

## 原 著

血管平滑筋の異常収縮に対するアカセチンと  
ビオカニン Aの異なる効果について

張 敏

山口大学大学院医学系研究科 分子細胞生理学 (生理学第一) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : アカセチン, ビオカニン A, スフィンゴシルホスホリルコリン, 血管平滑筋, Rhoキナーゼ

## 和文抄録

Rhoキナーゼ介在性Ca<sup>2+</sup>非依存性の血管の異常収縮は、くも膜下出血後の脳血管攣縮や狭心症などを惹起する。我々はCa<sup>2+</sup>非依存性の血管異常収縮の原因分子、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を同定した。血管攣縮治療薬の理想的な条件は、Ca<sup>2+</sup>依存性の生理的な血管収縮に影響を与えずに、Ca<sup>2+</sup>非依存性血管平滑筋異常収縮を特異に阻害することであるが、我々はこの条件を満たすものとしてエイコサペンタエン酸 (EPA) を見出した。実際にEPAはくも膜下出血後の血管攣縮を臨床的に抑制した。しかし、脂溶性のEPAは静脈内投与ができないため、新規水溶性の成分を探すことが急務であった。

そこで植物由来成分を中心にスクリーニングを行いフラボノイドで構造異性体であるアカセチンとビオカニン Aに注目した。ブタ冠状動脈血管平滑筋条片においてアカセチン後投与は40mM K<sup>+</sup>誘発性収縮を若干抑制したもののSPC誘発性収縮を速く、そして強く抑制したが、対照的にビオカニン A後投与はSPC誘発収縮よりむしろ40mM K<sup>+</sup>誘発性収縮を抑制するか、同程度に強く抑制した。アカセチンとビオカニン Aは共に、SPC誘発性Rhoキナーゼ活性化とミオシン軽鎖リン酸化の増加を強く阻害し、さらにヒト冠状動脈平滑筋細胞を用いた形態観察においてもSPC刺激によって生じる形態変化を強く抑制した。

以上の結果から、フェニル基の位置の相違が、後投与においてSPC誘発性異常収縮を特異的に抑制するかどうかに関与すると考えられる。

## 緒 言

狭心症、心筋梗塞、脳梗塞といった致命的疾患による死亡者数は合計すると癌とほぼ並び死因の第二位となっている。これらの疾患の原因は心臓や脳自体の異常ではなく、血管の攣縮が関与している。Ca<sup>2+</sup>依存性の血管収縮が生理的な血圧調節を担う一方で、Rhoキナーゼ介在性のCa<sup>2+</sup>非依存性の収縮は、くも膜下出血後の脳血管攣縮や狭心症などを惹起する。当研究室では血管攣縮を引き起こす原因分子として、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を発見した<sup>1)</sup>。血管攣縮の理想的な治療薬とは、血圧を維持するCa<sup>2+</sup>依存性の生理的な血管収縮に影響を与えずに、Ca<sup>2+</sup>非依存性血管平滑筋異常収縮を特異的に阻害するものである。当研究室の中尾らは、n-3多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) はSPCにより誘発されるブタ冠状動脈の異常収縮を特異的に阻害すると報告し、血管攣縮治療薬の理想的な条件を満たすものとしてEPAを見出した<sup>2)</sup>。しかしEPAには少なくとも2つの問題、『供給の不安定性』と『限定的な投与経路』がある。供給の不安定性の問題とは、EPA生産の大部分を魚からの精製に依存していること、乱獲や気候変動による大量死による魚の枯渇、海洋汚染による魚の品質の低下があげられる。投与方法における問題点

は、EPAは脂溶性であることから経口投与は可能であるものの、静脈内投与はできないため、意識不明の血管攣縮患者を救うことはできない点にある。これらの問題をクリアするには、安定供給可能な植物から、血管攣縮治療薬の理想的な条件を満たす、水溶性の分子を新たに見出すことが必要である。

フラボノイドとは、ポリフェノールの一種で天然に存在する有機化合物群の植物色素の総称であり、人体に対して生理機能を持つものも多く、特に植物に広く分布している。近年多くの研究により、フラボノイドが痛、心血管疾患、骨粗鬆症などに対して優れた保護効果を発揮することが証明されている<sup>3)</sup>。しかし、SPCにより引き起こされる血管異常収縮に関するフラボノイドの研究は不十分である。本研究では構造異性体であるアカセチンとビオカニン Aに注目する。アカセチンはいろいろな植物に存在する、ニセアカシア、ダミアナ、シラカンバおよびベニバナの種などにみられ<sup>4)</sup>、ビオカニン Aはレッドクローバー、大豆、ピーナッツ、ヒヨコマメ、その他のマメ科植物に含まれている<sup>5)</sup>。それぞれが、SPCによって引き起こされる血管平滑筋の非Ca<sup>2+</sup>依存性異常収縮と高カリウム溶液によって引き起こされるCa<sup>2+</sup>依存性収縮をさまざまな程度で抑制することを発見した。

