· 实验研究 ·

雌马酚对血管内皮细胞凋亡和增殖影响*

金连海[1],朱洁[2],张宸豪[2],张慧锋[3],赵文秀[3]

摘　要:目的　探讨大豆异黄酮(SI)代谢物雌马酚对血管内皮细胞凋亡和增殖的影响。**方法**　体外培养血管内皮细胞(ECV-304),采用不同浓度雌马酚(0、6.25、12.50、25.00、50.00 和 100.00 μmol/L)处理 24 h,收集细胞,采用流式细胞术分析细胞内活性氧(ROS)、细胞凋亡和细胞周期;采用免疫组织化学技术分析凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 表达;采用噻唑蓝(MTT)法分析雌马酚对 ECV-304 细胞增殖影响。**结果**　与对照组比较,6.25 μmol/L雌马酚组 ECV-304 细胞内 ROS 含量下降,100.00 μmol/L 雌马酚组 ECV-304 细胞内 ROS 含量升高;与对照组比较,25.00、50.00、100.00 μmol/L 雌马酚组 ECV-304 细胞早、晚期凋亡率明显升高,并可导致细胞 G1 期阻滞($P<0.05$);MTT 实验结果显示,0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μmol/L 雌马酚组 ECV-304 细胞增殖抑制率分别为 -(8.23±2.21)%、-(3.29±1.07)%、(6.75±1.73)%、(25.46±4.82)%和(36.93±4.66)%,低剂量雌马酚对细胞生长具有促进作用,高剂量雌马酚对细胞生长具有抑制作用;与对照组比较,25.00 μmol/L 雌马酚组作用 24 h 后,细胞内 Bax 和 caspase-3 表达增加,而 Bcl-2 表达减少。**结论**　低浓度雌马酚可降低细胞内 ROS 含量,促进 ECV-304 细胞增殖;高浓度雌马酚可导致细胞凋亡、细胞周期阻滞,抑制细胞增殖。

关键词:血管内皮细胞(ECV-304);细胞凋亡;增殖抑制;雌马酚
中图分类号:R 181.2+4　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2015)03-0318-03　DOI:10.11847/zgggws2015-31-03-19

Impact of equol on apoptosis and proliferation of vascular endothelial cells

JIN Lian-hai*, ZHU Jie, ZHANG Chen-hao, et al (*Psychology Department, Jilin Medical College, Jilin, Jilin Province 132013, China)

Abstract: Objective　To study the effect of equol (Eq), a metabolite of soybean isoflavones, on apoptosis and proliferation of vascular endothelial cells. **Methods**　Vascular endothelial cells (ECV-304) were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of Eq (0, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μmol/L) for 24 hours and then the cells were collected. Reactive oxygen species (ROS), apoptosis and cell cycle were determined with flow cytometry. Apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2, and caspase-3) were detected with immunohistochemical method. Eq-related cell proliferation inhibition rate (IR) was measured with 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. **Results**　Compared with that of the control group, lower concentration of Eq (6.25 and 12.5 μmol/L) reduced intracellular ROS, whereas the higher concentration (100 μmol/L) of Eq increased intracellular ROS. The apoptosis rates of the cells treated with Eq of higher concentration (25, 50 and 100 μmol/L) were increased (9.67%, 12.17%, and 12.87%). Lower concentration of Ep did not affect the cell cycle also, while higher concentration of Ep caused G1 arrest. The IR of the ECV-304 cells treated with different concentrations of Eq (6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μmol/L) were -8.23±2.21%, -3.29±1.07%, 6.75±1.73%, 25.46.23±4.82%, and 36.93±4.66%, respectively. Lower concentration of Eq promoted but the higher concentration inhibited the proliferation of the cells. Compared with the control group, the expression of Bax and caspase-3 in the cells treated with Eq (25 μmol/L) for 24 hours increased, while the expression of Bcl-2 decreased. **Conclusion**　Lower concentration of Eq could reduce intracellular ROS, promote cell proliferation, while higher concentration of Eq could induce cell apoptosis and cell cycle arrest.

