

新型大豆苷元磺酸酯抑制血管 平滑肌细胞增殖活性

彭 游^{1,2,3}, 赵文红², 邓泽元², 叶志刚¹

(1. 九江学院 化工学院, 江西 九江 332005; 2. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047; 3. 江西省鄱阳湖生态经济研究中心, 江西 九江 332005)

摘 要: 为寻找对血管平滑肌细胞异常增殖有较强抑制作用的化合物, 用 MMT 法考察新型大豆苷元磺酸酯体外抑制血管平滑肌细胞增殖活性。结果表明: 该大豆苷元磺酸酯对血管平滑肌细胞增殖在 10^{-6} mol/L 时有抑制作用 ($P < 0.05$), 该浓度下的抑制率为 64.62%, 与先导化合物大豆苷元相比活性提高约 100 倍。构效关系研究表明, 大豆苷元经苯磺酸酯修饰, 改变分子的空间结构、分子的可极化率从 26.51 增加到 40.32, 改变了药物的电荷分布, 更有利于药物通过细胞膜到达靶标和与靶标更精确作用而导致药物药理作用大大增强。药理实验与构效关系研究初步表明, 该大豆苷元磺酸酯有进一步药理研究价值。

关键词: 大豆苷元; 磺酸酯衍生物; 血管平滑肌细胞; 构效关系

中图分类号: R932 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)06-0844-05

Inhibition effects of novel daidzein sulfonate on the proliferation of vascular smooth muscle cells

PENG You^{1,2,3}, ZHAO Wen-Hong², DENG Ze-Yuan², YE Zhi-Gang¹

(1. Department of Chemistry and Engineering, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Jiangxi Poyang Lake Ecological Economy Research Center, Jiujiang 332005, China)

Abstract: To find compounds that have a strong inhibitory effect to the proliferation of vascular smooth muscle cells, inhibition effects of novel daidzein sulfonate on the proliferation of vascular smooth muscle cells were investigated *in vitro* with MMT method. The result showed that its inhibiting rate on the proliferation of vascular smooth muscle cells was 64.62% in the 10^{-6} mol/L of the novel daidzein sulfonate ($P < 0.05$), and it increased by about 100-fold compared with the inhibiting rate of lead compound daidzein. The construction effect relations studies indicated, its spatial structure and charge distribution were changed, its polarizability increased from 26.51 to 54.12, and these factors were more beneficial to the arrival at the target through the cell membrane and action more precisely with the target that led its pharmacological action to enhance greatly after its beautification of benzene sulfonate.

Key words: daidzein; sulfonate derivate; vascular smooth muscle cell; construction effect relation

葛根、大豆等植物中的次生代谢产物黄酮类化合物虽然具有多种生理活性, 如抗氧化、雌激素样作用、抗癌以及抗动脉粥样硬化及抑制 DNA 的合成等 (Naghma 等, 2008; 韩静等, 2004; 王虹等, 2004;

Aedin 等, 2008)。但不同的黄酮功能效果不一, 有些作用并不十分理想。究其原因, 可能是这些黄酮类化合物在水相或/和油相中溶解度低、在机体内生物利用度低、代谢途径复杂、靶向性差等药代动力学

收稿日期: 2010-12-24 修回日期: 2011-06-02

基金项目: 江西省自然科学基金(2010GZNO106); 江西省教育厅科技项目(GJJ08440, GJJ11626) [Supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province(2010GZNO106); the Science and Technology Item of Department of Education of Jiangxi Province(GJJ08440, GJJ11626)]

作者简介: 彭游(1971-), 男, 重庆万州人, 博士, 副教授, 研究方向为食品化学与营养, (E-mail) trihydracid@126.com.

性质不理想,但也有可能是这些类黄酮分子本身的药效学性质欠佳。

血管平滑肌细胞(Vascular Smooth Muscle Cell, VSMC)的异常增殖是许多血管增殖性疾病如高血压、冠状动脉硬化性心脏病、血管成形术后再狭窄的共同病理基础,因此抑制血管平滑肌细胞异常增殖是治疗血管增生性疾病的重要途径(王虹等, 2004)。葛根异黄酮中葛根素(Puerairin, PA)抑制

VSMC 增殖的活性不如大豆苷元(daidzein, DZ),可能是由于 DZ 的脂溶性更好(韩静等, 2004)。本实验室在 DZ 分子中引入苯磺酸酯基以大幅度提高脂溶性,合成其新型大豆苷元苯磺酸酯(Daidzein Benzensulfonate, DBS)衍生物(Peng 等, 2008)。对其进行体外抑制血管平滑肌细胞增殖实验,以期获得对 VSMC 增殖具有强抑制能力的大豆苷元苯磺酸酯衍生物。DZ 及其衍生物结构见图 1。

