

[文章编号] 1000-2200(2005)01-0090-03

大豆异黄酮对动脉粥样硬化所致血管内皮细胞损伤的保护作用

庄颖, 姚荣英 综述

[关键词] 动脉粥样硬化; 大豆异黄酮; 血管内皮细胞; 细胞因子

[中国图书资料分类法分类号] R 543.5 [文献标识码] A

血管内皮细胞能分泌众多生物活性物质,在维持正常的血管功能方面发挥着重要的作用。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)病变中内皮细胞功能发生显著改变,功能改变的内皮细胞又能通过分泌众多生物活性物质进一步促进AS的发生发展。大豆异黄酮(soybean isoflavone, SI)具有多种生物活性,对预防AS所致的血管内皮细胞损伤保护有很重要的作用,为抗AS的治疗提供新思路。本文综述了SI对这些活性物质的重要生物学特点及其抗氧化作用在AS病变中的重要地位。

1 动脉粥样硬化与血管内皮细胞

目前AS与血管内皮细胞之间关系密切,目前被普遍接受的Ross^[1]“损伤反应”学说认为,内皮细胞功能性的损伤是AS形成早期的始动环节。那么,血管内皮细胞是如何影响AS的发生发展呢?血管内皮细胞是一个十分活跃的代谢及内分泌库,通过合成与释放活性物质调节血管张力和血液流动性与黏附性。正常情况下,血管内皮细胞释放的各种活性物质在局部维持一定的浓度比,这对调节血液循环,维持内环境稳定和生命活动的正常进行,具有十分重要的意义。但许多病理情况下,如AS、高血压^[2]等均可导致内皮细胞结构和功能的改变,并且内皮细胞在相应病理过程的发生发展中起着重要的作用。另外,血管内皮细胞通过产生生物活性物质,对维持正常的血管壁通透性、血管的功能状态、凝血纤溶活性及炎症反应起着重要作用。然而,内皮细胞的正常代谢一旦发生异常改变,则能迅速促发血管的损伤,引发AS的发生发展。目前动物实验研究表明,已有几种在不同环节通过保护血管内皮细胞防治AS的措施,如提高具有内皮细胞保护效应一氧化氮(NO)含量的一氧化氮供体L-arginine拮抗内皮素(endothelin, ET)促进AS生物效应的ET受体拮抗剂Bosentan等。因此,对血管内皮细胞分泌的主要生物活性物质与AS关系的深入研究将为阐明AS的病理生理及防治提供重要的线索。而且血管内皮损伤常伴发或加重心血管疾病,因此,保护血管内皮功能已成为目前治疗心血管疾病的重要策略。

此外,血管内皮细胞合成与释放的舒血管活性物质与缩血管活性物质在血管舒缩过程中起一定的调节作用。如主要舒血管活性物质为NO、前列环素(prostacycling)和超极化因子(endothelium derived hyperpotarizing factor, EDHF),它们与血管内皮细胞合成释放的主要缩血管活性物质ET形成基本作用相反的血管内在自身调节体系。ET是一种肽类缩血管物质,由多种组织分泌,AS中的许多炎症因子和氧化低

密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)均能诱发内皮细胞产生ET,在AS患者血浆中ET水平明显升高且与AS累及范围和严重程度相关,并且在粥样斑块上也有大量的ET表达^[3]。AS中升高的ET不仅由内皮细胞分泌,平滑肌细胞、巨噬细胞和泡沫细胞也可大量分泌。ET在AS中使局部血流紊乱;通过激活c-fos、c-myc等原癌基因的表达,促进平滑肌细胞增殖;刺激黏附分子分泌;趋化单核细胞;增加内皮细胞通透性。在正常的内皮细胞,舒张因子的生物学效应强于收缩因子,血管处于一定的舒张状态;在AS病变中,内皮依赖的血管舒张效应明显减弱,并发生于AS病变早期甚至在形态学上无任何可见血管内膜增厚之前。许多研究表明,高胆固醇喂养的动物或离体的AS病人的冠状动脉,内皮依赖性舒血管效应显著降低,其降低程度与AS程度相关。内皮型一氧化氮合酶(eNOS)是一氧化氮合成的主要限速因素。在AS状态下或炎症细胞因子和低密度脂蛋白(LDL)刺激下,eNOS的表达明显降低。动物模型给予NOS抑制剂明显加速AS进程;给予NOS底物L-精氨酸或外源性一氧化氮供体可改善AS病变中降低的舒血管效应并延缓病变进程^[4]。

