

# 大豆异黄酮对青年雌性大鼠卵巢、子宫组织中 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 表达的影响

迟晓星<sup>1</sup>, 张涛<sup>2</sup>, 钱丽丽<sup>1</sup>, 孙清瑞<sup>1</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 哈尔滨医科大学大庆校区检验系, 黑龙江 大庆 163319)

**摘要:** 目的: 通过动物实验研究, 观察 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 在青年雌性大鼠卵巢和子宫组织中的表达情况, 从细胞凋亡角度研究大豆异黄酮对青年雌性大鼠的抗衰老作用。方法: 选用 2 月龄青年雌性大鼠 50 只, 按体质量分成 5 组, 每组 10 只, 分别为对照组(基础饲料)、低剂量组(大豆异黄酮 100mg/(kg bw·d))、中剂量组(大豆异黄酮 200mg/(kg bw·d))、高剂量组(大豆异黄酮 300mg/(kg bw·d))、雌激素组(己烯雌酚 0.5mg/kg 饲料), 实验周期 7 周。采用原位杂交法检测各组大鼠卵巢和子宫组织中 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 的表达水平。结果: 大豆异黄酮能够增强大鼠卵巢和子宫组织中 Bcl-2 mRNA 的表达水平; 而各剂量组大鼠卵巢和子宫组织中 Bax mRNA 水平呈下降趋势。结论: 大豆异黄酮可以增强抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA, 拮抗促凋亡基因 Bax mRNA 的水平, 推测这是大豆异黄酮对青年雌性大鼠发挥抗衰老作用的途径之一。

**关键词:** 大豆异黄酮; 青年雌性大鼠; Bcl-2 mRNA; Bax mRNA

Effect of Soy Isoflavones on the Expression of Bcl-2 mRNA and Bax mRNA in Ovary and Uterus in Young Female Rats

CHI Xiao-xing<sup>1</sup>, ZHANG Tao<sup>2</sup>, QIAN Li-li<sup>1</sup>, SUN Qing-rui<sup>1</sup>

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. Department of Examine of Daqing Campus, Harbin Medical University, Daqing 163319, China)

**Abstract** Objective: This paper focuses on the evaluation of the effect of soy isoflavones on the expression of Bcl-2 mRNA and Bax mRNA in ovary and uterus in youth female rats and the elucidation of anti-aging mechanism of soy isoflavones in youth female rats from the viewpoint of apoptosis. Methods Fifty two-month-old youth female rats were chosen to be divided into five groups of 10 rats each by body weight: control group (basic diet), low-dose group (soy isoflavones 100 mg/(kg bw·d)), middle-dose group (soy isoflavones 200 mg/(kg bw·d)), high-dose group (soy isoflavones 300 mg/(kg bw·d)), estrogen-treated group (diethylstilbestrol 0.5 mg/kg). The experiments lasted for 7 consecutive weeks. The expression of Bcl-2 mRNA and Bax mRNA in ovaries and uterus were detected by in situ hybridization method. Results: compared with the control group, the expression of Bcl-2 mRNA in ovary and uterus in soy isoflavones-treated groups was significantly increased, while the expression of Bax mRNA was significantly decreased. Conclusions. Soy isoflavones can enhance the expression of contra-apoptosis gene Bcl-2 mRNA and reduce the expression of auxo-apoptosis gene Bax mRNA. This is probably a good explanation of the anti-aging mechanism of soy isoflavones in youth female rats.

**Key words:** soy isoflavone; youth female rat; Bcl-2 mRNA; Bax mRNA

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)11-0231-04

卵巢和子宫衰老与细胞凋亡的关系一直是人们关注的热点之一。细胞凋亡是进化上细胞自杀的保守性程序, 它对调节细胞自然丢失和组织自身平衡有着重要作用, 普遍存在于多种组织和器官。Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 是细胞凋亡调控机制中两个非常关键的因子<sup>[1-4]</sup>。

大豆异黄酮的化学结构与动物体内的雌激素结构类似, 在体内能与雌激素受体结合, 具有轻度雌激素样调节作用<sup>[5-6]</sup>。越来越多的证据表明, 大豆异黄酮对 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 表达水平有调节作用, 这对改善细胞凋亡和抗衰老具有重要的意义, 目前国内外研究大都

收稿日期: 2009-10-21

基金项目: 黑龙江省青年科学基金项目(QC08C42); 黑龙江八一农垦大学博士科研启动基金项目(校启 B2005-13)

作者简介: 迟晓星(1976—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: chixiaoxing@sina.com

