

# 怀菊花茎叶中聚炔类化合物对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞损伤的保护作用

王小兰<sup>1,3</sup>, 石静亚<sup>2</sup>, 李孟<sup>2</sup>, 王滢清<sup>2</sup>, 郑晓珂<sup>2,3</sup>, 冯卫生<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>河南中医药大学中医药科学院; <sup>2</sup>河南中医药大学药学院; <sup>3</sup>河南省中药开发工程技术研究中心, 郑州 450046

**摘要:** 研究怀菊花茎叶中分离得到的聚炔类化合物对氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 损伤的保护作用及初步探讨作用机制。采用 ox-LDL(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 HUVECs 细胞建立内皮细胞损伤模型, 同时给予聚炔类化合物 **1**~**10**(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 干预; 通过 CCK-8 法检测细胞生存率, 筛选出有细胞保护作用的目标化合物; 采用目标化合物 **5** 和 **9**(12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 干预细胞 24 h, CCK-8 检测细胞生存率, 采用流式细胞术检测细胞凋亡率和活性氧(reactive oxygen species, ROS) 生成率, 酶联免疫(ELISA) 检测细胞上清液中白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-6(interleukin-6, IL-6) 及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 含量; 细胞免疫印迹法(In-Cell Western) 检测细胞中核转录因子- $\kappa\text{B}$ (nuclear transcription factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ ) 2p100/p52 与 NF- $\kappa\text{B}$ p65 蛋白的相对表达水平。结果显示: 与正常对照组(Con) 相比, 模型组(ox-LDL) 中的细胞生存率明显下降, 细胞凋亡率、ROS 生成, 炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  明显升高( $P < 0.01$ ); 与 ox-LDL 组相比, 聚炔类化合物 **5** 和 **9** 可以明显提高 HUVECs 细胞的生存率、降低细胞凋亡率、ROS 生成率, 炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  的分泌( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 下调 NF- $\kappa\text{B}$  2p100/p52、NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白的表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。综上所述, 怀菊花茎叶中聚炔类成分可以改善 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞损伤与功能障碍, 其作用机制可能与 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路相关。

**关键词:** 怀菊花茎叶; 聚炔类化合物; HUVECs; 凋亡与炎症; NF- $\kappa\text{B}$

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)10-1742-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.10.011

## Protective effect of polyacetylene compounds from the stem and leaves of *Chrysanthemum morifolium* Ramat on the HUVECs damage induced by ox-LDL

WANG Xiao-lan<sup>1,3</sup>, SHIJing-ya<sup>2</sup>, LI Meng<sup>2</sup>,  
WANG Ying-qing<sup>2</sup>, ZHENG Xiao-ke<sup>2,3</sup>, FENG Wei-sheng<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine;

<sup>2</sup>School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine;

<sup>3</sup>The Engineering and Technology Center for Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China

**Abstract:** The aim of this research was to study the protective effect of polyacetylene compounds isolated from the stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* Ramat on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) damaged by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), and explore the preliminary mechanism of effect. HUVECs cells were treated with ox-LDL (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to establish the endothelial cell injury model, and polyacetylene compounds **1**-**10** (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were given at the same time. The cell survival rate was measured by CCK-8, and the target compounds with cell protection were screened. The compounds **5** and **9** (12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were used to treat the cells for 24 h, CCK-8 was used to detect the cell survival rate, and flow cytometry was used to detect the apoptosis rate and reactive oxygen species (ROS) production rate.

收稿日期: 2024-03-12 接受日期: 2024-06-20

基金项目: 河南省重大科技专项(171100310500); 河南省博士后基金; 河南省高等学校重点科研项目(21B360003); 河南省中医药科学研究专项(20-21ZY2148)

\* 通信作者 Tel: 86-371-60190296; E-mail: fwsh@hactcm.edu.cn

The contents of inflammatory factors interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the cell culture fluid were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In-Cell Western was performed to detect the relative expression levels of Nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p100/p52 and NF- $\kappa$ Bp65. The results showed: compared with the normal control group (Con), the cell survival rate in model group (ox-LDL) was significantly decreased, and the cell apoptosis rate, ROS production rate, inflammatory factors IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with ox-LDL group, compounds **5** and **9** significantly increased the survival rate of HUVECs cells, reduced apoptosis rate, ROS production rate, and inflammatory factors IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), down-regulated the expression of NF- $\kappa$ B2 p100/p52 and NF- $\kappa$ B p65 proteins ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). In conclusion, polyacetylene glycosides in stems and leaves of *C. morifolium* can improve ox-LDL induced HUVECs cell damage and dysfunction, and the mechanism of action may be related to NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** the stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* Ramat; polyacetylene compounds; HUVECs; apoptosis and inflammation; NF- $\kappa$ B

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种由慢性脂质驱动的血管壁炎症性疾病, 通常在大中型动脉形成斑块, 是心脑血管疾病产生的主要因素<sup>[1]</sup>。氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 是由不同氧化程度的非均质物质组成的混合物, 主要包括有氧化磷脂、氧化蛋白、氧化甾醇。血液中 ox-LDL 浓度的升高是造成血管内皮损伤和功能紊乱的主要原因, 可以加速局部的粥样斑块的形成<sup>[2]</sup>, 探讨 ox-LDL 驱动内皮细胞损伤的机制, 可以更加深入地研究动脉粥样硬化的进程, 以便于有效地防治心脑血管疾病。

