

[文章编号] 1007-3949(2009)17-05-0363-04

· 实验研究 ·

金雀异黄素抑制人血管平滑肌细胞中核因子 κ B 的激活

冯赞杰, 卢志顺, 刘洋, 李琴山, 钱民章

(遵义医学院生物化学教研室, 贵州省遵义市 563003)

[关键词] 金雀异黄素; 核因子 κ B; 氧化型低密度脂蛋白; κ B抑制蛋白 α ; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究金雀异黄素对氧化型低密度脂蛋白诱导的人血管平滑肌细胞中核因子 κ B 激活的影响, 并对其作用机制进行初步探讨。方法 以体外培养的人脐静脉平滑肌细胞为对象, 用 50 mg/L 的氧化型低密度脂蛋白作用细胞 2 h 并加入不同浓度金雀异黄素 (10 30 90 μ mol/L) 对其进行干预, 免疫细胞化学方法检测各组血管平滑肌细胞中核因子 κ B 亚单位 p65 核移位阳性细胞数, Western blot 法检测细胞内 κ B 抑制蛋白 α 含量变化, 硝酸还原酶法测定各组细胞培养液中一氧化氮生成量。结果 人脐静脉平滑肌细胞经氧化型低密度脂蛋白刺激 2 h 后, 其核移位阳性细胞数为 76.67 ± 3.21 , 与空白组 1.33 ± 0.58 相比明显增加 ($P < 0.01$), 再与不同浓度金雀异黄素共同孵育 2 h 后, 核移位阳性细胞数分别为 28.33 ± 2.52 , 19.67 ± 1.53 和 15.67 ± 2.89 , 与单纯给予氧化型低密度脂蛋白刺激相比明显减少 ($P < 0.01$), 且随着浓度升高有递减的趋势; 30 90 μ mol/L 金雀异黄素能明显增加细胞内 κ B 抑制蛋白 α 的含量; 各组细胞培养液内的一氧化氮生成量差异无显著性。结论 金雀异黄素能抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞中核因子 κ B 的活化; 其作用机制可能涉及增加细胞内 κ B 抑制蛋白含量, 未发现与一氧化氮有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Genistein Suppresses Activation of Nuclear Factor- κ B in Vascular Smooth Muscle Cells

FENG Zan-Jie, LU Zhi-Shun, LIU Yang, LI Qian-Shan, and QIAN Min-Zhang

(Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[KEY WORDS] Genistein; Nuclear Factor- κ B; Oxidized Low Density Lipoprotein; Inhibitory κ B; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of genistein on activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and further examine the activation mechanism. **Methods** Human umbilical vein smooth muscle cells were pretreated with genistein in different concentrations (10 30 90 μ mol/L) and then treated by 50 mg/L of ox-LDL for 2 hours. Immunocytochemistry staining was used to detect the nuclear translocation of NF- κ B subunit p65. The intracellular level of inhibitory kappa B (κ B), inhibitor of NF- κ B, was detected by Western blotting analysis. The levels of nitric oxide (NO) in the culture medium was detected by the method of nitric acid reductase. **Results** Genistein significantly restrains the nuclear translocation of NF- κ B in VSMC induced by ox-LDL; High concentration of genistein increases intracellular κ B- α level and doesn't have significant effect on level of NO in the culture medium. **Conclusion** Genistein inhibited activation of NF- κ B induced by ox-LDL in VSMC. The mechanism is associated with increase of κ B and may not associate with nitric oxide level.

炎症反应在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生、发展全过程中起核心作用^[1]。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 在促炎症反应中发挥了重要作用^[2]。研究发现, ox-LDL 能诱导动脉壁内巨噬细胞、血管内皮细胞和血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC)

表达多种炎症反应相关细胞因子及炎症因子^[3], 这些因子对单核细胞的趋化、泡沫细胞形成以及促进 As 斑块的演进起到了重要作用^[4]。金雀异黄素心血管保护作用受到广泛关注, 近期发现金雀异黄素还可抑制血管炎症反应, 但其作用的分子机制不明^[5,6]。核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 是与炎症相关基因转录调控密切相关的一种转录蛋白, 金雀异黄素对 NF- κ B 活性的调节具有多样性, 在不同细胞, 不同刺激因素作用下, 其调节效果截然不同^[7-9]。VSMC 是参与 As 形成的三大主要细胞之一, ox-LDL 为致动脉血管炎症反应的重要因素, 金雀异黄素对 ox-LDL 诱导的 VSMC 中 NF- κ B 的激活

