

豆豉对早期动脉粥样硬化大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡的影响

牛丽颖¹, 田鹏娜², 李清¹, 刘娇¹, 王鑫国¹

(¹河北医科大学中医学院, 河北 石家庄 050091; ²保定市第三医院药剂科, 河北 保定 071000)

摘要:观察豆豉对早期动脉粥样硬化大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡及相关凋亡基因突变型 p53 和 Fas 蛋白表达的调节作用,以探讨其机制。采用高脂饲料喂养法建立大鼠早期动脉粥样硬化模型,同时连续 10 周灌胃给予豆豉提取物进行干预。末次给药后处死动物,光镜下观察血管平滑肌细胞的形态,透射电镜观察超微结构,采用流式细胞术检测细胞凋亡率以及凋亡相关基因突变型 p53 和 Fas 蛋白的表达。模型对照组主动脉平滑肌细胞的凋亡率及增殖指数(FI)明显高于正常对照组($P < 0.05$),p53 蛋白表达上调;豆豉干预组(20 g 生药·kg⁻¹、40 g 生药·kg⁻¹)大鼠主动脉平滑肌细胞的凋亡率明显高于模型对照组($P < 0.05$),增殖指数明显低于模型对照组($P < 0.05$),Fas 蛋白表达上调($P < 0.05$),p53 蛋白表达下调($P < 0.05$),光镜及透射电镜可见主动脉损伤明显较模型对照组改善。豆豉可调节早期动脉粥样硬化大鼠血管平滑肌细胞凋亡与增殖的平衡,其机制可能与调节突变型 p53 和 Fas 蛋白的表达有关。

关键词:豆豉;动脉粥样硬化;细胞凋亡;增殖指数;突变型 p53;Fas

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)01-0156-04

Effects of Semen Sojæ Preparatum on the Apoptosis of Aortic Smooth Muscle Cells in Rats With Early Atherosclerosis

NIU Li-ying, TIAN Peng-na, LI Qing, LIU Jiao, WANG Xin-guo

(¹College of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, Hebei; ²Pharmacy Department of the Third Hospital in Baoding City, Baoding 071000, Hebei, China)

Abstract: To investigate the effects of Semen Sojæ Preparatum (SSP) on apoptosis, and gene expression of p53 and Fas in aortic smooth muscle cells (ASMCs) in early Atherosclerosis (AS) rats, and to explore the possible mechanism. Rat models with early AS were induced by feeding fatty foods, meanwhile rats in two treated groups were orally administered with extract of SSP for 10 weeks. All rats were killed and samples of ASMCs harvested. The cellular morphology was observed by light microscope and ultrastructure by transmission electron microscopy; apoptosis and gene expression of p53 and Fas were detected by flow cytometry. Compared with normal group, the apoptosis rate and the proliferation index (PI) in model group were obviously increased ($P < 0.01$), with higher gene expression of p53; moreover compared with model group, the apoptosis rates in two treated groups (20 g·kg⁻¹, 40 g·kg⁻¹) were higher ($P < 0.01$), the proliferation index was lower ($P < 0.01$), and the gene expression of Fas was increased, but p53 was decreased ($P < 0.05$); histologically, the aortic damage was remarkably improved with SSP. These results suggest that SSP can adjust the balance between apoptosis and proliferation of ASMC, which may relate to gene expression regulation of p53 and Fas.

Key words: Soybean; Atherosclerosis; Apoptosis; Proliferation indexes; p53; Fas

女性进入更年期后,由于卵巢机能衰退,雌激素水平下降而导致脂质代谢紊乱,使绝经女性血脂升高,最终导致动脉粥样硬化(AS),使心血管疾病发病率和死亡率增加。由于老龄化社会的来临,绝经后妇女动脉粥样硬化的防治已成为本世纪医学界关注的焦点问题之一。中药的多成分、多效应与动脉

粥样硬化发生的多因素、多环节相吻合,因此从中药中寻找预防和治疗绝经妇女动脉粥样硬化的药物十分必要。前期的研究证实豆豉提取物具有广泛的心血管效应^[1-5],为深入探讨其抗动脉硬化的机制,采用高脂饲料喂养法建立大鼠早期动脉粥样硬化模型,同时给予豆豉提取物进行干预,流式细胞术

