

生薬水エキスによる血管平滑筋細胞の 一酸化窒素産生刺激作用の検討

福田 一典*, 緒形 孝弘, 木戸 敏孝, 植木 俊之, 山本 雅浩, 遠藤 徹

(株) ツムラ中央研究所 免疫研究部

Induction of nitric oxide production in vascular smooth muscle cells by aqueous extracts of crude drugs

Kazunori FUKUDA*, Takahiro OGATA, Toshitaka KIDO, Toshiyuki UEKI,
Masahiro YAMAMOTO, Tohru ENDO

Immunology Department, Central Institute of Laboratories. Tsumura & Co.

(Received March 25, 1994. Accepted June 27, 1994.)

Abstract

We investigated the effects of aqueous extracts of various crude drugs on the nitric oxide (NO) production in cultured vascular endothelial and smooth muscle cells. Aqueous extracts of *Astragali radix*, *Ginseng radix* and *Scutellariae radix* were shown to induce NO synthesis in rat vascular smooth muscle cells (VSMC). On the other hand, no significant alteration of NO production was observed in bovine aortic endothelial cells when aqueous extracts of these crude drugs were applied. Aqueous extracts of *Astragali radix* and *Ginseng radix* induced NO production in VSMC in a dose-dependent manner at higher concentrations over 400 $\mu\text{g/ml}$; 10- to 20-fold increase over the basal level in the NO production was observed when 1 mg/ml of the crude drugs was applied. Aqueous extract of *Scutellariae radix* also showed dose-dependent induction of NO synthesis at concentrations between 20 to 100 $\mu\text{g/ml}$. NO production induced by these aqueous extracts was inhibited by a NO synthase inhibitor, N^G-monomethyl-L-arginine, and dexamethasone which is a transcriptional inhibitor for inducible NO synthase gene, indicating that these extracts induce NO production by increasing the transcriptional level of inducible NO synthase gene. Our findings suggest that some crude drugs act on vascular function by modulating NO synthesis in vascular smooth muscle cells.

Key words nitric oxide, vascular smooth muscle cell, *Astragali radix*, *Ginseng radix*, *Scutellariae radix*.

Abbreviations cNOS, constitutive nitric oxide synthase; DEX, dexamethasone; EDRF, endothelium derived relaxing factor; GABA, γ -aminobutyric acid; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LDL, low-density lipoprotein; L-NMA, N^G-monomethyl-L-arginine; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; PBS, phosphate buffered saline.

*〒 300-11 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586
3586 Yoshiwara, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-11,
Japan

緒 言

L-arginine 由来の一酸化窒素 (Nitric oxide, NO) が血管壁の種々のシグナル伝達に関与し、血流や血圧のコントロールにおいて重要な役割を果たすことが近年明らかとなった。¹⁾

すなわち、種々の刺激による内皮細胞依存性ないし神経依存性の血管抵抗の調節やサイトカインやエンドトキシンに誘導される血管拡張には NO を介したシグナル伝達を中心をなす事、さらに NO が血小板の凝集や好中球の内皮細胞への付着・superoxide の産生を抑制し、組織の微小循環のコントロールにおいても重要な役割を果たしている事などが最近の多くの報告で指摘されている。^{1,2,3)} さらに、血管壁由来の NO が low-density lipoprotein (LDL) の酸化や血管平滑筋細胞の増殖を抑制することにより抗動脈硬化作用を示すことも指摘されている。^{3,4)} 血管壁における NO の産生源としては血管内皮細胞がまず明らかにされ、血管平滑筋は内皮細胞由来の NO のターゲット細胞として多くの研究がなされているが、血管平滑筋自身も NO を産生しオートクリン的に血管壁トーンの調節に関与し、従来内皮由来の NO の作用とされていた血小板凝集抑制や平滑筋細胞の増殖抑制にも関与している事が報告されている。⁵⁾

血圧降下・血管拡張作用や抗動脈硬化作用を有する漢方薬や生薬は多く知られており、そのメカニズムや活性成分に関する研究も広く行われている。^{6,8)} しかし、NO を介したシグナル伝達系におよぼす漢方薬の薬理作用に関する検討は始まったばかりであり、生薬成分による血管壁の NO 産生調節作用を検討する事は漢方薬の循環系に及ぼす薬理作用を科学的に解明する上で意義があると思われる。

