

[文章编号] 1000-4718(2006)11-2110-03

# 植物雌激素 $\alpha$ -玉米赤霉醇对 HUVEC 低氧/复氧损伤的保护作用\*

王 雯, 邱笑违, 蒋东桥, 张立克<sup>△</sup>  
(首都医科大学病理生理学教研室, 北京 100069)

**[摘要]** 目的: 探讨植物雌激素  $\alpha$ -玉米赤霉醇(ZAL)对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)低氧/复氧损伤的保护作用及其机制。方法: 低氧(93% N<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>-2% O<sub>2</sub>)环境中培养 HUVECs 3 h 后再恢复正常氧供应 1 h。用 MTT 法检测细胞存活率, 分光光度法测定细胞培养上清液中 LDH、SOD 活性及 MDA 含量。结果: HUVECs 经低氧/复氧处理后, 细胞存活率及 SOD 活性显著低于对照( $P < 0.01$ ), LDH 活性及 MDA 含量显著高于对照( $P < 0.01$ ); 经不同浓度( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  mol/L)的 ZAL 或雌二醇(E<sub>2</sub>)预处理后, 均可显著缓解上述改变, 此作用为剂量依赖性, 同浓度 ZAL 与 E<sub>2</sub> 的作用无显著差异。结论: ZAL 对低氧/复氧损伤的 HUVECs 可产生与 E<sub>2</sub> 类似的保护作用, 机制可能与促进自由基清除而减轻细胞氧化应激损伤有关。

**[关键词]** 玉米赤霉醇; 雌二醇; 缺氧; 脐静脉内皮细胞

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## Effects of phytoestrogen $\alpha$ -zearalanol on hypoxia/reoxygenation injury in HUVECs

WANG Wen, QIU Xiao-wei, JIANG Dong-qiao, ZHANG Li-ke

(Department of Pathophysiology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China. E-mail: bingshen@cpums.edu.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effects of phytoestrogen  $\alpha$ -zearalanol (ZAL) on hypoxia/reoxygenation (H/R) injury and mechanism involved in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **METHODS:** HUVECs were exposed to hypoxia for 3 hours and then reoxygenation 1 hour. ZAL or 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) at concentrations of  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  mol/L were pretreated before hypoxia. The survival rate of HUVECs was detected by MTT. Either the activities of LDH and SOD or the level of MDA in supernatant was detected by spectrophotometry. **RESULTS:** The survival rate of HUVECs and the activity of SOD were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), while the activity of LDH and the level of MDA were significantly increased ( $P < 0.01$ ) after H/R. These changes were reversed by pretreatment with ZAL or E<sub>2</sub>, and there was no significant difference between their effects in the same dose of ZAL and E<sub>2</sub>. **CONCLUSION:** These results suggest that phytoestrogen ZAL protects HUVECs from H/R injury by inhibiting the oxidative stress, which was similar to E<sub>2</sub>.

**[KEY WORDS]** Zearalanol; Estradiol; Anoxia; Umbilical vein endothelial cells

植物雌激素是一类存在于豆类、谷物、水果及蔬菜中的非甾体类化合物, 结构及生物活性均类似于动物类雌激素。已有研究表明植物雌激素在心血管疾病防治及抗肿瘤方面有一定作用, 其副作用小, 安全可靠<sup>[1]</sup>。 $\alpha$ -玉米赤霉醇( $\alpha$ -zearalanol, ZAL)是一种新型植物雌激素, 属于二羟基苯酸内酯类化合

物, 具有促生长效应, 与高等植物的发育有关<sup>[2]</sup>。前期研究工作表明<sup>[3-6]</sup>, 它可明显抑制家兔实验性动脉硬化进程, 改善脂质代谢障碍, 降低血脂; 抑制凝血因子Ⅲ-组织因子的表达, 降低凝血活性; 促进血管内皮细胞一氧化氮的表达, 产生明显的心血管保护作用。与内源性动物雌激素雌二醇(17 $\beta$ -estradi-

[收稿日期] 2006-01-16 [修回日期] 2006-04-03

\* [基金项目] 北京市优秀人才培养专项经费资助项目 (No. 20042D0501817); 首都医科大学科研基金资助项目 (No. 2004ZR02)