## 試薬と実験方法

### 1. 試薬類

ビオカニン A (純度  $\geq 97\%$ ) およびアカセチン (純度  $\geq 97\%$ ) はSigma-Aldrich (米国) から購入した。化合物を100% DMSOに溶解して40mMのストック溶液を作成して $-20^{\circ}\text{C}$ で保存し、使用直前に最終濃度に希釈した。SPCはEnzo Life Sciences Inc (米国) から購入した。ブラジキニン (BK) はペプチド研究所 (日本) から入手した。他のすべての化学物質は、片山化学と和光純薬から購入した。

### 2. 標本

すべての手順は、山口大学の動物実験委員会によって承認され、施設のガイドラインに準拠して実施された。ブタ冠状動脈左前下行枝は、地元の食肉処理場 (北九州市食肉検査管理センター) から入手した。ブタ冠状動脈を主幹分岐部の約1 cm下から約3~4 cm採取し、氷冷しておいたKrebs液 (123mM

NaCl, 4.7mM KCl, 15.5mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25mM CaCl<sub>2</sub>, 11.5mM D-glucose) で動脈内を洗浄した後、血管組織を氷冷Krebs溶液に入れて実験室に輸送した。Krebs溶液は5% CO<sub>2</sub>と95% O<sub>2</sub>の混合ガスで処理された ( $4^{\circ}\text{C}$ でpHを7.4に調整)。脂肪組織と外膜をはさみで血管組織から取り除き、内膜を綿棒でそとこすり落とし、中膜平滑筋組織を平滑筋細胞の走行に沿って細片 (0.7mm  $\times$  4 mm) に切断し平滑筋条片を作成した。平滑筋条片からの内皮の完全な除去は、1  $\mu\text{M}$  BKに対する弛緩反応の欠如によって確認した。

### 3. ブタ冠状動脈血管平滑筋条片を用いた張力測定

張力測定実験は以前の論文で記述した方法で測定した<sup>6-9)</sup>。平滑筋条片は、Krebs溶液で満たされた8チャンバーオルガンバスLE01086 (Panlab Harvard装置, スペイン) に垂直に取り付けられ、混合ガスで処理され、 $37^{\circ}\text{C}$ に維持された。等尺性収縮力の測定には、力変換器TB-612T (日本光電) を使用した。静止張力を調整しながら、118mM K<sup>+</sup> (10.9mM NaCl, 116.8mM KCl, 15.5mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25mM CaCl<sub>2</sub>, 11.5mM D-glucose) とKrebs溶液を交互に適用して、118mM K<sup>+</sup>で最大張力が誘発される様に、静止張力を最適化した。その後、30  $\mu\text{M}$  SPCまたは40mM K<sup>+</sup> (88.9mM NaCl, 38.8mM KCl, 15.5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25mM CaCl<sub>2</sub>, 11.5 mM D-glucose) によって誘発された前収縮が定常状態に達した時点でアカセチンまたはビオカニン Aを投与した。30  $\mu\text{M}$  SPCまたは40mM K<sup>+</sup>によって誘発された前収縮に対するアカセチンまたはビオカニン Aの抑制率は、投与前の定常状態の張力を100%として算出した。

### 4. ヒト冠状動脈平滑筋細胞収縮の観察

ヒト冠状動脈平滑筋細胞 (HCASMC) は、5% ウシ胎児血清 (FBS), 0.5ng/mLヒト上皮成長因子 (hEGF) を含むHuMedia-SG2 (2 ng/mLヒト線維芽細胞成長因子-B (hFGF-B), 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ インスリン, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシンと50ng/mLアンホテリシンBを含む) で培養した。培養開始後3~9代目の細胞を実験に使用した。HCASMCは、35mmディッシュに $1 \times 10^6$ 個細胞を播種し、細胞のコン

