

黑木耳多糖对动脉粥样硬化形成中平滑肌细胞增殖的影响

郭素芬¹, 李志强¹, 李 静², 王玉梅²

(牡丹江医学院 1. 病理学教研室, 2. 形态学实验室, 黑龙江省牡丹江市 157011)

[关键词] 病理学与病理生理学; 黑木耳多糖对血管平滑肌细胞增殖的影响; 免疫组织化学法; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 动脉粥样硬化; 兔

[摘要] 目的 通过平滑肌细胞的致动脉粥样硬化形成作用, 探讨黑木耳多糖对平滑肌细胞增殖的影响, 以减少动脉粥样硬化的形成。方法 将 30 只新西兰白兔随机分为正常对照组、模型组和实验组 3 组, 分别给予普通饲料(正常组)、高胆固醇饲料(模型组)以及高胆固醇加黑木耳多糖饲料(实验组)喂养。实验前及第 12 周时检测空腹 12~14 h 后血脂及血清中超氧化物歧化酶和丙二醛含量。喂养至第 12 周末处死动物, 取主动脉行组织形态学观察及用免疫组织化学方法分析 α 平滑肌肌动蛋白的表达, HPIAS-1000 高清晰度彩色医学图文分析系统进行图像分析。结果 与模型组比, 实验组动物血脂水平显著降低(模型组和实验组总胆固醇分别为 18.76 ± 2.32 和 11.68 ± 1.63 ; 甘油三酯分别为 1.52 ± 0.15 和 1.19 ± 0.12 ; 低密度脂蛋白胆固醇分别为 17.62 ± 2.27 和 9.64 ± 1.56 ; 高密度脂蛋白胆固醇分别为 0.65 ± 0.09 和 0.73 ± 0.76 ; $P < 0.01$), 血清中超氧化物歧化酶活力增高(模型组和实验组分别为 182.3 ± 10.9 和 216.0 ± 7.4 , $P < 0.05$) 而丙二醛含量显著降低(模型组和实验组分别为 4.53 ± 0.21 和 4.14 ± 0.14 , $P < 0.05$); 实验组主动脉斑块面积明显小于模型组(模型组和实验组分别为 0.44 ± 0.10 和 0.30 ± 0.83 , $P < 0.01$), 斑块内平滑肌细胞也少(模型组和实验组分别为 $14\% \pm 1\%$ 和 $12\% \pm 1\%$, $P < 0.05$)。结论 黑木耳多糖可减少平滑细胞的增殖, 从而减轻动脉粥样硬化形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Auricularia Auricula Polysaccharide on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherogenesis

GUO Su-Fen, LI Zhi-Qiang, LI Jing, and WANG Yu-Mei

(Department of Pathology, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cell; Proliferation; Blood Lipid; Malondialdehyde; Superoxide Dismutase; Atherosclerosis; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of auricularia auricula polysaccharide on the proliferation of vascular smooth muscle cells in the formation of atherosclerosis. **Methods** Thirty New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: normal group, model group and experiment group with ten rabbits in every group. The period of experiment is twelve weeks. Normal group received normal chow, model group received normal chow and cholesterol and, experiment group received normal chow, cholesterol and Polysaccharide. The levels of serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDLC), high density lipoprotein cholesterol (HDLC), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were detected at 0 and 12th week. Animals were killed after 12 weeks, and excised artery segments were prepared for histomorphological observation and α smooth muscle actin was investigated by immunohistochemistry analysis. The images were analyzed with HAIPS1000 software to distinguish the express of α smooth muscle actin. **Results** The serum TC, TG, LDLC and MDA were decreased (model group versus experiment group: TC was respectively 18.76 ± 2.32 and 11.68 ± 1.63 ; TG was respectively 1.52 ± 0.15 and 1.19 ± 0.12 ; LDLC was respectively 17.62 ± 2.27 and 9.64 ± 1.56 ; MDA was respectively 4.53 ± 0.21 and 4.14 ± 0.14 , $P < 0.01$ or $P < 0.05$), while the levels of serum HDLC and the serum SOD concentration were increased (model group versus experiment group: HDLC was respectively 0.65 ± 0.09 and 0.73 ± 0.76 ; SOD was respectively 182.29 ± 10.87 and 215.97 ± 7.38 , $P < 0.01$ or $P < 0.05$) in experiment group compared with those in model group. The atherosclerotic lesion were alleviated (model group versus experiment group: 0.44 ± 0.10 and 0.30 ± 0.83 , $P < 0.01$) and smooth muscle cells also diminished in lesions (model group versus experiment group: $14\% \pm 1\%$ and $12\% \pm 1\%$, $P < 0.05$). **Conclusion** The proliferation of vascular smooth muscle cells can be decreased through Auricularia Auricula Polysaccharide, thus inhibits the formation of atherosclerosis.

