DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.023
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)08-0717-03

论著

橙皮甙抗LDL氧化及对MCP-1 mRNA转录的影响

娄桂予[1],江 渝[1],彭家和[1],钱民章[2] ([1]第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038;[2]遵义医学院生物化学教研室,遵义 563003)

提 要:目的 研究橙皮甙体内外抗脂质氧化作用及其对兔食饵性动脉斑块中单核细胞趋化蛋白-1 mRNA转录的影响。方法 ①采用一次性密度梯度超速离心法制备正常人低密度脂蛋白,Cu^{2+}诱导其氧化,测定不同药物浓度和作用时间体系中丙二醛含量。②采用高脂饮食加免疫损伤的方法建立家兔动脉粥样硬化模型:将18只家兔随机化分为正常对照组、模型组、橙皮甙组。每组6只,分别给予普通饲料(正常对照组)和高脂饲料(模型组)喂养,橙皮甙组在喂高脂饲料的同时,加橙皮甙(2 g/d)一同喂养。建模10周末耳缘静脉采血,检测各组动物血清中丙二醛和一氧化氮的含量。而后处死动物,取胸主动脉,用逆转录聚合酶链反应技术检测动脉壁细胞中单核细胞趋化蛋白-1 mRNA的转录水平。结果 体外实验中,橙皮甙显著抑制丙二醛的生成,并呈一定浓度依赖关系($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。体内实验中,橙皮甙明显降低血浆丙二醛的含量($P<0.01$)和一氧化氮的水平($P<0.001$);并对胸主动脉壁细胞单核细胞趋化蛋白-1 mRNA的转录有明显抑制作用($P<0.05$)。结论 橙皮甙在体内外均有抗氧化作用,其下调单核细胞趋化蛋白-1 mRNA转录的机制可能部份与此有关。

关键词:橙皮甙;动脉粥样硬化;单核细胞趋化蛋白-1;氧化型低密度脂蛋白
中图法分类号:R282.71;R513.5;R392.2 文献标识码:A

Effects of hesperidin against lipid-oxidation and its effects on transcription of MCP-1

LOU Gui-yu[1], JIANG Yu[1], PENG Jia-he[1], QIAN Min-zhang[2] ([1]Department of Biochemistry, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China)

Abstract: Objective To evaluate the antioxidant effect of hesperidin and its effect on transcription of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rabbits with dietary atherosclerotic lesions. Methods (1) Low density lipoprotein (LDL) was isolated from healthy human plasma by sequential ultra-centrifugation and oxidized by copper. The contents of malondialdehyde (MDA) were measured at different dosages of the drug and at different reaction time. (2) Atherosclerotic model of rabbits was established by feeding rabbits with high lipid diet and immune injury. A total of 18 rabbits were divided randomly into three groups: control group, model group, and hesperidin group ($n=6$ in each group). Rabbits in the control group were fed with common diet, those in the model group with high lipid diet, and those in the hesperidin group with high lipid diet plus hesperidin. After 10 experimental weeks, blood samples were collected from the marginal ear veins for the detection of the contents of MDA and nitric oxide (NO). The rabbits were sacrificed for the isolation of the thoracic aorta. MCP-1 mRNA transcription in the thoracic aorta was detected by RT-PCR. Results Hesperidin could significantly inhibit MDA production in a dose dependent manner *in vitro* ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). Hesperidin could decrease MDA and NO concentrations ($P<0.01$, $P<0.001$), and could also inhibit the transcription of MCP-1 mRNA in the thoracic aorta ($P<0.05$) *in vivo*. Conclusion Hesperidin can down-regulate the transcription of MCP-1 mRNA, which is partly related with the antioxidant effect.

Key words: hesperidin; atherosclerosis; monocyte chemotactic protein-1; oxidized low density lipoprotein

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS),它是以内膜下脂质沉积,血管平滑肌和胶原增殖,泡沫细胞形成为主要特征的一种广泛性动脉病变。研究表明[1]由低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)氧化成的氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是其形成的重要危险因素。ox-LDL可通过调节单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)的表达促进AS的发生、发展。1999年,美国医学会在评估水果、蔬菜的摄取对心血管疾病影响的研究中指出:十字花科的蔬菜及柑橘类水果对降低心血管疾病的危险性贡献最大[2]。橙皮甙是柑橘类果肉及果皮的重要成分。它具有清除氧自由基、单浅态氧和抗生物膜脂

作者简介:娄桂予(1974-),女,河南省郑州市人,硕士,助教,主要从事动脉粥样硬化方面的研究 电话:(023)68752261
通信作者:钱民章,电话:(0852)8204473
收稿日期:2003-10-24;修回日期:2004-02-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