フルエンスが80~90%に達したとき、FBSおよび成長因子を含まないHuMedia-SB2 (Kurabo, 日本) 培地に交換して、収縮型の表現型を得た。HuMedia-SB2で24時間処理した後、アカセチンまたはビオカニン Aを終濃度40 $\mu$ Mで添加してインキュベーター内に戻し37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>で30分間前処理した。次に、30 $\mu$ M SPCを培地に添加し、位相差顕微鏡 (KEYENCE BZ9000) を37.0 $^{\circ}$ Cと5% CO<sub>2</sub>に設定し、それぞれのサンプルを顕微鏡内に置き、HCASMC収縮のタイムラプスで32秒に1度撮影記録を10分40秒間行った。

## 5. ウェスタンブロット

ブタ冠状動脈条片を①前処置無し、SPC刺激無し、②アカセチン (40 $\mu$ M, 30min) 前処置あり、SPC刺激無し、③ビオカニン A (40 $\mu$ M, 30min) 前処置あり、SPC刺激無し、④前処置無し、SPC (30 $\mu$ M, 15 min) 刺激あり、⑤アカセチン (40 $\mu$ M, 30min) 前処置あり、SPC刺激あり、⑥ビオカニン A (40 $\mu$ M, 30min) 前処置あり、SPC刺激あり、の6群に分け、それぞれの条件で処理した後、5%トリクロロ酢酸 (TCA) にすばやく浸し、冷やした10mM DL-ジチオスレイトール (DTT) /アセトンで2回洗浄し、TCAを除去した。液体窒素を使用して凍結し、SK-Mill Freeze - Crush Apparatus (Diagnocine, 米国) で粉碎し、RIPAバッファー (和光純薬, 日本) で溶解した。組織溶解物を遠心分離し、上清を収集してSDSサンプルバッファーを添加しウェスタンブロットに用いた。30 $\mu$ gのタンパク質をロードして10% SDS-PAGEで分離し、MYPT1, Thr853リン酸化MYPT1 (p-MYPT1) (Santa Cruz, 米国), ミオシン軽鎖 (MLC) (Santa Cruz, 米国), Ser19リン酸化MLC (p-MLC) (Cell signaling, 米国), グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) (和光純薬, 日本) に対する抗体を用いたウェスタンブロットを行った。すべての一次抗体は、0.05% Tween-20トリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) で1:1,000に希釈した。二次抗体をTBS-Tで1:5,000に希釈した。シグナルはSuper Signal West Pico (Thermo Fisher, 米国) 化学発光基質を使用して視覚化し、Quantity One with ChemiDoc XRS-J (Bio-Rad, 米国) のソフトウェアを使用して評価した。

## 6. 統計処理

データはExcelで分析し、平均 $\pm$ SEMとして表記した。nはアッセイ数を示す。統計的有意性は、2群間では対応の無いt検定、3群間以上ではTukey-Kramer検定を用いて決定し、P値0.05未満を統計的に有意差があると定義した。

## 結 果

### 1. Ca<sup>2+</sup>非依存性SPC誘発異常収縮およびCa<sup>2+</sup>依存性40mM K<sup>+</sup>誘発収縮におけるアカセチンとビオカニン A後投与の効果

アカセチン、ビオカニン Aの構造式を図1AとBに示した。アカセチンはフラボン、ビオカニン Aはイソフラボンに属す構造異性体である。図1C-Fは、SPCおよび40mM K<sup>+</sup>誘発収縮に及ぼす40 $\mu$ Mのアカセチンとビオカニン Aの抑制効果を示した代表的な実記録である。20-80 $\mu$ Mアカセチンとビオカニン Aは濃度依存性にSPCおよび40mM K<sup>+</sup>誘発収縮を抑制した。40-80 $\mu$ Mアカセチンは40mM K<sup>+</sup>誘発収縮と比較しSPC誘発収縮を有意に抑制した。20 $\mu$ Mビオカニン AはSPC誘発収縮と比較し40mM K<sup>+</sup>誘発収縮を有意に抑制した。40-80 $\mu$ Mビオカニン AはSPC誘発、40mM K<sup>+</sup>誘発収縮を同程度に抑制した (図1G, 1H), したがって後投与実験においては、アカセチンはSPC誘発血管異常収縮を特異的に抑制することが示された。

### 2. アカセチンとビオカニン AのSPC刺激誘発ヒト冠状動脈平滑筋細胞 (HCASMC) の形態変化に及ぼす効果

ブタの冠状動脈条片 (組織) においてアカセチンとビオカニン AのSPC誘発性異常収縮に対する抑制効果は明らかとなったが、その効果がヒト冠状動脈平滑筋細胞 (HCASMC) においても確認できるか検討するために、位相差顕微鏡を用いて観察した (図2)。対照群はSPC刺激により、HCASMCの形態は時間依存性に紡錘形から円形に変化し、細胞間隙が拡大した。アカセチンまたはビオカニン Aを30分間前処置したHCASMCは、対照群と比較してSPC刺激による形態変化速度が遅延した。したがって、図1のブタ冠状動脈組織で観察されたアカセチンまたはビオカニン AのSPC誘発収縮抑制効果は、

