

[文章编号] 1000-2200(2009)03-0188-04

· 基础医学 ·

同型半胱氨酸诱导内皮细胞炎症损伤及金雀异黄酮的保护作用机制探讨

李文学¹, 庄颖¹, 董建丽²

[摘要] **目的:**探讨金雀异黄酮(genistein, GEN)对同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)诱导的内皮细胞毒性和炎症的抑制作用及其分子机制。**方法:**采用MTT法检测细胞活性,倒置显微镜观察细胞形态变化,酶联免疫吸附法(ELISA)检测相关炎症分子白细胞介素-6(IL-6)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)。**结果:**单独加5.0 mmol/L的Hcy组活力最差,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。显微镜下见对照组细胞呈单层鹅卵石样紧密排列,细胞状态良好,而Hcy 5.0 mmol/L组细胞排列杂乱,凋亡增多,状态也最差。ELISA结果发现,与对照组比较,5.0 mmol/L的Hcy能显著增强IL-6及ICAM-1表达($P < 0.01$)。然而GEN(10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)能够增强细胞活力,显著抑制由Hcy介导的IL-6及ICAM-1表达的增强,大大改善细胞状态,尤其是100 $\mu\text{mol/L}$ 的GEN($P < 0.01$)。**结论:**GEN对Hcy介导的内皮细胞毒性及炎症反应有明显的抑制作用。

[关键词] 动脉粥样硬化;金雀异黄酮;同型半胱氨酸;ECV-304细胞

[中国图书资料分类号] R 543.5; Q 517 **[文献标识码]** A

Effects of genistein on homocysteine-induced endothelial dysfunction and inflammatory response and its molecular mechanisms

LI Wen-xue¹, ZHUANG Ying¹, DONG Jian-li²

(1. Research Center of Laboratory Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030,

2. Department of Laboratory Medicine, Zhengzhou Innovative Chinese Medicine Hospital, Zhengzhou He'nan 474500, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of genistein on homocysteine-mediated endothelial cell toxicity and inflammatory response and the underlying mechanisms of such effects. **Methods:** MTT assay was used to detect cell viability, changes in the morphology of cells were observed under microscope; ELISA assay was used to examine the levels of IL-6 and ICAM-1. **Results:** The viability of cells treated with 5.0 mmol/L of Hcy was lower than that of other groups, and the difference was statistics significance compared with the control group ($P < 0.01$). ECV-304 cells were identified by their typical cobblestone morphology when viewed by light microscope in control group, the state of cells was also better, but the arrange of cells became disorderly, congregate with 5.0 mmol/L of Hcy in test groups, and the state was the worst. ELISA showed that homocysteine (5.0 mmol/L) significantly increased the expression of IL-6 and ICAM-1, compared with the control group ($P < 0.01$). However, pretreatment with genistein (10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) reversed the decreased cell viability, improved the state of cells in a large extent, and suppressed an increase of expressions of IL-6 and ICAM-1 of cells induced by homocysteine markedly, especially the 100 $\mu\text{mol/L}$ of genistein ($P < 0.01$). **Conclusions:** Genistein inhibits homocysteine-induced endothelial dysfunction and inflammatory response obviously.

[Key words] atherosclerosis; genistein; homocysteine; ECV-304 cells

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)属含硫氨基酸,是蛋氨酸代谢过程中一个重要的中间产物^[1]。1969年McCully在2例患高同型半胱氨酸血症的儿童尸检中,发现广泛的动脉粥样硬化斑块和血栓形成,初步认为高同型半胱氨酸血症患者易患动脉粥样硬化性心脑血管病^[2]。此后,Hcy就作为致动脉粥样硬化性心血管病的一种危险因素倍受重视。最近

研究表明,Hcy能够引起内皮功能紊乱^[3],表现为对缩血管药物的反应增强,而对内皮依赖性舒张剂反应减弱。它可加速动脉粥样硬化,是血管造影还不能观察到的早期动脉粥样硬化的标志^[4,5]。但是,目前对于Hcy引起内皮功能紊乱的作用机制了解还很少。金雀异黄酮(genistein, GEN)为一种植物雌激素,目前认为其可能降低内皮细胞氧化损伤的程度,提高细胞活力,改善血管内皮功能^[5];可在肿瘤细胞、淋巴细胞等细胞上降低相关炎症因子水平及抗肿瘤、抗炎作用^[6];可降低黏附分子的表达,抑制其与单核细胞、血小板等黏附,抑制脂质沉积,血栓形成等。因为血管内皮功能障碍不仅是动脉粥样硬化的早期表现,而且可能参与冠心病的发生、发展过程。因此,本研究旨在探讨GEN对Hcy诱导的内