集中在大豆异黄酮对老年鼠及雄性鼠的抗氧化及抗衰老作用方面<sup>[7]</sup>,对青年雌性大鼠研究比较少。本研究主要通过动物实验,采用原位杂交方法检测大鼠卵巢和子宫组织中 Bcl-2 mRNA 及 Bax mRNA 表达情况,从细胞凋亡角度探讨大豆异黄酮对青年雌性大鼠的抗衰老作用及可能作用机制,旨在为成年女性在进入更年期之前合理的选择抗衰老药物,延缓衰老提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

大豆异黄酮由黑龙江双河松嫩大豆生物工程有限责任公司提供,高效液相色谱检测大豆异黄酮含量 42.54%,其中大豆苷 14.47%、大豆黄苷 6.13%、染料木苷 20.54%、大豆苷元 0.72%、染料木素 0.68%。

基础饲料采用的是 SAFD 饲料配方:玉米面 30.56%、玉米油 2%、小麦粉 27.27%、酵母 2%、鱼粉(60%蛋白)10%、AIN 矿物盐 3%、粗小麦 10%、维生素预混物 0.05%、酪蛋白 7%、氯化胆碱 0.12%、脱脂奶粉 5%、玉米蛋白 3%。

己烯雌酚(每片 0.5mg) 合肥久联制药有限公司。

Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 原位杂交检测试剂盒 武汉博士德生物工程有限公司;DRP-9082 型电热恒温培养箱 上海森信实验仪器有限公司。

### 1.2 动物与分组

选择雌性 Wistar 大鼠 50 只,2 月龄,体质量 110~130g,由哈尔滨市汉方实验鼠类养殖所提供,一级动物。按体质量随机分为 5 组,每组各 10 只,分别为对照组(基础饲料);低剂量组(大豆异黄酮 100mg/(kg bw·d));中剂量组(大豆异黄酮 200mg/(kg bw·d));高剂量组(大豆异黄酮 300mg/(kg bw·d));雌激素组(己烯雌酚 0.5mg/kg 饲料)。大豆异黄酮经口喂饲给予,单笼饲养。自由进食、进水,实验周期 7 周。

### 1.3 方法

大鼠喂养 7 周后,麻醉,腹主动脉取血,大鼠死后,剖取大鼠卵巢和子宫,立即用含 4% 体积分数多聚甲醛的 PBS(0.1mol/L pH7.2~7.6)的固定液固定,制作大鼠卵巢和子宫组织石蜡切片,厚度 4 μm,用含 1% 体积分数 DEPC 的 70% 乙醇溶液处理后,再用多聚赖氨酸处理,60℃ 恒温箱烤片 2h。此后具体操作方法按 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 原位杂交检测试剂盒说明书操作。

卵巢颗粒细胞凋亡因子 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 阳性评定标准:根据切片卵巢和子宫组织中颗粒细胞免疫组织化学染色的深浅分 4 级,未被染色的为阴性表达,深棕色为弱阳性表达,棕黄色为中度阳性表达,棕褐色为强阳性表达。

为了统计方便,予以半定量计分:1、2、3、4 分别对应阴性表达、弱阳性表达、中度阳性表达、强阳性表达。每张切片至少观察 5 个视野,观察各组大鼠卵巢和子宫颗粒细胞 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 阳性表达

情况。

### 1.4 统计分析

采用 SPSS17.0 软件包,对结果进行 *t* 检验统计学处理, $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 卵巢和子宫中 Bcl-2 mRNA 表达情况

Bcl-2 mRNA 的阳性表达主要在卵巢和子宫组织的胞浆中,结果见表 1、2 和图 1(子宫中 Bcl-2 mRNA 表达图片与卵巢基本相同,图略,以卵巢为例)。

表 1 Bcl-2 mRNA 在大鼠卵巢中表达情况比较

Table 1 Comparison of expression of Bcl-2 mRNA in ovaries among 5 trial groups of rats

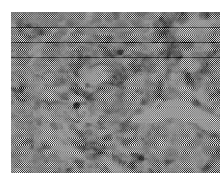
组别	<i>n</i>	给药剂量	Bcl-2 mRNA 表达个数				阳性积分	阳性表达率/%
			阴性	弱阳性	中度阳性	强阳性		
对照组	10	0	5	3	1	1	18	50
低剂量组	10	100mg/(kg bw·d)	2	2	2	4	28	80
中剂量组	10	200mg/(kg bw·d)	0	4	2	4	30	100
高剂量组	10	300mg/(kg bw·d)	0	2	3	5	33*	100
雌激素组	10	0.5mg/kg 饲料	0	1	1	8	37*	100