怀菊花属于“四大怀药”之一, 历史悠久, 是药用菊花的始祖<sup>[3]</sup>。怀菊花的化学成分研究发现主要包括有黄酮、萜类、有机酸等<sup>[4,5]</sup>。现代药理研究发现, 菊花及其茎叶具有降压<sup>[6]</sup>、保护心血管系统<sup>[7]</sup>、抗炎<sup>[8]</sup>、抗氧化<sup>[9]</sup>等作用。然而, 非药用部位

的茎叶产量远超过花, 却没有得到充分的开发利用, 造成了严重的资源浪费<sup>[10]</sup>。本实验中聚炔类化合物从怀菊花茎叶中分离得到, 首先初步筛选出对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 损伤有保护作用的聚炔类化合物, 并进一步探究具有保护作用的聚炔类化合物对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤的作用机制, 为怀菊花非药用部位茎、叶的开发利用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验药物

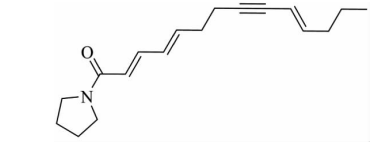
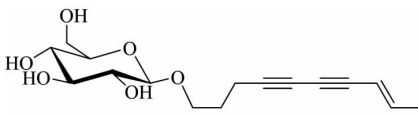
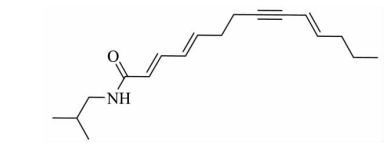
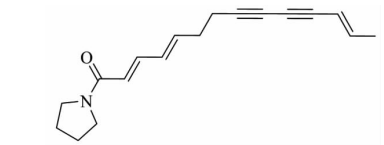
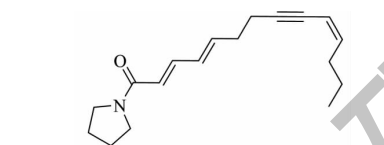
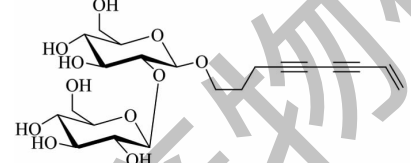

怀菊花茎叶采自河南温县, 经河南中医药大学董诚明教授鉴定为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat 的茎叶, 化合物 **1** ~ **10** 为本课题组从其中分离纯化所得 (纯度为 98% 以上), 经波谱学结构鉴定结构与名称<sup>[11]</sup>见表 1。

表 1 怀菊花茎叶中聚炔类化合物结构信息

Table 1 Structure information of polyacetylene compounds from stems and leaves of *C. morifolium*

编号 No.	化学结构式 Chemical structure	名称 Name
1		(2E,9Z)-Pentodeca-2,9-dien-12,14-diynoic acid piperidide
2		2E,4E-Undecyldiene-8,10-diynoic acid isobutyramide
3		2E,4E,12E-Tetradecatriene-8,10-diynoic acid isobutylamide

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	化学结构式 Chemical structure	名称 Name
4		Tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -trien-8-ynoic acid pyrrolidide
5		8 <i>E</i> -Decaene-4,6-diyne-1- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside
6		2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,10 <i>E</i> - <i>N</i> -Isobutyl-2,4,10-tetradecatrien-8-ynoic acid amide
7		Tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>E</i> -trien-8,10-diynoic acid pyrrolidide
8		Tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,10 <i>Z</i> -trien-8-ynoic acid pyrrolidide
9		8 <i>E</i> -Decaene-4,6-diyne-1- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranosyl-(1''-2')- $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside
10		Tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dien-8,10-diynoic acid pyrrolidide

## 1.2 细胞株

人脐静脉内皮细胞 HUVECs 由河南中医药大学第一附属医院李强老师惠赠。细胞培养于 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中(含有 1% 的青霉素-链霉素),培养箱环境条件:37 °C、5% CO<sub>2</sub>,取对数生长期细胞用于实验研究。

## 1.3 主要试剂

$\alpha$ -LDL(广州奕源生物科技有限公司,批号:YB-002);DMEM 高糖培养基与 CCK-8 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:2105004、310R016);FITC 偶联 Annexin-V 凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司,批号:8176893);活性氧(Reactive oxygen spe-

cies,ROS) 检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:S0033S);白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-6(interleukin-6, IL-6)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )检测试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:KE00021、KE00139、KE00154);核转录因子- $\kappa$ B(nuclear transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)2p100/p52 与 NF- $\kappa$ B p65 抗体(美国 CST 公司,批号:4882T、8242T);IRDye700CW Conjugate 羊抗兔二抗(德国 Licor,批号:C80911-11)。

## 1.4 主要仪器

iMark™ 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司);AVANCE III 500 核磁共振仪(Bruker 公司);Centri-

fuge-5804R 高速低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Forma 3111 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); FACS Aria II 流式细胞仪(美国 BD 公司); Odssey CLx 双色红外激光成像系统(美国 LI-COR 公司); TS100 倒置显微镜(日本 NIKON 公司)

## 1.5 方法

### 1.5.1 聚炔类化合物的制备

取干燥的怀菊花茎叶(35 kg)用 50% 含水丙酮浸泡 48 h, 室温下用组织细胞破碎法提取 2 次, 过滤合并滤液。提取液静置一周后减压浓缩得浸膏 2.8 kg, 浸膏加水溶解后用四部位萃取法, 得到石油醚部位(10.0 g)、乙酸乙酯部位(90.0 g)、正丁醇部位(160 g)和水部位。利用硅胶、凝胶、ODS、Diaion HP-20 并结合制备薄层和半制备高效液相等色谱方法, 对怀菊花茎叶各部分化学成分进行系统的分离, 得到单体化合物。其中化合物 **5** 和 **9** 从乙酸乙酯部位分离得到, 其他聚炔类化合物则由正丁醇部位分离得到。利用 MS、IR、UV、NMR 等方法对化合物进行结构鉴定<sup>[11]</sup>。

