文章编号:1000-5404(2011)03-0229-04

论著

染料木黄酮对人血管内皮细胞氧化应激损伤的保护作用

张 婷,王 凡,朱俊东,易 龙,付钰洁,糜漫天 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市医学营养研究中心,重庆市营养与食品安全重点实验室)

【摘要】 **目的** 观察染料木黄酮(genistein, Gen)对人血管内皮细胞株 *EA hy*.926 氧化应激损伤保护效应并探讨其机制。**方法** 用 H_2O_2 建立氧化应激损伤模型,CCK-8 法检测 Gen 对细胞活力的影响;流式细胞仪和 TUNEL 法检测 Gen 对氧化应激诱导细胞凋亡的影响;Western blot 检测 Gen 对 Bcl-2、Nrf2、HO-1 表达的影响。**结果** H_2O_2 明显影响细胞活力和诱导凋亡(IC_{50} 为 650 μmol/L),Gen(100~500 nmol/L)处理能显著抑制细胞活力下降,且细胞凋亡率由 16.54% 下降为 6.18%;Gen 对 Bcl-2 有上调作用;Gen 能激活 Nrf2/HO-1 抗氧化途径。**结论** Gen 抑制血管内皮细胞的氧化应激损伤与对 Bcl-2 的调节和 Nrf2/HO-1 抗氧化途径的激活有关。

【关键词】 动脉粥样硬化;染料木黄酮;人血管内皮细胞;氧化应激;Nrf2
【中图法分类号】 R282.71;R322.12;R363.27 【文献标志码】 A

Protective effect of genistein on oxidative stress-induced injuries of human vascular endothelial cells

Zhang Ting, Wang Fan, Zhu Jundong, Yi Long, Fu Yujie, Mi Mantian (Nutrition and Food Safety Research Center, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect of genistein (Gen) on oxidative stress-induced injuries of human vascular endothelial cell line *EA hy*.926 and its mechanism. **Methods** Oxidative stress-induced injury model was established with H_2O_2. Effect of Gen on viability of cells and oxidative stress-induced apoptosis of cells was detected by CCK-8 assay, flow cytometry and TUNEL assay, respectively. Effect of Gen on expression of Bcl-2, Nrf2 and HO-1 was detected by Western blotting. **Results** H_2O_2 at the concentration of 100 to 500 nmol/L significantly inhibited the viability and apoptosis of cells (IC_{50} = 650 μmol/L), with the apoptosis rate decreased from 16.54% to 6.18%. Gen up-regulated the expression of Bcl-2 protein and activated the anti-oxidation pathway of Nrf2 and HO-1. **Conclusion** Gen effectively inhibit oxidative stress-induced injuries of vascular endothelial cells by up-regulating the expression of Bcl-2 and activating the anti-oxidation pathway of Nrf2/HO-1.

【**Key words**】 atherosclerosis; genistein; human vascular endothelial cell; oxidative stress; Nrf2

Supported by the "Eleventh Five-year Plan" for National Key Technology R&D Program (2008BA158B06). Corresponding author: Mi Mantian, Tel: 86-23-68752292, E-mail: mimt@sina.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重威胁人类健康和生命的心血管疾病(cardiovascular diseases, CDs),内皮细胞(endothelial cells, ECs)功能性损伤和凋亡是 AS 发生、发展过程中的重要事件[1,2]。流行病学证据显示有摄食大豆制品传统的亚洲特别是中国和日本 CDs 发病率远低于欧美国家,进一步研究发现亚洲人血浆中的染料木黄酮(genistein, Gen)可达 300 nmol/L,远远高于没有食用豆制品习惯的欧美人血浆中的 Gen 水平(6 nmol/L)[3]。Gen 是一类重要的大豆异黄酮(isoflavones, IS),由于其优良的抗氧化性和与雌激素受体结合能力,成为研究较多的植物雌激素。Gen 具有抗肿瘤[4-5]、防治骨质疏松、改善更年期症状,治疗心血管疾病、抗 AS 等效应[3],但有关 Gen 抗 AS 的分子机制尚不清楚。Nrf2 是细胞调节氧化应激水平的重要转录因子,血红素加氧酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1)的高表达对保护心血管系统有重要意义,且其主要受 Nrf2 的调节。本实验以血管 ECs *EA hy*.926 为研究对

