

## 大豆异黄酮对大鼠实验性粥样硬化动脉壁内粘附分子基因表达的影响

张玉梅, 刘颖, 滕燕平, 邱隽, 崔洪斌

(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

[关键词] 营养学; 大豆异黄酮预防动脉粥样硬化作用及机制; 大鼠食饵性动脉粥样硬化模型; 细胞间粘附分子 1; 血管细胞粘附分子 1; 动脉粥样硬化

[摘要] 为研究大豆异黄酮在动脉粥样硬化发生过程中与细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 基因表达之间的关系。将 60 只大鼠按总胆固醇含量随机分为 6 组, 分别喂饲基础饲料、高脂饲料、高脂饲料加不同剂量大豆异黄酮和高脂饲料加雌激素。20 周后处死动物, 光学显微镜检测 HE 染色的主动脉壁横切面病理改变, 免疫组织化学和 Western blot 法检测血管壁内细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 蛋白, 并运用计算机图像分析系统进行组间分析比较。结果发现, 大鼠主动脉粥样斑块中, 细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 基因表达明显增加, 大豆异黄酮可以减轻高脂饲料诱导的主动脉病理变化, 减弱细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 基因在主动脉内的表达。此结果提示, 大豆异黄酮具有抗动脉粥样硬化形成作用, 此作用可能是通过减弱粘附分子在动脉壁的表达来实现的。

[中图分类号] R151.3

[文献标识码] A

### Soy Isoflavones Inhibits Gene Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Aorta Vessel of Atherosclerotic Rat Predisposed with High Cholesterol and High Fat Diets

ZHANG Yu-Mei, LIU Ying, TENG Yan-Ping, QIU Juan, and CUI Hong-Bin

(School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

[KEY WORDS] Soy Isoflavones; Atherosclerosis; Intercellular Adhesion Molecule-1; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate high quantity of total soy isoflavones influence adhesion molecule such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in aorta vessel during the formation of atherosclerosis in rats predisposed with high cholesterol and high fat diet. **Methods** 60 Wistar rats were divided in 6 groups randomly, rats of the normal diet control (NDC) group were fed with normal diet. Rats of the remainder groups were fed high cholesterol (3.5%), high fat (10%) and 1% hyocholic salt plus 85% normal diet. Rats of the high fat diet plus low (HLI group), medium (HMI group), high (HHI group) dose ISO groups were fed with high content of total isoflavones simultaneously and the dosage were 30 mg/kg, 90 mg/kg and 270 mg/kg body weights perday; rats of the high fat diet plus estrogen control (HEC) group was given estrogen 0.25 mg/kg body weights perday. After 20 week, rats were killed and aorta were taken. HE staining was used to study the pathology during the formation of atherosclerosis. Body weights and organ weight were detected to explore if there were physical impairment when isoflavones were given to rats. Immunohistochemistry and Western blotting were used to detect ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in aorta vessel and computer image analysis was used to check the degree of gene expression about VCAM-1 or ICAM-1. **Results** Soy isoflavones can inhibit atherosclerotic plaque formation dose dependently, lower the high expression of ICAM-1 and VCAM-1 in aorta vessel caused by high cholesterol and high fat diet (Compared to B group  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Soy isoflavones can inhibit expression of adhesion molecules genes such as ICAM-1, VCAM-1 in aortic of rats fed with high cholesterol and high fat diets.

流行病学调查发现, 经常食用大豆制品的日本人心血管疾病的发病率远远低于西方国家。研究发

现, 大豆中的异黄酮(soy isoflavones, ISO)具有降血脂和抗氧化作用, 可预防动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生<sup>[1,2]</sup>。白细胞与血管内皮的粘附是 As 发生的关键步骤之一。粘附分子在病人的 As 斑块、大鼠和家兔的脂质斑块中都有高表达<sup>[3-5]</sup>。体外研究发现, 大豆异黄酮的主要成分金雀异黄酮可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 MCP-1 的合成及表达<sup>[6,7]</sup>。整体动物