[收稿日期] 2005-10-08

[修回日期] 2006-09-14

[作者简介] 郭素芬, 硕士, 副教授, 主要研究方向为动脉粥样硬化的发病机制与防治, 联系电话 0453-6582156-3222, E-mail 为 goldenpot@163.com。通讯作者李志强, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的发病机制与防治研究, 联系电话 0453-6582156-3612。李静, 高级实验师。

在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生和发展过程中,血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的增殖和向内膜下迁移起重要作用。SMC增殖受多种因素的影响,尤其是内皮细胞源性及SMC源性生长因子表达增加,是诱导SMC增殖和迁移的重要因素之一^[1]。而这些生长因子的释放又与许多因素有关,如血脂异常、内皮细胞的脂质过氧化损伤等。黑木耳具有良好的降血脂、抗氧化和减少血小板聚集等功用^[2]。本实验旨在观察黑木耳多糖降低血脂及减少过氧化产物后对平滑肌细胞增殖的影响,探讨通过减少平滑肌细胞的增殖去减少动脉粥样硬化的形成。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

新西兰白兔由牡丹江医学院实验动物中心提供;黑木耳多糖为白色粉末,由黑木耳提取,其多糖提取过程和用量参照甘薯糖蛋白提取和用量^[3],其中多糖含量约为83.12%,蛋白质含量约为9.64%;胆固醇购于广州市器化医疗设备有限公司。

1.2 动物分组及处理

新西兰白兔30只,兔龄6个月,体重2.0~2.5 kg。随机分为三组:正常组、模型组和实验组。每组10只,实验期为12周。正常组喂饲普通饲料;模型组每日喂饲普通饲料+高胆固醇0.5 g/只;实验组每日喂饲普通饲料+高胆固醇0.5 g/只,并按体重加喂黑木耳多糖0.1 g/(kg·d)。上述饲料均制成颗粒,动物分笼饲养,自由饮水。

1.3 样本采集

分别于实验前、第12周末空腹12~14 h后从耳中央动脉采血。然后置37℃水浴中温育20 min,加速其凝固,用竹签沿试管四周轻轻剥离血块,使血清尽快自行析出,将血凝块以2.5 kr/min离心20 min,用加样器取出上层血清备用。

1.4 血脂及脂质过氧化指标的测定

采用酶法测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)。同时按硫代巴比妥酸法测定血清丙二醛(malondialdehyde)含量,采用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力。以上指标测定均按南京建成生物工程研究所提供试剂

盒说明书进行,各测定指标吸光度值用721型分光光度计完成。

1.5 动脉粥样硬化斑块面积测量

第12周末以空气栓塞法处死动物,解剖后立即将主动脉至髂动脉分叉处离断取出,生理盐水冲洗后,纵向剖开,中性福尔马林固定,所有标本于主动脉弓处取材进行常规酒精脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚度为5 μm,用于HE染色和α平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, SMA)免疫组织化学染色。再将上述取材后主动脉经苏丹Ⅳ染色,数码相机照相,采用HPIAS-1000病理图像分析系统,计算着色处(桔红色)面积占整条主动脉面积的百分比。

