

大豆异黄酮对内皮细胞损伤保护作用的研究进展

任 娇,孙惜时,田憬若,谈甜甜,崔桂友

(扬州大学 旅游烹饪学院,江苏 扬州 225127)

摘要:血管内皮细胞的损伤,会影响血管正常的功能运转,引发高血压、血栓等心血管疾病。大豆异黄酮(soy isoflavones)是一种植物雌性激素,主要存在于豆类植物中,其抗氧化作用可以修复内皮细胞的损伤,对心血管有显著的保护作用。大豆异黄酮对损伤内皮细胞的保护体现在清除自由基、干扰信号通路和影响基因的表达等多个方面。现对大豆异黄酮对损伤血管的保护作用及途径进行了综述,为开发新型内皮细胞保护药物及其临床研究提供理论依据。

关键词:大豆异黄酮;内皮细胞;氧化损伤;保护

中图分类号:R730.2

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2014)01-0135-04

Protection Effect of Soy Isoflavones on Injured Endothelial Cell

REN Jiao, SUN Xi-shi, TIAN Jing-ruo, TAN Tian-tian, CUI Gui-you

(Tourism and Cuisine College, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: Soybean isoflavones is a kind of estrogen, mainly exists in legumes. Recently studies have shown that it has many biological activities and pharmacological properties, such as antioxidant, anti-cancer, preventing osteoporosis, menopausal syndrome and cardiovascular protection, and so on. The injury of endothelial cells may lead to cell damage defense system, reduce the ability of scavenging oxygen free radicals and decrease the enzyme activity. Soybean isoflavone has the ability of anti peroxidation and repair the injury of endothelial cells. In this paper, the protection and mechanism of soy isoflavones on injured endothelial cell was summarized, and provided more material basis for the development of new endothelial cell protection drugs and clinical research.

Key words: Soy isoflavones; Endothelial cell; Oxidative damage; Protection

提取的天然大豆异黄酮是一种混合物,其主要成分为大豆苷(daidzin)、染料木苷(genistin)、黄豆苷(glycitin)、大豆苷元(daidzein)、染料木素(genistein)和黄豆黄素苷元(glycitein)。其中前3种成分属于糖苷型,后3种成分属于游离型,在天然大豆中,大豆异黄酮主要以糖苷型形式存在,游离型形式含量较低,一般不超过总含量的15%。研究证明,大豆异黄酮具有抗氧化、抗溶血和抗真菌活性,并能有效预防和治疗癌症,尤其是对乳腺癌和前列腺癌有积极的预防和治疗作用^[1]。此外,大豆异黄酮对心血管疾病、骨质疏松症以及更年期综合征具有预防甚至治愈作用^[2]。

血管内皮细胞是介于血管组织和血流之间的一层单核细胞,可通过自分泌、内分泌和旁分泌3种途径释放,分泌的内皮素(ET-1)、前列环素(PGI₂)和一氧化氮(NO)等血管活性物质,具有调节血管紧张性、抗血栓形成、抑制平滑肌细胞增殖及血管壁炎症反应等功能,是血管内环境稳定的重要保证。Ross“损伤反应”原理证明,内皮细胞功能性的

损伤是动脉粥样硬化形成早期的始动环节^[3]。

大豆异黄酮作为一种植物雌激素,在食品、医药、化妆品、饲料等领域具有广泛的应用前景。研究大豆异黄酮对损伤的内皮细胞的保护作用 and 机理,对于预防和治疗心血管疾病具有重要作用。现对大豆异黄酮及其单体化合物对损伤内皮细胞的保护作用进行综述,以期能为开发新型内皮细胞保护药物及其临床研究提供理论依据。

1 大豆异黄酮提取物对氧化损伤内皮细胞的保护作用

1.1 体外水平研究

缺血缺氧、高血糖、高血脂等导致的内皮细胞损伤,是引起高血压、血栓形成等心血管疾病的头号动因^[4],大豆异黄酮能不同程度地恢复氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)损伤后的内皮细胞的形态和细胞活力。高玉霞等^[5]从细胞形态学研究大豆异黄酮的保护作用,将不同剂量的维生素E(VE)和大豆

