

芥菜籽提取物抗氧化及下调巨噬细胞清道夫受体 CD36 表达和预防动脉粥样硬化的作用

肖铭甲, 陈卫红, 郭景新, 赵明

(南方医科大学病理生理学教研室 广东省休克微循环重点实验室, 广东省广州市 510515)

[关键词] 芥菜籽提取物; 动脉粥样硬化; CD36; 呼吸爆发; 脂质过氧化物

[摘要] **目的** 探讨芥菜籽提取物抗氧化、调节 CD36 的表达及预防动脉粥样硬化的作用。**方法** 将 C57/BL6 小鼠随机分为对照组和芥菜籽组, 分别经腹腔给予 1.5% 的生理盐水、1.5% 芥菜籽提取物溶液, 连续 3 天, 第 4 天停止注射, 第 5 天经眼眶取血并处死老鼠, 取腹腔巨噬细胞培养。将培养的巨噬细胞给予氧化型低密度脂蛋白刺激, 观察腹腔巨噬细胞氧化型低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞呼吸爆发和脂质过氧化物含量, 清道夫受体 CD36 表达水平以及中性脂肪蓄积情况, 并观察血浆超氧化物歧化酶活性和脂质过氧化物含量。雄性载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠 30 例, 随机分为对照组、高脂组和高脂 + 7.5% 芥菜籽组进行饲养, 25 周后处死, 分离并观察主动脉脂质斑块面积。**结果** 芥菜籽提取物明显增加机体血浆超氧化物歧化酶水平和降低脂质过氧化物水平; 降低氧化型低密度脂蛋白诱导的呼吸爆发; 降低氧化型低密度脂蛋白诱导的脂质过氧化物升高及 CD36 的表达水平, 减少细胞中性脂肪蓄积泡沫细胞形成; 降低高脂引起的脂质斑块面积。**结论** 芥菜籽提取物可有效地提高机体的抗氧化能力, 提高巨噬细胞的抗氧化性, 减少脂质的摄取, 预防动脉粥样硬化早期病变。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Sinapis Alba Extract Regulates CD36 Expression and Prevents Atherosclerosis as an Antioxidant

XIAO Ming-Jia, CHEN Wei-Hong, GUO Jing-Xin, and ZHAO Ming

(Department of Pathophysiology, Southern Medical University & Guangdong Provincial Key Laboratory of Shock and Microcirculation, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[KEY WORDS] Sinapis Alba Extract; Atherosclerosis; CD36; Respiratory Burst; Lipid Peroxide

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the function of Sinapis alba extract's antioxidant ability and regulation of CD36 expression in macrophages, and Sinapis alba extract's prevention of atherosclerosis. **Methods** C57/BL6 mice were divided into two groups which were injected with 1.5% normal saline or 1.5% Sinapis alba extract for 0.2 mL/day, respectively. The injection was paused for one day after continuously injected for three days, and then on the 5th day, mice were sacrificed to collect abdominal macrophages. Plasma superoxide dismutase (SOD) activity and lipid peroxide (LPO); cellular SOD, respiratory burst, LPO, expression of CD36 and neutral fat accumulation were assayed. 30 male ApoE^{-/-} mouse were randomly divided into three groups: chew food diet group, high-fat diet group and high-fat diet + 7.5% Sinapis alba group. The mouse were sacrificed 25 weeks later, and aorta was dissected, stained by oil red O. Plaque area was measured by an automatic image analyzer. **Results** In Sinapis alba extract group, SOD activity was higher and LPO was lower than that in the control group. Sinapis alba extract could reduce macrophage respiratory burst, and LPO level, CD36 expression and neutral fat accumulation induced by ox-LDL. Sinapis alba extract could reduce lipid plaque area by high-fat diet ($P < 0.05$). **Conclusions** Sinapis alba extract can effectively improve the body's antioxidant capacity, improve the antioxidant activity of macrophages, reduce lipid uptake, prevent early atherosclerosis lesions.

