

郑双,谭伟江,李想,等. 紫苏籽提取物在 ApoE^{-/-}小鼠中的抗动脉粥样硬化和心脏保护作用[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 683–691.

Zheng S, Tan WJ, Li X, et al. Anti-atherosclerotic and cardioprotective effects of perilla seed extract on ApoE^{-/-} mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 683–691.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.001

紫苏籽提取物在 ApoE^{-/-}小鼠中的抗动脉粥样硬化和心脏保护作用

郑双^{1,2}, 谭伟江², 李想², 马俊峰², 任学聪², 郑凌云¹, 王丽京¹, 杨丰华^{2*}, 黄韧^{1,2*}

(1. 广东药科大学, 生命科学与生物制药学院, 血管生物学研究所, 广州 510006;
2. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510633)

【摘要】 目的 应用 ApoE^{-/-}小鼠研究紫苏籽油性提取物(PSO)减少斑块形成和心脏保护的作用及分子机制。**方法** 3月龄 ApoE^{-/-}小鼠随机分为 ApoE^{-/-}组(无药物处理)、PSO 低剂量组、PSO 高剂量组和阿托伐他汀组, B6 小鼠为对照(WT 组), 给予常规饮食。连续治疗 8 周后, 进行生化检测、HE 染色病理学检测、超声检测、qPCR 检测、ATP 检测、Pro-Q Diamond 染色。**结果** 与 WT 组相比, ApoE^{-/-}小鼠出现心脏结构与功能异常。PSO 治疗后, 斑块面积减少, 心脏结构和功能改善; ANP、BNP、β-MHC 的 mRNA 表达下调, PPARα 和 PGC-1α 的 mRNA 表达上调, 胞内 ATP 含量增加, TnI 的磷酸化水平增加。**结论** PSO 抑制 ApoE^{-/-}小鼠动脉斑块形成、维持正常心脏结构和功能, 其可能通过调节 PPARα/PCG-1α/NRF-1 轴增加 ATP 和肌丝蛋白磷酸化、改善能量代谢、发挥心脏保护的作用。

【关键词】 紫苏籽油性提取物; ApoE^{-/-}小鼠; 动脉粥样硬化; 心脏保护

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0683-09

Anti-atherosclerotic and cardioprotective effects of perilla seed extract on ApoE^{-/-} mice

ZHENG Shuang^{1,2}, TAN Weijiang², LI Xiang², MA Junfeng², REN Xuecong², ZHENG Lingyun¹, WANG Lijing¹, YANG Fenghua^{2*}, HUANG Ren^{1,2*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, School of Life Sciences and Biopharmaceuticals, the Vascular Biology Institute, Guangzhou 510006, China. 2. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory for Laboratory Animals, Guangzhou 510633)

Corresponding author: HUANG Ren. E-mail: 1649405216@qq.com; YANG Fenghua. E-mail: fenghua.yang@gdlami.com

【Abstract】 Objective To study the role and molecular mechanism of perilla seed oil extract (PSO) in reducing arterial plaque formation and providing cardioprotection in ApoE^{-/-} mice. **Methods** Three-month-old ApoE^{-/-} mice were randomly divided into ApoE^{-/-} (no drug treatment), low-dose PSO, high-dose PSO and atorvastatin groups. B6 mice of the

【基金项目】 国家自然科学基金-面上项目 (31672376); 广东省科技专项 (2017B020231001, 2018B030317001, 2019A030317014, 2017A020215076); 广州市科技计划项目 (201804010206); 广东省实验动物重点实验室 (2017B030314171)。

Funded by National Natural Science Foundation of China - Surface Projects (31672376), Guangdong Provincial Science and Technology Project (2017B020231001, 2018B030317001, 2019A030317014, 2017A020215076), Guangzhou Science and Technology Project (201804010206), Guangdong Key Laboratory for Laboratory Animals (2017B030314171).

【作者简介】 郑双 (1995—), 女, 研究方向: 转基因动物疾病模型与新药筛选研究。Email: 1976308532@qq.com

【通信作者】 黄韧 (1959—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 实验动物学。Email: labking@sohu.com;

杨丰华 (1970—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 心血管生物学。Email: fenghua.yang@gdlami.com。

* 共同通信作者

same age were used as controls (WT group); they were fed a regular diet. After 8 weeks of treatment, biochemical tests, H&E staining, echocardiography, qPCR, ATP detection and Pro-Q Diamond staining were performed. **Results** Compared with the WT group, ApoE^{-/-} mice showed abnormal cardiac structure and function. After PSO treatment, the plaque area was reduced, and cardiac structure and function improved. mRNA expression of ANP, BNP and β -MHC was down-regulated, mRNA expression of PPAR α and PGC-1 α was up-regulated, and the intracellular content of ATP and the phosphorylation level of TnI were increased. **Conclusions** PSO inhibits arterial plaque formation and maintains normal cardiac structure and function in ApoE^{-/-} mice. It may regulate the PPAR α /PCG-1 α /NRF-1 axis to increase ATP and myofilament phosphorylation, improve energy metabolism, and exert cardioprotective action.

