

低密度脂蛋白体外氧化修饰过程中几种产物变化的动力学研究

刘尚喜 陈媛 周玫

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

Studies on Kinetic Changes of Several Products Produced During Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein in vitro

LIU Shang-Xi, CHEN Yuan and ZHOU Mei

(Research Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT

Aim Oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) has been proved to play a crucial role in atherogenesis. In this paper, we studied the kinetic changes of several products produced during oxidative modification of LDL in vitro.

Methods Oxidative modification of LDL was initiated by Cu^{2+} and kinetic changes of lipid hydroperoxides (LOOH), conjugated diene (CD), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), relative electrophoretic mobility (REM) and fluorescence of LDL were determined.

Results The content of TBARS, fluorescence in LDL and REM of LDL increased with the modification time, but the changes of LOOH and CD were different. Their kinetic changes showed three different phases: lag, propagation and decomposition.

Conclusions The values of TBARS, REM and fluorescence of LDL could denote the extent of modification, but that of LOOH and CD could not. By comparing the lag time, the susceptibility to the oxidative modification of LDL from different donors and the inhibitory effect of antioxidants on the oxidative modification could be studied.

KEY WORDS Low density lipoprotein; Cu^{2+} ; Oxidative modification; Kinetics

摘要 用 Cu^{2+} 引发低密度脂蛋白的氧化修饰, 研究了低密度脂蛋白氧化修饰过程中脂氢过氧化物、共轭二烯烃、硫代巴比妥酸反应物质、琼脂糖凝胶电泳迁移率和荧光物质含量变化的动力学。结果发现: 硫代巴比妥酸反应物质、琼脂糖凝胶电泳迁移率和荧光物质含量随修饰时间的延长呈增加趋势, 它们含量的高低可以反映低密度脂蛋白的修饰程度。而脂氢过氧化物和共轭二烯烃的变化则不同, 它们的动力学变化呈现三个时相: 延迟期、扩增期和降解期, 它们的高低不能反应低密度脂蛋白的修饰程度, 但可通过观察延迟期的时间长短, 研究不同来源低密度脂蛋白氧化修饰的难易程度及抗氧化剂对低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用。

关键词 低密度脂蛋白; Cu^{2+} ; 氧化修饰; 动力学

近年来的研究发现低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的氧化修饰与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生发展关系密切^[1], 因此有关的研究引起了人们的重视。在体外, LDL 的氧化修饰可由多种系统所介导, 包括细胞系统 (内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞等) 和过渡金属离子系统 (Cu^{2+} 和 Fe^{2+})^[2~4]。无论是细胞介导的还是过渡金属离子介导的 LDL 氧化修饰都涉及自由基介导的脂质过氧化反应, 反应过程中产生了大量的脂氢过氧化物 (LOOH) 及其降解产物活性醛类物质。后者可与载脂蛋白 B 上的 ϵ -氨基结合, 使其负电性增加和产生荧光物质^[5,6]。对 LDL 氧化修饰的研究多是通过测定脂质过氧化物及其降解产物, 如硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)、共轭二烯烃

(conjugated diene, CD)等和载脂蛋白 B 修饰后一些性质(如相对电泳迁移率 relative electrophoretic mobility, REM)和荧光物质含量等改变^[7,8]。由于这些指标在 LDL 氧化修饰过程中变化的动力学不同,因此某些非动力学的测定结果往往不能真实反映 LDL 的氧化修饰状况。本文通过研究 LDL 氧化修饰过程中 LOOH、CD、TBARS、REM 和荧光物质含量的动力学变化,分析了这些指标在 LDL 氧化修饰研究中所起的作用。

1 材料和方法

1.1 低密度脂蛋白的分离

新鲜人血购自南方医院血库, EDTA 抗凝, 低速离心分离血浆, 人血浆 LDL ($d=1.040\sim1.063$ kg/L) 采用一次性密度梯度超速离心法制备^[9]。分离的 LDL 置含 200 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 的 PBS 中透析 48 h, 超滤除菌后 4℃ 保存。

1.2 低密度脂蛋白的氧化修饰

低密度脂蛋白的氧化修饰采用本室建立的方法^[7], 无 EDTA 的 LDL (100 mg/L) 置含 5 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 的 PBS 中, 37℃ 温育一定时间。