[收稿日期] 2008-07-08

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(2004kj290ZC)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院临床检验诊断学实验中心,安徽蚌埠233030; 2. 河南省郑州创新中医院 检验科,474500

[作者简介] 李文学(1980-),男,硕士研究生。

[通讯作者] 庄颖,研究生导师,教授。

皮细胞毒性作用以及致动脉硬化的分子机制,为临床上防治动脉硬化提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RPMI 1640 (Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青生物公司),Hcy (Sigma 公司),胰蛋白酶(Difco 公司),Hepes (Sigma 公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT,Fluka 公司),白细胞介素(IL-6)及细胞间黏附分子(ICAM-1)ELISA 检测试剂盒(上海西唐生物科技公司),GEN (Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO,Sigma 公司),人脐静脉内皮细胞株 ECV-304(购自武汉中国生物典藏中心)。

1.2 主要仪器 二氧化碳培养箱(Shel Lab 公司),倒置显微镜(CK40 型,Olympus 公司),酶联免疫检测仪(DG 3022 型,南京华东电子管厂)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 ECV-304 细胞,用培养基为 RPMI 1640 (内含 L-谷氨酰胺 2 mmol/L、庆大霉素 5 万 u/L),调 pH 值至 7.2,用前加 10% 灭活小牛血清。细胞在 37 ℃、5% CO₂,饱和湿度为 60% 的培养箱中孵育培养,0.25% 胰蛋白酶消化、传代。所有操作均采用对数生长期细胞。

1.3.2 MTT 比色法测细胞活力 消化细胞调整浓度至 4×10^4 /ml,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ l 培养过夜,细胞贴壁生长,80% 融合时,吸弃原培养液。实验组设置 4 个浓度组,预先加入终浓度为 0、10、50、100 μ mol/L 的 GEN 孵育 12 h,再分别加入终浓度为 5.0 mmol/L Hcy 的 RPMI 1640 培养液 100 μ l,对照组加不含任何药物的培养液 100 μ l,每组设 4 个复孔;同时设空白对照(只有培养液,无细胞)继续培养 48 h。上述每孔分别加入 20 μ l MTT (5 mg/ml),置 5% CO₂ 37 ℃ 孵育 4 h 后,加三联溶解液每孔 100 μ l (10% SDS + 5% 异丁醇 + 0.012 mol/L 的 HCl),二氧化碳培养箱中继续培养 14 h,镜下观察甲臜结晶全部溶解后,以空白孔调零,酶标仪检测 570 nm 处的吸光度值(A₅₇₀)。

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{\text{实验孔 } A_{570} \text{ 值}}{\text{对照孔 } A_{570} \text{ 值}} \times 100\%$$

1.3.3 IL-6、ICAM-1 浓度检测及细胞形态学观察 将细胞消化计数,接种于 6 孔培养板,细胞浓度为 1×10^5 /ml,每孔 2 ml,待细胞贴壁长到 80% 融合时,吸弃原培养液。实验组预先加入终浓度为 0、10、50、100 μ mol/L 的 GEN 孵育 12 h,再加入终浓度为 5.0 mmol/L 的 Hcy。对照组不加入任何药物,只加入等量的培养液,继续孵育,分别收集各组 0、6、12、24 h 细胞培养上清液,按 ELISA 法检测 IL-6 及

ICAM-1 浓度。然后继续培养 48 h,倒置显微镜下观察内皮细胞形态,用 WinFast PVR 软件记录结果并直接拍摄。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 MTT 法检测细胞活力 加 GEN 各组内皮细胞活性明显高于 Hcy 5.0 mmol/L 组($P < 0.01$)。与对照组相比,Hcy 5.0 mmol/L 组活性最低($P < 0.01$),随着预先加入的 GEN 浓度由低到高,细胞活性也显著升高,至 GEN 100 μ mol/L 组活性与对照组无统计学意义($P > 0.05$)。说明 5.0 mmol/L 的 Hcy 确实能使内皮细胞受到损伤,活性下降,而不同浓度的 GEN 却可以抑制 Hcy 这种损伤作用,且呈剂量依赖性升高细胞活力,从而使损伤的内皮细胞得以恢复(见表 1)。