1.6 血管平滑肌肌动蛋白免疫组织化学染色

用SABC法对血管平滑肌肌动蛋白进行免疫组织化学染色,SABC试剂盒及抗SMA单克隆浓缩抗体均购自武汉博士德生物工程公司。抗体工作浓度为1:150,一抗孵育时间为4℃过夜。阴性对照片以PBS替代SMA单克隆抗体,显色试剂为DAB,显微镜下控制显色程度,自来水冲洗终止反应。常规脱水、透明、中性树胶封片。

1.7 平滑肌细胞计数

将平滑肌细胞免疫组织化学染色切片经HPIAS-1000高清晰度彩色医学图文分析系统分析,每组随机取5张切片,每张切片选5个视野,测定SMC阳性细胞数(凡染棕黄色者)及视野内细胞总数(按细胞核总数计算),计算SMC阳性表达率。

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS10.0软件处理,组间比较用方差分析,以 $P < 0.05$ 判定差异的显著性。

2 结果

2.1 血脂、丙二醛和超氧化物歧化酶含量变化

实验前和实验12周后三组血脂、丙二醛和超氧化物歧化酶的测定结果见表1。可见实验前各检测指标间无明显差异。第12周末,模型组血清中TC、TG和LDL较正常组明显升高($P < 0.01$),HDL也升高($P < 0.05$);丙二醛较正常组明显升高($P < 0.05$),SOD含量低于正常组($P < 0.05$);实验组血清TC、TG和LDL较模型组明显降低($P < 0.01$),HDL和丙二醛也降低($P < 0.05$),但比正常组高。而SOD较模型组有所升高($P < 0.05$),但比正常组轻度降低。

表 1. 三组血脂、丙二醛和超氧化物歧化酶含量变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

指 标	正常组 ($n=10$)		模型组 ($n=10$)		实验组 ($n=10$)	
	0 周	12 周	0 周	12 周	0 周	12 周
TC	1.26 \pm 0.12	1.26 \pm 0.13	1.27 \pm 0.09	18.76 \pm 2.32 ^{bd}	1.27 \pm 0.08	11.68 \pm 1.63 ^{bd}
TG	0.84 \pm 0.10	0.85 \pm 0.10	0.86 \pm 0.08	1.52 \pm 0.15 ^{bd}	0.84 \pm 0.09	1.19 \pm 0.12 ^{bd}
LDLC	0.46 \pm 0.37	0.53 \pm 0.17	0.46 \pm 0.11	17.62 \pm 2.27 ^{bd}	0.43 \pm 0.38	9.64 \pm 1.56 ^{bd}
HDLc	0.53 \pm 0.12	0.53 \pm 0.11	0.53 \pm 0.08	0.65 \pm 0.09 ^{ac}	0.54 \pm 0.08	0.73 \pm 0.76 ^{ac}
丙二醛	3.29 \pm 0.36	3.54 \pm 0.24	3.37 \pm 0.42	4.53 \pm 0.21 ^{ac}	3.49 \pm 0.40	4.14 \pm 0.14 ^{ac}
SOD	447.08 \pm 37.65	433.70 \pm 30.41	436.00 \pm 31.91	182.29 \pm 10.87 ^{bd}	440.92 \pm 38.42	215.97 \pm 7.38 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 0 周比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; e 为 $P < 0.05$, f 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.2 主动脉病理变化

2.2.1 大体观察 正常组兔主动脉内膜光滑, 肉眼无脂质斑块形成。模型组兔主动脉内膜可见明显的脂质斑块形成; 重者整条主动脉内膜可见弥漫分布脂质斑块形成。其主动脉脂质斑块与主动脉内膜表面积之比达 0.44 ± 0.10 。实验组兔主动脉内膜虽可见脂质斑块形成, 其主动脉脂质斑块与主动脉内