Key words: vascular endothelial cell; cell apoptosis; proliferation inhibition; equol

大豆中异黄酮类化合物的总称为大豆异黄酮(soybean isoflavones, SI)。研究表明 SI 具有多种生物学活性,如雌激素样作用、抗氧化、调节细胞周期等[1]。SI 在肿瘤治疗、防治心血管疾病和缓解更年期症状等方面的价值倍受重视。近年发现约 30%的人体内在肠道菌参与下 SI 转化为雌马酚,体外研究表明雌马酚可抑制多种肿瘤增殖,具有抗氧化和减轻骨质疏松等作用,其生物学活性优于 SI[2]。血管内皮是衬于血管腔内层的细胞,其形态功能以及增殖和凋亡平衡与心血管疾病和肿瘤关系密切。本研究通过观察雌马酚对血管内皮细胞增殖和凋亡的影响及机制,旨在为疾病预防和治疗领域中雌马酚

* **基金项目**:吉林省教育厅"十二五"科学技术研究项目(2012335);国家自然科学基金(82102953);吉林省科技厅中青年科技创新领军人才及团队项目(20130521018JH);吉林省科技厅科技攻关重大项目(20140203012YY)
作者单位:1. 吉林医药学院心理学教研室,吉林 吉林 132013;2. 吉林医药学院检验学院;3. 吉林医药学院药学院
作者简介:金连海(1972-),男,黑龙江牡丹江人,副教授,硕士,研究方向:医学行为学。
通讯作者:赵文秀,E-mail:wenxiu7201@163.com
数字出版日期:2015-2-15 10:14
数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150215.1014.020.html

的合理应用提供依据,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 雌马酚(北京百灵威科技有限公司);噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]和活性氧(reactive oxygen species, ROS)荧光探针双氯荧光黄乙酸乙酯(dichlorofluorescin diacetate, DCFH-DA)(上海碧云天生物技术研究所);1640 培养液(美国 Gibco 公司);小牛血清(美国 Hyclone 公司);碘化丙啶(propidium iodide, PI)和 annexin-V-FITC1 细胞凋亡试剂盒(美国 eBiocience 公司)。EPICS-X 流式细胞仪(美国贝克曼公司)。

1.2 细胞培养与处理 自液氮中取出冻存血管内皮细胞(ECV-304),复苏后在含 10% 小牛血清 1640 培养液、5% CO_2、饱和湿度和 37 ℃条件下培养,用含 0.5% 胰蛋白酶和 0.2% 乙二胺四乙酸的消化液消化细胞,2 ~ 3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。接种细胞于培养瓶,实验设对照组、雌马酚 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μmol/L 组,继续培养细胞 24 h,消化收集细胞待测。每组设 3 个平行孔。

1.3 指标与方法

1.3.1 细胞增殖抑制率检测 将细胞接种于 96 孔板,加入不同剂量雌马酚,继续培养 72 h,每孔加入 MTT 溶液 20 μL,37 ℃ 孵育 4 h,离心后弃去培养液,每孔加入 200 μL 二甲基亚砜溶解细胞内 MTT 还原产物,测定 570 nm 处吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率(%)。

1.3.2 细胞周期检测 取 10^6 个细胞,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 2 次后用 80% 预冷的甲醇固定过夜;检测分析前离心弃甲醇溶液,用 PBS 洗涤 2 次,将细胞用含 PI 和 Triton X-100和 RNA 酶的染液重悬,避光染色 30 min,立即用流式细胞仪分析。

1.3.3 细胞内 ROS 检测 取 5×10^5 个细胞,PBS 洗涤 2 次,100 μL PBS 重悬细胞,加入 DCFH-DA 储存液,至终浓度为 5 μmol/L,混匀后在 37 ℃避光反应 30 min,PBS 洗 2 次后上流式细胞仪分析。

1.3.4 细胞凋亡分析 取 5×10^5 个细胞,用 PBS 洗涤 2 次,取 195 μL 结合缓冲液重悬细胞,加入 5 μL FITC - 标记 annexin-V,室温下避光反应 30 min;用结合缓冲液洗涤细胞 2 次,400 μL 结合缓冲液重悬细胞,加入 PI 溶液 5 μL,5 min 后用流式细胞仪分析。

1.3.5 细胞爬片和免疫组化 传代细胞接种于 24 孔板(内置无菌玻片),实验设对照组、雌马酚 25.00 μmol/L组,继续培养至细胞覆盖面积大于玻片 40%(细胞数量 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ 个)时,多聚甲醛固定,试剂盒法进行免疫组化染色,封片拍照。

1.4 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行统计处理,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 雌马酚对 ECV-304 细胞增殖影响 雌马酚 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μmol/L 组 ECV-304 细胞增殖抑制率分别为 -(8.23 ± 2.21)%、-(3.29 ± 1.07)%、(6.75 ± 1.73)%、(25.46 ± 4.82)% 和 (36.93 ± 4.66)%,与对照组比较,低浓度雌马酚(6.25、12.5 μmol/L)对 ECV-304 细胞增殖表现出较弱的促进作用,较高浓度雌马酚(>25.00 μmol/L)对 ECV-304 细胞增殖具有抑制作用,呈剂量效应关系($P < 0.05$)。