何锐等^[5]测定54例高血压患者与20例非高血压患者血浆ET及NO水平,同时测定经颅多普勒血流。结果,高血压组的颅底动脉收缩期峰值流速(VS)及脉动指数(PI)明显高于对照组($P < 0.05$);高血压病人血浆NO与颅底动脉血流速度呈负相关($P < 0.02$),ET与颅底动脉血流速度呈正相关($P < 0.01$);高血压组血浆NO水平明显低于对照组($P < 0.05$),ET水平高于对照组($P < 0.05$),中重度高血压组NO水平低于轻度高血压组($P < 0.05$);ET水平高于轻度高血压组($P < 0.05$)。说明血浆ET和NO水平在一定程度上反映了高血压及其血管内皮损伤的程度。NO是内皮细胞中L-精氨酸在一氧化氮合酶作用下氧化生成的一种重要的生物活性物质,是心血管系统重要的调节因子^[6],ox-LDL和NO之间相互作用与AS的发生发展密切相关。ox-LDL作用于ECV,使OFR生成增多,加速了NO的氧化降解,可致NO合成减少,从而降低NO合酶的活性。这样会促使细胞黏附、增殖及血管收缩,可进一步加速AS的损伤^[7]。

相关研究^[4]还发现NO可通过多种途径发挥抗AS效应,如抑制白细胞黏附于内皮细胞、抑制血小板聚集、抑制平滑肌细胞的增生、迁移及基质的分泌等。研制作用于NO环节的抗AS药物是目前药物研究的热点之一,通过自体环节增加NO保护血管内皮细胞而抗AS的药物在国外已进入一期临床。

2 大豆异黄酮与内皮细胞的氧化损伤

近年来的实验研究表明^[5],LDL发生氧化修饰即成为ox-LDL,而ox-LDL所致内皮细胞损伤是AS形成的重要因

[收稿日期] 2004-05-11

[作者单位] 蚌埠医学院 预防医学系,安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 庄颖(1954-),女,安徽阜阳人,副教授。

素之一。许多天然食物具有抗氧化作用,并与预防 AS 等心血管疾病有密切关系,大豆就是其中的一种。研究表明大豆中的 SI 具有多种生物活性,而其抗氧化作用成为近年来研究的热点。Osamu^[8] 采用体外培养人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的方法,研究 SI 对 HUVECs 氧化损伤的保护作用,从细胞水平来探讨 SI 的抗氧化功能。研究表明,内皮细胞损伤及其功能异常是 AS 病变形成的始动环节。血液中过量的 LDL,尤其是 ox-LDL 是引起内皮细胞损伤的一个重要的有害因子。实验证明^[6], ox-LDL 具有细胞毒性,可以诱导 ECV 的损伤,其机制可能为: ox-LDL 诱发细胞膜上本身存在的一系列自由基,使其成为氧自由基 (oxygen free radical, OFR),并使其浓度增加,蓄积量过高;同时, ox-LDL 又使细胞本身的抗氧化酶类等防御系统受到抑制或损伤,清除 OFR 的能力下降,最终导致细胞受损。实验发现^[3], ox-LDL 组 ECV MDA 含量很高, SOD 和 GSH-Px 活性很低,乳酸脱氢酶 (LDH) 释放百分比很高, NO 浓度较低,且与对照组相比差别有显著性 ($P < 0.01$),说明 ox-LDL 确实使 ECV 受到了损伤。原因可能是 ox-LDL 作用于 ECV,从而损伤了内皮细胞的正常功能,导致 ECV 的损伤。

