

芝麻素对代谢综合征大鼠主动脉内皮功能损伤的保护作用及机制

杨解人^{*}, 周 勇, 黄 凯, 吴向起
(皖南医学院药理教研室, 安徽 芜湖 241002)

[摘要] 目的: 观察芝麻素对代谢综合征大鼠主动脉内皮功能损伤的保护作用, 探讨其可能机制。方法: 高脂高糖诱导大鼠代谢综合征 24 周, 于第 9 周开始连续口服芝麻素(120, 60, 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 16 周。测血压、血脂、血糖、血清过氧化氢和硝酸盐/亚硝酸盐含量; 采用离体灌流系统, 观察大鼠主动脉环对累积浓度去氧肾上腺素的收缩反应和对乙酰胆碱及硝普钠诱发的舒张反应; 免疫组织化学法观察主动脉内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达和硝基酪氨酸(NT)含量。结果: 芝麻素明显降低代谢综合征大鼠血压、血脂、血糖; 提高主动脉环对乙酰胆碱诱导的舒张反应; 上调主动脉 eNOS 表达, 降低 NT 含量; 升高血清硝酸盐/亚硝酸盐和减少过氧化氢含量。结论: 芝麻素具有改善代谢综合征大鼠的内皮功能障碍, 其机制可能与其降低氧自由基生成, 上调主动脉 eNOS 表达, 增加和(或)恢复 NO 的生物活性有关。

[关键词] 芝麻素; 代谢综合征; 主动脉环; 内皮型一氧化氮合酶; 硝基酪氨酸

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)03-0048-05

Effects of Sesamin on Aortic Function in Metabolic Syndrome Rats

YANG Jie-ren^{*}, ZHOU Yong, HUANG Kai, WU Xiang-qi
(Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of sesamin on aortic function in metabolic syndrome rats, and to explore its possible mechanism. **Methods:** A high-fat and refined-carbohydrate diet induced metabolic syndrome. Sesamin (120, 60, 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹) was given by intragastric administration to metabolic syndrome rats at the 9th week, then lasted for 16 weeks. After 24 weeks, blood pressure, blood fat, blood glucose, hydrogen peroxide and nitrate/nitrite in serum were determined. In addition, the vascular function test was performed. The thoracic aortic ring of rats was mounted on a bath system. The effect of sesamin on the contraction elicited by phenylephrine and the relaxation induced by acetylcholine and sodium nitroprusside were measured. To explore the mechanism, expression of endothelium nitric oxide synthase(eNOS) and nitrotyrosine in aorta were observed by immunohistochemical method. **Results:** Sesamin obviously decreased the level of blood pressure, blood fat, blood glucose, serum hydrogen peroxide and increased concentration of nitrate/nitrite in rats; it also enhance the relaxation induced by acetylcholine and raised expression of eNOS and depressed expression of nitrotyrosine in aorta. **Conclusion:** Sesamin may improve the endothelium-dependent relaxation dysfunction, possibly through decreasing the level of oxyradicals, increasing expression of eNOS in aorta, and raising concentration of NO or recovering its bioactivity.

[Key words] sesamin; metabolic syndrome; thoracic aortic ring; endothelium nitric oxide synthase; nitrotyrosine

[收稿日期] 2008-04-14

[基金项目] 安徽省教育厅科研基金重点项目(2006KJ099A)

[通讯作者] * 杨解人, Tel: (0553) 3932464; E-mail: wnmcyali@sina.com

代谢综合征(metabolic syndrome, MS)是伴有胰岛素抵抗、中心性肥胖、高血压、高脂血症、胰岛素水平升高或糖尿病等的症候群^[1],由于存在多种心血管危险因素,血管功能和结构损害显著,并在靶器官病变中起到重要的作用^[2,3]。故预防和治疗 MS 及其心血管并发症具有十分重要的意义。芝麻素(sesamin, Ses)是芝麻的一种重要成分,具有降低血脂、抗高血压、改善心肌和血管的肥厚、减少中风发生率和明显的抗氧化等作用^[4]。我们的前期研究证明,芝麻素可以降低肾性高血压和改善心血管重构,并可以改善机体产生的氧化应激^[5,6]。但未见芝麻素改善 MS 血管内皮功能的报道。本研究拟采用高脂、高糖饮食诱导大鼠 MS 模型,观察芝麻素对血管功能的改善作用,并探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物与饲料 雄性 Wistar 大鼠,体重(140~160)g,许可证号:SCXK(苏)2002-0018,大鼠分笼饲养,每笼 1 只,保持室温 22℃,相对湿度 60%~65%,自由饮水,定时进食。普通饲料(3%脂肪,2%蔗糖,20%蛋白质,70%淀粉,5%粗纤维),高脂高糖饲料(25%脂肪,20%蔗糖,20%蛋白质,30%淀粉,5%粗纤维),动物与饲料购自南京青龙山实验动物中心。

