

[文章编号] 1007-3949(2002)10-06-0509-04

• 实验研究 •

# 金雀异黄素对低密度脂蛋白氧化修饰及氧化型低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞 $c-myc$ mRNA 表达的抑制作用

刘 锦, 鲁映青<sup>1</sup>

(复旦大学上海医学院药理学系, 上海市 200032)

[主题词] 金雀异黄素; 大豆甙元; 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 内皮, 血管;  $c-myc$ , 原癌基因

[摘要] 为探讨大豆异黄酮(金雀异黄素和大豆甙元)在防止低密度脂蛋白氧化方面的作用以及对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞原癌基因  $c-myc$  表达的影响, 采用  $Cu^{2+}$  介导的低密度脂蛋白体外氧化方法, 通过测定硫代巴比妥酸反应物质生成和琼脂糖电泳迁移率的变化来观察大豆异黄酮对低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用; 采用 Northern blot 杂交技术, 分析氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞  $c-myc$  原癌基因 mRNA 表达的作用以及金雀异黄素对此表达的影响。结果发现, 金雀异黄素能够浓度依赖性减少硫代巴比妥酸反应物质生成, 降低低密度脂蛋白的相对电泳迁移率 ( $P < 0.05$ ); 氧化型低密度脂蛋白 (200 mg/L) 刺激人脐静脉内皮细胞  $c-myc$  mRNA 在 1~2 h 内表达增高, 表达量为对照水平的 3 倍, 4 h 回到对照水平以下; 金雀异黄素 (100  $\mu$ mol/L) 能有效抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的  $c-myc$  mRNA 表达增高。以上结果提示, 金雀异黄素不仅能防止低密度脂蛋白发生氧化, 而且能够抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞  $c-myc$  mRNA 表达增高。

[中图分类号] R363.1

[文献标识码] A

## Inhibitory Effects of Genistein on the Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein and $c-myc$ mRNA Expression Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein in Vascular Endothelial Cells

LIU Jin, and LU Ying-Qing

(Department of Pharmacology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[MeSH] Genistein; Daidzein; Lipoprotein, LDL; Endothelium, Vascular;  $c-myc$ ; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To discuss the effect of soy isoflavones (Genistein and Daidzein) on preventing the oxidation of LDL mediated by  $Cu^{2+}$  and to investigate the effect of Genistein on  $c-myc$  mRNA expression induced by ox-LDL in human vascular endothelial cells (ECV304). **Methods** 1. LDL were isolated from healthy human plasma by gradient ultra centrifugation and oxidized by  $Cu^{2+}$ . The formation of TBARS and relative electrophoretic mobility were employed to measure the antioxidant activity of Genistein and Daidzein of different concentrations (50, 100 and 200  $\mu$ mol/L respectively). 2. LDL isolated from healthy human plasma by gradient ultra centrifugation and oxidized by  $Cu^{2+}$  was used as a stimulus. ECV304 cells were exposed to ox-LDL (200 mg/L) in the presence or absence of Genistein 100  $\mu$ mol/L for 1, 2 and 4 h in vitro. Northern Blot was employed to measure  $c-myc$  mRNA levels of the treated cells. **Results** 1. The formation of TBARS and relative electrophoretic mobility of LDL were inhibited by Genistein in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$  vs control); However, Daidzein made none senses compared with control on the formation of TBARS and relative electrophoretic mobility of LDL ( $P > 0.05$ ). 2. In response to ox-LDL 200 mg/L,  $c-myc$  mRNA expression of hUVEC increased by about three folds in 1-2 h and decreased below the control level at 4 h; Genistein 100  $\mu$ mol/L effectively inhibited this over expression both at 1 and 2 h. **Conclusions** Genistein not only prevents the oxidation of LDL but also inhibits the over expression of  $c-myc$  mRNA induced by ox-LDL in ECV304.

目前有关动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发病机制已有许多学说, 但以 LDL 氧化学说最具有说服力<sup>[1]</sup>。分子生物学研究发现, 影响动脉粥样硬化发生的多种因素可调节原癌基因(protooncogene)

$c-myc$  表达, 尤以 ox-LDL 的作用明显<sup>[2]</sup>。已有研究表明, 脂溶性抗氧化剂维生素 E 和丙丁酚(probucol)能够抑制体外铜离子或细胞介导的 LDL 氧化, 并在实验性动脉粥样硬化模型中预防动脉粥样硬化的形成<sup>[3]</sup>。因此, 同样具有酚羟基的大豆异黄酮其抗动脉粥样硬化作用具有研究价值。大豆异黄酮主要包括金雀异黄素(genistein, 4', 5, 7-三羟异黄酮)和大豆甙元(Daidzein, 4', 7-二羟异黄酮)<sup>[4,5]</sup>。其中, 金雀异黄素作为酪氨酸蛋白激酶的专一性抑制剂, 在