【Keywords】 perilla seed extract; ApoE^{-/-} mice; atherosclerosis; cardioprotection

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

高胆固醇血症是心血管疾病的主要原因,与全球死亡率增加密切相关。研究表明,高胆固醇血症可诱发左心室质量增加和心脏病理性重构^[1-3],其为不可逆转的疾病,最终转归为心脏收缩功能损伤和心衰^[4]。有研究表明其与能量生成障碍^[5]和肌丝收缩调控相关^[6]。

紫苏籽油性提取物(PSO)含有丰富的 α -亚麻酸(ALA)^[7]。ALA为n-3多不饱和脂肪酸的一种,流行病学研究显示从饮食中摄入的ALA具有显著的心脏保护作用^[8-9]。目前少有研究探索 PSO 对高胆固醇血症患者心脏功能的影响,探究 PSO 对心脏的保护和作用机制具有重要意义。

载脂蛋白 E 敲除(ApoE^{-/-})小鼠具有高胆固醇水平,可发展类似于人类的动脉粥样硬化病变^[10],另外有报道 ApoE^{-/-}小鼠心脏出现肥大性重构^[11-12]、纤维化^[13]和功能障碍^[14],是一个适宜用于药物治疗研究的模型。本研究旨在利用 ApoE^{-/-}小鼠探索 PSO 在抗动脉粥样硬化和保护心脏功能的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40 只 3 月龄 ApoE^{-/-}雄性小鼠(B6 背景),体重 20~25 g,广东药科大学合作实验室馈赠;10 只 3 月龄 B6 雄性小鼠体重 20~25 g,购于广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0002】,所有小鼠均饲养于广东省实验动物监测所 SPF 环境中【SYXK(粤)2016-0122】,温度:22℃~25℃,湿度:50%~70%,昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h。所有操作符合广东省实验动物监测所动物保护和使用委员会(IACUC)的要求。

1.1.2 试剂与仪器

阿托伐他汀(浙江新东港药业,中国),羧甲基纤维素钠(阿拉丁,美国),甲醇(阿拉丁,美国),ATP 试剂盒(南京建成,中国),Takara 试剂盒(Takara,日本),引物(生工,中国),Triton X-100(Sigma,美国),Pro-Q Diamond 磷酸化蛋白凝胶染色试剂(赛默飞,美国),气相色谱(安捷伦 GC-7820A,美国),全自动生化分析仪(日立 7080 型,日本),Vevo2100 高分辨率超声系统(Visual Sonics,加拿大)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

PSO 成人剂量为每人 4.5 g/d,小鼠剂量按体表面积折算,约为 1000 mg/(kg·d),经预实验确定使用剂量。将 ApoE^{-/-}小鼠随机分为 4 组,分别为 ApoE^{-/-}:0.5%羧甲基纤维素钠;ApoE^{-/-}+0.5 g/kg PSO;0.5 g/(kg·d) PSO;ApoE^{-/-}+1.0 g/kg PSO;1.0 g/(kg·d) PSO;ApoE^{-/-}+Ato;2.1 mg/(kg·d) 阿托伐他汀(Ato),PSO 口服给药 8 周。B6 小鼠作为对照(WT 组),接受正常饮食,给予与 ApoE^{-/-}相同剂量的溶媒。

1.2.2 PSO 的制备和组成

使用二氧化碳超临界流体萃取(SFE-CO₂)获得 PSO^[15]。萃取压力、温度和 CO₂ 流速分别为 20 MPa、40℃ 和 30 L/h。使用气相色谱分析 PSO 的脂肪酸组成^[16]。PSO 用甲醇酯化后提取脂肪酸甲酯,使用气相色谱-火焰离子化检测器(GC-FID)进行分析,确定 PSO 的碘值、皂化值、非皂化物质的量和酸值。

1.2.3 血清生化指标测定

治疗 8 周后动物禁食 12 h,眼眶静脉采血,经 3500 r/min、离心 20 min 取上清液,采用全自动生化分析仪及匹配试剂盒测量血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)和高密度脂

蛋白 (HDL-C)。

1. 2. 4 超声心动图和脉冲波多普勒测量

治疗 8 周后使用 Vevo2100 高分辨率超声系统和 MS-550D 探头以左室短轴切面探测,采集 B 型和 M 型超声图;取心脏长轴切面,采用脉冲波多普勒测定经主动脉血流压力。测量舒张末期左室后壁厚度 (LVPW;d)、收缩末期左室后壁厚度 (LVPW;s)、收缩末期室间隔厚度 (IVS;s)、舒张末期室间隔厚度 (LVS;d)、收缩末期左室内径 (LVID;s)、舒张末期左室内径 (LVID;d),计算射血分数 (EF) 和短轴缩短率 (FS)。

1. 2. 5 组织学分析

治疗结束后处死小鼠,取心脏和主动脉,用 4% 多聚甲醛固定,HE 染色后观察主动脉根部和心肌,使用 ImagJ 软件测量斑块面积,使用公式计算斑块

面积百分比:斑块面积% = 动脉粥样硬化病变面积/管壁面积。

1. 2. 6 ATP 含量测定

50 mg 心肌组织匀浆后经 3500 r/min、4℃ 离心 10 min,取上清液使用试剂盒测定 ATP 含量。

1. 2. 7 qPCR 分析

采用 Trizol 法提取心脏组织总 RNA,用逆转录酶 PrimeScript™ RT 合成 cDNA 后进行 PCR 扩增,检测心脏重塑标记基因 (心钠肽 (ANP)、脑钠肽 (BNP)、β 肌球蛋白重链 (β-MHC))^[17-19] 和心肌能量代谢相关基因^[20] (过氧化物酶体增殖物激活受体 α/γ (PPARα/γ)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 (PGC-1α)、核呼吸因子 (NRF-1)) 的 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。数据标准化后使用 2^{-ΔΔCt} 比较法进行分析。

表 1 定量 PCR 引物

基因 Gene	正向引物 (5'-3') Forward primers (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primers (5'-3')
ANP	ACAGCCAAGGAGGAAAAGGC	CCACAGTGGCAATGTGACCA
BNP	GAGGTCACCTCCTATCCTCTGG	GCCATTTCTCCGACTTTTCTC
β-MHC	ACCGTCTTGCCATTCTCCG	GATGTTTTGTGCCCGATGA
NRF-1	TTACTGTGCTGTGGCTGATGG	CCTCTGATGCTTGCCTCGTCT
PGC-1α	ATGCACTGACAGATGCAGACGTGAC	GTTCCTATACCATAGTCATGCATTG
PPARα	ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC	GGCCTTGACCTTGTTTCATGT
PPARγ	TCCGAAGAACCATCCGATTGAA	CATACAAATGCTTTGCCAGGGC
β-action	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