收稿日期:2008-08-28

基金项目:牛丽颖(1968-),女,教授,硕士生导师,现主要从事中药物质基础研究工作。

作者简介:王鑫国,教授,硕士生导师, E-mail: wangxingguo@163.com。

(FCM)检测主动脉平滑肌细胞凋亡以及凋亡相关基因突变型 p53 和 Fas 蛋白的表达。

1 材料与方法

1.1 药物

豆豉,购自石家庄市乐仁堂总店,试验前将豆豉用 80% 乙醇提取 2 次,每次 2 h,减压浓缩至 4 g 生药·mL⁻¹ 备用;吉非罗齐,保定市古城药厂,批号 040625,试验前用 0.5% CMC - Na 配成 0.016 g·mL⁻¹ 混悬液备用。

1.2 动物

SD 大鼠(清洁级),雄性,体重 180~200 g,由河北省实验动物中心提供,许可证号为 SCXK(冀)2003-1-003,动物饲料亦由该中心提供。

1.3 S 试剂

突变型 p53 和 Fas 兔抗人多克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司产品。

1.4 仪器

Olympus 光学显微镜,(日本);日立 H-7500 型透射式电子显微镜(日本);Epics-XL II 型流式细胞仪,美国 Beckman Coulter 公司。

1.5 方法

1.5.1 动物模型 采用高脂饲料喂养造成大鼠早期动脉粥样硬化模型,高脂饲料配方(2% 胆固醇,0.5% 胆酸钠,10% 猪油,0.02% 他巴唑,普通饲料 87.48%)。

1.5.2 分组与给药 将大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,每笼 5 只,分别为正常对照组、模型对照组、豆豉低剂量组(20 g 生药·kg⁻¹)、豆豉高剂量组(40 g 生药·kg⁻¹)及阳性药吉非罗齐组(0.16 g·kg⁻¹)。除正常对照组外,其余各组大鼠每日定量给予高脂饲料喂养,每日每只大鼠按 10 g 计算,待吃完高脂饲料后,补充足量基础饲料,正常对照组大鼠每日给予足量基础饲料喂养,自由饮水。同时给药组大鼠开始灌胃给药,豆豉高剂组每日灌胃给予 4 g 生药·mL⁻¹ 的豆豉提取物,豆豉低剂组每日灌胃给予 2 g 生药·mL⁻¹ 的豆豉提取物,阳性对照组每日灌胃给予 0.016 g·mL⁻¹ 吉非罗齐混悬液,模型对照组和正常对照组给予等容量的自来水,灌胃容量均为 1 mL·100 g⁻¹ 体重,连续 10 周。

1.6 检测方法

1.6.1 主动脉形态学检查方法 各组随机取 4 只大鼠,用 4% 多聚甲醛灌注固定后,自主动脉弓处剪

取等长的动脉条,沿腹侧剖开,内膜面向上,平铺冰盘上取材,置 10% 甲醛固定,石蜡切片,HE 染色,光镜显微镜下观察动脉病理组织学改变;截取主动脉 2×3 mm² 迅速用 4℃ 预冷的 4% 戊二醛固定,1% 锇酸后固定,乙醇梯度脱水,环氧树脂包埋,做超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅双染色,透射电镜观察内皮细胞及平滑肌细胞形态学变化。

1.6.2 流式样品制备与检测 各组剩余 6 只大鼠,剖取胸主动脉约 2 cm 长,采用流式细胞术(FCM)检测平滑肌细胞凋亡情况以及凋亡相关基因突变型 p53 和 Fas 蛋白的表达。取主动脉 1 cm,70% 乙醇固定,剥取中膜,剪碎,制备单细胞悬液,碘化丙啶染色,先加入兔抗人多克隆一抗,再加入 IgG - PE 二抗。同时设阴性对照,以替代一抗,阳性对照只加一抗或只加二抗,采用美国 BD 公司生产的 FACS420 型流式细胞仪检测血管平滑肌细胞的凋亡,数据采集为对数(log)方式,应用 Expo 32 ADC 进行免疫荧光数据分析。计数 10 000 个细胞,计算凋亡率(AP)。