[收稿日期] 2012-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071549)

[作者简介] 肖铭甲, 研究方向为动脉粥样硬化病理生理, E-mail 为 mingjiaxiao@163.com。通讯作者郭景新, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的免疫机制, E-mail 为 guojingxin@gmail.com。通讯作者赵明, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为炎症与细胞内信号转导及动脉粥样硬化的免疫机制, E-mail 为 ming.zhao1966@gmail.com。

动脉粥样硬化是冠心病的主要原因。近年来的研究显示,氧化应激和炎症是动脉粥样硬化发生的两个关键成分。活性氧是动脉粥样硬化炎症发生的始动因素,活性氧和氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是内皮损伤和诱导内皮细胞促炎症因子释放的主要原因^[1]。目前的研究证实,低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)被氧化修饰后,被巨噬细胞的清道夫受体识别摄取,其中以 CD36 为主^[2]。巨噬细胞大量吞噬 ox-LDL 不受脂代谢负反馈调节使巨噬细胞泡沫样变。这一机制被认为是导致动脉粥样硬化斑块形成的主要作用^[3]。近年来对芥菜籽提取物的研究发现,芥菜籽不但是良好的天然抗氧化剂,而且具有独到的抗衰老功效^[4]。而中国传统医学认为白芥(芥菜籽的一种)具有防腐、化痰的功效。明确白芥籽是否具有抗氧化和防治动脉粥样硬化的作用,有利于我们开发中西方普遍接受的保健食品和药品。因此我们利用分子探针和流式细胞仪等手段,研究了芥菜籽提取物抗氧化的机制及其预防动脉粥样硬化早期病变—泡沫细胞形成的效果,为芥菜籽提取物在临床上的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及仪器

雌性 SPF 级 C57/BL6 小鼠,18~22 g,购自南方医科大学实验动物中心。雄性 ApoE^{-/-}小鼠,18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。水平电泳仪(美国 Biorad 公司);流式细胞仪(美国 R&D 公司);低温超速离心机(美国 Beckman 公司);恒温水浴箱(北京);超净操作台(苏州)。普通人血浆购自南方医院血库;Dissociation Buffer、CD36 抗体和 DHR123 购自美国 Sigma 公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、脂质过氧化物(lipid peroxide, LPO)检测试剂盒购自南京建成生物有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 动脉粥样硬化小鼠模型的建立

选取 4~6 周龄 ApoE^{-/-}小鼠 30 只,随机分组:对照组小鼠采用普通饲料喂养;高脂组小鼠采用高脂饲料(21%猪油+0.15%胆固醇+78.85%普通饲料)喂养;高脂+7.5%芥菜籽组小鼠采用 7.5%芥菜籽提取物+高脂饲料喂养。饲养于温度为 22℃~23℃,湿度为 55%~60%的动物房,25 周后处死,并解剖分离主动脉,观察脂质斑块面积。所有实验程序均获得南

方医科大学动物保健及使用委员会批准。

1.3 芥菜籽提取物的制备

将白芥籽磨碎,低温减压干燥,除去水分,装入分液漏斗,以乙醚为溶剂,浸泡、振荡、除去脂肪,取残渣加 75%乙醇,室温下浸提 4~5 次,每次为 12 h,合并浸提液,4℃低温过夜,芥菜籽抽提物析出,收集并干燥^[5]。

1.4 LDL 的分离与氧化修饰

用一次性密度梯度超速离心法(60000 r/min, 6 h)从人血浆中分离 LDL,测得蛋白浓度 0.4 g/L^[6]。LDL 经透析膜去除 NaBr 后,置于含 5 μmol/L Cu²⁺的 PBS 中,37℃温育 8 h。修饰后的 LDL 加入 200 μmol/L EDTA 终止反应。PBS 透析 24 h 去除 EDTA,超滤除菌后 4℃保存^[7]。修饰程度鉴定采用琼脂糖凝胶电泳法。

1.5 实验动物分组及处理

将白芥菜籽提取物用生理盐水配成 1.5%的溶液,小鼠腹腔注射 0.2 mL/d,对照组注射等量生理盐水,连续注射 3 天,第 4 天停止注射,第 5 天眼球取血处死,75%酒精消毒,取腹腔巨噬细胞培养备用。

1.6 细胞培养

将提取的小鼠腹腔巨噬细胞,以 1×10^6 个/孔的密度接种入 24 孔板,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养。

