

硫酸锌对高脂喂养载脂蛋白 E 基因敲除小鼠心脏抗氧化作用的研究

蒋金金 丁世彬 王慧峰 董闻平 汤嘉宁

【摘要】 目的 探讨硫酸锌对高脂喂养载脂蛋白 E (ApoE) 基因敲除小鼠心脏的抗氧化作用。**方法** ApoE基因敲除小鼠分为高脂模型组、低锌剂量组和高锌剂量组,三组小鼠连续 14 周喂饲高脂饲料制作动脉粥样硬化模型,除正常对照组和高脂模型组自由饮用去离子水外,其余两组给予高脂饲料喂养的同时分别自由饮用浓度为 2.5 mmol/L、25 mmol/L 硫酸锌水溶液分别作为低锌剂量组和高锌剂量组。测定小鼠的体重、心重指数、心脏组织的抗氧化能力和金属硫蛋白-I 型(MT-1) mRNA 的表达水平。**结果** 低锌剂量组和高锌剂量组小鼠的体重和体重增量明显降低($P < 0.05$);高脂模型组、低锌剂量组和高锌剂量组小鼠心重指数明显高于正常对照组($P < 0.05$);低锌剂量组和高锌剂量组小鼠的总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)水平均明显高于正常对照组和高脂模型组($P < 0.01$);但低锌剂量组和高锌剂量组小鼠的丙二醛(MDA)水平明显低于正常对照组和高脂模型组($P < 0.01$);高锌剂量组小鼠心脏组织中 MT-1 mRNA 水平明显高于高脂模型组($P < 0.05$)。**结论** 硫酸锌能够明显增强高脂喂养 ApoE 基因敲除小鼠心脏的抗氧化能力,而 MT 可能在抗氧化过程中具有重要作用。

【关键词】 动脉粥样硬化; 硫酸锌; 抗氧化剂

The antioxidative effect of zinc sulfate on heart of ApoE-knockout mice fed with high fat diet JIANG Jin-jin, DING Shi-bin, WANG Hui-feng, DONG Wen-ping, TANG Jia-ning. The First Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: TANG Jia-ning, Email: jianingtang@163.com

【Abstract】 Objective To study the antioxidative effect of zinc sulfate on heart of ApoE-knockout mice fed with high fat diet. **Methods** The ApoE-knockout mice were divided into high fat model group, low-dose group, high-dose group and all the mice were fed with high fat diet for 14 weeks. The C57BL/6J were took as normal control group. The normal control group and high fat model group mice drank deionized water, and both low-dose group and high-dose group mice drank 2.5 mmol/L and 25 mmol/L zinc sulfate respectively. We determined the body weight, the heart/weight index, antioxidant capacity and MT-1 mRNA level of heart. **Results** The body weight and weight gain of low-dose group and high-dose group mice were significantly decreased ($P < 0.05$), the heart weight index of normal control group was remarkably lower than the other three groups ($P < 0.05$). The total antioxidant capacity and superoxide dismutase of low-dose group and high-dose group mice were significantly higher than the other two groups ($P < 0.01$), but the malondialdehyde of low-dose group and high-dose group mice were significantly lower than the other two groups ($P < 0.01$). The heart's MT-1 mRNA level of high-dose group mice was significantly higher than high fat model group mice ($P < 0.05$). **Conclusions** Zinc sulfate could significantly improve heart's antioxidant capacity of ApoE-knockout mice fed with high fat diet, and metallothionein may play an active role in the process of antioxidation.

【Key words】 Atherosclerosis; Zinc sulfate; Antioxidants

动脉粥样硬化是一种多因素疾病,涉及基因、环

境、代谢等诸多因素。近年研究显示,氧化应激是动脉粥样硬化发生发展的重要因素,贯穿于动脉粥样硬化斑块的形成、发展以及破裂并触发临床事件的始终^[1];高脂喂养通过增强自由基产生的线粒体呼吸链增加了可获得的氧化底物和自由基的数量^[2],还会造成肝脏中脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的增加^[3];并且有研究报道饮食导致的肥胖可对抗氧化防御系统产生损

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.08.024

基金项目:太原市科学技术发展计划项目(11016224)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第一临床医学院(蒋金金);华中科技大学同济医学院公共卫生学院(丁世彬);山西医科大学附属太原总医院心内科(王慧峰、董闻平、汤嘉宁)