1. 2. 8 心肌丝磷酸化分析

心脏收缩是消耗 ATP 并由肌丝蛋白实施的一种活动,肌丝磷酸化水平可评估其活性状态。本实验使用匀浆器将心肌组织匀浆,经 12 000 r/min 离心后去除上清液。沉淀物重悬于含有 1% Triton X-100 的裂解液裂解后离心获得心肌丝,定量和变性后使用 12% 凝胶电泳分离肌球蛋白结合蛋白 C (MyBP-C)、肌钙蛋白 T (TnT)、肌钙蛋白 I (TnI)、肌球蛋白轻链 2 (MLC2),使用 Pro-Q Diamond 磷酸化蛋白染色试剂检测肌丝蛋白的磷酸化水平,评估其活性状态,考马斯亮蓝染料检测上样量,用激光扫描仪器扫描。使用 Image J 软件分析条带强度。

1. 3 统计学分析

数据以平均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析法 (One-way ANOVA) 和 Dunnett's 检验比较组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2. 1 PSO 的成分

PSO 的成分见图 1。ALA 是 PSO 中最丰富的脂肪酸,其次是油酸、亚油酸、棕榈酸和硬脂酸。PSO 的脂肪酸谱包括饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸 (表 2)。

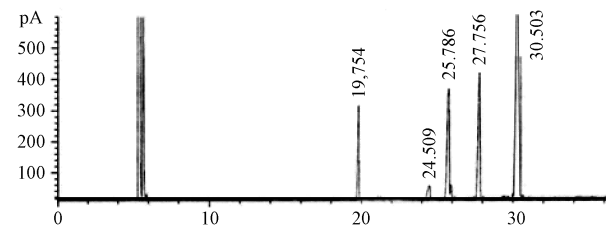


图 1 PSO 成分分析

Figure 1 The PSO component analysis

表 2 PSO 的理化特征

Table 2 The physicochemical characteristics of PSO		
种类 Items	值 Value	
碘吸附值 Iodine adsorption value (g/100 g substance)	193	
皂化值 Saponification value (mg KOH /g fat)	194	
非皂化物 Unsaponifiable matter%	1. 2	
酸值 Acid value (mg KOH/g)	3. 8	
脂肪 Lipids%	44. 7	
饱和脂肪酸 Saturated fatty acids		
棕榈酸 Palmitic acid (C16:0) %	6. 5 (19. 754 ^a)	
硬脂酸 Stearic acid (C18:0) %	2. 0 (24. 509 ^a)	
不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acids		
油酸 Oleic acid (C18:1) %	15. 4 (25. 786 ^a)	
亚油酸 Linoleic acid (C18:2) %	13. 5 (27. 758 ^a)	
α-亚麻酸 α-linolenic acid (C18:3) %	60. 1 (30. 503 ^a)	
n-6/n-3 的比例 n-6/n-3 ratio	0. 22	

2.2 PSO 对血脂水平的影响

治疗结束时,与 WT 组相比,ApoE^{-/-} 组血清 TC、HDL-C 和 LDL-C 水平显著升高,PSO 治疗后与 ApoE^{-/-} 组比较 LDL-C 和 HDL-C 水平有改善趋势,但未见显著差异。与 ApoE^{-/-} 组相比,Ato 组显示小鼠血清脂质水平均显著降低(表 3)。

2.3 PSO 对动脉压的影响

主动脉血管弹性纤维 HE 染色显示 WT 组中弹性内膜的平滑肌细胞排列整齐,结构完整,而 ApoE^{-/-} 组管壁有斑块沉积,泡沫细胞浸润。与 ApoE^{-/-} 组相比,PSO 组和 Ato 组主动脉斑块显著减少,血管结构相对完整(图 2A,B)。脉冲多普勒结果显示,ApoE^{-/-} 组动脉压显著高于 WT 组,PSO 和 Ato 治疗后,升高的动脉压恢复到 WT 组的水平(图 2C)。

2.4 心肌组织的病理学观察

HE 染色显示 WT 组心肌结构正常,ApoE^{-/-} 组心肌纤维的解体、碎裂或丢失。与 ApoE^{-/-} 组相比,PSO 和 Ato 治疗后心肌结构显著改善,心肌纤维整齐排列并且没有显著碎裂(图 3)。

2.5 PSO 对心脏结构与功能的影响

与 WT 组小鼠相比,ApoE^{-/-} 组小鼠 IVS; s 和 LVPW; s 显著降低,LVID; s 和 LVID; d 显著增加,表明心脏结构异常(图 4A-E),EF(57.93 ± 2.62% vs 71.27 ± 2.66%,*P* < 0.001)和 FS(30.05 ± 1.65% vs 41.53 ± 2.14%,*P* < 0.001)显著降低(图 4A,F-G),表明心脏功能障碍。与 ApoE^{-/-} 组相比,PSO 组的 IVS; s 和 LVPW; s 均显著增高,LVID; s 和 LVID; d 均显著减小(图 4A,B-E),EF(0.5 g/kg PSO:68.08 ± 1.63% vs 57.93 ± 2.62%,*P* < 0.01; 1.0 g/kg PSO: 71.27 ± 2.56% vs 57.93 ± 2.62%,*P* < 0.001)和 FS(0.5 g/kg PSO,37.09 ± 1.23% vs 30.05 ± 1.65%,*P* < 0.001; 1.0 g/kg PSO,39.84 ± 2.02% vs 30.05 ± 1.65%,*P* < 0.001)均显著增加,并恢复到与 WT 组接近水平(图 4A,F,G)。另外,Ato 组与 PSO 组的各项指标一致,表示 PSO 治疗显著保护了心脏结构和功能,具有效果。