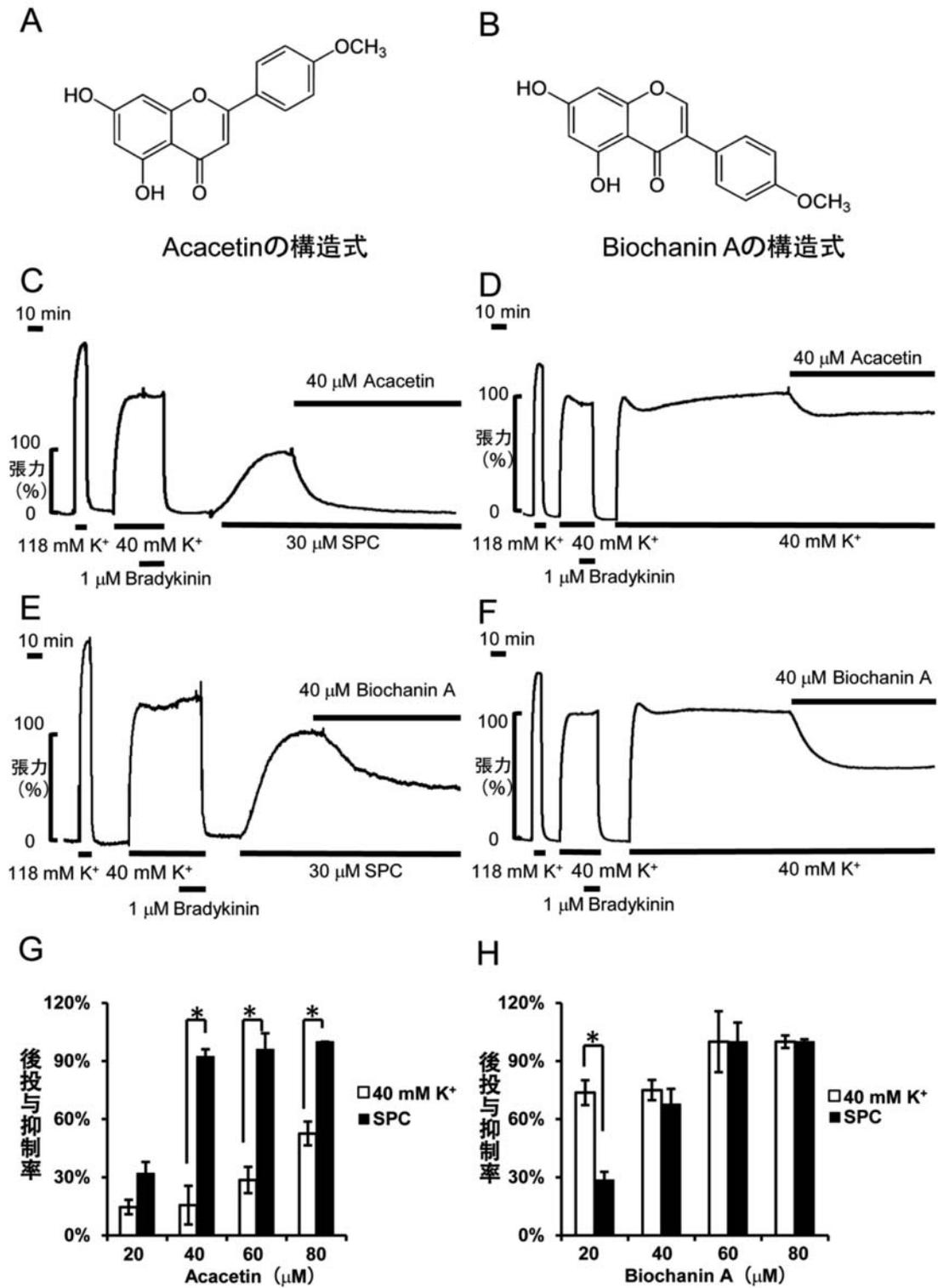


図1 プタ冠状動脈血管平滑筋条片におけるSPCによる異常収縮と40mM K<sup>+</sup>によるCa<sup>2+</sup>依存性収縮に対するアカセチンとバイオカニン Aの抑制効果

