

Genistein对内皮细胞内皮型一氧化氮合酶和核因子 κ B表达的影响

张华屏, 成晓龙, 郭东星, 赵嘉惠, 王春芳

(山西医科大学, 山西省太原市 030001)

[关键词] Genistein 内皮细胞; 内皮型一氧化氮合酶; 核因子 κ B

[摘要] 目的 探讨植物雌激素 Genistein对氧化型低密度脂蛋白干预的内皮细胞内皮型一氧化氮合酶和核因子 κ B表达的影响。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞,在氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)干预内皮细胞的基础上,不同浓度的 Genistein(10、50和 100 nmol/L)孵育,MTT法观察 Genistein对细胞活力的影响,实时定量逆转录聚合酶链反应检测内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达,Western blotting检测内皮型一氧化氮合酶和核因子 κ B蛋白的表达。结果 与空白对照组相比,氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)明显抑制细胞活力,下调内皮型一氧化氮合酶 mRNA 和蛋白表达,上调核因子 κ B蛋白表达($P < 0.05$); Genistein明显增高细胞活力,上调内皮型一氧化氮合酶 mRNA 和蛋白表达,抑制核因子 κ B蛋白表达($P < 0.05$),且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。结论 Genistein能够促进内皮型一氧化氮合酶的表达,抑制核因子 κ B的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Genistein on the Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Nuclear Factor- κ B in Endothelial Cells

ZHANG Hua-Ping CHENG Xiao-Long GUO Dong-Xing ZHAO Jia-Hui and WANG Chun-Fang

(Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Genistein Endothelial Cells Endothelial Nitric Oxide Synthase Nuclear Factor- κ B

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Genistein on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) expression in endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), which were incubated with ox-LDL (100 mg/L), were treated with different concentrations of Genistein (10, 50 and 100 nmol/L) for 24 hours. Cell activities were detected by MTT method, the mRNA expression of eNOS was detected by real-time RT-PCR, the protein expression of eNOS and NF- κ B was determined by Western blotting. **Results** Compared with control, ox-LDL decreased cell activities, down-regulated the expression of eNOS mRNA and protein, and up-regulated the expression of NF- κ B protein ($P < 0.05$). However, Genistein increased cell activities, up-regulated the expression of eNOS mRNA and protein, and down-regulated the expression of NF- κ B protein ($P < 0.05$). Furthermore, these effects were dose-dependent ($P < 0.05$). **Conclusion** Genistein could upregulate the expression of eNOS and downregulate the expression of NF- κ B in HUVEC.

研究表明,植物雌激素有助于降低动脉粥样硬化的危险性^[1-6]。动脉粥样硬化过程中,重要的早期表现为血管内皮细胞功能障碍,导致内源性一氧化氮(NO)合成、释放和活性受损;而内皮型一氧化氮合酶(eNOS)是内皮细胞中调节NO合成的限速酶。核因子 κ B(NF- κ B)作为调节多种炎症和免疫基因表达的重要转录因子,在动脉粥样硬化过程中起着

非常重要的作用^[7-9]。本研究观察植物雌激素 Genistein对内皮细胞 eNOS和 NF- κ B表达的研究,探讨植物雌激素保护内皮细胞功能的机制,为动脉粥样硬化的防治提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 内皮细胞的培养

人脐静脉内皮细胞 HUVEC(中国科学院上海细胞所),用 RPMI-1640培养基(含 10% 胎牛血清、100 IU/mL青霉素和 100 IU/mL链霉素),在 37℃、5% CO₂ 条件培养箱中培养,用 0.25%胰蛋白酶进行消化、传代。2%台盼蓝染色判断细胞活性,活细胞数占细胞总数的 96%以上,用于实验。

[收稿日期] 2010-01-27 [修回日期] 2010-04-03

[基金项目] 山西省青年科技研究基金(2007021046)

[作者简介] 张华屏,博士,副教授,研究方向为植物雌激素对动脉粥样硬化的保护作用,Email为 hpzhang7302@yahoo.com.cn 成晓龙,博士,副教授,研究方向为心血管生理与病理。郭东星,博士,副教授,研究方向为分子药理学。