注:\*.与对照组相比,差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

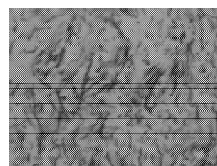
表 2 Bcl-2 mRNA 在大鼠子宫中表达情况比较

Table 2 Comparison of expression of Bcl-2 mRNA in utera among 5 trial groups of rats

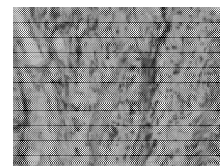
组别	<i>n</i>	给药剂量	Bcl-2 mRNA 表达个数				阳性积分	阳性表达率/%
			阴性	弱阳性	中度阳性	强阳性		
对照组	10	0	6	3	1	0	15	40
低剂量组	10	100mg/(kg bw·d)	4	3	2	1	20	60
中剂量组	10	200mg/(kg bw·d)	3	3	2	2	23	70
高剂量组	10	300mg/(kg bw·d)	0	3	3	4	31*	100
雌激素组	10	0.5mg/kg 饲料	0	2	1	7	35*	100



A.对照组卵巢(×10)



B.高剂量组卵巢(×10)



C.雌激素组卵巢(×10)

图 1 各剂量组大鼠卵巢中 Bcl-2 mRNA 的表达情况

Fig.1 Histopathology examinations of expression of Bcl-2 mRNA in ovaries in control group, high-dose soy isoflavones-treated group and estrogen-treated group

由表 1、2 和图 1 可见,Bcl-2 mRNA 在各组大鼠卵巢和子宫组织细胞均有不同程度的阳性表达,其中雌激素组大鼠卵巢和子宫组织细胞呈强阳性表达,棕褐色

颗粒最为显著;高剂量组大鼠卵巢和子宫组织细胞棕黄色颗粒也比较显著,呈中度阳性表达,对照组与之相比阳性细胞表达不明显,棕黄色颗粒较少。说明大豆异黄酮可上调 Bcl-2 mRNA 的表达量。

## 2.2 卵巢和子宫中 Bax mRNA 表达情况

Bax mRNA 在卵巢和子宫中的阳性表达主要也在细胞浆中表达,呈棕黄色颗粒,见表 3、4 和图 2(子宫中 Bax-2 mRNA 表达图片与卵巢基本相同,图略,以卵巢为例)。

表 3 Bax mRNA 在大鼠卵巢中表达情况比较

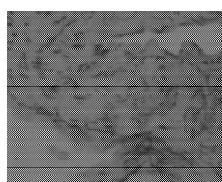
Table 3 Comparison of expression of Bax mRNA in ovaries among 5 trial groups of rats

组别	n	给药剂量	Bax mRNA 表达个数				阳性积分	阳性表达率/%
			阴性	弱阳性	中度阳性	强阳性		
对照组	10	0	1	1	2	6	33	90
低剂量组	10	100mg/(kg bw · d)	2	2	2	4	28	80
中剂量组	10	200mg/(kg bw · d)	3	1	3	3	23	70
高剂量组	10	300mg/(kg bw · d)	5	3	1	1	18*	50
雌激素组	10	0.5mg/kg 饲料	6	2	1	1	17*	40

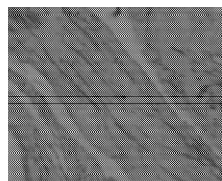
表 4 Bax mRNA 在大鼠子宫中表达情况比较

Table 4 Comparison of expression of Bax mRNA in utera among 5 trial groups of rats

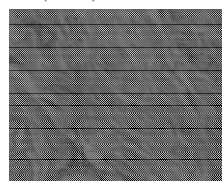
组别	n	给药剂量	Bax mRNA 表达个数				阳性积分	阳性表达率/%
			阴性	弱阳性	中度阳性	强阳性		
对照组	10	0	1	2	2	5	31	90
低剂量组	10	100mg/(kg bw · d)	1	2	3	4	30	90
中剂量组	10	200mg/(kg bw · d)	2	3	3	2	25	80
高剂量组	10	300mg/(kg bw · d)	2	4	3	1	23	80
雌激素组	10	0.5mg/kg 饲料	3	3	3	1	22	70



A. 对照组卵巢(× 10)



B. 高剂量组卵巢(× 10)



C. 雌激素组卵巢(× 10)

图 2 各剂量组大鼠卵巢中 Bax mRNA 的表达情况

Fig.2 Histopathology examinations of expression of Bax mRNA in ovaries in control group, high-dose soy isoflavones-treated group and estrogen-treated group