张玉梅等^[7] 为研究 SI 在 AS 发生过程中与细胞间黏附分子 1 (ICAM) 和血管细胞黏附分子 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 SI 和高脂饲料加雌激素。20 周后处死动物,光学显微镜检测苏木精-伊红 (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黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 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,细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1 基因表达明显增加,SI 可以减轻高脂饲料诱导的主动脉病理变化,减弱细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1 基因在主动脉内的表达。此结果提示,SI 具有抗 AS 形成作用,此作用可能是通过减弱黏附分子在主动脉壁的表达来实现的。并发现,SI 具有降血脂和抗氧化作用,可预防 AS 的发生^[9]。白细胞与血管内皮的黏附是 AS 发生的关键步骤之一。黏附分子在病人的 AS 斑块、大鼠和家兔的脂质斑块中都有高表达^[10-12]。SI 对大鼠粥样硬化主动脉壁内细胞间黏附分子表达影响细胞间黏附分子 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,基础饲料对照组和高脂饲料对照组细胞间黏附分子 1 的阳性表达率相似,而在饲料中加入 SI,不同剂量条件下表达均有减低作用,且有量-效关系。

目前,多数学者认为^[13], SI 的抗氧化作用类似于 Vit E,具有清除超氧阴离子自由基和过氧化氢的能力,从而发挥其抗氧化作用。实验结果显示, Vit E + ox-LDL 组与 SI-L、M、H + ox-LDL 组 MDA 含量明显低于 ox-LDL 组 ($P < 0.01$),而 SOD、GSH-Px 活性明显高于 ox-LDL 组 ($P < 0.01$)。说明 SI 在一定程度上抑制了 ox-LDL 对 ECV 的氧化损伤。实验结果表明, ox-LDL 损伤组无论细胞内、细胞外 NO 浓度均明显低于其它各组 ($P < 0.01$),与以上结论是一致的,而 Vit E + ox-LDL 组、(SI-L、M、H) + ox-LDL 组细胞生成 NO 能力明显

提高 ($P < 0.01$),说明 SI 改善了 ECV 的氧化损伤程度,起到了一定的保护作用。SI 是良好的抗氧化剂,可改善脂质代谢,可通过增强 LDL 受体活性来降低胆固醇水平,从而保护血管功能并拮抗 AS 的形成。另外, ECV 的细胞膜极易受到 OFR 的攻击,导致脂质过氧化反应,引起膜流动性、通透性和完整性破坏,进而使其双层结构发生断裂,破坏细胞膜^[5]。因此, ox-LDL 损伤的 ECV LDH 释放百分比应显著高于不加处理因素的 control 组,而经 Vit E、SI 预孵的细胞 LDH 释放百分比应有所降低。本实验测定结果与此相符,说明 SI 对 ECV 的氧化损伤起到了一定的抑制和保护作用。刘锦等^[9] 探讨 SI (金雀异黄素和大豆苷元) 在防止 ox-LDL 脂蛋白氧化方面的作用以及对 ox-LDL 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 LDL 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 SI 对 LDL 氧化修饰的抑制作用;采用 Northern blot 杂交技术,分析 ox-LDL 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 LDL 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 $\mu\text{mol/L}$) 能有效抑制 ox-LDL 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 LDL 发生氧化,而且能够抑制 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞 c-myc mRNA 表达增高。因此,金雀异黄素作为抗氧化剂,不仅可能通过抑制 LDL 的氧化修饰防止 AS 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 κ B 的激活,进而抑制 c-myc 的表达,从而阻止 AS 斑块的形成。