[收稿日期] 2002-05-17 [修回日期] 2002-11-25

[基金项目] 国家自然科学基金(30170802)资助。

[作者简介] 张玉梅, 女, 1966 年出生, 黑龙江省阿城县人, 博士, 副教授, 现为中山大学博士后, 主要从事食物中的植物性活性成分的生理作用的研究。刘颖, 女, 1968 年出生, 黑龙江省哈尔滨市人, 博士。滕燕平, 男, 1970 年出生, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士。

实验是否也存在相同的机制,值得进一步研究。我们分离纯化大豆异黄酮(总异黄酮 72.35%,金雀异黄素 28.49%)作为受试物,喂饲高脂动物,从分子生物学水平上探讨 ISO 对 As 形成过程中的相关基因如粘附分子表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及设备

大豆总异黄酮制品由本研究室自制,紫外分光光度法测得总异黄酮含量为 72.35%,高效液相色谱法测得其中的金雀异黄素含量为 28.5%。免疫组织化学试剂盒购自北京中山生物工程公司,其余为分子生物学常用设备。

### 1.2 实验动物及分组

雄性 Wistar 大鼠 72 只,体重  $160 \pm 20$  g,普通饲料喂养两周后,采尾血测定血清总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)值,剔除 TC 异常动物 12 只,剩余 60 只按 TC 值随机分为 6 组,每组 10 只。基础饲料对照(normal diet control, NDC)组大鼠喂饲基础饲料;高脂饲料对照(high fat diet control, HDC)组喂饲高脂饲料;低剂量大豆异黄酮(high fat diet plus low dose ISO, HLI)组、中剂量大豆异黄酮(high fat diet plus medium dose ISO, HMI)组和高剂量大豆异黄酮(high fat diet plus high dose ISO, HHI)组在喂饲高脂饲料的同时,分别按体重计算另加 30 mg/kg、90 mg/kg 和 270 mg/kg 大豆异黄酮;雌激素对照(high fat diet plus estrobenzene control, HEC)组在喂饲高脂饲料的同时,按体重计算另加 0.25 mg/kg 己烯雌酚。

### 1.3 饲料配方及来源

基础饲料配方来自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,因为本文主要观察大豆异黄酮的作用,所以,将其中豆粕按食物成分表<sup>[8]</sup>替换成其他成分;高脂饲料=85.5%基础饲料+10%大油+3.5%胆固醇+1%猪胆盐。

### 1.4 动物饲养及处置

所有动物单笼饲养,自由饮水和摄取配方饲料。实验 20 周。实验结束时处死动物,取腹主动脉和胸主动脉,放入液氮中迅速冷冻,然后置  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存,也可直接置液氮中保存。

### 1.5 免疫组织化学法检测血管壁组织中粘附分子基因的蛋白表达

制备大鼠主动脉切片,然后用多聚赖氨酸处理以防止脱片;用二甲苯脱脂和梯度乙醇脱水;3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mmol/L PBS 配制),室温作用 10 min,以灭

活内源性过氧化物酶;PBS 洗 3 次,每次 2 min;将切片浸入 10 mmol/L pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液中,电炉加热至  $96 \sim 100^{\circ}\text{C}$ ,维持 20~30 min,冷却后滴加抗原修复液,室温反应 10 min, PBS 洗 3 次,每次 2 min;加封闭液正常山羊血清,室温反应 10 min 后,甩去多余液体,不洗;滴加一抗,置湿盒内  $4^{\circ}\text{C}$  过夜。10 mmol/L PBS 洗 3 次,每次 3~5 min;加生物素标记的二抗,置湿盒内,  $37^{\circ}\text{C}$  反应 30 min;10 mmol/L PBS 洗 3 次,每次 3~5 min;加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(S-P)置湿盒内,  $37^{\circ}\text{C}$  放置 30 min;10 mmol/L PBS 洗 3 次,每次 3~5 min;加 DAB 显色 3~5 min;自来水冲洗,苏木素复染,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,光学树脂封片,镜下观察。蛋白表达情况经远航病理分析系统处理。

