

白藜三醇对人低密度脂蛋白氧化修饰的影响

邹建刚^① 黄元铸^① 陈 琪^② 魏恩会^② 曹克将^①

(南京医科大学^①附属第一医院心脏科; ^②动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

主题词 白藜三醇; 脂蛋白, 低密度; 氧化剂; 抗氧化剂; 铜; 电泳, 琼脂凝胶; 硫代巴比妥酸反应物质

摘 要 为探讨白藜三醇的抗脂质氧化作用及其可能机制, 采用 Cu^{2+} 和 2,2'-盐酸脒基丙烷两种不同的氧化体系诱导正常人低密度脂蛋白的氧化反应, 应用硫代巴比妥酸法测定低密度脂蛋白氧化过程中硫代巴比妥酸反应物质和氧化型低密度脂蛋白的相对电泳迁移率的变化。结果发现 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜三醇可使 Cu^{2+} 介导的低密度脂蛋白氧化反应明显减弱, 其硫代巴比妥酸反应物质和相对电泳迁移率分别下降 70.5% 和 42.3% ($P < 0.01$); 同时白藜三醇使 Cu^{2+} 和 2,2'-盐酸脒基丙烷诱导的低密度脂蛋白氧化反应潜伏期延长。上述结果提示白藜三醇具有抑制低密度脂蛋白氧化反应作用, 推测其作用机制可能与捕获自由基等有关。

Effect of Resveratrol on Oxidative Modification of Human Low Density Lipoprotein

ZOU Jian-Gang^①, HUANG Yuan-Zhu^①, CHEN Qi^②, WEI En-Hui^② and CAO Ke-Jiang^①

(^①Department of Cardiology, First Affiliated Hospital; ^②Atherosclerosis Research Center; Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

MeSH Resveratrol; Lipoproteins, LDL; Oxidants; Antioxidants; Copper; Electrophoresis, Agar Gel; Thiobarbituric Acid Reactive Substances

ABSTRACT **Aim** The antioxidation effect of resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, on the oxidation of human low density lipoprotein (LDL) were systematically investigated by two different oxidation systems. **Methods** Oxidation of LDL was induced by adding Cu^{2+} or azo compound. The extent of LDL modification was assessed by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the relative electrophoresis mobilities (REM) to native LDL. **Results** Treatment of LDL with resveratrol (50 $\mu\text{mol/L}$) reduced the production of TBARS and REM of LDL during Cu^{2+} -induced oxidation by 70.5% and 42.3%, respectively ($P < 0.01$). The lag phase of LDL oxidation induced by copper ion or azo compound was delayed. **Conclusion** Resveratrol could protect LDL against both Cu^{2+} -induced and azo compound-initiated oxidative modification in vitro, which might be contributed by its free radicals scavenging capacity.

越来越多的研究证明, 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生中起非常重要的作用。防止 LDL 的氧化, 也是预防 As 性疾病发生的有效途径之一。LDL 含有多种内源性抗氧化剂, 只有当这些抗氧化剂消耗, LDL 才发生脂质过氧化反应。营养性抗氧化剂, 包括维生素 E 与 β 胡萝卜素等能终止自由基链式反应, 从而抑制 LDL 的氧化, 预防 As 的进展。丙丁酚既是调脂药物又是抗氧化剂, 但其抑制 WHHL 兔 As 发生的机制主要在于其抗氧化作用, 而不是它的降脂作用^[1]。大量流行病学资料显示体内抗氧化剂水平与冠心病发生之间呈负相关^[2,3]。而“French Paradox”(即高脂饮食与冠心病发生率呈负相关)现象的重要原因是法国人饮用较多红葡萄酒, 红葡萄酒中含有多种多酚类化合物, 具有抗脂质过氧化作用^[4]。白藜三醇(resvera-

trol, RES) 是红葡萄酒中多酚类化合物之一。有关 RES 的抗脂质氧化作用正日渐受到重视^[5~8]。以往研究发现, RES 可抑制 Cu^{2+} 诱导 LDL 的氧化反应, 其抗氧化能力强于维生素 E^[5]。但 RES 抗脂质氧化作用的确切机制尚未明了。本文通过观察 RES 对不同 LDL 氧化体系的影响, 探讨其可能的抗氧化机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