2.2 雌马酚对 ECV-304 细胞周期影响(表 1) 与对照组比较,雌马酚 6.25、12.50 μmol/L 组 ECV-304 细胞周期无明显变化,雌马酚 25.00、50.00、100.00 μmol/L组 ECV-304 细胞 G1 期百分比均明显增加,G2 期百分率均下降($P < 0.05$)。

表 1 雌马酚对 ECV-304 细胞周期影响(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别(μmol/L)		G1	S	G2M
对照组		56.07 ± 5.01	21.21 ± 2.73	20.12 ± 3.08
雌马酚组	6.25	55.76 ± 4.57	19.71 ± 2.57	19.62 ± 4.37
	12.50	55.35 ± 4.06	19.66 ± 4.06	24.64 ± 4.88
	25.00	63.65 ± 5.38[a]	15.61 ± 3.28	15.60 ± 3.20[a]
	50.00	68.31 ± 5.29[a]	13.32 ± 1.15	11.59 ± 3.64[a]
	100.00	69.05 ± 6.02[a]	11.62 ± 2.39	11.21 ± 2.83[a]

注:与对照组比较,a $P < 0.05$。

2.3 雌马酚对 ECV-304 细胞内活性氧含量影响 结果显示,对照组、雌马酚 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μmol/L 组 ECV-304 细胞内活性氧含量(绿色荧光强度)分别为(69.8 ± 4.3)、(62.5 ± 5.3)、(65.4 ± 4.9)、(67.2 ± 4.6)、(71.3 ± 6.4)、(80.9 ± 6.5);与对照组比较,100 μmol/L 雌马酚组 ECV-304 细胞内活性氧增加($P < 0.05$)。

2.4 雌马酚对 ECV-304 细胞凋亡影响(表 2) 结果表明,低浓度雌马酚对 ECV-304 细胞凋亡无明显影响;与对照组比较,雌马酚 25.00、50.00、100.00 μmol/L 组 ECV-304 细胞早、晚期凋亡率均明显增加($P < 0.05$)。

2.5 雌马酚对 ECV-304 细胞凋亡相关分子表达影响(图 1) 结果显示,对照组、25 μmol/L 雌马酚组 ECV-304 细胞内 Bax、Bcl-2、caspase-3 表达量分别为

(1.012 ± 0.115)、(1.682 ± 0.172)、(0.628 ± 0.096)和(1.451 ± 0.164)、(1.022 ± 0.125)、(0.974 ± 0.084);与对照组比较,25 μmol/L 雌马酚组 ECV-304 细胞内 Bax 表达增加,Bcl-2 表达下降,caspase-3 表达增加。

表 2　雌马酚对 ECV-304 细胞凋亡影响(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别 (μmol/L)		早期凋亡细胞	晚期凋亡细胞	坏死细胞
对照组		1.90 ± 5.31	1.10 ± 0.33	0.63 ± 0.26
雌马酚组	6.25	2.23 ± 0.45	1.90 ± 0.89	0.97 ± 0.50
	12.50	2.43 ± 1.35	2.10 ± 1.01	0.77 ± 0.34
	25.00	5.60 ± 1.56[a]	4.07 ± 0.91[a]	2.53 ± 1.27
	50.00	7.57 ± 1.69[a]	4.60 ± 1.14[a]	4.30 ± 1.31[a]
	100.00	9.00 ± 2.01[a]	3.87 ± 1.15[a]	4.40 ± 1.67[a]

注:与对照组比较,a $P < 0.05$。

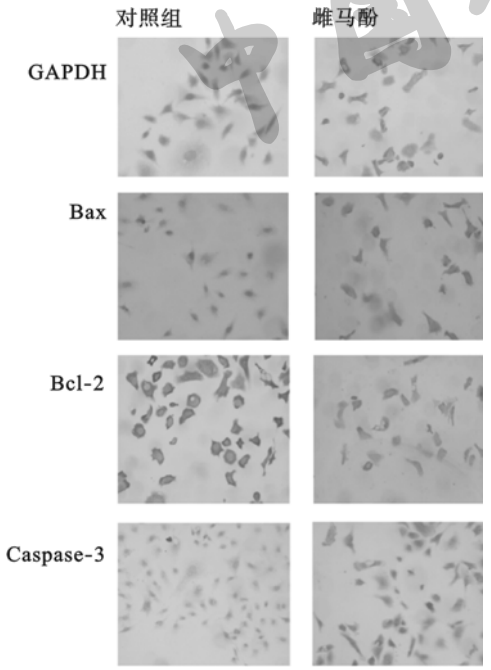

图 1　雌马酚对凋亡相关蛋白分子表达影响(免疫组化, ×400)