[收稿日期] 2009-02-12 [修回日期] 2009-05-10

[基金项目] 贵州省教育厅基金项目 (黔教科 2006314), 遵义医学院硕士启动基金 (2005-015)

[作者简介] 冯赞杰, 硕士, 讲师, 研究方向为心血管分子生物学, Email 为 fzan-jie@163.com。李琴山, 硕士, 副教授, 研究方向为心血管分子生物学, Email 为 liqinshan@163.com。通讯作者钱民章, 硕士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管分子生物学, Email 为 qianminzhan@163.com。

有无影响? 其机制如何? 国内外未见相关报道。

1 材料与方 法

1.1 材料

金雀异黄素 (Sigma公司); 改良 Eagle培养基 (DMEM, Gibco公司); 胰蛋白酶 (上海生物工程有限公司); α -actin 免疫组织化学检测试剂盒、抗鼠 Envision系统及 DAB (基因公司); 鼠抗人 NF- κ B p65 单克隆抗体、兔抗人 κ B 抑制蛋白 - α (inhibitory kappa B- α , I κ B- α) 多克隆抗体、山羊抗人 actin 多克隆抗体 (Santa Cruz Inc 公司); 抗兔 SP 免疫组织化学试剂盒、抗山羊 SP 免疫组织化学试剂盒 (北京中山生物技术公司); PVDF 膜 (Millipore 公司); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒 (南京建成生物公司); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 人脐静脉血管平滑肌细胞培养

采用文献 [10] 改良的贴壁法进行人血管平滑肌细胞的培养, 将培养的细胞在倒置显微镜下观察并拍照, 用 α -actin 单克隆抗体免疫组织化学方法进行鉴定。本实验所用细胞均为第 3 代。

1.3 低密度脂蛋白的分离鉴定和氧化修饰

参照文献 [11] 一次性密度梯度超速离心法分离人血浆低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL), 参照文献 [12] 的方法对提取的 LDL 进行氧化修饰。采用丙二醛试剂盒测定 MDA 值, 判定 LDL 是否已氧化, 用琼脂糖凝胶电泳鉴定 ox-LDL 的纯度及氧化度。

1.4 实验分组

实验分为 6 个组。空白对照组: 含 10 mL/L 胎牛血清的高糖 DMEM 组; 阳性对照组: 50 mg/L ox-LDL 作用组; 阴性对照组: 50 mg/L ox-LDL + 0.5 mL/L DMSO 作用组; 不同浓度金雀异黄素作用组: 分别为 10、30、90 μ mol/L 金雀异黄素 + 50 mg/L ox-LDL。由于金雀异黄素易溶于 DMSO 和乙醇, 几乎不溶于水。本实验用 DMSO 溶解金雀异黄素, DMSO 在培养液中的终浓度为 0.5 mL/L。为了消除 DMSO 对实验的干扰, 特设 DMSO 阴性对照组。

1.5 血管平滑肌细胞中核因子 κ B 核移位情况

VSMC 以 3×10^4 个/孔接种于预先置有盖玻片的 6 孔板内, 待细胞生长 24 h 后, 换为含 10 mL/L 胎牛血清的高糖 DMEM 液培养 24 h, 使细胞同步化。按分组加入试剂 (金雀异黄素或 DMSO 要预先孵育 2 h 后再加入终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 作

用 2 h)。取出细胞盖玻片, 进行免疫细胞化学测定。iv 抗 (1: 100) 4 $^{\circ}$ C 过夜, Envision 复合物 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h, DAB 显色。每张玻片于 100 倍镜下随机取 5 个视野, 每个视野读取 100 个细胞, 对 NF- κ B p65 核移位阳性细胞进行计数, 将 5 个视野阳性细胞的均数计为 NF- κ B 核移位阳性细胞数。

1.6 κ B 抑制蛋白 - α 蛋白含量检测

取生长状态良好的细胞, 以 6×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 同步化后按分组加入试剂。作用时间到时吸弃培养液, 细胞裂解液裂解并收集细胞, -80 $^{\circ}$ C 保存, 用于 Western-blot 的检测。取样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 全湿式电转法将分离胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上; I κ B- α 蛋白的 iv 抗为兔抗人多抗 (1: 500)、 P 抗为亲和素标记的羊抗兔 IgG (1: 200), 内参 actin 蛋白的 iv 抗为山羊抗人多抗 (1: 1000)、 P 抗为亲和素标记的兔抗羊 IgG (1: 200); 滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液; DAB 显色。在凝胶成像系统 (英国 SYNGENE) 上观察、分析结果并拍照, 用目的蛋白与 actin 的灰度值之比计算表达水平。