以上の観点から今回、漢方薬の構成生薬のうち血圧降下や血管拡張作用が指摘されている 21 種の生薬につき、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞に対する NO 産生刺激作用について検討し、人参・黄耆・黄芩の 3 つの生薬水エキスに血管平滑筋細胞に対する NO 産生刺激作用を認めたので報告する。

材料と方法

(1) 細胞培養：培養液は phenol red-free の RPMI 1640 (Sigma) に 10 % ウシ胎児血清, 100 u/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加して使用した。血管平滑筋細胞はラット大動脈から以下のように分離した。SD ラット (雄, 6 週令, 約 250 g) から大動脈を無菌

的に摘出し、phosphate buffered saline (PBS, pH. 7.4) 中で内皮細胞と外膜組織を剥離した後細切し、0.2 % コラゲナーゼ加 PBS で 37°C 15 分間処理し結合組織を部分消化した。コラゲナーゼ処理した中膜組織は培養液で洗浄した後、細胞培養用ディッシュ中で、2 ng/ml の basic fibroblast growth factor を添加した培養液を使用し 10-14 日間培養した。中膜組織より増殖してきた平滑筋細胞はトリプシン-EDTA 液を用いて継代培養し、20 代以下の細胞を実験に供した。動脈由来内皮細胞は、ウシ頸動脈より 0.125 % コラゲナーゼ (40 分, 37°C) 処理により血管壁より剥離採取し、平滑筋細胞に準じて継代培養し実験に供した。

(2) NO 産生量の測定：NO は不安定で直接測定が困難なため、その酸化産物である nitrite (NO_2^-) を Griess 試薬で定量することにより行った。⁹⁾ 培養液中の NO_2^- の量は培養上清と同量の Griess 試薬 (1 % sulfanilamide/0.1 % N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride/5 % リン酸) を混和し、10 分間室温にて反応後に 540 nm の吸光度を ELISA reader (Titertek) で測定した。新鮮な培養液をブランクとし、培養液で希釈した亜硝酸 (NaNO_2) をスタンダードとして定量した。

(3) 生薬水エキスの調製：調剤用生薬はウチダ和漢薬 (東京) より入手し、生薬 10 g につき 200 ml の精製水にて約半量になるまで煮沸し、濾液を濃縮した後、凍結乾燥を行い水エキス粉末を作製した。蒸留水にて 10 mg/ml の生薬水エキスのストック溶液を作製し実験に供した。血圧降下あるいは血管拡張作用が知られている生薬⁸⁾ のうち今回、黄芩、黄耆、黄柏、黄连、葛根、苦参、红花、山梔子、川芎、桑白皮、釣藤钩、当归、杜仲、人参、貝母、檳榔子、麻黄、桔梗、桂皮、芍药、薄荷の 21 種を検討した。

(4) 実験プロトコル：細胞は 6×10^5 /ml の密度で 24 well plate に撒き 16 時間の前培養にて細胞が plastic plate に付着した後に使用した。1 well 当たり 500 μ l の培養液を使い、10 mg/ml の生薬水エキス溶液を必要な最終濃度になるように添加した。種々の濃度の生薬水エキス存在下で培養し経時的に培養液中の NO_2^- 量を定量した。21 種の生薬は細胞毒性を示さない濃度以下で最大 2 mg/ml まで、また培養期間は最大 10 日まで検討した。NO 合成酵素 (NO synthase, NOS) の阻害剤である N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMA) と NOS 遺伝子の転写レベルでの抑制作用を有する dexamethasone (DEX) は Sigma 社 (St. Louis, USA) より購入した。L-NMA は蒸留水にて 100 mM のストック溶液を、DEX はエタノールで 1 mM のストック溶液を作成した。最終濃度はそれぞれ 1 mM (L-NMA) および 10^{-6} M (DEX)

で使用し、対照群には相当量の蒸留水あるいはエタノールを添加した。全ての実験は $n=6$ 以上で行い、結果は平均値±標準偏差で求めた。コントロール群との有意差検定は Student's paired t -test を用いて行い、 $p<0.05$ を有意とした。

結 果

1. 生薬水エキスによる NO 産生刺激作用のスクリーニング (Table I)

ウシ頸動脈内皮細胞およびラット大動脈平滑筋細胞を 6×10^5 cells/ml の細胞密度で、上述の実験プロトコールに従い、種々の濃度の生薬水エキス存在下で培養し経時的に培養液中の NO_2^- 量を定量した。ウシ血管内皮細胞

Table I Summary of the screening of crude drugs for the inducing activity on nitric oxide production in vascular smooth muscle cells and endothelial cells.