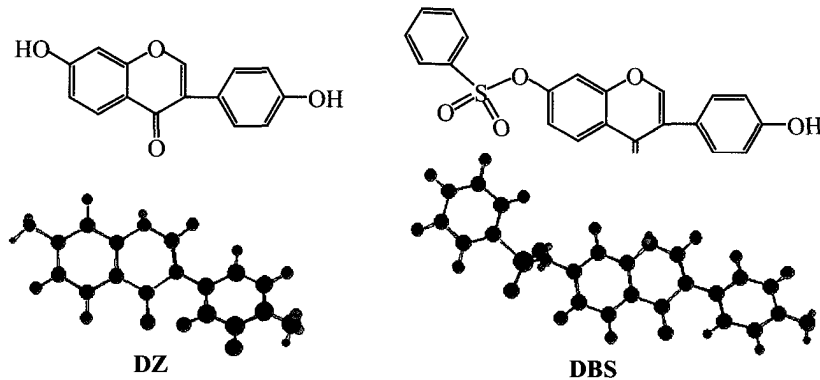


图 1 大豆苷元及其衍生物的结构与最低能量构象

Fig. 1 Structure and minimize energy conformation of daidzein and its derivate

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

DZ 购于陕西慧科植物开发有限公司,纯度大于 98%,其它试剂均为化学纯或分析纯。干粉培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco, DMEM), Gibco 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 杭州四季青;胰蛋白酶, Sigma; 96 孔培养板, Corning; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), 北京中山金桥; 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、青霉素、链霉素、谷氨酰胺、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、台盼兰等购自 Amresco。

长锦 CO₂ 培养箱;倒置生物相差显微镜(上海光学进出口有限公司);酶联免疫检测仪(Thermo electron corporation, USA); ChemAxon 5. 2. 1. 0。

1.2 实验方法

1.2.1 血管平滑肌细胞的培养 取自然分娩的健康胎儿脐带,用眼科镊仔 细剥离出脐静脉,置于含有无 菌 DMEM 培养液的培养皿中;以眼科镊夹取,去除外部的脂肪与结缔组织,仅余白色静脉管;纵向剪开血管,冲洗静脉内壁,并用棉签刮除血管内皮;用眼

科剪把静脉管剪成约 1 mm³ 的小块;转移至培养瓶中并均匀涂布于培养瓶壁上;竖直放置于培养瓶,放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中使之干燥贴壁(2~3 h)后;加入含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液 4 mL,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱(湿度 100%)内静置培养;每 3 d 更换新鲜培养液 1 次,每次保留 1/3 的原液;并置显微镜下观察细胞附着与生长情况,到组织块周围迁移出细胞并汇合成片时可用 0. 25% 胰蛋白酶、0. 02% EDTA 消化传代进行传代培养。

1.2.3 VSMCs 增殖实验 收集第五代细胞培养 24 h,换成无血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h,使细胞静止于 G₀/G₁ 期;分于 96 孔板,每孔 180 μL, 3 000~10 000 个/孔,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱,无血清的 DMEM 培养液培养 24 h,使细胞贴壁;随机分为对照组和不同浓度加药组,小心吸去上清,分别加入待筛样品 20 μL,及 80 μL 含 5% 高脂血清的 DMEM 培养液,每组设 3 个复孔,继续培养 48 h 后进行各项检测(王虹等, 2004)。

1.2.4 MTT 比色法检测细胞活性 取增殖细胞,再加入 20 μL MTT(3-(4,5-二甲 基噻唑-2)-2,5-二苯 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)溶液继续培养 4 h 后,吸掉上清,每孔加入 150 μL DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使

结晶物充分溶解;在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光值;同时设置调零孔(培养基、MTT、DMSO)及对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、DMSO),每组设定 3 复孔。

$$\text{抑制率} = (\text{对照} - \text{给药}) / (\text{对照} - \text{空白}) \times 100\%$$

1.3 数据处理

以 $\bar{X} \pm SD$ 表示结果,用 spss11.0 软件处理数据,实验统计采用 F 检验, $P < 0.05$ 为达显著性水平。

2 结果与分析

2.1 抑制血管平滑肌细胞增殖活性

采用 MTT 法测定了大豆苷元衍生物 DBS 的

表 1 大豆苷元及衍生物抑制血管平滑肌细胞增殖活性^a
Table 1 Inhibitory rate of daidzein and its derivatives on proliferation of vascular smooth muscle cells

