

α -硫辛酸对高盐诱导的大鼠高血压反应过程的抑制作用*

胥艳¹,袁丹¹,刘东亮¹,王宇¹,朱蜀侠¹,苟伟^{2△}

(1.四川省成都市 363 医院泌尿外科 610000;2.西南医科大学附属医院神经内科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 研究 α 硫辛酸能否抑制头端延髓腹外侧区(RVLM)线粒体中活性氧(ROS)的过量产生来缓解高盐诱导的高血压反应。**方法** 将雄性大鼠 32 只分配到两组:分别给予正常盐饮食(0.3% NaCl)8 周($n=16$)和高盐饮食(8% NaCl)8 周($n=16$,诱导高血压模型)。之后将正常盐饮食大鼠及高盐饮食大鼠各自再分别分为两组,每两组分别给予溶于 0.9% 生理盐水的 α 硫辛酸(60 mg/kg)或单独给予生理盐水灌胃饲养 9 周。由此共 4 组,即:实验组($n=8$,高血压模型样本喂养 α 硫辛酸)、模型组($n=8$,高血压模型样本喂养生理盐水)、对照组($n=8$,正常盐饮食样本喂养 α 硫辛酸)和空白对照组($n=8$,正常盐饮食样本喂养生理盐水)。监测各组样本动脉压的变化并在实验结束时通过免疫荧光检测超氧化物含量表达情况,Western blot 检测头端延髓腹外侧区内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸[NAD(P)H]氧化酶 2(NOX2)、NOX4 及铜/锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)的表达情况;用 ELISA 测定 RVLM 中线粒体丙二醛(MDA)等氧化应激相关物质的表达差异。**结果** 实验组平均动脉压(MAP)低于模型组差异有统计学意义($P<0.05$);实验组与模型组二氢乙啶(DHE)荧光强度分别为 60.2 ± 3.1 、 99.1 ± 3.8 ;Cu/Zn-SOD 阳性神经元的数量分别为 (20.8 ± 1.1) 、 (6.9 ± 1.2) 个;NOX2 阳性神经元数量分别为 (12.3 ± 3.5) 、 (25.1 ± 5.4) 个;NOX4 阳性神经元数量分别为 (10.1 ± 2.2) 、 (13.3 ± 4.1) 个,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 显示实验组与模型组 NOX2 水平分别为 78.9 ± 2.0 、 112.7 ± 3.8 ;NOX4 水平分别为 63.2 ± 2.1 、 99.4 ± 1.7 ;实验组与模型组 RVLM 中 Cu/Zn-SOD 水平分别为 19.7 ± 1.6 、 10.3 ± 1.2 ,差异均有统计学意义($P<0.05$);线粒体超氧化物歧化酶(SOD)水平分别为 (33.1 ± 3.8) 、 (15.2 ± 1.7) U/mg,差异均有统计学意义($P<0.05$)。实验组与模型组线粒体谷胱甘肽(GSH)水平分别为 (5.2 ± 0.9) 、 (2.3 ± 0.5) $\mu\text{mol/g}$;血清去甲肾上腺素(NE)水平分别为 (325.8 ± 7.3) 、 (467.9 ± 6.1) pg/mL,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** α 硫辛酸可通过降低 NOX2 和 NOX4 的表达、线粒体酶生物能量及提高高血压发展中的 RVLM 在细胞内的抗氧化能力来抑制高血压发展过程的氧化应激反应。

[关键词] α 硫辛酸;氧化应激;头端延髓腹外侧区;高钠盐诱发的高血压**[中图分类号]** R690**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)13-1716-04

The inhibitory effect of α -lipoic acid on the high salt-induced hypertension rats*

