

沙棘黄酮调控动脉粥样硬化大鼠自噬相关蛋白的表达

张启梅¹, 王颖超²

(1. 青海省湟中县第二人民医院, 青海湟中 811600; 2. 青海省人民医院, 青海西宁 810016)

摘要: **目的** 探讨沙棘黄酮(TFH)对动脉粥样硬化大鼠血管自噬相关基因 beclin-1 及 LC3 表达的影响,以阐明其保护粥样硬化的分子机制。**方法** 健康清洁级雄性 SD 大鼠 60 只随机分为:正常对照组,模型对照组,沙棘黄酮低、中、高剂量组,白藜芦醇组;采用高脂饲料与维生素 D3 复制大鼠动脉粥样硬化模型,提取血清后采用比色法测定氧化应激指标变化,取主动脉 HE 染色观察病理形态学变化;ELISA 技术检测血管中 beclin-1 蛋白及 LC3 蛋白表达,观察沙棘黄酮和白藜芦醇对 beclin-1 及 LC3 表达的影响。**结果** 动脉粥样硬化时大鼠 SOD、GSH-Px、CAT 活性均明显下降,MDA 含量明显升高;沙棘黄酮和白藜芦醇干预能使大鼠 SOD、GSH-Px、CAT 升高,MDA 含量降低;粥样硬化时大鼠自噬相关基因 beclin-1 及 LC3 表达降低,沙棘黄酮和白藜芦醇干预能够上调 beclin-1 及 LC3 蛋白的表达。**结论** 沙棘黄酮可明显上调粥样硬化大鼠自噬基因 beclin-1 蛋白和 LC3 蛋白的含量,引起机体自噬抑制动脉粥样硬化的发生和发展,发挥抗粥样硬化作用。

关键词: 沙棘黄酮;动脉粥样硬化;自噬;beclin-1;LC3

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)04-0013-04

沙棘黄酮是中药材沙棘的主要有效成分,通过以往的相关研究表明^[1-4],沙棘黄酮在保护心血管系统、清除体内自由基等作用方面具有明显药理作用,被誉为心血管疾病的克星。从前人研究可以得出结论是自噬可以延缓机体的动脉粥样硬化进程,其机理是自噬发生时,细胞内的损伤成分可以被清除,自噬可以进一步使内皮细胞抵抗炎症分子刺激。氧化应激的发生及内质网应激等,从而能够抑制机体组织细胞凋亡和坏死的发生^[5-7,10-11]。既往研究证实白藜芦醇的保护粥样硬化的作用是通过诱导自噬的发生且这种作用与 p38 通路有着密切的联系^[11],故本研究以 AS 大鼠模型为研究对象,以白藜芦醇为阳性药物对照来探讨沙棘黄酮对 AS 大鼠主动脉自噬相关基因 beclin-1 及 LC3 表达水平的影响,以阐明沙棘黄酮抗动脉粥样硬化的原理,为沙棘的临床应用提供科学的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

SD 大鼠,雄性体质量控制在 180~200g,由兰州大学医学实验动物中心提供。沙棘黄酮由康普德生物公

司提供,总黄酮度 27.2%;白藜芦醇由上海基免实业公司提供,谷胱甘肽过氧化物酶、丙二醛、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶试剂盒由南京建成生物公司提供;beclin-1 及 LC3 的 Elisa 试剂盒等购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 构建动物模型

采用 SD 大鼠 60 只。随机分为 6 组:正常对照组(CON)、模型对照组(AS)、沙棘黄酮低剂量组(TFH-L)、沙棘黄酮中剂量组(TFH-M)、沙棘黄酮高剂量组(TFH-H)、白藜芦醇组(Res)。正常对照组生理盐水腹腔注射,其余 5 组以 40mg/kg 剂量一次性腹腔注射维生素 D3,喂食高脂饲料。造模同时,沙棘黄酮低、中、高剂量组每日分别以 TFH 125、250、500 mg/kg 灌胃,白藜芦醇组以 150mg/kg 灌胃,正常对照组和模型对照组则采用等体积盐水灌胃。

