

芝麻素对肾性高血压伴高血脂大鼠心肌肥厚的影响

孔 祥, 杨解人*, 郭莉群, 周 勇
(皖南医学院药理教研室, 安徽 芜湖 241001)

[摘要] 目的: 探讨芝麻素对肾性高血压伴高血脂大鼠(RHHR)心肌肥厚的影响。方法: RHHR 灌服不同剂量芝麻素(100, 33, 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 8 周后处死动物, 计算左室重量指数(LVWI); 测定心肌羟脯氨酸(HYD)和硝酸盐/亚硝酸盐(NO₃⁻/NO₂⁻)含量; 免疫组化法观察心肌 C-fos 蛋白表达; 透射电镜观察心肌超微结构。结果: 100 mg·kg⁻¹芝麻素明显降低心肌 LVWI, HYD 含量和 C-fos 蛋白表达, 升高 NO₃⁻/NO₂⁻ 浓度, 改善肌丝排列紊乱, 胶原纤维增生等病理变化。结论: 芝麻素逆转 RHHR 心肌肥厚的机制可能与恢复 NO 水平, 降低 C-fos 蛋白表达有关。

[关键词] 芝麻素; 肾性高血压; 高血脂; 一氧化氮; C-fos 蛋白; 超微结构

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)12-0044-04

Effects of Sesamin on Myocardial Hypertrophy in Renal Hypertensive-hyperlipidemia Rats

KONG Xiang, YANG Jie-ren*, GUO Li-qun, ZHOU Yong

(Department of Pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the improve effect of sesamin on myocardial hypertrophy in renal hypertensive-hyperlipidemia rats (RHHR). **Methods:** Renal hypertensive-hyperlipidemia rats were orally given with sesamin at dosage of 100, 33, 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ respectively. Eight weeks later, rats were sacrificed and the left ventricular weight index (LVWI) was calculated, the contents of hydroxyproline (HYD) and NO₃⁻/NO₂⁻ in myocardium were measured, the expression of C-fos protein was determined by immunohistochemical staining, and the ultramicrostructures of myocardium was observed through electronmicroscope. **Results:** 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ sesamin decreased LVWI, content of HYD and expression of C-fos protein, increased NO₃⁻/NO₂⁻ concentration, and ameliorated the pathologic changes such as disorder of myofilament and cardiac muscle fibroplasia. **Conclusion:** The effect of sesamin on attenuating the hypertrophy of myocardium is partially related with improving NO availability and decreasing expression of C-fos protein.

[Key words] sesamin; renal hypertension; hyperlipidemia; nitric oxide; C-fos protein; ultramicrostructure

芝麻素(sesamin, Ses)是从芝麻中提取的木酚素类化合物,具有降脂、降压等作用^[1~2]。Mastumara等^[3]发现 Ses 可以明显改善卒中型自发性高血压大

鼠心肌和血管肥厚,但 Ses 对复合型高血压伴高血脂大鼠心肌肥厚的影响尚未见相关报道。因此,本研究在成功制备肾性高血压伴高血脂大鼠模型的基础上,观察 Ses 对心肌肥厚的保护作用并初步探讨其可能机制,为 Ses 的开发和防治心血管疾病提供理论依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 80 只,体重(160 ±

[收稿日期] 2008-06-10

[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: wnmcyao@
sina.com

20) g, 许可证号: SCXK(苏) 2003-0018。大鼠分笼饲养, 每笼 1 只, 室温 22~24℃, 自由进食饮水。高脂饲料(基础饲料 82.3%, 胆固醇 2%, 胆盐 0.5%, 猪油 10%, 蛋黄粉 5%, 丙基硫氧嘧啶 0.2%)。上述大鼠和饲料购自南京青龙山实验动物中心。

1.2 实验药物 芝麻素(sesamin, Ses), 纯度 93.7%, 分子式: $C_{20}H_{15}O_6$; 分子量: 354.34, 芜湖天一绿宝科技有限公司惠赠; 卡托普利(captopril, Cap) 25 mg/片, 批号: 040502, 常州制药厂有限公司。

1.3 试剂 总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司, 批号: 20060429, 20060301); 一氧化氮(nitric oxide, NO)、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYD)和蛋白检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20060613、20060626、20060515); C-fos 蛋白免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程公司); 其他试剂均为分析纯。