通讯作者:汤嘉宁,Email:jianingtang@163.com

害^[4]。而锌具有抗氧化作用,在清除氧自由基过程中发挥重要作用^[5]。目前补锌对于高脂造成动脉粥样硬化小鼠心脏氧化应激损伤影响的研究甚少。本实验主要探讨硫酸锌对高脂喂养载脂蛋白 E(AopE)基因敲除小鼠模型心脏氧化损伤的保护作用及可能的作用机制。

材料与方 法

一、实验动物

8周龄清洁级雄性纯合子 AopE 基因敲除小鼠 18 只,购自北京大学医学部动物中心[合格证号为 SCXK(京)2006-0008];8周龄清洁级 C57BL/6J 小鼠 6 只,购自北京维通利华实验动物中心[合格证号为 SCXK(京)2006-0009]。实验动物饲养于山西医科大学屏障动物房,动物房内室温为 20~24℃,湿度为 40%~60%,光暗周期各 12 h,分笼饲养,每笼 1 只。小鼠随机分笼,自由饮水,喂饲颗粒饲料,小鼠适应性喂养 1 周。

二、主要试剂和仪器

1. 试剂:七水合硫酸锌(天津博迪化工股份有限公司,分析纯);胆固醇(美国 Amresco 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术研究所);总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、MDA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);Trizol(Invitrogen 公司);SYBR[®] Premix Ex Taq[™](Perfect Real Time)和 PrimeScript[®] RT Master Mix(Perfect Real Time)(宝生物工程(大连)有限公司)。

2. 主要仪器:7900HT 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),电动匀浆器(美国 Pro 公司),ES-C600 电子天平,B-260 型恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂),5804R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

三、实验方法

1. 动脉粥样硬化动物模型的建立:以 AopE 基因敲除小鼠和 C57BL/6J 小鼠建立动物模型。小鼠适应性喂养 1 周后,连续 14 周饲以“西方类型”膳食(其中胆固醇含量为 0.15%,脂肪含量为 21%)^[6]。

2. 实验动物处理:实验以 6 只 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组,并将 AopE 基因敲除小鼠随机分为 3 组,分别为高脂模型组、低锌剂量组和高锌剂量组,每组 6

只。四组小鼠均喂饲高脂饲料,在高脂喂养的同时,除正常对照组和高脂模型组连续自由饮用去离子水外,低锌剂量组和高锌剂量组小鼠分别连续 14 周自由饮用 2.5 mmol/L 和 25 mmol/L 的硫酸锌水溶液。

每天观察、记录小鼠活动、反应、进食、皮毛、粪便等情况。于末次给予小鼠受试物 24 h 后,小鼠眼眶取血置于离心管中,脱颈处死小鼠,观察内脏变化,迅速分离心脏等组织。

3. 心重指数和生化指标的测定

(1)心重指数:取各组小鼠心脏,称重量,计算心重指数:心重指数=心脏重量/体重。

(2)生化指标的检测:心脏组织匀浆总蛋白、T-AOC、SOD 和 MDA 的检测均按照试剂盒说明书操作。

(3)Real-Time PCR 检测小鼠心脏金属硫蛋白-I 型(MT-1)mRNA 水平:小鼠处死后分离心脏,液氮冷冻后迅速置于 -80℃ 冰箱保存。按 Trizol 法提取总 RNA,逆转录为 cDNA 后扩增。反应体系在 ABI7900HT 型荧光定量 PCR 仪上进行。引物序列如下:GAPDH: sense primer 5'-AGGCCGGTGCTGAGTATGTC-3', Anti-sense primer 5'-TGCCTGCTTCACCACCTTCT-3'; MT-1: sense primer 5'-TCTAAGCGTCACCACGACTTCA-3', Anti-sense primer 5'-GTGCACCTTGCAGTCTTGCAG-3'。

四、统计学分析

计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验数据采用 SPSS 16.0 软件统计分析,数据如符合正态分布,用单因素方差分析,用 LSD 法、Dunnett T3 法进行两两比较;如不服从正态分布,用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组实验动物体重和心重指数比较(表 1):低锌剂量组和高锌剂量组小鼠体重均明显低于正常对照组和高脂模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);正常对照组和高脂模型组小鼠体重没有差异。高脂模型组、低锌剂量组和高锌剂量组心重指数明显高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2. 各组实验动物心脏抗氧化指标比较(表 2):低

