

生脉散体外对低密度脂蛋白氧化修饰的保护作用*

阎道广 周 玫 陈 媛

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

The Protective Effect of Chinese Medicine Recipe Shengmaisan on Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein in Vitro

YAN Dao-Guang, ZHOU Mei and CHEN Yuan
(Research Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT Using the oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) as a model and the contents of thiobabitoric acid reactive substances, vitamin E and fluorescent substances, the inhibitory effects of Shengmaisan on oxidative modification of LDL induced by Cu^{2+} and Fe^{2+} were studied. The results showed that Shengmaisan inhibited the oxidative modification of LDL significantly, and the extents of inhibition of oxidative modification of LDL induced by Cu^{2+} and Fe^{2+} were similar. The protective effect of Shengmaisan is mainly to scavenge lipid free radical.

KEY WORDS Shengmaisan; Oxidative modification, low density lipoprotein; Transition metal; Thiobabitoric acid reactive substance; Vitamin E; Fluorescent substance

摘要 本文以低密度脂蛋白氧化修饰为模型,以硫代巴比妥酸反应物质生成量、维生素 E 和荧光物质含量变化为指标,研究了生脉散对 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 诱导低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用。结果说明,生脉散能明显地抑制 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 诱导低密度脂蛋白氧化修饰,对这两种过渡金属诱导低密度脂蛋白氧

化修饰的抑制速率和程度相似。生脉散抑制低密度脂蛋白氧化修饰的机制主要是清除脂自由基。

关键词 生脉散; 低密度脂蛋白氧化修饰; 过渡金属; 硫代巴比妥酸反应物质; 维生素 E; 荧光物质

生脉散是我国传统古方,已在临床上用于心肌梗塞、心绞痛、心律失常和心动过速等与心肌缺血再灌注有关的疾病,并获得满意效果^[1~3]。活性氧是心肌缺血再灌注损伤的重要因素^[4]。我们^[5]用在体缺血再灌注模型以电子顺磁共振和电镜技术检测到心肌氧自由基产生与组织损伤程度有关。同时对大鼠在体和离体心肌缺血再灌注损伤的研究提示:生脉散能防止和减轻缺血再灌注心肌氧自由基生成和脂质过氧化速率,改善某些生物化学指标、心肌功能以及减轻超微结构改变^[6,7]。最近邓锡伟等^[8]观察到生脉散可显著地改善心绞痛患者左心室功能和增加运动耐受力,同时显著减轻血清脂质过氧化物含量。先前的工作^[7]说明生脉散能抑制缺血再灌注氧自由基 O_2^- 的生成,本文以低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 氧化修饰模型,从分子水平探讨生脉散的抗脂质过氧化损伤机理。

1 材料和方法

1.1 生脉散制剂由解放军 157 医院药局提供,每安瓿 2 ml,用量以 $\text{ml} \cdot \text{L}^{-1}$ LDL 表示。 Cu^{2+} (CuSO_4)、 Fe^{2+} (FeSO_4) 溶解在 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl (pH 7.4) 溶液中,20 min 内使用。

1.2 LDL 分离

采用一次性密度梯度离心法^[9]。健康成人新鲜血取自南方医院血库,EDTA 抗凝并分离血清,固

* 国家自然科学基金资助项目

体溴化钾调血清密度到 $1.30 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$, 置制备型超速离心机 NFE72 角度转头中, 在 4°C 用 $55\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5.5 h , 收集 LDL, 在含 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的 PBS 中透析 48 h , 超滤除菌, 4°C 保存备用。

1.3 LDL 的抗氧化修饰

修饰前将 LDL 在 PBS 中透析 24 h , 除去 EDTA, 调蛋白浓度到 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。(1) LDL 分成 4 组, 每组均加入 Cu^{2+} 到终浓度 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 各组分别加入不同浓度的生脉散, 终浓度为 $0, 0.5, 1, 2 \text{ ml} \cdot (\text{L LDL})^{-1}$, 在 37°C 水浴中温育 4 h 。(2) LDL 溶液中加入 Cu^{2+} ($3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和生脉散 ($1 \text{ ml} \cdot (\text{L LDL})^{-1}$), 在 37°C 水浴中温育 $2, 4, 6, 8 \text{ h}$, 同时设立不加生脉散的对照组。(3) LDL 分成 4 组, 以 Fe^{2+} 代替 Cu^{2+} , 其它条件同 (1)。

1.4 测定方法

蛋白浓度定量采用 Lowry's 法; 硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) 测定采用改良的 Schuh 法^[10]; 维生素 E 测定采用 Taylor's 等方法^[11]; 荧光物质测定采用 Esterbauer 等方法^[12]。

