

· 论 著 ·

前列腺素 E 对氧化和糖基化低密度脂蛋白影响的比较研究*

邱近明 项建梅^① 赵 晖 王新允 郭 刚^②

(天津医科大学病理学教研室, ①内分泌研究所, ②生物化学教研室, 天津 300070)

Comparative Studies of the Effects of Prostaglandin E on the Oxidized and Glycosylated Low Density Lipoproteins

QIU Jin-Ming, XIANG Jian-Mei, ZHAO Hui, WANG Xin-Yun and Guo Gang

(Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT Comparative studies of oxidative and glycosylated modification of low density lipoproteins (LDL) were made by biochemical, histochemical and morphometric analysis, in the meantime the effects of prostaglandin E (PGE) on the modified LDL were observed. The results showed that compared with the control's the antioxidizing enzyme activities in oxidized low density lipoprotein (OLDL) group decreased but lipid peroxide (LPO) content increased markedly, while PGE drugs elevated enzyme activities and inhibited LPO production. The results of morphometric studies confirmed that prostaglandin E₂ (PGE₂) obviously inhibited foam cells formation. The mechanism of glycosylation was complicated. It was characterized only mildly decreased enzyme activities but markedly increasing of LPO content, suggesting that at the beginning it might be due to non-enzymatic glycosylation and then complicated with the so called glycooxidation of LDL, therefore heavily enhanced tissue injuries and diabetic atherosclerosis. This experiments showed that PGE, especially PGE₂ also possessed the protective effects to LDL glycosylation.

KEY WORDS Oxidized low density lipoprotein; Glycosylated low density lipoprotein; Antioxidizing enzymes; Thiobabutaric acid reactive substance; Prostaglandin E; Macrophage

摘要 应用生物化学、组织化学和形态计量学等技术对低密度脂蛋白的氧化和糖基化损伤进行了比较研究,同时观察了前列腺素E类药物的影响。结果显示:与对照组相比,氧化低密度脂蛋白组的抗氧化酶活性明显低落,过氧化脂质含量显著升高,但前列腺素E类药物却明显提高抗氧化酶活性,抑制过氧化脂质生成。巨噬细胞含脂的形态计量学分析表明前列腺素E,尤其前列腺素E₂明显抑制泡沫细胞形成。糖基化修饰低密度脂蛋白机理较为复杂,其酶活性仅轻微低落但过氧化脂质含量却显著升高,提示是由于低密度脂蛋白非酶性糖基化,随后又诱发复杂的糖基氧化过程所致,从而加重了糖尿病性动脉粥样硬化发展。本实验显示前列腺素E,尤其前列腺素E₂对低密度脂蛋白糖基化修饰也有明显保护作用。

关键词 氧化修饰低密度脂蛋白;糖基化修饰低密度脂蛋白;抗氧化酶;硫代巴比妥酸反应物质;前列腺素E;巨噬细胞

近年来氧化修饰脂蛋白和动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)关系的实验研究已引起广泛注目,特别是目前研究已证实活体内确实存在氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OLDL)^[1,2]。但是这一过程确系在何处,如何发生,发生后又产生一系列何种影响和结果,至今所知仍甚少。

糖尿病性As发生率和病死率明显高于非糖尿病患者,而且病变严重,常成为致死并发

* 天津自然科学基金资助项目

症,其发生机理更为复杂,难于防治。近年来研究提示糖基化低密度脂蛋白(glycosylated low density lipoprotein, GLDL)在糖尿病性As发生中具有重要作用。并且糖尿病患者体内常同时存在GLDL和OLDL两种不同修饰过程^[3],且关系极为密切。从而可见研究GLDL特性与OLDL关系对阐明糖尿病性As机理和防治是非常重要的。本室以往研究中已证实大剂量前列腺素E₂(prostanglandin E₂, PGE₂)具有抗As作用,其机理与抗氧化密切相关。此次实验除进行氧化和糖基化修饰低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的比较研究外,并进一步观察了前列腺素E(prostanglandin E, PGE)类药物的保护作用。