表 1 各组实验动物体重和心重指数比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	初体重(g)	末体重(g)	体重增量(g)	心重指数(%)
正常对照组	21.52 ± 0.79	27.25 ± 1.25	5.73 ± 1.96	0.526 ± 0.0175
高脂模型组	22.58 ± 0.67	26.95 ± 0.80	4.37 ± 1.19	0.612 ± 0.0447 ^a
低锌剂量组	22.13 ± 0.50	24.88 ± 0.24 ^{ab}	2.75 ± 0.60 ^{ab}	0.589 ± 0.0322 ^a
高锌剂量组	21.87 ± 0.81	24.40 ± 0.81 ^{ab}	2.53 ± 0.41 ^{ab}	0.574 ± 0.0391 ^a

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与高脂模型组比较,^b $P < 0.05$

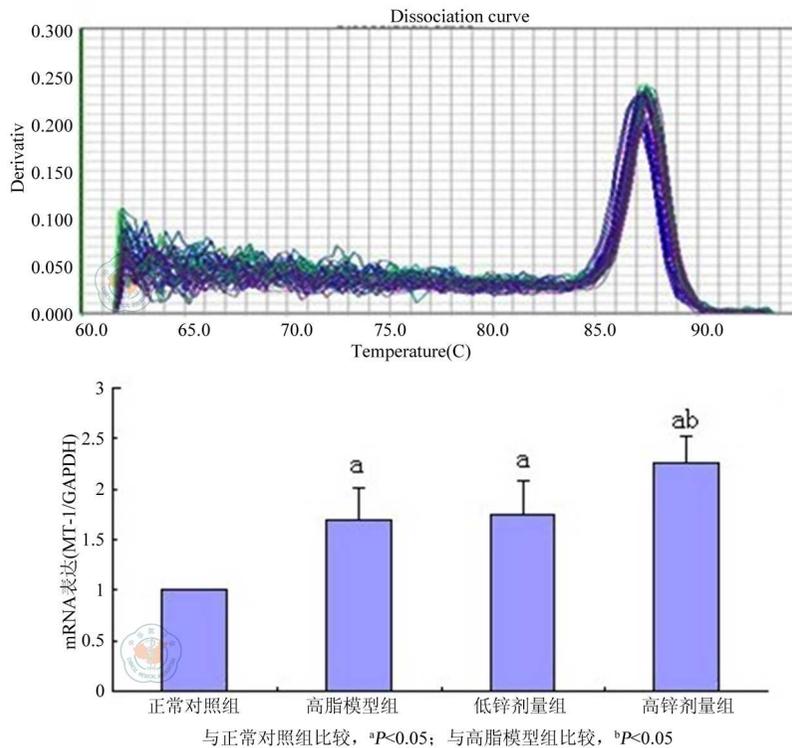


图1 硫酸锌对小鼠心脏MT-1 mRNA 表达的影响

表2 各组实验动物心脏抗氧化指标比较(n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	T-AOC(U/mg prot)	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
正常对照组	0.77 ± 0.04	1.29 ± 0.06	5.35 ± 0.27
高脂模型组	0.67 ± 0.13	1.27 ± 0.06	5.29 ± 0.46
低锌剂量组	1.15 ± 0.16 ^{ab}	1.70 ± 0.13 ^{ab}	3.90 ± 0.14 ^{ab}
高锌剂量组	1.20 ± 0.15 ^{ab}	1.91 ± 0.25 ^{ab}	3.99 ± 0.39 ^{ab}

注:与正常对照组比较, ^aP < 0.01; 与高脂模型组比较, ^bP < 0.01

锌剂量组和高锌剂量组的 T-AOC 和 SOD 水平均明显高于正常对照组和高脂模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 低锌剂量组和高锌剂量组的 MDA 水平均明显低于正常对照组和高脂模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3. 硫酸锌对小鼠心脏 MT-1 mRNA 表达的影响 (图 1): 与对照组相比, 高脂模型组、低锌剂量组和高锌剂量组显著升高 MT-1 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$); 而加硫酸锌干预后低锌剂量组和高锌剂量组 MT-1 mRNA 表达水平均有上升, 其中高锌剂量组与高脂模型组比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