XU Yan¹, YUAN Dan¹, LIU Dongliang¹, WANG Yu¹, ZHU Shuxia¹, GOU Wei^{2△}

(1. Department of Urology, Chengdu 363th Hospital, Chengdu, Sichuan 610000, China; 2. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether the excessive production of reactive oxygen species (ROS) in the mitochondria of the rostral ventrolateral medulla (RVLM) can inhibit the high salt-induced hypertension response. **Methods** A total of 32 male rats were divided into two groups: two groups were given normal salt diet (0.3% NaCl) for 8 weeks ($n=16$) and high salt diet (8% NaCl) for 8 weeks ($n=16$, induced hypertension model) respectively. The two groups were divided into four groups, two groups were given α -lipoic dissolving in 0.9% normal saline (60 mg/kg), two groups were fed with saline for 9 weeks. There were four groups: the experimental group ($n=8$, the hypertension model sample fed α -lipoic acid), the model group ($n=8$, the hypertension model sample fed saline), the control group ($n=8$, normal salt diet sample fed α -lipoic acid) and the blank control group ($n=8$, normal salt diet sample fed saline). Monitored the change of the arterial pressure and detected the expression of superoxide by immunofluorescence at the end of the experiment, measured the expression of NAD(P)H NOX2, NOX4 and Cu/Zn-SOD in RVLM by Western blot; determined the expression differences of oxidative stress related substances such as mitochondrial malondialdehyde(MDA) in RVLM by ELISA. **Results** The mean arterial pressure (MAP) in the experimental group was lower than

* 基金项目:四川省卫生计生厅科学研究项目(120446)。 作者简介:胥艳(1982-),主治医师,本科,主要从事泌尿外科工作。 △ 通信作者, E-mail: herezcis@163.com。

that in the model group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); in the experimental group and the model group the intensities of fluorescent-labeled dihydroethidium (DHE) were $60.2 \pm 3.1, 99.1 \pm 3.8$; the numbers of positive neurons in Cu/Zn-SOD were $20.8 \pm 1.1, 6.9 \pm 1.2$; the numbers of NOX2 positive neurons were $12.3 \pm 3.5, 25.1 \pm 5.4$; the numbers of NOX4 positive neurons were $10.1 \pm 2.2, 13.3 \pm 4.1$, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Western blot showed that the NOX2 levels of the experimental group and the model group were $78.9 \pm 2.0, 112.7 \pm 3.8$; the levels of NOX4 were $63.2 \pm 2.1, 99.4 \pm 1.7$. The levels of Cu/Zn-SOD in RVLM of the experimental group and the model group were $19.7 \pm 1.6, 10.3 \pm 1.2$, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the levels of mitochondrial superoxide dismutase (SOD) were $(33.1 \pm 3.8), (15.2 \pm 1.7)$ U/mg, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The levels of mitochondrial glutathione (GSH) in the experimental group and the model group were $(5.2 \pm 0.9), (2.3 \pm 0.5)$ $\mu\text{mol/g}$; the levels of norepinephrine (NE) were $(325.8 \pm 7.3), (467.9 \pm 6.1)$ pg/mL, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** α -lipoic acid could decrease the expression of NOX2, NOX4 and the bioenergy of mitochondria enzyme, and increase the intracellular antioxidant ability in the RVLM during the development of hypertension to inhibit the oxidative stress response in the development of hypertension.

[Key words] α -lipoic acid; oxidative stress; rostral ventrolateral medulla; high salt-induced hypertension

高盐摄入作为一个重要的环境因素,在高血压的发生、发展中起着重要的作用^[1]。据报道,活性氧(reactive oxygen species, ROS)在头端延髓腹外侧区(rostral ventrolateral medulla, RVLM)中的过量产生与高盐诱发的高血压的发生明显相关^[2]。相关研究显示,它可在体内代谢产生抑制 ROS 的抗氧化物质^[3-4]。最新研究提示, α 硫辛酸能够降低血压,并通过抵制过氧化物损伤而保护机体减轻心血管疾病所带来的危害^[5]。因此,本研究旨在探讨补充 α 硫辛酸能否抑制 RVLM 中的 ROS 的产生从而对高盐诱发的高血压产生抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料来源 成年雄性大鼠,清洁级,120~150 g,由南京模型动物研究所提供。

1.2 试剂与仪器 胎牛血清购自美国 Santa Cruz 公司;还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸[NAD(P)H]氧化酶 2(NOX2)、NOX4、铜/锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)及 β -actin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;鼠二抗购自美国 Abcam 公司; α 硫辛酸(规格 300 mg : 12 mL)购自武汉天翼有限公司;电化学发光试剂盒购自美国 Abcam 公司。