1 材料和方法

1.1 低密度脂蛋白的提取

依郭刚等的方法取健康人血,Backman超速离心机55 000 r·min⁻¹离心2.5 h,收集LDL,透析48 h超滤保存。

1.2 低密度脂蛋白的氧化和糖基化修饰

将LDL分为七组:①对照组(nature LDL, NLDL);②氧化组(OLDL);③氧化前加PGE₂组;④氧化前加前列腺素E₁(prostanglandin E₁, PGE₁)组;⑤糖基化(GLDL)组;⑥糖基化前加PGE₂组;⑦糖基化前加PGE₁组。各组PCE用量均为25 mg·L⁻¹,4℃,48 h;各氧化组均加入Cu²⁺终浓度为10 μmol·L⁻¹,37℃,6 h;各糖基化组LDL,加80 mmol·L⁻¹葡萄糖PBS液(1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH7.4),37℃,5 d。

1.3 小鼠腹腔含巨噬细胞液体的制备

离心后用10%小牛血清调整细胞为5×10⁹·L⁻¹作为原始细胞悬液,以盖片法培养上述细胞,48 h后按原分组分别加入药物再培养2.5 h,取出盖片常规油红O染色,镜下观察形态学,便于含脂的相对定量分析,将其分为三级:Ⅰ级,胞浆内微脂滴小于胞浆面积1/3;Ⅱ级,脂滴量达胞浆面积1/3~2/3;Ⅲ级,脂滴达胞浆面积2/3以上。

1.4 检测方法

参照翁玉椿等^[5]方法进行各组LDL脂过氧化物(lipid peroxide, LPO)微量测定。参照Paglia等^[6]方法测定LDL的谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-POA)活性;以邻苯三酚自氧化抑制法^[7]检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,

并同时计算了上述两种抗氧化酶活性和LPO的比值。各组巨噬细胞摄脂的形态学和油红O组织化学观察,此外用IMAG300型图像分析仪对氧化修饰组进行了巨噬细胞脂质含量的形态计量学分析。

以t检验分析各组均数间的差异性。

2 结果

2.1 前列腺素E对氧化低密度脂蛋白的保护作用比较

低密度脂蛋白以Cu²⁺氧化修饰后,OLDL组的GSH-POA和SOD活性均明显低于NLDL组,具极显著性差异,这说明LDL的氧化明显抑制了抗氧化酶活性。但与OLDL组相比,两种PGE用药组的两酶活性均显著上升。尤以PGE₂组作用更为突出,且具有极显著统计学意义(Table 1)。

Table 1. Comparison of antioxidizing enzyme activities between LDL oxidation of each group ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	GSH-POA(U)	SOD(kU·L ⁻¹)
1. NLDL	5	11.58±0.35	9.73±0.21
2. OLDL	5	1.15±0.14	4.48±0.32
3. PGE ₂	5	18.09±0.17	12.73±0.97
4. PGE ₁	5	10.50±0.29	5.74±0.35

Group 1,3 and 4 compared with group 2, P<0.01; group 3 compared with group 4, P<0.01.

氧化低密度脂蛋白组的LPO含量高于NLDL组,但无统计学意义,而PGE₂组则明显低于OLDL组(P<0.01)。OLDL组的GSH-POA/LPO、SOD/LPO比值均明显低于NLDL组,但PGE₂组的上述比值却显著高于OLDL组,也高于NLDL(Table 2)。

Table 2. LPO content and the ratio of antioxidizing enzyme activities to LPO in oxidized groups.

Groups	n	LPO		
		(MDA μmol·L ⁻¹)	GSH-POA/LPO	SOD/LPO
1. NLDL	5	35.9±8.4	0.32±0.04	0.27±0.03
2. OLDL	5	44.8±8.8	0.03±0.02	0.10±0.04
3. PGE ₂	5	8.0±2.6	2.26±0.65	1.59±0.37
4. PGE ₁	5	49.6±17.1	0.21±0.02	0.12±0.02

Group 1 and 3 compared with group 2, P<0.01; group 3 compared with group 4, P<0.01.

2.2 前列腺素 E 对糖基化低密度脂蛋白的保护作用比较

糖基化低密度脂蛋白组的两酶活性虽明显低于 NLDL 组但却仍显著高于 OLDL 组 ($P < 0.01$)。PGE₂ 和 PGE₁ 组的酶活性均明显高于 GLDL 组 ($P < 0.01$, Table 3)。

Table 3. Comparison of antioxidizing enzyme activities between LDL glycosylation of each group ($x \pm s$).