氧化应激与冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)的发病机制密切相关^[1]; 并且一般认为高脂饮食导致的氧化应激在冠心病的发展中具有活跃的作用^[7]。因此, 探讨高脂饮食模式对动脉粥样硬化过程

中心血管系统的氧化损伤作用具有重要意义。本实验模拟人体“西方膳食”, 对 ApoE 基因敲除小鼠进行高脂喂养, 并同时用不同浓度硫酸锌进行干预。

本次实验发现低锌剂量组和高锌剂量组小鼠的体重和体重增重明显降低, 这可能是因为小鼠饮用硫酸锌可以增加锌 $\alpha 2$ 糖蛋白的合成, 而锌 $\alpha 2$ 糖蛋白能够以时间和剂量依赖性的方式减少小鼠体质量, 其中以脂肪的减少为主, 肌肉含量没有改变^[8]。

本次实验结果显示, 低剂量锌组和高剂量锌组小鼠心脏组织 T-AOC 和 SOD 水平增高, 并且随着硫酸锌浓度的增加, T-AOC 和 SOD 也有增加的趋势, 而脂质过氧化产物 MDA 的含量明显降低, 这说明锌干预能够提高小鼠心脏抗氧化能力, 改善高脂引起的心脏组织氧化损伤, 这与孙忠等^[9]的实验结果一致。

有研究显示, 心脏中 MT 具有明显的抗氧化作用^[10], 并且锌是 MT 的强诱导剂^[11]。通过进一步实验还发现, 硫酸锌干预组小鼠心脏组织中 MT-1 mRNA 水平高于高脂模型组, 并且心脏组织中 MT-1 mRNA 的水平与硫酸锌具有剂量依赖关系, 随着硫酸锌浓度的增加而增加。心脏组织中的 T-AOC 和 SOD 水平与 MT-1 mRNA 的水平具有相同趋势, 这进一步确证了心脏组织抗氧化能力的提高可能是通过锌诱导心脏中 MT 的增加实现的。

综上所述, 适当剂量地长期补锌能够降低高脂膳食对小鼠心血管系统的氧化损害。因此, 日常合理补

锌对于降低我国心血管疾病的发病率具有重大的社会价值和现实意义。

参 考 文 献

- [1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2005, 352:1685-1695.
- [2] Nadal-Casellas A, Amengual-Cladera E, Proenza AM, et al. Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 26:291-302.
- [3] 王一平, 谭华炳, 王记红, 等. 非酒精性脂肪性肝病兔肝组织甘油三酯、丙二醛、超氧化物歧化酶与血浆内皮素的关系[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011:971-974.
- [4] Gomez-Perez Y, Amengual-Cladera E, Catala-Niell A, et al. Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. *Cell Physiol Biochem*, 2008, 22:539-548.
- [5] Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 2011, 283:65-87.
- [6] Sasaki T, Kuzuya M, Nakamura K, et al. AT1 blockade attenuates atherosclerotic plaque destabilization accompanied by the suppression of cathepsin S activity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 2010, 210:430-437.
- [7] Lee JH, Son CW, Kim MY, et al. Red beet (*Beta vulgaris* L.) leaf supplementation improves antioxidant status in C57BL/6J mice fed high fat high cholesterol diet. *Nutr Res Pract*, 2009, 3:114-121.
- [8] Russell ST, Zimmerman TP, Domin BA, et al. Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc-alpha2-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1636:59-68.
- [9] 孙忠, 吴蕴棠, 车素萍, 等. 锌对糖尿病大鼠血脂及脂质过氧化作用的影响. *天津医科大学学报*, 2001:171-173.
- [10] Kang YJ. The antioxidant function of metallothionein in the heart. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999, 222:263-273.
- [11] Palmiter RD. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91:1219-1223.
- 蒋金全, 丁世彬, 王慧峰, 等. 硫酸锌对高脂喂养载脂蛋白 E 基因敲除小鼠心脏抗氧化作用的研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(8):2071-2074.

(收稿日期: 2011-12-21)

(本文编辑: 张岚)

中华医学协会