1.7 SOD 检测

将小鼠腹腔巨噬细胞离心后超声粉碎,再离心,根据 SOD 试剂盒说明书要求取细胞裂解液的上清测定细胞 SOD。

1.8 LPO 检测

将提取并培养的巨噬细胞给予 ox-LDL (50 mg/L)刺激 4 h,离心,取上清,并按照 LPO 试剂盒说明书检测细胞 LPO。

1.9 流式细胞仪检测呼吸爆发

小鼠腹腔巨噬细胞接种于培养基,培养 12 h 后洗去未贴壁细胞,向培养基加 ox-LDL (50 mg/L),刺激 15 min, PBS 冲洗终止刺激,用 Dissociation buffer 洗脱细胞,清洗后用 10 μmol/L DHR123 处理细胞,流式细胞仪检测呼吸爆发。

1.10 流式细胞仪检测 CD36

小鼠腹腔巨噬细胞接种于培养基,培养 12 h 后洗去未贴壁细胞,向培养基加 ox-LDL (50 mg/L)。培养 24 h 后,用 Dissociation buffer 洗脱细胞,清洗后用 FITC-CD36 抗体标记,流式细胞仪检测诱导情况。

1.11 主动脉油红 O 染色

将动脉由主动脉弓到腹主动脉段被完整游离

下来,并剖开后加 Histochoice Tissue Fixative 固定。0.5 g 油红 O 粉末溶解于 100 mL 98% 异丙醇中,制成油红 O 母液储存备用;使用时取油红 O 母液 6 mL 加入蒸馏水稀释至 10 mL,静置 10 min,普通滤纸过滤,为工作液。将固定了的血管段捞出并吸尽固定液,室温下用油红 O 工作液染色 10 min,70% 酒精漂洗 2 min,双蒸水洗涤 2 次,封片后显微镜下观察并照相。

1.12 统计学方法

采用 GraphPad4.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间比较采

用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芥菜籽提取物对血浆 SOD 活性和 LPO 水平的影响

芥菜籽提取物可以显著提高机体血浆中的 SOD 活性,大大降低自由基终产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量,表明它具有极强的、全身性的抗氧化能力(图 1)。

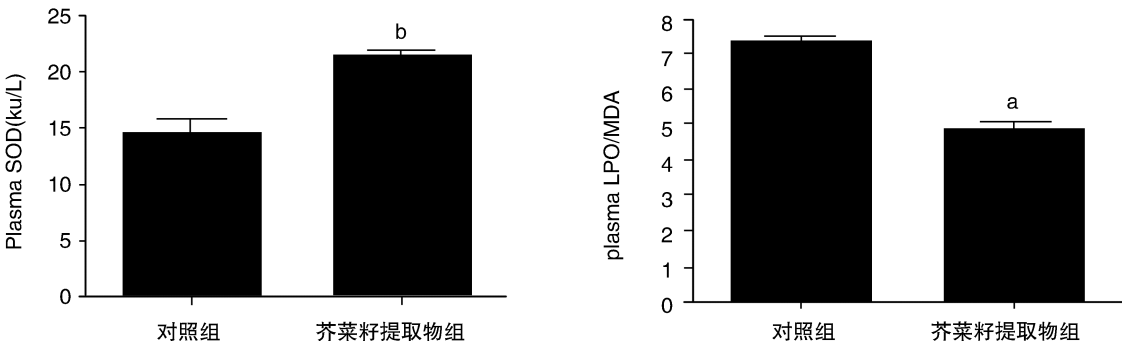


图 1. 芥菜籽提取物对血浆 SOD 活性和 LPO 水平的影响 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, 与对照组比较。