### 1.5.2 CCK-8 法检测细胞存活率的影响

取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化后, 调整细胞浓度  $1 \times 10^4$  个/mL 后, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 接种于 96 孔细胞培养板, 细胞贴壁后, 向 96 孔板中加入 ox-LDL(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 同时加入化合物 **1**~**10**(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 在考察化合物 **5** 和 **9** 时, 加入的浓度为: 12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每组设置 6 个复孔, 同时设定空白对照组(Con)与模型对照组(ox-LDL), 培养 24 h 后, 更换新培养基 100  $\mu\text{L}$ , 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 4 h。酶标仪测量各组在 450 nm 处的吸光度(A), 按照以下公式计算细胞存活率: 存活率 = (加药组 A 值 - 调零组 A 值) / (空白对照组 A 值 - 调零组 A 值)  $\times 100\%$ 。

### 1.5.3 细胞形态学观察

实验操作步骤同“1.5.2”, 在加入 CCK-8 溶液之前, 倒置显微镜下观察各组细胞形态, 对比各组细胞形态差异。

### 1.5.4 Annexin-V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡

将 HUVECs 单细胞悬液接种于 6 孔透明板(细胞  $1 \times 10^5$  个/mL), 每孔 1 mL, 细胞贴壁后, 更换无血清的培养基培养 24 h, 使细胞生长同步化, 分组给予化合物 **5** 和 **9**(12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 24 h 后, 加入 1 mL 5% 的胰酶消化 5~10 min, PBS 清洗收集

细胞。用 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 洗细胞两次, 用 250  $\mu\text{L}$  结合缓冲液重新悬浮细胞, 取 100  $\mu\text{L}$  的细胞悬液于 5 mL 流式管中, 分别加入 FITC 和 PI(5  $\mu\text{L}$ ) 染色, 设立单阳对照管; 混匀后于室温避光孵育 15 min, 在流式管中加 400  $\mu\text{L}$  PBS, 流式细胞仪分析检测, 激发波长为 488 nm 与 535 nm。每个样品检测  $1 \times 10^4$  个细胞, 每组重复 3 次, Flow Jo 10.8.1 软件分析细胞凋亡率。

### 1.5.5 DCFH-DA 荧光探针法检测 ROS 在细胞中的生成率

将 HUVECs 单细胞悬液接种于 6 孔透明板( $4 \times 10^4$  个细胞/mL), 每孔 3 mL, 细胞贴壁后, 更换无血清的培养基培养 24 h, 使细胞生长同步化, 分组给予化合物 **5** 和 **9**(12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 24 h 后, 去除培养液, 按照 ROS 检测试剂盒说明, 加入培养基稀释后的 DCFH-DA(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min, 采用无血清的培养基洗涤细胞 3 次, 收集细胞后, 采用流式细胞仪于 488 nm 激发光条件下, 检测 ROS 生成率, 每个样品检测  $1 \times 10^4$  个细胞, 每组重复 3 次, Flow Jo 10.8.1 软件分析 ROS 生成率。

### 1.5.6 细胞免疫印迹(In-Cell Western)检测 NF- $\kappa$ B2 p100/p52、NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达量

将 HUVECs 单细胞悬液接种于 96 孔黑色避光板中( $1 \times 10^5$  个细胞/mL), 每孔 1 mL, 细胞贴壁后, 更换无血清的培养基培养 24 h, 使细胞生长同步化, 分组给予化合物 **5** 和 **9**(12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 24 h 后, 加入 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$  的 11.1% 甲醛溶液固定 20 min; 去除固定液后, 采用 0.1% Triton(200  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ) 透化 5 次, 每次 5 min; 去除 Triton 后, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的牛血清白蛋白(BSA)进行封闭 15 min; 封闭结束后, 每孔按照分组加入一抗 NF- $\kappa$ B2 p100/p52(1:200)、NF- $\kappa$ B p65(1:200), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 孵育结束后平衡室温, 回收一抗, 200  $\mu\text{L}/\text{孔}$  PBST 清洗 5 次, 每次 5 min; 加入 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$  二抗(1:1000), 避光慢摇 1 h, 回收二抗, 200  $\mu\text{L}/\text{孔}$  PBST 清洗 4 次, 5min/次, 双色红外激光成像系统 700 nm 波长扫描结果。

### 1.5.7 统计学方法

采用 SPSS18.0 软件统计分析数据, 实验数据用均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 各组数据采用单因素方差分析, 组间多重比较采用最小显著性差异法(LSD),  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。采用 GraphPad Prim 8.0 软件绘图。

## 2 实验结果

### 2.1 化合物 1~10 对 HUVECs 细胞存活率的影响

如图 1 所示,与 Con 组相比,ox-LDL 组细胞存活率明显下降( $P < 0.05$ ),怀菊花中聚炔类化合物 5 和 9 在剂量 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,ox-LDL 诱导的 HUVECs

细胞损伤存活率明显升高( $P < 0.05$ ),其他化合物则对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞损伤存活率没有明显的影响( $P > 0.05$ ),因此,从 10 个聚炔类化合物中筛选的化合物 5 和 9 有细胞保护活性,故后续实验以这两个化合物为主要考察目标。