1.7 培养液中一氧化氮含量的检测

取生长状态良好的细胞, 以 3×10^4 个/孔接种于 24 孔板中, 同步化后按分组加入试剂。作用时间到, 吸取培养液保存于 -80 $^{\circ}$ C。按 NO 检测试剂盒的说明书操作, 测定各组生成 NO 的量。

1.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养与鉴定

培养的细胞在显微镜下观察, 呈现典型的“峰、谷”样结构特征。 α -actin 单克隆抗体免疫组织化学结果显示 95% 以上为阳性 (图 1)。证明所培养的细胞为血管平滑肌细胞, 并且纯度符合实验要求。

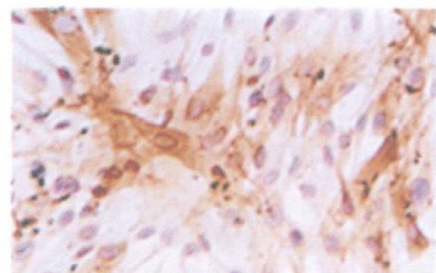


图 1 平滑肌细胞 α -actin 免疫细胞化学染色阳性 (SP \times 200)

2.2 氧化型低密度脂蛋白鉴定

琼脂糖凝胶电泳结果显示 ox-LDL 样品电泳迁移率明显大于 LDL ($P < 0.05$, 图 2), Cu^{2+} 氧化的 LDL 样品中 MDA 值为 18.6~20.6 mmol/L, 说明 LDL 已充分氧化。

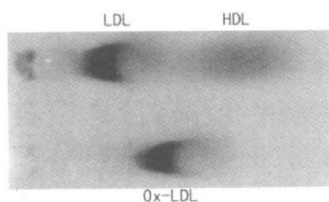


图 2 氧化型低密度脂蛋白琼脂糖电泳图

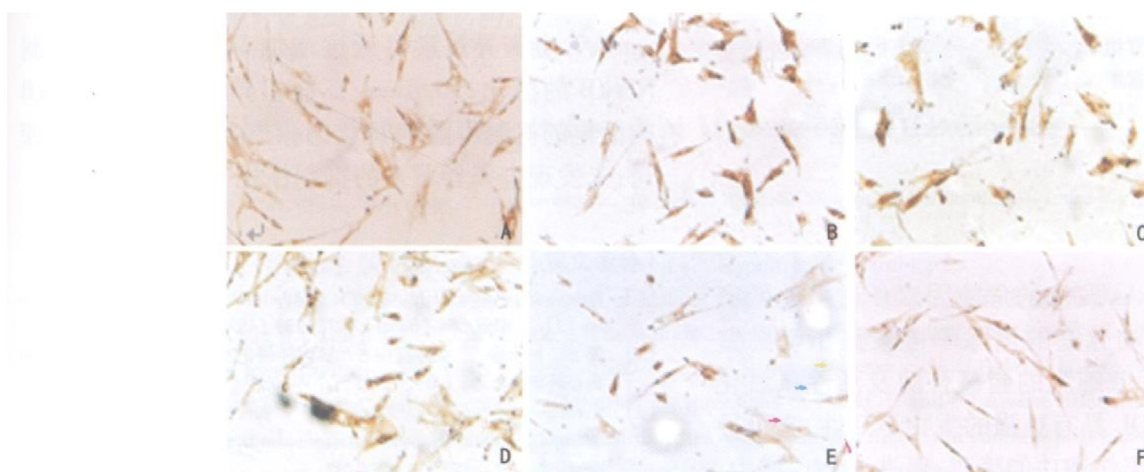


图 3 不同浓度金雀异黄素对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌中核因子 κB 核移位的影响 (100×) A 为空白对照组, B 为阳性对照组, C 为阴性对照组, D~F 为 10、30、90 μmol/L 金雀异黄素组。