### 1.6 Western blot 法检测血管壁组织中粘附分子基因的蛋白表达

分别取各组动物的血管放入 Ap 管中,于 PBS 洗涤除去血液,剪碎,加 1 mL 的裂解缓冲液(预冷至  $0^{\circ}\text{C}$ )等,在组织匀浆器上  $0^{\circ}\text{C}$  匀浆,匀浆后,冰上放置 30 min, 10 000 r/min  $4^{\circ}\text{C}$  离心 5 min,取上清液少许测蛋白含量,剩余上清液按蛋白量相同上样,8%分离胶分离,进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳及转膜操作。然后对滤膜进行封闭,先与山羊抗鼠 VCAM-1 多克隆抗体反应,再与辣根过氧化物酶标记的二抗反应,采用含 DAB (3,3'-二氨基联苯胺)的 PBS 溶液显色。用数字显像仪对滤膜进行图象拍照和分析。

### 1.7 统计学方法

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 大豆异黄酮对实验大鼠主动脉形态学的影响

2.1.1 肉眼观察 基础饲料对照(NDC)组的主动脉和腹主动脉管腔内壁光滑,无异物。高脂饲料对照(HDC)组的动物血管内壁上可见乳白色小的突起物,洗尽血液后,将腹主动脉对光观察,可见乳白色的脂质条纹。添加高剂量大豆异黄酮(HHI)组的大鼠主动脉内壁,未见明显的形态学改变。

2.2.2 病理观察 实验各组动物 20 周处死后,胸主动脉和腹主动脉浸入 4% 多聚甲醛溶液固定,脱水,石蜡固定,切片,常规染色,结果见图 1 (Figure 1)。可见, Wistar 大鼠喂饲富含胆固醇、胆盐、甘油三酯的饲料 20 周后,动脉内管壁呈现明显的病理性

变化, 内膜增厚, 可以见到明显的泡沫细胞, 动脉壁各层脂质浸润, 可以见到胆固醇结晶, 管腔内管壁厚薄不匀, 有类似于粥样和纤维样的斑块; 喂饲基础饲料 20 周后, 动脉内膜正常, 各层细胞排列均匀, 管腔内壁光滑, 未见异常增生。

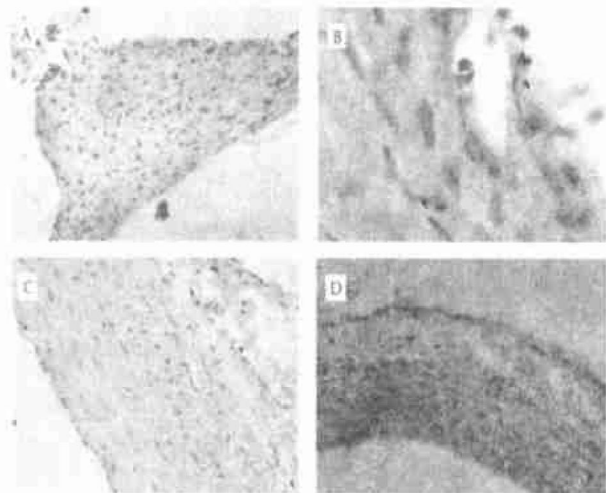


图 1. 大鼠胸主动脉壁病理分析 A 为高脂饲料对照组 (200 $\times$ ), 箭头示粥样斑块, 可见泡沫细胞和胆固醇结晶; B 为低剂量大豆异黄酮组 (400 $\times$ ), 箭头示泡沫细胞及中间的胆固醇结晶; C 为高剂量大豆异黄酮组 (400 $\times$ ); D 为基础饲料对照组。

Figure 1. Pathological analysis of the thoracaortal wall in rats

A is the rat of HDC group; B is the rat of HLI group; C is the rat of HHI group; D is the rat of NDC group.