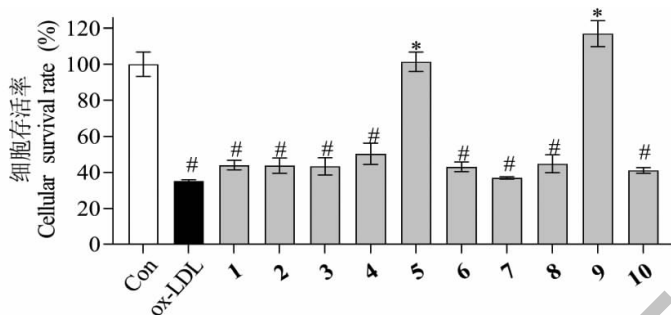


图 1 化合物 1~10 对 HUVECs 细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effects of compounds 1-10 on the cellular survival rate of HUVECs( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

注:与 Con 组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; 与 ox-LDL 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 下同。Note: Compared with Con group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; Compared with ox-LDL group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , the same below.

### 2.2 化合物 5 和 9 对 HUVECs 细胞形态的影响

如图 2 所示,显微镜下 Con 组细胞贴壁良好呈梭形排列,无明显的形态改变;与 Con 组相比,ox-LDL 组细胞数量明显减少,细胞形态皱缩,有部分呈

漂浮状态。化合物 5 在 50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量时,细胞的数量和形态有明显的改善;化合物 9 在剂量 25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时均有不同程度的改善,其中化合物 9 在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对细胞的保护作用最为明显。

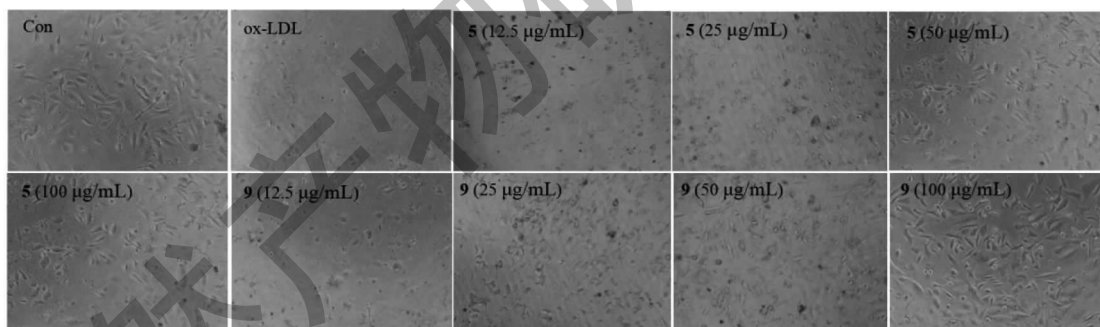


图 2 化合物 5 和 9 对细胞形态的影响( $\times 100$ )

Fig. 2 Effects of compounds 5 and 9 on the cell morphology of HUVECs ( $\times 100$ )

### 2.3 化合物 5 和 9 对 HUVECs 细胞存活率的影响

如图 3 所示,不同浓度的化合物 5 和 9 对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞损伤存活率的高低有所不同;与 ox-LDL 组相比,剂量在 50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时细胞存活率明显升高( $P < 0.05$ ),剂量低于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞存活率略有升高,但是无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.4 化合物 5 和 9 对 HUVECs 细胞凋亡率的影响

采用流式细胞术检测了各组细胞凋亡率,如图 4 所示,散点图中的 Q4 为存活细胞比率,Q1 为坏死

细胞比率,Q3 为细胞的早期凋亡比率,Q2 为晚期凋亡细胞比率。细胞的凋亡率为 Q2 与 Q3 之和;柱形图结果显示,与 Con 组相比,ox-LDL 组的细胞凋亡率明显升高( $P < 0.01$ );与 ox-LDL 组相比,化合物 5 和 9 能降低 ox-LDL 诱导 HUVECs 细胞凋亡率( $P < 0.01$ )。

### 2.5 化合物 5 和 9 对 HUVECs 细胞 ROS 生成率的影响

采用流式细胞术检测了各组细胞 ROS 生成率, FITC-A<sup>+</sup> 阳性率代表 ROS 的生成率,如图 5 所示,与

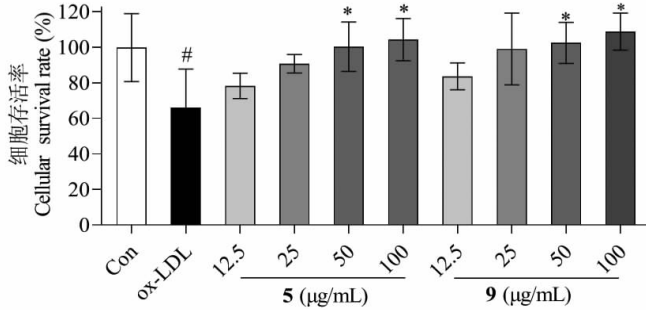


图 3 化合物 5 和 9 对 HUVECs 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effects of compounds 5 and 9 on the cellular survival rate of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