【基金项目】 "十一五"国家科技支撑计划(2008BA158B06)
【通信作者】 糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail:mimt@sina.com

象，建立 H_2O_2 氧化应激模型，探讨 Gen 对 ECs 氧化应激损伤的影响及其分子机制，旨在为 Gen 用于对 AS 的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Cell Counting Kit-8（CCK-8）细胞计数试剂盒（Dojindo 日本），Gen、H_2O_2、DMSO（美国 Sigma 公司），Nrf2、β-tubulin 兔抗人多克隆抗体（美国 Santa Cruz 公司），HO-1 兔抗人多克隆抗体（美国 Stressgene 公司），Bcl-2 兔抗人多克隆抗体（美国 Bioworld 公司），Annexin Ⅴ-FITC 凋亡检测试剂盒（Bestbio 贝博生物），TUNEL 试剂盒（德国 Roche 公司），ECL 化学发光试剂盒（Beyotime 碧云天）。人脐静脉 ECs 株 *EA. hy* 926 购自美国 ATCC。用含 10% 胎牛血清的 DMEM/H 培养基在 37℃、5% CO_2、100% 饱和湿度条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测细胞活力 取对数生长期的 *EA. hy*926 细胞，以 5×10^4/ml 细胞数接种于 96 孔板，每孔 100 μl，贴壁后，加入不同浓度 H_2O_2（200、400、600、800 μmol/L），空白对照组只加入培养基，每组 6 个平行孔，处理 24 h 后，小心吸去孔内液体，加入按 1∶9（CCK-8∶培养基）配制的 CCK-8 应用液 100 μl，置于 CO_2 培养箱中孵育 1～4 h 后，用酶标仪（450 nmol/L）测定各孔光密度值[*D*（450）值]。H_2O_2 的 IC_{50} 值为细胞活力为 50% 时 H_2O_2 的浓度。

细胞活力 = 处理组 *D*（450）值/对照组 *D*（450）值 ×100%

以相同方法接种细胞，贴壁后，分别加入不同浓度（1、5、10、50、100、500 nmol/L 及 1、5、10、50 μmol/L）Gen，另设空白对照组只加培养基，预处理 10 h 后，按 IC_{50} 加入 H_2O_2 处理 24 h 后，同前述方法测定各组细胞活力。

1.2.2 流式细胞法检测细胞凋亡 取对数生长期的 *EA. hy*926 细胞，分为 Gen 预处理 10 h + H_2O_2 处理 24 h 组，H_2O_2 处理 24 h 组和正常对照组，每组 3 个平行，收集各组细胞，调整细胞数为 1×10^6/ml，2 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入冰冷 PBS 洗涤 2 次，2 000 r/min 离心 5 min，弃上清，将细胞重悬于 200 μl 的 Binding buffer 中，先加入 10 μl Annexin Ⅴ-FITC，轻轻摇匀室温避光反应 15 min 后，再加入 10 μl PI，4 ℃ 避光反应 5 min 后，用流式细胞仪检测细胞凋亡。

总凋亡细胞率 = 早期凋亡细胞率 + 晚期凋亡细胞率

1.2.3 TUNEL 法检测细胞 DNA 损伤 按 1.2.2 方法分组后制备各组细胞爬片，4% 多聚甲醛室温固定 1 h，PBS 浸洗，3% H_2O_2 甲醇溶液室温封闭 10 min，PBS 浸洗，以 0.1% Triton X-100 在冰上孵育 2 min，PBS 浸洗 2 次，按照试剂盒说明加入 TUNEL reaction mixture 37 ℃避光孵育 1 h，PBS 浸洗 3 次，用激光共聚焦扫描显微镜观察。

