

## 新的非肽类内皮素拮抗剂：咖啡酸、阿魏酸

王 峰\*, 刘 敏, 杨连春, 王京媛, 吕 敏, 李 菲

(中国人民解放军空军总医院, 北京 100036)

**摘要** 目的:研究桂皮酸类化合物咖啡酸和阿魏酸对内皮素(endothelin-1, ET-1)生物效应的拮抗作用。方法:体内 ET-1 iv 致小鼠急性死亡、体外血管平滑肌细胞培养、主动脉条收缩试验和 ET 受体结合试验。结果:咖啡酸和阿魏酸(ip)能剂量依赖性显著延长 ET-1 致小鼠急性死亡时间,在离体器官可观察到咖啡酸与阿魏酸能拮抗 ET-1 的缩血管效应;放射性受体-配体结合实验表明,咖啡酸和阿魏酸可竞争性地抑制 ET-1 与其受体的结合。结论:咖啡酸和阿魏酸为新的非肽类 ET 拮抗剂。

**关键词** 内皮素;咖啡酸;阿魏酸;内皮素拮抗剂

内皮素-1(endothelin-1, ET-1)是由 21 个氨基酸组成的体内活性多肽,除强大而持久的血管收缩作用外,对啮齿类动物和哺乳类动物有多种生物效应,如调节水和电解质平衡、激素分泌,组织细胞增生和血管通透性等<sup>[1,2]</sup>。ET-1 参与多种疾病如高血压、冠心病、脑卒中、心律失常的病理生理过程<sup>[3,4]</sup>。对内皮素拮抗剂的研究与开发,为治疗内皮素相关性疾病提供了新的途径。咖啡酸与阿魏酸为桂皮酸类化合物,普遍存在于当归、川芎等常用植物药中。为了探讨咖啡酸与阿魏酸的药理作用机理,本研究对咖啡酸及阿魏酸拮抗 ET-1 的作用进行探索。

### 材 料 与 方 法

**动物** 昆明种小鼠、Sprague-Dawley(SD)大鼠均购自北京医科大学实验动物部。

**试剂与仪器** ET-1、咖啡酸(caffeic acid, CFA)、阿魏酸(ferulic acid, FLA)购自美国 Sigma 公司;<sup>125</sup>I-ET-1 购于 Amersham Pharmacia Biotech,放射浓度 3.7 MBq·mL<sup>-1</sup>, 370 MBq·mL<sup>-1</sup>;混合性内皮素受体拮抗剂 bosentan 由 Dr. Volker Breu (Hoffmann-La Roche, Switzerland) 惠赠。MB-III 型酶标检测仪为北京市新技术应用研究所产品。NIH 3T3 血管平滑肌成纤维细胞由中国预防医学

科学院病毒研究所韩立群研究员提供,Topcount (Microplate Scintillation & Luminescence Counter) Packard BioScience Company 产品。

**CFA, FLA 对 ET-1 致小鼠急性死亡的拮抗作用** 体重 20 ± 2 g,昆明种小鼠,♀♂兼用,随机分组,禁食(不禁水) 18 h 后,分别给予 CFA 及 FLA 各 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 mg·kg<sup>-1</sup>, ip, 对照组给予等容积的生理盐水, 30 min 后给予 ET-1 12 nmol·kg<sup>-1</sup>, iv, 观察给 ET-1 后 15 min 内小鼠的存活情况,记录动物数和死亡时间,存活时间超过 15 min 按 15 min 计。