3　讨　论

大豆苷元和染料木黄酮是 SI 的主要苷元成分,大豆苷元在体内经由某些特定肠道菌代谢后最终产物为雌马酚。近年研究表明,雌马酚较其母体更易被吸收,也具有更高的生理活性[1-2]。雌马酚主要生理活性包括雌激素样作用和抗氧化作用。雌马酚对雌激素依赖生长的肿瘤具有一定的预防和治疗作用[3]。当雌激素缺乏时可产生替代雌激素的作用,更年期妇女可用雌马酚或食用豆制品减轻潮红和骨质流失等症状[4]。自由基通过损伤 DNA 参与肿瘤发生,快速增殖的肿瘤也在细胞内产生自由基[5]。

血管内皮细胞是指衬于心、血管和淋巴管内表面的单层扁平上皮,形成血管的内壁。血管内皮细胞具有吞噬异物和衰老细胞成分,以及介导免疫细胞迁移、趋化功能。高血压、炎症、感染等情况下,内皮细胞可通过活化、释放细胞因子、促发血小板凝集等参与病理变化,其自身也可发生凋亡或通过增殖而自我修复[6]。肿瘤发生过程中,需伴随内皮细胞增殖和血管新生。本研究结果显示,雌马酚对内皮细胞的作用与其浓度关系密切,低浓度雌马酚对血管内皮增殖具有一定的促进作用,同时可降低细胞内活性氧,对细胞凋亡无明显影响;而高浓度雌马酚可导致细胞内活性氧增加,细胞凋亡率升高,细胞周期阻滞,从而表现出对血管内皮细胞增殖抑制作用。提示,在应用雌马酚预防心脑血管疾病时,需注意限制用量。

近年来发现,SI 和雌马酚可诱导乳腺癌、卵巢、前列腺癌等多种肿瘤细胞凋亡,其诱导细胞凋亡的机制与磷脂酰肌醇 3 - 激酶/蛋白激酶 B、细胞外调节蛋白激酶和丝裂原活化的蛋白激酶等信号途径有关[7],Bax 和 Bcl-2 的比值在线粒体损伤启动凋亡的时相往往增加[8]。本研究结果表明,高浓度雌马酚可诱导 ECV-304 细胞凋亡,细胞内 caspase 家族凋亡效应性分子 caspase-3 表达增加,雌马酚处理后,细胞内 Bax 表达增加而 Bcl-2 表达下降。提示线粒体途径(内源性细胞凋亡途径)可能参与了雌马酚诱导细胞凋亡过程。但具体机制尚有待于进一步深入研究。

参考文献

[1] 李超,刘艾林,杜冠华. 天然异黄酮类化合物的药理学研究进展[J]. 中国新药杂志,2013,22(12):1415 - 1419.
[2] 姜雪,迟玉杰,许岩,等. 大豆异黄酮代谢终产物 - 雌马酚的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,19(33):401 - 404.
[3] Kang HJ, Ansbacher R, Hammond MM. Use of alternative and complementary medicine in menopause[J]. International J Gynecol Obstetrics,2002,79:195 - 207.
[4] 李基文. 环境雌激素对人体的作用[J]. 中国公共卫生,2000,16(9):847 - 848.
[5] Scott TL, Rangaswamy S, Wicker CA, et al. Repair of oxidative DNA damage and cancer: recent progress in DNA base excision repair[J]. Antioxid Redox Signal,2014,20(4):708 - 726.
[6] Toya SP, Malik AB. Role of endothelial injury in disease mechanisms and contribution of progenitor cells in mediating endothelial repair[J]. Immunobiology,2012,217(5):569 - 580.
[7] Krenn L, Paper DH. Inhibition of angiogenesis and inflammation by anextract of red clover[J]. Phytomedicine,2009,16:1083 - 1088.
[8] Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, et al. Apoptotic mechanisms in the immature brain: involvement of mitochondria[J]. J Child Neurol,2009,24(9):1141 - 1146.

收稿日期: 2014-10-24　　(解学魁编辑　郭薇校对)