1.2.4 Western blot 检测细胞 Bcl-2、Nrf2、HO-1 的表达 根据文献[6]报道，Nrf2 被激活后其胞内表达水平与胞核表达水平一致。因此本研究观察了 Nrf2 在细胞中的表达情况。取对数生长期的 *EA. hy*926 细胞接种于细胞培养瓶中，待细胞融合瓶底 70%～80%，加入药物（分组同 1.2.2）分别处理，收集各组细胞，加入蛋白裂解液置于冰上裂解 30 min 后，4 ℃，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液。各组分别取 40 μg 蛋白，加入 5 × SDS 上样缓冲液，95 ℃煮沸 5 min 使蛋白变性，于 120 V、10% 的 SDS-PAGE 胶中电泳分离，半干法转移至 PVDF 膜，5% BSA 室温封闭 2 h，1∶800 稀释的一抗于 4 ℃孵育过夜；次日 TBST 漂洗 10 min × 3 次后，1∶6 000 稀释的二抗室温孵育 2 h，TBST 漂洗 10 min × 3 次，ECL 显色。避光晾干底片后扫描存盘，以 Quantity One 软件进行条带分析。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 H_2O_2 对 ECs 活力的影响

H_2O_2（200 μmol/L）处理细胞 24 h 后，细胞大部分存活，活力为 96.77%，随着剂量的升高（400 μmol/L 和 600 μmol/L）细胞活力显著下降，分别为 77.35% 和 56.57%，至处理浓度 800 μmol/L 时，细胞大部分死亡，细胞活力仅为 17.5%。H_2O_2 的 IC_{50} 值约为 650 μmol/L。

2.2 Gen 对 H_2O_2 诱导的 ECs 活力下降的影响

染料木黄酮在较大剂量范围内（1～10 μmol/L）对 ECs 活力有保护效应。与对照组相比，在 5～500 nmol/L 范围内随着染料木黄酮剂量的加大，细胞活力显著增加，呈明显剂量效应关系，随着剂量的进一步加大（1～10 μmol/L），细胞活力又逐渐降低，50 μmol/L 剂量组则无保护效应，见表 1。

表 1 Gen 对氧化应激下 ECs 活力的影响

Gen 浓度	细胞活力（%）
对照组（0 nmol/L）	100
1 nmol/L	124.30 ± 10.12
5 nmol/L	115.84 ± 8.88
10 nmol/L	136.33 ± 13.44[b]
50 nmol/L	133.36 ± 19.99[b]
100 nmol/L	154.67 ± 20.97[c]
500 nmol/L	161.45 ± 10.33[c]
1 μmol/L	133.03 ± 9.21[b]
5 μmol/L	128.09 ± 6.74[a]
10 μmol/L	109.72 ± 3.86
50 μmol/L	100.30 ± 7.34

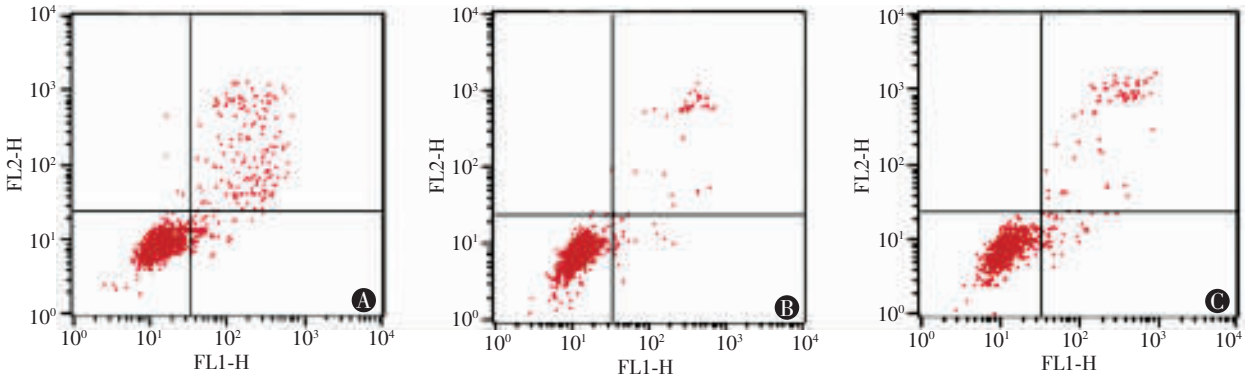
a $P<0.05$，b $P<0.01$，c $P<0.001$，与对照组相比

