

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-10-0792-03

雌激素受体介导 Genistein 对内皮型一氧化氮合酶表达的诱导作用

张华屏, 郭东星, 成晓龙, 赵嘉惠, 王春芳

(山西医科大学, 山西省太原市 030001)

[关键词] Genistein 内皮型一氧化氮合酶; 雌激素受体

[摘要] 目的 研究雌激素受体介导的基因组效应在 Genistein 促进内皮型一氧化氮合酶表达过程中的作用。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, 经雌激素受体拮抗剂 ICI182780 (1 μmol/L) 或经基因转录阻断剂放线菌素 D (5 mg/L) 作用 30 min 后, 再加入 Genistein (100 nmol/L) 作用 24 h 实时定量 PCR 检测内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达, Western Blotting 检测内皮型一氧化氮合酶蛋白的表达。结果 与空白对照组相比, 氧化型低密度脂蛋白 (100 mg/L) 明显下调内皮型一氧化氮合酶 mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.05$); Genistein 明显上调内皮型一氧化氮合酶 mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.05$), 而且 Genistein 对内皮型一氧化氮合酶的诱导作用被雌激素受体拮抗剂 ICI182780 和基因转录阻断剂放线菌素 D 明显抑制 ($P < 0.05$)。结论 Genistein 促进内皮型一氧化氮合酶的表达与雌激素受体介导的基因组效应密切相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Action of Estrogen Receptor in Genistein Upregulating the Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase

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

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

[KEY WORDS] Genistein Endothelial Nitric Oxide Synthase Estrogen Receptor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the action of estrogen receptor in Genistein upregulating the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were exposed to medium or oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) (100 mg/L) in the presence or absence of estrogen antagonists ICI182780 (1 μmol/L) or/and actinomycin D (5 mg/L) for 0.5 hour, then were treated with Genistein (100 nmol/L) for 24 hours. The mRNA expression of eNOS was detected by real-time PCR, the protein expression of eNOS was determined by Western Blotting. **Results** ox-LDL downregulated the expression of eNOS mRNA and protein ($P < 0.05$ vs that of basal level); Genistein upregulated the expression of eNOS mRNA and protein ($P < 0.05$ vs that of ox-LDL-treated group), furthermore, the increase can be inverted by estrogen antagonists ICI182780 or actinomycin D ($P < 0.05$). **Conclusion** Genistein could upregulate the expression of eNOS, which is associated with estrogen receptor regulating genes transcription.

研究表明, 植物雌激素有助于降低动脉粥样硬化的危险性^[1-5]。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 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 是内皮细胞中调节 NO 合成的限速酶。研究显示, Genistein (100 nmol/L) 作用人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 24

h 明显促进 eNOS 的表达^[6-9], 然而, 其作用机制不是很清楚。本实验观察植物雌激素 Genistein 在促进 eNOS 表达过程中雌激素受体的介导作用, 进一步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 材料与方法

1.1 主要材料

HUVEC (中国科学院上海细胞所), RPM I-1640 培养基 (GIBCO), 胎牛血清 (杭州四季青生物有限公司), 氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) (北京欣源佳和生物科技有限公司), 雌激素受体拮抗剂 ICI182780 (I4409)、放线菌素 D (A9415) 和 Genistein

[收稿日期] 2010-08-02 [修回日期] 2010-10-15

[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, E-mail: hpzhang7302@yahoo.com.cn; 成晓龙, 博士, 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。

(G6649) (Sigma公司), Trizol试剂 (GIBCO, 15596-026), RevertAidTM First stand cDNA Synthesis kit (Fementas # K1622), eNOS 单克隆抗体 (sc-136977)、 β -actin 单克隆抗体 (sc-47778) 和 HRP 标记的羊抗小鼠二抗 (sc-2005) (santa cruz biotechnology)。

1.2 内皮细胞的培养和药物干预

人脐静脉内皮细胞用 RPMI-1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 KU/L 青霉素和 100 KU/L 链霉素), 在 37°C、5% CO₂ 条件培养箱中培养, 用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化、传代。在 ox-LDL (100 mg/L) 干预内皮细胞的基础上, 经雌激素受体拮抗剂 ICI182780 (1 μ mol/L) 或经基因转录阻断剂放线菌素 D (5 mg/L) 作用 30 min 后, 再加入 Genistein (100 nmol/L) 作用 24 h 用于后面检测。