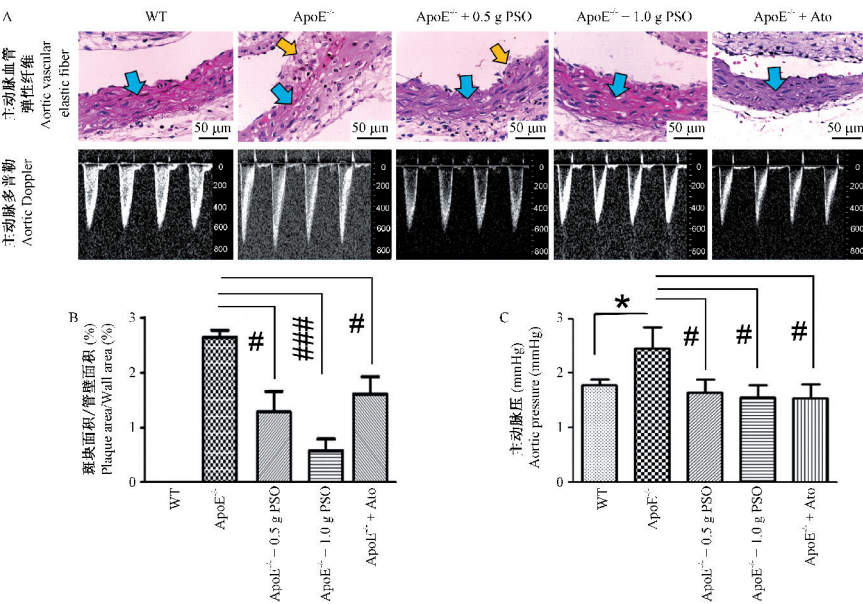
2.6 PSO 对细胞内 ATP 含量和基因表达的影响

与 WT 组相比,ApoE^{-/-} 组的 ATP 含量显著降低,与 ApoE^{-/-} 组相比,PSO 组的 ATP 水平得到恢复,Ato 组的 ATP 含量无显著差异(图 5A)。与 WT 组相比,ApoE^{-/-} 组小鼠 ANP,BNP 和 β-MHC 的 mRNA 表达水平增加。与 ApoE^{-/-} 组相比,PSO 组 BNP 和 β-MHC 的 mRNA 表达显著降低,并且接近 WT,但 ANP 无显著改变,Ato 组中 ANP,BNP 和 β-MHC 的 mRNA 表达水平也显著降低(图 5B-D)。以上结果表明 PSO 减少 ApoE^{-/-} 心脏重塑。与 WT

表 3 血清脂质水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Serum lipid levels ($\bar{x} \pm s, n = 10$)				
组别 Groups	总胆固醇 TC (mmol/L)	甘油三酯 TG (mmol/L)	高密度脂蛋白 HDL-C (mmol/L)	低密度脂蛋白 LDL-C (mmol/L)
WT	4.02 ± 0.15	1.78 ± 0.12	2.65 ± 0.10	0.57 ± 0.02
ApoE ^{-/-}	16.62 ± 1.21 ^{**}	1.71 ± 0.17	6.36 ± 0.82 ^{**}	4.03 ± 0.43 ^{**}
ApoE ^{-/-} + 0.5 g/kg PSO	15.80 ± 1.03	1.48 ± 0.18	7.36 ± 0.49	2.72 ± 0.56
ApoE ^{-/-} + 1.0 g/kg PSO	16.45 ± 0.72	2.27 ± 0.38	7.56 ± 0.39	3.18 ± 0.59
ApoE ^{-/-} + Ato	13.59 ± 0.85 [#]	1.24 ± 0.14 [#]	4.49 ± 0.82 [#]	3.22 ± 0.21 [#]

注: ***P* < 0.01, vs WT group; [#]*P* < 0.05, vs ApoE^{-/-}。
Note. ***P* < 0.01, vs WT group; [#]*P* < 0.05, vs ApoE^{-/-}.



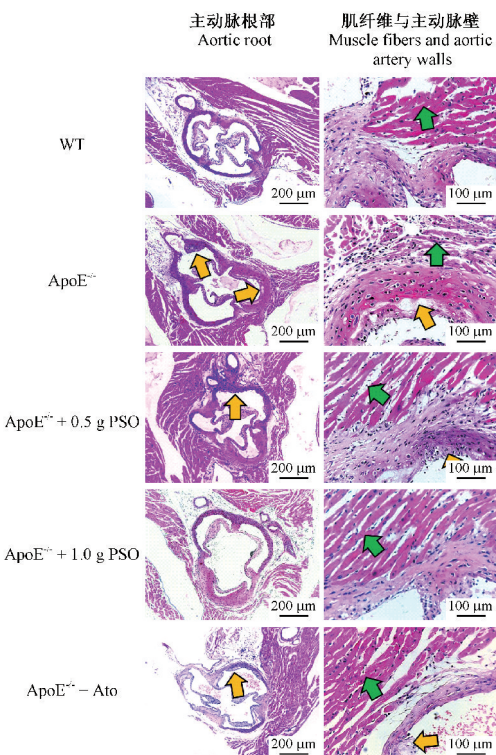
注:A:主动脉血管弹性纤维与主动脉血流多普勒;B:斑块面积与管壁面积的比值;C:主动脉压。蓝色箭头表示弹性纤维,黄色箭头表示斑块。^{*}*P* < 0.05 vs WT 组;[#] *P* < 0.05, ^{###} *P* < 0.001 vs ApoE^{-/-} 组。

图2 小鼠主动脉压的检测
Note. A, Aortic vascular elastic fiber and aortic Doppler images. B, Ratio of plaque area to wall area. C, Aortic pressure. The blue arrow indicates elastic fiber and the yellow arrow indicates plaque. ^{*}*P* < 0.05 vs WT group; [#] *P* < 0.05, ^{###} *P* < 0.001 vs ApoE^{-/-} group.

