, Ge W, Yue GG, *et al*. Anti-angiogenic effects of the fruit of *Alpinia oxyphylla*[J]. *J Ethnopharmacol*,2010,**132**(2):443-449.

[9] Shoji N, Umeyama A, Takemoto T, *et al*. Isolation of a cardiotonic principle from *Alpinia oxyphylla*[J]. *Planta Med*,1984,**50**(2):186-187.

[10] Wang CM, Jing LJ, Wei YJ, *et al*. Evaluation of antiosteoporotic activity for micro-amount asperosaponins V and VI by on the osteoporosis model using zebrafish[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报),2014,**45**(1):88-91.

[11] Liang D, Chang JR, Chin AJ, *et al*. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development[J]. *Mech Dev*,2001,**108**:29-43.

[12] Pham VN, Roman BL, Weinstein BM, *et al*. Isolation and expression analysis of three zebrafish angiopoietin genes[J]. *Dev Dyn*,2001,**221**(4):470-474.