

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.09.006

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191219.1459.005.html\(2019-12-19\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191219.1459.005.html(2019-12-19))

槲皮素对妊娠子宫动脉血管的舒张作用及机制研究*

李清华¹, 赵淑洋^{2#}, 尹陵轩², 司延如², 张翠娟³, 潘智芳^{2,4}, 杨潍潍^{2,4△}

(1. 潍坊医学院公共卫生与管理实验教学中心, 山东潍坊, 261053; 2. 潍坊医学院生物科学与技术学院, 山东潍坊, 261053; 3. 潍坊医学院附属医院产科, 山东潍坊, 261042; 4. 山东省生物药物重点实验室, 山东潍坊, 261053)

[摘要] **目的** 探讨槲皮素对妊娠子宫动脉内皮血管的舒张作用及其机制。**方法** 利用妊娠大鼠子宫动脉收缩张力反应, 观察槲皮素对大鼠内皮完整子宫动脉血管舒缩反应性的作用; 使用槲皮素处理妊娠大鼠子宫动脉环后, 采用 Western blot 法检测血管中磷酸化的内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和总 eNOS 的表达水平; 观察 eNOS 特异性抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)对槲皮素舒张大鼠血管功能的影响。**结果** 槲皮素能剂量依赖性地舒张苯肾上腺素(PE)预收缩的妊娠大鼠子宫动脉血管, 相比胸主动脉, 子宫动脉对槲皮素的反应更加敏感, 舒张幅度更大($P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 经槲皮素处理子宫动脉后, 大鼠血管内 eNOS 的磷酸化水平明显上升, 并呈剂量依赖效应($P < 0.01$)。使用 L-NAME 预处理子宫动脉血管后, 槲皮素对子宫动脉血管的舒张作用明显降低($P < 0.01$)。细胞实验发现, 槲皮素在人内皮细胞系中也能明显增强 eNOS 的磷酸化水平和一氧化氮(NO)的产生($P < 0.01$)。**结论** 槲皮素能剂量依赖性地舒张妊娠大鼠子宫动脉血管, 可能与 eNOS 磷酸化水平升高有关。

[关键词] 槲皮素; 子宫动脉; 血管舒张; 内皮型一氧化氮合酶; 子痫前期

[中图法分类号] R714.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)09-1400-05

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Relaxant effect of quercetin on uterine arterial vessels and its mechanism*

LI Qinghua¹, ZHAO Shuyang^{2#}, YIN Lingxuan², SI Yanru²,

ZHANG Cuijuan³, PAN Zhifang^{2,4}, YANG Weiwei^{2,4△}

(1. Public Health and Management Experimental Teaching Center, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China; 2. School of Biosciences and Technology, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China; 3. Department of Obstetrics, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261042, China; 4. Shandong Provincial Key Laboratory of Biopharmacy, Weifang, Shandong 261053, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relaxant effect of quercetin on uterine arterial endothelial vessel and its mechanisms. **Methods** The effect of quercetin on the intact endothelial uterine artery vasoconstriction reactivity in rat was observed by using the contractile tension reaction of uterine artery in pregnant rats. After treating the rat uterine arterial ring by using quercetin, the Western blot method was adopted to detect the phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the blood vessel and total eNOS levels. The effect of eNOS specific inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on the function of quercetin for relaxing the rat blood vessels was observed. **Results** Quercetin could relax the phenylephrine (PE) precontracted uterine arterial vessel in pregnant rat with dose dependence. Compared with the thoracic aorta, the reaction of

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81601318); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0668); 2016 年度山东省政府公派出国留学项目。 作者简介: 李清华(1984-), 实验师, 硕士, 主要从事生殖病理研究。 # 共同第一作者: 赵淑洋(1997-), 助理研究员, 在读本科生, 主要从事生殖病理研究。 △ 通信作者, E-mail: yangww@wfmcc.edu.cn.