1.4 仪器 ALC-nibp 无创尾动脉血压测定系统(上海奥尔科特生物科技有限公司); XD-811 型生化分析仪(上海迅达医疗器械厂); OLYMPUS 显微镜(日本 OLYMPUS 公司); GSM 显微图像分析系统(深圳华锐科技有限公司); H-600 透射电镜(日本日立公司)。

2 实验方法

2.1 模型建立 按 Goldblatt 法复制两肾一夹肾性高血压大鼠模型。大鼠用安定($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + 氯胺酮($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉, 游离左侧肾动脉, 用内径 0.25 mm 银夹夹住, 对侧肾脏不触及。假手术组除不上银夹, 其余程序同模型组。术后给予青霉素 4 万 $\text{U} \cdot \text{kg}^{-1}$, 肌注 3 d。1 周后除假手术组继续喂饲正常饲料, 其余大鼠喂饲高脂饲料, 持续到实验结束。术后第 5 周大鼠血压达 160 mmHg 以上视为造模成功。

2.2 分组、剂量设置及给药方法 取造模成功大鼠 46 只, 随机分为: Ses 高、中、低剂量组(100, 33, 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=9$), Cap 阳性对照组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=9$) 和肾性高血压伴高血脂模型组(RHHR, $n=10$)。另设假手术组(Sham, $n=9$)。药物充分研碎, 用 2% 羧甲基纤维素制成混悬液, 于每日上午 9 时 ig 给药。假手术组及模型组 ig 等容积羧甲基纤维素, 连续给药 8 周。

2.3 尾动脉血压测定 分别于给药前及给药后第 2, 4, 6, 8 周用 ALC-nibp 无创尾动脉血压测定系统,

测清醒状态下大鼠尾动脉收缩压(SBP/mmHg)。每只大鼠测量 3 次, 取其平均值。

2.4 左室重量指数(LVWI)测定 给药 8 周后, 称大鼠体重(BW), 用 3% 戊巴比妥钠($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 麻醉大鼠, 腹主动脉取血后迅速开胸, 取出心脏。用滤纸将心脏吸干后准确称左心室湿重(LVWW), 计算左室重量指数(LVWI=LVWW/BW)。

2.5 标本制备 将左室心肌加入冷生理盐水, 充分研磨制备成 10% 组织匀浆。血液及心肌匀浆以 $3600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4℃离心 10 min, 分离血清及匀浆上清液, -20℃冰箱保存待测; 取左室心肌组织 3 mm^3 , 用 10% 福尔马林固定, 常规脱水、浸蜡、包埋, 制成 6 μm 心肌切片; 另取左室心肌组织 3 mm^3 , 用 4% 多聚甲醛(内含 25% 戊二醛)固定。

2.6 生化指标测定 考马斯兰法测蛋白含量; 酶法测血清 TC, TG 含量($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 碱水解法检测心肌 HYD 含量($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$); 硝酸还原酶法测心肌 $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ 浓度($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) 反映 NO 水平, 均按试剂盒中说明书操作。

2.7 免疫组化法测心肌 C-fos 蛋白表达 采用 SABC 法, DAB 显色, 全部操作按试剂盒说明书完成。每批染色均设立阴性对照(用 PBS 代替一抗)。C-fos 蛋白阳性细胞主要呈棕黄色, 定位于胞核/胞浆。运用 GSM 图像分析系统对染色进行分析, 每个样本在 400 倍视野范围内寻找 10 个细胞分别测积分灰度值(gray value, GV), 取平均值作统计学分析(阳性黄色颗粒表达越多其灰度值越低)。

2.8 心肌超微结构观察 标本经 0.1 M 磷酸盐缓冲液漂洗后, 用 25% 戊二醛前固定, 再予以 1% 四氧化锇酸溶液后固定; 上行梯度酒精、丙酮系列脱水; 环氧树脂浸透、包埋; 超薄切片(厚度约为 500 nm), 载网, 经醋酸铀及柠檬酸铅双重染色后, 用 H-600 透射电镜观察心肌超微结构并摄片。

2.9 统计学处理 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析和 q 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 实验结果