## 2.2 大豆异黄酮对大鼠粥样硬化主动脉壁内细胞间粘附分子表达的影响

细胞间粘附分子 (ICAM) 1 蛋白存在于细胞的胞浆中, 阳性表达呈现棕黄色。将镜下某一视野阳性表达区域与视野下血管总面积比较, 结果见表 1 (Table 1)。可见基础饲料对照组和高脂饲料对照组 ICAM-1 的阳性表达率相似, 而在饲料中加入大豆异黄酮, 不同剂量条件下表达均有减低作用, 且有量-效关系。

## 2.3 大豆异黄酮对大鼠粥样硬化主动脉壁内血管细胞粘附分子表达的影响

将转膜后的滤膜与山羊抗大鼠多克隆 VCAM-1 抗体进行杂交, 反应结束后用 PBS 缓冲液清洗滤膜, 再与抗山羊的二抗杂交, 然后在含有 DAB、双氧水和二氯化钴的 PBS 缓冲液中显色, 再经数字成像仪成像, 结果见图 2 和表 2 (Figure 2 and Table 2)。可见, 血管细胞粘附分子 (VCAM-1) 在各组大鼠主动脉壁内均有表达, 与基础饲料对照组相比, 高脂饲料对照组 VCAM-1 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ), 喂饲高脂饲料同时给予大豆异黄酮的各剂量组都能降低

VCAM-1 的高表达, 特别高剂量大豆异黄酮组的 VCAM-1 表达水平与基础组相比没有明显差异, 即可将 VCAM-1 的高表达降低到接近正常水平。雌激素也有一定的降低 VCAM-1 表达的作用, 但没有大豆异黄酮明显。

表 1. 大鼠主动脉壁内细胞间粘附分子 1 表达

Table 1. ICAM-1 gene expression in aorta of rats

分组	n	表达阳性率
NDC	10	23.5% $\pm$ 7.7%
HDC	10	92.3% $\pm$ 17.3%
HLI	10	67.5% $\pm$ 15.5% <sup>a</sup>
HMI	10	32.1% $\pm$ 10.9% <sup>a</sup>
HHI	10	15.6% $\pm$ 3.2% <sup>a</sup>
HEC	10	36.6% $\pm$ 12.3% <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与 HDC 组比较。NDC: 基础饲料对照; HDC: 高脂饲料对照; HLI: 高脂饲料加 30 mg/kg 大豆异黄酮; HMI: 高脂饲料加 90 mg/kg 大豆异黄酮; HHI: 高脂饲料加 270 mg/kg 大豆异黄酮; HEC: 高脂饲料加雌激素对照; 下同。

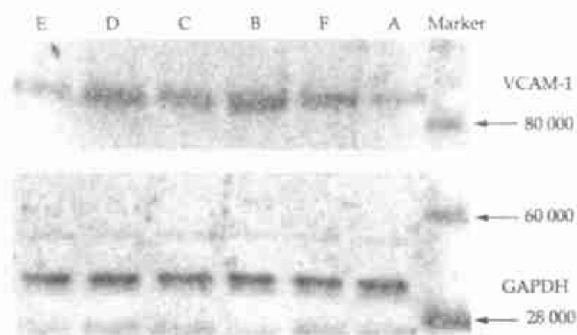


图 2. 大豆异黄酮对血管壁内细胞粘附分子 1 表达的影响

Figure 2. ISO inhibits high expression of ICAM-1 and VCAM-1 in aorta vessel

表 2. 血管细胞粘附分子 1 在鼠血管壁中的表达

Table 2. VCAM-1 expression in rats aortic

分组	样本中的蛋白含量 ( $\mu$ g)	峰面积
NDC	30	1810
HDC	30	3342
HLI	30	2315 <sup>a</sup>
HMI	30	2468 <sup>a</sup>
HHI	30	1820 <sup>a</sup>
HEC	30	2435

a:  $P < 0.05$ , 与 HDC 组比较。

## 3 讨论

动脉粥样硬化被认为是一个慢性炎症过程, 通

过上调粘附分子 ICAM-1、VCAM-1 及 MCP-1、E-selectin 的表达,使得白细胞和巨噬细胞活动性、粘附力和转移力增强,是导致 As 的前提<sup>[9,10]</sup>,以血管内的白细胞及血管壁内的中层平滑肌细胞进入到血管内膜形成斑块样物质为特征。这些粘附分子在斑块形成早期促使血中的白细胞和巨噬细胞掺入内皮,在已形成的斑块组织中促使斑块的扩大。斑块中的粘附分子可能影响细胞的形态结构并促使细胞/生长因子的合成及中层平滑肌细胞继续掺入内膜,并因此影响细胞的复制、分裂和增殖。

