

内源性高甘油三酯血症患者体内存在氧化型低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和高密度脂蛋白

江 渝 刘秉文 范 萍 刘 宇 张荣爵

(华西医科大学载脂蛋白研究室, 成都 610041)

Oxidative Modification of Plasma Low Density Lipoprotein, Very Low Density Lipoprotein and High Density Lipoprotein in Endogenous Hypertriglyceridemia

JIANG Yu, LIU Bing-Wen, FAN Ping, LIU Yu and ZHANG Rong-Jue

(Apolipoprotein Research Unit, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT

Aim Oxidized low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL) and high density lipoprotein (HDL) were occurred in *vivo* in endogenous hypertriglyceridemia (HTG) human.

Methods Human plasma triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), apolipoproteins A I, A II, B100, C II, E and lipoperoxide (LPO) levels in 25 endogenous HTG patients whose plasma TG levels were >2.26 mmol/L and $TC < 6.21$ mmol/L, and in 25 normal age-matched persons ($TG < 2.26$ mmol/L, $TC < 6.21$ mmol/L) were measured. Blood glucose, TC, TG and HDL-C were performed by enzyme method. Plasma apolipoprotein were determined by radial immunodiffusion (RID) assay. The human plasma LDL, VLDL and HDL were isolated by the one step density gradient ultra-centrifugation method. The oxidative modification of LDL, VLDL and HDL was identified by agarose gel electrophoresis, absorbance at 234 nm and fluorescence

of thiobarbituric acid reaction substance (TBARS).

Results The results showed that plasma TG, LPO and apolipoprotein B100 levels in endogenous HTG group were significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$). Plasma HDL-C and apolipoprotein A I contents in endogenous HTG group were significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$). The electrophoretic mobility of LDL, VLDL and HDL was increased and absorbance at 234 nm and TBARS of LDL, VLDL and HDL in endogenous HTG group were significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$).

Conclusion The results suggest that not only LDL but also VLDL and HDL were oxidatively modified in *vivo* of endogenous HTG patients.

KEY WORDS Hypertriglyceridemia, endogenous; Lipoprotein, low density, very low density, high density; Oxidative modification

摘要 为探讨内源性高甘油三酯血症患者体内低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白及高密度脂蛋白是否发生氧化修饰,对25例内源性高甘油三酯血症患者与25例年龄性别相匹配的正常人的血糖、血脂、载脂蛋白及脂过氧化物进行了分析,并对其血浆低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白及高密度脂蛋白的电泳迁移率、234 nm光吸收和硫代巴比妥酸反应物质含量的改变进行了测定。结果表明,内源性高甘油三酯血症患者血浆甘油三酯、脂过氧化物和载脂蛋白B100、C II、C III及E显著升高($P < 0.01$),高密度脂蛋白和载脂蛋白A I显著降低($P < 0.01$),低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和高密度脂蛋白电泳迁移率均较正常人相应脂蛋白的迁移率增加,234 nm光吸收及硫代巴比妥酸反应物质含量均显著增加($P < 0.01$)。说明内源性高甘油三酯血症患者不仅血浆低密度脂蛋白、而且极低密度脂蛋白和高密度

脂蛋白均发生了氧化修饰。

关键词 高甘油三酯血症, 内源性; 脂蛋白, 低密度, 极低密度, 高密度; 氧化修饰

内源性高甘油三酯血症(endogenous hypertriglyceridemia, HTG)又称N型高脂血症,是我国最常见的一类高脂血症。流行病学研究表明,HTG是冠心病发生的独立危险因子^[1]。血脂特别是低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)含量与冠心病呈正相关,高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)含量与冠心病呈负相关^[2]。Steinberg等^[3]提出氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, OLDL)致动脉粥样硬化的作用比天然LDL更强。现已证明,OLDL可在体内形成,并存在于动脉粥样硬化的斑块中。本室汪浩川等^[4,5]报道,在体外不仅LDL,而且极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)及HDL均可被氧化修饰。HDL一旦氧化修饰后,即具有较强的致动脉粥样硬化作用。曹圣等^[6]将VLDL与巨噬细胞和平滑肌细胞在体外保温24h或48h发现VLDL发生了氧化。最近本室江渝等^[7]报道,家兔高脂血症实验模型中LDL、VLDL和HDL在活体内发生了氧化修饰,但在人体内是否存在VLDL及HDL氧化修饰,在所查国内外文献中迄今尚未见报道。为此,我们进行了研究。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 高甘油三酯血症组 选择空腹血浆甘油三酯(triglyceride, TG) $> 2.26 \text{ mmol/L}$ (2.0 g/L)及总胆固醇(total cholesterol, TC) $< 6.21 \text{ mmol/L}$ (2.4 g/L)的患者25例(男21例,女4例),年龄41~65(54.9 ± 5.5)岁,体重指数 25.4 ± 3.5 ,多为干部、工人,经询问病史及体格检查排除心、肝、肾及内分泌等疾病。