1.2 药物和试剂 芝麻素粉剂(分子式 C₂₀H₁₅O₆,纯度>95%),批号:060312(芜湖天一绿宝科技有限公司);辛伐他汀(simvastatin, Sim),批号:0608202(哈药集团)。含 Ses 饲料(Ses 72 g、36 g、18 g 分别与普通饲料 4.0 kg 混匀),含 Sim 饲料(Sim 750 mg 与普通饲料 1.0 kg 充分混匀),由南京青龙山实验动物中心加工成等重量药丸(2.0 g)。甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、血糖(GLU)、H₂O₂、NO⁻³/NO⁻²试剂盒,均购于南京建成生物工程研究所;苯肾上腺素(phenylphrine, Phe)、乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)和硝普钠(sodium nitroferricyanide, SNP),均购于美国 SIGMA 公司;内皮型一氧化氮合酶(eNOS)即用型免疫组化染色试剂盒、生物素化山羊抗兔 IgG、链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)和抗原修复液,均购于武汉博士德生物工程公司,硝基酪氨酸(nitrotyrosine, NT)免疫组化试剂盒,购于德国 Santa Cruz 公司。

1.3 模型建立、分组及给药 大鼠 40 只,适应性普通饲料喂养 7 d 后,给予高脂、高糖饲料 24 周。于第

9 周,大鼠随机分为模型组、模型组+ Ses 高、中、低(120, 60, 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹)剂量组和 Sim(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)阳性对照组,每组 8 只。另设正常(等量普通饲料)对照组 8 只。高脂、高糖饮食 8 周后,大鼠每周空腹称体重 1 次,根据体重变化于每日上午 9 时给含药饲料,待吃完含药饲料 1 h 后给予高脂高糖饲料,正常对照组及模型组同时给予等量普通饲料,连续给药 16 周。

1.4 测血压及标本采集 于末次给药后禁食 12 h 然后称大鼠体重,3%戊巴比妥钠(40mg·kg⁻¹)ip 麻醉,分离右颈总动脉,进行动脉插管,连接 MPA-R 多通道生物信号分析系统,测量颈动脉收缩压(SBP/mmHg)。腹主动脉采血,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取血清,用 XD-811 型自动生化分析仪(上海迅达医疗器械厂),葡萄糖氧化酶法测 GLU 含量;比色法测 TG、LDL-C 和 H₂O₂ 含量;化学法检测 NO⁻³/NO⁻² 含量。另取腹主动脉 5 mm,4% 甲醛固定,常规石蜡包埋制片。

1.5 制备主动脉环、测血管张力 取(3~4)mm 胸主动脉环垂直悬挂于盛有 15 mL 充以 95% O 和 5% CO₂ 混合气体的 K-H 液(NaCl 118.3, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, 葡萄糖 11.1 mmol·L⁻¹)水浴槽中(37℃),一端固定于浴槽底部,另一端连接张力换能器,通过 Medlab 6.0 生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司)连续记录血管的张力变化。调节静息张力 1.5 g,平衡 60 min,每隔 15 min 换 KH 液 1 次。用 KCl (60 mmol·L⁻¹)检测血管环的反应性,待收缩反应曲线至平台期后冲洗,确认其反应性稳定后,依次做:①用 Phe(1×10⁻⁶ mol·L⁻¹)收缩血管,待稳定后观察累积浓度的 Ach(1×10⁻⁸~1×10⁻⁴ mol·L⁻¹)的作用;②观察累积浓度的 SNP(1×10⁻⁹~1×10⁻⁶ mol·L⁻¹)诱导血管舒张;③观察累积浓度的 Phe(1×10⁻⁶ mol·L⁻¹)的收缩反应,每一步反应之间用 K-H 液反复冲洗 3~5 次,至张力回到基线水平,开始下一步实验。主动脉舒张反应以血管舒张张力占 Phe(1×10⁻⁶ mol·L⁻¹)引起的收缩张力的百分比(%)表示。

1.6 主动脉 eNOS 和 NT 表达(SABC 法) 切片常规脱蜡至水,双蒸水冲洗,0.01 mol·L⁻¹枸橼酸盐缓冲液处理后,加正常山羊血清封闭液,37℃ 20 min。分别加适度稀释的 I 抗,4℃ 过夜后,加生物素化山羊抗兔的 II 抗,37℃ 20 min,加 SABC,37℃ 20 min,