1.2.2 主动脉 HE 染色

处死大鼠后用 4%福尔马林液固定,乙醇脱水,石蜡包埋切片,HE 染色后观察内皮改变情况。

1.2.3 氧化指标测定

详细遵照试剂盒说明书方法,测定血浆中

收稿日期: 2014-05-16

作者简介: 张启梅(1970-),女,青海湟中人,主治医师,主要从事内科工作。E-mail:lczzqmlmy@126.com

SOD、GSH-Px 活性和 CAT、MDA 活性变化。

1.2.4 主动脉 beclin-1 及微管相关蛋白 LC3 表达测定

取主动脉,按照 elisa 试剂盒说明书方法测定蛋白相对表达量。

1.2.5 统计学处理

所得实验数据均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异具有显著性意义。

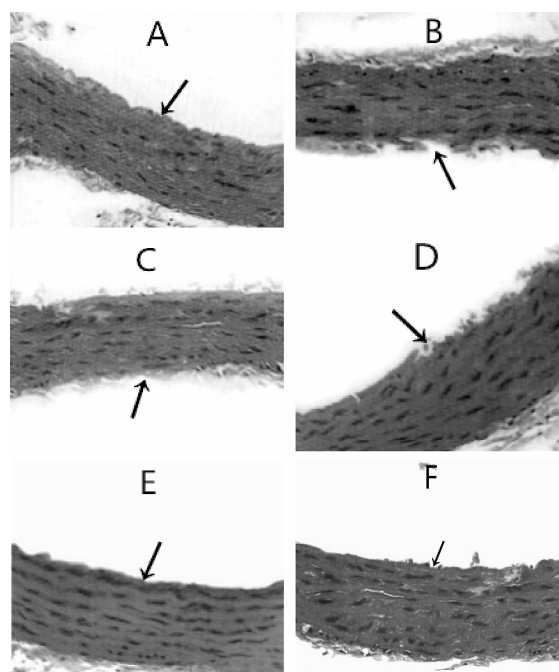
2 结果

2.1 大鼠动脉粥样硬化时血管内皮损伤改变

由 HE 染色结果可知:正常对照组血管内皮层无明显损坏,表面无炎性细胞浸润,无脂质沉积,无管腔狭窄;模型对照组内皮细胞脱落,内弹力膜消失或损坏,血管管腔增厚,泡沫细胞形成,脂质沉积严重,血管结构已经欠完整;沙棘黄酮低剂量和沙棘黄酮中剂量组主动脉内皮无明显损伤,仅见血管腔轻微增厚,但炎性细胞浸润程度较轻,脂质沉积不明显,泡沫细胞罕见;沙棘黄酮高剂量组和白藜芦醇组血管内膜有所轻微增厚,内皮细胞水肿不明显,仅见少量内皮层撕裂,脂质沉积较少,没有发现泡沫细胞(见图 1)。

2.2 氧化应激指标含量的变化

模型对照组比正常对照组 SOD、GSH-Px、CAT 活性均明显下降($P<0.01$),MDA 含量明显升高($P<0.01$);与模型对照组比较,沙棘黄酮低剂量组 MDA 含量降低($P<0.05$),中剂量组 SOD、GSH-Px 活性上升($P<0.05$),MDA 含量降低($P<0.05$),高剂量组和白藜芦醇组 SOD、GSH-Px、CAT 活性均上升($P<0.01$),MDA 含量降低($P<0.01$);可见沙棘黄酮和白藜芦醇均能降低动脉粥样硬化大鼠血清中 MDA 的水平,升高大鼠血清中 SOD、GSH-Px、CAT 的含量,



A 为正常对照组,B 为模型对照组,C 为沙棘黄酮低剂量组,D 为沙棘黄酮中剂量组,E 为沙棘黄酮高剂量组,F 为白藜芦醇组;图片箭头所指为血管内膜

图 1 AS 大鼠主动脉病理切片[HE 染色、(400)]

这是沙棘黄酮产生抗氧化作用从而预防粥样硬化发生的机制。(见表 1)

2.3 自噬相关基因 beclin-1 及微管相关蛋白 LC3 蛋白表达变化

正常对照组 beclin-1 与 LC3 蛋白的表达极低,而模型对照组 beclin-1 与 LC3 蛋白表达有所升高,但并不明显($P<0.01$);沙棘黄酮组和白藜芦醇组自噬程度均高于正常对照组,并较模型组表达也明显升高($P<0.01$)。提示沙棘黄酮可以有效的上调 AS 大鼠 beclin-1 与 LC3 蛋白的表达,从而产生抗动脉粥样硬化作用(见图 2)。