1.1.2 对照组 选择空腹血浆TG $< 2.26 \text{ mmol/L}$, TC $< 6.21 \text{ mmol/L}$ 的健康成年人25例(男21例,女4例),年龄28~65(53.4 ± 9.1)岁,体重指数 21.8 ± 2.9 ,多为教师、干部,经询问病史及体格检查排除心、肝、肾及内分泌等疾病。

1.2 方法

1.2.1 血糖和血脂的测定 按酶法(北京中生公司试剂盒)测定血糖、血浆TG、TC及HDL-C值。

1.2.2 血浆载脂蛋白测定 血浆载脂蛋白AⅠ、AⅡ、B100、CⅠ、CⅡ及E均采用本室研制的单向免疫扩散试剂盒测定^[8]。

1.2.3 血浆脂蛋白的制备 按本室张林华等^[9]一次性密度梯度超速离心法制备血浆LDL、VLDL及HDL。然后按Markwell等改良Lowry法测定分离纯化的LDL、VLDL及HDL蛋白含量。

1.2.4 硫代巴比妥酸反应物质测定 在激发光为515 nm,发射光为550 nm条件下按荧光法^[10,11]置于日本岛津RF-510荧光分光光度计测定荧光强度值。

1.2.5 天然及氧化型脂蛋白的鉴定

1.2.5.1 琼脂糖凝胶电泳 先用苏丹黑B预染血浆和已分离纯化的LDL、VLDL和HDL组分,然后用0.5%琼脂糖凝胶在70~80 V下电泳20~30 min。

1.2.5.2 脂蛋白234 nm紫外光吸收 在234 nm波长下,用日本岛津UV-120-02型紫外分光光度计测定分离的LDL、VLDL和HDL的光吸收值。

2 结果

2.1 血糖、血脂、载脂蛋白及脂过氧化物含量

从表1(Table 1)可见,与对照组比较,HTG组患者空腹血浆TG、载脂蛋白B100、CⅠ、CⅡ、E及LPO含量均显著增加($P < 0.01$);HDL-C和载脂蛋白AⅠ显著降低($P < 0.01$);血糖、TC和载脂蛋白AⅡ无明显改变($P > 0.05$)。

2.2 琼脂糖凝胶电泳

由图1(Figure 1)可见,血脂含量正常者其血浆HDL、LDL及VLDL的电泳迁移率与正常人血浆 α 、 β 和前 β -脂蛋白相对应,而HTG患者血浆HDL、LDL及VLDL迁移率均较相应正常脂蛋白为大。这表明,HTG患者血浆LDL、VLDL及HDL发生氧化修饰,其负电荷增加,向正极迁移率增加。

2.3 硫代巴比妥酸反应物质含量

由表2(Table 2)可见,与对照组相比较,HTG组患者血浆LDL、VLDL及HDL中硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reaction substance, TBARS)含量显著增加,分别增加1.44、2.54和1.98倍($P < 0.01$)。这表明,

HTG 患者血浆不仅 LDL、而且 VLDL 及 HDL 均发生了氧化修饰,因而其 TBARS 值显著增加。

Table 1. Plasma glucose, lipids, apolipoproteins and LPO levels in HTG and control group ($\bar{x} \pm s$).

	Control (n=25)	HTG (n=25)
Glucose (mmol/L)	5.27±0.57	5.56±1.00
Lipids (mmol/L)		
TG	1.48±0.26	4.12±1.71 ^c
TC	4.94±0.90	5.06±0.80
HDLC	1.34±0.28	1.01±0.25 ^c
Apolipoproteins (mg/L)		
AI	1229±204	1104±150 ^c
A II	265±43	259±38
B100	940±281 ^c	1313±425 ^c
C I	36±8	63±20 ^c
C II	45±11	56±16 ^c
E	93±24	175±53 ^c
LPO(μmol/L)	2.19±0.35	5.27±0.65 ^c

c: $P < 0.01$, compared with the control group.