1.3 实时定量 PCR 检测 eNOS mRNA 表达

用 Trizol 试剂抽提各组总 RNA, 紫外分光光度计测定 A_{260nm} 和 A_{280nm}, 计算 RNA 的纯度和浓度, A_{260nm}/A_{280nm} 在 1.8 到 2.0 之间。RNA 通过 RevertAidTM First stand cDNA Synthesis kit 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 上游引物为 5'-CGG CAT CAC CAG GAA GAA GA-3', 下游引物为 5'-CAT GAG CGG CGG AGA T-3', 探针为 FAM-TTT AAA GAA GTG GCC AAC GCC GTG AA-BHQ; β -actin 上游引物为 5'-AGC GGT TCC GATG CCC T-3', 下游引物为 5'-AGA GGT CTT TACG GATG TCA ACG-3', 探针为 FAM-CCT TCC TTC TTG GGT ATG GAA TCC TGT G-BHQ1。实时定量 PCR 的反应条件为 94°C 预变性 2 min, 94°C 20 s, 60°C 45 s 循环 40 次。读取 Ct 值, 首先计算各样本测定基因 eNOS Ct 与内对照基因 β -actin Ct 的差值, 即 $\Delta Ct = Ct_{eNOS} - Ct_{\beta-actin}$, 再用各实验组样本的 ΔCt 减去正常对照组样本的 ΔCt 得到 $\Delta\Delta Ct$ 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算^[10], 表示实验组测定基因 eNOS 的表达相对于正常对照组样本 eNOS 表达的变化倍数。

1.4 Western Blotting 检测 eNOS 蛋白的表达

用 4°C 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/cm²) 到 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 4 h 分别于 1: 1000 稀释的小鼠来源的 eNOS 单克隆抗体和 β -actin 单克隆抗体中 4°C 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, X 胶片曝光, 显影、定影, 凝胶成像系统扫描分析。eNOS 蛋

白的表达量用各组 eNOS 光密度值与相应 β -actin 光密度值的比值表示。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 作单因素 ANOVA 分析。

2 结果

2.1 雌激素受体拮抗剂和基因转录阻断剂对 Genistein 诱导的 eNOS mRNA 表达的影响

ox-LDL (100 mg/L) 组内皮细胞 eNOS mRNA 表达明显受到抑制; 而 Genistein (100 nmol/L) 则明显增强内皮细胞 eNOS mRNA 表达 ($P < 0.05$)。Genistein 对 eNOS 的诱导作用被雌激素受体拮抗剂 ICI182780 (1 μ mol/L) 和基因转录阻断剂放线菌素 D (5 mg/L) 明显的抑制 ($P < 0.05$ 表 1)。

表 1 雌激素受体拮抗剂和基因转录阻断剂对 Genistein 诱导的内皮型 eNOS mRNA 表达的影响

分组	n	eNOS mRNA
空白对照组	8	1.000
ox-LDL 组	8	0.101 \pm 0.060 ^a
ox-LDL + Genistein 组	8	0.976 \pm 0.030 ^b
ox-LDL + Genistein + ICI182780 组	8	0.421 \pm 0.041 ^c
ox-LDL + Genistein + 放线菌素 D 组	8	0.279 \pm 0.030 ^c
ox-LDL + Genistein + ICI182780 + 放线菌素 D 组	8	0.201 \pm 0.024 ^c

a 为 $P < 0.05$ 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL 组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL + Genistein 组比较。

2.2 雌激素受体拮抗剂和基因转录阻断剂对 Genistein 诱导的 eNOS 蛋白表达的影响

ox-LDL (100 mg/L) 组 eNOS 蛋白表达明显受到抑制, 而 Genistein (100 nmol/L) 则明显增强 eNOS 蛋白表达 ($P < 0.05$); Genistein 对 eNOS 的诱导作用被雌激素受体拮抗剂 ICI182780 (1 μ mol/L) 和基因转录阻断剂放线菌素 D (5 mg/L) 明显抑制 ($P < 0.05$ 图 1 和表 2)。

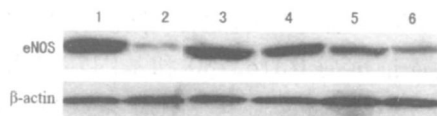


图 1 雌激素受体拮抗剂和基因转录阻断剂对 Genistein 诱导的 eNOS 蛋白表达的影响 1 为空白对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 ox-LDL + Genistein 组, 4 为 ox-LDL + Genistein + ICI182780 组, 5 为 ox-LDL + Genistein + 放线菌素 D 组, 6 为 ox-LDL + Genistein + ICI182780 + 放线菌素 D 组。