[收稿日期] 2002-02-04 [修回日期] 2002-09-20

[作者简介] 刘锦, 女, 1975 年 10 月出生, 河南省洛阳市人, 药理学硕士, 助教, 研究方向为心血管药理学。鲁映青, 女, 1953 年 5 月出生, 浙江余姚人, 医学博士, 教授, 硕士研究生导师, 现任复旦大学上海医学院副院长, 本文通讯作者。联系电话 021-64041900-2308。E-mail 为 yqlu@shmu.edu.cn。

体外还具有抗增殖效应<sup>[6,7]</sup>。为探讨大豆异黄酮对体外铜离子介导的 LDL 氧化修饰的抑制作用以及对氧化型 LDL (ox-LDL) 诱导的动脉粥样硬化相关基因  $\sigma$ -myc mRNA 表达的抑制作用,以期对大豆异黄酮在动脉粥样硬化中的作用机制取得进一步的研究进展。

## 1 材料和方法

### 1.1 低密度脂蛋白的分离和提取

采用密度梯度超速离心法分离健康人新鲜血浆 LDL(密度范围为 1.019~1.063)<sup>[8]</sup>。分离的 LDL 在含有 EDTA(0.1%) 和  $\text{NaN}_3$ (0.02%) 的  $1 \times \text{PBS}$ (pH 7.4) 中  $4^\circ\text{C}$  透析 48 h, Lowry 法蛋白定量,  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌,  $4^\circ\text{C}$  避光保存。

### 1.2 低密度脂蛋白的氧化修饰

上述 LDL 在无 EDTA 的  $1 \times \text{PBS}$ (pH 7.4) 中  $4^\circ\text{C}$  透析 24 h, 以去除其中的 EDTA。用  $1 \times \text{PBS}$ (pH 7.4) 调节 LDL 浓度至  $1 \text{ g/L}$ , 加入终浓度为  $50 \mu\text{mol/L}$  的硫酸铜溶液,  $37^\circ\text{C}$  放置 24 h, 加入终浓度为 1% 的 EDTA 终止氧化。作为阳性对照的维生素 E( $100 \mu\text{mol/L}$ ) 以及金雀异黄素和大豆甾元(各  $50$ 、 $100$  和  $200 \mu\text{mol/L}$ ) 在加硫酸铜前加入。

### 1.3 硫代巴比妥酸反应物质测定<sup>[9]</sup>

取终止氧化的 LDL  $100 \mu\text{L}$ , 加入 20% 三氯乙酸  $1.5 \text{ mL}$ , 再加 0.67% 的硫代巴比妥酸  $1.5 \text{ mL}$ , 充分混匀, 置  $100^\circ\text{C}$  水浴  $45 \text{ min}$ , 冷却后,  $3500 \text{ r/min}$  离心  $10 \text{ min}$ , 取上清在  $532 \text{ nm}$  处测吸光度, 以 1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷为标准物质, 结果用丙二醛的含量( $\mu\text{mol/g}$ ) 表示。经测定氧化前后 TBARS 值相差 15 倍, 氧化后琼脂糖凝胶电泳迁移率为 2.0, 表明 ox-LDL 制备成功。

### 1.4 琼脂糖电泳迁移率测定

将终止氧化的 LDL 进行 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 油红 O 染色。电泳迁移率以 ox-LDL 与天然 LDL (n-LDL) 的电泳距离之比来表示。

### 1.5 内皮细胞培养

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 由北京大学医学部汤健教授提供。用 0.125% 的胰蛋白酶消化液, 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  进行传代培养, 经三次传代后, 获得实验所需细胞 18 瓶( $75 \text{ cm}^2$ , Nunc)。将生长即近汇合(70%~80%) 的 18 瓶细胞转换成含 0.4% 胎牛血清的 RPMI1640 饥饿 72 h, 使细胞处于同一状态, 准备用于实验。