$$AP = \frac{\text{凋亡细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

用 Muticycle AV 分析软件对 DNA 细胞周期拟合分析,计算出 DNA 组方图各时相分布的百分比,以增殖指数(PI)表示细胞的增殖活性。公式:

$$PI = \frac{S + G_2/M}{G_0/G_1 + S + G_2/M} \times 100\%$$

蛋白表达定量分析:以荧光指数(FI)表示相对含量,FI = (样品蛋白表达的平均荧光强度 - 对照样品蛋白表达的平均荧光强度) / (正常样品蛋白表达的平均荧光强度),FI > 1.0 为阳性表达,FI ≤ 1.0 为阴性表达。

1.7 统计学处理

所得数据用 SPSS 软件包(Version 11.5)采用方差齐性检验及 t 检验。

2 结果与分析

2.1 动脉标本的病理形态学观察

光镜下可见,正常对照组:内皮细胞连续完整而光滑,中膜平滑肌走行清晰,无增生;弹力纤维未见异常;模型对照组:内皮炎性细胞堆积,斑块表层内皮不完整,有纤维化的趋势,中膜弹力纤维断裂、消失或紊乱,平滑肌细胞增生明显;阳性对照组:内皮细胞比较完整,中膜平滑肌走行清晰,增生不明显;豆豉高剂组:表面内皮光滑连续,少数炎细胞黏附,

无纤维增生;中膜平滑肌厚度均匀,走行无明显异常,部分弹力纤维波纹断裂或消失,接近阳性药组;豆豉低剂组:增生明显,内皮有少数炎细胞黏附,较高剂组动脉硬化明显。

2.2 动脉标本的透射电镜结果

正常对照组:内皮细胞完整,细胞间连接紧密,平滑肌细胞呈长梭形,胞浆内含大量肌丝,细胞器较少,细胞核完整;病理模型组:内皮细胞破损,部分脱落残缺,内皮间连接处胞质分离,变直、变宽,出现较大间隙,其胞浆内可见脂质空泡形成;VSMC 高度变形,核分裂,核仁肥大。细胞器增多,肌丝减少,胞质中可见吞噬的脂滴,间质纤维增生;豆豉高、低剂量

组;可见内皮细胞较完整,覆盖于内膜表面,细胞连接好。内膜下间隙明显变的规则、清晰,较病理模型组增宽。平滑肌细胞突起明显减少,胞浆内空泡少见或无,核形状较规则。

2.3 对动脉硬化大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡率及增殖指数的影响

结果见表 1,从结果可见,模型对照组大鼠主动脉平滑肌细胞的凋亡率和增值指数均显著高于正常对照组组($P < 0.01$);豆豉干预组($20\text{ g 生药}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $40\text{ g 生药}\cdot\text{kg}^{-1}$)大鼠主动脉平滑肌细胞的凋亡率均较模型对照组增高($P < 0.01$),增殖指数均较模型对照组降低($P < 0.01$)。

表 1 豆豉对动脉硬化大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡率及增殖指数的影响

Table 1 The effect of SSP extract on apoptosis rate and proliferation indexes of VSMC/ $\bar{X} \pm S$

组别 Group	剂量 Dose/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	样本数 Number	凋亡率 Apoptotic percentage	增殖指数 Proliferation indexes
正常对照组 Normal group	—	6	$2.12 \pm 0.38^{**}$	$9.73 \pm 1.95^{**}$
模型对照组 Model group	—	6	8.05 ± 1.38	25.59 ± 4.66
阳性对照组 Control group	0.16	6	$12.63 \pm 0.60^{**}$	$15.22 \pm 2.10^{**}$
豆豉组 Group of SSP	40	6	$18.04 \pm 1.29^{**}$	$14.85 \pm 1.78^{**}$
	20	6	$13.44 \pm 1.41^{**}$	$19.55 \pm 1.90^{**}$

与模型对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Compared with Model, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 对动脉硬化大鼠主动脉平滑肌细胞突变型 p53 和 Fas 蛋白表达的影响

