维普资讯 http://www.cqvip.com

253-255
文章编号：0253-3626(2000)03-0253-03

HDL的体外氧化及丙丁酚的抗氧化作用

胡厚源，陈运贞
（重庆医科大学临床学院心血管内科 400016）

R543.5

摘 要：目的 探讨高密度脂蛋白(HDL)的体外氧化过程及丙丁酚对HDL氧化的抑制作用。**方法** 采用一次性密度梯度超速离心法获取人血清HDL，以Cu^{2+}介导其氧化，荧光法检测样品中硫代巴比妥酸反应产物（TBARS）的含量，用于判定氧化效果。**结果** Cu^{2+}可有效地介导HDL的体外氧化，并在一定范围内呈浓度和时间依赖性；预先加入丙丁酚可有效阻止HDL的体外氧化，5 μ mol/L丙丁酚即有显著的抗氧化作用。**结论** HDL亦易于发生氧化修饰，抗氧化剂丙丁酚可明显抑制由Cu^{2+}介导的HDL体外氧化。

关键词： 脂蛋白；丙丁酚
中国图书分类法分类号： R541.4 **文献标识码：** A **收稿日期：** 1999-06-17

Oxidation of high-density lipoproteins in vitro and protective effects of probucol

HU Hou-yuan, et al
Department of Cardiology, College of Clinical Medicine

Abstract: Objective To investigate the oxidation of high-density lipoproteins(HDL) in vitro and protective effects of probucol. **Methods** Human plasma lipoproteins were separated by one-step ultracentrifugation with a simple density-gradient. The in vitro oxidation of HDL was mediate by $CuSO_4$, the oxidative effect of Cu^{2+} and the antioxidation effect of probucol were assayed simultaneously by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). **Results** (1) Cu^{2+} could effectively mediated the oxidation of HDL in vitro, which was both dose-dependent and time-dependent with Cu^{2+} within definite ranges.(2) The oxidation of HDL in vitro could be inhibited by probucol, and 5 μ mol/L probucol was effective obviously. **Conclusion** HDL is susceptible to oxidation and probucol can inhibit the Cu^{2+} mediated oxidation of HDL in vitro.

Key Words: Lipoproteins; Probucol

近年的研究表明，高密度脂蛋白（high density lipoprotein, HDL）和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)一样也易被氧化修饰而形成氧化高密度脂蛋白（oxidized HDL, oxHDL）。oxHDL不仅转运胆固醇的能力下降，而且具有细胞毒性作用，亦可被巨噬细胞表面的清道夫受体识别和摄取，促进细胞中胆固醇的聚集[1~3]；它还可影响内皮细胞功能并激活血小板，从而有可能促进动脉粥样硬化的发生[4~6]。本文采用一次性密度梯度超速离心法获取人血浆HDL，以Cu^{2+}介导其氧化，从而探讨HDL的体外氧化过程及丙丁酚的抗氧化作用。

1 材料和方法

1.1 血清脂蛋白的分离

人血清脂蛋白采用张林华的一次性密度梯度超速离心法分离[7]，略加改良。主要步骤如下：采取空腹健康人全血，以EDTA Na_2抗凝（1mg/ml），分离血浆：以固体溴化钠（NaBr）调血浆密度为1.400 g/ml，日立55P-72型超速离心机、RP-50T角度转头，容量34ml×8管；每管由下至上加入d=1.400g/ml血浆9 ml、d=1.200g/ml的NaBr溶液(以0.85%NaCl-0.01%EDTA Na_2液配制)5 ml和0.85%NaCl-0.01%EDTA Na_2（pH 7.6）溶液20 ml；10℃，250 000×g离心6h。预染血清脂蛋白聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳显示HDL可分为HDL_2和HDL_3两条带，VLDL和LDL均为单一条带，其位置与参照血清中各脂蛋白带的位置一致。

1.2 HDL的体外氧化

氧化修饰采用Cu^{2+}介导法[1]，取新分离的HDL，以20倍体积的10mmol/L PBS（pH 7.4）透析48h，每8h换液一次。用PBS稀释至0.5mg protein/ml，分装于消毒的玻璃培养瓶中用于下面的分组实验，置37℃、5%CO_2孵箱中孵育。氧化作

作者介绍：胡厚源（1966- ），男，主治医师，博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

表　Cu^{2+}介导HDL氧化的时间效应及丙丁酚的作用(MDA, nmol/mg protein, n =4)