3.1 芝麻素对血压和血脂的影响 由表 1 可见, 给药前除假手术组外, 其它各组 SBP 均在 165~175 mmHg 之间; 治疗 8 周后模型组 TC, TG 显著高于假手术组($P < 0.01$), 说明造模成功。与模型组相比, Ses 100, 33 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 SBP 明显降低($P < 0.01$); TC,

TG 明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$), 表明 Ses 具有降低 RHHR 血压和血脂的作用。

3.2 芝麻素对左室重量指数的影响 模型组 LVWI

表 1 芝麻素对血压、血脂和 LVWI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	SBP (5 wk, mmHg)	SBP (13 wk, mmHg)	TC ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TG ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	LVWI ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
假手术组	—	116.33 ± 4.44	118.11 ± 4.53	1.79 ± 0.27	0.73 ± 0.16	1.808 ± 0.153
模型组	—	169.11 ± 7.01 ²⁾	172.45 ± 7.58 ²⁾	6.78 ± 1.20 ²⁾	2.13 ± 0.49 ²⁾	2.336 ± 0.314 ²⁾
芝麻素组	100	172.44 ± 6.50 ²⁾	141.33 ± 7.53 ^{2,4)}	4.20 ± 0.29 ^{2,4)}	1.51 ± 0.28 ^{2,4)}	1.946 ± 0.224 ⁴⁾
	33	169.89 ± 6.59 ²⁾	153.44 ± 5.15 ^{2,4)}	5.45 ± 0.61 ^{2,3)}	1.68 ± 0.26 ^{2,3)}	2.124 ± 0.327 ¹⁾
	10	171.78 ± 6.50 ²⁾	168.43 ± 5.81 ²⁾	5.83 ± 0.81 ²⁾	1.89 ± 0.39 ²⁾	2.257 ± 0.251 ²⁾
卡托普利组	30	173.78 ± 5.04 ²⁾	132.33 ± 6.60 ^{2,4)}	6.49 ± 0.87 ²⁾	1.99 ± 0.42 ²⁾	1.913 ± 0.163 ⁴⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.3 芝麻素对心肌 HYD 和 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 含量的影响

由表 2 可见, 模型组 HYD 明显高于假手术组, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 浓度明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Ses 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 HYD 明显降低, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 浓度明显升高 ($P < 0.01$)。提示 Ses 降低 HYD 含量, 减轻心肌细胞外基质增生; 恢复 NO 水平。

表 2 芝麻素对心肌 HYD、 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 含量和 C-fos 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	HYD ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{prot}$)	$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{prot}$)	C-fos (Grav value)
假手术组	—	0.794 ± 0.112	2.742 ± 0.687	150.23 ± 14.59
模型组	—	1.110 ± 0.062 ²⁾	1.209 ± 0.331 ²⁾	92.44 ± 8.69 ²⁾
芝麻素组	100	0.885 ± 0.065 ⁴⁾	2.420 ± 0.497 ⁴⁾	125.96 ± 10.52 ^{2,4)}
	33	1.004 ± 0.122 ²⁾	1.974 ± 0.690 ³⁾	106.76 ± 15.47 ²⁾
	10	1.043 ± 0.098 ²⁾	1.587 ± 0.464 ²⁾	100.61 ± 11.42 ²⁾
卡托普利组	30	0.856 ± 0.058 ⁴⁾	2.509 ± 0.446 ⁴⁾	137.13 ± 11.27 ⁴⁾

显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Ses 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 LVWI 显著降低 ($P < 0.01$), 见表 1。

3.4 芝麻素对心肌 C-fos 蛋白表达的影响

免疫组化观察显示: 模型组心肌细胞阳性黄色颗粒密布于胞核/胞浆内, 染色较深, 阳性表达部分融合成片状; 假手术组阳性黄色颗粒较少, 染色较浅; Ses 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组可见阳性黄色颗粒表达减少, 染色较浅。由表 2 可见半定量分析结果: 模型组平均灰度值 (GV) 明显低于假手术组 ($P < 0.01$); Ses 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组平均灰度值高于模型组 ($P < 0.01$), 提示 Ses 可明显降低心肌 C-fos 蛋白表达。

3.5 芝麻素对心肌超微结构的影响

由图 1 可见, 假手术组心肌肌丝排列整齐, 染色质均匀, 胶原纤维无增生; 模型组肌丝溶解性坏死、断裂、排列紊乱, 胶原纤维明显增生, 染色质密度增加, 浓缩积聚; Ses 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和卡托普利组可见肌丝紊乱明显改善, 染色质均匀, 胶原纤维增生明显改善。