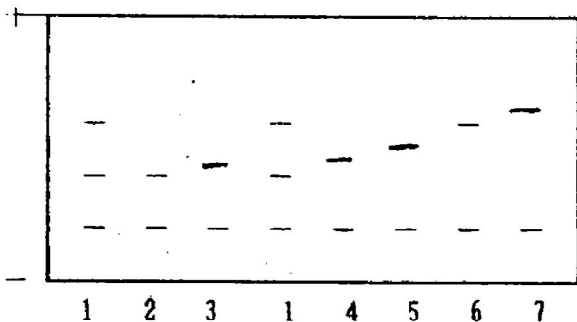


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of lipoproteins (Samples were pre-stained with sudan Black B). Lane 1. Normal human plasma, 2. Control LDL, 3. HTG LDL, 4. Control VLDL, 5. HTG VLDL, 6. Control HDL, 7. HTG HDL.

2.4 紫外光吸收曲线

由图 2(Figure 2)可见,内源性 HTG 患者血浆 HDL 在 234 nm 呈最大光吸收,而对照组血浆 HDL 则无吸收峰。表明 HTG 患者血浆 HDL 发生了氧化修饰,因而在 234 nm 呈特征性吸收峰。

2.5 血浆脂蛋白 234 nm 光吸收变化

由表 3(Table 3)可见,HTG 患者 LDL、VLDL 及 HDL 的 234 nm 光吸收值较对照组显著增加($P < 0.01$),分别增加 0.97、0.85 和 1.15 倍。这表明,HTG 患者体内不仅 LDL,而且 VLDL 及 HDL 均发生了氧化修饰。

Table 2. Changes of TBARS contents of plasma LDL, VLDL and HDL in HTG and control groups (mmol/g, $\bar{x} \pm s$).

	Control (n=25)	HTG (n=25)
LDL	1.58±0.40	3.85±0.94 ^c
VLDL	2.03±0.69	7.18±1.68 ^c
HDL	0.82±0.17	2.44±0.69 ^c

c: $P < 0.01$, compared with the control group.

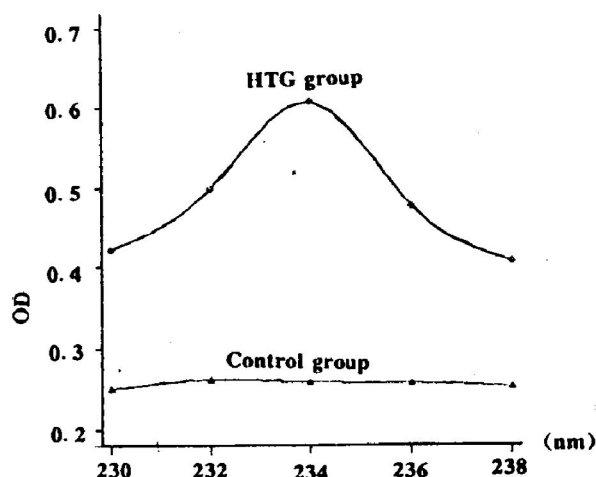


Figure 2. The curve of ultraviolet absorbance at 230 ~ 238 nm of HDL human plasma.

Table 3. Changes of 234 nm absorbance of plasma LDL, VLDL and HDL in HTG and control groups (mm/g, $\bar{x} \pm s$).

	Control (n=25)	HTG (n=25)
LDL	1.48±0.19	2.92±0.83 ^c
VLDL	3.57±0.45	6.59±1.27 ^c
HDL	0.87±0.08	1.87±0.43 ^c

c: $P < 0.01$, compared with the control group.

3 讨论

在本研究中,内源性 HTG 患者血浆 TG 含

量平均升高 1.78 倍, HDLC 下降 32.7%, 同时 LPO 升高 1.41 倍。这表明内源性 HTG 患者血浆 TG 升高, HDLC 下降的同时, 血浆脂过氧化物亦明显升高, HTG 患者血浆 LPO 升高, 可能系血浆 LDL、VLDL 及 HDL 发生氧化修饰所致, 与我们以往的观察一致。