Groups	n	GSH-POA(U)	SOD(kU · L ⁻¹)
1. NLDL	5	11.58 ± 0.35	9.73 ± 0.21
5. GLDL	5	1.95 ± 0.08	5.58 ± 0.37
2. OLDL	5	1.15 ± 0.14	4.48 ± 0.32
6. PGE ₂	5	7.13 ± 0.10	11.19 ± 0.16
7. PGE ₁	5	2.26 ± 0.18	16.23 ± 0.13

Group 1,6 and 7 compared with group 5, $P < 0.01$; group 5 compared with group 2, $P < 0.01$; group 6 GSH-POA compared with group 7, $P < 0.01$.

Table 4. LPO content and the ratio of antioxidizing enzyme activities to LPO in glycosylated LDL groups.

Group	n	LPO (MDA $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	GSH-POA/LPO	SOD/LPO
1. NLDL	5	35.87 ± 8.4	0.323 ± 0.04	0.27 ± 0.03
5. GLDL	5	76.0 ± 10.1	0.026 ± 0.008	0.07 ± 0.03
2. OLDL	5	44.8 ± 8.8	0.026 ± 0.016	0.1 ± 0.04
6. PGE ₂	5	13.9 ± 2.9	0.51 ± 0.03	0.81 ± 0.06
7. PGE ₁	5	15.3 ± 0.76	0.148 ± 0.02	1.06 ± 0.17

Group 1,6 and 7 compared with group 5, $P < 0.01$; group 5 compared with group 2, $P < 0.01$; group 6 GSH-POA compared with group 7, $P < 0.01$.

从 Table 4 的 LPO 含量来看, GLDL 组含量最高超过 OLDL 组。但两用药组的 LPO 含量明显低于 GLDL 组而其两酶活性与 LPO 的比值却显著高于 GLDL 组 ($P < 0.01$)。

2.3 巨噬细胞形态和含脂的形态计量分析

对照组的细胞较单核细胞略大, 见少量伪足, 含脂量多为 I 级; OLDL 组的细胞体积明显增大, 伪足增多, 含多量 II ~ III 级粗大脂滴, 部分细胞已呈泡沫状; PGE₂ 组的细胞形态和大

小多与单核细胞相似, 罕见伪足, 胞浆内脂滴甚少。上述观察与相应的形态计量学分析结果一致, 无论是从巨噬细胞平均面积或其脂质含量面积来比较均以 OLDL 组为最高 (Table 5)。

Table 5. Morphometric analysis of the average area and lipid content of macrophages in LDL oxidation of each group ($x \pm s$)

Groups	n	average area of macrophage (μm^2)	area of macrophage lipid content (μm^2)
1. NLDL	100	230 ± 71	36 ± 19
2. OLDL	100	387 ± 193	125 ± 70
3. PGE ₂	100	157 ± 51	21 ± 13

Group 2,3 compared with group 1, $P < 0.001$; group 2 compared with group 3, $P < 0.001$.

3 讨论

3.1 氧化和糖基化对低密度脂蛋白的损伤和致动脉粥样硬化机理

本实验结果显示 LDL 经 Cu²⁺ 作用后, 其两种抗氧化酶活性明显下降而脂质过氧化物含量升高, 这表明 LDL 已被 Cu²⁺ 氧化修饰, 不饱和脂肪酸大量分解^[8]、与此同时由于载脂蛋白 B 发生降解, 其赖氨酸残基与脂肪酸分解产物共价结合后被巨噬细胞清道夫受体迅速识别而大量摄取, 从而促进泡沫细胞形成^[9,10]。本实验通过各组巨噬细胞的形态学观察以及形态计量学分析充分证实了 OLDL 促使巨噬细胞转变为泡沫细胞的过程。现已明确后者是 As 早期脂纹病变的形态学基础。