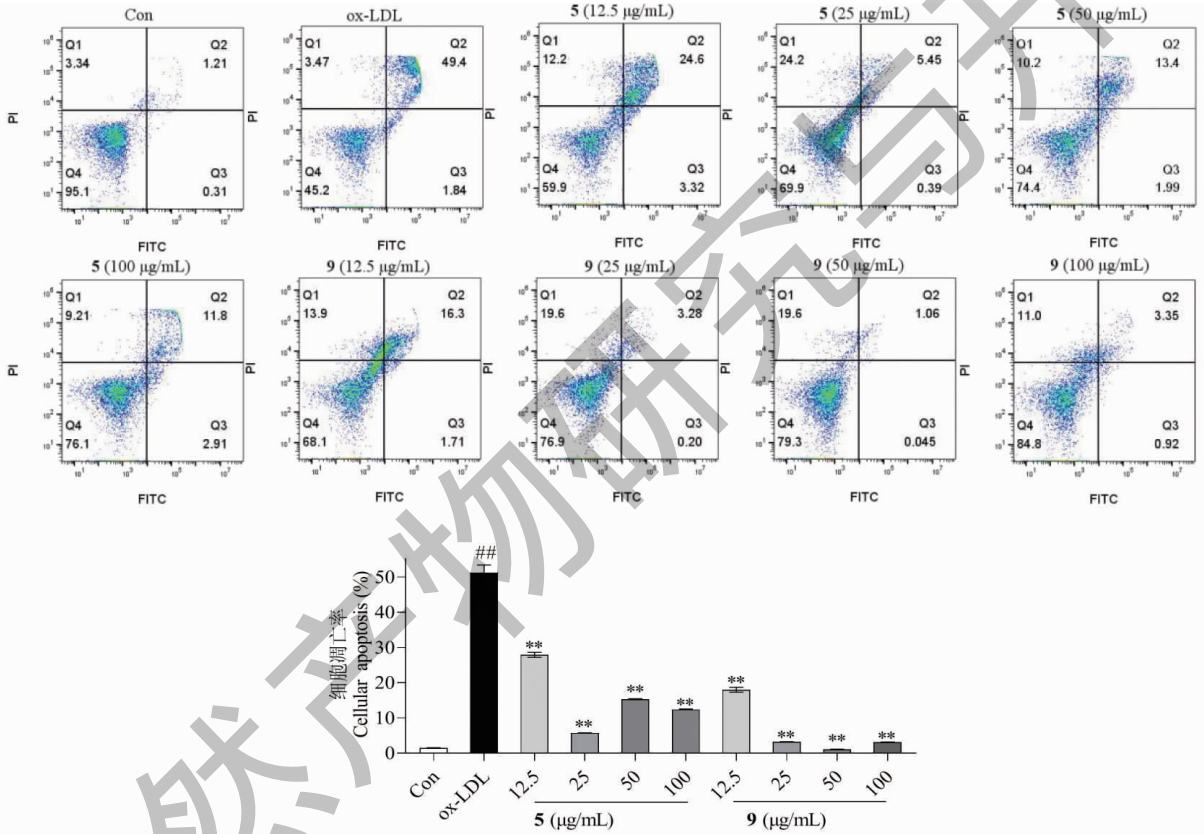
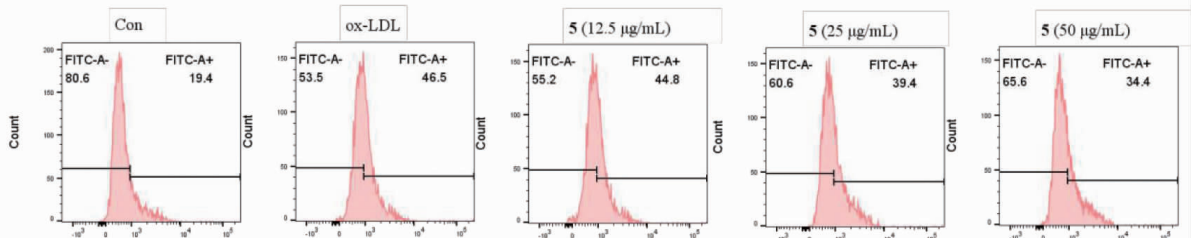


图 4 化合物 5 和 9 对 HUVECs 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effects of compounds 5 and 9 on the cellular apoptosis rate of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Con 组相比, ox-LDL 组的细胞 ROS 的生成率明显升高, 与 ox-LDL 组相比, 化合物 9 各浓度均能降低

ROS 生成率 ( $P < 0.01$ ), 化合物 5 在浓度 12.5 µg/mL 时, ROS 生成率无明显变化 ( $P > 0.05$ )。



续图 5 (Continued Fig. 5)