Figure 1. Effect of Sinapis alba extract on plasma SOD activity and LPO level

2.2 芥菜籽提取物对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞呼吸爆发的影响

芥菜籽提取物 + ox-LDL 组巨噬细胞呼吸爆发

显著低于 PBS + ox-LDL 组,但与对照组没有统计学差异。提示芥菜籽提取物有抑制呼吸爆发机制的能力(图 2)。

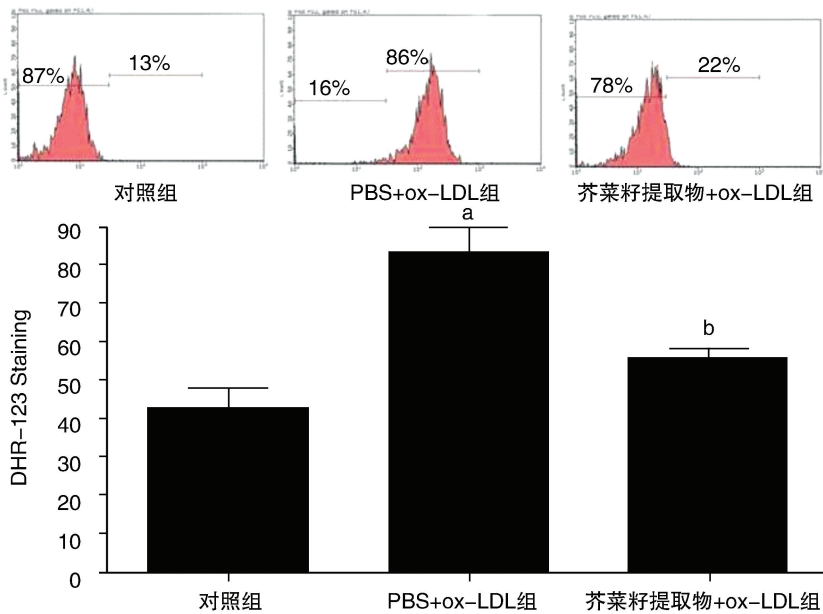


图 2. 芥菜籽提取物对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞呼吸爆发的影响 a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 PBS + ox-LDL 组比较。

Figure 2. Effect of Sinapis alba extract on macrophage respiratory burst induced by ox-LDL

2.3 芥菜籽提取物对 ox-LDL 诱导的小鼠巨噬细胞 LPO 的作用

对照组细胞 LPO 蓄积较少, PBS + ox-LDL 组细胞 LPO 蓄积明显增多, 提示细胞的氧化应激程度较高; 而芥菜籽提取物 + ox-LDL 组细胞 LPO 蓄积低于 PBS + ox-LDL 组, 表明芥菜籽提取物有降低腹腔巨噬细胞氧应激反应的能力 (图 3)。

2.4 芥菜籽提取物对 ox-LDL 诱导的小鼠巨噬细胞 CD36 表达的影响

对照组巨噬细胞表达的 CD36 水平较低, 在给予 ox-LDL 刺激后, CD36 表达明显增多, 而芥菜籽提取物可有效抑制 ox-LDL 诱导的 CD36 表达 (PBS + ox-LDL 组 CD36 水平为 91.44 ± 9.07 , 芥菜籽提取物 + ox-LDL 组 CD36 水平为 49.52 ± 2.01 ; 图 4)。

2.5 芥菜籽提取物对小鼠巨噬细胞中性脂肪的影响

静息状态下的巨噬细胞 LipidTox 的荧光强度较

低; ox-LDL 刺激 24 h 后 LipidTox 荧光强度明显增高, 提示有大量中性脂肪堆积; 而芥菜籽提取物 + ox-LDL 组巨噬细胞中性脂肪的蓄积与 PBS + ox-LDL 组相比明显降低 (图 5)。

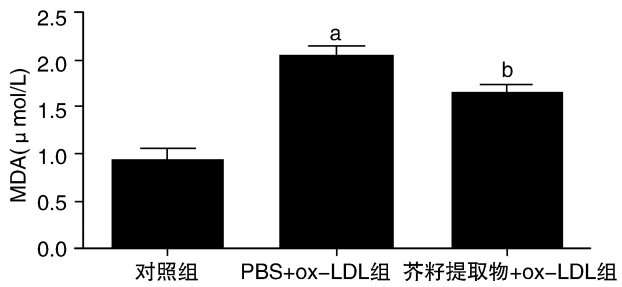


图 3. 芥菜籽提取物对 ox-LDL 诱导的小鼠巨噬细胞 LPO 的作用 a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 PBS + ox-LDL 组比较。