浓度 Concentration (mol/L)	大豆苷元磷酸酯 DBS		大豆苷元 DZ	
	光密度 ODb	抑制率 Inhibitory rate(%)	光密度 ODb	抑制率 Inhibitory rate(%)
10^{-4}	$0.092 \pm 0.01^*$	84.47	$0.151 \pm 0.051^*$	68.35
10^{-5}	$0.128 \pm 0.012^*$	74.64	0.263 ± 0.052	37.35
10^{-6}	$0.164 \pm 0.017^*$	64.62	0.285 ± 0.022	31.56
10^{-7}	0.187 ± 0.014	28.46	0.311 ± 0.012	24.45
10^{-8}	0.322 ± 0.029	21.45	0.325 ± 0.03	20.81

注: a. 空白组的光密度为 0.035 ± 0.01 , 对照组的光密度为 0.401 ± 0.021 ; b. 光密度; * 与控制组相比, $P < 0.05$ 。

Note: a. Optical density of the blank group was 0.035 ± 0.01 , optical density of the control group was 0.401 ± 0.021 . b. Optical density; * Compared with the control group, $P < 0.05$.

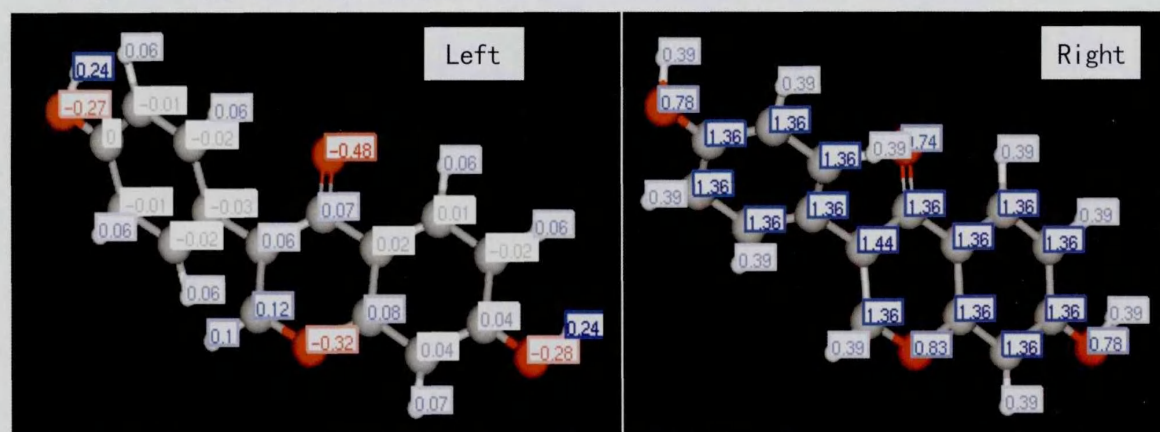


图 2 大豆苷元的电荷(左)与可极化率分布(右)

Fig. 2 Charge (L) and polarizability (R) of daidzein

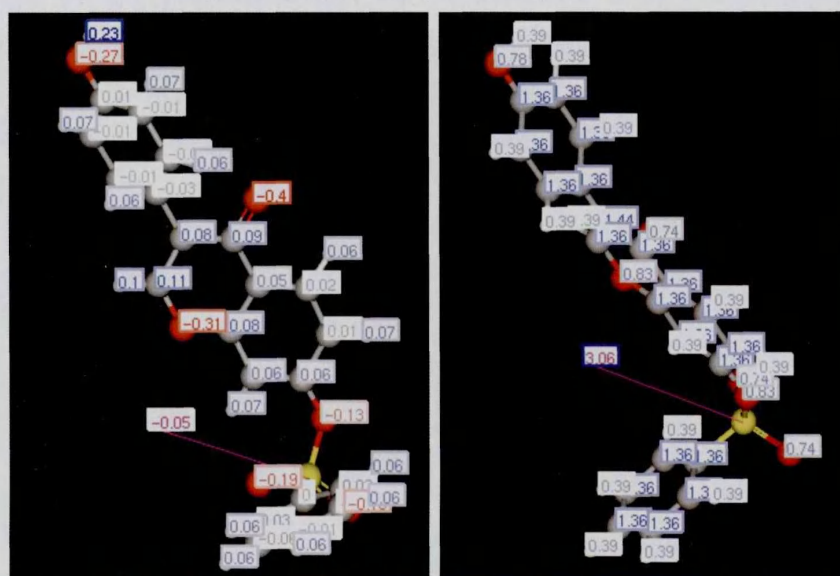


图 3 大豆苷元苯磺酸盐的电荷(左)与可极化率分布(右)

