

【实验研究】

大豆异黄酮对氧化损伤的血管内皮细胞的保护作用

何煜舟 丁美萍

浙江大学医学院附属第二医院 浙江 杭州 310006

摘要 目的：探讨大豆异黄酮对氧化损伤的血管内皮细胞的保护作用。方法：体外培养内皮细胞，将细胞分为 7 组，即空白对照组 (control)、溶剂对照组 (DMSO)、氧化损伤组 (H_2O_2)、氧化损伤加入槲皮素对照组 (Quercetin + H_2O_2)、氧化损伤加入大豆异黄酮低、中、高浓度组 (Isonavone-L + H_2O_2 、Isoflavone-M + H_2O_2 、Isoflavone-H + H_2O_2)。将 $750\mu mol/L H_2O_2$ 作用于加入槲皮素及不同浓度大豆异黄酮预培养 24 小时的内皮细胞，继续培养 18 小时，以一氧化氮 (NO)、丙二醛 (MDA)、SOD、GSH-PX、流式细胞凋亡率为检测指标。结果：大豆异黄酮呈剂量依赖性降低 H_2O_2 对抗氧化酶 SOD、GSH-PX 的活力的影响，降低 MDA 量，增加培养液中 NO^{2-}/NO^{3-} 含量，并显著减少细胞凋亡数量，各指标差异有显著性 ($P < 0.01$)。结论：大豆异黄酮可保护和修复过氧化氢诱导的血管内皮细胞的损伤，其作用可能与抗氧化、促进 NO 释放，增强抗氧化酶 SOD、GSH-PX 的活力有关。

关键词 过氧化氢 大豆异黄酮 内皮细胞 凋亡 动脉粥样硬化

近年来，内皮细胞凋亡在动脉粥样硬化发生和发展中的作用正逐渐成为研究的热点，而抗内皮细胞凋亡、保护内皮细胞有望成为防治以血管硬化为基础的心脑血管疾病一种新的、有效的方法。因此寻找和开发保护内皮细胞，抑制内皮细胞凋亡或死亡的药物，为临床开辟了新的治疗思路，具有十分重要的临床意义。大豆是一种药食兼用的佳品，据《中药大辞典》记载，大豆性味甘平，入脾、肾经。能活血、利水、祛风、解毒、治水肿胀满、风毒脚气、黄疸浮肿、风痹筋挛、产后风痉、口噤、痈肿疮毒，解药毒。大豆异黄酮是一种植物雌激素，系由大豆及黑豆等豆类植物中提炼而出，对人体健康十分有益。它具有明显的清除自由基和抗氧化作用。过氧化氢 (H_2O_2) 是主要的活性氧，它可诱导内皮细胞凋亡，甚至死亡。本实验用体外细胞培养方法，采用过氧化氢诱导血管内皮细胞损伤模型，研究大豆异黄酮对内皮细胞损伤的过氧化脂质生成、一氧化氮、抗氧化酶 SOD 与 GSH-PX 的活力及细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料：大豆异黄酮购自上海黄山制药厂，用 DMSO (上海生物工程有限公司生产) 溶解后避光保存备用，AO、EB 为 Fluka 公司产品，DMEM 培养基、胰蛋白酶为 GIBCO 公司产品，槲皮素购自 SIGMA 公司，小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司，MDA 试剂盒、SOD、GSH-PX 试剂盒购自南京建成生物工程公司， H_2O_2 (30%，AR 级) 购自浙江临安化工厂，临用时稀释，并在 5 分钟内使用。

1.2 实验方法：分如下几步进行。

1.2.1 血管内皮细胞培养：取新生未进食小牛胸主动脉 20cm 左右，用 D-Hank's 液清洗干净，剥去血管外结缔组织，结扎分支血管，结扎近心端，外翻，将远心端结扎，在 0.25% 胰酶中消化 10 分钟，离心 1000r/min，5 分钟后收集内皮细胞，用含 20% 胎牛血清的 DMEM 液培养基，37℃ 下置于 5% 培养箱中培养，在倒置显微镜下，细胞呈多角形单层铺路石样排列，形态学鉴定为血管内皮细胞。待长成致密单层后传代。