DAB 显色。每个样本在倒置显微镜 400 倍下(日本 OLYMPUS 公司)寻找 10 个视野(血管细胞胞浆内出现黄至棕黄色颗粒或匀质样结构为阳性),运用 GSM 显微计算机图像分析管理系统(深圳华锐科技有限公司)对动脉 eNOS 和 NT 染色进行灰度值分析。

1.7 统计学方法 采用 DAS 2.0 软件,数值用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,量效分析采用成组直线回归,显著性水平 $P = 0.05$ 。

2 结果

2.1 对血压、血脂和血糖的影响 模型组 SBP、TG、LDL-C 和 GLU 显高于正常组($P < 0.01$);与模型组相比,Ses 各剂量组随着剂量增加,SBP、TG、LDL-C 和 GLU 均有不同程度的下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),提示 Ses 可以抑制血压升高,有调脂和降糖作用,结果见表 1。

表 1 芝麻素对代谢综合征大鼠血压、血脂和血糖的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	收缩压 (mmHg)	甘油三酯 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	低密度脂蛋白 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	血糖 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
正常对照组	—	105 ± 2.7 ²⁾	0.59 ± 0.16 ²⁾	0.65 ± 0.04 ²⁾	4.11 ± 0.26 ²⁾
模型组	—	139 ± 5.6	1.51 ± 0.36	1.66 ± 0.31	6.44 ± 0.34
芝麻素组	120	108 ± 5.1 ²⁾	0.66 ± 0.11 ¹⁾	0.74 ± 0.09 ²⁾	4.96 ± 0.21 ²⁾
	60	111 ± 5.4 ²⁾	0.89 ± 0.14 ¹⁾	1.12 ± 0.14 ¹⁾	5.17 ± 0.35 ²⁾
	30	130 ± 4.8 ²⁾	1.29 ± 0.32	1.52 ± 0.23	6.07 ± 0.21
辛伐他汀组	5	109 ± 3.1 ²⁾	0.64 ± 0.09 ¹⁾	0.72 ± 0.09 ²⁾	4.26 ± 0.22 ²⁾

注:与模型组相比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (下同)。

2.2 对血清 H_2O_2 和 $\text{NO}^{-3}/\text{NO}^{-2}$ 的影响 与正常组相比,模型组血清中的 H_2O_2 含量明显增高, $\text{NO}^{-3}/\text{NO}^{-2}$ 含量明显下降($P < 0.01$);与模型组相比,Ses 各剂量组和 Sim 组血清 H_2O_2 含量明显减少,Ses 高、中剂量组和 Sim 组 $\text{NO}^{-3}/\text{NO}^{-2}$ 含量明显升高($P < 0.01$),说明芝麻素具有减少氧自由基生成和提高 NO 生物活性的作用,结果见表 2。

表 2 芝麻素对大鼠血清 H_2O_2 和 $\text{NO}^{-3}/\text{NO}^{-2}$ 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	H_2O_2 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\text{NO}^{-3}/\text{NO}^{-2}$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
正常对照组	—	105.1 ± 15.9 ²⁾	14.96 ± 1.71 ²⁾
模型组	—	556.3 ± 62.2	5.43 ± 1.39
芝麻素组	120	148.5 ± 20.8 ²⁾	12.57 ± 1.51 ²⁾
	60	235.7 ± 46.9 ²⁾	9.60 ± 0.57 ²⁾
	30	405.8 ± 98.9 ¹⁾	6.51 ± 1.69
辛伐他汀组	5	144.5 ± 35.7 ²⁾	13.01 ± 1.70 ²⁾

2.3 对 Phe 引起主动脉环收缩反应的影响 各组大鼠主动脉环对累积浓度的 Phe 诱发的收缩反应无统计学差异,说明造模大鼠对缩血管物质的敏感性正常,不是导致血压升高的主要原因(见图 1)。