时间(h)	0	1	2	4	8	12	24
Cu^{2+}	0.18±0.12	0.97±0.33**	1.08±0.52**	1.73±0.59**	4.79±0.82**	17.41±2.34**	15.55±2.13**
Probucol	0.18±0.12	0.41±0.19*#	1.02±0.38**	1.19±0.32**#	1.36±0.30**##	2.86±0.57**##	6.01±0.96**##

*P<0.05　**P<0.01 vs 0h group ;#P<0.05, ## P<0.01 vs Cu^{2+} group

用结束时以5倍于Cu^{2+}浓度的EDTA Na2终止氧化。氧化效果鉴定：采用硫代巴比妥酸反应产物荧光检测法测定氧化前后丙二醛（MDA）的含量，以“nmol/mg protein”表示。

1.2.1　Cu^{2+}介导HDL氧化的浓度效应

于HDL中加入新鲜配制的1mmol/L $CuSO_4$溶液.使其终浓度分别为5μmol/L，10μmol/L，15μmol/L，20μmol/L和40μmol/L，作用时间12h。

1.2.2　Cu^{2+}介导HDL氧化的时间效应及丙丁酚的作用

在加入10μmol/L $CuSO_4$的情况下，分别于孵育后1h、2h、4h、8h、12h和24h取出HDL 100μl终止氧化;丙丁酚组则于加入$CuSO_4$前1h预先加入终浓度为50μmol/L丙丁酚。

1.2.3　丙丁酚抑制HDL体外氧化的浓度效应

于加入$CuSO_4$前1h预先加入终浓度分别为0μmol/L，5μmol/L，10μmol/L，15μmol/L，25μmol/L，50μmol/L和100μmol/L的丙丁酚，再加入10μmol/L $CuSO_4$，作用时间12h。

1.3　统计学处理

数值以$\bar{X}\pm S$表示，组间比较采用t检验。

2　结　果

2.1　Cu^{2+}介导HDL氧化的浓度效应

Cu^{2+}可有效地介导HDL的体外氧化，0.5mg protein/ml的HDL与5μmol/L Cu^{2+}于37℃孵育12h后即可引起HDL的显著氧化，Cu^{2+}增至10μmol/L时MDA含量由nHDL的0.18nmol/mg protein上升至17.41nmol/ mg protein，增加近100倍，而Cu^{2+}浓度继续增加直至40μmol/L，MDA含量均不再增加(图1)。

2.2　Cu^{2+}介导HDL氧化的时间效应及丙丁酚的作用

Cu^{2+}作用1h后即有HDL的氧化发生，12～24h间氧化程度稳定在高水平。预先加入丙丁酚可有效抑制Cu^{2+}介导的HDL体外氧化（表1）。

2.3　丙丁酚抑制HDL体外氧化的浓度效应

5μmol/L的丙丁酚即可显著抑制HDL的氧化（图2）。

3　讨　论

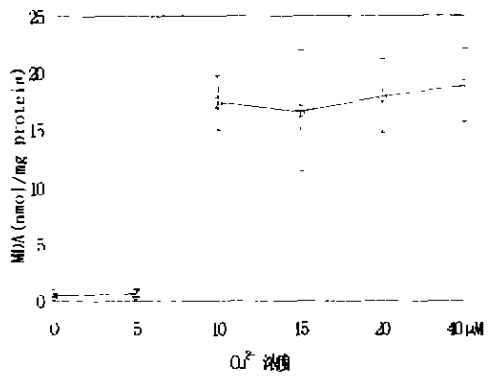


图1　Cu^{2+}介导HDL氧化的浓度效应（n=4）

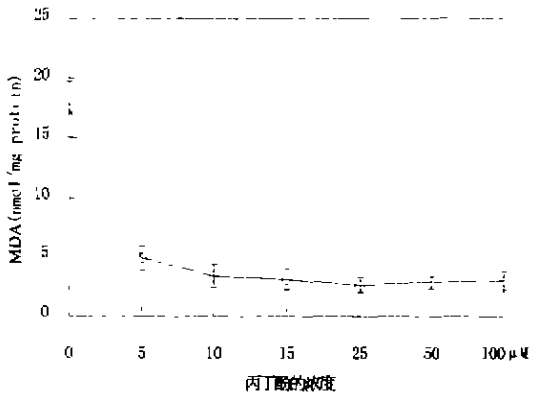


图2　丙丁酚抑制HDL体外氧化的浓度效应（n=4）

血清脂蛋白的分离以Havel等的密度顺序超离心浮选法最为经典，该法采用角度转头，以溴化钠或溴化钾依次调血清密度为1.006，1.063及1.210g/ml，分别超离心18～24h，才能获得各种密度的脂蛋白组分，总离心时间约72h。由于分离脂蛋白的纯度高，目前它仍是国外最常采用的方法。国内多采用离心时间较短的角度转头超离心(<10h)[7]和垂直转头超离心（<3h）[8]，它们所分离的脂蛋白虽难以达到浮选法那样的绝对纯度，但已完全能满足一般性实验的需要。本实验采用角度转头一次性密度梯度超离心法，缓慢加速和减速，250,000×g离心6h，能很好地分离各脂蛋白带。