uterine artery on quercetin was more sensitive, and the diastole range was larger ($P < 0.01$). The Western blot results showed that after treating the uterine artery by quercetin, the phosphorylation level of rat intravascular eNOS was significantly increased, moreover which showing the dose dependent effect ($P < 0.01$). After pre-treating uterine arterial vessel by L-NAME, the relaxant effect of quercetin on uterine arterial vessel was significantly decreased ($P < 0.01$). The cell experiment found that quercetin also could significantly enhance eNOS phosphorylation level in human endothelial cells and NO production ($P < 0.01$). **Conclusion** Quercetin can relax the pregnant rat uterine arterial vessel in a dose-dependent manner, which may be related with the increase of eNOS phosphorylation level.

[Key words] quercetin; uterine artery; vasorelaxation; endothelial nitric oxide synthase; preeclampsia

子宫胎盘组织的血液灌注对于维持正常妊娠至关重要^[1]。在正常妊娠过程中,母体血管舒张和血管反应性降低有助于增强对子宫胎盘的血液灌注,从而为发育中的胎儿提供足够的氧气和营养物质。妊娠期间子宫胎盘灌注不足将导致胎盘的缺血性损伤,释放各种细胞因子作用于母体,导致内皮细胞损伤,血管舒张功能障碍,血压升高,引发子痫前期等严重的妊娠并发症^[2],严重威胁母婴健康。

槲皮素是一种植物来源的黄酮类化合物,在人体内发挥抗氧化、抗炎和抗血管平滑肌收缩等多种生理活性^[3-4]。研究发现槲皮素可以舒张离体大鼠主动脉血管^[5],降低高血压患者的血压^[6]。但对于槲皮素在妊娠中的作用目前仍不清楚。本研究使用苯肾上腺素(PE)收缩妊娠大鼠子宫动脉环,观察槲皮素对 PE 预收缩妊娠大鼠子宫动脉环的舒张作用,旨在研究槲皮素在妊娠期间血管舒张中的作用机制,并进一步探讨其在子痫前期发病过程中的作用及在临床应用中的前景。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

采用孕 19 d 的 SD 大鼠进行血管环张力测定实验。实验大鼠购自北京市维通利华公司。所有实验动物食用经高压消毒的饲料,室温控制在 22 °C,昼夜节律 12/12 h。所有动物实验均遵守美国国家健康协会出版的实验动物饲养与使用指南(NIH Publication No.85-23, revised 1996),并得到潍坊医学院科研伦理委员会的许可。槲皮素、PE、乙酰胆碱(Ach)、内皮型-氧化氮合酶(eNOS)抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)及其他化学试剂均购自美国 Sigma 公司。亚硝酸盐/硝酸盐荧光测定试剂购自美国 Cayman Chemical 公司,小鼠抗 eNOS 和磷酸化 eNOS(p-eNOS)抗体购自美国 CST 公司。槲皮素以二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制成浓度为 2 mmol/L 的储存液,冷冻于 -80 °C 备用。

1.2 方法

1.2.1 观测孕大鼠子宫动脉收缩张力

使用异氟烷处死孕 19 d 的 SD 大鼠(220~250 g),立即手术分离胸主动脉和子宫动脉。剔除血管周围组织后,将胸主动脉和子宫动脉环切成 3~4 mm 的小段,放入 4 °C 预冷的生理盐水溶液(PSS)中,将子宫动脉用两根不锈钢微型挂钩贯穿血管腔,固定于浴槽,平衡 60 min,静息张力至 2 g,平衡 60 min 后所有子宫动脉用 1 μmol/L PE 预收缩子宫动脉环记录血管环张力变化;收缩稳定后 Ach 舒张血管,记录血管反应,评估子宫动脉环完整性。通过 1 μmol/L PE 预收缩子宫动脉环,当收缩反应稳定后,依次加入不同浓度的槲皮素。观测不同浓度槲皮素对 SD 大鼠胸主动脉和子宫动脉收缩作用的影响。实验中的收缩作用主要是用药后每个浓度引起的子宫动脉收缩张力与 PE 引起的子宫动脉血管环的收缩反应张力的百分比来表示。实验结束后,充分洗去药物,再加入氯化钾,观察血管收缩状态。