1.2 MTT法检测内皮细胞活力

取对数生长期细胞分为5组:空白对照组、ox-LDL(100 mg/L)组、ox-LDL(100 mg/L)+10 nmol/L Genistein组、ox-LDL(100 mg/L)+50 nmol/L Genistein组和ox-LDL(100 mg/L)+100 nmol/L Genistein组。调整细胞浓度为 1×10^5 /L,接种于96孔板,每孔180 μ L,每组设8孔,ox-LDL作用24 h后,Genistein作用24 h,每孔加入MTT(0.5 g/L)20 μ L,继续培养4 h,吸去上清液,每孔加入200 μ L二甲亚砜,振荡摇匀,使紫色晶体充分溶解,于酶标仪检测492 nm处吸光度值。

1.3 实时定量逆转录聚合酶链反应检测 eNOS mRNA表达

用Trizol试剂(Gibco公司)抽提各组总RNA,紫外分光光度计测定 $A_{260\text{ nm}}$ 和 $A_{280\text{ nm}}$ 吸光度,计算RNA的纯度和浓度, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在1.8~2.0之间。RevertAidTM First stand cDNA Synthesis kit(Fermentas公司)进行逆转录。PCR中所用的引物和探针由上海生物工程技术有限公司合成。eNOS上游引物5'-CGG CAT CAC CAG GAA GAA GA-3',下游引物5'-CAT GAG CGG CGG AGA T-3',探针FAM-TTT AAA GAA GTG GCC AAC GCC GTG AA-BHQ。 β -actin上游引物5'-AGC GGT TCC GAT GCC CT-3',下游引物5'-AGA GGT CTT TAC GGA TGT CAA CG-3',探针FAM-CCT TCC TTC TTG GGT ATG GAA TCC TGT G-BHQ1。实时定量PCR反应条件:94℃预变性2 min,94℃ 20 s,60℃ 45 s,循环40次。读取 C_T 值,首先计算各样本测定基因eNOS C_T 与内对照基因 β -actin C_T 的差值,即 $\Delta C_T = C_{T(eNOS)} - C_{T(\beta\text{-actin})}$,再用各实验组样本的 ΔC_T 减去正常对照组样本的 ΔC_T ,得到 $\Delta\Delta C_T$,利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 进行计算^[10],表示实验组测定基因eNOS的表达相对与正常对照组样本eNOS表达的变化倍数。

1.4 Western blotting检测 eNOS和 NF- κ B蛋白的表达

用4℃预冷的细胞裂解液将内皮细胞裂解,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。取60 μ g总蛋白样品经SDS-PAGE分离,半干转移(2 mA/ cm^2)到PVDF膜,5% BSA封闭4 h,分别于1:1000稀释的小鼠来源的eNOS单克隆抗体、NF- κ B单克隆抗体和 β -actin单克隆抗体中4℃过夜,洗膜,再以1:10000稀释的HRP标记的羊抗小鼠的二抗孵育4 h,ECL化学发光显色,凝胶成像系统扫描分析。蛋白的表达量用各组光密度值与相应 β -actin光密度值的比值半定量表示。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,作单因素ANOVA分析。

2 结果

2.1 Genistein对内皮细胞增殖活力的影响

ox-LDL组内皮细胞活力明显受到抑制,而Genistein则明显增强内皮细胞增殖活力,随Genistein浓度的升高增强作用越显著($P < 0.05$ 表1)。

表1 Genistein对内皮细胞活力的影响

分 组	标本数	吸光度值
空白对照组	8	0.86 \pm 0.19
ox-LDL组	8	0.52 \pm 0.14 ^a
ox-LDL+10 nmol/L Genistein组	8	0.61 \pm 0.15 ^{ab}
ox-LDL+50 nmol/L Genistein组	8	0.70 \pm 0.16 ^{ab}
ox-LDL+100 nmol/L Genistein组	8	0.82 \pm 0.18 ^{ab}

a为 $P < 0.05$ 与ox-LDL组比较; b为 $P < 0.05$ 不同浓度Genistein组比较。

2.2 Genistein对内皮细胞 eNOS mRNA 表达影响

ox-LDL组内皮细胞eNOS mRNA表达明显受到抑制($P < 0.05$);而Genistein则明显增强内皮细胞eNOS mRNA表达,随Genistein浓度的升高增强作用越显著($P < 0.05$ 表2)。