收稿日期:2013-09-07

基金项目:江苏省普通高校研究生科研创新计划(cxLx12_0941)。

第一作者简介:任娇(1990-),女,在读硕士,主要从事大豆异黄酮对内皮细胞损伤保护研究。E-mail:68843234@qq.com。

通讯作者:崔桂友(1962-),男,硕士生导师,主要从事食物成分与人体健康研究。E-mail:gycui@yzu.edu.cn。

异黄酮加入 ox-LDL 损伤后的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 模型后,发现 VE 组和大豆异黄酮中、高剂量组细胞多恢复正常,边界清楚,大小均匀。

黄国伟等^[6]用 ox-LDL 对 HUVEC 造模,结果大豆异黄酮各剂量组和 VE 组的血管内皮细胞的细胞凋亡指数 (AI) 均明显降低,凋亡细胞减少,且同浓度的大豆异黄酮和 VE 作用相似,这与郭伟等^[7]的研究结果一致。何煜舟等^[8]同样从细胞凋亡角度证实了大豆异黄酮可以保护和修复过氧化氢 (H_2O_2) 诱导的血管内皮细胞的损伤,并推测其作用可能与其抗氧化、促进一氧化氮 (NO) 释放、增强 SOD 和 GSH-PX 的活力有关。

大豆异黄酮可以通过扩张微动脉,改善微循环,增加血流量来保护内皮细胞,一定剂量的大豆异黄酮还可以增强内皮细胞的活力。Andrade 等^[9]用脂多糖刺激已培养 24 和 48 h 的 HUVEC,添加染料木素、7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、鹰嘴豆芽素 A、黄豆苷元及其混合物,检测结果显示各物质均能减小 VCAM-1/ICAM-1 和 E-选择素在细胞表面和上清液中的粘附力,降低细胞粘附力表达,进而表现出抗动脉粥样硬化的效果。

1.2 体内水平研究

高脂高糖饮食会造成内皮细胞功能的紊乱和损伤,是心血管疾病发生的潜在因素。刘莉等^[10]用大豆异黄酮 (SI) 3 个剂量组对高糖高脂高盐饲料小鼠灌胃 28 d 后表明,从形态结构上看,SI 低剂量组内膜不同程度增厚,排列尚规整,与空白组相似;从体重、血糖和血清上看,SI 高剂量组大鼠各指标水平均下降;血压仅大豆异黄酮高剂量组明显下降;与模型组比,SI 高剂量组、二甲双胍组 eNOS mRNA 表达明显增高 ($P < 0.05$),可见大豆异黄酮对代谢综合征 (MS) 小鼠各代谢组分均有改善作用,降低血管性血友病因子 (vWF) 水平,修复内皮细胞损伤,改善血管内皮功能。逢晓云等^[11]的研究表明不同剂量的大豆异黄酮对高脂饮食 9 周后高密度脂蛋白 (HDL) 和甘油三酯 (TG) 分别有明显的升高和降低,SOD 的活力明显升高,丙二醛 (MDA) 含量明显降低,但是对于高脂饮食的大鼠的肝脏系数无明显影响。

张玉梅等^[12]从细胞粘附力的角度研究了大豆异黄酮的保护作用,结果显示,不同剂量的大豆异黄酮可以降低大鼠主动脉血管内皮细胞间黏附分子 CAM 和血管粘附分子的表达,对细胞损伤有保护作用,与 Andrade 等^[9]的研究结果一致。

2 大豆异黄酮单体成分对氧化损伤内皮细胞的保护作用

2.1 染料木素

染料木素又称 4',5,7-三羟基异黄酮、金雀异黄酮,具有抗氧化成分,可以有效抑制损伤血管的生成和转移,对心血管有明显的保护作用。

逢晓云等^[11]的细胞实验得出,染料木素 25, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能显著抑制 H_2O_2 脂质过氧化引起的 OD 值下降,说明染料木素对 HUVEC 有剂量依赖的保护作用。Fuchs 等^[13]的研究结果显示,对于 ox-LDL 诱导的 926 人内皮细胞,染料木素对其损伤有保护作用。Exner 等^[14]证明了染料木素能够保护来自葡萄糖氧化修饰的 LDL 对内皮细胞的损伤,能够阻止来自葡萄糖诱导的低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化,而且完全抑制了糖化的 LDL,能增加组织因子合成 HUVEC 的能力。