组相比, ApoE^{-/-} 组 PPARα, PPARγ 和 NRF-1 的 mRNA 表达降低, PCG-1α 的 mRNA 表达升高(图 5E-H)。与 ApoE^{-/-} 组相比, PSO 组 PPARα 的 mRNA(0.5 g/kg PSO, 1.65 ± 0.35 vs 0.62 ± 0.11, *P* < 0.01; 1.0 g/kg PSO, 1.87 ± 0.34 vs 0.62 ± 0.11, *P* < 0.01), NRF-1 的 mRNA(0.5 g/kg PSO, 0.59 ± 0.03 vs 0.28 ± 0.08, *P* < 0.01; 1.0 g/kg PSO, 0.66 ± 0.12 vs 0.28 ± 0.08, *P* < 0.05), PGC-1α 的 mRNA(0.5 g/kg PSO, 4.58 ± 0.36 vs 0.97 ± 0.11, *P* < 0.01; 1.0 g/kg PSO, 5.89 ± 0.6 vs 0.97 ± 0.11, *P* < 0.01)表达显著增加(图 5F-H)。PPARγ 的 mRNA 表达没有显著差异(图 5E)。与 ApoE^{-/-} 组相比, Ato 组 PPARα, NRF-1 的 mRNA 表达均得到恢复(图 5F-G),但 PGC-1α 的 mRNA 水平降低(图 5H)。以上结果表明 PSO 有助恢复 ApoE^{-/-} 心脏的能量供给。

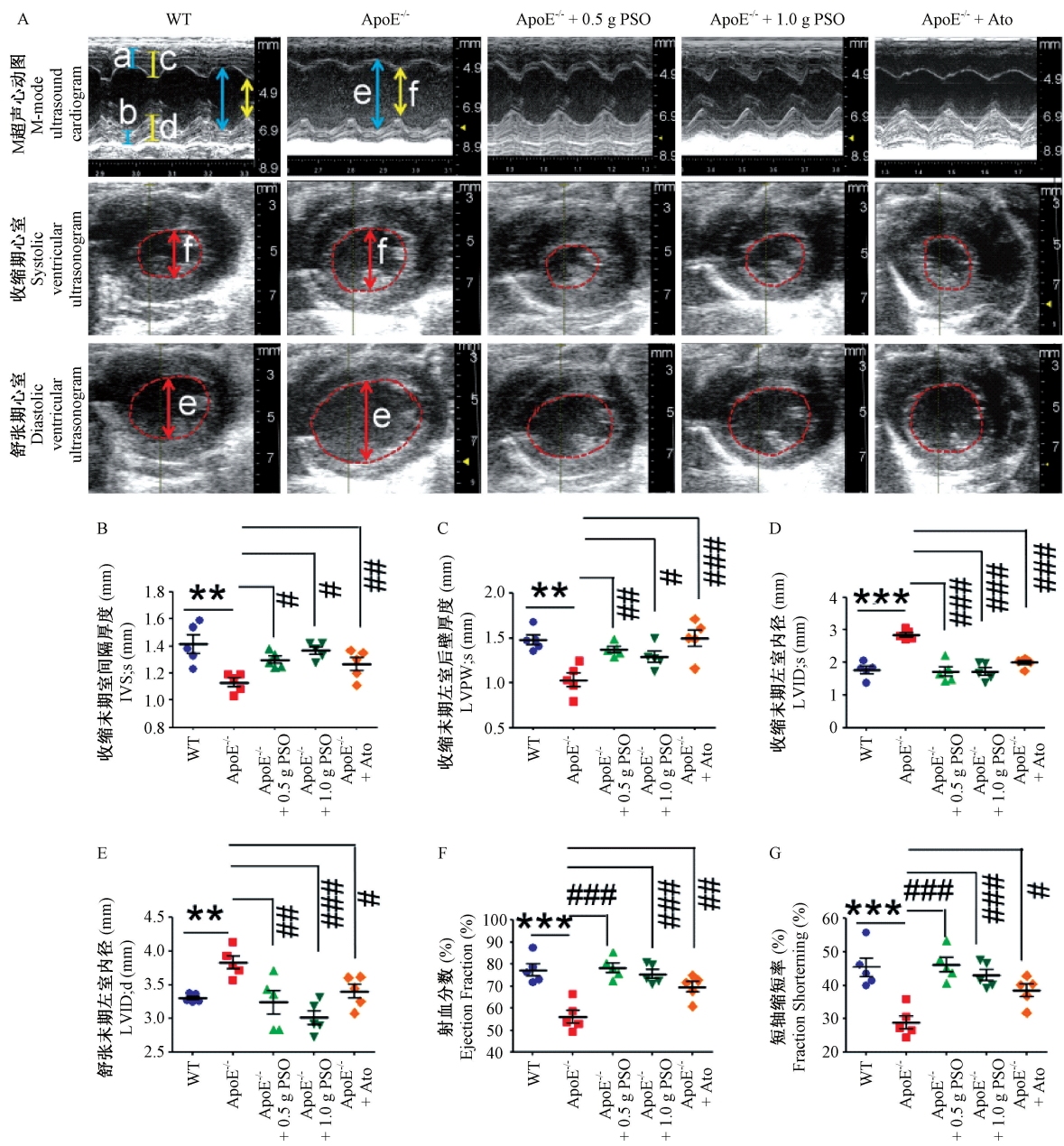
2.7 PSO 对肌丝蛋白磷酸化的影响

Pro-Q Diamond 染色结果见图 6A。统计显示 ApoE^{-/-} 组中 MyBP-C、TnT、TnI 和 MLC2 的磷酸化水平显著低于 WT 组(图 6A-E);与 ApoE^{-/-} 组相比 PSO 治疗后 MyBP-C、TnT、TnI 和 MLC2 得到一定程度的恢复(图 6A-E),其中 1.0 g/kg PSO 组和 Ato 组 TnI 的磷酸化水平恢复显著,接近 WT 组水平(图 6D),表明心肌丝活性状态得到改善。