质氧化作用。本实验研究了橙皮甙(Hesperidin)体内外抗脂质氧化作用及其对 MCP-1 基因转录的影响,旨在分子水平上探讨这种中药成分抗 AS 的机制,为开发新的抗 AS 药物打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

健康雄性家兔 18 只,体质量 2.0~2.5 kg(遵义医学院实验动物中心提供),丙基硫氧咪啶(广州市洪桥制药厂),牛血清白蛋白,胆固醇粉,脱氧胆酸钠(华美生物工程公司),橙皮甙(成都地澳植化有限公司,纯度>97.5%),丙二醛检测试剂盒,一氧化氮检测试剂盒(南京建成公司),RT-PCR 试剂盒(华美生物工程公司)。

普通饲料配方:麦麸 34%、玉米 28%、豆渣 20%、鱼粉 4%、骨粉 7%、大豆粉 7%。高脂饲料配方:每 60 克普通饲料含 1.5 g 胆固醇、2.5 g 炼制猪油、0.1 g 脱氧胆酸钠、0.05 g 丙基硫氧咪啶。

721 型可见光分光光度计(上海第三分析仪器厂产品)、超速离心机(HITACHI,55P-72 型)、PE2400PCR 扩增仪(美国 PE 公司)、BioMias 自动图像分析系统(四川大学产品)。

1.2 方法

1.2.1 LDL 的分离鉴定 按张林华等[3]一次性密度梯度超速离心法分离人血浆 LDL,用 pH 7.4 含 1 g/L EDTA 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)于 4 ℃透析 48 h。琼脂糖凝胶电泳法鉴定 LDL,Lowry's 法测定蛋白浓度。再用无 EDTA 的 PBS 液于 4 ℃透析 24 h。

1.2.2 LDL 的氧化修饰和橙皮甙体外抗氧化作用 总反应体积为 5 ml,LDL 终浓度为 50 mg/L,$CuSO_4$ 的终浓度为 10 mg/L。不同剂量橙皮甙抗氧化实验分为 3 组:①nLDL 组:LDL+PBS;②ox-LDL 组:LDL+Cu^{2+}+PBS;③橙皮甙组:LDL+Cu^{2+}+PBS+hesperidin(终浓度分别为 1、3、9、27、81、160 mg/L),37 ℃恒温振荡器中孵育 4 h。不同时间橙皮甙抗氧化实验分 3 组:①nLDL 组:LDL+PBS;②ox-LDL 组:LDL+Cu^{2+}+PBS;③橙皮甙组:LDL+Cu^{2+}+PBS+hesperidin(终浓度为 81 mg/L),37 ℃恒温振荡器中孵育 2、4、8、16 h。

1.2.3 家兔动脉粥样硬化模型的建立及分组 18 只正常家兔,随机分为 3 组,每组 6 只,用普通饲料分笼饲养观察 1 周,而后一次性静脉注射牛血清白蛋白(250 mg/kg)。第 2 周开始:①正常组:自由进食普通颗粒饲料。②模型组:每日每只给予高脂饲料 60 g,然后自由进食普通饲料。③橙皮甙组:在模型组基础上,每日每只给予橙皮甙 2 g 灌胃。共喂养 10 周。

1.2.4 血清 MDA 和 NO 的检测 建模 10 周后采各兔耳缘静脉血 5 ml,4 ℃静置 24 h,分离血清,按照试剂盒说明书操作测定血清 MDA 和 NO 的含量。用硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)来表示上述各组中脂质过氧化代谢产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)。

1.2.5 RT-PCR 法检测兔主脉壁细胞 MCP-1 mRNA 的表达 耳缘静脉取血后即空气栓塞处死家兔。无菌条件下分离胸主动脉,剥去外膜和结缔组织。沿动脉纵轴剖开,灭菌生理盐水冲洗干净,消毒滤纸拭干。将动脉剪成碎块,留约 0.5 g 组织于冻存管内,再加 0.6 ml 细胞裂解液,液氮保存。按异硫氰酸胍一步法提取总 RNA。紫外分光光度法测其样品浓度和纯度。MCP-1 和内参 GAPDH 核苷酸引物按国外文献[2]设计而成。MCP-1 上游引物为 GCTTCTGTGCCTGCTGCTCA,下游引物为 GTCAGCACAGATCCCCTTG,扩增片段为 215 bp;GAPDH 上游引物为 GTCACCAGGGCTGCTTTTAA,下游引物为 ACGGAAGGCCATGCCAGTGA,扩增片段为 652 bp。采用一步法逆转录聚合酶链式反应检测 MCP-1 mRNA 表达,操作按试剂盒说明书进行,反应条件为逆转录:42 ℃,20 min;预变性 95 ℃,1 min;变性 94 ℃,45 s;退火 56 ℃,45 s;延伸 72 ℃,1 min;后延伸 72 ℃,7 min,循环 35 次。取 10 μl PCR 扩增产物,用含溴乙锭的 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,电压 4 V/cm,电泳 2 h。在凝胶成像系统上观察结果并拍照。MCP-1 半定量按 MCP-1 与 GAPDH 条带的光密度比值进行计算。