王凡等^[15]从不同水平检测显示,染料木素在浓度为 500 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能够明显抑制叔丁基氢过氧化物 (t-BHP) 诱导的内皮细胞凋亡,5 ~ 500 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能够显著抑制 Caspase-3 的激活及表达。染料木素可以保护 H_2O_2 损伤的内皮细胞,但是高糖环境可能局部影响其保护力。用 H_2O_2 和高糖刺激 HUVEC,在大豆苷元和染料木素浓度为 100 ~ 500 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, HUVEC 增殖,在 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能明显减少氧化损伤引起细胞凋亡,且染料木素比大豆苷元效果更强;而在高糖培养液 25 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 中,大豆苷元和染料木素则失去了刺激效应,在此浓度下孵育细胞,大豆异黄酮对内皮细胞的保护作用效果较弱,试验还得出染料木素对于 ERB 的上调效果在有无 H_2O_2 影响的条件下均有表现,而在 ICI182780 出现时这种效应发生改变^[16]。

2.2 其他单体成分

染料木素是大豆异黄酮活性最强的成分,很多试验表明,把大豆异黄酮各单体成分分别试行实验,只有染料木素表现出了显著的保护作用,而其他单体则不稳定或无效。

Braun 等^[17]用染料木素、黄豆苷元和雌马酚 3 种化合物,在浓度分别为 1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 37℃ 条件下处理内皮细胞 4 h 后,添加肿瘤 TNF- α 作为氧化应激因子,荧光值显示染料木素能明显抑制内皮细胞中由肿瘤坏死因子活性氧引起的刺激,而大豆黄酮和雌马酚效果则不稳定,此结果与 Hernandez-Montes 等^[18]的研究一致。Kapiotis 等^[19]通

过对硫代巴比妥酸反应产物(TBARS)电泳迁移率和脂质过氧化物的测定,发现染料木素能够抑制铜离子或一氧化氮自由基的低密度脂蛋白的氧化,抑制经 LDL 诱导的牛主动脉细胞和人内皮细胞的损伤,保护氧化脂蛋白损伤的血管细胞,染料木素作为一个酪氨酸激酶抑制剂,可以阻止 ox-LDL 诱导的内皮细胞的 2 个酪氨酸磷酸化蛋白 132 和 69 的向上调节。

刘锦等^[20]的研究也显示,相同浓度范围内,染料木素和大豆苷元对于 LDL 的损伤抗氧化效应具有显著性差异。大豆苷元、黄豆黄素等其他单体对于损伤的内皮细胞保护能力有限,可能是由于结构差异造成的。

3 大豆异黄酮对内皮细胞损伤的保护途径

3.1 自由基水平

LDL 是血液中胆固醇重要的载体,而氧化修饰的 LDL(ox-LDL)会使内皮细胞内环境发生紊乱,而大豆异黄酮(SI)可能是通过稳定 LDL 结构、保持 LDL 完整性,并抑制自由基链反应而起作用^[21]。大豆异黄酮抗氧化性机制原因可能为:(1)与超氧阴离子反应,阻止自由基引发;(2)与金属离子螯合,阻止羟基自由基生成;(3)与脂质过氧化基反应,阻止脂质过氧化过程^[22]。

3.2 基因水平

大豆异黄酮可以改变氧化反应相关基因的表达,如影响平滑肌中谷胱甘肽限速酶的合成^[23]。刘莉等^[10]研究指出大豆异黄酮通过降低血清 Vwf 水平,上调内皮型一氧化氮合酶(eNOS)mRNA 表达来改善血管内皮功能的。

Caspase 家族是一类半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶,是细胞凋亡中的关键因子^[24],Kapiotis 等^[19]认为染料木素对细胞凋亡的抑制是通过降低 Caspase-3 的表达来实现的。金雀异黄酮能够有效抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 原癌基因 c-myc 的 mRNA 表达的增高,抑制 ox-LDL 内皮细胞活性氧的产生,阻断 NF- κ B 的活化,抑制 c-myc 的表达^[20]。