Figure 3. Role of Sinapis alba extract on macrophage LPO level induced by ox-LDL

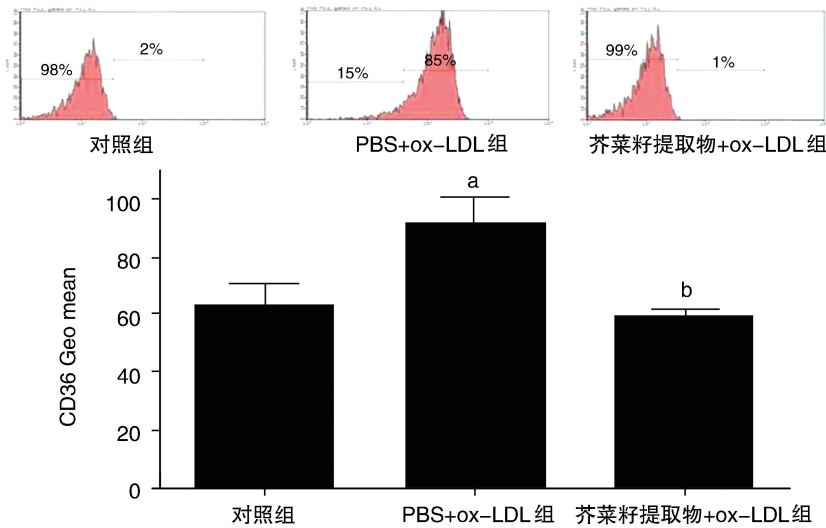


图 4. 芥菜籽提取物对 ox-LDL 诱导的小鼠巨噬细胞 CD36 表达的影响 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 PBS + ox-LDL 组比较。

Figure 4. Effect of Sinapis alba extract on macrophage CD36 expression induced by ox-LDL

2.6 芥菜籽提取物对脂质斑块形成的作用

对照组中仅有少量脂质斑块, 高脂饲料喂养的小鼠血管内壁有着明显增多的脂质斑块, 而高脂 + 7.5% 芥菜籽组脂质斑块面积与高脂组比较有着显著的下降 (图 6)。

3 讨论

ox-LDL 可以经过激活细胞内 NADPH 氧化酶, 诱导巨噬细胞呼吸爆发^[8]。静止状态下的 NADPH 氧化酶有 6 个亚基, 即 gp91^{phox}、p22^{phox}、p47^{phox}、

p67^{phox}、p40^{phox} 和 Rac, 其中 gp91^{phox} 和 p22^{phox} 亚基位于膜上, 而其它的则在胞浆中。巨噬细胞一旦被激活, NADPH 氧化酶在胞浆中的亚基则会迁移到质膜上, 与 gp91^{phox} 和 p22^{phox} 亚基组装成完整的酶复合体, 发挥作用。NADPH 氧化酶可以被看成是与质膜结合的微小的电子传递链, 它能够将分子氧通过单电子还原产生过氧化自由基, 并以此为基础形成一系列二级产物, 这些产物通称活性氧 (reactive oxygen species, ROS)^[9]。本研究发现, 芥菜籽提取物可以大大地减少 ox-LDL 诱导的巨噬细胞呼吸爆发, 其背后的原理, 一是可能其具有极强的抗氧化能