表 2 雌激素受体拮抗剂和基因转录阻断剂对 Genistein 诱导的 eNOS 蛋白表达的影响

分 组	n	eNOS 蛋白
空白对照组	8	1.000
ox-LDL 组	8	0.139 ± 0.120 ^a
ox-LDL + Genistein 组	8	0.912 ± 0.130 ^b
ox-LDL + Genistein + ICI182780 组	8	0.429 ± 0.128 ^c
ox-LDL + Genistein + 放线菌素 D 组	8	0.288 ± 0.141 ^c
ox-LDL + Genistein + ICI182780 + 放线菌素 D 组	8	0.196 ± 0.126 ^c

a 为 $P < 0.05$ 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL 组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL + 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,血管内皮细胞机能变化和损害而引起内皮细胞剥离,进而血浆成分(脂质)浸润、巨噬细胞浸润、内膜内平滑肌细胞增殖,最后导致动脉粥样硬化斑块形成。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^[1-5]。Genistein 明显上调 eNOS mRNA 和蛋白表达^[6-9]。在内皮细胞中,eNOS 是 NO 合成的限速酶,对调节 NO 的合成起重要作用。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,在动脉粥样硬化的防治作用中具有非常重要的作用。然而,Genistein 促进 eNOS 表达的机制不太清楚^[6-9, 11]。

研究表明,植物雌激素可能通过与雌激素相似的途径在动脉粥样硬化过程中发挥保护作用。借鉴雌激素对 eNOS 活性影响的作用机制,本实验观察雌激素受体拮抗剂 ICI182780 和基因转录阻断剂放线菌素 D 在 Genistein 促进 eNOS 表达过程中的作用,结果表明,Genistein 对 eNOS mRNA 和蛋白表达的诱导作用被雌激素受体拮抗剂或基因转录阻断剂明显抑制。可见,雌激素受体介导的基因组效应在 Genistein 诱导 eNOS 表达,促进 NO 合成中起重要作用^[7]。但是,也有研究显示,在 Genistein 提高 eNOS

活性、进而促进 NO 合成的过程中,雌激素受体介导的作用不明显^[8, 9, 11]。进一步研究发现,在 Genistein 提高 eNOS 的活性、进而促进 NO 合成的过程中,雌激素受体介导与否可能首先与 Genistein 作用时间密切相关。如果 Genistein 的作用时间较短(通常是 20 min 内),尽管 Genistein 能促进 NO 合成,但并不伴随 eNOS 基因和蛋白水平表达的增加,Genistein 促进 NO 合成可能是通过 eNOS 磷酸化水平(如 1179 位丝氨酸)的改变而发挥作用的,雌激素受体介导的作用不明显^[11]。相反,如果 Genistein 的作用时间较长(本实验中作用 24 h),雌激素受体介导的基因组效应在 Genistein 诱导 eNOS 表达、促进 NO 合成中起重要作用^[7]。

综上所述,本研究表明植物雌激素 Genestein 降低动脉粥样硬化的危险性、保护内皮细胞功能、促进 eNOS 表达可能与雌激素受体介导的基因组效应密切相关;本研究将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] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 张华屏,成晓龙,郭东星,等. Genistein 对内皮型一氧化氮合酶和核因子 κ B 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010; **18** (4): 257-259.
- [7] Wang D, Gutkowska J, Marcinkiewicz M, et al. Genistein supplementation stimulates the oxytocin system in the aorta of ovariectomized rats [J]. *Cardiovasc Res* 2003; **57** (1): 186-194.
- [8] Vera R, Sanchez M, Galisteo M, et al. Chronic administration of genistein improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: involvement of eNOS, caveolin and calmodulin expression and NADPH oxidase activity [J]. *Clin Sci* 2007; **112** (3): 183-191.
- [9] Shi H, Liu D. Genistein, a soy phytoestrogen, upregulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Nutr* 2008; **138** (2): 297-304.
- [10] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res* 2001; **29**: 2002-2007.
- [11] Liu DM, Haman LL, Dillon JS. Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5' monophosphate-dependent mechanism [J]. *Endocrinology* 2004; **12**: 532-539.

(此文编辑 许雪梅)