### 1.6 氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞

将饥饿 72 h 后的 ECV304 细胞随机分成 6 组, 每组 3 瓶( $75 \text{ cm}^2$ , Nunc), 每瓶细胞计数约  $8 \times 10^6$  个。对照组更换 RPMI1640 培养基继续培养; 诱导组给予含  $200 \text{ mg/L}$  ox-LDL 的 RPMI1640 培养基分别诱导 1、2 和 4 h; 给药组在给予 ox-LDL  $200 \text{ mg/L}$  的 RPMI1640 培养基分别诱导 1、2 h 的同时, 加入终浓度为  $100 \mu\text{mol/L}$  的金雀异黄素。

### 1.7 Northern blot 杂交

用异硫氰酸胍法提取各组细胞总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 区带完整, 28S 与 18S 区带比例接近 2:1, 测 A260 与 A280 比值均在 1.8~2.0 之间。各组 RNA 均取  $45 \mu\text{g}$  经 1.0% 琼脂糖-甲醛凝胶变性电泳分离, 然后转移至尼龙膜, 进行紫外交联,  $80^\circ\text{C}$  烤膜 1 h,  $4^\circ\text{C}$  保存备用。 $\sigma$ -myc cDNA 探针采用随机引物法(random priming) 用 [ $^{32}\text{P}$ ] dCTP 进行标记(Promega 公司随机引物标记试剂盒)。 $68^\circ\text{C}$  预杂交 1 h, 加入标记好的探针继续杂交 3 h。先用  $200 \text{ mL}$   $2 \times \text{SSC}$ , 0.05% SDS 室温洗膜 3 次, 每次 10 min, 再用  $200 \text{ mL}$   $0.1 \times \text{SSC}$ , 0.1% SDS  $50^\circ\text{C}$  洗 20 min,  $56^\circ\text{C}$  洗 20 min。用 X 光片进行放射自显影, 附加增感屏,  $-70^\circ\text{C}$  曝光 72 h。用光密度扫描仪扫描 X 光片, 采用 Scion Image 分析软件对 Northern 杂交信号进行定量分析。

### 1.8 统计学方法

使用 SPSS 软件包对实验数据进行单向方差分析(One-way ANOVA),  $P < 0.05$  表示统计学上有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 大豆异黄酮体外抗低密度脂蛋白氧化

2.1.1 硫代巴比妥酸反应物质测定 选用天然抗氧化剂维生素 E 作为阳性对照, 结果发现维生素 E  $100 \mu\text{mol/L}$  能够明显抑制 TBARS 的生成( $P < 0.001$ ), 从而证明由铜离子介导的体外 LDL 氧化实验模型建立成功。与阴性对照 ox-LDL 相比, 金雀异黄素能够显著抑制 TBARS 的生成, 并具有浓度依赖性效应:  $50 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.05$ ;  $100 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.01$ ;  $200 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.001$ 。大豆甾元也能够抑制 TBARS 的生成, 但与 ox-LDL 相比, 无显著性差异。在相同浓度范围内, 大豆甾元与金雀异黄素的抗 LDL 氧化效应相比具有显著性差异:  $100 \mu\text{mol/L}$  时,  $P < 0.05$ ,  $200 \mu\text{mol/L}$  时,  $P < 0.001$  (表 1, Table 1)。

表 1. 金雀异黄素及大豆甙元的抗 LDL 氧化作用.

**Table 1. Inhibitory effect of vitamin E, Genistein and Daidzein on oxidation of LDL induced by Cu<sup>2+</sup> in vitro.**

Treatment group	n	TBARS (μmol/g)	Rate of inhibition (%)
rr-LDL		1.0	
ox-LDL	3	23.2 ± 1.8	2.8
Vitamin E 100 μmol/L	3	5.3 ± 2.5 <sup>c</sup>	77 ± 1
Genistein 50 μmol/L	3	17.0 ± 4.4 <sup>a</sup>	27 ± 2
Genistein 100 μmol/L	3	14.1 ± 5.7 <sup>b</sup>	39 ± 2
Genistein 200 μmol/L	3	8.4 ± 0.3 <sup>c</sup>	64 ± 1
Daidzein 50 μmol/L	3	21.0 ± 0.7	10 ± 3
Daidzein 100 μmol/L	3	20.7 ± 1.3	11 ± 2
Daidzein 200 μmol/L	3	19.2 ± 1.5	17 ± 2

Values are expressed as  $\bar{x} \pm s$ . a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , c:  $P < 0.001$ ; compared with ox-LDL group.