膜表面积之比为 0.30 ± 0.83 , 较模型组明显下降 ($P < 0.05$)。

2.2.2 显微镜观察 正常组兔主动脉内膜完整, 中膜平滑肌排列规整(图 1A); 模型组主动脉内皮细胞下间隙增宽, 泡沫细胞堆积, 中膜近内膜处平滑肌排列紊乱明显(图 1B); 实验组主动脉内膜泡沫细胞数量少, 中膜平滑肌排列紊乱不显著(图 1C)。

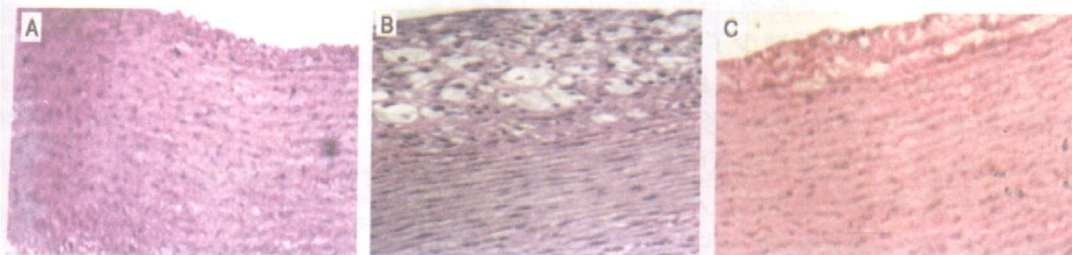


图 1. 兔主动脉内膜显微镜照片(HE 染色, $\times 200$) A 为正常组, B 为模型组, C 为实验组。

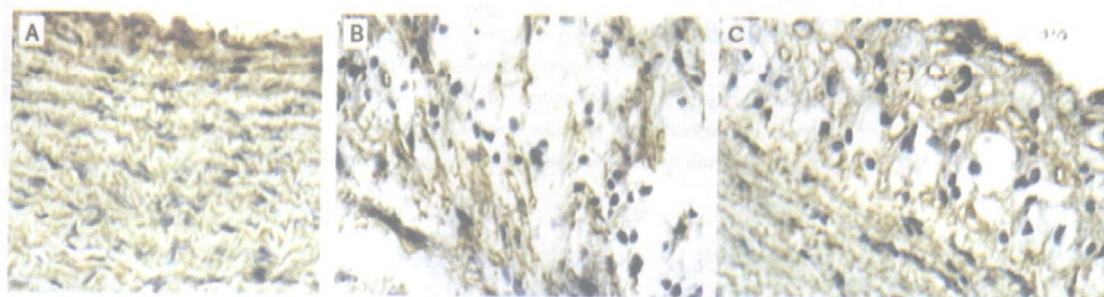


图 2. 兔主动脉内膜 α 平滑肌肌动蛋白免疫组织化学染色 ($\times 400$) A 为正常组, B 为模型组, C 为实验组。

2.3 主动脉免疫组织化学染色结果

实验动物标本的免疫组织化学染色结果见图 2, 阳性结果为胞浆内有棕黄色颗粒。正常组血管中膜平滑肌细胞胞浆内见棕黄色颗粒, 内膜完整(图 2A)。模型组和实验组除血管中膜平滑肌细胞胞浆着色外, 斑块内增殖的平滑肌细胞着色, 但模型组斑

块内着色细胞比实验组多, ($P < 0.05$, 图 2B、C 和表 2), 增殖的 SMC 朝管腔方向垂直生长并延伸至内膜。

3 讨论

高脂血症是动脉粥样硬化形成的始动性化学变

表 2. 模型组和实验组动脉粥样硬化斑块中平滑肌细胞的表达 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	视野数	SMC(%)
模型组	25	14% \pm 1%
实验组	25	12% \pm 1% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与模型组比较

