

一氧化氮在低密度脂蛋白氧化中的作用及调控研究

王瑾雯 陈媛 周玫

(第一军医大学生物化学与分子生物学研究所, 广州 510515)

关键词 云芝多糖; 干扰素; 脂多糖; 佛波酯醇; 脂蛋白; 低密度; 一氧化氮; O_2^- ; 巨噬细胞

摘要 通过给小鼠腹腔注射云芝多糖,并用干扰素 γ 、脂多糖及佛波酯醇刺激细胞,观察细胞一氧化氮的产量,测定脂氢过氧化物和硫代巴比妥酸反应物质,以反应低密度脂蛋白的氧化程度,从而部分揭示巨噬细胞氧化低密度脂蛋白的机制,探讨一氧化氮在低密度脂蛋白氧化中的作用和云芝多糖的抑制效果。结果显示,干扰素 γ 和脂多糖及云芝多糖均可增加一氧化氮的释放量($P < 0.05$),减轻低密度脂蛋白的氧化($P < 0.05$),佛波酯醇的作用则相反。表明干扰素 γ 和脂多糖及云芝多糖可能通过诱导细胞诱生性一氧化氮合酶的活性,产生大量的一氧化氮,从而保护细胞,抑制低密度脂蛋白的氧化。

Effects and Regulation Mechanism of Nitric Oxide on Oxidation of Low Density Lipoprotein

WANG Jin- Wen, CHEN Yuan and ZHOU Mei

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

MeSH Polysaccharide Krestin; Interferon; Lipopolysaccharides; Phorbol- 12- Myristate- 13- Acetate; Lipoprotein, LDL; Nitric Oxide; O_2^- ; Macrophages

ABSTRACT **Aim** Effects of nitric oxide (NO), superoxide anion (O_2^-) and polysaccharide krestin (PSK) on macrophage-mediated oxidation of LDL were investigated. **Methods** Mouse were given peritoneal injection PSK (control mouse were given injection physiological saline), peritoneal macrophages were collected and stimulated with low-density lipoprotein (LDL), γ - IFN, LPS and PMA. Contents change of nitrite, hydroperoxides and TBARS were measured. **Results** PSK-treated mouse peritoneal macrophages secreted much NO and produced less LOOH, TBARS than non-PSK-treated. Much NO and less LOOH, TBARS could be found to be produced by macrophage when stimulated with γ - IFN, LPS, macrophages stimulated with PMA appeared opposite effect. **Conclusions** The results indicated PSK has a protective effect, prevent cell from lipoperoxidative injury. γ - IFN and LPS could induce NO synthase activity and produce substantial NO. Stimulated macrophages were less efficient in oxidizing LDL. PMA can activate the respiratory burst, the stimulated cells were more effective than unstimulated cells in modifying LDL, and that O_2^- was of critical importance.

研究表明超氧阴离子(superoxide anion, O_2^-)、一氧化氮(nitric oxide, NO)及脂氧合酶等细胞衍生物参与了低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化。干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可诱导巨噬细胞诱生性一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的活性,而佛波酯醇(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)能刺激细胞产生大量的 O_2^- 。本文拟研究IFN- γ 、LPS和PMA以及云芝多糖(polysaccharide krestin, PSK)对NO释放量和LDL氧化程度的影响,从而揭示NO在LDL氧化中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂

雄性昆明鼠(清洁级)购自本校实验动物中心(4~5周龄,18~20g)。IFN- γ 、LPS、PMA、对氨基苯磺酸、N-萘基二乙胺、四乙氧基丙烷及硫代巴比妥

酸均购自Sigma公司。PSK是我室自制的1.5%溶液。所用其它试剂均为分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离

新鲜人血由南方医院血库提供,低速离心分离血清,固体溴化钾调密度至1300g/L。采用一次性密度梯度离心法^[1]制备LDL($d=1.040\sim 1.063$)。