2.1.2 琼脂糖凝胶电泳迁移率测定 迁移率测定结果与 TBARS 测定结果基本一致。维生素 E 100 μmol/L 组的 LDL 电泳迁移率几乎与 rr-LDL 相当; 金雀异黄素能够明显降低 LDL 的电泳迁移率, 并表现出剂量依赖性, 200 μmol/L 金雀异黄素对电泳迁移率的影响与 100 μmol/L 维生素 E 相当; 大豆甙元对 LDL 电泳迁移率的影响则不明显(表 2, Table 2)。

表 2. 金雀异黄素及大豆甙元对 LDL 氧化修饰过程中电泳迁移率变化的抑制作用

**Table 2. Effect of VitE, Genistein and Daidzein on the relative electrophoretic mobility of LDL oxidized by Cu<sup>2+</sup> in vitro.**

Treatment group	Relative electrophoretic mobility
rr-LDL	1.0
ox-LDL	2.8
Vitamin E 100 μmol/L	1.0
Genistein 50 μmol/L	2.22
Genistein 100 μmol/L	1.66
Genistein 200 μmol/L	1.06
Daidzein 50 μmol/L	2.58
Daidzein 100 μmol/L	2.50
Daidzein 200 μmol/L	2.43

2.2 金雀异黄素对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞原癌基因 c-myc mRNA 表达的影响

200 mg/L ox-LDL 刺激人脐静脉内皮细胞株 ECV304 的 c-myc mRNA 表达增高。诱导 1 h 为对照

组的 3 倍, 2 h 为对照组的 3.3 倍, 4 h 则降低为对照组的 60%。金雀异黄素(100 μmol/L) 能够明显抑制 ox-LDL 诱导的 c-myc mRNA 表达增高: 1 h 加药组 c-myc mRNA 表达量为 1 h ox-LDL 诱导组的 80%, 2 h 加药组则降为 2 h ox-LDL 诱导组的 60% (图 1, Figure 1)。

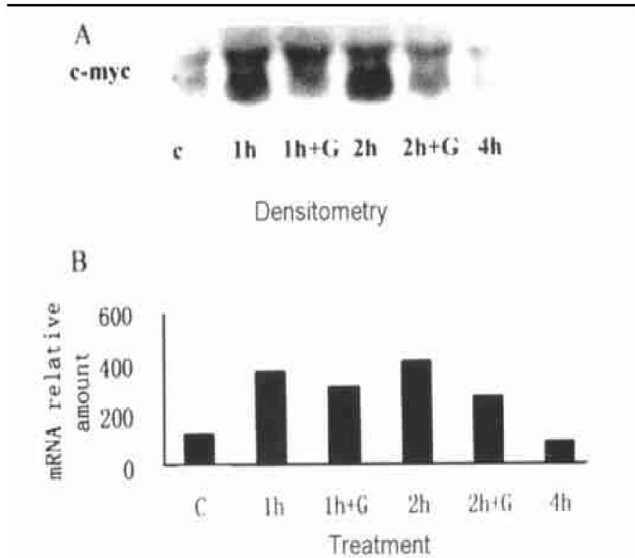


图 1. c-myc mRNA 表达的 Northern blot 杂交分析及密度扫描.

**Figure 1. Northern blot analysis showing the effects of ox-LDL and Genistein on c-myc mRNA levels in ECV304. C: control, G: genistein 100 (μmol/L).**

3 讨论

大豆异黄酮为大豆中含有的天然成分, 能否作为天然抗氧化剂用于临床多种疾病的辅助治疗是研究其抗氧化效应的意义所在。本实验通过体外铜离子介导的 LDL 氧化反应, 进一步证实了金雀异黄素在脂质系统的抗氧化效应, 为其作为抗氧化剂应用于动脉粥样硬化的早期防治积累了实验数据。在本实验中, 相同浓度范围内, 金雀异黄素与大豆甙元的抗 LDL 氧化效应相比具有显著性差异。这一结果与 Kapiotis 等<sup>[10]</sup> 及 Kerry 等<sup>[11]</sup> 对大豆异黄酮体外抗氧化效应的研究结果趋势基本一致。金雀异黄素和 大豆甙元均具有酚羟基结构, 前者在 C-5, 7, 4' 位上有 3 个羟基, 后者则在 C-5 位上少一个羟基。Arora 等<sup>[12]</sup> 在对大豆异黄酮及其代谢产物抗氧化效应进行的研究中指出: 其化学结构中 C-4' 的羟基是决定抗氧化效应的关键, 其次是 C-5 位羟基, C-7 位羟基的作用则相对不重要。金雀异黄素和 大豆甙元在化学结构上的区别有可能决定了其抗氧化效应的强弱。