3.3 信号通路

Xiao 等^[21]指出大豆异黄酮通过 ER-beta 和 Bcl-2 的表达及细胞生存信号 PI3K 途径的调制来抑制细胞的损伤和凋亡。被染料木素培养过的内皮细胞能有效地减少经 VEGF 诱导的 MMP-2 和 MMP-9 的分泌,向下调节血管生成因子 VEGF、MMPS、uPA 在转录和翻译水平的表达^[25]。Liu 等^[26]认为是染料木素非基因组激活 cAMP/PKA 信号通路,改变了

cAMP 调节基因的表达,从而保护受损血管。

4 展 望

血液中过量的 LDL、ox-LDL 和高糖高脂等环境都会引起血管内皮细胞的氧化损伤,致使内皮细胞的功能失常,调节紊乱。大豆异黄酮通过清除自由基、上调 eNOS mRNA、增加 Bax 的表达,抑制 Caspase-3 的激活和 Bcl-2 的 mRNA 表达,阻止内皮细胞的氧化损伤而预防心脑血管疾病的发生。

大豆异黄酮的生物活性多样,但结构存在缺陷,结构的改变可能会使其生物活性的发挥更加完善。近些年来,研究学者提出,通过微生物转化改变其化学结构,以提高活性。如 8-羟基大豆苷元是在大豆苷元的 8 位 C 上发生羟基化反应得来的转化产物,其抗氧化性、清除自由基活性提高了数十倍,解除了在很多领域的局限性^[27]。

参考文献

- [1] 井乐刚,路芳. 大豆异黄酮的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2004,30(2):62-65. (Jing L G, Lu F. The antioxidant activity of soybean isoflavone[J]. Food and Fermentation Industries, 2004, 30(2):62-65.)
- [2] 刘志胜,李里特. 大豆异黄酮及其生理功能研究进展[J]. 食品工业科技,2000,21(1):78-80. (Liu Z S, Li L T. The research on soybean isoflavones and it's physiological functions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2000, 21(1):78-80.)
- [3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s[J]. Nature, 1993, 362:801-809.
- [4] 吴旭彤,朱萱萱. 中药对血管内皮细胞损伤的保护作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2011,29(12):2648-2650. (Wu X T, Zhu X X. The research on traditional Chinese medicine on vascular endothelial cell injury protection[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2011, 29(12):2648-2650.)
- [5] 高玉霞,黄国伟. 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. (Gao Y X, Huang G W. Protective effect of soybean isoflavone on morphology of vein endothelial cells from oxidative injury *in vitro* [J]. Journal of Tianjin Medical University, 2003, 9(1):39-41.)
- [6] 黄国伟,曹小红. 大豆异黄酮对氧化损伤血管内皮细胞凋亡作用[J]. 中国公共卫生,2008,24(7):830-831. (Huang G W, Cao X H. Inhibitive effects of soybean isoflavone on apoptosis of vascular endothelial cells following oxidative injury[J]. Chinese Journal of Public Health, 2008, 24(7):830-831.)
- [7] 郭玮,马丽杰. 浅谈大豆异黄酮对血管内细胞氧化的抑制作用[J]. 求医问药(下半月),2013,11(1):214-215. (Guo W, Ma L J. Introduction to soy isoflavones on vascular endothelial cells oxidation inhibition [J]. Seek Medical and Ask the Medicine (The second half of the month), 2013, 11(1):214-215.)