1.2.2 H_2O_2 及大豆异黄酮处理：细胞传代铺于 24 孔板中，待生长至单层融合， H_2O_2 损伤组加入 $750\mu mol/L H_2O_2$ 刺激 18 个小时，给药组在 H_2O_2 刺激前，细胞分别与 1、10、 $100\mu mol/L$ 的大豆异黄酮预培养 24 小时，另设槲皮素 ($30\mu mol/L$) 阳性药物对照组、溶剂对照组和正常组。所有的实验至少重复 3 次。

1.2.3 NO 量的测定：细胞接种于 24 孔板，分组及处理方法同上。一氧化氮 (NO) 测定：用 NO^{2-}/NO^{3-} 含量表示 NO 生成量，Griess 试剂测定。取各组培养液 $100\mu l$ ，加入等量的 Griess 试剂，室温避光 15 分钟后，ELX750 酶标仪于 550nm 处测定 A 值，以亚硝酸钠作标准曲线计算 NO^{2-} 量表示 NO 的量。

1.2.4 MDA 测定：细胞接种于 24 孔板，如上所述，分组及处理方法同上。收集各组上清液，按试剂盒所述方法测定各组 MDA 含量。

1.2.5 细胞 SOD、GSH-PX 活力测定：细胞接种于 24 孔板，分组及处理方法同上。取 $100\mu l$ 各组细胞

上清液，按试剂盒所述方法测定。

1.2.6 流式细胞仪分析：处理方法、分组同上。将细胞制成单细胞悬液，收集 1×10^6 个细胞，经冷 PBS 洗 2 次，加入 1ml 体积分数为 70% 的乙醇固定，4℃ 放置 24 小时，加等量的 PBS 洗 2 次，加 RNA 酶 (10mg/ml) 100 μ l，37℃ 置 15~20min。加含 Triton X-100 的碘化内啉 (50 μ g/ml) 500 μ l，4℃ 30min，用美国 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 大豆异黄酮对脂质过氧化物 (MDA) 的影响：给予槲皮素、不同浓度的大豆异黄酮对过氧化氢所致的 MDA 增加有很好的抑制作用，并呈剂量依赖性，见表 1。

2.2 大豆异黄酮对 NO 含量的影响：给予槲皮素、不同浓度的大豆异黄酮对 H_2O_2 损伤的内皮细胞所致 NO 水平减低，呈现剂量依赖性的保护作用，见表 1。

表 1 对 H_2O_2 损伤的血管内皮细胞 MDA、NO 含量影响

group	MDA (nmol/L)	NO (μ mol/L)
control	3.36 \pm 0.12	12.30 \pm 0.52
H_2O_2	4.56 \pm 0.08*	5.73 \pm 0.36*
DMSO	3.48 \pm 0.17	11.20 \pm 0.21
Quercetin+ H_2O_2	3.71 \pm 0.09**	9.05 \pm 0.29**
Isoflavone-L+ H_2O_2	3.94 \pm 0.07**	6.56 \pm 0.53**
Isoflavone-M+ H_2O_2	3.54 \pm 0.18**	8.49 \pm 0.47**
Isoflavone-H+ H_2O_2	3.19 \pm 0.15*	10.32 \pm 0.22**

注：与 control 组比较，* $P < 0.01$ ；与 H_2O_2 组比较，# $P < 0.01$ 。

2.3 大豆异黄酮对抗氧化酶 SOD、GSH-PX 活力的影响：给予槲皮素、不同浓度的大豆异黄酮呈剂量依赖性抑制 H_2O_2 所致的抗氧化酶 SOD、GSH-PX 细胞活力降低，见表 2。

表 2 对 H_2O_2 损伤的血管内皮细胞 SOD、GSH-PX 的影响

Group	SOD (NU/ml)	GSH-PX (U/ml)
Control	31 \pm 3.6	157.23 \pm 6.2
H_2O_2	9.2 \pm 1.9*	42.7 \pm 5.6*
DMSO (1/1000)	30.6 \pm 3.8	154.19 \pm 4.19
Quercetin+ H_2O_2	23.2 \pm 2.8**	121.6 \pm 3.4**
Isoflavone-L+ H_2O_2	16.23 \pm 3.5**	71.8 \pm 5.6**
Isoflavone-M+ H_2O_2	22.6 \pm 1.7**	93.4 \pm 2.8**
Isoflaxrode-H+ H_2O_2	29.19 \pm 1.7*	125.7 \pm 3.7**