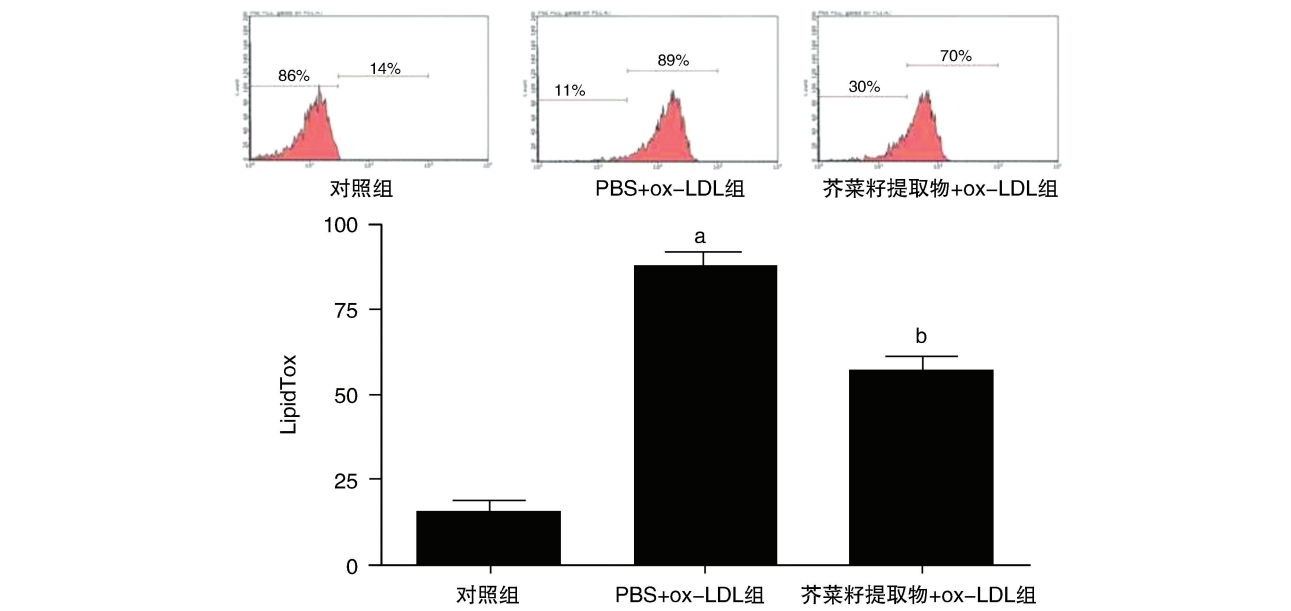


图 5. 芥菜籽提取物对小鼠巨噬细胞中性脂肪的影响 a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 PBS + ox-LDL 组比较。
Figure 5. Effect of Sinapis alba extract on macrophage neutral fat accumulation

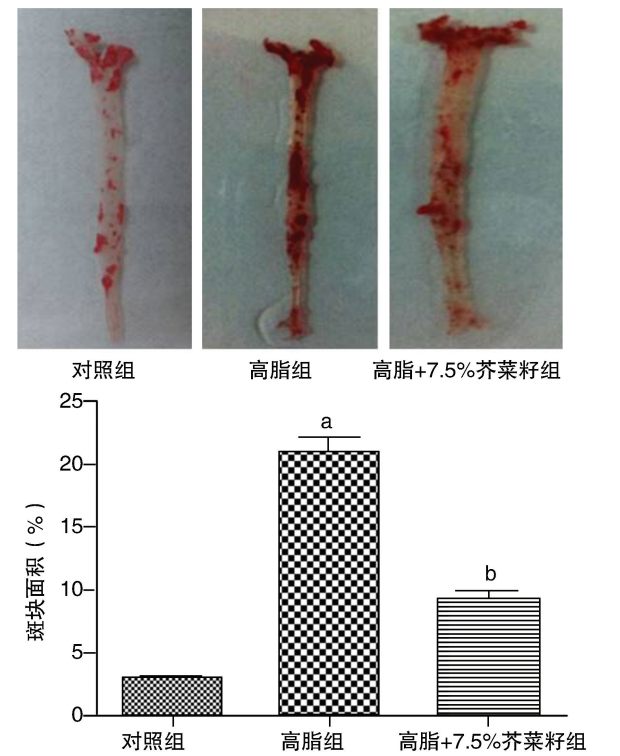


图 6. 芥菜籽提取物对脂质斑块形成的作用 a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高脂组比较。
Figure 6. Role of Sinapis alba extract in the plaque formation

力,从而淬灭由 NADPH 氧化酶释放的自由基;另一种可能性是它本身就具有调节 NADPH 氧化酶的能力。有报道显示,p47^{phox} 和 p67^{phox} 被磷酸化激活,才能从胞浆中迁移到质膜上。芥菜籽提取物是否有调节磷酸化 NADPH 氧化酶亚基的激酶的作用等,