2.3 Gen 对 H_2O_2 诱导的 ECs 凋亡的影响

图 1 所示，与对照组（4.35%）相比，H_2O_2 处理组细胞凋亡率显著上升为 16.54%（$P<0.01$），经 Gen 预处理后，细胞凋亡率显著下降（与 H_2O_2 处理组相比 $P<0.01$），为 6.18%。对照组中无 TUNEL 阳性细胞，而 H_2O_2 处理组中 TUNEL 阳性细胞数上升，Gen 预处理组与对照组无显著差异（图 2）。

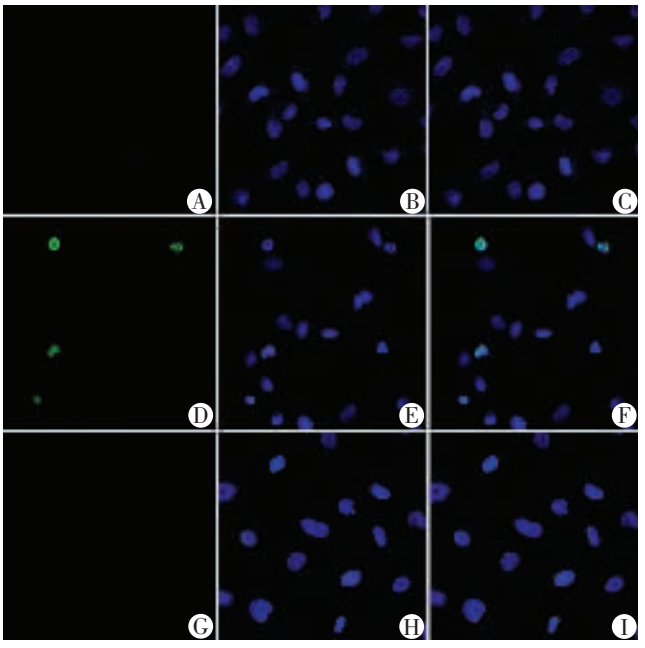
2.4 Gen 对 Bcl-2 的调节作用

与对照组相比，Gen 处理能显著上调 ECs Bcl-2 的表达，H_2O_2 处理后明显抑制了 Bcl-2 的表达水平，而 Gen 预处理能有效缓解此种抑制效应（图 3）。



A：H_2O_2 处理组；B：对照组；C：Gen 预处理 10 h + H_2O_2 处理 24 h

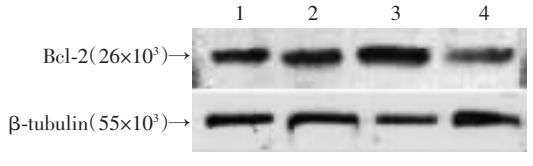
图 1　流式细胞法检测 Gen 对 ECs 凋亡的影响



A：对照组 TUNEL；B：对照组 DAPI；C：对照组融合；D：H_2O_2 组 TUNEL；E：H_2O_2 组 DAPI；F：H_2O_2 组融合；G：Gen 处理 + H_2O_2 TUNEL；H：Gen 处理 + H_2O_2 DAPI；I：Gen 处理 + H_2O_2 融合