Crude drug	VSMC	Endothel
Angelicae Radix (当帰)	—	—
Arecae Semen (檳榔子)	—	—
Astragali Radix (黄耆)	+	—
Carthami Flos (紅花)	—	—
Cinnamomi Cortex (桂皮)	—	—
Cnidii Rhizoma (川芎)	—	—
Coptidis Rhizoma (黄連)	—	—
Ephedrae Herba (麻黄)	—	—
Eucommiae Cortex (杜仲)	—	—
Fritillariae Bulbus (貝母)	—	—
Gardeniae Fructus (山梔子)	—	—
Ginseng Radix (人參)	+	—
Menthae Herba (薄荷)	—	—
Mori Cortex (桑白皮)	—	—
Phellodendri Cortex (黄柏)	—	—
Pheoniae Radix (芍薬)	—	—
Platycodi Radix (桔梗)	—	—
Puerariae Radix (葛根)	—	—
Scutellariae Radix (黄芩)	+	—
Sophorae Radix (苦参)	—	—
Uncariae Uncis Cum Ramulus (釣藤鈎)	—	—

Rat vascular smooth muscle cells (VSMC) and bovine aortic endothelial cells (Endothel) were treated with various concentrations (0-2000 $\mu\text{g/ml}$) of each crude drug listed in the table. Nitrite concentration of each conditioned medium was measured for up to 10 days. The activity of each crude drug on NO induction was summarized as positive (+) or negative (—). Positive (+) indicates that nitrite concentration of the medium is significantly higher than that of control culture. In the endothelial cell cultures, nitrite concentrations were less than $1 \mu\text{M}$ in all samples.

を使用した場合には、いずれの生薬水エキス添加時にも、培養液中の NO_2^- 量は Griess 試薬で検出できないレベル ($1 \mu\text{M}$ 以下) であった。一方、ラット血管平滑筋に対しては、検討した 21 種のうち人參 (*Ginseng radix*)・黄耆 (*Astragali radix*)・黄芩 (*Scutellariae radix*) の 3 つの生薬水エキスに NO 産生刺激作用を認めた。その他の生薬エキスは種々の実験条件にて検討したが、有意な NO 産生刺激作用は認めなかった。以下、ラット平滑筋細胞に対して有意な NO 産生刺激作用を認めた人參・黄耆・黄芩に関してさらに検討した。

2. 人參・黄耆・黄芩の各水エキスによる NO 産生刺激作用の検討

種々の濃度の人參・黄耆・黄芩の各水エキス存在下でラット血管平滑筋細胞を 6×10^5 cells/ml の細胞密度にて 6 日間培養した時の培養上清中の NO_2^- 量に対する生薬水エキスの濃度依存曲線を Fig. 1 に示す。人參と黄耆は 2 mg/ml の濃度まで細胞生存率低下は見られず、400 $\mu\text{g/ml}$ 以上で濃度依存的に NO 産生を刺激し、生薬水エキス非添加群の NO_2^- 蓄積量 ($4.10 \pm 0.95 \mu\text{M}$) に対して 2 mg/ml の濃度で黄耆は約 18 倍 ($74.12 \pm 2.0 \mu\text{M}$)、人參は約 12 倍 ($49.07 \pm 3.2 \mu\text{M}$) の NO 産生を示した。一方、黄芩は 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では細胞毒性のため細胞生存率が低下するが、25 $\mu\text{g/ml}$ から 100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲

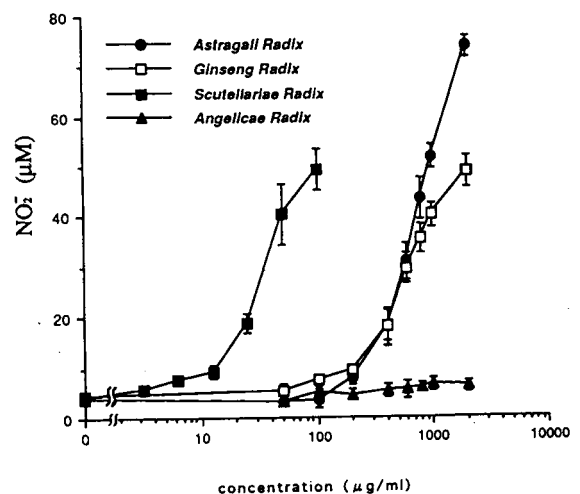


Fig. 1 Effects of aqueous extracts of *Astragali radix*, *Ginseng radix*, *Scutellariae radix* and *Angelicae radix* on nitrite (NO_2^-) accumulation in rat vascular smooth muscle cell cultures.