**CFA 和 FLA 对 ET-1 缩血管效应的拮抗作用** 体重 230 ± 10 g, ♂ SD 大鼠,击头致昏后快速摘取胸主动脉,分离结缔组织后,剪成 2 ~ 3 mm 宽的血管环,置于 Krebs-Henseleit 生理溶液(K-H 液, pH 7.40 ± 0.05, 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>, 37.0 ± 0.5 °C)中,经张力换能器连台式平衡记录仪(上海大华仪表厂),记录血管张力。加基础张力 2 g,以 10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup> 去甲肾上腺素预激 2 次。平衡 60 min 达稳定后,加入 ET-1 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup>,待达到最大收缩效应,分别加入不同浓度的 CFA 及 FLA(以 2% DMSO 为溶媒,实验用 2% DMSO 作对照),观察 CFA 与 FLA 的作用。

**CFA 及 FLA 对 ET-1 致血管平滑肌细胞增殖效应的拮抗作用** 取第 5 代兔主动脉平滑肌细胞(RAVS MC)以传代培养法调整细胞数为 1 × 10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup>,接种于 96 孔培养板(100 μL/孔), 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h 后换以含 1% 小牛血清和 ET-1 10 nmol·L<sup>-1</sup> 的 DMEM 培养液继续孵育,加入 CFA 及

FLA 考察其对 ET-1 致平滑肌细胞增殖的作用。于不同培养时间以结晶紫染色后用酶标检测仪在 570 nm 处测定各孔吸光度 (A) 值, 得到 ET-1 对 RAVSMC 增殖的时间-效应关系和 CFA 与 FLA 对 ET-1 致平滑肌细胞增殖的作用。

咖啡酸、阿魏酸、<sup>125</sup>I-ET-1 与 NIH 3T3 结合实验 3T3 成纤维细胞用 RPM 1640 培养液调整至 10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup>, 转移到 96 孔细胞培养板上, 使每孔细胞数为 10<sup>4</sup> 个, 咖啡酸、阿魏酸和 bosentan 用二甲基亚砜(DMSO)溶解后, 用 RPM 1640 培养液稀释成不同浓度(浓度范围为 10<sup>-10</sup> ~ 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>), 按不同浓度梯度加入 96 孔细胞培养板后, 再加入 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> <sup>125</sup>I-ET-1, 使体系总体积为 300 μL, 37℃培养 1 h 后, 用缓冲液(20 mol·L<sup>-1</sup> Tris HCl, pH 7.5, 10 nm MgCl<sub>2</sub>) 经 Whatman GF/C 滤器洗 4 次, 加 50 μL 闪烁液后进行放射活性计数。用 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> bosentan 作为非特异性结合管, 并用已知的非肽类混合型 ET 受体拮抗剂 bosentan 作为阳性对照, 判定咖啡酸、阿魏酸拮抗内皮素效能强弱。

数据处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 进行组间 *t* 检验。

## 结 果

### 1 CFA, FLA 对 ET-1 致小鼠急性死亡的拮抗作用

ET-1 12 nmol·kg<sup>-1</sup>, iv 可引起各组小鼠全部死亡, 但死亡时间不同。小鼠给予 CFA, FLA 可依剂量地延长 ET-1 引起的小鼠急性死亡时间。同样剂量下, FLA 的拮抗 ET-1 致小鼠急性死亡作用较强。结果见表 1。

Tab 1 Effects of caffeic acid(CFA) and ferulic acid (FLA) dose from 0.1 to 100 mg·kg<sup>-1</sup> ip on the time of acute death induced in mice by endothelin 1 (ET-1) (12 nmol·kg<sup>-1</sup>, iv) *in vivo*. The data is the time of death in min after ET-1 administration

Dose/ mg·kg <sup>-1</sup>	Time of death/ min	
	CFA	FLA
Control	2.24 ± 1.02	2.24 ± 1.02
0.1	2.33 ± 0.19	3.33 ± 1.84
1.0	2.58 ± 0.21	4.04 ± 0.50*
10	3.19 ± 0.88	5.54 ± 1.06*
100	12.72 ± 3.11**	14.37 ± 1.89**

*n* = 10,  $\bar{x} \pm s$ , \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs control group.