维普资讯 http://www.cqvip.com

高密度脂蛋白（HDL）在体内执行逆转运胆固醇的功能，使胆固醇实现从外周组织向肝脏的净转运[9]；HDL还可保护内皮细胞免受氧化低密度脂蛋白（oxLDL）的损伤[10]，并可抑制LDL的氧化[11]。另外，HDL还可诱导内皮细胞产生前列环素(PGI_2)[12]。因此，HDL具有抗动脉粥样硬化作用。本研究在采用一次性密度梯度离心法得到HDL（包括HDL_2和HDL_3）并经PBS彻底透析后，加入Cu^{2+}以介导其氧化，结果发现其MDA含量显著增高，并在一定范围内与Cu^{2+}浓度和作用时间成正相关，这与LDL的体外氧化十分相似，文献报道oxHDL在动脉粥样硬化的早期发生中可能具有较为重要的作用[1~3]，但oxHDL是否存在与oxLDL一样广泛的致动脉粥样硬化作用机理尚有待进一步研究。

丙丁酚是一种强的抗氧化剂，它可有效阻止LDL的体外氧化[8]。本研究显示，在以10 μ M/0.5mg HDL protein的Cu^{2+}作用12h所形成的oxHDL作为对照的情况下，5 μ mol/L丙丁酚即有显著的抗氧化作用，它可使MDA含量降低三分之二，而在25～100 μ mol/L范围内其作用不再随浓度增加而增强。另外，维生素C和维生素E也可降低HDL对氧化反应的易感性[13]。因此，常规应用抗氧化剂对预防动脉粥样硬化的发生可能具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Rifici V,Khachadurian AK. Oxidation of high density lipoproteins: characterization and effects on cholesterol efflux from J774 macrophages[J]. Biochim Biophys Acta, 1996; 1299(1): 87-92.

[2] Hurtado I, Fiol C, Gracia V.et al.In vitro oxidised HDL exerts a cytotoxic effect on macrophages[J].Atherosclerosis,1996; 125(1):39-45.

[3] La Ville AE, Sola r, Balanya J, et al.In vitro oxidised HDL is recognised by the scavenger receptor of macrophages: implications for its protective role in vivo[J]. Atherosclerosis, 1994; 105(1):179-189.

[4] Fogliatto G, Musanti R, Pirillo A, et al. Oxidized lipoproteins induce long-lasting inhibition of nitric oxide synthase from a murine endothelioma cell line (bEnd.4) [J]. J Cardiovasc Risk, 1995; 2(2): 123-130.

[5] Martin-Nizard F, Sqalli-Houssaini H, Walters-Laporte E.et al. Oxidized high-density lipoproteins modulate endothelin secretion by adult bovine aortic endothelial cells[J]. J Cardiovasc Risk, 1995;2(3): 263-267.

[6] Takahashi Y, Chiba H, Matsuno K,et al. Native lipoproteins inhibit platelet activation induced by oxidized lipoproteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996; 222(2): 453-459.

[7] 张林华，刘秉文．一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白[J]．生物化学与生物物理学报，1989; 21(2): 257-260.

[8] 沈成兴，罗 俊，刘乃丰，等．丙丁酚对氧化型低密度脂蛋白损伤内皮的保护作用[J]．中国动脉硬化杂志，1997;5(1):52-54.

[9] Tall AR. An overview of reverse cholesterol transport[J].Eur Heart J,1998;19 (S):31-35.

[10] Suc I,Escargueil-Blanc I,Troly M,et al.HDL and apoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,1997;17(11):2158-2166.

[11] Aviram M, Rosenblat M,Bisgaier CL,et al. Paraoxonase inhibits high-density- lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase[J]. J Clin Invest,1998; 101(8): 1581-1590.

[12] Myers DE,Huang WN, Larkins RG. Lipoprotein-induced prostacyclin production in endothelial cells and effects of lipoprotein modification[J]. Am J Physiol.1996; 271(5 Pt 1): C1504-1511.

[13] Rifici VA, Khachadurian AK. Effects of dietary vitamin C and E supplementation on the copper mediated oxidation of HDL and on HDL mediated cholesterol efflux[J]. Atherosclerosis, 1996;127(1): 19-26.