表2 Genistein对内皮细胞 eNOS mRNA 表达的影响

分 组	标本数	eNOS mRNA
空白对照组	8	1.000 \pm 0.030
ox-LDL组	8	0.101 \pm 0.060 ^a
ox-LDL+10 nmol/L Genistein组	8	0.226 \pm 0.050 ^{ab}
ox-LDL+50 nmol/L Genistein组	8	0.421 \pm 0.040 ^{ab}
ox-LDL+100 nmol/L Genistein组	8	0.979 \pm 0.030 ^{ab}

a为 $P < 0.05$ 与ox-LDL组比较; b为 $P < 0.05$ 不同浓度Genistein组比较。

2.3 Genistein对内皮细胞 eNOS蛋白表达的影响

ox-LDL组内皮细胞eNOS蛋白表达明显受到抑制($P < 0.05$),而Genistein则明显增强内皮细胞eNOS蛋白表达,随Genistein浓度的升高增强作用越显著($P < 0.05$ 图1和表3)。

2.4 Genistein对内皮细胞 NF- κ B蛋白表达的影响

ox-LDL组内皮细胞NF- κ B蛋白表达明显增强($P < 0.05$),而Genistein则明显抑制内皮细胞NF- κ B蛋白的表达,随Genistein浓度的升高抑制作用

越显著 ($P < 0.05$, 图 2 和表 3)。

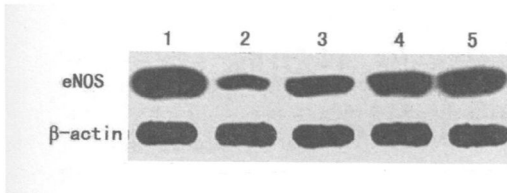


图 1 Genistein 对内皮细胞 eNOS 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 ox-LDL + 10 nmol/L Genistein 组, 4 为 ox-LDL + 50 nmol/L Genistein 组, 5 为 ox-LDL + 100 nmol/L Genistein 组。

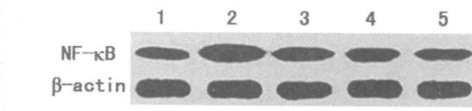


图 2 Genistein 对内皮细胞 NF-κB 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 ox-LDL + 10 nmol/L Genistein 组, 4 为 ox-LDL + 50 nmol/L Genistein 组, 5 为 ox-LDL + 100 nmol/L Genistein 组。

表 3 Genistein 对内皮细胞 eNOS 和 NF-κB 蛋白表达的影响

分 组	标本数	eNOS 蛋白	NF-κB 蛋白
空白对照组	8	1.000 ± 0.140	1.000 ± 0.120
ox-LDL 组	8	0.3393 ± 0.120 ^a	2.201 ± 0.160 ^a
ox-LDL + 10 nmol/L Genistein 组	8	0.541 ± 0.130 ^{ab}	1.978 ± 0.140 ^{ab}
ox-LDL + 50 nmol/L Genistein 组	8	0.729 ± 0.130 ^{ab}	1.562 ± 0.130 ^{ab}
ox-LDL + 100 nmol/L Genistein 组	8	0.889 ± 0.140 ^{ab}	1.201 ± 0.120 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL 组比较; b 为 $P < 0.05$ 不同浓度 Genistein 组比较。