绿色荧光为 TUNEL 染色阳性细胞，DAPI 复染

图 2　TUNEL 法检测 Gen 对 ECs 凋亡的影响　（激光共聚焦显微镜 ×400）

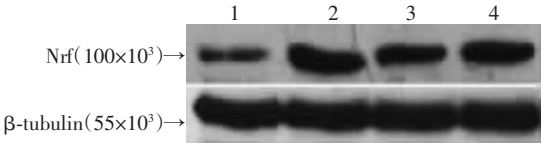


1：对照组；2：Gen 处理 10 h + H_2O_2 处理 24 h 组；3：Gen 处理 10 h 组；4：H_2O_2 处理 24 h 组

图 3　Gen 对 ECs Bcl-2 的调节作用

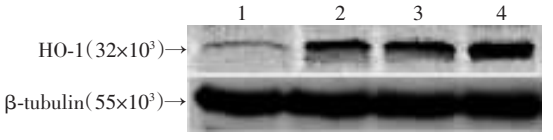
2.5　Gen 对 Nrf2/HO-1 的激活效应

对照组中 ECs Nrf2 表达水平很低，Gen 处理 1 h 后 Nrf2 表达明显升高，在 2 h 和 4 h 处理组也观察到同样的情况（图 4）。对照组中 HO-1 表达水平非常低，随着 Gen 处理时间的延长（1 ~ 10 h）HO-1 表达水平随之升高，呈显著的剂量效应关系（图 5）。



1：对照组；2：Gen 处理 1 h 组；3：Gen 处理 2 h 组；4：Gen 处理 4 h 组

图 4　Gen 对 ECs Nrf2 的激活效应



1：对照组；2：Gen 处理 1 h 组；3：Gen 处理 5 h 组；4：Gen 处理 10 h 组

图 5　Gen 对 ECs HO-1 的上调作用

3　讨论

Ross 的“损伤反应”学说认为血管 ECs 功能性损伤是 AS 形成早期的始动环节[7]。活性氧族（Reactive oxygen species，ROS）如超氧阴离子（O_2^- ·）、过氧化氢（H_2O_2）、羟自由基（OH ·）在机体内的大量生成，可直接或间接地对细胞产生各种毒性作用，甚至引起细胞凋亡[8]。染料木黄酮又名金雀异黄酮或染料木素，是大豆异黄酮的主要成分，也是一类重要的天然植物雌激素，其分子结构含有 3 个羟基而具有较强的抗氧化能力[9]。大量体内外试验表明 Gen 具有抗 AS[10]、抗氧化效应[11]，但相关分子机制研究甚少。本研究发现 Gen 在 10 ~ 1 000 nmol/L 较宽剂量范围内对 ECs 氧化应激损伤有较强的保护作用，其中在 100 ~ 500 nmol/L 抗氧化效应尤其显著，此保护效应与 Gen 对 Bcl-2 的调节和 Nrf2/HO-1 的激活有关。

细胞凋亡的通路一条为死亡受体通路，由死亡配体如（TNF-α、FasL、TWEAK、TRAIL）与死亡受体结合后启动。已证实17β-雌二醇能够促进ECs增殖、迁移和抑制TNF-α诱导的细胞凋亡[12]。近年来研究报道Gen通过p38MAPK途径抑制TNF-α诱导的细胞凋亡[13]；另一条为细胞色素C释放和caspase激活的生物化学通路，Bcl-2家族在此通路中起重要作用。本研究发现Gen对氧化应激因子诱导的细胞凋亡具有明显的抑制作用，TUNEL法显示Gen尤其对DNA损伤具有显著的保护效应，其抑凋亡机制可能与Gen对Bcl-2的调节作用有关。

Gen作为典型的酪氨酸酶抑制剂（PTK）使用已经有20多年[14]，但被用于此目的的药物浓度（>40 μmol/L）与本研究相比高很多。长期摄入大豆制品的亚洲人或摄入SI膳食补充剂的患者血液中的Gen浓度为（18±20）nmol/L[15]，远低于Gen发挥PTK活性的剂量。Nrf2是CNC（cap 'n 'collar）转录因子家族成员中活力最强的转录调节因子，主要调节Ⅱ相解毒酶（GST、NQO1）和抗氧化酶基因（HO-1、Prx、Trx、xCT）表达，是主要的抗氧化应激调节因子。血红素加氧酶-1（hemeoxygenase-1，HO-1）是受Nrf2调节的最重要的抗氧化蛋白酶，因此目前越来越多的研究认为Nrf2/HO-1是心血管疾病治疗中的新靶点。本研究发现Gen（500 nmol/L）能够持续激活Nrf2，诱导HO-1的表达，其浓度与Gen在人体血清中发挥有效生理功能的生理浓度[3]接近，推测Gen可能通过激活Nrf2/HO-1改善内皮功能，抑制AS形成。