1.3 大鼠高血压模型的建立和实验分组^[6] 将雄性大鼠 32 只随机分配到两组:两组分别给予正常盐饮食(0.3% NaCl)8 周($n=16$)和高盐饮食 8 周(8% NaCl)(诱导高血压模型)($n=16$)。之后将正常盐饮食大鼠及高盐饮食大鼠各自再分别分为两组,每两组分别给予溶于 0.9% 生理盐水的 α 硫辛酸(60 mg/kg)或单独给予生理盐水灌胃饲养 9 周。由此共 4 组,即:实验组($n=8$,高血压模型样本喂养 α 硫辛酸)、模型组($n=8$,高血压模型样本喂养生理盐水)、对照组($n=8$,正常盐饮食样本喂养 α 硫辛酸)和空白对照组($n=8$,正常盐饮食样本喂养生理盐水)。

1.4 方法

1.4.1 血压监测 所有大鼠动脉压通过尾套仪器测量及系统记录。血压测量从实验第 7 周开始,每天测量 3 次。取平均值,直至实验结束。

1.4.2 实验标本制作 将氯胺酮(90 mg/kg)和甲苯噻嗪(10 mg/kg)混合麻醉大鼠。取标本。用 Palkovits's 显微解剖技术收集 RVLM 组织^[7]。-80 °C 冻存。

1.4.3 NOX2、NOX4 及 Cu/Zn-SOD 的测定 大鼠面颌神经核尾端周围 500~700 μm 的区域被确认为 RVLM。解剖大鼠获得标本后切片装载固定,-80 °C 储存。免疫组织化学和免疫荧光标记在流动截面上进行,一抗分别为 NOX2 (sc-20782, Santa Cruz, 1 : 200)、NOX4 (sc-5827, Santa Cruz, 1 : 200)及(Cu/Zn-SOD, sc-11407, Santa Cruz, 1 : 200)。用来做免疫组织化学的脑组织用羊抗兔二抗(Histostain™-Plus IHC Kit, SP-9001, Zsfg-Bio, China)孵育。用二氨基联苯胺(3,3-diaminobenzidine, DAB)试剂盒(AR 1002, Boster, China)染色。一抗 NOX2 (sc-20782, Santa Cruz, 1 : 400)、NOX4 (sc-5827, Santa Cruz, 1 : 400)及 Cu/Zn-SOD (sc-11407, Santa Cruz, 1 : 200)。

1.4.4 ELISA 测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽(GSH) 用 ELISA 试剂盒(In-vitrogen Corporation, CA, USA)对上述指标进行定量检测。

1.4.5 高效液相色谱法检测血清去甲肾上腺素(NE)水平 用高效液相色谱法检测血清 NE 水平。全心质量/体质量(whole heart weight/body weight, WHW/BW),全心质量/胫骨长度(whole heart weight/tibia length, WHW/TL)及左心室重量/胫骨长度(left-ventricular weight/tibia length, LVW/TL)作为心肌肥厚的指标被检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学

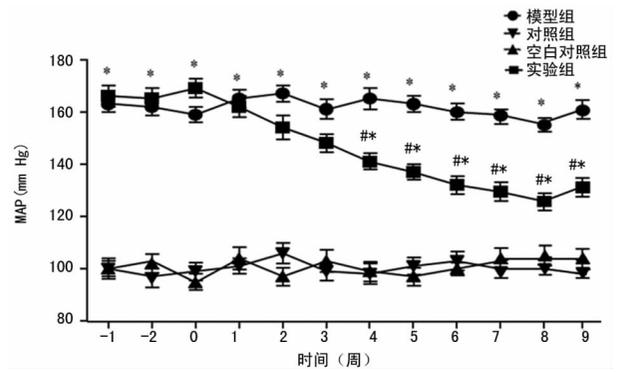
分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用方差分析模型比较不同组之间的差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 给药后各组平均动脉压(MAP)的变化 给药后第 8 周, 模型组平均动脉压为 (162.4 ± 11.3) mm Hg、空白对照组为 (106.2 ± 10.1) mm Hg, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组平均动脉压为 (129.1 ± 8.9) 、实验组为 (159.4 ± 9.2) mm Hg, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 免疫荧光显示给药后 RVLM 中 NOX2、NOX4 阳性神经元的表达情况 免疫荧光结果显示, 模型组较空白对照组中表达 NOX2 和 NOX4 的阳性神经元要高。给药后 9 周, 实验组和模型组 RVLM 中表达 NOX2 和 NOX4 的阳性神经实验组较模型组中表达