白藜三醇(resveratrol, RES)、1,1,3,3-四甲氧基丙烷(1,1,3,3-tetramethoxypropane)、硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)和维生素 C 购自 Sigma 公司; 2,2'-盐酸脒基丙烷(2,2'-azobis-2-amidinopropane dihydrochloride, AAPH) 购自 Polysciences Inc.; 其余试剂为国产分析纯。L8-80

超速离心机和 Ti80 转头系 Beckman 公司产品; RF-540 荧光分光光度计为 Shimadzu 公司生产; 48 孔培养板购自 Gercus 公司; 二氧化碳孵箱为 Heraeus 公司产品。

1.2 低密度脂蛋白(LDL)的制备

参照文献[9], 取正常人新鲜空腹血清作序列超速离心, 分离 LDL ($d=1.019\sim1.063$ kg/L)。整个操作过程中, 密度液中均加入 0.05% 的 EDTA, 以防止脂蛋白氧化, 同时加入 80 mg/L 的庆大霉素用于抗菌, 最终获得的 LDL 经 pH 7.4, 含 1 g/L EDTA 的 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)于 4℃ 透析 48 h 后, 经微孔滤膜除菌, 置于 4℃ 充 N_2 储存备用。以牛血清白蛋白为标准品, 用 Lowry' 法测定蛋白浓度。

1.3 低密度脂蛋白(LDL)的氧化修饰

低密度脂蛋白(LDL)经 pH 7.4, 不含 EDTA 的 0.01 mol/L 的 PBS 于 4℃ 充分透析后, 按 Cu^{2+} [10] 和 AAPH[11] 氧化法制备 ox-LDL。在用 Cu^{2+} 氧化时, LDL 的终浓度为 500 mg/L, $CuCl_2$ 终浓度为 40 μ mol/L, 37℃ 孵育一定时间后, 用终浓度 2.7 mmol/L 的 EDTA 终止反应。AAPH 氧化时, LDL 终浓度为 500 mg/L, AAPH 终浓度为 10 mmol/L, 终止反应加入终浓度 10 mmol/L 的抗坏血酸。制得的 ox-LDL 冷藏于 4℃ 备用。

1.4 硫代巴比妥酸反应物质测定

用硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)来表示脂质过氧化代谢产物丙二醛(MDA)的含量。取 50 μ L (25 μ g) ox-LDL 加入 1 mL 10% 三氯醋酸(TCA)和 1 mL 0.67% TBA, 充分混匀, 置 95℃ 水浴中作用 30 min, 冷却后于 Ex 515 nm, Em 553 nm 检测荧光强度, 以 1,1,3,3-四甲氧基丙烷为标准对照。MDA 含量由 TBARS 值测得并以 μ mol/g 表示。

1.5 相对电泳迁移率测定

于 pH 8.6 的巴比妥酸缓冲液中进行琼脂糖凝胶电泳。天然未修饰(nature LDL, n-LDL)作为基准对照, 其相对电泳迁移率(relative electrophoresis mobility, REM)为 1, ox-LDL 与 n-LDL 的实际距离之比即为 ox-LDL 的 REM。

1.6 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 示有显著性差异。

2 结果

2.1 白藜三醇对低密度脂蛋白氧化反应中丙二醛

生成和相对电泳迁移率的影响

将 Cu^{2+} 加入 LDL 孵育 18 h 后, 测得的丙二醛 (37.18 ± 1.09 μ mol/g) 和 REM(2.6) 均较氧化前显著升高 ($P<0.01$), 表明 LDL 已发生明显的氧化修饰; 25 μ mol/L 的 RES 对 Cu^{2+} 诱导 LDL 的氧化修饰作用影响不明显, 而 50 μ mol/L 的 RES 能明显抑制 LDL 的氧化 ($P<0.01$), 其 TBARS 值降低了 70.5% ($P<0.01$)。当 RES 浓度为 100 μ mol/L 及以上时, LDL 氧化的抑制率进一步增强, TBARS 值分别降低了 78.7% 和 82.1%, 几乎没有新的丙二醛产生 (图 1, Figure 1)。因此, 在后续实验中 RES 工作浓度均采用 50 μ mol/L。