高玉霞等^[14] 从形态学角度观察 SI 对 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞 (ECV) 损伤的保护作用。体外培养人脐静脉 ECV,将细胞分为 5 组,即氧化损伤对照组 (ox-LDL)、氧化损伤加入维生素 E 对照组 (Vit E + ox-LDL)、氧化损伤加入 SI 低、中、高浓度组 (SI-L + ox-LDL、SI-M + ox-LDL、SI-H + ox-LDL)。用 ox-LDL 作用于加入 VE 及不同浓度 SI 孵育 24 h 的内皮细胞,继续培养 24 h,测定各组细胞活力 (MTT),观察各组细胞一般形态和超微结构的变化。结果:加入 Vit E 及 SI 各浓度组细胞 MTT (OD 值) 明显高于 ox-LDL 组,差异有显著性 ($P < 0.01$);而 Vit E + ox-LDL 组与 (SI-L、M、H) + ox-LDL 组间,MTT (OD 值) 差异无显著性 ($P > 0.05$)。光镜观察结果显示 ox-LDL 组细胞收缩、变圆,细胞间隙增宽,而加入 Vit E 及 SI 可使细胞形态有不同程度的恢复,细胞间隙减小。扫描电镜观察显示 ox-LDL 组细胞膜有破损,细胞表面微绒毛减少甚至消失,加入 Vit E 及 SI 可使细胞恢复近似正常状态,铺片良好,胞膜完整,细胞间有突起互连接。结论:SI 对血管内皮细胞氧化损伤具有一定的保护作用,而且 SI 与 Vit E 之间差别无显著性。血管内皮细胞损伤及其功能异常是 AS 病变形成的始动环节。血液中过量的 LDL,尤其是 ox-LDL 是引起内皮损伤的一个重要的有害因子^[15]。近年来^[16],流行病学调查和实验研究显示 SI 是良好的抗氧化剂,可改善脂质代谢,从而保护血管功能并拮抗 AS 的形

成。Anthony 等^[13]采用体外培养人脐静脉 ECV 的方法,用 ox-LDL 诱导 ECV 损伤,建立体外 ECV 氧化损伤模型,从细胞形态学角度观察 SI 对 ECV 氧化损伤的保护作用。血管内皮作为血管壁的屏障,使血流中的物质选择性地进入血管壁,感受血流速度、压力等变化并表现相应的反应。一旦血管或血液出现异常,如 ox-LDL 破坏等就会导致血管内皮的损伤,引起巨噬细胞、成纤维细胞、单核细胞黏附在内皮上并进入内皮,形成大量泡沫细胞,进而导致一系列细胞因子和炎性物质的非正常释放,引起内皮细胞、平滑肌细胞的异常增殖,就会导致 AS^[13]。陈宇等^[17]采用体外培养 ECV 的方法,观察 SI 对 ox-LDL 诱导的氧化损伤 ECV 的保护作用,结果显示加入 SI 组细胞 MTT(OD 值)明显高于 ox-LDL 组,差异有显著性($P < 0.01$),说明 SI 可促进 ECV 活力的恢复,从而减少 ECV 的氧化损伤。此外,形态学观察结果显示,ox-LDL 组细胞变形明显,细胞间隙增宽;而(SI-L, M, H) + ox-LDL 组细胞形态有不同程度的改善,细胞逐渐恢复为多角形或短梭形,呈单层排列,细胞形态基本恢复正常。另外,扫描电镜观察,(SI-M, H) + ox-LDL 组 ECV 细胞铺片良好,胞膜表面微绒毛丰富,胞膜完整,较 ox-LDL 组 ECV 超微结构有明显改善。说明 SI 对氧化损伤 ECV 形态改变的恢复有良好的促进作用。SI 是一类多酚类混合物,结构中含有酚羟基,易被氧化。此结构与 Vit E 极为相似,因此,SI 的生理作用特点也类似于 Vit E。由于 Vit E 保护细胞免受氧化损伤的作用已为公认,因此本实验采用血浆 VE 浓度(12 ~ 46 $\mu\text{mol/L}$)作为阳性对照组,比较 SI 及 Vit E 对氧化损伤 ECV 保护作用的差异,结果显示 VE 组与(SI-L, M, H) + ox-LDL 组 MTT 及形态学观察差异均无显著性($P > 0.05$),说明 SI 与 Vit E 均可使氧化损伤的 ECV 受到不同程度的保护。综上所述,SI 可以不同程度的减轻 ox-LDL 在形态等方面对内皮细胞的损伤作用,使之形态完整,并促进其活力的恢复,从而防止 AS 的形成和发展。因而,SI 抑制 ox-LDL 对血管内皮的氧化损伤可能是预防 AS 的作用机制之一。