<sup>△</sup>通讯作者 Tel: 010-83911433; E-mail: bingshen@cpums.edu.cn

ol, E<sub>2</sub>) 相比, 其致乳腺癌和子宫内膜癌的风险明显下降<sup>[2]</sup>, 是一种有一定应用前景的雌激素替代药物。

本研究拟进一步观察 ZAL 对内皮细胞低氧/复氧损伤的影响, 探讨其作用机制, 并与雌二醇的作用进行比较。

## 材 料 和 方 法

### 1 主要试剂

ZAL(中国农业大学提纯), E<sub>2</sub>、I 型胶原酶和噻唑蓝(MTT)(Sigma), 胎牛血清(Hyclone), 胰蛋白酶(Invitrogen), 乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究中心)。

### 2 HUVECs 原代培养及鉴定

参考 Jaffe 等<sup>[7]</sup>的方法, 略有改进<sup>[8]</sup>, 进行 HUVECs 原代培养及鉴定。传至 2-3 代细胞用于实验。

### 3 实验分组及药物处理

分组如下: 正常对照组(control); 低氧/复氧组(H/R): 细胞在低氧(93% N<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> - 2% O<sub>2</sub>) 中 3 h 后再恢复正常氧供应 1 h; ZAL 处理组和 E<sub>2</sub> 处理组: 分别在低氧前 20 min 加入不同浓度(10<sup>-9</sup> - 10<sup>-6</sup> mol/L) ZAL 或 E<sub>2</sub>, 然后低氧 3 h, 复氧 1 h。各组均  $n = 6$ 。

### 4 MTT 法检测细胞存活率

细胞以  $2 \times 10^4$  cells/well 接种于 96 孔培养板, 待生长单层融合后, 分别给予不同处理。弃上清, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20  $\mu$ L, 继续培养 4 h; 弃上清, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO, 振荡 5 min 使结晶物充分溶解, 用酶标仪测定 492 nm 波长各孔吸光度(A) 值。细胞存活率 = 处理组细胞 A 值/正常对照组细胞 A 值  $\times 100\%$ 。

### 5 LDH、SOD 活性及 MDA 含量测定

细胞以  $3 \times 10^5$  cells/well 接种于 24 孔培养板, 待生长至 80% - 90% 融合后, 分别给予不同处理, 吸取上清液, 采用分光光度法按试剂盒说明操作, 测定各孔 LDH、SOD 活性及 MDA 含量。

### 6 统计学处理

各组数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SPSS 软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

## 结 果

### 1 ZAL 及 E<sub>2</sub> 对低氧/复氧后 HUVECs 存活率的影响

低氧 3 h/复氧 1 h 后, HUVECs 存活率明显低于正常对照组( $P < 0.01$ ); ZAL(10<sup>-9</sup> - 10<sup>-6</sup> mol/L)

可以显著缓解上述变化(均  $P < 0.01$ ), 呈剂量依赖性。相同浓度的 ZAL 与 E<sub>2</sub> 的作用无显著差异(表 1)。

### 2 ZAL 及 E<sub>2</sub> 对低氧/复氧后 HUVECs LDH 活性的影响

低氧 3 h/复氧 1 h 后, HUVECs 上清液 LDH 活性明显大于正常对照组( $P < 0.01$ ), 10<sup>-8</sup> - 10<sup>-6</sup> mol/L 浓度的 ZAL 可以显著缓解上述变化( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 呈剂量依赖性。相同浓度的 ZAL 与 E<sub>2</sub> 的作用无显著差异(表 2)。

### 3 ZAL 及 E<sub>2</sub> 对低氧/复氧后 HUVECs SOD 活性及 MDA 含量的影响

低氧 3 h/复氧 1 h 后, HUVECs 上清液 SOD 活性明显低于正常对照组( $P < 0.01$ ), 而 MDA 含量明显高于正常对照组( $P < 0.01$ ); 10<sup>-8</sup> - 10<sup>-6</sup> mol/L 浓度的 ZAL 可以显著缓解上述变化( $P < 0.05$ ), 呈剂量依赖性。相同浓度的 ZAL 与 E<sub>2</sub> 的作用无显著差异(表 3)。