1.3 动物处理与腹腔巨噬细胞的提取

将大鼠随机分为PSK组和对照组。PSK组腹腔注射PSK 2×10^{-4} L/d,对照组注射等量生理盐水,连续3天。两天后,将小鼠拉颈处死,用PBS腹腔灌洗收集腹腔巨噬细胞,1000r/min离心6min,将沉淀用含10%小牛血清的1640培养液制成悬液,接种于24孔细胞培养板。置37℃、5%CO₂的孵箱中培养,2h后洗去未贴壁细胞,换不含血清的DMEM/F12继续培养,并加入各处理因素:IFN- γ (100ku/L),LPS(1×10^{-3} g/L),PMA(1.6 μ mol/L)及LDL(0.2g/L)。

1.4 亚硝酸盐测定

取培养上清液 150 μL , 加入等量 Griess 试剂(1% 对氨基苯磺酸, 0.1% N- 萘基二乙胺, 2.5% 磷酸), 反应 10 min, 于 560 nm 比色, 用 NaNO_2 作标准参考。

1.5 脂氢过氧化物含量的测定

采用 FOX 法^[2]。取 50 μL 上清液加至 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 BHT) 中, 室温反应 30 min, 560 nm 测光吸收度。用 tBOOH 作标准参考。

1.6 硫代巴比妥酸反应物含量的测定

采用 Schuh's 法^[3]。取 100 μL 培养上清液, 加入 50% 三氯醋酸 1 mL 和 0.67% TBA 1 mL, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 45 min, 冷却后加 2 mL 正丁醇, 充分混匀, 离心, 取上层有机相, 测 533 nm 的光吸收度。以四乙氧基丙烷为标准参考。

1.7 蛋白质测定

采用 Lowry's 法。以酪蛋白为标准参考(吸光值的测定均使用 Beckman DU- 560 分光光度计)。

1.8 数据处理

采用方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 各处理因素对一氧化氮释放量的影响

从表 1(Table 1) 可见, 培养 24 h 时细胞分泌 NO 大于 12 h ($P < 0.05$), 说明在一定的范围内随培养时间的延长, NO 释放增多。PSK 处理组各组细胞释放 NO 均较对照组多 ($P < 0.05$)。各刺激因素中以 IFN- γ (50 ku/L) 加 LPS (0.5 mg/L) 联合刺激的作用最强 ($P < 0.01$), 其次为 LPS, 而 PMA 刺激细胞释放 NO 的量与对照细胞(未加各处理因素) 相比差异无显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 各处理因素对巨噬细胞氧化修饰低密度脂蛋白的影响

从图 1(Figure 1) 可见, PSK 各处理组脂氢过氧化物(LOOH) 均低于非 PSK 处理组 ($P < 0.05$)。各刺激因素中 PMA 组 LOOH 含量最高, 与对照组(仅加 LDL) 相比差异显著 ($P < 0.05$)。IFN- γ 和 LPS 及 IFN- γ + LPS 刺激组 LOOH 含量均低于对照组, 其中以 LPS 及 IFN- γ + LPS 联合作用较强。观察各刺激组 LOOH 的含量似与其对应 NO 的释放量呈负相关。硫代巴比妥酸反应物反映了脂质过氧化产生的醛类物质的含量, 其变化趋势基本与 LOOH 相同(表 2, Table 2)。

表 1. 各处理因素对巨噬细胞一氧化氮释放量的影响

Table 1. Contents of nitrite in culture supernatants of macrophages with different treatments ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)

Groups	NO_2^-	
	12 h	24 h
non- PSK	9.17 \pm 0.12	11.24 \pm 0.93 ^a
non- PSK+ IFN- γ	13.05 \pm 0.67 ^{cd}	20.06 \pm 0.96 ^{acd}
non- PSK+ LPS	20.24 \pm 4.95 ^{cd}	30.45 \pm 4.22 ^{acd}
non- PSK+ IFN- γ + LPS	23.28 \pm 6.83 ^c	35.61 \pm 6.31 ^{ac}
non- PSK+ PMA	9.36 \pm 0.64 ^{cd}	13.46 \pm 1.06 ^{acd}
PSK	11.28 \pm 1.91 ^b	11.89 \pm 0.65 ^a
PSK+ IFN- γ	17.29 \pm 2.63 ^{bcd}	26.52 \pm 4.20 ^{abcd}
PSK+ LPS	29.11 \pm 6.21 ^{bcd}	43.94 \pm 7.13 ^{abcd}
PSK+ IFN- γ + LPS	33.57 \pm 7.11 ^{bc}	49.07 \pm 5.31 ^{abc}
PSK+ PMA	11.07 \pm 1.62 ^{bd}	15.86 \pm 2.78 ^{abcd}

a: $P < 0.05$, compared with 12 h. b: $P < 0.05$, compared with non- PSK group. c: $P < 0.05$, compared with PSK or non- PSK group. d: $P < 0.05$, compared with IFN- γ + LPS group