表 1. 不同浓度金雀异黄素对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌中核因子 κB 核移位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	NF-κB 核移位阳性细胞数
空白对照组	1.33 ± 0.58
阳性对照组	76.67 ± 3.21 ^a
阴性对照组	74.67 ± 4.51
10 μmol/L 金雀异黄素组	28.33 ± 2.52 ^b
30 μmol/L 金雀异黄素组	19.67 ± 1.53 ^b
90 μmol/L 金雀异黄素组	15.67 ± 2.89 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比; b 为 $P < 0.01$, 与阴性对照组比。

2.4 金雀异黄素对血管平滑肌细胞中 κB 抑制蛋白 IκB-α 蛋白含量的影响

无 ox-LDL 诱导的 VSMC 中有一定量的 IκB-α 蛋白表达 (0.65 ± 0.04); ox-LDL 作用 2 h 后, IκB-α 蛋白含量为 0.26 ± 0.04 与空白组相比较明显降低 ($P < 0.01$)。用不同浓度的金雀异黄素预先孵育 2 h 后再加入终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 作用 2 h, 10 μmol/L 金雀异黄素对 ox-LDL 刺激的 VSMC 中 IκB-α 蛋白含量 (0.37 ± 0.01) 无明显增强作用; 随

2.3 金雀异黄素对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞中核因子 κB 活性影响

向培养液中加入终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 后, NF-κB 核移位阳性细胞数明显增加, 由 1.33 ± 0.58 增至 76.67 ± 3.21 ($P < 0.01$), 说明终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 作用 2 h 能明显激活 VSMC 中的 NF-κB。预先 2 h 加入不同浓度的金雀异黄素与 50 mg/L 的 ox-LDL 共孵育 2 h, 10 μmol/L 金雀异黄素即可抑制 ox-LDL 诱导的 NF-κB 核移位 ($P < 0.01$), 随着金雀异黄素浓度增高 (30~90 μmol/L), 抑制作用有增强的趋势 ($P < 0.01$, 图 3 表 1)。

随着金雀异黄素浓度增高 (30~90 μmol/L), IκB-α 蛋白的含量逐渐增加, 分别增至 0.68 ± 0.09 和 1.20 ± 0.08 ($P < 0.01$; 图 4 表 2)。

2.5 金雀异黄素对细胞培养液中一氧化氮含量的影响

各组培养液 NO 生成量无明显变化, 差异无统计学意义 (表 3)。

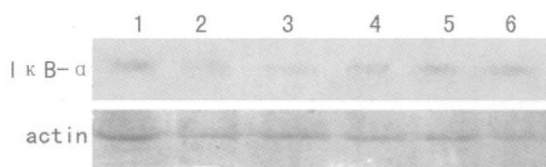


图 4 金雀异黄素对血管平滑肌细胞中 κB 抑制蛋白表达的影响 1 为空白对照组, 2 为阳性对照组, 3 为阴性对照组, 4~6 为 10、30、90 μmol/L 金雀异黄素组。

表 2 金雀异黄素对血管平滑肌细胞中 $\text{I}\kappa\text{B}$ 抑制蛋白 α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	$\text{I}\kappa\text{B}-\alpha / \text{actin}$ 比值
空白对照组	0.65 ± 0.04
阳性对照组	0.26 ± 0.04 ^a
阴性对照组	0.27 ± 0.03
10 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素组	0.37 ± 0.01
30 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素组	0.68 ± 0.09 ^b
90 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素组	1.20 ± 0.08 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比; b 为 $P < 0.01$, 与阴性对照组比。

表 3 金雀异黄素作用前、后细胞培养液中一氧化氮含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	一氧化氮含量 ($\mu\text{mol/L}$)
空白对照组	42.07 ± 7.74
阳性对照组	32.99 ± 9.65
阴性对照组	35.81 ± 10.02
10 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素组	39.96 ± 6.79
30 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素组	51.65 ± 17.74
90 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素组	38.94 ± 10.23

3 讨论

高血脂症是 As 发生的危险因素。过多的低密度脂蛋白超过了动脉壁清除率可聚集于动脉壁内, 它们易被血管壁细胞的脂氧合酶及活性氧化为 ox-LDL 。 ox-LDL 具有更强的生物学活性, 它可导致血管内皮细胞损伤和功能障碍; 促进 VSMC 增生; 诱导血管壁细胞生成多种促进炎症的细胞因子 (ox-LDL 可诱导 VSMC 生成单核细胞趋化蛋白-1、血管细胞黏附分子-1、白介素-6等), 这些因子可引起单核细胞集聚、纤维组织形成、破坏动脉粥样硬化斑块的稳定性, 从而加速 As 的发生、发展^[13]。炎症相关因子的表达主要受 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 调节, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 是以 p65/p50 异二聚体为主要形式的一种转录因子。静息状态下, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的 p65 亚基与 $\text{I}\kappa\text{B}$ 单体结合形成的三聚体复合物以失活状态存在于细胞质中, 不具有调节基因转录的能力; 细胞在上游刺激因子作用下, $\text{I}\kappa\text{B}$ 磷酸化降解, 激活的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 迅速移入细胞核, 与靶基因上启动子区域的 κB 序列发生特异性结合, 从而启动相应基因转录和蛋白质表达^[14]。抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的激活对于防治 As 十分关键。