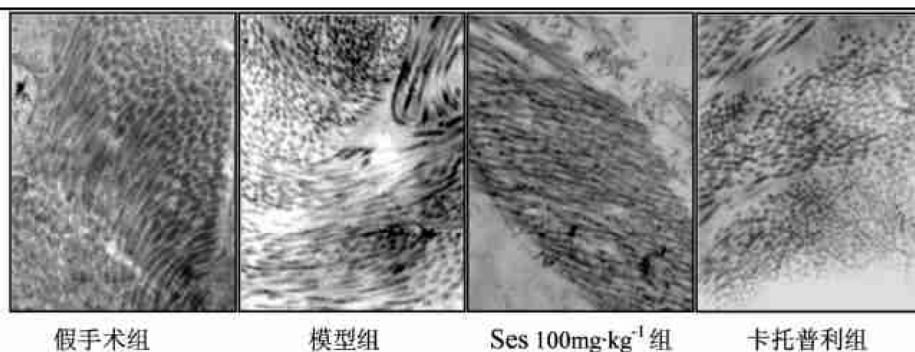


图 1 芝麻素对心肌超微结构的影响 (透射电镜 × 15 000)

4 讨论

高血压左室肥厚在形态上表现为室壁增厚及心肌重量增加, 在组织学上表现为心肌重构, 即心肌细胞肥大和心肌纤维化。文献报道, 采用两肾一夹复

制的肾性高血压大鼠模型存在明显的心肌肥厚和纤维化, 与 RASS 系统激活、血管紧张素 II (Ang II) 等分泌增加、NO 等分泌减少, 同时脂质过氧化损伤增加, 进而通过多种细胞信号转导途径来影响重构过

程有关。左室重构的形成和发展过程与心肌组织内原癌基因 C-fos 的高表达存在密切联系,许多学者将 C-fos 视为 Ang II 心肌肥厚的标志物^[4]。而在心肌肥厚的发生和发展过程中,除致病因素外,机体必然有一些保护因素。目前认为 NO 是重要的候选因子,可能在防止心肌肥厚过程中起重要作用^[5]。文献报道,在原代培养新生大鼠心肌细胞上,观察到内源性和外源性 NO 均抑制 Ang II 或 ET 分别诱导的心肌细胞原癌基因 C-fos 表达^[6]。

本研究中观察到模型组心肌细胞肌丝溶解性坏死、断裂、排列紊乱,染色质密度增加,浓缩积聚,胶原纤维明显增生;LVWI,反映心肌细胞的增生与肥厚,显著升高;心肌中羟脯氨酸(为胶原纤维所特有,反映纤维化程度)含量增高;NO₃⁻/NO₂⁻ 含量降低;C-fos 蛋白的表达增多,证实肾性高血压伴高血脂大鼠存在明显的心肌肥厚和纤维化。芝麻素治疗 8 周后,模型大鼠 LVWI 和心肌羟脯氨酸含量明显降低,超微结构显示心肌损害明显减轻,肌丝紊乱、胶原纤维增生明显改善,染色质均匀,表明芝麻素能防止和逆转肾性高血压伴高血脂大鼠的心肌肥厚与重构。其机制可能与芝麻素恢复 NO 水平,减少 C-fos 蛋白

表达有关,确切机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 丰田佳子. 芝麻木酚素“芝麻明”的生理活性[J]. 日本食品科学, 2001, 1: 41-45.
- [2] 孔祥, 杨解人. 芝麻素对肾性高血压大鼠主动脉收缩功能 NO 和 ET 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志. 2006. 12(4): 47-50.
- [3] 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]. Biol Pharm Bull, 1998, 21(5): 469-473.
- [4] Aoki H, Richmond M, Izumo S, et al. Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro[J]. Biochem J, 2000, 347: 275-284.
- [5] 詹昌德. 一氧化氮在防止心肌肥厚反应中的作用及其机制[J]. 生理科学进展, 2000, 4(31): 322-324.
- [6] Guh J, Hwang T, Ko F, et al. Antiproliferative effect in human prostatic smooth muscle cells by nitric oxide donor[J]. Mol Pharmacol, 1998, 53: 467-474.