注:光学显微镜下的小鼠主动脉根部,以及肌纤维和主动脉壁。绿色箭头表示心肌纤维,黄色箭头表示斑块。

图3 心肌组织 HE 染色
Note. Mouse aortic root, and aortic wall and cardiac muscle fiber. The green arrows indicate myocardial fibers and the yellow arrows indicate plaques.
Figure 3 Histological changes of the mouse myocardial tissues (HE staining)

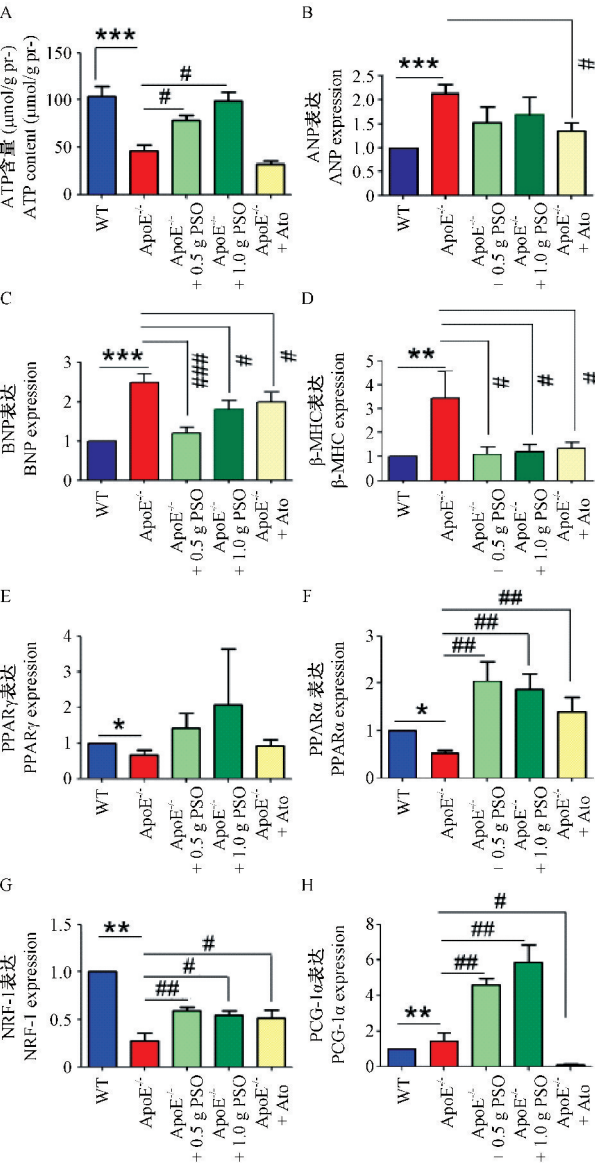


注:A:超声显示小鼠心脏的M型和B型图;B:收缩末期室间隔厚度;C:收缩末期左室后壁厚度;D:收缩末期左室内径;E:舒张末期左室内径;F:射血分数;G:短轴缩短率。a:舒张末期室间隔厚度;b:舒张末期左室后壁厚度;c:收缩末期室间隔厚度;d:收缩末期左室后壁厚度;e:舒张末期左室内径;f:收缩末期左室内径。 $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs WT 组; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs ApoE^{-/-} 组。

图4 小鼠心功能检测

Note. A, Typical B-mode and M-mode ultrasound images of the mouse heart. B, Internal ventricular septum thickness at end-systole. C, Left ventricular posterior wall thickness at end-systole. D, Left ventricular internal dimension at systole. E, Left ventricular internal dimension at diastole. F, Ejection fraction. G, Short axis shortening rate. a, Internal ventricular septum thickness at diastole. b, Left ventricular posterior wall thickness at diastole. c, Internal ventricular septum thickness at end-systole. d, Left ventricular posterior wall thickness at end-systole. e, Left ventricular internal dimension at diastole. F, Left ventricular internal dimension at systole. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs WT group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs ApoE^{-/-} group.

Figure 4 Measurements of cardiac function of the mice



注: A:ATP 含量;B:ANP 的表达;C:BNP 的表达;D:β-MHC 的表达;E:PPAR γ 的表达;F:PPAR α 的表达;G:NRF-1 的表达;H:PCG-1 α 的表达。 $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ vs WT 组; $^{#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$ vs ApoE^{-/-} 组。