Fig. 3 Charge (L) and polarizability (R) of daidzein benzenesulfonate

体外抑制血管平滑肌细胞增殖活性,并与 DZ 对比,实验结果见表 1。由表 1 可知,DZ 的活性远较 DBS 低。在选用 DBS 的浓度为 $10^{-4} \sim 10^{-8}$ mol/L 之间,其中三个浓度 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} mol/L 在 48 h 对细胞增殖均有显著的抑制作用($P < 0.05$),且各浓度间有显著差异。

通过分析 DBS 的结构可知,7-OH 被苯磺酸酯基取代,说明 7-OH 封闭有利于该类衍生物体外抑制血管平滑肌细胞增殖活性的增加,活性次序为: DBS > DZ。

有文献报道 DZ 可抑制人脐动脉平滑肌细胞的增殖(韩静等,2004), 10^{-4} mol/L 的抑制率可达 60%。本实验结果为 68.35%,与韩静等(2004)报道的结果较一致。作者进一步做了 RT-PCR 实验,从基因角度解释了 DZ 与 PA 抑制平滑肌细胞增殖的原因,作用的差别也可能是大豆苷元更偏脂溶性,易于通过细胞膜发挥作用。这也说明对大豆苷元的脂溶性的修饰,有利于提高其抑制血管平滑肌细胞增殖活性,这从分子机制上得以证明。

2.2 大豆苷元与衍生物的电荷分布与可极化率

由 chemoffice2002 搜寻得到 DZ 与衍生物 DBS 的最低能量构象(minimize energy conformation, MEC)见图 1。采用计算机辅助药物设计软件 Chem-Axond 对 DZ 与衍生物 DBS 进行电荷分布与可极化率进行计算,结果见图 2~3。对比图 2~3(左),经修饰后的 DBS 电荷分布与 DZ 相比,发生改变明显。

由图 1~3 可知,DZ 引入苯磺酸酯基后,其磺酸酯键部分 S 由于与强电负性的 O 相连,磺酸酯键有强电负性,使与之相连的苯环(DBS 中的 A 环, C 环)有更高的正电荷,在分子中形成正电荷中心。DZ、DBS 的可极化率分别为 26.51、54.12(图 2~3),表明在 DZ 引入苯磺酸酯基的修饰,优化其药效学构象、增加了分子的可极化率和变形性。

3 结论与讨论

3.1 讨论

药物产生的治疗效应来自同功能性大分子的相互作用。大部分药物通过与生物受体分子的分子间相互作用而发挥疗效(郭宗儒,2005),作用的特异性依赖于药物分子内化学基团的一种精确结合和空间排列。由于分子间的化学键合和物理吸附所包含的力基本是短距离力,在药物的特异性活性基团与生

物受体的互补基团间的契合问题是高度关联的。药物分子的大小、整个分子的形状、药物分子内主要结构部分的空间位置与必需基团的相对方位都极为重要。结构特异性药物的微小化学结构改变会导致其药理反应相应地甚至显著地改变(郭宗儒,2003)。

根据受体学说,药物和其他生理活性物质产生作用,是通过与机体内受体的结合,产生激动或拮抗的作用。由于受体大多是具有特定空间结构的生物大分子,而药物与受体的作用也是有其特定区域的,因而药物的分子结构自然会对药物与受体分子的结合、以及对维系这种结合的作用力产生影响,这便是药效相构效关系存在的机理(薛东,2002)。生理活性物质与受体相互作用的时候,分子的构像会发生变化,与受体结合的构像称作药效构像,对大多数分子而言,其药效构像与稳定构像是不同的,有些药物会以不同的构像与不同的受体结合,从而产生不同的生理活性。

DZ 在抑制人脐动脉平滑肌细胞增生的过程中可能是通过促进了蛋白 H3A 的表达来抑制人脐动脉平滑肌细胞的迁移和增生(韩静,2004)。药物如与组蛋白 H3A 电荷分布匹配,则可能相互结合形成复合物。由于 S 具有很大的可极化率,一方面分子的变形性增加,有利于药物分子 DBS 以适当的构型与受体蛋白 H3A 进行互补性结合。另一方面特别是 DBS 与受体蛋白分子作用力也越大,有利于药物与受体蛋白分子键合作用而产生药效。在 DZ 引入苯磺酸酯基的修饰,优化其药效学构象、增加了分子的可极化率和变形性。受体 H3A 作为蛋白,其立体结构电子密度分布是不均匀的,大豆苷元苯磺酸酯基修饰物的电子可能适合该蛋白分子(H3A)的电荷分布,则有利于相互结合,形成复合物,这改变了药物的电荷分布,更有利于药物与靶标识别作用而导致药物药效性质的根本性改变。