2 结果

2.1 不同浓度生脉散对 Cu^{2+} 诱导 LDL 之 TBARS 生成, 维生素 E 和荧光物质含量的影响

LDL 与不同浓度的生脉散及 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 共同温育 4 h , TBARS 生成量及维生素 E 损耗量见 Table 1。可见随着生脉散浓度增加, TBARS 生成量逐渐减少, 呈现明显的量效关系 ($r = -0.891, P < 0.05$); 维生素 E 损耗量也有逐渐减少趋势。还发现随着生脉散浓度增加, LDL 荧光物质含量也随之减少 (Figure)。

2.2 同一浓度生脉散对 Cu^{2+} 诱导 LDL 不同时间硫代巴比妥酸反应物质的影响

1 ml/L LDL 生脉散与 LDL 和 Cu^{2+} 共同孵育不同时间后, TBARS 生成量见 Table 2。可见孵育时间延长, TBARS 生成量增多, 有明显的时间依赖关系, ($r = 0.984, P < 0.001$)。与对照组 ($r = 0.947, P < 0.01$) 相比较, 生脉散组在各个时间点 TBARS 生成速率都明显减慢, 减慢程度以 2 h 最明显 (5.87

± 0.31 对 9.71 ± 0.43), 随着时间延长, 减慢程度逐渐缩小 ($8 \text{ h}: 16.10 \pm 0.05$ 对 19.23 ± 0.07)。

Table 1. Effects of various concentration of Sheng Maisan on thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) formation and α -tocopherol content of LDL induced by Cu^{2+} for $4 \text{ h} (\bar{x} \pm s)$.

concentration of Shengmaisai	TBARS ($\mu\text{mol/g}$ LDL protein)	α -tocopherol (mg/g LDL protein)
0	16.93 ± 0.21	0.71 ± 0.32
0.5	12.31 ± 0.40	4.83 ± 0.54
1	10.75 ± 0.09	5.32 ± 0.27
2	9.46 ± 0.23	5.49 ± 0.07
native LDL	0.71 ± 0.25	8.90 ± 0.19

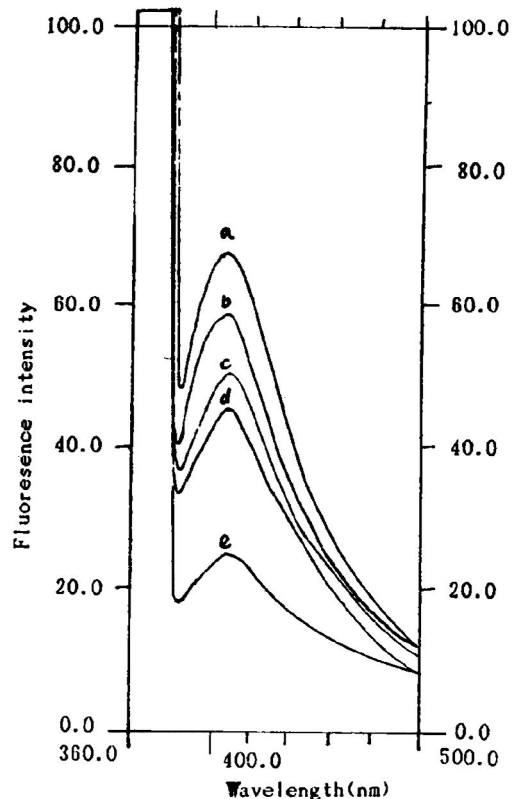


Figure. Effect of various concentration of Sheng-maisan on emission fluorescence spectra at 360 nm excitation of LDL induced by Cu^{2+} for 4 h .

a. control; b. 0.5 ml/L LDL; c. 1 ml/L LDL; d. 2 ml/L LDL; e. native LDL.

Table 2. Effects of the same concentraion of Shengmaisan on TBARS formation of LDL induced by Cu^{2+} at various times.

incu bation time(h)	TBARS(mmol/g LDL protein)	
	control	Shengmaisan
0	0.49±0.23	0.49±0.23
2	9.71±0.42	5.87±0.31
4	14.70±0.26	10.91±0.25
6	18.70±0.50	13.83±0.41
8	19.23±0.07	16.10±0.05

2.3 不同浓度生脉散对 Fe^{2+} 诱导 LDL 的硫代巴比妥酸反应物质生成量的影响

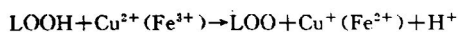
不同浓度生脉散对 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 诱导 LDL 的 TBARS 生成量见 Table 3。可见生脉散对 Fe^{2+} 诱导 LDL 的 TBARS 的生成同样有明显的抑制作用,且有明显的量效关系($r=0.932, P<0.05$),抑制程度与 Cu^{2+} 诱导的一致。

Table 3. Effects of various concentration of Sheng Mai san on TBARS formation of LDL induced by Fe^{2+} and Cu^{2+} at 37°C for 4 h.

concentrations of Shengmaisan	TBARS(mmol/g LDL protein)	
	Fe^{2+}	Cu^{2+}
0	17.31±0.38	16.95±0.21
0.5	12.41±0.35	12.32±0.40
1	10.39±0.22	10.70±0.09
2	8.17±0.51	9.41±0.23