在对 As 的研究中,已经检测到血浆中由可以诱发 As 的脂蛋白如 LDL 或 ox-LDL 诱导的关键性粘附分子的较高的表达<sup>[11]</sup>,这些粘附分子反过来又介导单核细胞掺入到斑块组织中。Porsch-Oezcuemez M 等建议将血清中可溶性的粘附分子 sICAM-1、sVCAM-1 和 sE-selectin 作为考查 As 发展程度的临床指标<sup>[10]</sup>。在用高脂饲料诱导的高胆固醇大鼠血液中,研究者发现在 As 形成的早期,斑块区域内 ICAM-1 的表达增强,伴随 ICAM-1 高表达的同时,单核细胞和巨噬细胞明显地掺入到内皮组织中。体外研究发现,金雀异黄素通过抑制转录活化因子及 VCAM-1 mRNA 表达方式拮抗由 IL-4 诱导的内皮细胞 VCAM-1 及 E-选择蛋白的增加<sup>[12]</sup>。由于粘附分子种类繁多,本研究集中于 ICAM-1 和 VCAM-1 在血管壁内的表达,原因在于它们在血管内皮细胞和血管平滑肌细胞中的表达受转录机制调节,而且有人认为这些粘附分子可能是基因治疗的潜在的靶分子。

本研究通过 Western blot 法和免疫组织化学法检测大鼠动脉壁内粘附分子由于高脂饲料摄入对粘附分子表达的影响,结果表明大鼠摄入高脂饲料后,血管壁内粘附分子 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达较喂饲基础饲料的对照动物显著增高( $P < 0.05$ )。这与文献报道的相同。本研究结果说明大豆异黄酮可以

拮抗高脂引起的粘附分子的高表达,且有随剂量增长,粘附分子表达逐渐降低的趋势(注:中剂量组 VCAM-1 表达略有增高,可能由实验因素所至)。

本实验从体内研究角度出发,首次阐明了高含量的大豆异黄酮在由高脂饲料诱导的整体动物 As 中对高脂因素引起的粘附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的高表达有下调的作用,这对于 As 的基因预防和基因治疗都很有意义。

#### [参考文献]

- [1] Anthony MS, Clarkson TB, Bullock BC, et al. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 1998, **68**: 1 390-393
- [2] 刘锦,鲁映青. 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  $\alpha$ -myc mRNA 表达的抑制作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 509-512
- [3] Webber C. Effects of oxidized low density lipoprotein, lipid mediators and statins on vascular cell interactions. *Clin Chem Lab*, 1999, **37** (3): 243-251
- [4] Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*, 1999, **85** (2): 199-207
- [5] 张新超. 细胞粘附分子在动脉粥样硬化发生发展中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 179-184
- [6] Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, et al. Angiotensin  $\text{II}$  induces monocyte chemoattractant protein 1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1998, **83** (9): 952-959
- [7] Weber C. Involvement of tyrosine phosphorylation in endothelial adhesion molecule induction. *Immunol Res*, 1996, **15** (1): 30-37
- [8] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食物成分表. 北京: 人民卫生出版社, 1997; 4
- [9] 全智华,杨向东,刘江华,张彤. 氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞凋亡时细胞间粘附分子-1 的表达时序. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 385-387
- [10] Porsch-Oezcuemez M, et al. Evaluation of serum levels of solubilized adhesion molecules and cytokine receptors in coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*, 1999, **34** (7): 1 995-2 001
- [11] Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Homocysteine provoke leukocyte-endothelium interaction by downregulation of nitric oxide. *Gen Pharmacol*, 1999, **33** (6): 487-498
- [12] Takahashi M, Ikeda U, Masuyama J, et al. Monocyte-endothelial cell interaction induces expression of adhesion molecules on human umbilical cord endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 1996, **32** (2): 422-429

(此文编辑 胡必利)