在动脉粥样硬化的形成过程中, 内皮损伤和血

管内皮细胞的激活是参与动脉粥样硬化斑块形成的起始环节,而 ox-LDL 则是导致内皮损伤和激活的重要因素。ox-LDL 通过细胞内信号转导通路激活转录因子 (transcription factor), 其中核因子 kappa B (NF- $\kappa$ B) 的激活被视为血管内皮细胞受损的始动机制之一。活化的 NF- $\kappa$ B 通过与靶基因特定的识别序列相结合,调控参与损伤部位炎症/增殖反应的基因表达<sup>[13]</sup>。c-myc 作为多种细胞受到刺激分裂时的一种早期即刻反应基因,在其启动子/增强子 (promotor/enhancer) 区域含有功能性 (B 作用原件。因此, ox-LDL 可能通过激活 NF- $\kappa$ B, 增强 c-myc 的基因表达<sup>[14]</sup>。Cominacini 等<sup>[15]</sup> 提出, ox-LDL 与内皮细胞表面的凝集素样 ox-LDL 受体-1 (LOX-1) 结合, 通过增加细胞内活性氧 (reactive oxygen species) 的产生, 进一步激活 NF- $\kappa$ B; 抗氧化剂能够阻断由活性氧诱导的 NF- $\kappa$ B 的活化。Nigris 等<sup>[16]</sup> 首次发现维生素 E 除了能够防止 LDL 发生氧化, 还有可能通过抑制 ox-LDL 诱导的 c-myc 活化以及 c-myc 依赖性通路的激活, 防止动脉粥样硬化的形成。本实验首次发现金雀异黄酮能够有效抑制 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞株 ECV304 的原癌基因 c-myc mRNA 表达增高。因此, 金雀异黄酮作为抗氧化剂, 不仅可能通过抑制 LDL 的氧化修饰防止动脉粥样硬化的发生, 而且还有可能通过抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞活性氧的产生, 阻断 NF- $\kappa$ B 的激活, 进而抑制 c-myc 的表达, 从而阻止动脉粥样硬化斑块的形成。以上研究结果为开发大豆产品应用于冠心病等疾病的预防和治疗提供了重要的理论依据。

#### [参考文献]

[1] Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis.

- Free Radic Bio Med*, 1996, **20** (5): 707-727
- [2] Muller WD, Lochow P, Banskota N, et al. Increase of protooncogene mRNA levels by low density lipoprotein in vascular muscle cells. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, **35** (6): 1 169-173
- [3] Hoffman RM, Garewal HS. Antioxidants and the prevention of coronary heart disease. *Arch Inter Med*, 1995, **155**: 241-247
- [4] Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol*, 1996, **87** (5): 897-904
- [5] 郑高利. 大豆异黄酮的药理作用 I. *中国现代应用药学*, 1998, **15** (2): 4-5
- [6] Raines EW, Ross R. Biology of atherosclerotic plaque formation: Possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *J Nutr*, 1995, **125**: 624s-630s
- [7] Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, et al. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vivo angiogenesis. *J Nutr*, 1995, **125**: 790s-797s
- [8] Wang XY, Bucala R, Milne R. Epitopes close to the apolipoprotein B low density lipoprotein receptor-binding site are modified by advanced glycation end products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 7 643-647
- [9] Vazquez M, Merlos M, Adzet T, et al. Decreased susceptibility to copper induced oxidation of rat lipoproteins after fibrate treatment: influence of fatty acid composition. *British J Pharmacol*, 1996, **117**: 1 155-162
- [10] Kapiotis S, Hemann M, Held I, et al. Genistein, the dietary derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (11): 2 868-874
- [11] Kerry N, Abbey M. The isoflavone genistein inhibits copper and peroxy radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 1998, **140**: 341-347
- [12] Arora A, Nair MC, Strasburg. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **356** (2): 133-141
- [13] Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, 1994, **10**: 405-455
- [14] Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 1994, **12**: 141-179
- [15] Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, et al. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF- $\kappa$ B through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 2000, **275** (17): 12 633-638
- [16] Nigris F, Youssef T, Ciafre S, et al. Evidence for oxidative activation of c-myc dependent nuclear signaling in human coronary smooth muscle cells and in early lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: protective effects of vitamin E. *Circulation*, 2000, **102**: 2 111-117

(此文编辑 胡必利, 文玉珊)

## 中国病理生理学会网页

中国病理生理学会网页已在北京大学医学部网上建立, 可先进入 [www. bjmu. edu. cn](http://www.bjmu.edu.cn), 然后点击科学研究, 再点击学会就可进入。