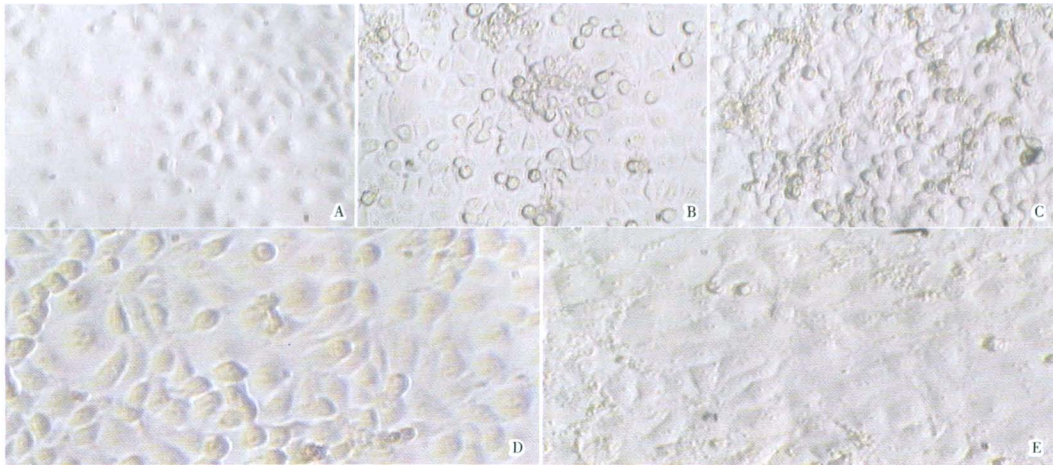
表 1 GEN 对 Hcy 诱导的 ECV-304 细胞活性降低的影响 ($n_i = 4; \bar{x} \pm s$)

分组	细胞活力(%)	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> _{组内}
对照组	100.00 ± 4.54			
Hcy 5.0 mmol/L 组	41.27 ± 5.09**			
GEN 10 μ mol/L 组	64.49 ± 9.08**	65.42	< 0.01	34.302
GEN 50 μ mol/L 组	75.79 ± 6.10**			
GEN 100 μ mol/L 组	94.25 ± 2.31**			

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 Hcy 5.0 mmol/L 组比较 ## $P < 0.01$

2.2 ECV-304 细胞的形态学改变 正常 ECV-304 细胞光滑饱满,呈单层铺路石样镶嵌排列。Hcy 5.0 mmol/L 组细胞收缩、变圆,彼此连接减少,细胞排列变得杂乱,聚集成团,出现脱落现象,说明细胞受损非常严重。随着 GEN 浓度的增高,细胞形态逐渐改善,其效应呈剂量依赖性。GEN 10 μ mol/L 组细胞间隙缩小,细胞间连接增加,细胞边界较清楚,少数细胞恢复成短梭形。GEN 50 μ mol/L 组细胞与单纯加 Hcy 5.0 mmol/L 组比较,细胞形态明显好转,可见大部分细胞为多角形或短梭形,呈单层排列;细胞仍然有脱落现象,但已大大减少。而 GEN 100 μ mol/L 组细胞饱满,大小均匀,几乎无脱落现象,形态基本恢复正常,与对照组无太大差别(见图 1)。

2.3 IL-6 及 ICAM-1 浓度 5.0 mmol/L Hcy 作用不同时间后,IL-6 和 ICAM-1 的表达水平都显著升高,且均于 12 h 左右达到峰值,此后逐渐下降。与 0 h 相比差异均有统计学意义($P < 0.01$) (见表 2)。在 GEN (10、50、100 μ mol/L) 预处理 6 h,再加入 5.0 mmol/L Hcy,作用 12 h 后,各组 IL-6 及 ICAM-1