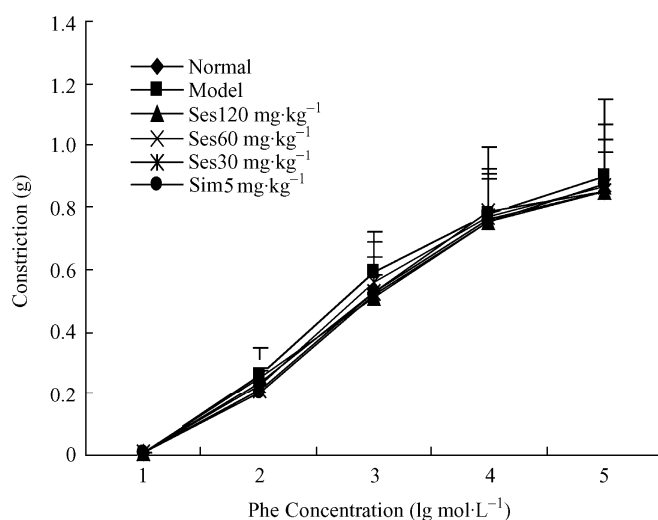


图 1 各组大鼠离体主动脉环对 Phe 的收缩反应

2.4 对 Ach 引起主动脉环舒张反应的影响 与正常组相比,模型组主动脉环对 Ach 诱发的最大舒张反应明显降低($P < 0.01$),提示模型组出现了内皮依赖性的舒张功能障碍。与模型组相比,Ses 高、中剂量组最大舒张反应显著增加($P < 0.01$),说明芝麻素可以改善主动脉内皮舒张功能障碍(图 2)。

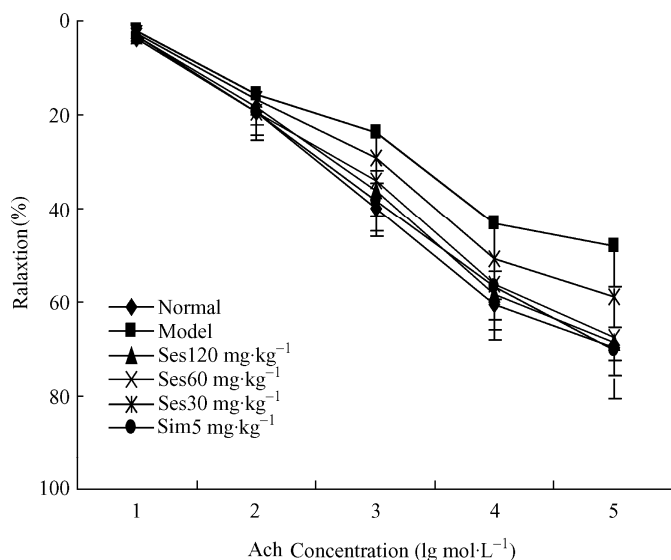


图 2 各组大鼠离体主动脉环对 Ach 的舒张反应

2.5 对 SNP 引起主动脉环舒张反应的影响 各组大鼠主动脉环对累积浓度的 SNP 诱发的血管舒张反应无统计学差异,提示造模大鼠血管平滑肌对 NO 的利用没有发生障碍(图 3)。

2.6 对主动脉 eNOS 和 NT 表达的影响 与正常组

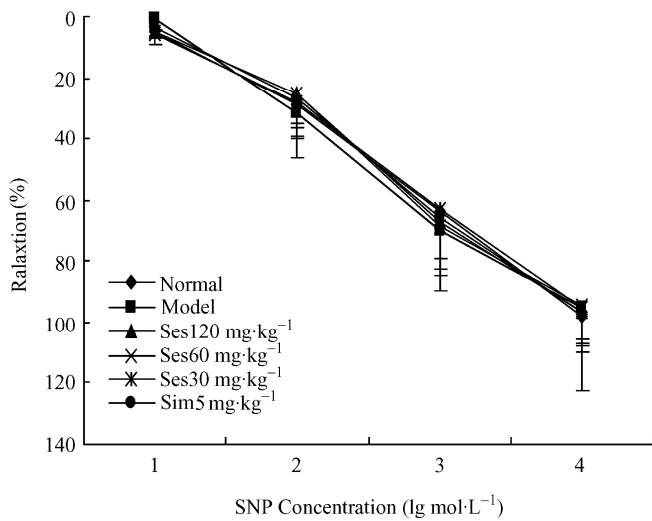


图 3 各组大鼠离体主动脉环对 SNP 的舒张反应

相比, 模型组大鼠血管 eNOS 表达减少 NT 增多 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 芝麻素组血管 eNOS 和 NT 表达分别呈不同程度升高和降低, 结果见表 3。

表 3 芝麻素对大鼠主动脉 eNOS 和 NT 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹)	eNOS (GV)	NT (GV)
正常对照组	—	97.6 ± 7.83 ²⁾	144.8 ± 15.09 ²⁾
模型组	—	151.8 ± 12.19	96.6 ± 8.93
芝麻素组	120	106.0 ± 14.16 ²⁾	129.2 ± 9.73 ²⁾
	60	121.6 ± 11.37 ²⁾	118.4 ± 14.15 ¹⁾
	30	144.2 ± 10.83	103.2 ± 9.47
辛伐他汀组	5	100.4 ± 12.05 ²⁾	133.8 ± 15.58 ²⁾

