

沙棘黄酮对粥样硬化大鼠 NADPH 氧化酶亚基 Nox4 及 ox-LDL 的影响

王颖超¹, 柳茵², 刘维军², 李琳²

(1. 青海大学医学院, 青海西宁 810001; 2. 青海大学附属医院, 青海西宁 810001)

摘要: 目的 探讨沙棘黄酮(TFH)对粥样硬化大鼠 NADPH 氧化酶亚基 Nox4 及 ox-LDL 的影响及机制。方法 将 50 只 SD 大鼠随机分为正常对照组(CON 组)、粥样硬化组(AS 组)、沙棘黄酮低、中、高剂量组。除 CON 组其余 4 组喂高脂饲料,TFH 低、中、高剂量组以不同剂量 TFH 灌胃,60 d 后,取血清测定 SOD、MDA 及 ROS 水平,ELISA 技术测主动脉 ox-LDL 和 Nox4 蛋白表达水平。结果 AS 组比 CON 组 SOD 下降,MDA 及 ROS 含量升高,沙棘黄酮干预能改善以上指标;沙棘黄酮降低了 AS 大鼠 Nox4 及 ox-LDL 蛋白表达水平。结论 沙棘黄酮可降低 AS 大鼠 Nox4 及 ox-LDL 蛋白表达从而减少 ROS 生成防治粥样硬化。

关键词: 沙棘黄酮;动脉粥样硬化;Nox4;ox-LDL;ROS

中图分类号:R285 文献标志码:A 文章编号:1000-2723(2013)05-0007-03

沙棘黄酮是中药材沙棘的主要有效成分,既往对沙棘黄酮研究表明其在保护粥样硬化、清除体内自由基等方面发挥重要作用^[1-3]。NADPH 氧化酶被认为是血管内生成 ROS 的主要酶体并参与了氧化应激致 AS 的全过程,NADPH 氧化酶亚基 Nox4 则是激活它的主要亚基^[4-6]。研究表明^[7],ox-LDL 能够激活动脉内皮细胞中的 Nox4 而促进 ROS 的生成,促进动脉粥样硬化的形成。沙棘黄酮对 Nox4 的影响还未见报道,本试验以 AS 大鼠模型为研究对象,探讨沙棘黄酮对粥样硬化影响及 Nox4、ox-LDL 表达水平的影响,以阐明沙棘黄酮抗 AS 的可能机制,为其药物开发提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及饲料

雄性 SD 大鼠^[8],清洁级,约 7 周龄,180~200 g,由兰州大学医学实验动物中心提供。合格证号:ZGLZ(甘)2012-0007。高脂饲料购自 Sigma 公司(批号:17853-88-4)。

1.1.2 药物与试剂

沙棘黄酮(TFH)购自青海康普德生物制品有限公司,总黄酮含量 75.0%(批号:19013C),ROS 试剂

盒(批号:20130728)、MDA 试剂盒(批号:20130731)、SOD 试剂盒(批号:20130802)购自南京建成生物研究所;Nox4 ELISA 试剂盒(批号:CQ13142B),ox-LDL 的 ELISA 试剂盒(批号:BR11152A)等购自 Sigma 公司。

1.1.3 实验仪器

台式高速离心机(上海展晨仪器有限公司生产,型号:XC1350)、电热恒温水槽(上海市百典仪器厂生产,型号:DKB-8A)、电子分析天平(南京艾赛特科技有限公司;型号:FA-1004)、轮转式切片机(北京佳源兴业有限公司生产,型号:KD-1508A)。

1.2 方法

1.2.1 复制动物模型^[9]

健康 SD 大鼠 50 只,体质量 180~200 g。随机分为 5 组:正常对照组(CON)、粥样硬化组(AS)、TFH 低、中、高剂量组(TFH-L、TFH-M、TFH-H)。除正常对照组外其余 4 组喂高脂饲料^[9]。造模同时,TFH 低、中、高剂量组每日分别以 TFH 60、120、180 mg/kg 灌胃,CON 组和 AS 组给予等量生理盐水灌胃。

1.2.2 血管内皮 HE 染色

处死大鼠取出主动脉,多聚甲醛溶液固定后再采用乙醇脱水,石蜡包埋主动脉切片,HE 染色观察

收稿日期:2013-09-05 修回日期:2013-09-27

作者简介:王颖超(1987~),男,河南周口人,在读研究生。研究方向:粥样硬化干预。

动脉内皮损伤情况并记录。

1.2.3 氧化指标

SOD、MDA 及 ROS 测定严格按试剂盒说明书,测定血中 SOD、MDA 及 ROS 含量。

1.2.4 ELISA 法测主动脉 Nox4、ox-LDL 蛋白含量

采用双抗体夹心 ELISA 法测 Nox4、ox-LDL 蛋白 OD 值,NOX4 和 ox-LDL 浓度与 OD₄₅₀ 值之间呈正比,通过 OD 值查出其蛋白表达量。