1.3 测定方法

蛋白浓度测定采用 Lowry 法^[10], LOOH 含量测

定采用 FOX 法^[11], 取 50 μl LDL 溶液加到 950 μl FOX 反应液 (100 $\mu\text{mol/L}$ 二甲酚橙, 250 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} , 25 mmol/L H_2SO_4 和 4 mmol/L 丙丁酚, 溶于 90% 甲醇中) 中, 震荡后室温放置 30 min, 离心后 560 nm 测定光吸收, 用叔丁基脂氢过氧化物作为标准, 结果用 μmol LOOH/g LDL 蛋白表示; 硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS) 值测定采用 Schuh 等^[12]方法, 以四乙氧基丙烷 (Sigma) 作为标准对照, 结果以 μmol 丙二醛/L LDL 蛋白表示; CD 测定采用 Kleinveld 等^[13]方法, 在 Beckman DU640 分光光度计上用动力学分析程序连续记录 LDL 氧化修饰过程中 234 nm 吸光度, 绘出 CD 的变化图谱, 琼脂糖电泳使用 0.5% 的琼脂糖和 pH 8.6 的巴比妥酸缓冲液, 40 mA 电泳 50 min^[14], REM 为修饰 LDL 的泳动距离和正常 LDL 的泳动距离之比; 荧光物质测定采用 Esterbauer 等^[15]方法, 用日本岛津 RF540 型荧光分光光度计在 360 nm 激发光下记录 360 至 500 nm 的发射光谱。

2 结果

LOOH 是脂质氧化的直接产物, 对其动力学进行研究可以了解 LDL 氧化修饰早期的脂质过氧化情况。以前对 LOOH 的测定要用高压液相层析, 由于操作复杂, 很难对 LDL 的氧化过程进行连续

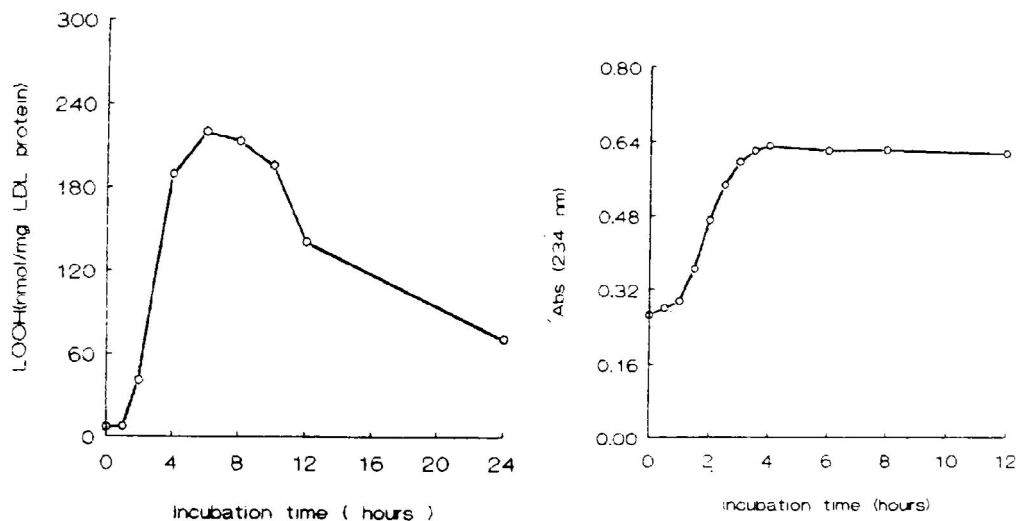


Figure 1. Kinetic changes of LOOH(a) and CD(b) during LDL oxidative modification.

监控^[17]。本文采用 Woff 的 FOX 法测定 LOOH, 该方法简单易操作, 可对 LDL 氧化修饰过程中 LOOH 的变化进行连续监控。从 Figure 1a 可以看出 LDL 氧化修饰过程中 LOOH 的变化呈现三个时相, 最初一段时间 LOOH 维持在低水平几乎不发生变化, 称为延迟期; 接着 LOOH 急剧上升, 称为扩增期, 最后 LOOH 达到最大值并出现下降趋势, 称为降解期。

用 Beckman 紫外分光光度计连续监测 LDL 氧化修饰过程中 CD 的变化(测 234 nm 光吸收)得到与 LOOH 测定相似的动力学曲线, 也可观察到延迟期和扩增期, 但降解期不明显(Figure 1b)。

硫代巴比妥酸反应物质是常用来反映脂质过氧化反应发生的间接指标, 它测定的是脂过氧化物分解产物的醛类物质, 常用丙二醛代表, 事实上能与硫代巴比妥酸反应的远不止丙二醛^[18]。在 LDL 的氧化修饰过程中总的 TBARS 值随温育时间的延长逐渐升高, 最后达到最大值并趋于稳定, 但是 LDL 的 TBARS 含量则变化幅度较小, 说明大量的 TBARS 存在于水溶液中, 通过透析可以将其除去(Figure 2)。

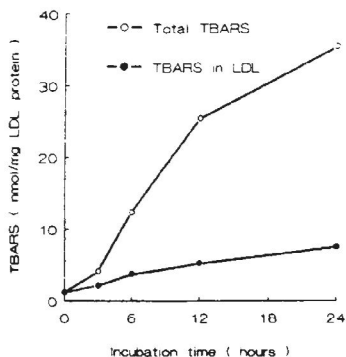


Figure 2. Kinetic changes of TBARS during LDL oxidative modification.