3 讨论

过渡金属 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 是 LDL 氧化修饰的前氧化剂(proxidant),其能诱导 LDL 氧化修饰,这是因为在 LDL 中存在的微量脂氢过氧化物(LOOH),受到过渡金属的催化生成过氧基($\text{LOO}\cdot$)和脂氧基($\text{LO}\cdot$):



这些脂自由基作引发剂,引发脂质过氧化的链式反应,新生成的 LOOH 也受到 Cu^{2+} (Fe^{2+}) 的催化,使反应不断地扩增(propagation), Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 通过氧化还原不断地驱动着反应的进行^[13]。

本研究说明,生脉散对 Cu^{2+} 诱导的 LDL 氧化修饰从 TBARS 生成和维生素 E 含量以

及荧光物质的生成都有明显的抑制作用,并显示明显的量效关系,对 TBARS 生成还显示明显的时效关系。由上可知 LDL 氧化修饰速率主要决定于脂自由基引发脂质过氧化的链式反应以及过渡金属催化 LOOH 均裂生成脂自由基。生脉散抑制 LDL 的脂质过氧化速率是以清除脂自由基还是对过渡金属的螯合作用。为此我们又研究了生脉散抑制 Fe^{2+} 诱导的 LDL 氧化修饰的作用并与 Cu^{2+} 进行比较,结果说明生脉散对 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 诱导 LDL 氧化修饰的抑制速率,无明显差异。虽然,提出生脉散的保护作用可能与抑制依赖于铁的脂质过氧化形成即螯合铁有关,但根据 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 在 NaCl 溶液中催化 LDL 氧化修饰的速率近似^[14],而生脉散在 NaCl 溶液中对 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 诱导 LDL TBARS 生成的抑制程度也相近似,说明生脉散抑制 LDL 脂质过氧化机理可能与其清除脂自由基有关,其对铁离子似无明显的螯合作用。

LDL 结构成分类似质膜,与组织匀浆、亚细胞器和完整细胞不同,组成成分简单,作为氧化修饰模型,影响因素较小,是从分子水平比较研究药物抗脂质过氧化能力及其作用机理的很好模型。考虑到氧化修饰 LDL 是动脉粥样硬化发生的重要原因^[15],冠心病的病理基础是动脉粥样硬化,以 LDL 氧化修饰为模型寻找有效的防治动脉硬化和冠心病的药物更具有实际意义。

参考文献

- 周佩青,张鸿祥. 治心悸验方三则. 上海中医药杂志, 1989, 2: 27
- 田芬兰. 急性心肌梗塞中医临床研究述评. 北京中医学院学报, 1990, 13(1): 36
- 陈德磊,王吉侯,尤江云. 生脉散临床应用概况与展望. 中国中西医结合杂志, 1992, 12(4): 251~253.
- 陈瑗,周玫. 组织缺血再灌注(注)损伤与活性氧. 见:陈瑗,周玫(主编). 自由基医学. 北京:人民军医出版社, 1991. 142~166.
- 黄宁,陈瑗,赵保路, et al. 大鼠在体心脏缺血再灌注氧自由基产生的研究. 中华医学杂志, 1990, 70(12): 691~693.

- 6 黄宁,陈瑗,周玫. 生脉散对在体心肌缺血的保护作用. 第一军医大学学报, 1993, 13(1): 43~46.
 - 7 黄宁,陈瑗,周玫. 生脉散对大鼠在体心肌缺血再灌注氧自由基生成的影响. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(特集): 28~30.
 - 8 邓锡伟,罗德诚. 生脉饮对心绞痛患者左室功能、运动耐量和氧自由基的影响. 中华内科杂志, 1992, 31(2): 113~115.
 - 9 张林华,刘秉文. 一次性密度梯度离心分离人血清脂蛋白. 生物化学与生物物理学报. 1989, 21(3): 257
 - 10 Schuh J, Faircolough J G, Haschemcyer H. Qxygen mediated heterogeneity of apo low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978, 75: 3173
 - 11 Taylor SL, Lamden MP, Tappel AL. Sensitive flouremetric method for tissue tocopherol analysis. *Lipid*, 1976, 11(7): 530
 - 12 Esterbauer H, Dieber-Rothender M, Waeg G, et al. Biochemic al, structural, and functional properties of oxidized low density lipoprotein. *Chen Res Toxicol*, 1990, 3(2): 77
 - 13 陈瑗,周玫. LDL的氧化修饰和氧化修饰LDL的组成和结构变化. 生物物理学报. 1993, 9(2): 334~340.
 - 14 Kuzuya M, Yamada k, Hayashi T, et al. Oxidation of low density lipoprotein by copper and iron in phosphate buffer. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1084: 198~201.
 - 15 周玫,陈瑗. OLDL与动脉粥样硬化研究的新进展. 中国动脉硬化杂志, 1993, 1: 69~73.
- (本文 1994-08-14 收到)