1.2.2 L-NAME 对槲皮素血管舒张作用的抑制分析

分离孕鼠子宫动脉环,经评估后选择完整的子宫动脉环研究 L-NAME 抑制对子宫动脉血管的舒张作用,在 PE 诱导的子宫动脉环收缩稳定后加入 100 μmol/L 浓度的 L-NAME,孵育 15 min,连续加入不同浓度的槲皮素(L-NAME 处理组),记录每次加入槲皮素后的张力变化,以未加入 L-NAME 为对照组。

1.2.3 蛋白质印迹分析

将大鼠子宫动脉环与 50 μmol/L 的槲皮素共同孵育,不同时间点检测 eNOS 的磷酸化水平;不同浓度的槲皮素(1、5、10、25、50、100 μmol/L)孵育 15 min,Western blot 检测 p-eNOS 和总 eNOS 水平。使用 RIPA 裂解液裂解提取总蛋白,BCA 法定量。取等量蛋白样品,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,湿转,封闭 2 h,4 °C 孵育一抗过夜,TBST 洗膜后二抗孵育 2 h,辣根过氧化物酶-增强

化学发光法(HRP-ECL)显色,凝胶扫描仪成像。首先用磷酸化特异的 eNOS 抗体与膜进行蛋白杂交,然后酸洗硝酸纤维素膜(NCM)并用总 eNOS 抗体重新孵育。使用图像分析软件(Image J,NIH)对蛋白质条带进行光密度定量分析,实验重复 3 次。

1.2.4 一氧化氮(NO)检测

为了研究槲皮素对内皮细胞释放 NO 的影响,使用 12 孔板培养人子宫动脉内皮细胞,原代 HAECs 细胞使用含有 2% FBS 和 EGM2 的 M199 培养基进行培养,37 °C、5% CO₂、0.05% 胰蛋白酶消化细胞传代。隔天换液,直到细胞密度至 70%~80% 时开始血清饥饿,使用不同浓度的槲皮素(0、1、5、10 μmol/L)孵育处理血清饥饿的人主动脉内皮细胞(HAEC)30 min。收集处理的 HAEC 和培养液,通过 Western blot 检测细胞中 eNOS 的磷酸化水平,通过检测释放到培养基中的亚硝酸盐和硝酸盐(NO_x)比值来评估 NO 产量。实验重复 3 次。

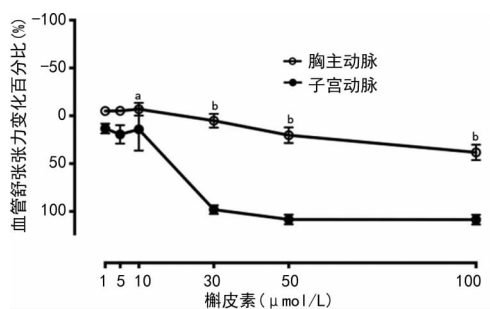
1.3 统计学处理

数据采用 Graphpad7.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Student-t 检验或单因素方差分析 ANOVA,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对子宫动脉与胸主动脉舒张幅度比较

10 μmol/L 的槲皮素即可明显舒张预收缩的子宫动脉环,且随槲皮素累积浓度的增加,子宫动脉舒张幅度明显增加,当累积浓度达到 50 μmol/L 时,子宫动脉环完全舒张[(100.5 ± 5.2)%],而胸主动脉的血管舒张幅度为(27.5 ± 10.0)%,二者比较差异有统计学意义($P < 0.01$);当槲皮素浓度达到 100 μmol/L 时,对比依然明显($P < 0.01$)。统计分析结果显示,胸主动脉血管的半最大效应浓度(EC₅₀)为 61.2 μmol/L,子宫动脉的 EC₅₀ 仅为 14.4 μmol/L,槲皮素对子宫动脉与胸主动脉舒张幅度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