A: 正常对照组 B: Hey 5.0 mmol/L 组 C: GEN 10 $\mu\text{mol/L}$ + Hey 5.0 mmol/L 组
D: GEN 50 $\mu\text{mol/L}$ + Hey 5.0 mmol/L 组 E: GEN 100 $\mu\text{mol/L}$ + Hey 5.0 mmol/L 组
图 1 Hey 致内皮细胞损伤及 GEN 作用后的细胞形态学变化(10 \times 20)

水平均下降。其中 GEN 100 $\mu\text{mol/L}$ 组下降最明显,与单纯加 Hey 5.0 mmol/L 组 IL-6 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。而 ICAM-1 水平与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明 GEN 能抑制由 Hey 诱导的炎症因子 IL-6 和 ICAM-1 增高,且具有剂量依赖性,以高浓度组最显著(见表 3)。

表 2 Hey(5.0 mmol/L)作用不同时间后 IL-6 及 ICAM-1 的浓度($n_i = 4; \bar{x} \pm s$)

作用时间(h)	IL-6($\mu\text{g/L}$)	ICAM-1($\mu\text{g/L}$)
0	1.24 \pm 0.14	1.62 \pm 0.12
6	1.84 \pm 0.19**	2.90 \pm 0.18**
12	2.66 \pm 0.28**	4.38 \pm 0.31**
24	2.15 \pm 0.13**	3.72 \pm 0.25**
F	37.38	110.12
P	<0.01	<0.01
MS _{组内}	0.038	0.051

q 检验:与 0 h 比较 ** $P < 0.01$

表 3 GEN 对 Hey 诱导的 IL-6、ICAM-1 增高的抑制作用($n_i = 4; \bar{x} \pm s$)

组别	IL-6($\mu\text{g/L}$)	ICAM-1($\mu\text{g/L}$)
对照组	2.18 \pm 0.04	3.24 \pm 0.32
Hey 5.0 mmol/L 组	2.66 \pm 0.28 *	4.38 \pm 0.31**
GEN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.55 \pm 0.26	3.90 \pm 0.37 *
GEN 50 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.37 \pm 0.26 *	3.58 \pm 0.21
GEN 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.17 \pm 0.21	3.38 \pm 0.27**
F	3.99	9.18
P	<0.01	<0.01
MS _{组内}	0.052	0.091

q 检验:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 Hey 5.0 mmol/L 组比较, ## $P < 0.01$

3 讨论

Hey 引起动脉粥样硬化被认为主要是由于其对内皮细胞的损伤,而损害机制至今未明,推测可能是 Hey 产生的氧化应激反应及相关信号通路被激活,而造成血管内皮细胞损伤,致内皮细胞结构和功能改变^[7],这可能是形成动脉粥样硬化早期病变的重要机制之一。

大豆异黄酮(SI)是一种植物雌激素,其结构上与维生素 E 相似,具有多个酚羟基,可作为抗氧化剂,具有多方面保护内皮细胞作用。有报道证实 SI 可使因氧化低密度脂蛋白损伤的内皮细胞功能及形态恢复,内膜损伤消退^[8];可降低 ICAM-1、血管内皮细胞黏附分子(VCAM-1)等黏附分子的表达,抑制其与单核细胞、血小板等黏附^[9,10]。SI 主要包含 3 种物质,而 GEN 又是 SI 中含量最多的一种物质。已有研究证实,GEN 可在肿瘤细胞、淋巴细胞等细胞上降低细胞核因子核转录因子- κB (NF- κB)以及相关炎症因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6 水平等,从而起到抗肿瘤、抗炎作用。但 GEN 是否可以抑制因 Hey 介导的内皮细胞活力降低,氧化损伤,降低内皮细胞上的相关炎症因子及黏附分子水平,抑制炎症反应,从而达到保护内皮细胞、防止动脉粥样硬化发生,尚不得而知。

本实验预先加入不同浓度的 GEN 与细胞孵育 12 h,再加入 5.0 mmol/L Hey 继续作用 48 h,MTT 法检测细胞活力的变化,倒置显微镜下观察细胞形态。结果显示,单独加入 5.0 mmol/L Hey,细胞损伤最严重,活力也最差。随着 GEN 浓度增高,细胞

活力逐渐升高,细胞状态也越来越好,GEN 100 $\mu\text{mol/L}$ 组已经与对照组没有太大差别($P > 0.05$),形态基本恢复正常。这说明 GEN 的确可以抑制由 Hey 诱导的内皮细胞损伤,提高活力,改善其状态。