低密度脂蛋白(LDL)氧化修饰后琼脂糖电

泳迁移率加快, 主要是因为氧化过程中产生的醛类物质与 LDL 上的氨基结合, 使其负电性增加, 由 Figure 3 可见随温育时间的延长, LDL 迁移逐渐加快, 其相对电泳迁移率(REM)随温育时间的延长而增加(Figure 4), 说明 LDL 修饰程度逐渐升高。

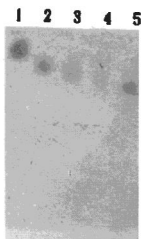


Figure 3. The pattern of agarose gel electrophoresis of LDL after oxidative modification.

1, 2, 3, 4, 5 represent LDL modified for 0, 3, 6, 12 and 24 respectively.

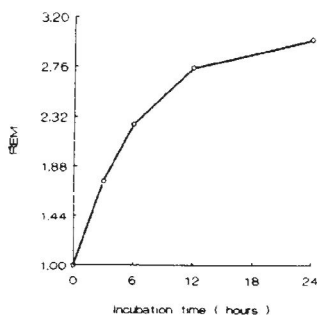


Figure 4. Kinetic changes of REM during LDL oxidative modification.

低密度脂蛋白(LDL)氧化修饰后, 当用 360 nm 激发光激发时在 430 nm 处的荧光峰增强, 这可能是由于氧化修饰过程中产生的醛类物质与载脂蛋白 B 的 ϵ -氨基结合产生了新的

荧光发色团。由 Figure 5 可见,随温育时间的延长,LDL 在 430 nm 处的荧光强度逐渐增强,说明 LDL 的修饰程度逐渐升高。

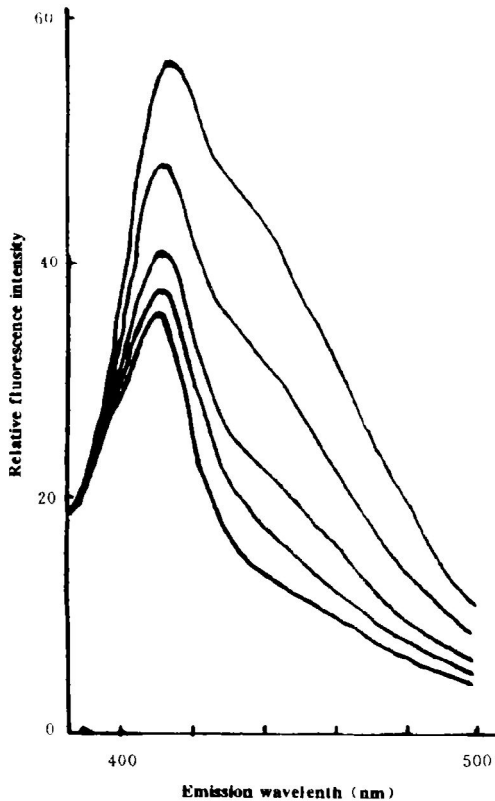


Figure 5. Emission fluorescence spectra at 360 nm excitation of LDL after oxidative modification. From bottom to top are native LDL modified for 3, 6, 12 and 24 h.

3 讨论

Cu^{2+} 诱导的 LDL 氧化修饰的可能机制为: LDL 上存在微量的 LOOH, Cu^{2+} 能催化 LOOH 产生 LOO^{\cdot} 和 LO^{\cdot} 。 LOO^{\cdot} 和 LO^{\cdot} 都是很活泼的自由基,可以引发 LDL 上的其他不饱和脂肪酸过氧化产生更多的 LOOH,形成自由基链式反应。 LOOH 可分解产生活性醛类物质,这些物质与载脂蛋白 B 上的 ϵ -氨基结合使其产生修饰^[16]。

LOOH 和 CD 是 LDL 氧化修饰过程中产生的两种重要的中间产物,由于它们的化学性质非常活泼,可继续与其它物质反应或降解为

脂质过氧化终产物,因此 LDL 修饰过程中其变化不是持续性增加,可观察到延迟期、扩增期和降解期的存在。由于 LDL 氧化修饰过程中 LOOH 和 CD 的变化不是持续性增加,因此 LOOH 和 CD 的非动力学测定结果并不能反映 LDL 的修饰程度。但由于上述两种物质的测定方法简便易操作,可对 LDL 的氧化过程进行连续监控并可测出 LDL 氧化修饰的延迟期的时间,因此常用来研究不同来源的 LDL 对氧化修饰的敏感性及其抗氧化剂对 LDL 氧化修饰的抑制作用(主要通过比较延迟期的时间长短来进行)^[13,18]。

硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)是脂质过氧化反应的终产物,它主要由一些醛类物质所构成。在 LDL 氧化修饰过程随脂质过氧化反应的进行,产生的 TBARS 的量也在不断增加,因此 TBARS 的含量可以反映 LDL 的修饰程度。但必须指出的是这里的 TBARS 量是 LDL 氧化修饰后产生的总的 TBARS,而不是 LDL 上的 TBARS。因为 LDL 氧化修饰过程中产生的 TBARS 主要(80%以上)存在于水溶液中,通过透析可将其除去。因此在以 TBARS 为指标反映 LDL 的修饰程度时,必须在修饰后和透析前测定 TBARS 含量,这样测出的 TBARS 值才能准确反映 LDL 的修饰程度。

相对电泳迁移率(REM)是常用来反映 LDL 修饰程度的另一重要指标。LDL 氧化修饰后由于其游离氨基与修饰过程中产生的醛类物质结合,导致其负电性增加,琼脂糖电泳迁移加快。因此 REM 能直观地反映 LDL 的氧化修饰程度,特别是用于与一些化学修饰如乙酰化修饰、丙二醛修饰等进行修饰程度比较时更为有效,但其灵敏度和重复性较差。

低密度脂蛋白(LDL)氧化修饰后用 360 nm 激发光激发时,其在 430 nm 处的荧光强度随修饰程度的增加而增强,因此荧光强度也能间接反映 LDL 的氧化修饰程度,但由于无法从荧光光谱得到反映修饰程度的相对数据,使其应用受到限制。

综上所述,由于 LDL 氧化修饰过程中几种

主要产物的动力学变化不同,因此在选择这些产物作为描述 LDL 氧化修饰的指标时应考虑到它们的动力学变化。用非动力学测定结果反映 LDL 的氧化修饰程度时,应选择 TBARS 和 REM 而不能选择 LOOH 和 CD。研究不同来源 LDL 氧化修饰的难易程度及抗氧化剂对 LDL 氧化修饰的抑制作用最好选用 LOOH 和 CD 为指标,观察其动力学变化曲线,比较延迟期的时间长短。

参考文献

- 1 陈琰,周玫. 脂质过氧化作用与动脉粥样硬化. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(4): 278~283.
- 2 Panasenko OM, Volnova TV, Azizova OA. Free radical modification of lipoproteins and cholesterol accumulation in cells upon atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 1991, 10: 137~148.
- 3 Heincke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest*, 1987, 74: 1 890~894.
- 4 Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*, 1984, 4: 357~364.
- 5 Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, et al. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 3 883~887.
- 6 Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, et al. Biochemical structure, and functional properties of oxidized low density lipoprotein. *Chem Res Toxicol*, 1990, 3: 77~92.
- 7 刘尚喜,周玫,陈琰. 低密度脂蛋白的氧化修饰和丙二醛修饰的比较研究. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(6): 569~572.
- 8 Ding ZH, Chen Y, Zhou M, et al. Low density lipoprotein modified by ultraviolet irradiation the modification mechanism may differ from that induced by Cu^{2+} . *Med Sci Res*, 1993, 21: 157~158.
- 9 张林华,刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血浆脂蛋白. 生物化学和生物物理学报, 1992, 21(3): 257~260.
- 10 Lowry OH, Rosebroug N, Farr AL, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1957, 193: 265~275.
- 11 Woff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for the measurement of hydroperoxide. *Methods in Enzymology*, 1994, 223: 182~189.
- 12 Schuh J, Fairclough GF, Haschemeyer RH. Oxygen mediated heterogeneity of apo low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 3 173.
- 13 Kleinveld HA, Hak-Lemmers HLM, Stalenhoef AFH, et al. Improved measurement of low density lipoprotein susceptibility to copper induced oxidation; application of a short procedure for isolating low density lipoprotein. *Clin Chem*, 1992, 38: 2 066~72.
- 14 王克勤,周凤兰,程小款. 琼脂糖电泳用于人血清 β -脂蛋白的分离分型. 生物化学与生物物理学报, 1979, 11(1): 37~48.
- 15 Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, et al. Autooxidation of human low density lipoprotein; loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res*, 1987, 28: 495~509.
- 16 Thomas CE, Jackson RL. Lipid peroxide involvement in copper-dependence and independent oxidation of low density lipoprotein. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991, 256: 1 182~188.
- 17 Lynch SM, Frei B. Mechanism of copper and iron dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J Lipid Res*, 1993, 34: 1 745~753.
- 18 Liu SX, Chen Y, Zhou M, et al. Inhibitory effect of ebselen on the oxidation of low density lipoprotein. *Redox Report*, 1995, 1: 357~360.

(1996-10-02 收到, 1996-11-30 修回)