1.2.5 统计学处理

所测的相关数据用均数±标准差表示,用 SPSS 16.0 软件处理,组间采用单因素方差分析且以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠主动脉内皮损伤改变

HE 染色图可知:正常对照组主动脉内皮无明显损伤,表面光滑无内皮脱落及脂质沉积;粥样硬化组可见内皮有脱落甚至断裂,内皮层不完整,可见到内膜脂质沉积严重、弹力板撕裂现象,并有泡沫细胞生成。而沙棘黄酮各组内皮细胞脱落较轻,脂质沉积较少,内皮层断裂较少(图 1)。

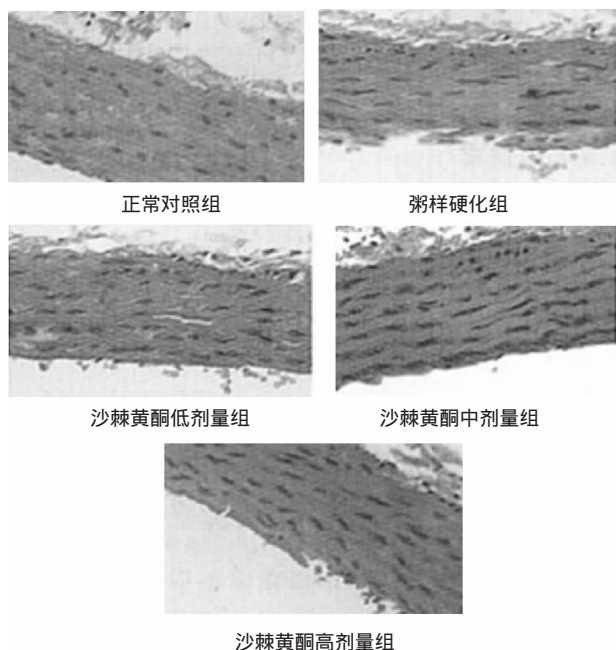


图 1 AS 大鼠主动脉 HE 染色($\times 40$ 倍)

2.2 氧化应激指标变化

AS 组比 CON 组 SOD 活性均显著下降,MDA 及 ROS 含量显著升高。沙棘黄酮干预能不同程度的改善以上指标。与 AS 组比较,沙棘黄酮低剂量组 MDA、ROS 含量开始降低,中剂量组 SOD 活性开始

上升,高剂量组 SOD、ROS 活性均上升,MDA 含量降低。见表 1。

表 1 沙棘黄酮对 AS 大鼠 SOD、ROS 和 MDA 等因子表达的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mL)	ROS(IU/mL)	MDA(μ mol/L)
正常对照组	70.31 \pm 11.32**	77.28 \pm 10.49**	4.49 \pm 1.24**
粥样硬化组	42.22 \pm 8.56	98.32 \pm 12.29	9.58 \pm 2.86
沙棘黄酮低剂量组	44.23 \pm 3.84	91.49 \pm 11.38	8.81 \pm 3.06*
沙棘黄酮中剂量组	65.82 \pm 5.97*	83.28 \pm 12.15*	7.49 \pm 2.94**
沙棘黄酮高剂量组	70.96 \pm 7.76**	76.56 \pm 12.11**	6.64 \pm 2.54**

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与粥样硬化组比较,** $P < 0.01$

2.3 蛋白表达变化

AS 组大鼠血管中 NADPH 氧化酶亚基 Nox4 及 oxLDL 的蛋白水平明显高于 CON 组大鼠血管表达水平,沙棘黄酮干预组大鼠血管的 Nox4 及 oxLDL 的蛋白水平低于 AS 组。提示沙棘黄酮可以有效的下调 AS 大鼠 Nox4 及 ox-LDL 的蛋白表达水平(见图 2)。

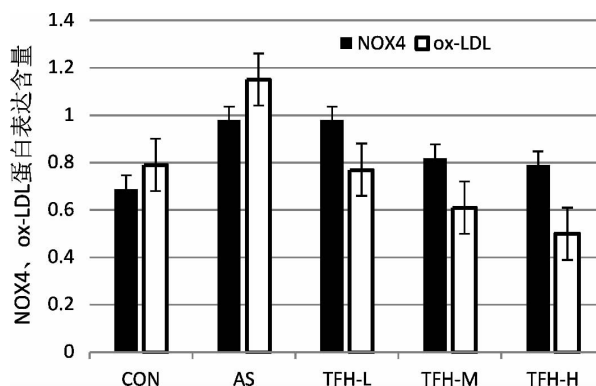


图 2 ELISA 法检测 AS 大鼠主动脉蛋白的表达($P < 0.05$)