(A, B) アカセチンとバイオカニン Aの化学構造式. (C-F) 血管平滑筋条片におけるSPC (30μM) による異常収縮もしくは40mM K<sup>+</sup>溶液によるCa<sup>2+</sup>依存性収縮に対するアカセチンとバイオカニン A (40μM) の収縮抑制効果を示す. データは平均±標準誤差 (n = 3) で表示した. 抑制率はアカセチンまたはバイオカニン A添加前の定常状態下での張力を100%として算出した. \*P < 0.05, SPC: スフィンゴシルホスホリルコリン, BK: ブラジキニン, 40mM K<sup>+</sup>: 40mM K<sup>+</sup>溶液. (G, H) 血管平滑筋条片におけるSPCによる異常収縮および40mM K<sup>+</sup>溶液によるCa<sup>2+</sup>依存性収縮でのアカセチンとバイオカニン Aの濃度依存性収縮抑制率を示した. データは平均±標準誤差 (n = 3) にて表示した.

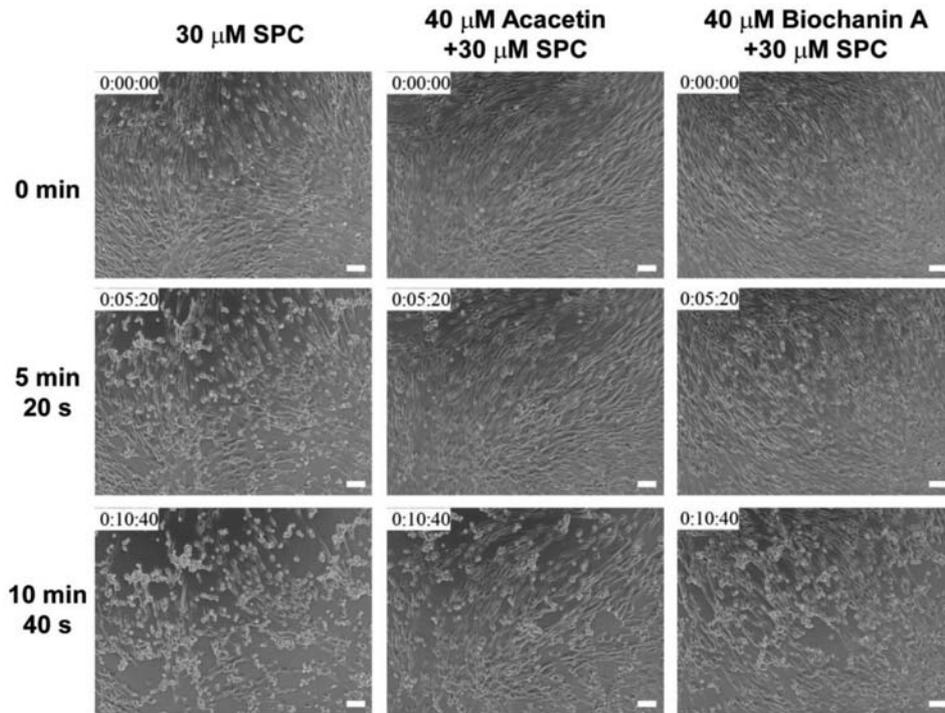


図2 ヒト冠状動脈平滑筋細胞 (HCASMC) においてアカセチンとビオカニン AはSPCによる異常収縮を抑制した. HCASMCを24時間血清飢餓状態にし, 続いてアカセチンまたはビオカニン Aのプレインキュベーション後, SPCで刺激した. 位相差顕微鏡を用いたタイムラプス観察により, コントロール群, アカセチン群, および, ビオカニン A群の細胞の形態学的な変化を観察した. スケールバー: 100μm.