表 1 沙棘黄酮对动脉粥样硬化大鼠 SOD、GSH-Px、CAT 和 MDA 等因子表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Group	n	SOD/U·mL ⁻¹	GSH-Px/U·mL ⁻¹	CAT/U·g ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹
Control	10	91.12 $\pm$ 11.39	80.58 $\pm$ 20.39	211.95 $\pm$ 32.86	5.72 $\pm$ 1.84
Model	10	52.51 $\pm$ 10.56*	36.52 $\pm$ 10.69*	117.28 $\pm$ 25.64*	12.18 $\pm$ 3.86*
Res	10	76.12 $\pm$ 9.45**	56.16 $\pm$ 11.31**	158.98 $\pm$ 26.75**	7.89 $\pm$ 2.04**
TFH-L	10	58.56 $\pm$ 9.84**	45.59 $\pm$ 10.58**	130.64 $\pm$ 28.64**	10.21 $\pm$ 2.06**
TFH-M	10	71.51 $\pm$ 10.97**	48.78 $\pm$ 11.35**	136.52 $\pm$ 27.92**	9.49 $\pm$ 1.94**
TFH-H	10	76.75 $\pm$ 11.76**	59.76 $\pm$ 14.21**	164.27 $\pm$ 30.23**	8.45 $\pm$ 1.54**

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

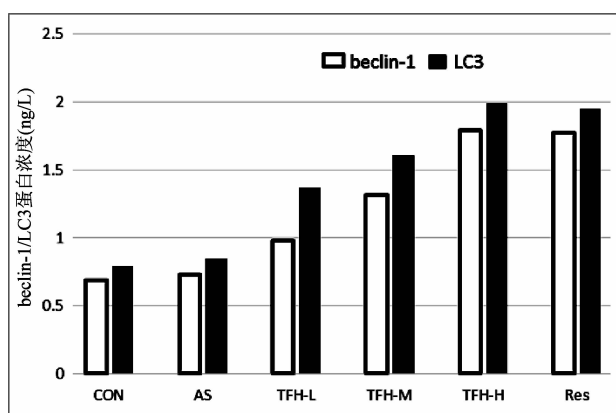


图2 ELISA检测AS大鼠主动脉 beclin-1 与 LC3 蛋白的表达

3 讨论

实验大鼠2月后主动脉切片检测大鼠显示粥样硬化动物模型成功,血清中氧化应激指标模型对照组比正常对照组SOD、GSH-Px、CAT活性均明显下降,MDA含量明显升高,提示AS状态下的大鼠可能存在抗氧化防御机制的下降,进一步阐释了该动物模型的复制是成功的^[4]。沙棘黄酮既往的药理学实验证实其有很多样化学活性和药理机制,其作为一种具有多种药理作用的化合物,主要在保护心血管系统、延缓衰老、增强免疫、清除体内自由基和抗肿瘤等机制方面有关键药理作用^[1-4]。程嘉艺^[1]等研究证实沙棘总黄酮对抗H₂O₂所致的内皮细胞凋亡时降低了Caspase-3表达,是其内皮细胞保护作用机制之一。苑博^[9]等研究发现沙棘总黄酮可提高细胞增殖活性,增加S期细胞比率,从而对受损血管内皮细胞有保护作用。

自噬按字面理解意思为“自食”,是一种在细胞溶酶体中发生的消化蛋白质和细胞器活性的一个相对保守的机制,基础水平的自噬可以作为一种机体自动修复,维持自身生命的过程,但不加控制的自噬过程会加速机体组织细胞凋亡,产生不利机体存活的作用^[7,11]。既往研究发现,自噬与心血管疾病有着不可分割的关联。在心肌急性缺血再灌注、心力衰竭、扩张性心肌病、瓣膜性心脏病、高血压心脏病以及衰老的心肌中均发现了自噬的存在,研究表明,自噬在AS形成和发展中发挥关键的调节因素^[11]。在AS早期,巨噬细胞的自噬减少了泡沫细胞的积聚,抑制了斑块的形成和发展。在AS的中晚期,巨噬细胞的自噬减少斑块中的炎症反应,起到

稳定斑块的作用,而平滑肌细胞的自噬过程会加速纤维帽向变薄的方向发展,使斑块向不稳定方向改变^[5-6,10-12]。Martinet等^[7]认为低密度脂蛋白LDL、炎症以及代谢性应激可以促进粥样硬化斑块中细胞的自噬。斑块细胞的自我吞噬是斑块细胞通过降解损伤的细胞器从而防止外部氧化应激损害^[12]。Verheye等^[5-7]利用扫描电镜、免疫组织化学染色等方法发现AS斑块中巨噬细胞和平滑肌细胞均存在自噬现象。