NOX2 和 NOX4 的阳性神经元要低, 见图 2。



*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与模型组比较

图 1 各组 MAP 的变化

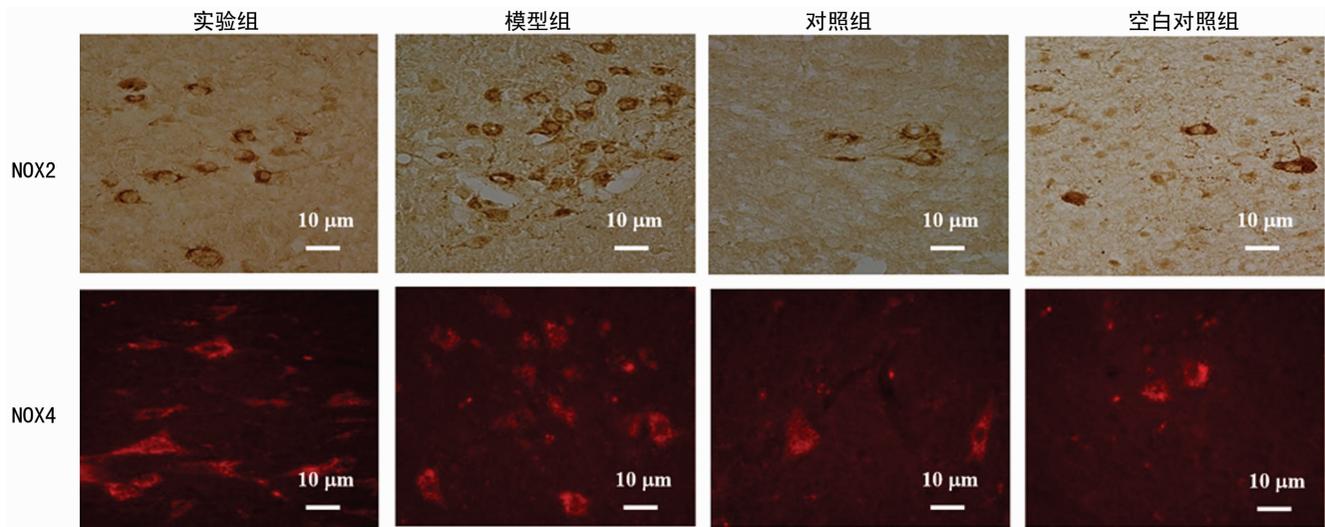


图 2 免疫荧光显示给药后 RVLM 中 NOX2、NOX4 阳性神经元的表达情况 ($\times 40$)

2.3 模型建立后和给药后 9 周各组 RVLM 中二氢乙啶(DHE)荧光强度和 Cu/Zn-SOD 阳性神经元的表达情况 模型建立后, 免疫荧光结果显示模型组和空白对照组 RVLM 中 Cu/Zn-SOD 的阳性神经元数量分别为 (9.2 ± 2.1) 、 (32.4 ± 4.6) 个, 空白对照组明显高于模型组 ($P < 0.05$), 二氢乙啶(DHE)荧光强度分别为 86.5 ± 3.4 和 22.3 ± 1.7 , 模型组明显高于空白对照组 ($P < 0.05$); 给药后, 实验组与模型组 RVLM 中 Cu/Zn-SOD 水平分别为 19.7 ± 1.6 、 10.3 ± 1.2 , 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组和模型组二氢乙啶(DHE)荧光强度分别为 63.4 ± 2.9 和 101.3 ± 4.1 , 实验组明显低于模型组 ($P < 0.05$)。

2.4 模型建立后及给药后 9 周各组 RVLM 中 NOX2、NOX4 表达情况 模型建立后, Western blot 结果显示, 模型组和空白对照组 RVLM 中 NOX2 和 NOX4 蛋白表达 (OD 值) 分别为模型组 NOX2: 103.6 ± 4.1 , NOX4: 114.5 ± 3.2 ; 空白对照组 NOX2: 24.6 ± 1.9 , NOX4: 32.1 ± 3.0 , 模型组和空白对照组表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 给药后 9 周, 实