表 1 ZAL 及 E<sub>2</sub> 对低氧/复氧后 HUVECs 存活率的影响

Tab 1 Effects of ZAL or E<sub>2</sub> on survival rate of HUVECs after H/R ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Group	Survival rate(%)
Control	100.0 $\pm$ 6.8
H/R	52.9 $\pm$ 2.0**
H/R + 10 <sup>-9</sup> MZAL	67.3 $\pm$ 11.6 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-8</sup> MZAL	64.9 $\pm$ 3.1 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-7</sup> MZAL	71.0 $\pm$ 9.8 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-6</sup> MZAL	70.4 $\pm$ 10.4 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-9</sup> ME <sub>2</sub>	58.7 $\pm$ 8.1 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-8</sup> ME <sub>2</sub>	60.1 $\pm$ 8.2 <sup>#</sup>
H/R + 10 <sup>-7</sup> ME <sub>2</sub>	66.7 $\pm$ 3.6 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-6</sup> ME <sub>2</sub>	71.9 $\pm$ 15.7 <sup>##</sup>

\*\*  $P < 0.01$  vs control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs H/R.

表 2 ZAL 及 E<sub>2</sub> 对低氧/复氧后 HUVECs LDH 活性的影响

Tab 2 Effects of ZAL or E<sub>2</sub> on LDH activity of HUVECs after H/R ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Group	LDH(U/L)
Control	487 $\pm$ 217
H/R	894 $\pm$ 125**
H/R + 10 <sup>-9</sup> MZAL	788 $\pm$ 178
H/R + 10 <sup>-8</sup> MZAL	606 $\pm$ 253 <sup>#</sup>
H/R + 10 <sup>-7</sup> MZAL	587 $\pm$ 85 <sup>#</sup>
H/R + 10 <sup>-6</sup> MZAL	560 $\pm$ 142 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-9</sup> ME <sub>2</sub>	858 $\pm$ 123
H/R + 10 <sup>-8</sup> ME <sub>2</sub>	596 $\pm$ 52 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-7</sup> ME <sub>2</sub>	559 $\pm$ 61 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-6</sup> ME <sub>2</sub>	547 $\pm$ 105 <sup>##</sup>

\*\*  $P < 0.01$  vs control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs H/R.

**表 3 ZAL 及 E<sub>2</sub> 对低氧/复氧后 HUVECs SOD 活性及 MDA 含量的影响**

Tab 3 Effects of ZAL or E<sub>2</sub> on SOD activity and MDA level of HUVECs after H/R ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Group	SOD(10 <sup>3</sup> U/L)	MDA(μmol/L)
Control	14.74 ± 1.17	2.37 ± 0.29
H/R	11.62 ± 0.80**	2.88 ± 0.18**
H/R + 10 <sup>-9</sup> MZAL	12.17 ± 0.60	2.48 ± 0.17 <sup>#</sup>
H/R + 10 <sup>-8</sup> MZAL	12.65 ± 0.42 <sup>#</sup>	2.40 ± 0.11 <sup>#</sup>
H/R + 10 <sup>-7</sup> MZAL	13.54 ± 0.96 <sup>#</sup>	2.37 ± 0.40 <sup>#</sup>
H/R + 10 <sup>-6</sup> MZAL	13.40 ± 1.34 <sup>#</sup>	2.36 ± 0.18 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-9</sup> ME <sub>2</sub>	13.76 ± 0.98 <sup>#</sup>	2.43 ± 0.28 <sup>#</sup>
H/R + 10 <sup>-8</sup> ME <sub>2</sub>	13.51 ± 0.24 <sup>##</sup>	2.36 ± 0.20 <sup>#</sup>
H/R + 10 <sup>-7</sup> ME <sub>2</sub>	13.29 ± 0.73 <sup>#</sup>	2.32 ± 0.27 <sup>##</sup>
H/R + 10 <sup>-6</sup> ME <sub>2</sub>	14.38 ± 3.29 <sup>#</sup>	2.40 ± 0.06 <sup>##</sup>

\*\*  $P < 0.01$  vs control; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs H/R.