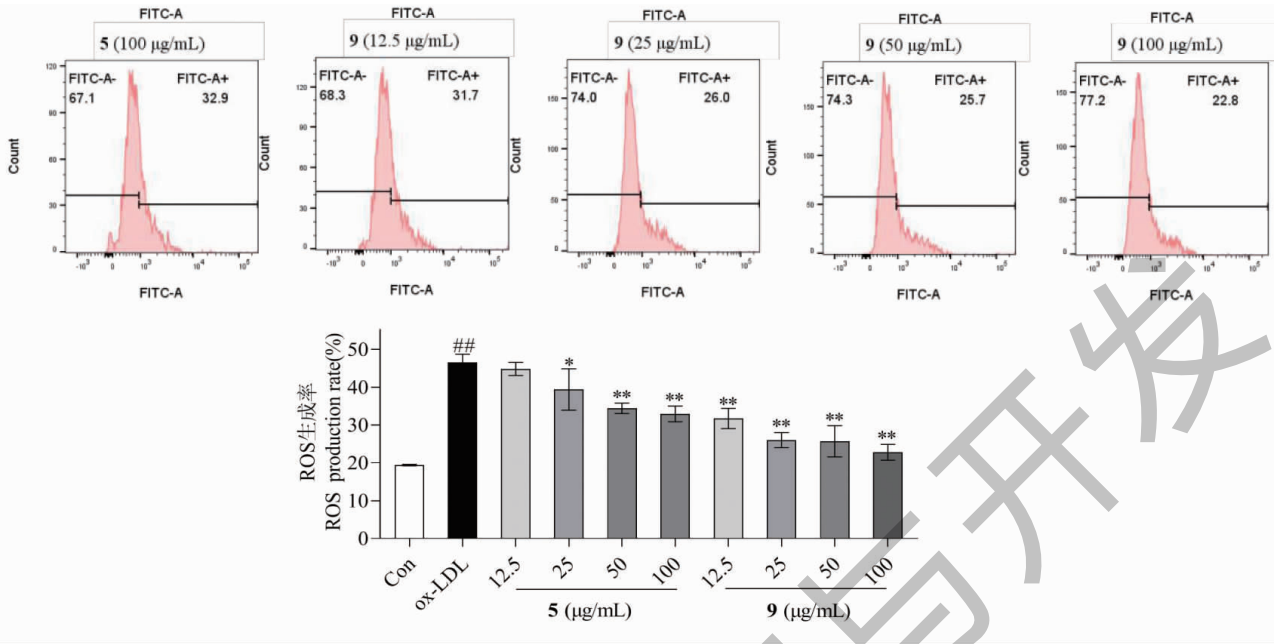


图5 化合物5和9对HUVECs细胞ROS生成率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effects of compounds 5 and 9 on the ROS production rate of HUVECs( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 2.6 化合物5和9对HUVECs细胞上清液中IL-1 $\beta$ 、IL-6及TNF- $\alpha$ 含量的影响

各组给药24 h后,采用ELISA法检测细胞上清液中炎性因子的含量,如图6所示,与Con组相比,ox-LDL组的细胞上清液中的IL-1 $\beta$ 、IL-6及TNF- $\alpha$ 含量明显升高;与ox-LDL组相比,化合物9各浓度

均能降低IL-1 $\beta$ 、IL-6含量( $P < 0.01$ ),在100  $\mu\text{g/mL}$ 时,可以明显降低TNF- $\alpha$ 含量( $P < 0.01$ );化合物5在浓度25、50和100  $\mu\text{g/mL}$ 时能显著降低IL-1 $\beta$ 、IL-6含量( $P < 0.01$ ),在100  $\mu\text{g/mL}$ 显著降低TNF- $\alpha$ 含量( $P < 0.01$ )。

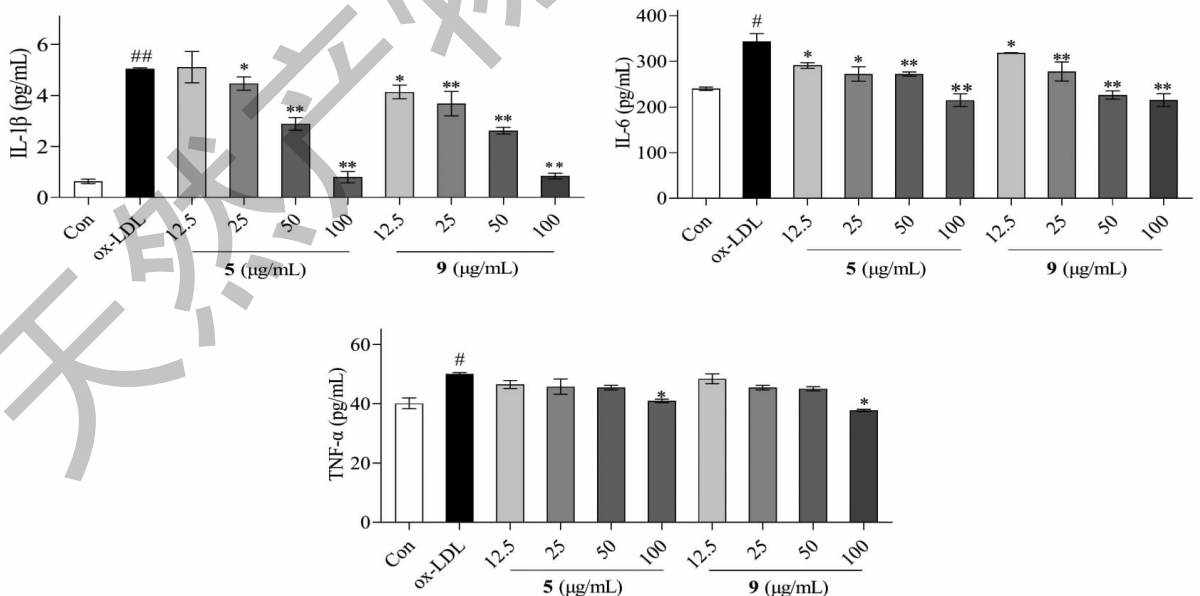


图6 化合物5和9对HUVECs细胞上清液中IL-1 $\beta$ 、IL-6及TNF- $\alpha$ 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 6 Effects of compounds 5 and 9 on the content of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the cell supernatant of HUVECs( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