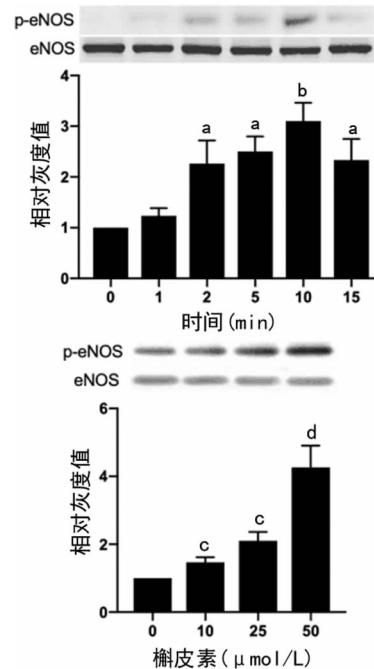


^a: $P < 0.05$; ^b: $P < 0.01$, 与子宫动脉比较。

图 1 槲皮素对子宫动脉与胸主动脉舒张幅度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.2 槲皮素诱导妊娠大鼠子宫动脉组织 p-eNOS 水平上升

Western blot 分析发现,大鼠子宫动脉组织中 p-eNOS 水平随时间逐渐升高,在 10 min 时 p-eNOS 水平最高;不同浓度槲皮素处理大鼠子宫动脉组织,10 min 时检测组织中 p-eNOS 水平,发现随槲皮素处理的浓度增加,大鼠组织中 p-eNOS 水平明显增强,见图 2。

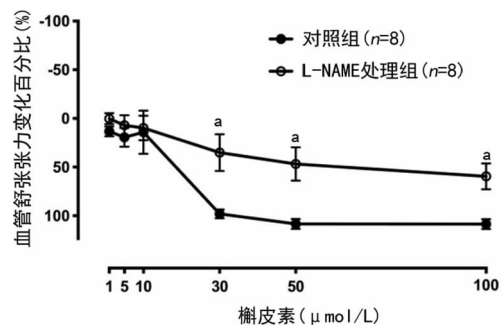


^a: $P < 0.05$; ^b: $P < 0.01$, 与 0 min 比较; ^c: $P < 0.05$; ^d: $P < 0.01$, 与 0 μmol/L 槲皮素比较。

图 2 槲皮素剂量依赖性地激活大鼠子宫动脉中的 p-eNOS

2.3 槲皮素诱导血管舒张被 eNOS 抑制剂部分抑制

槲皮素松弛 PE 诱导的血管收缩作用被 L-NAME 部分消除,槲皮素累积浓度 100 μmol/L 时,相对对照组(100.0 ± 7.6)% 的舒张,L-NAME 处理组的大鼠子宫动脉环舒张明显降低,为(57.0 ± 12.3)%,见图 3。

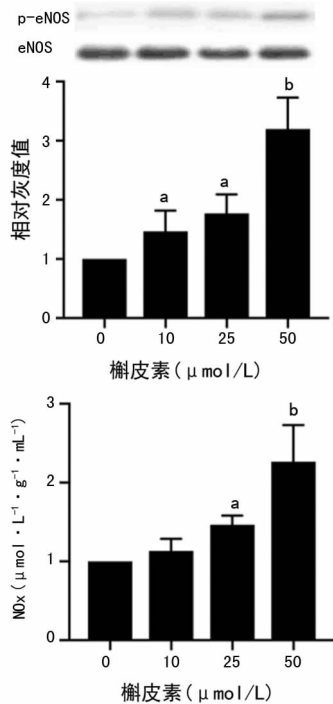


^a: $P < 0.05$; ^b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 3 槲皮素诱导的血管舒张作用被 L-NAME 部分消除