1.3 统计学处理

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和均数间两两比较。

2 结果

2.1 不同剂量橙皮甙体外抗氧化结果

将各组混合液在 37 ℃恒温振荡器中孵育 4 h 后,1 mg/L 橙皮甙组与 ox-LDL 组相比,MDA 无明显降低($P>0.05$),当浓度达到 3 mg/L 时,随着剂量的增加,MDA 含量呈一定的剂量依赖关系($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),当浓度为 160 mg/L 时,LDL 氧化的抑制率达到 71.2%,几乎没有新 MDA 产生,因此在后续实验中橙皮甙采用 81 mg/L 的浓度,见表 1。

表 1 橙皮甙对 Cu^{2+} 诱导的 LDL 氧化反应中 MDA 生成的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$, μmol/L)

Tab 1 Effects of hesperidin on MDA in LDL oxidation induced by Cu^{2+} ($n=3$, $\bar{x}\pm s$, μmol/L)

Group	MDA
nLDL	2.98±0.35
ox-LDL	41.75±1.23 *
Hesperidin (1 mg/L)	38.77±1.52 **
Hesperidin (3 mg/L)	33.40±1.70 #
Hesperidin (9 mg/L)	32.81±1.51 ##
Hesperidin (27 mg/L)	29.82±1.56 ##
Hesperidin (81 mg/L)	27.44±1.47 ##
Hesperidin (160 mg/L)	11.95±0.78△

*: $P<0.001$, *vs* nLDL; **: $P>0.05$, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, △: $P<0.001$, *vs* ox-LDL.

2.2 橙皮甙体外不同作用时间抗氧化结果

橙皮甙作用 2 h 时,MDA 的生成无明显减少($P>0.05$);作用 4 h 后,则可显著降低 MDA 的生成($P<0.01$),且随着时间的延长,MDA 量一直维持在较低水平,见表 2。

表 2 橙皮甙在不同时间对 MDA 生成的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$, μmol/L)

Tab 2 Effects of hesperidin on MDA production at different time ($n=3$, $\bar{x}\pm s$, μmol/L)

Group	2 h	4 h	8 h	16 h
ox-LDL	22.73±0.98	41.75±1.56	50.14±2.31	57.42±2.43
Hesperidin	21.67±1.01 *	27.44±1.56 #	20.00±1.42 #	17.55±0.99 #

*: $P>0.05$, #: $P<0.01$, *vs* ox-LDL

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　血清 MDA 和 NO 的含量

模型组血清 MDA 含量显著高于对照组($P<0.001$); 橙皮甙组与模型组相比, MDA 含量有显著下降($P<0.01$)。血清 NO 检测结果为: 模型组与对照组相比有明显的降低($P<0.001$), 橙皮甙组与模型组比较其含量有显著增高($P<0.001$), 见表 3。

表 3　实验 10 周后 3 组动物血清 MDA 和 NO 的含量($n=6$, $\bar{x}\pm s$, μmol/L)

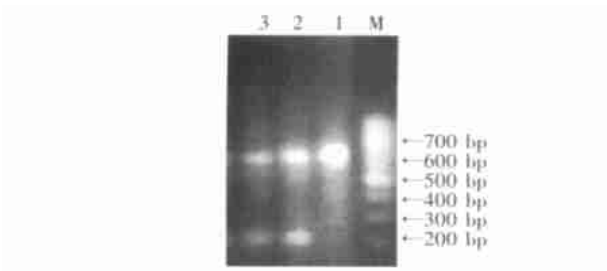
Tab 3　Serum MDA and NO contents in each group at 10 weeks after experiment ($n=6$, $\bar{x}\pm s$, μmol/L)

Group	MDA	NO
nLDL	4.23±0.73	72.19±2.36
ox-LDL	44.18±3.23 *	17.50±0.47 *
Hesperidin	18.62±1.71 #	45.77±1.06 △