### 2 CFA, FLA 对 ET-1 缩血管效应的拮抗作用

离体大鼠主动脉给予 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> ET-1 后,

可导致动脉收缩。ET-1 引起最大动脉收缩后给予 CFA, FLA, 二者均能拮抗 ET-1 的缩血管效应, 且表现明显的剂量依赖性。结果如图 1。药物浓度-效应曲线经 sigmoidal 方法拟合后, 求得最大效应 (*E*<sub>max</sub>) 和 IC<sub>50</sub>, CFA 和 FLA 最大效应分别为 70.95% ± 6.30% 和 92.10% ± 0.81%, IC<sub>50</sub> (× 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>) 分别为 1.80 ± 0.80 和 0.063 ± 0.005。结果表明, FLA 对 ET-1 缩血管作用的拮抗效能较 CFA 强 (*P* < 0.05)。

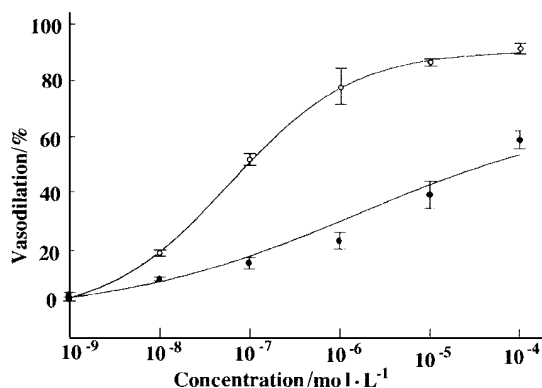


Fig 1 Concentration-response curves of antagonist effects of caffeic acid(CFA) and ferulic acid(FLA) concentrations from 10<sup>-4</sup> to 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> on vasoconstriction induced by endothelin-1 (ET-1) 10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup> on isolated aortic rings of Sprague-Dawley rats *in vitro* ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 6). ○-○ CFA; ●-● FLA.

### 3 CFA, FLA 对 ET-1 致血管平滑肌细胞增殖效应的拮抗作用

ET-1 可刺激 RAVSMC 增殖, 于 d 2 达峰值, d 1, d 2 和 d 7 的细胞增殖率分别为 33.3% ± 25.0%, 50.0% ± 13.6%, 40.0% ± 9.28%, 与对照组相比有显著性差异。根据 ET-1 引起 RAVSMC 增殖的时间-效应关系, 选定 10 nmol·L<sup>-1</sup> ET-1 与 CFA, FLA 共孵 d 2 测定细胞染色后 A(570 nm) 值, 判断 ET-1 引起 RAVSMC 增殖效果。结果表明, CFA, FLA 可显著性地拮抗 ET-1 引起的 RAVSMC 增殖, 且该作用表现为浓度依赖性。结果如表 2。

### 4 咖啡酸、阿魏酸、<sup>125</sup>I-ET-1 与 NIH 3T3 细胞结合实验

<sup>125</sup>I-ET-1 可与 3T3 成纤维细胞上的内皮素受体特异性结合, 当培养液中含有咖啡酸或阿魏酸时, <sup>125</sup>I-ET-1 的结合反应被咖啡酸或阿魏酸竞争性拮抗。根据结合效应-浓度曲线分析, 非肽类混合型内

皮素受体拮抗剂 bosentan 对<sup>125</sup>I-ET-1 与 ET 受体结合的拮抗效能最大,其次为 FLA,而 CFA 作用最小,结合效应-浓度曲线呈平行性右移。经 sigmoidal 方法对结合效应-浓度曲线进行拟合,得出 bosentan、阿魏酸和咖啡酸拮抗<sup>125</sup>I-ET-1 与 3T3 成纤维细胞

ET 受体结合的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为 8.13 × 10<sup>-9</sup>, 8.86 × 10<sup>-8</sup>和 6.98 × 10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>;最大效应分别为 102.05%, 101.11%和 100.30%。结果见图 2。