综上所述,在 DZ 引入苯磺酸酯基修饰后,其衍生物抑制 VSMC 增殖的活性极大提高,可能是苯磺酸酯基的引入优化了空间结构、增加了分子的可极化率和变形性,改变了药物的电荷分布,有利于药物更有效的与靶标的识别作用而导致药物药效性质的根本性改变。

3.2 结论

DZ 有弱的抑制血管平滑肌细胞增殖的作用,由实验的标准,其活性还达不到“有效”的标准,而其苯磺酸酯的修饰物 DBS 有较好的活性。DZ 的脂溶性

衍生物 DBS 具有优良的抑制血管平滑肌细胞增殖活性,该衍生物有进一步筛选价值。可见对 DZ 的脂溶性修饰优化了其结构,改变分子的空间结构、增加了分子的可极化率和变形性,改变了药物的电荷分布,更有利于药物通过细胞膜到达靶标和与靶标更精确作用而导致药物生物学作用大大提高。

参考文献:

- 郭宗儒. 2005. 药物分子设计[M]. 科学出版社:511-517
- 郭宗儒. 2003. 药物化学总论[M]. 第2版. 中国医药科技出版社:105-150
- 薛东. 2002. 大豆苷元衍生物的合成与药理作用研究[D]. 硕士论文. 陕西师范大学
- 韩静. 2004. 葛根异黄酮抑制血管平滑肌细胞增殖作用机制的实验研究[D]. 硕士论文. 北京中医药大学
- Aedin C, Bryn H, Rosa M. 2000. Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health[J]. *J Sci Food Agric*, **80**:1 044-1 047
- Han J(韩静), Wang W(王伟), Wang LY(王绿娅), et al. 2004. Effect of puerarin and daidzein on proliferating vascular smooth muscle cells(葛根素与大豆苷元对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用)[J]. *Chin Pharm J Chin Mat Med*(中国药学杂志), **29**(5):437-440
- Naghma K, Farrukh A, Hasan M. 2008. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise[J]. *Antioxid Red Signal*, **10**(3):475-510
- Peng Y(彭游), Deng ZY(邓泽元), Ye XL(叶兴琳). 2009. Design, synthesis and anticancer activity of isoflavone derivatives(异黄酮衍生物的设计、合成与抗肿瘤活性)[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), **21**:796-799
- Wang H(王虹), Gao XM(高秀梅), Zhang BL(张伯礼), et al. 2004. Influence of different component of danshen on the proliferation in vessel smooth muscle cell(丹参不同组分对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响)[J]. *Tianjin J Trad Chin Med*(天津中医药), **21**(3):231-233
- (地质通报), **26**(8):1 048-1 055
- Yang FM(杨福明). 1986. Vegetation category and use of March in the Ruergai Plateau(若尔盖高原沼泽植被类型及其利用)[J]. *Chin J Grassland*(中国草地科学), (1):19-23
- Yang FM(杨福明). 1998. The evolutionary way of moory vegetation of Ruergai Plateau(若尔盖高原沼泽植被的演替方式与途径.)([J]. *J Southwest Norm Univ*(西南师范大学学报), (3):77-86
- Yang YX(杨永兴). 1999. Ecological environment deterioration, mire degeneration egeneration and their formation mechanism in the Zoige Plateau(若尔盖高原生态环境恶化与沼泽退化及其形成机制)[J]. *J Mount Sci*(山地学报), **17**(4):318-323
- Yong GW(雍国玮), Shi CC(石承苍), Qiu PF(邱鹏飞). 2003. Monitoring on desertification trends of the grassland and shrinking of the wetland in Ruergai Plateau in Northwest Sichuan by means of remote-sensing(川西北高原若尔盖草地沙化及湿地萎缩动态遥感监测)[J]. *J Mount Sci*(山地学报), **21**(6):758-762
- Zhou HK(周华坤), Zhao XQ(赵新全), Zhou L(周立), et al. 2006. Alpine meadow degradation alter the clonal growing characteristics of *Potentilla anserina*(高寒草甸退化对鹅绒委陵菜克隆生长特征的影响)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), **26**(2):508-520
- Zhu Z(朱珠), Bao WK(包维楷), Pang XY(庞学勇), et al. 2006. Tourism effect on species composition and diversity of understory plants in *Abies fargesii* var. *faxoniana* forest in Jiuzhaigou, Sichuan(旅游干扰对九寨沟冷杉林下植物种类组成及多样性的影响)[J]. *Biodivers Sci*(生物多样性), **14**(4):284-291

(上接第 781 页 Continue from page 781)