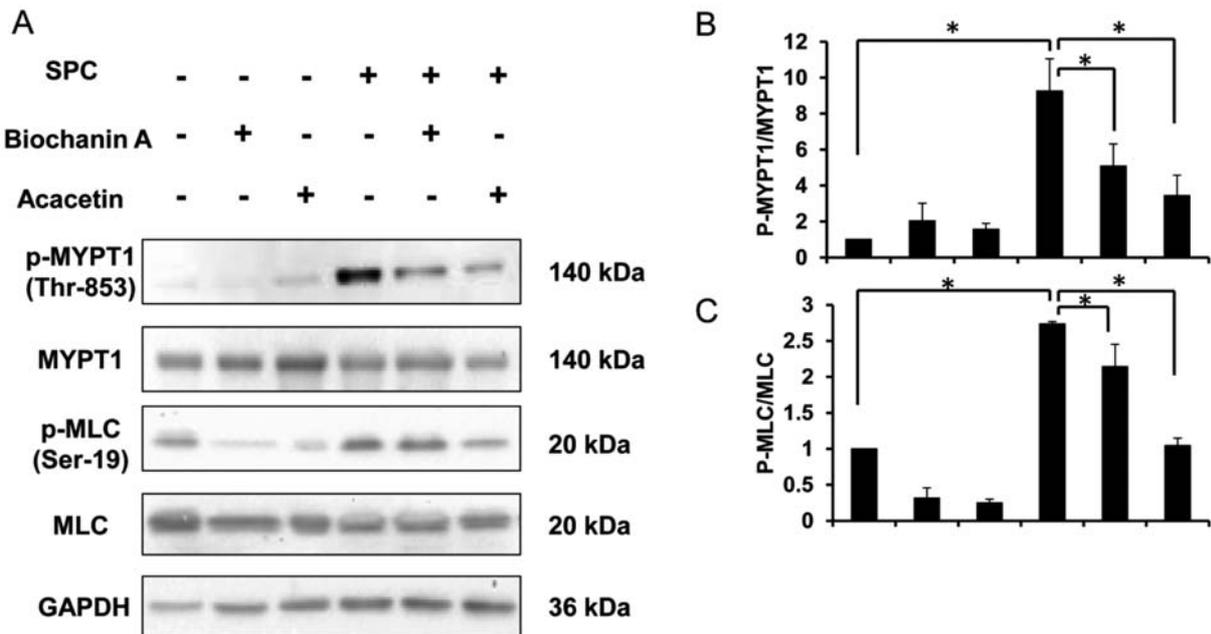


図3 アカセチンまたはビオカニン Aは血管平滑筋条片においてSPCが誘発したRhoキナーゼの活性化およびMLCのリン酸化を抑制した.

A. 血管平滑筋条片をアカセチン, ビオカニン A (40μM, 30min) の存在下または非存在下でプレインキュベートした後, SPC (30μM) の存在下あるいは非存在下で15分間インキュベートした. 抗p-MYPT1 (Thr853), 抗MYPT1, 抗p-MLC (Ser19), 抗MLC抗体および抗GAPDH抗体を用いたウエスタンブロット画像. B, C p-MYPT1とMYPT1 (B), および, p-MLCとMLC (C) のバンドの濃度を定量し, 比率をグラフ化した. データは平均±標準誤差 (n=3) にて表示した. \*P < 0.05. p-MLC: ミオシン軽鎖のリン酸化, p-MYPT1: ミオシンホスファターゼ調節サブユニット1のリン酸化

種を超えてヒトにおいても保存されていることが明らかとなった。

### 3. アカセチン, ビオカニン AのSPC刺激による Rhoキナーゼの活性化とMLCリン酸化レベル上昇に及ぼす影響

SPC誘発性血管異常収縮は, Rhoキナーゼを活性化して, ミオシン軽鎖ホスファターゼの調節サブユニット1であるMYPT1をリン酸化し, 平滑筋の収縮機構におけるCa<sup>2+</sup>感受性を増強させることが知られている<sup>1, 10-12)</sup>。したがってMYPT1のリン酸化(phospho-thr-853)を指標に, アカセチン, ビオカニン AのSPC刺激によるRhoキナーゼの活性化を抑制するかどうか評価した<sup>13, 14)</sup>。30μM SPCは対照群と比較して, MYPT1のThr-853のリン酸化レベルを有意に上昇させ, アカセチン, ビオカニン A前処置(30分間)共にそれを有意に抑制したが, その程度はアカセチンの方が優れていた。ミオシン軽鎖(MLC)のリン酸化も同時に測定したところ, MLCのSer-19リン酸化も同様に変化した(図3)。

## 考 察

本研究ではアカセチンおよびビオカニン AのSPC誘発Ca<sup>2+</sup>非依存性Rhoキナーゼ介在性血管異常収縮と40mM K<sup>+</sup>誘発Ca<sup>2+</sup>依存性収縮に及ぼす影響について検討し, アカセチンはビオカニン Aと比較してSPC誘発Ca<sup>2+</sup>非依存性Rhoキナーゼ介在性血管異常収縮を選択的に抑制することが明らかとなった。考察においては①くも膜下出血後の血管攣縮の治療薬として, ②くも膜下出血のリスクファクターの一つである高血圧の予防薬として, ③考えられる作用機序と構造活性相関について考察する。