化, 血浆脂质几乎总以脂蛋白的形式出现, 其中的 LDL 或 LDLC 是 As 的重要致病因素, 尤其是被氧化修饰的 LDL(ox-LDL) 致 As 作用最强。本实验结果显示: 随着高脂饮食的摄入, 受试家兔血清 TC、TG 及 LDL-C 水平不断升高, 但实验组上述三者水平则显著低于模型组, 说明黑木耳多糖具有明显调节血脂代谢紊乱作用, 这也与其他学者的结果一致^[4], 从而发挥了其抗动脉粥样硬化作用。本实验结果还显示: 在实验组, 血浆丙二醛含量明显降低, SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而且在实验组中兔主动脉 As 斑块也有所减轻, 这也说明黑木耳多糖具有抗氧化作用, 其可能的机制是通过黑木耳多糖降低血清中脂质, 减少组织中脂质蓄积, 进而减轻机体脂质过氧化反应的发生, 这样既减少了 LDL 的过氧化, 又保护了血管内膜, 从而减轻了 As 的形成。

另外, VSMC 增殖反应被认为是 As 形成的中心环节。As 斑块中 SMC 成分主要来自动脉中膜, 中膜 SMC 在渗入脂质的刺激、附着于内皮的血小板、单核细胞、内皮细胞以及 SMC 自身产生的一些生长因子 (如 IL-1、TNF、PDGF 等) 的作用下, 动脉中膜 SMC 经内弹力膜窗孔迁入内膜并增生, 其中内膜中部分 SMC 吞噬 LDL 变成泡沫细胞; 部分 SMC 由于基因的改变逐渐由收缩表型变成合成表型, 合成及分泌粘

多糖, 胶原等物质, 使局部纤维组织增生, 在纤维斑块形成中发挥重要作用。本实验从 HE 染色及免疫组织化学染色均能见到模型组血管中膜 SMC 增生明显且排列紊乱, 增生的 SMC 朝管腔方向垂直生长并延伸至内膜, 这与 Ross^[5] 的新观点恰好相符。而且本实验通过免疫组织化学实现了对斑块中 SMC 计数, 发现实验组中 VSMC 增殖的比模型组少 ($P < 0.05$), 其可能机制是黑木耳多糖一方面通过降血脂和抗氧化作用, 抑制促 SMC 增殖因子的产生; 另一方面通过减少脂质过氧化而抑制 SMC 由收缩型向合成型的转变, 从而减少促 SMC 增殖因子的产生; 此外, 本实验所用黑木耳多糖具有良好的抗血栓形成和抗血小板聚集作用^[6]。据报道, 使 SMC 增殖的因子中约有 2/3 是由血小板产生的, 因此, SMC 的增殖也因血小板的聚集、活化率下降而减少。

因此黑木耳多糖既可以减少斑块内脂质的含量, 保护细胞免于损伤, 又可以减少血管平滑肌细胞的增殖, 从而预防动脉粥样硬化的发生发展。

【参考文献】

[1] Boucher P, Gottardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. Role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis [J]. *Science*, 2003, **300** (5617): 329-332

[2] 范亚明, 王 朋, 张 颖, 方 虹, 潘晓东, 王绿娅. 黑木耳抗脂质过氧化的初步探讨[J]. *心肺血管病杂志*, 1995, **14** (4): 236-238

[3] 郭素芬, 包海花, 李志强. 甘薯的抗家兔主动脉粥样硬化形成作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (6): 23-26

[4] 蔡小玲, 章佩芬, 何有明, 邝 旭, 殷隆发. 黑木耳多糖、红菇多糖的降胆固醇作用研究[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2002, **12** (3): 137-139

[5] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126

[6] 张才擎. 黑木耳药用研究的进展[J]. *中国中医药科技*, 2001, **8** (5): 339-340

(此文编辑 胡必利)