2.4 槲皮素刺激 HAEC 中的 p-eNOS 和 NO 产生

Western blot 结果显示,槲皮素能剂量依赖性地增强 p-eNOS 水平,同时增加人内皮细胞中 NO 的产生,见图 4。



a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素比较。

图 4 槲皮素刺激 HAEC 中的 p-eNOS 和 NO 产生

3 讨论

子痫前期严重威胁母婴健康,是临床上导致产妇与胎儿死亡或损伤的重要因素,除终止妊娠外尚无有效的治疗干预手段^[1]。对子痫前期进行各方面的研究以有效地降低其对孕产妇和胎儿生命的威胁,具有极其重要的意义。

有研究报道表明,子痫前期患者的交感神经兴奋性高于正常孕妇^[7-10]。交感神经兴奋促进肾上腺素与去甲肾上腺素的分泌增加,诱发全身血管收缩,血压升高。SPASOJEVIC 等^[11]认为子痫前期是一种血管收缩状态,其对患者的影响比高血压更为严重。BRENNAN 等^[12]在 RUPP 大鼠子痫前期动物模型中研究发现高血压与肾上腺素能受体诱导的血管收缩有关。在本研究中,首先利用 PE 预收缩妊娠大鼠子宫动脉环,然后往浴槽中加入槲皮素,随着槲皮素累积浓度增加,结果发现,槲皮素能迅速有效地舒张 PE 预收缩的血管,在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,收缩的子宫动脉环近乎完全舒张;相比胸主动脉,子宫动脉对槲皮素更加敏感。这些结果表明,槲皮素对子宫动脉血管的舒张作用更为明显,子宫动脉可能是妊娠过程中槲皮素作用的重要靶器官。

LI 等^[3]报道指出,槲皮素通过影响磷酸化调控 eNOS 酶的活性,促进 NO 的产生,进而有效改善血管舒张。但槲皮素的血管舒张作用不能通过抑制 eNOS 活性完全消除,表明槲皮素可通过多种机制促进血管舒张。在其他关于类黄酮 NO 调控的研究中也发现了类似的现象^[13-14]。

为进一步研究 eNOS/NO 系统在 PE 预收缩的血管舒张反应中的作用,本研究在 PE 诱导的收缩反应稳定后,加入 eNOS 特异性抑制剂 L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$),依次连续加入不同剂量的槲皮素。本研究的研究表明,槲皮素可通过作用于妊娠大鼠子宫动脉血管内皮细胞,导致 eNOS 快速活化和 NO 产生,从而引起大鼠子宫动脉环血管张力的松弛,进而明显降低子痫前期大鼠的血压。为了确定槲皮素在人体内是否存在类似作用,本研究使用人子宫动脉血管内皮细胞进行了体外研究。本研究的体外细胞实验也表明,槲皮素还能在人原代 HAEC 细胞中增强 eNOS 活性和随后的 NO 产生,与动物实验结果一致。槲皮素能够影响人内皮细胞 p-eNOS 水平,提示本研究中槲皮素有可能在子痫前期患者体内通过影响 eNOS 促进子宫动脉舒张,从而改善胎盘供血不足的情况。本研究可为进一步对槲皮素在临床上的研究和应用提供理论基础。

本研究的创新之处主要体现在两个方面,(1)本研究通过比较研究发现,孕鼠子宫动脉对槲皮素的反应非常敏感,50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的槲皮素能够完全放松被 PE 紧缩的子宫动脉血管,预示了槲皮素在舒张孕期血管改善血管功能方面的潜在作用;(2)本研究使用人内皮细胞系研究,发现 eNOS/NO 信号通路在人内皮细胞也存在,且受槲皮素调控,本研究认为槲皮素可能通过调控 eNOS/NO 通路促进人子宫动脉的舒张作用,改善血管功能。不足之处主要是未在体内水平上研究槲皮素舒张血管可能导致的血压、血流和胎盘灌注等生理功能变化,基于本研究的数据可以推测,在由血管过度收缩或舒张不足导致的子宫血管灌注功能障碍相关疾病中,槲皮素可以改善血压、血流和胎盘灌注等生理功能,但还缺少动物模型水平上的研究和临床水平上的验证。