ELISA 结果显示,5.0 mmol/L Hey 能够显著提高 IL-6 及 ICAM-1 的表达水平,与正常对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 GEN 能降低 Hey 诱导的 IL-6 及 ICAM-1 水平的升高,且具有剂量依赖性,以 100 $\mu\text{mol/L}$ 最强,说明 GEN 可以抑制 Hey 诱导的炎症损伤,抑制内皮细胞与白细胞、血小板等黏附。

综上所述,Hey 能引起内皮细胞活性降低,损伤脱落,促进炎症因子与黏附分子的表达与释放;加快动脉硬化进程。而 GEN 能显著抑制上述效应,从而阻止或延缓动脉粥样硬化的发生、发展,为 GEN 防治动脉粥样硬化的机制提供一个新的解释。

[参 考 文 献]

- [1] 禹 莉,章 尧,陈昌杰,等. 同型半胱氨酸对 A_{785} 细胞增殖及 MMP-2 表达的影响[J]. 蚌埠医学院学报,2008,33(3): 266 - 269.
- [2] Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease[J]. N Engl J Med, 1991,324(17):1149 - 1455.
- [3] Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol, 1996,27(3):517 - 527.
- [4] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s[J]. Nature, 1993,362(6423):801 - 809.
- [5] Blundell G, Jones BC, Rose FA, et al. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration[J]. Atherosclerosis, 1996,122(2):163 - 172.
- [6] 庄 颖,赵 红,张玉媛,等. 大豆异黄酮对大鼠血脂和抗脂质过氧化作用的探讨[J]. 蚌埠医学院学报,2004,29(2): 113 - 115.
- [7] Dijsselbloem N, Goriely S, Albarani V, et al. A critical role for p53 in the control of NF- κ B-dependent gene expression in TLR4-stimulated dendritic cells exposed to genistein[J]. J Immunol, 2007,178(8):5048 - 5057.
- [8] 胡允兆,董吁钢,翟玉锋,等. 辛伐他汀对同型半胱氨酸诱导的 HUVEC 的毒性和炎症反应的影响及分子机制[J]. 中国病理生理杂志,2005,21(8):1594 - 1598.
- [9] Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms[J]. Am J Clin Nutr, 1998,68(6 Suppl):1390S - 1393S.
- [10] Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, et al. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 1998,83(9): 952 - 959.
- [11] Weber C. Involvement of tyrosine phosphorylation in endothelial adhesion molecule induction[J]. Immunol Res, 1996,15(1): 30 - 37.

“文章编号”的结构介绍

文章编号是为保护知识产权,防止盗版、剽窃、抄袭、复制他人学术文章,使作者的知识产权得到进一步保护,更便于期刊文章的检索、查询、全文信息索取和远程传送以及著作权管理,《中国学术期刊(光盘版)评价与数据规范》(以下简称规范)规定了公开发行人期刊上发表的文章必须编号,且该编号在全世界范围内是该篇文章的惟一标识。

文章编号是由该期刊的国际标准刊号、出刊年、期次号及文章的首页码和页数 5 段共 20 位数字组成,其结构为:

文章编号:XXXX-XXXX(YYYY)NN-PPPP-CC

其中:XXXX-XXXX 为该文章所在期刊的国际标准刊号(ISSN);YYYY 为文章所在期刊的出版年;NN 为文章所在期刊的期次,PPPP 为文章首页所在期刊的页码;CC 为文章共占的页数;“-”为连字符。

期次为两位数,当实际期次为一位数字时需在前面补“0”,如第 8 期应为 08;12 期则为 12。文章所在首页码为四位数字,实际所在首页的不足四位者,应在前面补“0”,如 8 页应为 0008,88 页应为 0088,485 页应为 0485,1108 页则为 1108。文章共占有的页数为两位数字,实际页数不足两位数字者,应在前面补“0”,如 5 页应为 05,而 12 页则为 12,转页不计。

示例:[文章编号]1000-2200(2008)06-0769-03

表示发表在《蚌埠医学院学报》(国际标准刊号 ISSN1000-2200)2008 年第 6 期第 769 页至 771 页(共 3 页)上一文的文章编号。