综上所述，Gen能够抑制氧化应激诱导的内皮活力下降和细胞凋亡，Gen对Nrf2/HO-1的激活可能是其抗氧化效应的重要机制。结合本科室近年来研究成果[16-18]，本研究提示了植物化合物对AS可能的防治作用，SI的心血管保护效应的可能机制及植物雌激素对氧化应激水平紊乱疾病如AS等可能的益处。作为天然的植物雌激素，低浓度的Gen是否通过雌激素受体放大其生物学效应，激活Nrf2/HO-1发挥细胞保护作用，有待进一步研究证实。

参考文献：

[1] Norata G D, Tonti L, Roma P *et al*. Apoptosis and proliferation of endothelial cells in early atherosclerotic lesions: possible role of oxidised LDL[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2002, 12(5): 297-305.

[2] 王凡，张婷，糜漫天. 染料木黄酮对叔丁基过氧化氢诱导的内皮细胞凋亡的抑制作用[J]. 第三军医大学学报，2010，32(23)：2507-2510.

[3] Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men[J]. Lancet, 1993, 342(8881): 1209-1210.

[4] 李明，周永，糜漫天. 染料木黄酮对人乳腺癌细胞株MDA-MB-453、MCF-7、MCF-7/HER2增殖能力的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(17)：1618-1621.

[5] 吕斌，张萍，李振国，等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠子宫内膜细胞增殖的影响[J]. 郑州大学学报（医学版），2009，44(6)：1256-1257.

[6] Zhang D D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway[J]. Drug Metab Rev, 2006, 38(4): 769-789.

[7] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. Nature, 1993, 362(6423): 801-803.

[8] Abraham Spector, Wanchao Ma, Fang Sun, *et al*. The effect of H2O2 and tertiary butyl hydroperoxide upon a murine immortal lens epithelial cell line, alphaTN4-1[J]. Exp Eye Res, 2002, 75(5): 573-582.

[9] Wenzel U D. Fuchs D, Daniel H. Protective effects of soy-isoflavones in cardiovascular disease. Identification of molecular targets[J]. Hamostaseologie, 2008, 28(1/2): 85-88.

[10] Jackman K A, Woodman O L, Sobey C G. Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights[J]. Curr Med Chem, 2007, 14(26): 2824-2830.

[11] Huang G, Liu Y, Chang H, *et al*. Effects of genistein on oxidative injury in endothelial cells[J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2008, 54(5): 402-408.

[12] Florian M, Magder S. Estrogen decreases TNF-alpha and oxidized LDL induced apoptosis in endothelial cells[J]. Steroids, 2008, 73(1): 47-58.

[13] Si H, Liu D. Isoflavone genistein protects human vascular endothelial cells against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis through the p38beta mitogen-activated protein kinase[J]. Apoptosis, 2009, 14(1): 66-76.

[14] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, *et al*. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases[J]. J Biol Chem, 1987, 262(12): 5592-5595.

[15] Pytel D, Sliwinski T, Poplawski T, *et al*. Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2009, 9(1): 66-76.

[16] 易龙，陈春烨，金鑫，等. 花色苷类植物化学物抑制血管内皮细胞氧化应激损伤作用的结构-效应关系研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(21)：2046-2049.

[17] 金鑫，易龙，陈春烨，等. 膜电位及MAPK磷酸化在飞燕草素抑制Ox-LDL诱导的血管内皮细胞氧化损伤中的作用[J]. 第三军医大学学报，2009，31(19)：1854-1858.

[18] 陈春烨，张乾勇，易龙，等. bcl-2在氧化低密度脂蛋白诱导人血管内皮细胞凋亡中的作用[J]. 第三军医大学学报，2009，31(8)：663-667.

（收稿：2010-09-18 修回：2010-10-21）

（编辑 龙 亮）