三种剂量金雀异黄素对 ox-LDL 诱导的 VSMC 中 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 核移位均具有抑制作用, 并且随着金雀异黄素浓度的增加抑制效果越明显。提示金雀异黄素可能通过抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 中 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的激活, 进而抑制 VSMC 中炎症相关因子的表达, 减轻 ox-LDL 导致的血管炎症反应, 发挥其抗 As 的作用。

30、90 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素能明显增加 $\text{I}\kappa\text{B}$ 蛋白含量, 10 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素对 $\text{I}\kappa\text{B}$ 蛋白影响不明显。30、90 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素可通过增加 $\text{I}\kappa\text{B}$ 蛋白含量以抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 激活, 但此蛋白含量的增加是通过抑制降解还是增加合成, 尚待进一步探讨; 10 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 激活的作用可能与其它因素有关。

细胞产生的 NO 可通过对 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p50 亚基的 62 位 Cys 进行亚磷酸化, 降低 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 与 κB 序列的结合能力, 以抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的激活。本实验结果表明, 金雀异黄素对 VSMC 中 NO 的生成无影响, 金雀异黄素不能通过增加 NO 抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的激活。

综上所述, 金雀异黄素能抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 中 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的活化, 其机制比较复杂: 30、90 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素可通过增加 $\text{I}\kappa\text{B}$ 蛋白含量抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的活化; 10 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的活化的机制可能与其它因素有关, 尚需进一步探讨; 未发现金雀异黄素的抑制作用与 NO 有关。

[参考文献]

- Paramo JA, Rodriguez JA, Orbe J. Atherosclerosis in inflammatory diseases [J]. *Med Clin (Barc)*, 2007, 128 (19): 749-756
- 王燕, 杨永宗. 炎症反应在动脉粥样硬化发病学中的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (7): 706-708
- Christian AG, Norbert L, Klaus L. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis [J]. *Hypertension*, 2007, 50 (2): 276-283
- Loppnow H, Werdan K, Bueke M. Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate immunity-related inflammatory mechanisms [J]. *Innate Immunity*, 2008, 14 (2): 63-87
- Raghendra KD, DeBert GG, Bruno I et al. Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells [J]. *Hypertension*, 1999, 33 (1 Pt 2): 177-182
- Si H, Liu D. Phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14 (24): 2581-589
- Tago K, Funakoshi M, Mano H, et al. Presence of a genistein-responsive inhibitory mechanism on interleukin-1 α -induced $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268 (24): 6526-533
- Parikh AA, Moon MR, Pritts TA, et al. IL-1 β induction of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation in human intestinal epithelial cells is independent of oxidant signaling [J]. *Shock*, 2000, 13 (1): 8-13
- Doi M, Shichiri M, Katsuyama K, et al. Cytokine-activated Jak-2 is involved in inducible nitric oxide synthase expression independent from $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation in vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 160 (1): 123-132
- 张闻宇, 吴芹, 官秀梅, 等. 一种改进的人脐静脉平滑肌细胞培养方法 [J]. 遵义医学院学报, 2004, 27 (1): 68-69
- 张林华, 刘秉文. 一次性密度梯度超速分离血清脂蛋白 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1989, 21 (3): 1792-798
- Kerry N, Abbey M. The isoflavone genistein inhibits copper and peroxyl mediated low density-lipoprotein oxidation in vitro [J]. *Atherosclerosis*, 1998, 140 (2): 341-347
- 蔡志友, 晏勇. 氧化型低密度脂蛋白致动脉粥样硬化的机制 [J]. 中国卒中杂志, 2008, 3 (3): 187-190
- 胡榕, 吴可贵. 核因子 κB 在心血管疾病中的作用的研究现状 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (5): 604-606

(此文编辑 李小玲)