Cultures were incubated for 144 hours in the presence of various concentrations of the herbal extracts. Cells were cultured on a 24 well plate in 500 μl of RPMI 1640 medium containing 10 % fetal calf serum at a starting cell density of $6 \times 10^5/\text{ml}$. Nitrite levels in the conditioned media were quantified using Griess colorimetric assay. Each point represents the mean $\pm$ S.D. ($n=6$).

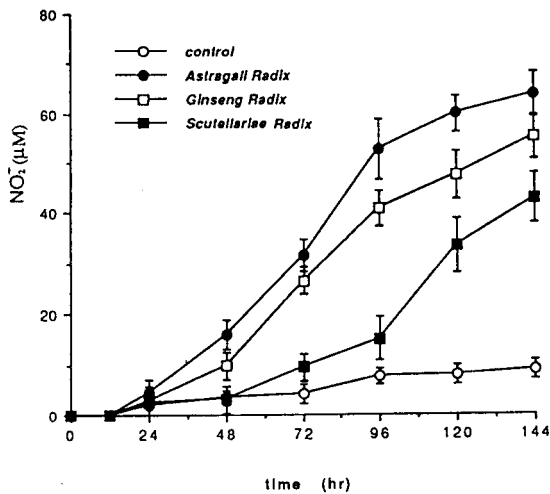


Fig. 2 Time course of the accumulation of nitrite (NO_2^-) in conditioned culture media of rat vascular smooth muscle cells.

Cells were incubated for the indicated lengths of time up to 144 hours in a control medium or in the presence of *Astragali radix* (1 mg/ml), *Ginseng radix* (1 mg/ml) or *Scutellariae radix* (0.1 mg/ml). Cells were cultured on a 24-well plate in 500 μl of RPMI 1640 medium containing 10 % fetal calf serum at a starting cell density of $6 \times 10^5/\text{ml}$. The extracellular accumulation of nitrite was determined using Griess colorimetric assay. Each point represents the mean $\pm$ S.D. (n=6).

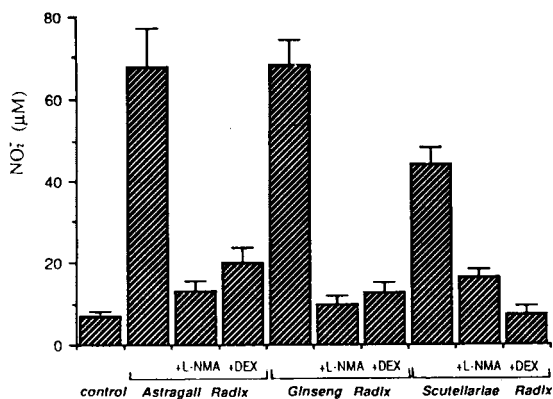


Fig. 3 Effects of N^6 -monomethyl-L-arginine (L-NMA) and dexamethasone (DEX) on the nitric oxide synthesis induced by aqueous extracts of *Astragali radix*, *Ginseng radix* or *Scutellariae radix*. Vascular smooth muscle cells were incubated for 144 hours in a control medium or media containing aqueous extracts of *Astragali radix* (1 mg/ml), *Ginseng radix* (1 mg/ml) or *Scutellariae radix* (0.1 mg/ml) in the presence or absence of L-NMA (1 mM) or DEX (10^{-6}M). The data represent the mean $\pm$ S.D. (n=8).

では濃度依存的な NO 産生刺激作用を認めた。対照薬として当帰 (*Angelicae Radix*) の水エキスを同様に検討したが、当帰には NO 産生刺激作用は認めなかった。次に、黄耆 (1 mg/ml)・人参 (1 mg/ml)・黄芩 (0.1 mg/ml) にて刺激した時の培養液中の NO_2^- 量を経時的に測定した (Fig. 2)。黄耆と人参は 24 時間後、黄芩は 72 時間後に培養液中の NO_2^- 量は Griess 反応で検出可能なレベルに達し以後経時的に蓄積した。また、NO 合成酵素 (NOS) の阻害剤である L-NMA (1 mM) や NOS 遺伝子の転写レベルでの抑制作用を有する DEX (10^{-6}M) の添加により、生薬エキスにより誘導される NO 産生は 30 % 以下のレベルまで抑制された (Fig. 3)。生薬成分そのものから NO が遊離されてくる可能性を検討するため、細胞を含まない培養液中に生薬水エキスを添加し、同様に検討したが、これら 3 つの生薬水エキスからの NO 遊離は認めなかった。