①くも膜下出血後の血管攣縮の治療薬として: 血管攣縮の治療の際には, 血管拡張薬であるCaチャンネル拮抗薬は低血圧を誘発しその病状を悪化させる可能性があるため禁忌である。したがって, SPC誘発収縮よりむしろ40mM K<sup>+</sup>誘発収縮を抑制するビオカニン Aより, SPC誘発収縮を選択的に抑制するアカセチンが血管攣縮の治療薬の候補として推奨される。

②くも膜下出血のリスクファクターである高血圧の予防薬として: くも膜下での脳動脈瘤破裂のリスク

ファクターとして, 高血圧が示されており, 脳卒中治療ガイドライン2015にも, 高血圧の改善が強く勧められると明示されている。高血圧の代表的な第一選択薬の一つとしてCaチャンネル拮抗薬が使用されているが, これは40mM K<sup>+</sup>による収縮を抑制する作用を持つ。予防的投与を想定した前処置の実験では, 40μM アカセチン, 40μM ビオカニン Aは共に対照群と比較して40mM K<sup>+</sup>誘発およびSPC誘発収縮を有意に抑制した(data not shown)。したがって予防的投与の場合にはアカセチンもビオカニン Aも高血圧を抑制し得るので, 高血圧患者においてはくも膜下出血そのものの予防が可能になるかもしれない。なお図1の後投与の結果と同様にアカセチンは40mM K<sup>+</sup>誘発収縮よりもSPC誘発収縮抑制率が高く, ビオカニン Aはその逆であった。

③考えられる作用機序と構造活性相関: アカセチンは抗炎症作用, 心保護作用, 抗腫瘍作用などを持つことが知られている<sup>4)</sup>。アカセチンの作用メカニズムの一つにAMPKの活性化が知られている<sup>15, 16)</sup>。近年, クロウメドキに多く含有されるマダガシンがAMPKの活性化を介してSPC/Rhoキナーゼ経路を抑制するとの報告があった<sup>17, 18)</sup>。したがって, アカセチンも同様にAMPK活性化を介してSPC/Rhoキナーゼ経路を抑制する可能性がある。Biochanin Aについても抗炎症作用, 抗腫瘍作用, エストロゲン作用などが知られているが, われわれの知る限り, ビオカニン AはAMPKやRhoキナーゼ活性化に関する報告は見いだせなかった。これらの報告や結果から, 構造異性体のアカセチンとビオカニン A(図1AとB)の作用の比較にすると, フェニル基の位置の相違が, AMPK活性化やRhoキナーゼ活性化抑制の強さ, ひいてはSPC誘発Ca<sup>2+</sup>非依存性の異常収縮を選択的に阻害するかどうかを決定する可能性があるかもしれない。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり, ご指導下さいました, 分子細胞生理学講座の小林 誠 教授, 岸 博子 准教授, 張 影 講師, 森田知佳 助教の皆様へ深く感謝申し上げます。そして, いつもご支援頂いた同教室の大学院生 宮成健司さんと呂 博超さんに厚く御礼申し上げます。また, プタ冠状動脈サンプルを譲