验组和模型组 NOX2 和 NOX4 蛋白表达分别为实验组 NOX2: 80.2 ± 1.7 , NOX4: 65.1 ± 2.4 ; 模型组 NOX2: 112.7 ± 3.8 , NOX4: 99.4 ± 1.7 , 实验组明显低于模型组 ($P < 0.05$)。

2.5 模型建立后及给药后 9 周各组 RVLM 线粒体中 MDA、SOD 及 GSH 表达情况 模型建立后, 用 ELISA 检测模型组和空白对照组 RVLM 线粒体中 MDA 水平分别为 (10.2 ± 2.9) 、 (5.1 ± 2.0) $\mu\text{mol/g}$, 空白对照组明显低于模型组 ($P < 0.05$)。模型组和空白对照组 RVLM 线粒体中 GSH 和 SOD 水平分别为 GSH: (2.1 ± 0.3) 、 (5.7 ± 1.2) $\mu\text{mol/g}$, SOD: (17.4 ± 1.6) 、 (32.3 ± 2.5) U/mg, 模型组明显低于空白对照组 ($P < 0.05$)。给药后 9 周, 实验组和模型组 MDA 分别为 (5.4 ± 1.2) 、 (9.8 ± 3.2) $\mu\text{mol/g}$, 实验组明显低于模型组 ($P < 0.05$); 实验组和模型组 RVLM 线粒体中 SOD 水平分别为 (35.2 ± 3.1) 、 (16.2 ± 1.3) U/mg, 实验组较模型组明显增高 ($P < 0.05$), 实验组和模型组 GSH 水平分别为 (5.6 ± 0.4) 、 (2.0 ± 0.4) $\mu\text{mol/g}$, 实验组较模型组明显增高 ($P < 0.05$)。

2.6 模型建立后和给药后 9 周各组心肌肥厚相关指标和血清去甲肾上腺素(NE)水平的变化 模型建立后,模型组 WHW/BW、WHW/TL 及 LVW/TL 分别为 4.6 ± 0.7 、 46.9 ± 0.3 、 31.6 ± 2.4 ,空白对照组 WHW/BW、WHW/TL 及 LVW/TL 分别为 2.0 ± 0.5 、 31.4 ± 0.1 、 18.2 ± 1.1 ,模型组明显高于空白对照组($P < 0.05$);给药 9 周后,实验组 WHW/BW、WHW/TL 及 LVW/TL 分别为 3.0 ± 0.5 、 35.7 ± 0.6 、 21.3 ± 2.1 ,模型组 WHW/BW、WHW/TL 及 LVW/TL 分别为 4.6 ± 0.7 、 46.9 ± 0.3 、 31.6 ± 2.4 ,实验组明显低于模型组($P < 0.05$)。模型建立后,用高效液相色谱法检测模型组和空白对照组血清 NE 水平分别为(465.9 ± 7.2)、(301.5 ± 3.6)pg/mL,模型组明显高于空白对照组($P < 0.05$);给药 9 周后,实验组和模型组血清 NE 水平分别为(332.8 ± 6.5)、(512.3 ± 7.9)pg/mL,实验组明显低于模型组($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究结果显示,补充 α 硫辛酸 9 周可通过降低 MAP 和代表交感神经系统活性的血清 NE 水平从而显著缓解高盐诱导的高血压反应。此外,补充 α 硫辛酸还可降低 RVLM 中 NOX2 和 NOX4 的表达,减少线粒体 RVLM 中 ROS 的过量产生,而且高盐诱导高血压大鼠 WHW/BW、WHW/TL 和 LVW/TL 比值的增加提示其可以提高抗氧化能力、延缓心肌肥厚。因此,本研究观点可归纳为长期给予 α 硫辛酸可通过降低 NOX2 和 NOX4 的表达、增强线粒体的生物能量、提高高血压发展中的 RVLM 中细胞内抗氧化能力从而降低高盐诱导的高血压大鼠的 MAP、交感神经活性及机体氧化应激损伤。