## 2.7 化合物 5 和 9 对 HUVECs 细胞中 NF- $\kappa$ B2 p100/p52、NF- $\kappa$ Bp65 蛋白水平的影响

给药 24 h 后, 采用 In-Cell Western 检测了细胞中 NF- $\kappa$ B2 p100/p52、NF- $\kappa$ B p65 蛋白的相对表达水平。如图 7 所示, 与 Con 组相比, ox-LDL 组的细胞 NF- $\kappa$ B2 p100/p52、NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达水平明

显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 与 ox-LDL 组相比, 化合物 5 和 9 不同浓度对 NF- $\kappa$ B2 p100/p52、NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达均有不同程度的降低 ( $P < 0.01$ ), 提示: 化合物 5 和 9 可能通过调节 NF- $\kappa$ B2 p100/p52、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达改善 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞的细胞损伤和炎症因子分泌。

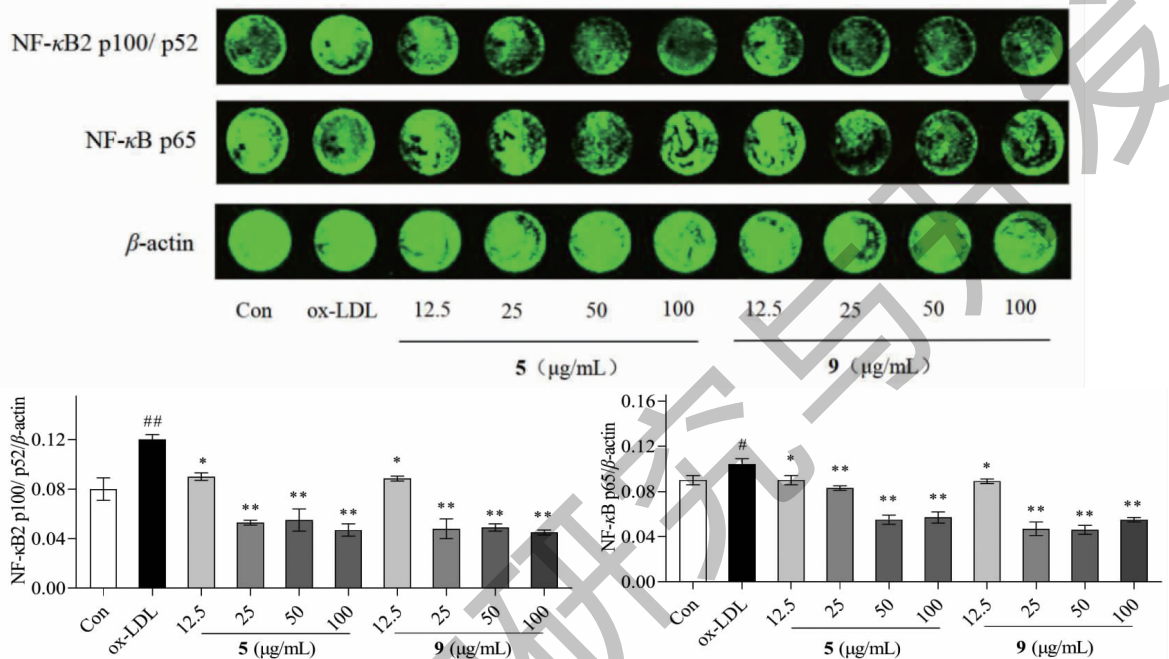


图 7 化合物 5 和 9 对细胞中 NF- $\kappa$ B2 p100/p52、NF- $\kappa$ Bp65 蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 The protein expression levels of NF- $\kappa$ B2 p100/p52, NF- $\kappa$ B p65 of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 3 讨论与结论

AS 是内皮功能障碍、炎症细胞浸润、脂质代谢紊乱等多因素相互作用导致的慢性血管系统炎症性疾病<sup>[12]</sup>。2020 年底美国心脏病学会发表的《全球心血管疾病和危险因素负担 1990—2019》一文中, 汇总了过去 30 年内全球心血管疾病的患病率和病死率的巨额数据, 强调了当前心血管疾病对人类健康的严重威胁<sup>[13]</sup>。菊花是我国常见的一种花卉, 并且是著名的药食同源植物, 大量的研究发现菊花具有抗氧化、抗肿瘤、扩张血管、降血压、调节胆固醇代谢等多种药理作用和养生价值, 适合进一步地开发与利用<sup>[14]</sup>。

怀菊花为河南省道地药材, 然而菊花的药用部位头状花序仅仅是其植株很少的一部分, 而占据其植株很大部分的茎、叶、根均作为废弃物丢弃。本课题组前期, 在怀菊花茎叶中发现了一系列聚炔类化合物, 其中有 7 个为菊花中首次发现, 1 个为新化合物, 具有潜在的抗癌活性<sup>[11,15]</sup>, 本研究在菊花心血

管药理作用基础上, 开展对怀菊花茎叶成分中首次发现的聚炔类化合物进行活性筛选, 为怀菊花非药用部位在治疗心血管疾病方面提供参考依据。

血管内皮在动脉粥样硬化疾病和急性冠状动脉综合症的病理过程中起着至关重要的作用, 内皮功能障碍是核心问题<sup>[16]</sup>。ox-LDL 是内皮细胞损伤的重要因素, 并且诱发炎症介质如: IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  的释放<sup>[17]</sup>。在炎症因子释放过程中, 机体内的 NF- $\kappa$ B 的激活会导致血管平滑肌细胞、巨噬细胞以及内皮细胞中纤维内膜增厚, 导致 AS 的病变<sup>[18]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号通路包括经典通路和非经典通路, 区别在于经典通路中 I $\kappa$ B 蛋白的降解使 NF- $\kappa$ B 二聚体 (NF- $\kappa$ B P65、NF- $\kappa$ B P50) 得到释放, 通过各种翻译后的修饰进一步激活, 并转移到细胞核中。在细胞核里, 它与目的基因结合, 以促进目的基因的转录; 非经典信号通路中, 则是通过 p100 到 p52 的加工处理, 使信号通路激活, 从而引起细胞凋亡、细胞脂质过氧化、炎症因子的分泌<sup>[19]</sup>。因此, 本研究以细胞