渡頂きました北九州市食肉検査管理センターの皆様  
に心から感謝致します。

### 引用文献

- 1) Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, et al. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated  $Ca^{2+}$  sensitization in the bovine cerebral artery : unimportant role for protein kinase C. *Circulation Research* 2002 ; **91** (2) : 112-119.
- 2) Nakao F, Kobayashi S, Mogami K, et al. Involvement of Src family protein tyrosine kinases in  $Ca^{2+}$  sensitization of coronary artery contraction mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway. *Circulation Research* 2002 ; **91** (10) : 953-960.
- 3) Perez-Vizcaino F, Fraga CG. Research trends in flavonoids and health. *Arch Biochem Biophys* 2018 ; **646** : 107-112.
- 4) Singh S, Gupta P, Meena A, et al. Acacetin, a flavone with diverse therapeutic potential in cancer, inflammation, infections and other metabolic disorders. *Food Chem Toxicol* 2020 ; **145** : 111708.
- 5) Liu X, Wang T, Liu X, et al. Biochanin A protects lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Int Immunopharmacol* 2016 ; **38** : 324-331.
- 6) Todoroki-Ikeda N, Mizukami Y, Mogami K, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces  $Ca^{2+}$ -sensitization of vascular smooth muscle contraction : possible involvement of rho-kinase. *FEBS Letters* 2000 ; **482** (1-2) : 85-90.
- 7) Mogami K, Mizukami Y, Todoroki-Ikeda N, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces cytosolic  $Ca^{2+}$  elevation in endothelial cells in situ and causes endothelium-dependent relaxation through nitric oxide production in bovine coronary artery. *FEBS Letters* 1999 ; **457** (3) : 375-380.
- 8) Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) induces  $Ca^{2+}$ -independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. *FEBS Letters* 2001 ; **487** (3) : 361-366.
- 9) Mogami K, Kishi H, Kobayashi S. Sphingomyelinase causes endothelium-dependent vasorelaxation through endothelial nitric oxide production without cytosolic  $Ca^{2+}$  elevation. *FEBS Letters* 2005 ; **579** (2) : 393-397.
- 10) Choi SK, Ahn DS, Lee YH. Comparison of contractile mechanisms of sphingosylphosphorylcholine and sphingosine-1-phosphate in rabbit coronary artery. *Cardiovasc Res* 2009 ; **82** (2) : 324-332.
- 11) Zhang Y, Zhang M, Lyu B, et al. Omega-3 and omega-6 DPA equally inhibit the sphingosylphosphorylcholine-induced  $Ca^{2+}$ -sensitization of vascular smooth muscle contraction via inhibiting Rho-kinase activation and translocation. *Scientific Reports* 2017 ; **7** : 36368.
- 12) Xu D, Kishi H, Kawamichi H, et al. Involvement of Fyn tyrosine kinase in actin stress fiber formation in fibroblasts. *FEBS Letters* 2007 ; **581** (27) : 5227-5233.
- 13) Szasz T, Webb RC. Rho-Mancing to Sensitize Calcium Signaling for Contraction in the Vasculature : Role of Rho Kinase. *Adv Pharmacol* 2017 ; **78** : 303-322.
- 14) MacDonald JA, Walsh MP. Regulation of Smooth Muscle Myosin Light Chain Phosphatase by Multisite Phosphorylation of the Myosin Targeting Subunit, MYPT1. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2018 ; **18** (1) : 4-13.
- 15) Wu WY, Cui YK, Hong YX, et al. Doxorubicin cardiomyopathy is ameliorated by acacetin via Sirt1-mediated activation of AMPK/Nrf2 signal molecules. *J Cell Mol Med* 2020 ; **24**

(20) : 12141-12153.

- 16) Wu WY, Li YD, Cui YK, et al. The Natural Flavone Acacetin Confers Cardiomyocyte Protection Against Hypoxia/Reoxygenation Injury via AMPK-Mediated Activation of Nrf2 Signaling Pathway. *Front Pharmacol* 2018 ; 9 : 497.
- 17) Chen D, Lv B, Kobayashi S, et al. Madagascine Induces Vasodilatation via Activation of AMPK. *Front Pharmacol* 2016 ; 7 : 435.
- 18) Yu C, Zhang P, Lou L, et al. Perspectives Regarding the Role of Biochanin A in Humans. *Front Pharmacol* 2019 ; 10 : 793.

## The Different Effects of Acacetin and Biochanin A on Abnormal Contraction of Vascular Smooth Muscle

Min ZHANG

Department of Molecular and Cellular Physiology (Physiology I.), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

### SUMMARY

Rho-kinase-mediated  $Ca^{2+}$ -independent vascular abnormal contraction causes cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage and vasospastic

angina. We identified sphingosylphosphorylcholine (SPC) as the key molecule of  $Ca^{2+}$ -independent contraction. The ideal condition for the therapeutic agent for cerebral vasospasm is to specifically inhibit  $Ca^{2+}$ -independent contraction without affecting  $Ca^{2+}$ -dependent one. We found the ideal drug eicosapentaenoic acid (EPA), while EPA also suppressed vasospasm after subarachnoid hemorrhage clinically. However, lipophilic EPA can't be administered intravenously. In this way, it's urgent to find a new water-soluble compound.

We screened plant-derived compounds and focused on flavonoids, acacetin and biochanin A. Acacetin slightly inhibited 40 mM  $K^+$ -induced contraction in porcine coronary vascular smooth muscle strips, but inhibited SPC-induced contraction fast and strongly. In contrast, biochanin A inhibited 40 mM  $K^+$ -induced contraction more strongly than SPC-induced contraction. Both acacetin and biochanin A strongly inhibited SPC-induced Rho-kinase activation and myosin light chain phosphorylation. The morphological changes induced by SPC in human coronary smooth muscle cells were inhibited by acacetin and biochanin A.

In summary, the difference in the position of the phenyl group is involved in the inhibitory effect on SPC-induced abnormal contraction in post administration.