研究证明, 在动脉壁内皮细胞、平滑肌细胞及巨噬细胞中的脂加氧酶作用下, LDL 在活体内可发生氧化修饰, 其多不饱和脂肪酸双键重排, 产生共轭二烯, 在 234 nm 呈现特征性吸收峰。因此, LDL 发生氧化修饰后, 234 nm 光吸收增加。此外, 在 LDL 氧化修饰过程中, 脂肪酸氧化断裂生成具有极高反应活性的中间产物如醛类和酮类物质, 这二类物质可与载脂蛋白发生结合反应, 导致 LDL 的负电荷增加, 因此, 电泳迁移率比相应天然 LDL 增加。当 LDL 发生氧化修饰后, 氧化产物如丙二醛增加, TBARS 也随之增加, 故 LPO 值升高^[12]。因此, 可用脂蛋白电泳迁移率、234 nm 光吸收和 LPO(TBARS) 增加来鉴定 LDL 是否发生氧化修饰。和 LDL 一样 VLDL 和 HDL 分子也含有多不饱和脂肪酸, 推测它们也可和 LDL 一样发生氧化而产生类似的改变。因此, 也可通过脂蛋白电泳、234 nm 光吸收和 TBARS 来鉴定这两类脂蛋白是否发生氧化修饰。

我室以往的研究证实^[7], 家兔高脂血症实验模型活体内不仅 LDL, 而且 VLDL 和 HDL 均可发生氧化修饰。本研究的结果表明, 内源性 HTG 患者体内不仅有 LDL 的氧化修饰, 而且也有 VLDL 及 HDL 的氧化修饰。应着重指出的是, 尽管天然 HDL 有抗氧化能力和抑制 LDL 氧化修饰^[13,14]的作用。但在一定条件下, 如内源性 HTG 患者体内 HDL 亦可发生氧化修饰。我们以往的研究^[4,5]表明, 一旦 HDL 发生氧化修饰后, 和 OLDL 及 OVLDL 一样, OHDL 亦显著刺激人动脉平滑肌细胞的增殖及原癌基因 *fos*、*myc*、*sis*、*jun* 和 *ras* 的表达, 这提示, OHDL 亦可能是引起动脉粥样硬化的因素之一。因此, 对内源性高甘油三酯血症患者, 除采用措

施降血脂外, 同时应防治体内脂蛋白的氧化修饰。

参考文献

- 1 Gotto Jr Am. Hypertriglyceridemia: Risk and perspectives. *Am J Cardio*, 1992, 70(suppl): 19H~25H.
- 2 刘秉文, 曾成林. 高密度脂蛋白抗动脉粥样硬化作用. *中国动脉硬化杂志*, 1994, 2(1): 44~50.
- 3 Steinberg D, Witztum JL. Lipoprotein and atherogenesis: current concept. *J Am Med Assoc*, 1990, 264: 3 047~052.
- 4 汪浩川, 刘秉文, 傅明德. 天然和氧化修饰 LDL、VLDL 及 HDL 对培养人动脉平滑肌细胞原癌基因 *fos* 及 *myc* 表达的影响. *生物化学杂志*, 1995, 11(3): 304~310.
- 5 汪浩川, 刘秉文, 傅明德. 天然及氧化修饰脂蛋白对人动脉平滑肌细胞原癌基因表达的影响. *生物化学与生物物理学报*, 1995, 27(5): 507~513.
- 6 曹圣, 冯宗忱, 王淳本, 等. 血管细胞对极低密度脂蛋白的氧化修饰. *中国动脉硬化杂志*, 1995, 3(2): 176~177.
- 7 江渝, 刘秉文, 傅明德. 高脂膳食诱发家兔血清过氧化脂质升高及 LDL、VLDL 和 HDL 在活体内的氧化修饰. *华西医科大学学报*, 1997, 28(1): 1~5.
- 8 刘秉文. 血浆载脂蛋白免疫测定及应用. 见: 王克勤(主编). *脂蛋白与动脉粥样硬化*. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 359~360.
- 9 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. *生物化学与生物物理学报*, 1989, 21(3): 257~260.
- 10 钟福孙, 胡文亮, 冯驰. 硫代巴比妥酸比色法测定血清过氧化脂质. *临床医学检验杂志*, 1986, 4(3): 129~130.
- 11 Liu R, Saku K, Zhang B, et al. In vivo kinetics of oxidatively modified HDL. *Biochem Med Metab Biol*, 1993, 49: 392~397.
- 12 Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 1991, 88: 1 785~792.
- 13 Mackness MI, Durrington PN. HDL its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 1995, 115: 243~253.
- 14 Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochem Biophys Acta*, 1990, 1 044: 275~283.

(1997-01-03 收到, 1997-05-18 修回)