Beclin-1基因是第一个经过研究公认的在哺乳动物身上发现的自噬基因,也是第一个公认的在溶酶体自噬降解途径中起肿瘤抑制作用的基因,对自噬体的形成至关重要^[7-8];微管相关蛋白LC3是哺乳动物细胞中酵母自噬相关基因8(ATG8)的同源物,LC3的表达含量与自噬泡含量数的多少成正比的相关,因此,LC3被认为是自噬体的标志分子,可作为检测机体自噬程度的基因检测物,近来的研究发现,ox-LDL能够诱导血管内皮细胞自噬,导致微管相关蛋白LC3和Beclin-1表达增加,在过量胆固醇存在的情况下,LC3 II蛋白含量明显升高,大量自噬泡聚集,自噬的抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)明显抑制由胆固醇负荷所诱导的自噬^[13-14]。既往研究证实白藜芦醇的保护粥样硬化的作用是通过诱导自噬的发生,且这种作用与p38通路有着密切的联系^[11],本研究以白藜芦醇为阳性药物对照,本实验结果表明沙棘黄酮能够产生与白藜芦醇一样的药理作用,即上调自噬相关基因 beclin-1 蛋白和 LC3 蛋白表达量,使机体产生抗氧化作用,进一步减少内皮细胞里粥样斑块或细胞的浸润,阻止氧化应激反应的进展从而预防大鼠动脉粥样硬化,因而深入了解自噬在动脉粥样硬化中的作用、调控机制以及调控自噬相关信号途径的关键分子,将有可能为动脉粥样硬化的防治提供新的治疗策略及治疗靶点,但有关自噬时沙棘黄酮如何抑制机体氧化的详细机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 程嘉艺,滕丹. 沙棘总黄酮对血管内皮细胞保护作用及机制研究[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(3):355-356.
- [2] 刘风云. 沙棘总黄酮的药理研究[J]. 中药材,2004,27(2):145-146.
- [3] 廖晓阳,章茂顺,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]. 华西医学, 2005, 20(2): 247-248.
- [4] 古丽米热·阿不都热依木. 沙棘总黄酮对阿霉素所致大鼠心肌梗塞和脂质过氧化保护作用的研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(4): 383-385.
- [5] Razani B, Feng C, Coleman T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression [J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 534-544.
- [6] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes [J]. Aging, 2012, 4(3): 166-175.
- [7] 翟纯刚, 季晓平. 自体吞噬在动脉粥样硬化斑块中的作用 [J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(3): 142-144.
- [8] 刘友斌, 杨树森, 樊瑛, 等. 自噬与心肌缺血/再灌注损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(12): 2478-2482.
- [9] 苑博, 张放, 程嘉艺, 等. 沙棘总黄酮对人脐静脉血管内皮损伤细胞增殖及细胞周期的影响 [J]. 山东医药, 2011, 51(15): 34-36.
- [10] Schrijvers DM, De Meyer GRY, Martinet W. Autophagy in atherosclerosis: a potential drug target for plaque stabilization [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(12): 2787-2791.
- [11] Kurz T, Terman A, Brunk UT. Autophagy, Ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron [J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 462(2): 220-230.
- [12] Liao X, Sluimer JC, Wang Y, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis [J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 545-553.
- [13] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2491-2502.
- [14] Xu K, Yang Y, Yan M, et al. Autophagy plays a protective role in free cholesterol overload-induced death of smooth muscle cells [J]. Lipid Res, 2010, 51: 2581-2590.
- (编辑: 杨阳)

TFH Control the Autophagy Related Protein Expression in Atherosclerosis Rats

ZHANG Qi-mei¹, WANG Ying-chao²

(1. The Second People's Hospital of Huangzhong County of Qinghai Province, Huangzhong 811600, China;

2. The People's Hospital of Qinghai, Xining 810016, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the effects of total flavones of TFH on expression of beclin-1 and LC3 in atherosclerosis rats. And to explore the molecular mechanism of TFH protecting atherosclerosis. **Methods** Atherosclerosis rats model was established by feeding the animals with a high lipid diet. Take the rat serum for the determination of related parameters of oxidative stress changes. The aorta were taken for pathological sections. The expression of beclin-1 in aorta of Atherosclerosis rats which were affected by TFH were analyzed by Elisa. **Results** Atherosclerosis rats SOD, Gsh-px and CAT activity were significantly decreased, MDA content increased significantly; TFH and Resveratrol intervention can make SOD, GSH-px and CAT in rats, reduce MDA content; Both Resveratrol and TFH could increase markedly the expression of beclin-1 and LC3 protein in atherosclerosis rats. **Conclusion** TFH can up-regulate significantly the expression of beclin-1 and LC3 in atherosclerosis rats.

KEY WORDS: TFH; Atherosclerosis; autophagy; beclin-1; LC3

《云南中医学院学报》欢迎网上投稿

网址: <http://www.ynzyxyxb.cn>