### 讨 论

血管内皮细胞介于血流和血管壁组织之间,具有多重功能,是一种易受损的功能性界面,对各种不同的病理生理刺激均可发生形态学和生物化学方面的改变,是多种血管病变的一个重要原因。

本工作采用在低氧条件下培养内皮细胞 3 h 后再恢复正常氧供应 1 h 的方法复制细胞氧反常(低氧/复氧)模型。结果表明,低氧/复氧组细胞存活率较对照组明显下降,同时上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活性明显升高,表明低氧 3 h/复氧 1 h 可造成严重的内皮细胞损伤。病理情况下,由于活性氧生成过多或机体抗氧化能力不足而引发的氧化应激反应,是低氧/复氧损伤的重要发生机制之一。超氧化物歧化酶(SOD)是一种酶性清除剂,可清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和超氧阴离子,保护细胞不受毒性氧自由基的损伤。自由基可引起膜脂质过氧化增强,造成细胞结构损伤和功能代谢障碍。丙二醛(MDA)是膜脂质过氧化过程的中间产物,通过检测 MDA 的含量可以反映脂质过氧化的程度。内皮细胞对氧化应激高度敏感,本研究表明低氧 3 h/复氧 1 h 组内皮细胞 SOD 活性明显降低,同时 MDA 含量增高,证实低氧/复氧可破坏内皮细胞氧化-抗氧化平衡,导致氧化应激。

α-玉米赤霉醇是一种新型植物雌激素,已有研究发现,它可通过多种途径产生心血管保护作用,且不良反应小,安全可靠。本研究在此基础上观察了 ZAL 对内皮细胞低氧/复氧损伤的影响。发现 ZAL 干预组细胞存活率较低氧/复氧组明显升高,而 LDH 活性明显下降,表明 ZAL 可保护内皮细胞,减轻细胞低氧/复氧损伤。此作用与雌二醇作用类似且为剂量依赖性。我们也观察了常氧条件下 ZAL 对内皮细

胞存活率和 LDH 活性的影响(资料未显示),发现上述指标变化不明显,提示在常氧条件下 ZAL 的细胞保护作用有限,其保护作用主要体现在低氧/复氧损伤情况下。为探讨 ZAL 的作用机制,我们进一步观察了不同浓度 ZAL 对内皮细胞 SOD 活性和 MDA 含量的影响,发现它可显著提高细胞 SOD 活性,降低 MDA 含量,此作用亦为剂量依赖性;表明 ZAL 可能通过促进自由基清除,抑制脂质过氧化反应,从而减轻氧化应激损伤,保护细胞。

综上所述,植物雌激素 α-玉米赤霉醇对低氧/复氧损伤的血管内皮细胞具有保护作用,机制可能与促进自由基清除而减轻细胞氧化应激损伤有关。本研究为其抗心血管疾病的药效研究和临床应用提供依据,其作用的分子机制值得进一步深入探讨。

### [参 考 文 献]

- [1] Munro IC, Harwood M, Hlywka JJ, et al. Soy isoflavones: a safety review[J]. Nutr Rev, 2003, 61(1): 1-33.
- [2] Dai S, Duan J, Lu Y, et al. Alpha-Zearalanol, a phytoestrogen for cardiovascular therapy[J]. Endocrine, 2004, 25(2): 117-119.
- [3] Dai S, Duan J, Lu Y, et al. Phytoestrogen alpha-zearalanol inhibits atherogenesis and improves lipid profile in ovariectomized cholesterol-fed rabbits[J]. Endocrine, 2004, 25(2): 121-129.
- [4] Wang W, Zhu GJ, Zu SY. Effects of 17β-estradiol and phytoestrogen α-zearalanol on tissue factor in ovariectomized rats and endothelial cells[J]. Chinese J Physiol, 2004, 47(2): 67-72.
- [5] Wang W, Zhu GJ. Comparison between phytoestrogen α-zearalanol and supplementary ectogenesis 17β-estradiol in the effect on coagulation and fibrinolysis in ovariectomized rats[J]. 中国临床康复, 2005, 9(27): 195-197.
- [6] Xu HS, Duan JH, Dai S, et al. Phytoestrogen α-zearalanol antagonizes oxidized LDL-induced inhibition of nitric oxide production and stimulation of endothelin-1 release in human umbilical vein endothelial cells[J]. Endocrine, 2004, 25(3): 235-245.
- [7] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. J Clin Invest, 1973, 52(11): 2745-2756.
- [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.