结果见表 2,从结果可见,模型对照组大鼠主动脉平滑肌细胞突变型 p53 蛋白表达增高($P < 0.01$), Fas 蛋白表达无明显变化;豆豉干预组($20\text{ g 生药}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $40\text{ g 生药}\cdot\text{kg}^{-1}$)大鼠主动脉平滑肌细胞的突

Compared with Model, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

变型 p53 蛋白表达量均较模型对照组降低($P < 0.01$), Fas 蛋白表达量较模型对照组增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

豆豉主要成分是大豆异黄酮,属多酚类混合物,主要以九种异黄酮糖苷和三种相应的配糖体混合存在,目前研究得最多的是 7,4'-二羟基异黄酮-7-葡萄糖苷(黄豆苷,daidzin)和 5,7,4'-三羟基异黄酮-7-葡萄糖甙(染料木苷,genistin)。大豆经加工、微生物发酵或体外酸水解作用,部分糖苷脱离释放出游离式的二羟基异黄酮(大豆黄素,daidzein)和三羟基异黄酮(染料木素 genistein),这两种结构与 17- β 雌二醇的结构相似,试验证明它们是弱雌激素,能与内源性雌激素受体结合,发挥雌激素效应,故有植物雌激素之称。对豆豉与原料大豆的成分进行比较,结果发现豆豉中异黄酮、染料木素、大豆苷元含量均高于原料大豆,提示豆豉比大豆具有更高的应用价值^[8]。

细胞凋亡是机体生长发育,细胞分化和病理状态中细胞自主性死亡的过程。近几年发现在多种心

表 2 豆豉对动脉硬化大鼠主动脉平滑肌细胞 p53 和 Fas 蛋白表达的影响

Table 2 The effect of SSP extract on Fas and p53 rate of VSMC/ $\bar{X} \pm S$

组别 Group	剂 量 Dose/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	样本数 Number	Fas (FI)	p53 (FI)
正常对照组 Normal group	—	6	1.00 ± 0.11	$1.00 \pm 0.19^{**}$
模型对照组 Model group	—	6	1.09 ± 0.04	1.80 ± 0.03
阳性对照组 Control group	0.16	6	$1.22 \pm 0.11^{*}$	$1.42 \pm 0.07^{**}$
豆豉组 Group of SSP	40	6	$1.30 \pm 0.08^{*}$	$1.40 \pm 0.10^{*}$
	20	6	$1.30 \pm 0.10^{**}$	$1.58 \pm 0.12^{**}$

与模型对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

血管疾病的发生与发展中起重要的作用,特别是在动脉粥样硬化斑块中发现内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞都经历着凋亡与坏死,而凋亡占主导地位,参与 AS 的形成过程。研究表明基因的异常表达直接调控着细胞的增殖与凋亡。Fas 蛋白与 Fas 配体结合后,会激活 caspase,导致靶细胞走向凋亡。突变型 p53 有促进异常细胞增殖,抑制其凋亡的作用^[9-10]。这些发现为人们认识和探索 AS 的发生机理及防治提供理论基础。

采用高脂饮食喂养法造成大鼠早期动脉粥样硬化病变,从结果可以看出,各组大鼠高脂饮食喂养 10 周主动脉平滑肌细胞都出现不同程度的损伤,流式细胞检测发现模型对照组的凋亡率和增值率均高于正常对照组,模型对照组突变型 p53 的基因表达也明显比正常对照组要高,光镜和电镜检测发现这一时期动脉壁病变正处于早期向中期过渡,细胞有明显增殖。而豆豉干预后凋亡率和增值指数均降低,突变型 p53 的表达下调,Fas 的表达上调。研究结果提示豆豉可能是通过调节突变型 P53 和 Fas 的基因表达,调节血管平滑肌细胞凋亡和增值的平衡,产生抗动脉粥样硬化的作用。