3 讨论

沙棘又名沙枣、酸柳果,是蒙古族和藏族的常用中药材,其主要成分沙棘黄酮药理学研究证实具有多种生物活性和药理作用,在保护粥样硬化、清除自由基等方面发挥重要作用^[1-3]。本次实验大鼠血管 HE 染色示 AS 模型复制成功,AS 组比对照组 SOD 活性下降,MDA、ROS 含量升高,提示 AS 大鼠的抗氧化应激能力已下降^[3-5],而沙棘黄酮干预后改善了以上指标。

以往的研究^[4-7]表明 NADPH 氧化酶是血管中 ROS 的主要来源,NOx4 是激活 NADPH 氧化酶的主

要酶体,可生成 ROS 造成血管损伤。本试验说明了高脂饮食能够上调大鼠血管 Nox4 蛋白表达,而不同剂量的沙棘黄酮能够减少 Nox4 蛋白水平,说明沙棘黄酮具有的保护血管粥样硬化的作用可能是由于它能够降低 Nox4 的表达,进而减少 ROS 的产生而延缓血管内皮损伤的发生^[7]。此次试验结果提示高脂饮食能够升高 ox-LDL 蛋白表达水平,而沙棘黄酮却减低了高脂饮食所引起的 ox-LDL 的升高^[8]。研究表明^[8] ox-LDL 能够激活人动脉内皮细胞中的 Nox4 而促进 ROS 的生成,ROS 又能够氧化 LDL,ox-LDL 又能进一步促进 Nox4 的活化形成恶性循环,促进 AS 形成,而我们本次试验发现沙棘黄酮干预组能够通过下调 Nox4、ox-LDL 蛋白表达,从而减少 ROS 产生保护粥样硬化,这可以解释沙棘黄酮保护粥样硬化的可能机制。

总之,本试验结果确定了沙棘黄酮通过降低 Nox4 及 ox-LDL 蛋白的表达能够降低血管 ROS 水平,发挥保护动脉粥样硬化作用,然而 ox-LDL 调节 NADPH 氧化酶表达的详细机制及与沙棘黄酮干预的关系目前尚不太清楚,需进一步研究。

参考文献

- [1] 刘风云. 沙棘总黄酮的药理研究[J]. 中药材, 2004, 27(2): 145-146.
- [2] 廖晓阳, 张茂顺, 王伟文, 等. 醋柳黄酮对原发性高血压患者一氧化氮内皮素的影响[J]. 医学研究, 2005, 20(2): 247-248.
- [3] Zhang C, Li PL. Membrane raft redox signalosomes in endothelial Cells[J]. Free Radic Res, 2010, 44(3): 831-842.
- [4] Liu F, Havens J, Yu Q, et al. The link between angiotensin II-mediated anxiety and mood disorders with NADPH oxidase-induced oxidative stress[J]. Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2012, 4(3): 28-35.
- [5] Wang Z, Tang L, Zhu Q, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α contributes to the profibrotic action of angiotensin II in renal medullary interstitial cells[J]. Kidney Int, 2011, 79(5): 300-310.
- [6] Kumar R, Thomas CM, Yong QC, et al. The intracrine renin-angiotensin system[J]. Clin Sci, 2012, 123(2): 273-284.
- [7] Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, et al. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases[J]. Cell Signal, 2006, 18(1): 69-82.
- [8] Thum T, Borlak J. Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular injury: therapy through LOX-1 receptor antagonism[J]. Circ Res, 2004, 94(1): 11-13.
- [9] 傅剑云, 夏勇. 多因素致大鼠实验性动脉粥样硬化模型建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 11(11): 53-54.

(编辑:迟越)

Effect of Regulation of TFH on Expression of Nox4 and ox-LDL in Atherosclerosis Rats

WANG Ying-chao¹, LIU Yin², LIU Wei-jun², LI Lin²

(1. The Medical College of Qinghai University, Xining Qinghai 810001, China;

2. The Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining Qinghai 810001, China)

ABSTRACT : Objective To investigate whether TFH improve the atherosclerosis rats vascular function and its mechanism. **Methods** 50 male SD rats were divided into 5 groups: blank control group, atherosclerosis group, TFH low, medium and high dose group. After feeding for 60 days. Taking aorta to detect vascular injury condition; Separation and determination of SOD, MDA and ROS content. Elisa technique to detect NADPH oxidase subunit protein Nox4 and ox-LDL expression level. **Results** Compared AS group to CON, MDA and ROS activity were significantly increased, SOD content decreased significantly; TFH intervention can improve the above indicators; TFH reduce NADPH oxidase protein Nox4 and ox-LDL protein expression level. **Conclusion** TFH has protective effect of vascular in atherosclerosis rats, Its mechanism could be by lowering Nox4 and ox-LDL protein levels, and reduce ROS generation.

KEY WORDS : TFH ; Atherosclerosis ; Nox4 ; ox-LDL ; ROS