[参 考 文 献]

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362(6 423): 801 ~ 803.
- [2] Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis [J]. *Basic Res Cardiol*, 1999, 94(5): 295 ~ 314.
- [3] Jones GT, van Rij AM, Sobmon C, et al. Endothelin-1 is

increased overlying atherosclerotic plaques in human arteries [J]. *Atherosclerosis*, 1996, 124(1): 25 ~ 35.

- [4] Boger RH, Bode-Boger SM, Brandes RP, et al. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin [J]. *Circulation*, 1997, 96(4): 1 282 ~ 1 290.
- [5] 何 锐,孙爱华,梅克治,等.高血压患者颈低血流速度改变与内皮素、一氧化氮关系的探讨 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2002, 8(1): 47 ~ 49.
- [6] 刘英华,黄国伟,常 红,等.大豆异黄酮对氧化损伤血管内皮细胞抗氧化作用的研究 [J]. *天津医科大学学报*, 2003, 9(1): 10 ~ 12.
- [7] 何 杰,甘华山,吴 岩,等.溶血磷脂酰胆碱对内皮细胞一氧化氮的生成的影响 [J]. *中国医学物理杂志*, 2001, 18(2): 99 ~ 101.
- [8] Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, et al. Single LDL apheresis improves endothelin-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans [J]. *Circulation*, 1997, 9(5): 76 ~ 82.
- [9] 刘 锦,鲁映青,金雀异黄酮对低密度脂蛋白的氧化修饰及氧化性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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10(6): 509 ~ 510.
- [10] Webber C. Effects of oxidized low density lipoprotein, lipid mediators and statins on vascular cell interactions [J]. *Clin Chem Lab*, 1999, 37(3): 243 ~ 245.
- [11] 张新超. 细胞粘附分子在动脉粥样硬化发生发展中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, 7(2): 179 ~ 180.
- [12] 张玉梅,刘 颖,藤燕平,等.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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(1) 13 ~ 15.
- [13] Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: Potential mechanisms [J]. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68(6 Suppl): S1 390 ~ S1 393.
- [14] 高玉霞,黄国伟,刘英华,等.大豆异黄酮对体外血管内皮细胞氧化损伤保护作用的形态学观察 [J]. *天津医科大学学报*, 2003, 9(1): 39 ~ 41.
- [15] Slembrecher UP. Role of superoxide in endothelial cell modification of low density lipoproteins [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 959(1): 20 ~ 22.
- [16] Lichtenstein AH. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk [J]. *J Nutr*, 1998, 128(10): 1 589 ~ 1 592.
- [17] 陈 宇,王志武. 动脉粥样硬化发生相关因素研究现状和展望 [J]. *国外医学·老年医学分册*, 1999, 20(4): 1 451 ~ 1 452.

[文章编号] 1000-2200(2005) 01-0092-03

· 综 述 ·

Sox 基因家族的特点及其功能

陈冬生,程双怀,聂刘旺

[关键词] 基因; Sox 基因家族; 基因表达调控

[中国图书资料分类法分类号] Q 343.1

[文献标识码] A

[收稿日期] 2004-04-19

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(No. 2002kj128; No. 2003kj170)

[作者单位] 安徽师范大学生命科学学院,安徽 芜湖 241000

[作者简介] 陈冬生(1973-), 男,安徽肥西县人,硕士,讲师。

Sox 基因家族是由众多具有 HMG-box 保守基序的基因构成的超基因家族。由于其编码的蛋白质具有结合 DNA 的能力,因而认为其是一类重要的转录调控因子。Sox 蛋白在性别决定与分化、胚胎早期发育及组织器官的形成等方面都担负有重要的生物学功能。本文对 Sox 家族的特点及其表达与功能作一综述。