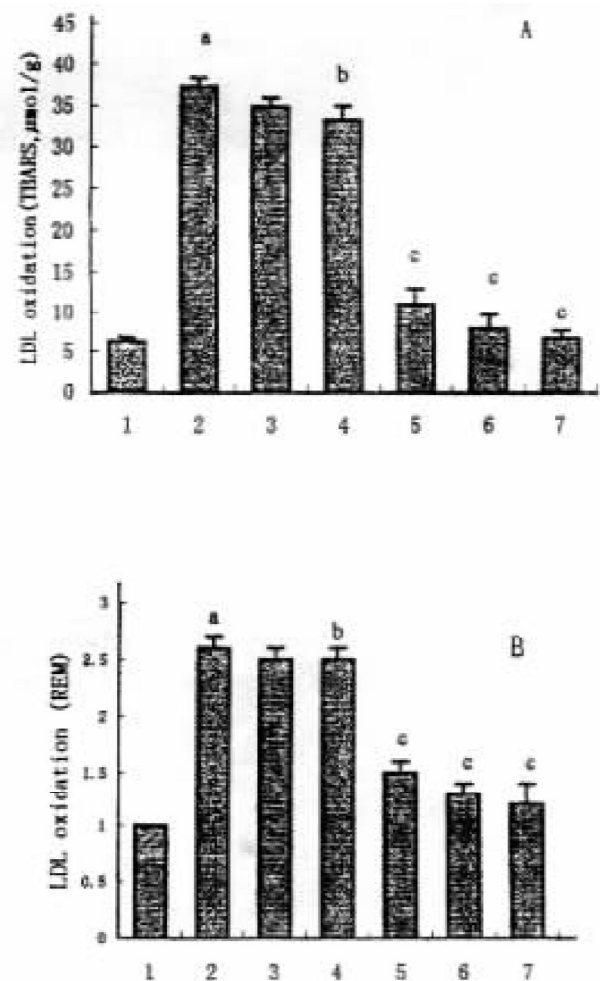


图1. 白藜三醇对 Cu^{2+} 诱导低密度脂蛋白氧化时硫代巴比妥酸反应物质 (图 A) 和相对电泳迁移率 (图 B) 的影响

Figure 1. Effect of resveratrol on TBARS (Panel A) and REM (Panel B) in Cu^{2+} -induced oxidation of LDL. Oxidation with and without resveratrol was for 18 h. Results are expressed as $\bar{x}\pm s$ from 6 separate experiments. 1: n-LDL; 2: Cu^{2+} ; 3: DMSO; 4: RES 25 μ mol/L; 5: RES 50 μ mol/L; 6: RES 100 μ mol/L; 7: RES 200 μ mol/L. a: $P<0.01$, compared with n-LDL group; b: $P>0.05$; c: $P<0.01$, compared with Cu^{2+} group

2.2 白藜三醇对 Cu^{2+} 和 2,2'-盐酸脒基丙烷诱导低密度脂蛋白氧化反应时丙二醛的动态变化

从图2A (Figure 2A)可见,在 Cu^{2+} 介导的 LDL 氧化过程中,对照组 LDL 氧化反应潜伏期 < 30 min,在 2 h 后 TBARS 值达最高峰,为 $23.1 \mu\text{mol/g}$,以后 TBARS 值逐渐下降;而在 RES ($50 \mu\text{mol/L}$) 组,LDL 的氧化反应潜伏期延长到 4 h 左右,高峰时间延长到 6 h;但 TBARS 最大值无明显降低;AAPH 氧化 LDL 的动态过程如图2B(Figure 2B)所示,RES 使 LDL 的氧化反应潜伏期由对照组的 1 h 延长到 12 h,高峰时间滞后至 24 h,而峰值与对照组几乎一致。