注：与 control 组比较，* $P < 0.01$ ；与 H_2O_2 组比较，# $P < 0.01$ 。

2.4 流式细胞仪分析内皮细胞凋亡：正常培养的内皮细胞的凋亡百分率仅为 2.56 \pm 1.5，而 H_2O_2 可致内皮细胞明显凋亡，凋亡百分率显著上升，至 42.3 \pm 1.3，而预先加入 100 μ mol/L 大豆异黄酮孵育 24 小时，可使内皮细胞凋亡百分率降至 9.98 \pm 1.45。

讨论

内皮细胞生成的一氧化氮具有抑制血细胞对内皮

细胞的粘附和损伤，调节血管张力等作用。有实验表明 NO 活性的恢复能导致内膜损伤的消退。本实验证明大豆异黄酮随浓度促进 H_2O_2 降低的 NO 水平升高，提示大豆异黄酮可能促进损伤的内皮细胞功能的恢复。

H_2O_2 作为活性氧家族中的一员，可直接作用于膜脂质，形成脂质过氧化物，导致细胞膜的损伤，而且还可通过脂质过氧化物分解代谢产物 MDA，促使蛋白质交联聚合反应引起细胞损伤。我们实验也表明可促进脂质过氧化反应，增加 MDA 生成，而大豆异黄酮可降低 H_2O_2 损伤的内皮细胞产生 MDA，提示大豆异黄酮具有抗细胞过氧化反应性损伤的能力。机体在正常的情况下，存在完善的抗氧化体系。如 SOD、GSH-PX 在细胞浆和线粒体内发挥重要的防御作用。 H_2O_2 导致细胞抗氧化酶的活力下降，清除氧自由基的能力下降等均会使细胞损伤进一步加重。我们研究表明大豆异黄酮提高过氧化损伤的内皮细胞中 SOD、GSH-PX 的活力，从而保护细胞免受自由基损伤。

在正常情况下，内皮细胞的增殖率和凋亡率都很低，其凋亡与增殖之间的动态平衡维持内皮细胞数量的稳定和血管功能的正常。多项研究证实内皮细胞损伤、功能异常是冠状动脉粥样硬化发生的早期事件，而内皮细胞的过度凋亡却是内皮细胞功能失调的始动环节。有文献也报道，过氧化氢可引起内皮细胞的凋亡。本实验研究也发现，750 μ mol/L H_2O_2 可导致内皮细胞大量凋亡，而预先加入阳性对照药槲皮素培养，可明显抑制内皮细胞的凋亡。不同浓度的大豆异黄酮在 H_2O_2 损伤内皮细胞前预培养 24 小时，可呈浓度依赖性地抑制内皮细胞的凋亡数量，减轻内皮的损伤。

血管内皮细胞的氧化损伤会引起血管的粥样硬化，而易导致心、脑血管等多系统疾病的发生。作为一个关键的病理环节，某种程度上类似于中医湿热致病的特点，病久留瘀，瘀水兼夹为病，而引起血行不畅，水湿内停。有人曾根据中医理论制作的温病湿热证模型大鼠中，就发现了 SOD 活性显著降低，MAD 含量显著升高，存在过氧化损伤的现象。大豆异黄酮主要来源于大豆及黑豆等豆类植物，大豆长期食用具有健脾利湿、清热祛瘀的作用，临床上对心脑血管疾病的防治有一定价值。本实验研究也从抗氧化损伤角度，证实了大豆异黄酮的药理作用。通过文献检索发现，这是第一次在体外证实了大豆异黄酮对 H_2O_2 诱导的内皮细胞损伤的保护作用，并第一次初步探讨了其可能存在的机制，它为防治以动脉粥样硬化为基础的心脑血管疾病提供了新思路，并为大豆异黄酮防治此类疾病提供了部分理论和实验基础。

收稿日期 2005-11-22