Tab 2 Inhibitory effects of CFA, FLA concentrations from 10<sup>-8</sup> to 10<sup>-11</sup> mol·L<sup>-1</sup> on RAVSMC proliferation induced by ET-1(10 nmol·L<sup>-1</sup>)cultured for 48 h

Group	Control	10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>
CFA	2.4 ± 0.2	1.2 ± 0.1**	1.2 ± 0.4**	1.2 ± 0.8**	0.9 ± 0.1**
FLA	2.4 ± 0.2	1.4 ± 0.3**	1.5 ± 0.7*	1.2 ± 0.2**	1.2 ± 0.4**

The data is the A value × 100.  $\bar{x} \pm s$ . n = 3. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs control group.

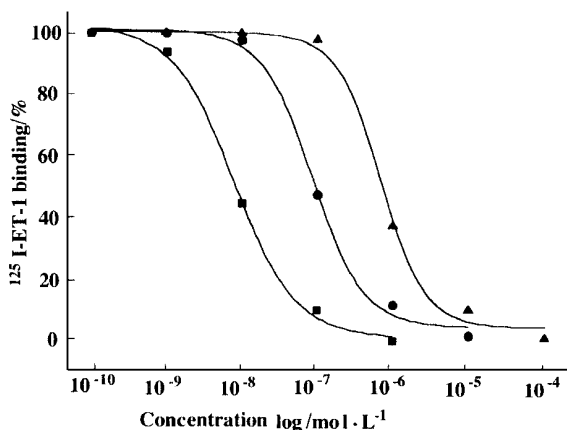


Fig 2 Concentration response curve of bosentan, ferulic acid and caffeic acid in the binding of <sup>125</sup>I-ET-1 to ET-1 receptor in cultured 3T3 cells. ■—■ bosentan; ●—● FLA; ▲—▲ CFA.

### 讨论

ET-1 是迄今为止发现的缩血管活性最强的肽类物质,亦是细胞有丝分裂激动剂。现已证明 ET-1 参与多种疾病如肺动脉高压、冠心病、肾功能衰竭、心功能衰竭、偏头痛和血管性疾病等的病理生理过程有关。国内外对 ET 拮抗剂尤其是非肽类内皮素拮抗剂的研究较多,有些 ET 受体拮抗剂的研究已进入临床阶段<sup>[5~9]</sup>,在对病人的治疗过程中取得了满意的效果。ET 与某些蛇毒如 sarafotoxin 的结构极为相似,一级结构序列相似性约在 65%以上,经基因家系分析的结果表明,认为 ET 与 sarafotoxin 源于同一祖基因。正是因为 ET 与某些蛇毒的相似性,我们考虑到我国传统的抗蛇毒中草药中是否存在具有能有效拮抗内皮素生物效应的拮抗剂。本实

验室以往的工作已证明,多种临床有效的抗蛇毒中草药如红背丝绸、东风菜、徐长卿、通城虎等具有拮抗 ET 生物效应的作用。经初步研究认为,从红背丝绸中的分离、提纯得到单体化合物 CA-1201,有拮抗 ET-1 的作用<sup>[10~13]</sup>。结构分析发现该化合物具苯乙烯结构,与我国活血化瘀药桂皮酸类物质如 CFA,FLA 等化合物的结构十分相似,因而我们推测 CFA 和 FLA 可能亦具有拮抗 ET 生物效应的活性。

本研究在整体动物、离体器官、细胞和亚细胞等水平上评价了咖啡酸和阿魏酸对 ET-1 生物效应的影响,证实这两种桂皮酸类化合物对 ET-1 有明显的拮抗作用。实验结果表明,咖啡酸和阿魏酸拮抗 ET-1 生物效应,与其对 ET-1 受体的拮抗作用密切相关。本实验室对咖啡酸和阿魏酸作用机理的深入研究尚在进行之中。