3 讨论

动脉粥样硬化是多因素引发的疾病, 它的形成和发展受许多因素的影响, 至今, 有关动脉粥样硬化机制有多种学说。一般认为, 血管内皮细胞机能的变化和损害而引起内皮细胞的剥离, 进而血浆成分(脂质)的浸润、巨噬细胞的浸润、内膜内平滑肌细胞增殖, 最后导致动脉粥样硬化斑块的形成。在这一系列反应过程中, 血管内皮细胞的损害和机能异常发生最早, 对动脉硬化的发生、发展极为关键。血管内皮细胞功能障碍最重要特征是内源性 NO 合成、释放和活性功能受损。NO 减少导致血管收缩、血小板聚集、平滑肌细胞增殖和白细胞黏附而损伤血管内皮功能。研究表明, 植物性食物中富含的植物雌激素有助于降低心血管疾病的危险性, 对心血管具有良好的保护效应。然而, 植物雌激素对动脉粥样硬化的防治作用机制不太清楚^[1-6]。本研究中, Genistein 明显上调 eNOS mRNA 和蛋白表达。在内

皮细胞中, eNOS 是 NO 合成的限速酶, 对调节 NO 的合成起着重要作用。eNOS 表达增加将引起内皮细胞 NO 合成增多, 从而导致血管舒张, 抑制血小板聚集、平滑肌细胞增殖和白细胞黏附, 在内皮细胞发挥其保护功能方面起着非常重要的作用。NF-κB 作为调节多种炎症和免疫基因表达的重要转录因子, 是动脉硬化的启动因子, 在动脉粥样硬化过程中起着非常重要的作用^[7-9]。本研究中, Genistein 明显抑制 NF-κB 的表达。NF-κB 表达降低, 将抑制一系列和动脉粥样硬化的发生、发展密切相关的基因表达, 包括内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞分泌的血小板源性生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子等活性物质, 从而阻遏动脉粥样硬化的发生和发展。

综上所述, 本研究表明植物雌激素 Genistein 保护内皮细胞功能, 降低动脉粥样硬化的危险性可能和其促进 eNOS 表达、抑制 NF-κB 表达密切相关, 为深入探讨植物雌激素在动脉粥样硬化中的防治作用提供新的依据。

[参考文献]

- [1] Xu H, Duan J, Dai S, et al. alpha-Zearanol attenuates oxLDL-induced ET-1 gene expression, ET-1 secretion and redox-sensitive intracellular signaling activation in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Toxicology Letters* 2008; **179**: 163-168.
- [2] Lu H, Shi JX, Zhang DM, et al. Genistein, a soybean isoflavone, reduces the production of pro-inflammatory and adhesion molecules induced by hemolysate in brain microvascular endothelial cells [J]. *Acta Neurol Belg* 2009; **109** (1): 32-37.
- [3] Shi H, Liu D. Genistein, a soy phytoestrogen, up-regulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Nutr* 2008; **138** (2): 297-304.
- [4] Duan J, Xu H, Dai S, et al. Phytoestrogen-zearanol inhibits homocysteine-induced endothelin-1 expression and oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Atherosclerosis* 2008; **197**: 549-555.
- [5] 陈国雄, 卜军, 张存泰, 等. β受体阻断剂对实验性动脉粥样硬化内皮型一氧化氮合酶活性和基因表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17** (1): 48-52.
- [6] 胡新贵, 王国凤, 薛丽霞, 等. 苯扎贝特对脐静脉内皮细胞内皮型一氧化氮合酶表达的影响及机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17** (1): 14-18.
- [7] Siow RC, Li FY, Rowlands DJ, et al. Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes [J]. *Free Radic Biol Med* 2007; **42** (7): 909-925.
- [8] Vanden Berghe W, Dijsselbloem N, Vermeulen L, et al. Attenuation of mitogen- and stress-activated protein kinase-1-driven nuclear factor-κB gene expression by soy isoflavones does not require estrogenic activity [J]. *Cancer Res* 2006; **66**: 4852-4862.
- [9] Kang JS, Yoon YD, Han MH, et al. Estrogen receptor-independent inhibition of tumor necrosis factor-α gene expression by phytoestrogen equol is mediated by blocking nuclear factor-κB activation in mouse macrophages [J]. *Biochem Pharmacol* 2005; **71**: 136-143.
- [10] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res* 2001; **29**: 2002-2007.

(此文编辑 文玉珊)