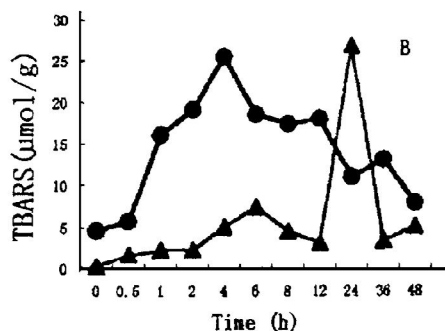
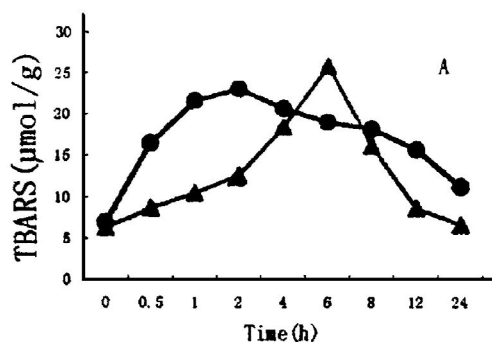


图2. 白藜三醇对 Cu^{2+} 和 2,2'-盐酸脒基丙烷诱导低密度脂蛋白氧化反应时丙二醛的影响

Figure 2. Effect of resveratrol on formation of MDA in Cu^{2+} -induced (Panel A) and AAPH (Panel B) oxidation of LDL. Panel A, oxidation of LDL from normolipidemic individual, with (▲, the same below) and without (●, the same below) the addition of $50 \mu\text{mol/L}$ resveratrol; Panel B, AAPH-induced oxidation of LDL from the same individual, with (▲) and without (●) the addition of $50 \mu\text{mol/L}$ resveratrol. Each point represents the means of two experiments

2.3 白藜三醇对 Cu^{2+} 氧化低密度脂蛋白时相对电泳迁移率的影响

利用琼脂糖凝胶电泳,对 Cu^{2+} 介导的 ox-LDL

的 REM 进行测定,结果见图1B(Figure 1B)和图3 (Figure 3)。 50 、 100 和 $200 \mu\text{mol/L}$ 的 RES 使 REM 分别下降了 42.3% 、 50% 和 53.8% 。对照组和 RES 组的 REM 均随氧化时间的延长而逐渐增加,但在每个特定的作用时间内,RES 组的 REM 均低于对照组。RES 组反应 24 h 时 ox-LDL 的 REM 值相当于对照组 8 h 的水平。

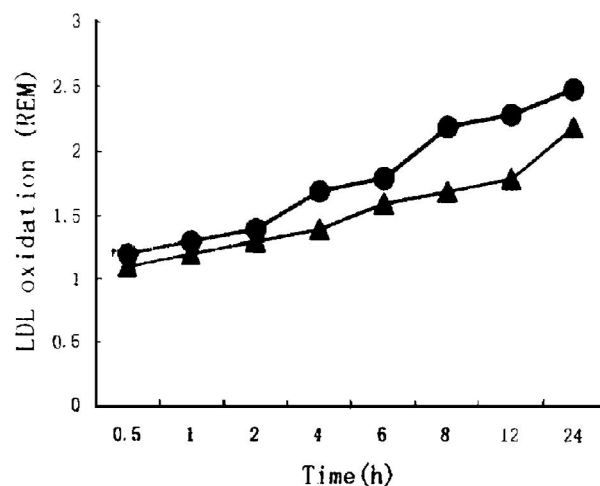


图3. 白藜三醇对 Cu^{2+} 诱导 LDL 氧化反应中相对电泳迁移率的影响

Figure 3. Effect of $50 \mu\text{mol/L}$ resveratrol on the REM of Cu^{2+} -induced oxidation of LDL

3 讨论

低密度脂蛋白(LDL)是机体主要致 As 脂蛋白,在体内外均可被氧化修饰。目前多采用 Cu^{2+} 和 AAPH 诱导 LDL 的氧化反应。前者主要通过 LDL 中的载脂蛋白 B 单点结合,使内源性抗氧化剂消耗,进而产生广泛的脂质过氧化;而 AAPH 为水溶性自由基释放物,形成的自由基能多点攻击 LDL,诱发后者产生脂质过氧化反应。本文采用这两种氧化体系诱导 LDL 发生氧化反应以探讨 RES 的抗脂质过氧化作用及其可能机制。