*: $P<0.001$, *vs* control group; #: $P<0.01$, △: $P<0.001$, *vs* model group

2.4　MCP-1 mRNA 表达分析

胸主动脉提取 mRNA 进行 RT-PCR 后, 其产物电泳, 结果显示, 条带位置分别位于 215 bp 和 652 bp, 与所设计的 MCP-1、GAPDH 扩增长度一致。图像分析系统测定照片上电泳条带的光密度值, 计算每一样本 MCP-1 mRNA 的相对水平, 见图 1, 表 4。



M: Marker; 1: Control; 2: Model; 3: Hesperidin

图 1　RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1　Agarose gel electrophoretogram of RT-PCR products

表 4　3 组动脉壁内 MCP-1 基因表达的相对水平($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Relative MCP-1 gene expression in each group ($n=6$ $\bar{x}\pm s$)

Group	Relative level of mRNA
Control	0.07±0.02
Model	0.83±0.24 *
Hesperidin	0.49±0.09 #

*: $P<0.05$ *vs* control group; #: $P<0.05$, *vs* model group

3　讨论

近年来, 大量资料表明动物和人体内存在着由 LDL 氧化生成的 ox-LDL。LDL 氧化是指其核心的多聚不饱和脂肪酸在氧自由基或其他氧化剂作用下发生脂质过氧化反应, 生成脂类自由基, 并产生脂过氧化物, 引发自由基链式反应, 最终生成醛(主要是丙二醛和 4-羟烯醛), LDL 转变为 ox-LDL。橙皮甙能否在体外及 AS 形成过程中抑制 LDL 的氧化, 值得研究。我们在体外实验中发现: 橙皮甙能显著抑制丙二醛的生成($P<0.05$), 并呈一定的浓度和时间依赖关系。体内实验中, 我们观察到模型组血清丙二醛含量显著高于对照组($P<0.001$); 橙皮甙组与模型组相比, MDA 含量显著下降($P<0.05$), 提示: AS 兔体内存在有大量 ox-LDL, 橙皮甙在体内外均能抑制 LDL 的氧化。

一氧化氮即内皮衍生的舒张因子(endo the-lial-derived relaxing factor, EDRF)是一种多功能气体分子, 可从抗氧化损伤、抑制血小板聚集、单核-巨噬细胞浸润等多个环节发挥抗 AS 作用。在高胆固醇血症患者体内, NO 与 LDL 氧化之间的平衡被破坏, 产生一个利于 NO 清除, LDL 氧化加速的恶性循环, 最终导致 AS[4]。我们也观察了橙皮甙对 NO 生成的影响, 间接反映它们抗脂质氧化的作用。血清 NO 检测结果显示: 模型组与对照组相比有显著降低($P<0.001$), 橙皮甙组与模型组比较其含量有显著增高($P<0.001$)。AS 模型 NO 含量减少可能是由于 ox-LDL 含有与 NO 直接作用的物质, 可直接或间接清除 NO。橙皮甙组 NO 含量升高可能橙皮甙的抗氧化作用, 减少了对 NO 的灭活。

单核-巨噬细胞首先进入动脉内膜并在内膜下形成泡沫细胞是动脉粥样硬化最早期的病理形态学特点, MCP-1 为作用很强的单核细胞趋化因子, 在单核细胞粘附进入动脉内膜过程中具有十分重要的作用。MCP-1 的表达和分泌受多种因素的调节, 如 ox-LDL、NO、血小板源性生长因子、肿瘤坏死因子、高胆固醇血症等。除 NO 外, 其他因素均能上调 MCP-1 的表达。不同的因素调节 MCP-1 的机制不同。本实验结果表明, 用橙皮甙干预后动脉壁内 MCP-1 的表达较模型组明显减少($P<0.05$), 下降程度为 16%～17%。而橙皮甙组与模型组相比血清 LDL 的氧化程度减轻, NO 增高, 因此, 我们认为橙皮甙下调 MCP-1 的表达可能与其抑制 LDL 氧化, 增加 NO 的生成有关。

参考文献:

[1] Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(7): 1162－1167.

[2] Joshipura K J, Ascherio A, Manson J E, *et al*. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke[J]. JAMA, 1999, 282(13): 233－239.

[3] 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(3): 257－259.

[3] Hogg N, Kalyanaramer B, Joseph J, *et al*. Inhibition of low－density lipoprotein oxidation by nitric oxide: potential role in atherogenesis[J]. FEBE Lett, 1993, 344(2): 170－174.

[4] Navab M, Imes S S, Hama S Y, *et al*. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein[J]. J Clin Invest, 1991, 88(6): 2039－2046.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net