由表 3、4 和图 2 可见,以对照组大鼠卵巢组织中阳性颗粒表达明显,棕褐色颗粒多,雌激素组和高剂量组大鼠呈弱阳性表达,棕黄色颗粒很少,其他大豆异黄酮剂量组随剂量的增加阳性表达逐渐减少,但与对照组相比差异不显著。研究表明,大豆异黄酮可不同程度地下调大鼠卵巢和子宫中 Bax

mRNA 的表达量。

## 3 讨论

根据临床研究发现,大部分成年女性因缺乏医学常识,自我保健意识淡薄,尤其缺乏对自身雌激素作用的认识和了解,导致身体出现了一些女性特有的疾病。如:月经不调、子宫肌瘤、子宫内膜癌、乳腺增生、乳腺癌、更年期综合症、骨质疏松等 30 多种疾病。因此,成年女性不能缺少雌激素。每个人卵巢功能衰老的时间都各不相同。如果提前衰老、雌激素的分泌也将提前终止,那么更年期就提前;如果及时补充雌激素,就可以延缓更年期,避免更年期综合症的发生,延缓女性衰老。本研究通过大豆异黄酮对青年雌性大鼠的抗衰老作用研究,使人们认识到植物雌激素的可靠性和有效性,将为成年女性正确选择抗衰老药物及提前采取措施延缓更年期综合征提供可靠的理论依据。

卵巢衰老与细胞凋亡的关系一直是人们关注的热点之一。Bcl-2 和 Bax 是细胞凋亡调控机制中两个非常关键的因子。Bcl-2 基因表达水平的下调是凋亡信号传递过程中最先发生和最关键的步骤之一,本研究结果表明,大豆异黄酮可以使抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达明显增高,且添加量不同表达的结果也不同。随着大豆异黄酮添加量的增加,对照组、低剂量组、中剂量组、雌激素组的卵巢和子宫组织中 Bcl-2 mRNA 表达逐渐增强,这说明大豆异黄酮对抗凋亡基因具有促进作用。

Bax 为细胞凋亡的诱发基因,研究结果表明,在对照组青年雌性大鼠卵巢和子宫组织中 Bax mRNA 基因表达呈强阳性。雌激素组的青年雌性大鼠卵巢和子宫组织中有少量 Bax mRNA 基因表达,且颜色较浅,说明雌激素组大鼠卵巢和子宫组织中也有 Bax mRNA 基因表达,但并不起主要作用。而在大豆异黄酮低、中、高剂量组大鼠卵巢和子宫组织中均有 Bax mRNA 基因表达,且随剂量的增加颜色呈递减趋势,说明各剂量组的组织细胞凋亡的发生与 Bax mRNA 基因表达密切相关,大豆异黄酮有能够抑制 Bax mRNA 基因诱导卵巢和子宫凋亡的作用。

总之,植物雌激素大豆异黄酮可上调卵巢和子宫组织中 Bcl-2 mRNA、下调 Bax mRNA 表达,由此推断,大豆异黄酮延缓卵巢和子宫衰老及对于卵巢和子宫功能的保护机制可能与抑制细胞凋亡密切相关。

## 参考文献:

- [1] 秦佳佳. 中成药坤宁安调控围绝经期大鼠卵巢颗粒细胞凋亡因子 Bcl-2 mRNA 表达的特点[J]. 中国临床康复, 2006, 10(19): 149-151.
- [2] 徐霞, 刘美莲, 卢瑾, 等. 长期雌激素替代治疗对大鼠子宫内膜 Bcl-2 和 H-ras 基因与蛋白表达的影响[J]. 中南大学学报, 2005, 30(1): 41-45.
- [3] 薛晓鸥, 牛建昭, 王继峰, 等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠子宫细胞凋亡影响的研究[J]. 中日友好医院学报, 2005, 19(1): 28-30.
- [4] KIRCH D G, DOSEFF A, CHAU B N, et al. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c[J]. J Biol Chem, 1999, 274(30): 21155-21161.
- [5] 薛晓鸥, 金哲, 魏育林, 等. 葛根提取物对去卵巢大鼠阴道子宫及垂体: 性激素变化的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(6): 28-30.
- [6] UPMALIS D H, LOBO R, BRADLEY L M S, et al. Vasomotor sympyomr isoflavone extract tablets in postmenopausal women: a multicenter, double blind randomized, lacebocontrolled study[J]. Menopanse, 2000, 7(4): 236-242.
- [7] 迟晓星. 植物雌激素及其对雌性生殖系统影响的研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2001(6): 26-28.