则是我们下一步需要进行的深入研究。

活性氧能攻击生物膜磷脂中的多聚不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,形成脂质过氧化物。脂质过氧化可破坏细胞膜的功能,还能产生多种活泼的自由基,攻击蛋白和酶。脂质过氧化物可以分解成醛、酮、醇、醚、羧酸等产物,其中产生的以丙二醛为代表的醛类具有毒性,可与蛋白质、核酸、脑磷脂等含氨基化合物反应,破坏其功能。这些氧自由基同时还可以攻击线粒体膜上的脂质,使其过氧化,而破坏线粒体膜的稳定结构,造成线粒体高能电子和氧自由基的释放。本研究发现芥菜籽提取物可明显降低 ox-LDL 诱导的 LPO 水平,减少自由基的产生。更有重要意义的发现是,芥菜籽提取物可以降低全身的 LPO 水平(血浆 LPO),提示它的抗氧化能力极强。我们同时还研究了白藜芦醇和云芝多糖的全身作用(结果未显示),芥菜籽提取物是唯一可以降低全身 LPO 水平的提取物,说明它有极高的临床应用价值。

在细胞内,活性氧可作为第二信使诱导细胞产生一系列氧化应激反应,包括细胞骨架的改变,释放细胞因子以及表达细胞膜蛋白、受体。巨噬细胞清除 ox-LDL 的清道夫受体 CD36 也受活性氧的调控^[10]。以往的研究证明,ox-LDL 诱导的 CD36 表达,是经过 MAPK 激酶通路调节的。ox-LDL 激活 p38 蛋白激酶,而 p38 蛋白激酶抑制剂特异而有效地阻断 ox-LDL 诱导的 CD36 的表达。进一步的研究显示,p38 蛋白激酶是通过调节 PPAR γ 的活性调

控 CD36 的表达的^[11]。因此,氧化应激对 CD36 的表达,有重要的调节作用。本研究结果显示,芥菜籽提取物有抑制 ox-LDL 诱导 CD36 表达的作用,同时还发现芥菜籽提取物可以有效地减少 ox-LDL 引起的巨噬细胞内中性脂肪的蓄积。其主要机制可能是它的抗氧化功能起作用。芥菜籽提取物的主要成分为多糖,而多糖的直接的抗氧化作用已经有了广泛的报道,多糖淬灭巨噬细胞激活产生的氧自由基,阻断自由基作为第二信使的进一步反应,阻断 CD36 的表达。其下调 CD36 的机制因而可能也包括阻滞 MAPK 家族成员对 PPAR γ (CD36 调控的关键蛋白)的磷酸化作用。

综上所述,芥菜籽具有极强的抗氧化作用和预防动脉粥样硬化早期病变的功效,具有良好的药物和保健食品开发前景。

[参考文献]

- [1] Libby P, Ridker PM, Hansson, GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54 (23): 2 129-138.
- [2] Silverstein RL. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36[J]. Cleve Clin J, 2009, 76 (2): S 27-30.
- [3] Itabe H. Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2009, 37 (1): 4-11.
- [4] Yusuf MA, Sarin NB. Antioxidant value addition in human diets: genetic transformation of Brassica juncea with gam-

ma-TMT gene for increased alpha-tocopherol content[J]. Transgenic Res, 2007, 16 (1): 109-113.

- [5] 吴红京, 段建平. 高效液相色谱测定白芥子 β -谷甾醇的研究[C]. 第十五次全国色谱学术报告会文集, 2006; 442-443.
- [6] 林春榕, 吴学东, 狄勇, 等. 人血浆脂蛋白(a)的分离纯化[J]. 大理医学院学报, 2001, 10 (3): 3-5.
- [7] 胡兵, 汪俊军, 张春妮, 等. 类风湿关节炎患者丙二醛修饰型低密度脂蛋白及低密度脂蛋白循环免疫复合物水平分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (4): 296-298.
- [8] Jacobs M, Plane F, Bruckdorfer KR. Native and oxidized low-density lipoproteins have different inhibitory effects on endothelium-derived relaxing factor in the rabbit aorta[J]. Br J Pharmacol, 1990, 100 (1): 21-26.
- [9] Leto TL, Morand S, Hurt D, et al. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11 (24): 2 607-619.
- [10] Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, et al. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation[J]. Cell Metab, 2006, 4 (3): 211-221.
- [11] Zhao M, Liu Y, Wang X, et al. Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL[J]. APMIS, 2002, 110 (6): 458-468.

(此文编辑 文玉珊)