研究结果显示,RES 对 Cu^{2+} 和 AAPH 介导的 LDL 的氧化均有明显的抑制作用,RES 的抗氧化作用呈浓度依赖关系,当其浓度超过 $100 \mu\text{mol/L}$ 时,LDL 几乎不再发生氧化反应,很少有新的丙二醛产生。在 Cu^{2+} 诱导的 LDL 氧化过程中,RES 组 LDL 的氧化敏感性低于对照组,与文献[5]报道结果相似。RES 使 LDL 氧化反应潜伏期延长,而且在特定氧化时间点的 REM 值低于对照组。为了进一步探讨 RES 抗脂质过氧化反应的作用机制。我们选择了另一种常用的体外氧化体系 AAPH 与 Cu^{2+} 氧化

LDL 进行比较。结果发现在应用 RES 后, 尽管 TBARS 的最大值并无明显降低, 但 LDL 的氧化反应潜伏期明显延长。由于 RES 在两种氧化体系中均起明显作用, 因而不大可能通过过渡金属螯合作用发挥其抗氧化效应, 我们推测 RES 抗 LDL 氧化作用的机制可能象 α -生育酚那样通过捕获自由基, 从而阻止脂质过氧化链式反应不断扩展, RES 可能属于一种“断链式”抗氧化剂。

白藜三醇 (RES) 最初发现是一种植物防御素^[12], 当植物在受到紫外光照射、真菌感染或暴露于臭氧中时可合成 RES。RES 分布于 72 种植物中, 其中一部分是人类的饮食成分如葡萄、花生、桑葚和草莓等。RES 呈脂溶性, 相对分子质量为 228. 2, 从结构式看, RES 含有羟基酚的结构, 因而可能具有抗氧化特性。早在 80 年代初, 日本学者^[13]就报道了“*Polygonum cuspidatum*”根茎中的二苯乙烯成分之一白藜三醇对脂质代谢的影响, 发现 RES 可降低肝内甘油三酯的合成, 抑制胆固醇和甘油三酯在肝内沉积。Frankel 等^[5]于 1993 年首次报道了 RES 对 Cu^{2+} 诱导的 LDL 氧化修饰具有抑制作用, 且强于维生素 E 的抗氧化作用。随后有关 RES 的抗脂质氧化作用、抑制血小板聚集及对 As 的防治作用日益受到人们关注^[5~7]。

致谢 本文得到纽约医学院生物化学和分子生物学研究室 Joseph M. Wu 教授的指导和帮助, 并提供部分试剂。

参考文献

- 1 Kita T, Nagano Y, Yokode M, et al. Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1987, **84**: 5 928—931
- 2 Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*, 1993, **328**: 1 444—449
- 3 Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N En-*

gl J Med, 1993, **328**: 1 450—456

- 4 Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelet, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 1992, **339**: 1 523—526
- 5 Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 1993, **341**: 1 103—104
- 6 Frankel EN, Kanner J, German JB, et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 1993, **341**: 454—457
- 7 Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chem Acta*, 1995, **235**: 207—219
- 8 Wilson T, Knight T, Beitz DC, et al. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci*, 1996, **59**: 15—21
- 9 Chen Q, Esterbauer H, Jurgens G. studies on epitopes on low density lipoprotein modified by 4-hydroxynonenal: Biochemical characterization and determination. *Biochem J*, 1992, **288**: 249—254
- 10 Loughheed M, Steinbrecher UP. Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent its extent of oxidation. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 11 798—805
- 11 Stocker R, Bowry VW, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1991, **88**: 1 646—650
- 12 Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: A molecule whose time has come? and gone? *Clin Biochem*, 1997, **30**(2): 91—113
- 13 Arichi H, Kimura Y, Okuda H, et al. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* sieb. Et zucc. On lipid metabolism. *Chem Pharmac Bull*, 1982, **30**: 1 766—770

(此文1998—09—21收到, 1999—02—19修回)

(此文编辑 胡必利)