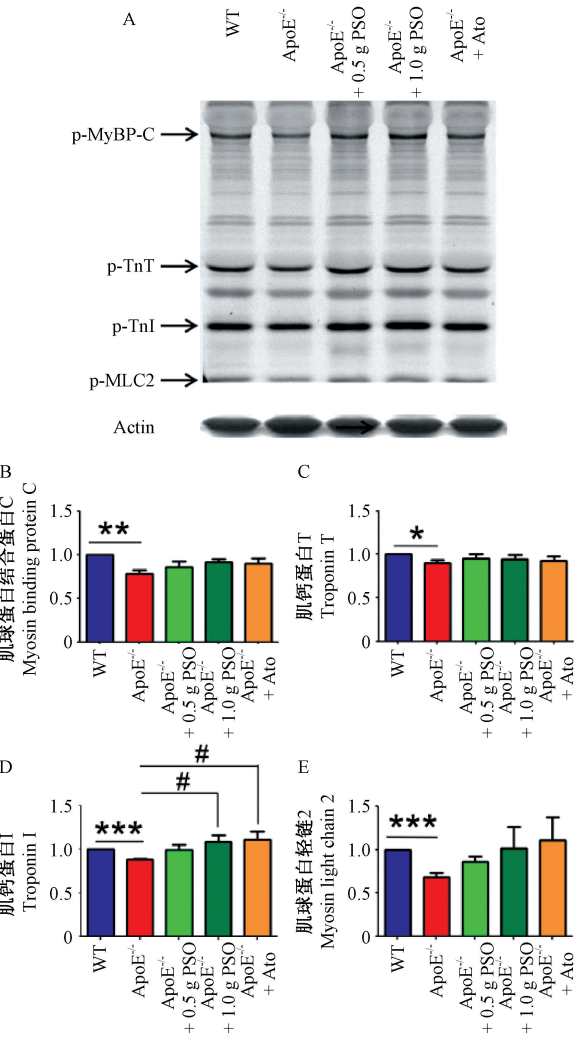
图 5 ATP 含量和基因表达水平

Note. A, Content of ATP. B, Expression of ANP. C, Expression of BNP. D, Expression of β-MHC. E, Expression of PPAR γ . F, Expression of PPAR α . G, Expression of NRF-1. H, Expression of PCG-1 α . $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ vs WT group; $^{#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$ vs ApoE^{-/-} group.

Figure 5 The content of ATP and gene expression levels

3 讨论

本实验中, ApoE^{-/-} 小鼠可检测到心脏扩张、心功能障碍和心肌结构损伤, 与其他报道结果一致, 例如肥大性心脏重构^[21-23] 和内皮功能障碍^[21]。但



A:Pro-Q Diamond 染色;B:肌球蛋白结合蛋白 C 磷酸化水平; C:肌钙蛋白 T 磷酸化水平;D:肌钙蛋白 I 磷酸化水平;E:肌球蛋白轻链 2 磷酸化表达水平。 $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ vs WT 组; $^{#}P<0.05$ vs ApoE^{-/-} 组。

图 6 肌丝蛋白磷酸化水平

Note. A, Pro-Q Diamond staining. B, Phosphorylation levels of MyBP-C. C, Phosphorylation levels of TnT. D, Phosphorylation levels of TnI. E, Phosphorylation levels of MLC₂. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ vs WT group; $^{#}P<0.05$ vs ApoE^{-/-} group.

Figure 6 Phosphorylation level of myofilaments

是我们的小鼠出现的时间较早, 约为 5 个月, 其它文献报道出现症状的时间有长于或短于此时间的, 如正常饮食的 ApoE^{-/-} 小鼠 7.5 个月出现显著的心脏重构和内皮功能障碍^[21], 13 个月大的 ApoE^{-/-} 小鼠出现明显的肥大性心脏重构^[22], 较短时间的则显示正常饮食 4 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠已出现左室肥大性重构^[23]。ApoE^{-/-} 病理表型出现时间不一致可能与饲养管理情况和实验时间点有关。另外, 研究表明动脉粥样硬化病变与巨噬细胞能量代谢异常^[22]、线

粒体功能损伤引起的能量代谢障碍^[23]密切相关,本研究中 PSO 没有显著降低血脂但却减少动脉粥样硬化斑块,可能与能量代谢的机制相关,本研究中的基因表达检测结果也支持这个观点,具体机制有待于进一步研究。

哺乳动物需要大量的 ATP 来维持正常的心脏收缩功能,能量代谢异常与心功能失常密切相关。PGC-1 α 是线粒体合成的“主控制器”,与 PPARs 和 NRF-1 共激活起作用^[24]。研究表明多不饱和脂肪酸能激活 PPARs 与 PGC-1 α 调节心脏代谢^[25-26],而 PPAR α 的激活可改善心肌能量代谢、延缓心力衰竭^[27]。我们的结果显示,PSO 治疗改善了 ApoE^{-/-}小鼠心功能,提高了 PPAR α ,PCG-1 α 和 NRF-1 的 mRNA 表达水平,表明这些基因表达在 PSO 治疗机制中起到关键作用。PSO 治疗后 PPAR γ 的 mRNA 表达水平没有显著差异,这可能是由于 PPAR γ 的激活主要受 n-6 脂肪酸调控^[28],并且其激活未参与左心室重构^[29]。同时,心肌丝磷酸化结果提示 PSO 可通过调节心肌丝活性状态改善心脏功能收缩,但其如何与能量代谢相互协调保护心脏的机制仍有待探索阐明。

ApoE^{-/-}小鼠发生心脏结构和功能异常,PSO 可抑制其动脉斑块形成、维持正常心脏结构和功能。PSO 可能通过调节 PPAR α /PCG-1 α /NRF-1 轴增加 ATP 和肌丝蛋白磷酸化、改善能量代谢、发挥心脏保护作用。

参 考 文 献(References)