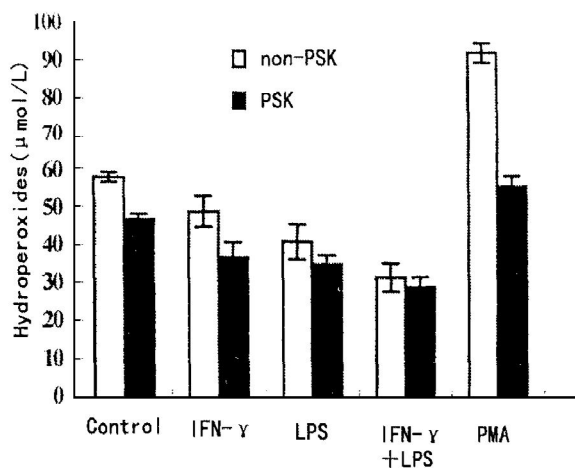


图 1. 各处理因素对脂氢过氧化物含量的影响

Figure 1. Effects of different treatments on the contents of hydroperoxides in macrophage-mediated oxidation of LDL ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 2. 各处理因素对丙二醛含量的影响

Table 2. Contents of TBARS in macrophage-mediated oxidation of LDL with different treatments ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, $\mu\text{mol/L}$)

	non- PSK	PSK
0	13.41 \pm 0.30	9.98 \pm 0.35 ^a
IFN- γ	9.26 \pm 0.15 ^b	6.81 \pm 0.14 ^{abc}
LPS	7.94 \pm 0.24 ^{bc}	6.42 \pm 0.28 ^{abc}
IFN- γ + LPS	6.72 \pm 0.13 ^b	5.88 \pm 0.20 ^{ab}
PMA	15.72 \pm 0.16 ^{bc}	10.94 \pm 0.07 ^{abc}

a: $P < 0.05$, compared with non- PSK group. b: $P < 0.05$, compared with non- stimulation factor group. c: $P < 0.05$, compared with IFN- γ + LPS group

3 讨论

巨噬细胞在生理状态下不表达诱生性 NOS, 它

接受 IFN- γ 和 LPS 的刺激时可表达诱生性 NOS。诱生性 NOS 的基因序列上有 IFN- γ 和 LPS 的应答元件。诱生性 NOS 受到诱导后可产生大量的 NO^[4]。目前的研究表明, NO 在生物体内可作为 O₂ 的一种清除剂, 能终止 O₂ 的链式反应($3\text{NO} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{NO}_2 + 2\text{H}^+$), 当 NO 产生增多时可通过清除 O₂ 来抑制脂质过氧化^[5]。本研究中 IFN- γ 和 LPS 刺激后的细胞较未受刺激的细胞产生的 NO 量多, 细胞对 LDL 的氧化程度减轻。LOOH 和硫代巴比妥酸反应物含量均较对照组和 PMA 刺激组为低。PMA 是细胞呼吸爆发的有效激发剂^[6], 受到刺激的细胞产生大量的氧自由基(可能通过 MPO-H₂O₂ 卤化物途径), 从而促进 LDL 的氧化。本研究中予以 PMA 刺激的细胞 NO 产量低于 IFN- γ 和 LPS 刺激的细胞, 接近并略高于未受刺激的细胞, 而 LOOH 和硫代巴比妥酸反应物含量高于 IFN- γ 和 LPS 刺激的细胞, 接近并高于未受刺激的细胞。