众所周知,高盐饮食可上调大脑区域如海马和大脑皮层的氧化应激,在高血压的病理机制中发挥重要作用^[7-8]。RVLM 可决定心血管中心交感神经基本功能,且与交感神经系统活性密切相关^[9]。本研究亦证实高盐饮食可增加 RVLM 中超氧化物的产生进而激活交感神经系统,与前期研究结果一致^[10-11]。

α 硫辛酸被公认为强效生物抗氧化物及线粒体生物能量酶的必要辅助因子,可恢复细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)的表达^[12-13],亦是抗氧化物中惟一一个脂水兼容的物质。因此, α 硫辛酸可进入大脑底部清除自由基、修复 ROS 的过度损伤。本研究结果显示长期补充 α 硫辛酸可降低高盐诱导的大鼠模型中的 MAP、延缓心肌肥厚的产生、降低 NOX2 和 NOX4 的表达及 RVLM 线粒体中过氧化物。因此笔者推测,补充 α 硫辛酸通过下调 NOX2 和 NOX4 的表达从而降低 RVLM 中的氧化应激、增强线粒体的生物能量、提高 RVLM 在细胞内的抗氧化能力,最终降低血压和高盐诱导高血压产生的心肌肥厚。

综上所述,长期高盐饮食可增加高血压的风险并诱导 NAD(P)H 和 RVLM 内线粒体中的 ROS 过量

产生,在高血压的发生、发展中起到了重要作用;长期 α 硫辛酸补充可通过多种途径缓解高血压反应和延缓心肌肥厚产生。

参考文献

- [1] WU K L, CHAN S H, CHAN J Y. Neuroinflammation and oxidative stress in rostral ventrolateral medulla contribute to neurogenic hypertension induced by systemic inflammation[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9(1):212.
- [2] OGAWA K, HIROOKA Y, SHINOHARA K, et al. Inhibition of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla improves impaired baroreflex sensitivity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats[J]. *Int Heart J*, 2012, 53(3):193-198.
- [3] 谭颖颖,王亚运,张琪.电针“曲池”穴对中枢血管紧张素 II 诱发的动脉血压升高大鼠异常交感神经活性的影响[J]. *针刺研究*, 2016, 41(2):144-149.
- [4] 赵冉冉,徐晓臣,徐飞,等.天然抗氧化剂 α 硫辛酸对血管性痴呆大鼠线粒体的保护作用[J]. *山西医科大学学报*, 2014, 45(12):1136-1139.
- [5] SU Q, LIU J J, CUI W, et al. Alpha lipoic acid supplementation attenuates reactive Oxygen species in hypothalamic paraventricular nucleus and sympathoexcitation in high salt-induced hypertension [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 241(241):152-158.
- [6] 刘美丽,宋海旭,邵晓平,等.趋化因子配体 16 在高盐诱导的盐敏感性高血压大鼠心肌重构中的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2015, 40(11):873-879.
- [7] HE F J, CAMPBELL N R, MACGREGOR G A. Reducing salt intake to prevent hypertension and cardiovascular disease[J]. *Rev Panam Salud Publica*, 2012, 32(4):293-300.
- [8] PARK J, CHANG K K. Sodium intake and prevalence of hypertension, coronary heart disease, and stroke in Korean adults[J]. *J Ethnic Foods*, 2015, 2(3):92-96.
- [9] 王英,郭曲练,鄢建勤,等. DNA 甲基转移酶类在大鼠神经病理性疼痛发病机制中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2016, 41(6):578-585.
- [10] WU K L, HUNG C Y, CHAN J Y, et al. An increase in adenosine-5'-triphosphate (ATP) content in rostral ventrolateral medulla is engaged in the high fructose diet-induced hypertension[J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21(1):8.
- [11] GUDJONCIK A, GUENANCIA C, ZELLER M, et al. Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(8):1721-1738.
- [12] 吴敏,袁刚,管晓峰,等. α -硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变的疗效观察[J]. *中华全科医学*, 2011, 9(4):517-519.
- [13] 张晶晶,邓后亮,季爱民. α -硫辛酸预处理对人脐静脉内皮细胞缺氧复氧损伤的保护作用[J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(7):1053-1056.