- [8] 何煜舟,丁美萍.大豆异黄酮对氧化损伤的血管内皮细胞的保护作用[J].浙江中医杂志,2006,41(4):228-229. (He Y Z, Ding M P. Soy isoflavones on oxidative damage of endothelial cells of protection[J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2006, 41(4):228-229.)
- [9] de Andrade C M, Silva de Sá M F, Toloi M R, et al. Effects of phytoestrogens derived from soy bean on expression of adhesion molecules on HUVEC[J]. The Journal of the International Menopause Society, 2012, 15(2):186-94.
- [10] 刘莉,隋艳波.大豆异黄酮对代谢综合征大鼠主动脉内皮细胞功能影响的实验研究[J].中华中医药学刊,2010,28(10):2024-2027. (Liu L, Sui Y B. The influence research of soy isoflavones on endothelial function of metabolic syndrome rats[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2010, 28(10):2024-2027.)
- [11] 逢晓云,沈金芳.大豆异黄酮对大鼠血脂的影响及其体内外抗氧化作用研究[J].中国临床药理学与治疗学,2008,13(1):62-67. (Xiang X Y, Chen J F. The influence of soy isoflavones on blood lipid in rats and its antioxidant effect in vivo and in vitro studies[J]. Chinese Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2008, 13(1):62-67.)
- [12] 张玉梅,刘颖,藤燕平.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. (Zhang Y M, Liu Y, Teng Y P. Soyisoflavones inhibits gene expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in aorta vessel of atherosclerotic rat predisposed with high cholesterol and high fat diets[J]. Chinese Journal of Arterioscler, 2003, 11(1):13-15.)
- [13] Fuchs D, Erhard P, Turner R, et al. Genistein reverses changes of the proteome induced by oxidized ox-LDL in EA hy 926 human endothelial cells[J]. Journal of Proteome Research, 2005, 4(2):369-376.
- [14] Exner M, Hermann M, Hofbauer R, et al. Genistein prevents the glucose autooxidation mediated atherogenic modification of low density lipoprotein [J]. Free Radical Research, 2001, 34(1):101-112.
- [15] 王凡. PPAR γ 在大豆异黄酮抑制叔丁基过氧化氢诱导人血管内皮细胞氧化应激损伤中的作用研究[D].重庆:第三军医大学,2004. (Wang F. The study on PPAR γ of soy isoflavone inhibits cell injury induced by tert-butyl hydroperoxide in human vascular endothelial cell[D]. Chongqing: The Third Military Medical University, 2004.)
- [16] Xu S Z, Zhong W W. Multiple mechanisms of soy isoflavones against oxidative stress-induced endothelium injury[J]. Free Radical Biology And Medicine, 2009, 47(2):167-175.
- [17] Braun M M, Steinberg F M. Soyisoflavones increase antioxidant capacity of endothelial cells[J]. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 2003, 5(17):A1118.
- [18] Hernandez-Montes E, Pollard S E. Activation of glutathione peroxidase *via* Nrf1 mediates Genistein's protection against oxidative endothelial cell injury [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 346(3):851-859.
- [19] Kapiotis S, Hermann M, Held I. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL [J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 1997, 17:2868-2874.
- [20] 刘锦,鲁映青.金雀异黄素对低密度脂蛋白氧化修饰及氧化型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):509-512. (Liu J, Lu Y Q. Inhibitory effects of genistein on the oxidative modification of low density lipoprotein and c-myc mRNA expression induced by oxidized low density lipoprotein in vascular endothelial cells[J]. Chinese Journal of Arterioscler, 2002, 10(6):509-512.)
- [21] Wu X C, Jie M, Wood Carla M. Effect of soy proteins and isoflavones on lipid metabolism and involved gene expression[J]. Frontiers in Bioscience Landmark, 2008, 13(2):2660-2673.
- [22] 吴定,江汉湖.发酵大豆制品中异黄酮形成及其功能[J].中国调味品,2001(6):3-6. (Wu D, Jiang H H. Fermented soy isoflavones in the formation and function[J]. Chinese Condiment, 2001(6):3-6.)
- [23] Richard C M S, Francois Y L L, David J R, et al. Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens; transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2009, 42:909-925.
- [24] Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development[J]. Cell, 1997, 88(3):347-354.
- [25] Yu X Y, Zhu J D, Mi M T, et al. Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation [J]. Medical Oncology, 2012, 29(10):349-357.
- [26] Liu D M, Jiang H L, Robert W. Genistein activates the 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in vascular endothelial cells and protects endothelial barrier function[J]. The Endocrine Society, 2005, 146(3):1312-1320.
- [27] 吴婷婷,崔桂友,颜云莽,等.8-羟基大豆苷元的生物活性研究进展[J].食品与发酵工业,2012,38(2):141-146. (Wu T T, Cui G Y, Yan Y Q, et al. Progress in the biological activity of 8-OHD [J]. Food and Fermentation Industry, 2012, 38(2):141-146.)