综上所述,对槲皮素在妊娠大鼠子宫动脉血管舒张中作用研究的基础上,结合此前的研究报道^[6,15],有理由推测,槲皮素可能对子痫前期患者的血管舒张也发挥一定的调控作用。这些结果均提示了槲皮素在子痫前期研究与临床干预治疗中的可能前景。

参考文献

- [1] MOL B W, ROBERTS C T, THANGARATINAM S, et al. Pre-eclampsia[J]. *Lancet*, 2016, 387(10022): 999-1011.
- [2] SHAO X, WANG Y Q, LIU Y L, et al. Association of imbalanced sex hormone production with excessive procoagulation factor SerpinF2 in preeclampsia[J]. *J Hypertens*, 2019, 37(1): 197-205.
- [3] LI P G, SUN L, HAN X, et al. Quercetin induces rapid eNOS phosphorylation and vasodilation by an Akt-Independent and PKA-Dependent mechanism[J]. *Pharmacology*, 2012, 89(3/4): 220-228.
- [4] ANAND DAVID A V, PARASURAMAN S. Overview of biological importance of quercetin; a bioactive flavonoid[J]. *Pharmacogn Rev*, 2016, 10(20): 84-89.
- [5] OYAGBEMI A A, OMOBOWALE T O, ASEUNGA E R, et al. Quercetin attenuates hypertension induced by Sodium fluoride via reduction in oxidative stress and modulation of HSP 70/ERK/PPAR gamma signaling pathways[J]. *Biofactors*, 2018, 44(5): 465-479.
- [6] SAHEBKAR A, SIMENTAL-MENDÍA L E, KOVANEN P T, et al. Effects of quercetin on blood pressure; a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2018, 12(2): 80-96.
- [7] JARVIS S S, SHIBATA S, BIVENS T B, et al. Sympathetic activation during early pregnancy in humans[J]. *J Physiol*, 2012, 590(15): 3535-3543.
- [8] OKADA Y, BEST S A, JARVIS S S, et al. Asian women have attenuated sympathetic activation but enhanced renal-adrenal responses during pregnancy compared to Caucasian women[J]. *J Physiol*, 2015, 593(5): 1159-1168.
- [9] YOUSIF D, BELLOS I, PENZLIN A I, et al. Autonomic dysfunction in preeclampsia; a systematic review[J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 816.
- [10] SPRADLEY, F T. Sympathetic nervous system control of vascular function and blood pressure during pregnancy and preeclampsia[J]. *J Hypertens*, 2019, 37(3): 476-487.
- [11] SPASOJEVIC M, SMITH S A, MORRIS J M, et al. Peripheral arterial pulse wave analysis in women with pre-eclampsia and gestational hypertension[J]. *BJOG*, 2005, 112(11): 1475-1478.
- [12] BRENNAN L, MORTON J S, QUON A, et al. Postpartum vascular dysfunction in the reduced uteroplacental perfusion model of preeclampsia[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162487.
- [13] GENTILE D, FORNAI M, PELLEGRINI C, et al. Luteolin prevents cardiometabolic alterations and vascular dysfunction in mice with HFD-Induced obesity[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1094.
- [14] HAN F, LI K, PAN R Y, et al. Calycosin directly improves perivascular adipose tissue dysfunction by upregulating the adiponectin/AMPK/eNOS pathway in obese mice[J]. *Food Funct*, 2018, 9(4): 2409-2415.
- [15] EDWARDS L R. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects[J]. *J Nutr*, 2007, 137(11): 2405-2411.

(收稿日期: 2019-07-18 修回日期: 2019-12-10)