3 讨论

长期高脂高糖饮食诱导的 MS 大鼠模型与人类 MS 的发生有着极为相似的病理特征与发展过程。由于高脂高糖的大量摄入, 而导致血管内皮功能障碍以及血压升高^[6]。Shinozake 等人^[7]证明单纯高糖饮食可以使大鼠体内 ROS 产生增多, 并通过抑制血管 eNOS 活性而引起血管的舒张功能障碍。Robter 等人^[8]证实长期高脂高糖饮食更易导致血管内皮功能障碍, 并认为是造成心血管疾病发生的重要机制, 因此改善血管功能可能是成为防治 MS 所导致的心血管病变的新途径。本研究结果显示, 模型组大鼠 24 周后血脂、血糖和血压增高、具有明显的 MS 改变。经芝麻素治疗 16 周后, 上述现象得到明显纠正, 说明芝麻素具有改善 MS 的作用。

离体主动脉环实验显示, HFS 对 Phe 产生的收缩反应和对 NO 的供体 SNP 产生舒张反应无明显改变, 但对 ACh 的舒张反应明显减弱, 血管 eNOS 表达和 NO 的代谢产物 NO⁻³/NO⁻² 减少, 说明模型大鼠

出现了血管内皮依赖性舒张障碍, 导致血压升高; 当使用芝麻素治疗后, 主动脉对 ACh 的舒张反应得到不同程度恢复, 血管 eNOS 表达和血清 NO⁻³/NO⁻² 显著增加, 提示芝麻素上调 eNOS 表达, 增加并恢复 NO 的生物活性可能参与了芝麻素的舒血管作用。

血管内皮功能障碍是动脉粥样化和慢性高血压产生的一个共同特征。研究证明 ROS 产生增多是血管功能障碍的一个重要原因, ROS 增多可以促进 NO 的失活, 导致 NO 的生物活性降低和使血管紧张性增加。过量产生的 ROS 可消耗 NO 生成氧化能力更强的过氧基阴离子 (ONOO⁻)^[9], 与酪氨酸结合成稳定的标志物——硝基酪氨酸 (NT)^[10]。在长期高糖高脂饮食诱导的 MS 大鼠模型中, 存在着产生氧化应激的多种因素, 生成过多的 ROS^[11]。我们在实验中发现模型组大鼠血清中的 H₂O₂ 含量和血管中的 NT 表达增加, 说明机体中存在着明显的氧化应激和 NO 的失活; 芝麻素干预后, 血清 H₂O₂ 含量和血管中的 NT 表达明显减少, 提示芝麻素改善血管内皮功能的作用与芝麻素清除 ROS 等氧自由基, 发挥抗氧化作用有关。

[参考文献]

- [1] Zhang GW, Zhao P, Yang SJ. Recent progress in study of metabolic syndrome [J]. Adv Cardiovasc Dis, 2007, 28(4): 587-590.
- [2] Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle aged men [J]. JAMA, 2002, 288(21): 2709-2716.
- [3] Chinali M, Devereux RB, Howard BV, et al. Comparison of cardiac structure and function in American Indians with and without the metabolic syndrome (the Strong Heart Study) [J]. Am J Cardiol, 2004, 93(1): 40-44.
- [4] Matsumura Y, Kito S, Tanida Y, et al. Antihypertensive effect of sesamin III Protection against development and maintenance of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. Bid. Pharm. Bull, 1998, 21(5): 469-473.
- [5] Kong X, Yang JR. Effects of sesamin on contraction of aortic ring, NO and ET in renal hypertension rats [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2006, 12(4): 47-49.
- [6] Li XW, Yang JR. Effects of sesamin on antihypertension with renal hypertension rats [J]. China Medicine Technology, 2006, 13(5): 330-332.

- [7] Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, *et al.* Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/ O^{2-} imbalance in insulin-resistant rat aorta [J]. *Diabetes*, 1999, 48(12) : 2437-2445.
- [8] Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, *et al.* Oxidative stress and dysregulation of NAD (P) H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome [J]. *Metabolism*, 2006, 55(7) : 928-934.
- [9] Bian K, Murad F. Nitric oxide (NO)-biogenesis, regulation, and relevance to human diseases [J]. *Front Biosci*, 2003, 8: 264-278.
- [10] Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, *et al.* Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils [J]. *Nature*, 1998, 391: 393-397.
- [11] Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD (P) H oxidase: role in cardiovascular biology and disease [J]. *Circ Res*, 2000, 86(5) : 494-501.