本研究中预先用 IFN- γ 和 LPS 刺激细胞产生大量的 NO, 表明 IFN- γ 和 LPS 有保护细胞防止 LDL 氧化的作用, 而用 PMA 刺激细胞后有相反的结论。当然这些作用也可能是巨噬细胞受到各处理因素刺激后而发生的许多生理变化介导的, 不单纯地局限于 NO 或 O₂。但 NO 和 O₂ 在本研究系统中发挥了比较突出的作用。有报道认为 NO 对脂质过氧化的抑制作用可能与脂氧合酶受到 NO 抑制或培养液中铁离子与 NO 螯合有关^[7]。亦有文献认为 NO 的抗脂质过氧化作用不是通过抑制脂氧合酶诱导的起始反应, 而是通过与脂氧基和脂过氧基结合终止脂质过氧化扩增反应。与 O₂ 有关的促发 LDL 氧化的机制也还不清楚, 推测可能是: 细胞活性氧种 (O₂、H₂O₂、HOCl 等) 的直接氧化作用; ④O₂ 将细胞膜脂质的 LOOH 引入 LDL 颗粒; ⑤LDL 暴露于直接用 LDL 为底物的活性氧化酶中; ⑥过渡金属维持一种还原状态和高度反应状态^[8]。O₂ 和 NO 还能快速反应生成过氧亚硝酸, 后者能直接损伤脂质和蛋白。

云芝多糖是从云芝子实体中提取的一种蛋白多糖, 是一种非特异性免疫增强剂。我室近年来对 PSK 抗动脉粥样硬化的作用进行了一系列的研究, 发现小鼠腹腔注射 PSK 对 ox-LDL 所致的细胞损伤有保护作用, 并可提高巨噬细胞硒谷胱甘肽过氧化物酶的基因表达, 降低细胞内的 LOOH^[9, 10]。给实验性动脉粥样硬化家兔腹腔注射 PSK 可以缩小动脉粥样

样硬化斑块面积, 减轻动脉粥样硬化损伤。其机制除与能提高机体的抗氧化能力有关外, 还可能与其减轻 ox-LDL 对诱生性 NOS 基因表达的抑制作用有关。PSK 是一种蛋白结合多糖, IFN- γ 是 T 细胞产生的淋巴因子, LPS 是一种含有脂类的多糖, 这三者之间的相互关系还有待进一步的研究。本实验中应用 IFN- γ 和 LPS 后细胞产生 NO 增多, 而 PSK 处理组较相应对照组产生 NO 又进一步增多, 表明 PSK 可在一定条件下增加巨噬细胞 NO 的分泌。实验中, PSK 处理组脂氢过氧化物和硫代巴比妥酸反应物的含量较对照组为低, 进一步证明 PSK 有防止小鼠腹腔巨噬细胞氧化 LDL 的作用, 提示 PSK 在防治动脉粥样硬化中有一定的潜力, PSK 与 NO 似能协同防止 LDL 的氧化。

参考文献

- 1 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
- 2 Woff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for the mensurement of gydroperoxide. *Methods Enzymology*, 1994, **223**: 182- 189
- 3 Schuh J. Oxygen mediated heterogeneity of apo low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **7**: 3 173- 177
- 4 Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate iduction by interferon (and lipopolysaccharide . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (9): 730- 734
- 5 Radi R, Beckman JS, Bush KM, et al. Peroxynitrite- iduced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 1991, **288**: 481- 487
- 6 Scaccini C, Jialai I. LDL modification by activated polymorphonuclear leukocytes: A cellular model of mild oxidative stress. *Free Radical Biology Medicine*, 1994, **16**: 49- 55
- 7 Jessup W, Dean RT. Autoinhibition of murine macrophage- mediated oxidation of low - density lipoprotein by nitric oxide synthesis. *Atherosclerosis*, 1993, **101**: 145- 155
- 8 Garner B, Jessup W. Cell - mediate oxidation of low density lipoprotein : the elusive mechanism (s). *Redox Report*, 1996, **2** (2): 97- 104
- 9 刘尚喜, 周 玫, 陈 媛. 云芝多糖对叔丁基脂氢过氧化物所致腹腔巨噬细胞损伤作用的特点. 第一军医大学学报, 1998, **18** (1): 15- 17
- 10 Liu SX, Chen Y, Zhou M. A preliminary study on the enhancement of gone expression of SeGSHPx in mouse peritoneal macrophage by polysaccharide krestin. *J Med Coll PLA*, 1994, **9**: 303

(1999- 03- 24 收到, 1999- 08- 12 修回)

(此文编辑 朱雯霞)