糖基化对 LDL 的损伤机理较为复杂尚不够明了。在修饰过程中葡萄糖与赖氨酸残基不需酶的催化而结合在一起, 形成早期产物—果糖赖氨酸, 后者是可逆性的。但 LDL 的糖基化过程可促发自由基生成, 明显增加了随后发生的自身氧化损伤, 这称为糖基化—氧化过程 (glycooxidation)^[3,10], 其终产物如羧甲基赖氨酸 (carboxymethyllysine) 等, 这个过程为不可逆性而且损伤组织严重, 可见糖基化和氧化过程密切相关。从本实验结果 (Table 3,4) 可以看出 GLDL 组的 LPO 含量明显高于 OLDL 组 ($P <$

0.01),但两酶活性也高于 OLDL 组 ($P < 0.01$),致使两者变化极不成比例,这足以说明 LPO 明显升高的原因之一极可能是非酶性糖基化所致.因此一开始对酶的干扰不大,但糖基化本身促发了复杂的糖基-氧化过程,从而使 LPO 含量十分明显的高于 OLDL 组.再者,糖尿病患者的血管壁胶原成分也由于血中大量的糖基-氧化产物堆积而发生交联,这将更促进病变的发展.由此可以理解糖尿病患者的动脉壁细胞和组织损伤远较非糖尿病患者严重,因此促进 As 的机会也就大大增加.

3.2 前列腺素 E 对低密度脂蛋白氧化和糖基化修饰的保护作用

本文实验表明在 LDL 氧化修饰过程中 PGE 类药物显示了抗氧化保护作用,尤其是 PGE₂ 其提高两种抗氧化酶活性和抑制 LPO 生成的能力均高于 PGE₁. 结合巨噬细胞形态学和含脂的形态计量学分析结果,从另一个角度又说明了 PGE₂ 通过其抗氧化机是抑制了巨噬细胞清道夫受体活性,表现在明显抑制巨噬细胞摄脂和泡沫细胞形成^[11].

两种 PCE 在糖基化修饰过程中也均显示有抗修饰保护作用.与 GLDL 组相比,除能提高抗氧化酶活性外,尤其是有明显抑制 LPO 生成的能力.相比之下,仍以 PGE₂ 作用优于 PGE₁.

3.3 本实验在衡量前列腺素 E 类药物抗氧化能力方面重视了酶活性和过氧化脂质的比值

硒是谷胱甘肽过氧化物酶的组成成份之一,其本身能将脂肪酶等物质内的 H₂O₂ 转化为损伤力较小的醇类,具有加速分解和清除 LPO 的作用,因此认为 GSH-POA/LPO 比值比单一的 GSH-POA 活性能更准确地反应机体的抗氧化能力,因而已被认为是一重要的指标.有人提出 SOD/LPO 比值在反应机体抗氧化能

力上也具有明显意义,本实验某些数据支持这一论点.另外实验结果表明用药组的两种抗氧化酶在抗 LDL 修饰过程中也显示了协同作用.

参考文献

- 1 Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosendeld ME, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest*, 1989, **84**: 1 086~95.
- 2 Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 1 372~76.
- 3 Lyons TJ. Glycation and oxidation: A role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 1993, **71**: 268~318.
- 4 郭刚,田俊敏,解用虹.低密度脂蛋白的分离、提纯和鉴定.天津医学院学报,1991,**15**:16~19.
- 5 翁玉椿,王秀平,卢泳才, et al. 细胞和细胞膜内过氧化脂质的微量定量.细胞生物学杂志,1985,**7**:142~144.
- 6 Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967, **70**(1):158~169.
- 7 黄维嘉,陈宏础,黄天禄.邻苯三酚自氧化抑制法测定人红细胞超氧化物歧化酶.中华医学检验杂志,1989, **12**:206~208.
- 8 Esterbauer H, Jurgens C, Quichenberger O, et al. Autoxidation of human low density lipoprotein; Loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res*, 1987, **28**: 495~509.
- 9 Parthasarathy S, Fong LC, Otero D, et al. Recognition of solubilized apoproteins from delipidated oxidized low density lipoprotein (LDL) by the acetyl-LDL receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 537~540.
- 10 Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification; The potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes mellitus. *Biochem J*, 1987, **245**: 243~250.
- 11 邱近明,徐东坡,孙保存, et al. PGE₂ 对 LDL 氧化修饰和巨噬细胞清道夫受体活性的影响.中华病理学杂志, 1995, **24**: 165~167.