考 察

内皮由来血管拡張因子 (Endothelium Derived Relaxing Factor, EDRF) として発見された物質が NO と同一であることが証明されて以来、循環調節における情報伝達物質としての NO の役割が次々に明らかにされている。^{1,2,3)} すなわち、血管壁において NO は血管内皮細胞や平滑筋細胞から産生され、血管拡張や血小板凝集抑制に関与し、さらに非アドレナリン・非コリン作動性の血管拡張神経の伝達物質として外膜側からも作用する事が証明されている。

今回著者らは、人参・黄耆・黄芩の 3 つの生薬水エキスにより、血管平滑筋細胞からの NO 産生量が増加することを示しそのメカニズムについて検討を行った。生薬成分そのものからの NO 遊離は認めておらず、血管内皮細胞に対しては NO 産生増加は認めなかった。さらに NOS 阻害剤である L-NMA や DEX は生薬エキスにより誘導される NO 産生増加に対して抑制作用を示した。これらの結果は、生薬水エキスによる血管平滑筋細胞からの NO 産生が NOS により L-arginine から新たに合成された NO に由来することを示している。superoxide が NO を消去する事実より生薬の superoxide dismutase (SOD) 活性が、NO 産生量増加に間接的に関与している可能性も考察する必要がある。¹⁰⁾ 生薬にはフラボノイドやカテキン類などのポリフェノール化合物をはじめとして、抗酸化作用や SOD 活性を有する物質を多く含んでいる。¹¹⁾ 今回検討した生薬では、芍薬・桂皮・黄芩・紅花・桑白皮などに強い抗酸化作用や SOD 活性が報告されている。しかし著者らの検討では、このうち黄

芩以外には NO 産生促進作用は認めておらず、生薬の SOD 活性による NO 産生量増加の可能性は低いと思われる。今後、NOS 遺伝子の転写レベルや酵素活性などさらに詳しいメカニズムの検討が必要と思われる。

NO 産生の検出に今回使用した Griess 反応の検出限界は数 μM のオーダーであるため、NO 産生刺激が検出されなかったものについても、そのような作用を否定する根拠にはならず、さらに感度の高いアッセイ法を用いて検討する必要も示唆された。また、NOS は誘導型 (inducible type, iNOS) と非誘導型 (constitutive type, cNOS) とに大別され、iNOS によって生成される NO の量は cNOS の数千倍にも達するとされており、通常、血管内皮細胞には cNOS が、平滑筋細胞には iNOS が主として存在することが知られている。¹²⁾したがって、内皮細胞の cNOS の活性化による NO 産生刺激作用はこの実験系で検出するのは困難と推測される。しかし、検出感度の低いこのアッセイ系で平滑筋細胞に対して NO 産生刺激作用を認めたものについては、その生薬の薬理作用との関連を検討するに十分の根拠になるとと思われる。人參と黄耆については NO 産生刺激作用は 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の高い濃度でしか検出できず、生体内で達し得る血中濃度を越えていると予想されるが、前述の理由により、この *in vitro* の実験での有効濃度の高さは生体内での血管平滑筋細胞からの NO 産生刺激作用を否定する根拠にはならない。敗血症性ショックにおいて、IL-1 などのサイトカインに誘導される iNOS による高度の NO 産生はショック状態における低血圧の主因と考えられており、¹³⁾ 実際、IL-1 は培養血管平滑筋細胞に対して強力な NO 産生刺激作用を示す。¹⁴⁾ 人參、黄耆や黄芩で見られた緩徐で穏やかな NO 産生刺激の方が生体内での薬理効果としてはより好ましいと推測される。黄耆の血圧降下作用に関する *in vivo* の検討ではすでに抑制性伝達物質である γ -aminobutyric acid (GABA) がその活性物質として報告されているが、¹⁵⁾ GABA には内皮細胞や平滑筋細胞に対して *in vitro* での NO 産生刺激作用は認めない。これは黄耆の血圧降下作用に、GABA 以外の活性成分による NO を介したメカニズムも関与している可能性を示唆している。人參には血圧上昇成分と血圧降下成分が共存している事が知られているが、¹⁶⁾ 今回の実験結果は、人參による血圧降下作用のメカニズムのひとつとして、NO 依存性の機序の関与の可能性を示唆していると思われる。黄芩にも血管拡張作用や血小板凝集抑制など NO を介したメカニズムの関与を示唆する薬理効果がすでに報告されている。⁸⁾ このような作用が果たして生体内でも同様の機序で起こっているかどうかの証明には、NO 産生刺激作用を有する活性成分を同定し、そ