损伤、细胞凋亡、ROS 氧化、炎症因子分泌以及 NF- $\kappa$ B2 p100/p52、NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达水平,来探讨怀菊花茎叶中筛选出的化合物 **5** 和 **9** 对内皮细胞的保护作用。

本研究结果显示:怀菊花茎叶中 10 个聚炔类化合物中 **5** 和 **9** 为聚炔苷类化合物,对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞损伤有明显的保护作用,可以增加细胞生存率,抑制细胞凋亡率和 ROS 生成率、降低炎症因子的分泌,下调 NF- $\kappa$ B2 p100/p52、NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达水平。结构显示化合物 **5** 与 **9** 多了糖苷基,这有可能与糖苷基增加了药物的溶解性和渗透性相关<sup>[20,21]</sup>,或者其与效应蛋白之间的相互作用相关,还需进一步地去研究和探讨。本研究提示:怀菊花茎叶中的聚炔苷类化合物对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞损伤有一定的保护作用,可能通过调控 NF- $\kappa$ B 信号通路减轻细胞凋亡与细胞氧化,抑制炎症因子分泌,从而恢复内皮细胞功能,聚炔类化合物活性的构效关系还需进一步地研究与探讨。怀菊花茎叶中聚炔类化合物抗 AS 的药效还需后续动物实验进一步地确认与探讨,本研究为怀菊花非药用部位的开发利用提供参考依据。

#### 参考文献

- 1 Summerhill V, Orekhov A. Pericytes in atherosclerosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1147: 279-297.
- 2 Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein [J]. *Nature*, 1997, 6620: 73-77.
- 3 Dai Z, Li SX, Chen SQ, et al. Quality Evaluation on germplasm resources of Huai Chrysanthemi Flos [J]. *Chin Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 48-54.
- 4 Feng WS, Chen WJ, Zheng XK, et al. Flavonoids from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* Ramat [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2017, 17: 1497-1502.
- 5 Zhang BB, Zeng MN, Li M, et al. Guaiane-Type sesquiterpenoids from *Dendranthema morifolium* (Ramat.) S. Kitam flowers protect H9C2 cardiomyocyte from LPS-induced injury [J]. *Nat Prod Commun*, 2019, 7: 1934578X1986417.
- 6 Zhang LJ, Zhang HB, Tu WQ, et al. Experimental study on antihypertensive effects and mechanisms of total flavonoids of Flos Chrysanthemi on spontaneous hypertension rats [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 592-597.
- 7 Sun Y, Ma X, Liu J. Compounds from fraction with cardiovascular activity of *Chrysanthemum indicum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 61-65.
- 8 Xiong X, Huang CQ, Cheng L. Anti-inflammatory effect and

mechanism of *Chrysanthemum indicum* decoction on RAW 264.7 inflammatory cell model [J]. *Herald Med* (医药导报), 2024, 43: 1192-1198.

- 9 Wu MY, Chen HF, Chen RR, et al. Screening antioxidative material basis of total flavonoids from stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* based on the spectrum-effect relationship and its mechanism [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 36: 464-477.
- 10 Liu XJ, Li Y, Su SL, et al. Status and prospects of resource utilization of non-medicinal parts of medicinal *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2020, 51: 4075-4081.
- 11 Shi JY, Li M, Zeng MN, et al. A new polyacetylene from the stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* Ramat [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2021, 56: 283-288.
- 12 Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis [J]. *J Cell Biol*, 2015, 209: 13-22.
- 13 Roth GA, Mensah GA, Fuster V. The global burden of cardiovascular diseases and risks: a compass for global action [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 25: 2980-2981.
- 14 Chen QL, Chen QG, Zhao YR. The efficacy of *Chrysanthemum* and its product development [J]. *China Fruit Veg* (中国果菜), 2023, 43: 61-65.
- 15 Jia JF, Shi JY, Zhang BB, et al. The effect of polyacetylene alkaloids from the stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* Ramat on the apoptosis of non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2022, 31: 885-892.
- 16 Duvall WL. Endothelial dysfunction and antioxidants [J]. *Mt Sinai J Med*, 2005, 72: 71-80.
- 17 Ridker PM, Lüscher TF. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35: 1782-1791.
- 18 Sun X, Feinberg MW. NF- $\kappa$ B and hypoxia: a double-edged sword in atherosclerosis [J]. *Am J Pathol*. 2012, 181: 1513-1517.
- 19 Mitchell JP, Carmody RJ. NF- $\kappa$ B and the transcriptional control of inflammation [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 335: 41-84.
- 20 Yang J, Ye L, Huang JM, et al. Improvement of solubility of epimedium flavonoid secondary glycoside components by traditional Chinese medicine polysaccharides and its mechanism [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2023, 48: 6058-6065.
- 21 Xiao XN, Wang F, Zhou J, et al. Improving of solubilization and *in vitro* release enhancement of phloretin by steviol glycosides [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报), 2021, 3: 11-21.