### References

- Garcia PMR. The endothelium in health and in cardiovascular disease. *P R Health Sci J*, 1997, **16**: 130
- Parris RJ, Webb DJ. The endothelin system in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Vasc Med*, 1997, **2**: 31
- Ferro CJ, Webb DJ. The clinical potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular medicine. *Drugs*, 1996, **51**: 12
- Webb DJ, Monge JC, Rabelink TJ, et al. Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharmacol Sci*, 1998, **19**: 5
- Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere V, et al. The effects of an endothelin receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *New Engl J Med*, 1998, **338**: 784

- 6 Clozel M, Breu V, Gray GA, *et al.* Pharmacological characterization of bosentan. A new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, **270**: 228
- 7 Veniant M, Clozel JP, Hess P, *et al.* Endothelin plays a role in the maintenance of blood pressure in normotensive guinea pigs. *Life Sci*, 1994, **56**: 445
- 8 Williams DL Jr, Murphy KL, Nolan NA, *et al.* Pharmacology of L-744, 453, a novel nonpeptidyl endothelin antagonist. *Life Sci*, 1996, **58**: 1149
- 9 Wellings RP, Corder R, Doherty AM, *et al.* Antagonist of renal and systemic responses to endothelin-1 infusion with PDI 45065. *Eur J Pharmacol*, 1994, **256**: 201
- 10 Wang F(王峰), Yang LC(杨连春), Liu M(刘敏), *et al.* A primary study on antagonizing effects of anti-snake venom Chinese herbs on endothelin-1 and sarafotoxin 6b. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1997, **22**: 620
- 11 Wang F(王峰), Yang LC(杨连春), Cheng YL(程言亮), *et al.* Antagonism effects of both extracts of Chinese herb *Cissus assamica* and monomer CA-1201 on endothelin-1 responses. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 1998, **33**: 337
- 12 Ji XS(季小慎), Wang F(王峰), Wang JY(王京媛), *et al.* Synthesis of cinnaomoylamide analogs and their antagonistic effects on biological actions of endothelin-1. *Chin J Med Chem*(中国药物化学杂志), 1998, **8**: 250
- 13 Yang LC(杨连春), Wang F(王峰), Liu M(刘敏), *et al.* Study of an endothelin antagonist from a Chinese anti-snake venom medicinal herb. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998, **31**(Suppl 1): S249

## A NEW KIND OF NON PEPTIDE ENDOTHELIN ANTAGONISTS: CAFFEIC ACID AND FERULIC ACID

Wang Feng( Wang F ), Liu Min( Liu M ), Yang Lianchun( Yang LC ),  
Wang Jingyuan( Wang JY ), Lü Min( Lü M ) and Li Fei( Li F )

( General Hospital of Air Force , PLA , Beijing 100036 )

**ABSTRACT AIM:** To evaluate the effects of caffeic acid and ferulic acid on the biological responses induced by endothelin-1 ( ET-1 ) and study the mechanism of their antagonistic actions on endothelin-1 .  
**METHODS:** Acute death of mouse induced by iv ET-1 , isolated artery ring constrictions and rabbit aortic vascular smooth cells ( RAVSMC ) proliferation induced by ET-1 were used to observe the antagonistic effects of caffeic acid and ferulic acid on ET-1 . Also, the <sup>125</sup>I-ET-1 binding with 3 T3 cells were employed to measure the effects of caffeic acid and ferulic acid on binding potency .  
**RESULTS:** Caffeic acid and ferulic acid were shown to increase the mouse survival time induced by ET-1 iv administration and decrease the vasoconstrictions of isolated aortic rings . Both acids were found to bind competitively with <sup>125</sup>I-ET-1 on 3 T3 cells .  
**CONCLUSION:** Caffeic acid and ferulic acid are a new kind of non-peptide endothelin antagonists .

**KEY WORDS** endothelin-1 ; caffeic acid ; ferulic acid ; endothelin-1 antagonists