- [1] Opadijo OG, Omotoso AB, Akande AA. Relation of electrocardiographic left ventricular hypertrophy to blood pressure, body mass index, serum lipids and blood sugar levels in adult Nigerians [J]. Afr J Med Med Sci, 2003, 32(4): 395-399.
- [2] 武文峰, 温文慧, 吴月, 等. 家族性高胆固醇血症患者心血管系统病变临床特点的分析 [J]. 心肺血管病杂志, 2018, 37(7): 635-638.
Wu WF, Wen WH, Wu Y, et al. The clinical characteristics of cardiovascular involvement in patients with familial hypercholesterolemia [J]. J Cardiovasc Pulmon Dis, 2018, 37(7): 635-638.
- [3] Celentano A, Crivaro M, Roman MJ, et al. Left ventricular geometry and arterial function in hypercholesterolemia [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2001, 11(5): 312-319.
- [4] Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. Nat Rev Cardiol, 2018; 15(7): 387-407.
- [5] Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling [J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(3): 412-419.
- [6] Sequeira V, Bertero E, Maack C. Energetic drain driving hypertrophic cardiomyopathy [J]. FEBS Lett, 2019, 593(13): 1616-1626.
- [7] 解现星, 张涛, 赵爽, 等. 苏子油对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌胰岛素敏感性相关基因表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(12): 1-5.
Xie XX, Zhang T, Zhao S, et al. Effects of perilla oil on the insulin sensitivity-related gene expression in skeletal muscle in insulin resistant rats [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(12): 1-5.
- [8] Rodriguez-Leyva D, Bassett CM, McCullough R, et al. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid [J]. Can J Cardiol, 2010, 26(9): 489-496.
- [9] Han H, Yan P, Chen L, et al. Flaxseed oil containing α -linolenic acid ester of plant sterol improved atherosclerosis in ApoE deficient mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 1-17.
- [10] Plump AS, Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells [J]. Cell, 1992, 71(2): 343-353.
- [11] Wu JH, Hagaman J, Kim S, et al. Aortic constriction exacerbates atherosclerosis and induces cardiac dysfunction in mice lacking apolipoprotein E [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(3): 469-475.
- [12] Mishra S, Bedja D, Amuzie C, et al. Prevention of cardiac hypertrophy by the use of a glycosphingolipid synthesis inhibitor in ApoE^{-/-} mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 465(1): 159-164.
- [13] Qin YW, Ye P, He JQ, et al. Simvastatin inhibited cardiac hypertrophy and fibrosis in apolipoprotein E-deficient mice fed a “Western-style diet” by increasing PPAR α and γ expression and reducing TC, MMP-9, and Cat S levels [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(10): 1350-1358.
- [14] Vincelette J, Martin-McNulty B, Vergona R, et al. Reduced cardiac functional reserve in apolipoprotein E knockout mice [J]. Transl Res, 2006, 148(1): 30-36.
- [15] 马尧, 庄云, 张瑶. 超临界 CO₂ 萃取紫苏油的工艺优化研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(33): 14577-14592.
Yao MA, Zhuang Y, Zhang Y. Study on optimization of technology for extracting perilla oil by supercritical CO₂ extraction [J]. J Anhui Agr Sci, 2008, 36(33): 14577-14592.
- [16] Jung MY, Choi NJ, Chan HO, et al. Selectively hydrogenated soybean oil exerts strong anti-prostate cancer activities [J]. Lipids, 2011, 46(3): 287-295.
- [17] 王晓建, 王继征, 王长鑫, 等. 跑步训练诱导小鼠生理性心

- 脏肥厚模型 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(4): 301-305.
- Wang XJ, Wang JZ, Wang CX, et al. A mouse model of physiological cardiac hypertrophy induced by exercise-training on treadmill [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2011, 19(4): 301-305.
- [18] 严雪瑜, 蒋钦杨, 吴延军, 等. 广西巴马小型猪 2 型糖尿病模型骨骼肌糖代谢及能量代谢相关基因的表达差异 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(5): 470-474.
- Yan XY, Jang QY, Wu YJ, et al. Expression of skeletal muscle glucose and energy metabolism-related genes in Guangxi Bama minipigs with type 2 diabetes mellitus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(05): 470-474.
- [19] Yang R, Powellbraxton L, Ogaoawara AK, et al. Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(11): 2762.
- [20] Wang YX. Cardiovascular functional phenotypes and pharmacological responses in apolipoprotein E deficient mice [J]. Neurobiol Aging, 2005, 26(3): 309-316.
- [21] Ulasova E, Perez J, Hill BG, et al. Quercetin prevents left ventricular hypertrophy in the ApoE knockout mouse [J]. Redox Biol, 2013, 1(1): 381-386.
- [22] Remmerie A, Scott CL. Macrophages and lipid metabolism [J]. Cell Immunol, 2018, 330: 27-42.
- [23] Dong Y, Fernandes C, Liu Y, et al. Role of endoplasmic reticulum stress signalling in diabetic endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. Diab Vasc Dis Res, 2017, 14(1): 14-23.
- [24] Mohagheghi F, Ahmadiani A, Rahmani B, et al. Gemfibrozil pretreatment resulted in a sexually dimorphic outcome in the rat models of global cerebral ischemia-reperfusion via modulation of mitochondrial pro-survival and apoptotic cell death factors as well as MAPKs [J]. J Mol Neurosci, 2013, 50(3): 379-393.
- [25] Wang YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases [J]. Cell Res, 2010, 20(2): 124-137.
- [26] Duncan JG, Finck BN. PPAR/PGC-1 regulation of metabolism in cardiac disease [M]. Humana Press, 2012.
- [27] Yang Y, Zhang H, Li X, et al. Effects of PPAR α /PGC-1 α on the myocardial energy metabolism during heart failure in the doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in mice [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(9): 2435-2442.
- [28] Forman BM, Tontonoz P, Chen J, et al. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma [J]. Cell, 1995, 83(5): 803-812.
- [29] Weiss CS, Hagenmüller M, Pichler M, et al. Activation of PPARgamma by pioglitazone does not attenuate left ventricular hypertrophy following aortic banding in rats [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2010, 381(4): 285-295.

[收稿日期] 2019-06-19