の物質の *in vivo* での作用を検討する必要がある、今後の研究課題と思われる。

NO を介した血管拡張による血流増加や微小循環の改善は消化管や腎臓機能とも関連することが推測される。エンドトキシン誘発性の消化管粘膜障害が NO により阻害される事が報告されており、その機序として、エンドトキシンにより誘導される thromboxane A2 などの血管収縮性伝達物質による末梢血管の収縮に拮抗し、更に血小板凝集を抑制することにより血栓形成を抑制する事で組織微小循環を改善するなどが指摘されている。¹⁷⁾ このような末梢循環障害に起因する組織・臓器機能の障害の改善、さらに動脈硬化抑制効果などにおける漢方薬の薬理作用の検討に際しても、生薬成分による血管壁からの NO 産生に対する作用や NO を介したシグナル伝達系に及ぼす作用に関する検討が今後必要と思われる。

結 論

人參・黄耆・黄芩の各水エキスを、ラット血管平滑筋細胞に対する NO 産生刺激作用を認めた。漢方薬による血管拡張作用、抗動脈硬化作用などの循環系に及ぼす薬理作用の機序に、生薬成分による血管壁からの NO 産生刺激作用の関与の可能性を指摘した。

References

- 1) Ignarro, L.J.: Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* 3, 31-36, 1989.
- 2) Knowles, R.G. and Moncada, S.: Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem. Sci.* 17, 399-402, 1992.
- 3) Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142, 1991.
- 4) Hogg, N., Kalyanaraman, B., Joseph, J., Struck, A. and Parthasarathy, S.: Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide; potential role in atherogenesis. *FEBS letters* 334, 170-174, 1993.
- 5) Charpie, J.R. and Webb, R.C.: Vascular myocyte-derived nitric oxide is an autocrine that limits vasoconstriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 763-768, 1993.
- 6) Matsuda, J.: Endothelial injury with special reference to Oketsu. *Metabolism and Disease (extra edition, Kampo-yaku)* 29, 190-196, 1992.
- 7) Inaki, K.: A consideration on the treatment for hypertension, hypotension, peripheral circulatory disturbance, hypersensitivity to coldness from the viewpoint of Japanese traditional medicine. *The Journal of Traditional Sino-Japanese Medicine* 11, 437-444, 1990.
- 8) Cyong J-C: Cardiovascular disease and Kampo-yaku (循環器疾患と漢方薬). *Kampo Igaku (漢方医学)* 10 (8), 17-24, 1986.
- 9) Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R.: Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]

- Nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138, 1982.
- 10) Huie, R.E. and Padmaja, S.: The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Res. Commun.* **18**: 195-199, 1993.
- 11) Niwa, Y. and Miyachi, Y.: Antioxidant action of natural health products and Chinese herbs. *Inflammation* **10**, 79-91, 1986.
- 12) Nathan, C.: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064, 1992.
- 13) Kilbourn, R.G., Gross, S.S., Lodato, R.F., Adams, J., Levi, R., Miller, L.L., Lachman, L.B. and Griffith, O.W.: Inhibition of interleukin-1- α -induced nitric oxide synthase in vascular smooth muscle and full reversal of interleukin-1- α -induced hypotension by N^w-amino-L-arginine. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**, 1008-1016, 1992.
- 14) Inoue, T., Fukuo, K., Morimoto, S., Koh, E. and Ogihara, T.: Nitric oxide mediates interleukin-1-induced prostaglandin E₂ production by vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 420-424, 1993.
- 15) Hikino, H., Funayama, S., and Endo, K., Hypotensive principle of *Astragalus* and *Hedysarum* roots. *Planta medica*. **30**, 297-302, 1976.
- 16) Takagi, K.: Pharmacology of Ginseng. *The Journal of Traditional Sino-Japanese Medicine* **3** (3): 47-54, 1982.
- 17) Whittle, B.J.R., Boughton-Smith, N.K. and Moncada, S.: Biosynthesis and role of the endothelium-derived vasodilator, nitric oxide, in the gastric mucosa. *Ann. New York Acad. Sci.* **664**, 126-139, 1992.