参考文献

- [1] 王鑫国,葛喜珍,白霞,等. 淡豆豉对去卵巢大鼠脂代谢的影响[J]. 中药材,2003,26(9):652-654. (Wang X G, Ge X Z, Bai X, et al. Effects of Semen Sojae Preparatum on lipid metabolism in ovariectomized rat [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003,26(9):652-654.)
- [2] 高淑丽,牛丽颖,曹秀莲,等. 淡豆豉提取物抗心肌缺血作用的研究[J]. 河北医药,2007,29(9):923-924. (Gao S L, Niu L Y, Cao X L, et al. Protective effect of fermented soybean extraction on myocardial ischemia in mice[J]. Hebei Medical Journal, 2007, 29(9):923-924.)
- [3] 牛丽颖,刘娇,崔力剑,等. 淡豆豉对早期动脉粥样硬化大鼠血管内皮损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2007,23(5):923-924. (Niu L Y, Liu J, Cui L J, et al. Effects and mechanisms of semen sojae preparatum extracts on rat's injury at the early stage of atherosclerosis[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2007,23(5):923-924.)
- [4] 曹秀莲,牛丽颖,窦玉红,等. 淡豆豉对心肌缺血小鼠心肌一氧化氮合酶表达的影响[J]. 河北中医药学报,2007,22(4):3-4. (Cao X L, Niu L Y, Dou L H, et al. Effects of Semen Sojae Preparatum on the NOS expression of myocardial ischemia in mice [J]. Hebei Medical Journals, 2007,22(4):3-4.)
- [5] 白霞,牛丽颖,刘娇,等. 淡豆豉防治早期动脉粥样硬化大鼠血管损伤的机制研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(1):170-171. (Bai X, Niu L Y, Liu J, et al. Mechanisms of Semen Sojae Preparatum Extracts on Rat's injury at the early stage of atherosclerosis[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008,19(1):170-171.)
- [6] 王鑫国,郭秋红,白霞,等. 乌鸡白凤丸对去卵巢大鼠雌激素分泌的影响[J]. 中成药,2003,25(1):67-68. (Wang X G, Guo Q H, Bai X. The effect of White Phoenix bolus of black-bone chicken on oestrogen level in ovariectomized Rat [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003,25(1):67-68.)
- [7] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2005:230. (Chinese Pharmacopoeia Committee. China pharmacopoeia version(part one) [M]. Beijing: Chemical Industrial Press, 2005:230.)
- [8] 牛丽颖,杜红娜,刘姣,等. 淡豆豉炮制前后异黄酮组分含量的比较研究[J]. 大豆科学,2008,27(4):672-674,678. (Niu L Y, Du H N, Liu J, et al. The comparative study on the content of isoflavone in Sojae Preparatum Extracts before and after processing [J]. Soybean Science, 2008,27(4):672-674,678.)
- [9] Kockx M M, Knaapen M W. The role of apoptosis in vascular disease[J]. Journal of Pathology, 2000,190(3):267-280.
- [10] Han D K, Haudenschild C C, Hong M K, et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model [J]. American Journal of Pathology, 1995,147(2):267-277.
- [11] 王立国,张晔,谷延锋. 支持向量机多类目标分类器的结构简化研究[J]. 中国图象图形学报,2005,10(5):571-574. (Wang L G, Zhang Y, Gu Y F. Research of simplification of structure of multi-class classifier of SVM[J]. Journal of Image and Graphics, 2005,10(5):571-574.)
- [12] Vapnik V N. Statistical learning theory [M]. New York, John Wiley, 1998,95-104.
- [13] HSU C W, LIN C J. A comparison of methods for multi-class support vector machines [J]. IEEE Trans on Neural Networks, 2002, 13(2):415-425.

(上接第 155 页)

- [9] 罗三定,肖飞. 不规则类圆形团块目标图像识别的新方法[J]. 中南大学学报,2002,35(4):632-637. (Luo S D, Xiao F. A new method of recognizing quasi-circular object [J]. Journal of South University, 2002,35(4):632-637.)
- [10] 雷国伟,郭东辉. 基于 CNN 二值图像处理的欧拉数计算[J]. 哈尔滨工程大学学报,2006,27(10):202-204. (Lei G W, Guo D H. Euler solving based on binary image processing via CNN[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2006, 27(10):202-204.)