

一氧化氮在低密度脂蛋白氧化中的双向作用

王瑾雯, 陈 媛, 周 玫, 王珣章¹

(第一军医大学生物化学与分子生物学研究室, 广州 510515; 1. 中山大学生物医药中心, 广州 510275)

[关键词] 一氧化氮; 脂蛋白, 低密度; 巨噬细胞; 氧化修饰

[摘要] 为观察一氧化氮与低密度脂蛋白氧化的关系, 揭示一氧化氮在动脉粥样硬化发病和防治中的作用, 给小鼠腹腔注射云芝多糖, 再用干扰素 γ 、脂多糖和L-精氨酸刺激小鼠腹腔巨噬细胞, 然后检测一氧化氮释放量与脂氢过氧化物浓度。结果发现, 一氧化氮与低密度脂蛋白氧化间有一个量的相关关系($r=0.753$, $P<0.05$), 一定范围内($\leq 50 \mu\text{mol/L}$)的一氧化氮释放量与脂氢过氧化物的量呈负相关, 即抑制细胞对低密度脂蛋白的氧化; 当一氧化氮产生过多时($\geq 90 \mu\text{mol/L}$), 脂氢过氧化物的量随之增加, 则促进低密度脂蛋白的氧化。结果提示, 一氧化氮在低密度脂蛋白氧化中发挥双重作用, 它对低密度脂蛋白的氧化起抑制或促进作用取决于它的释放量。

[中图分类号] R363.1

[文献标识码] A

Double Effects of Nitric Oxide on Oxidation of Low Density Lipoprotein

WANG Jin- Wen, CHEN Yuan, ZHOU Mei, and WANG Xun- Zhang

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

MeSH Nitric Oxide; Lipoproteins, LDL; Macrophages; Oxidants

ABSTRACT **Aim** To investigate the relationship of nitric oxide (NO) and macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein (LDL). **Methods** Mice were given peritoneal injection polysaccharide krestin (PSK) (control mice were given intraperitoneal physiological saline), peritoneal macrophages were collected for incubation and stimulated with LDL, interferon- γ (IFN- γ), lipopolysaccharide (LPS) and L-arginine (L-Arg). Contents of change of NO and hydroperoxides were measured.

Results There is a quantity effect significance between NO and oxidation of LDL. It showed a negative correlation when the contents of NO within a certain range (approximately $\leq 50 \mu\text{mol/L}$) and the contents of hydroperoxide (LOOH) decreased with that of NO increased, it meant to inhibit LDL oxidized. When the contents of NO were excessive (approximately $\geq 90 \mu\text{mol/L}$), the contents of LOOH increased with that of NO increased, it's a positive correlation and meant to promote LDL oxidized.

Conclusions The results indicated there is a double effects of NO on oxidation of LDL, to inhibit or promote oxidation of LDL decided on the contents of NO.

一般认为低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)水平的升高是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的危险因素, 而LDL的氧化在As的发生发展中起着重要的作用。一氧化氮(nitric oxide, NO)是血管病理和生理的重要介质, 大部分研究认为NO有抑制LDL氧化的作用, 而近年来也有一部分研究认为NO对宿主细胞本身有毒害作用^[1~4]。本研究旨在观察As发病中NO对LDL的氧化调节作用。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂

[基金项目] 国家自然科学基金资助(项目编号 39570867)

[作者简介] 王瑾雯, 女, 1969年生于新疆, 1999年博士毕业于第一军医大学, 现为中山大学生命科学院生物医药中心博士后。研究方向为基因高效表达与调控。

雄性昆明鼠共120只, 4~5周龄, 体重18~20g。清洁级, 购自本校实验动物中心。干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、L-精氨酸(L-arginine, L-Arg)、对氨基苯磺酸、N-羰基二乙胺、四乙氧基丙烷及硫代巴比妥酸均购自Sigma公司。云芝多糖(polysaccharide krestin, PSK)由我室从云芝子实体提取, 用生理盐水配成1.5%的溶液。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1.300 g/L。用一次性密度梯度离心法^[5]制备LDL($d=1.040\sim 1.063$)。

1.3 动物分组与腹腔巨噬细胞的提取

将鼠随机分为云芝多糖组和对照组。云芝多糖组腹腔注射PSK 2×10^{-4} L/d, 连续3天, 对照组注

射等量生理盐水。停止注射两天后,将鼠拉颈处死,用 70% 酒精消毒,PBS 腹腔灌洗收集腹腔巨噬细胞,1 000 r/min 离心 6 min,将细胞沉淀用含 10% 小牛血清的 1 640 制成悬液,调整细胞浓度,接种于 24 孔细胞培养板,置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,2 h 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 (1×10^5 u/L)、LPS (1×10^{-3} g/L)、L- 精氨酸 (1 mmol/L) 及 LDL (0.2 g/L)。

1.4 亚硝酸盐测定

取培养上清液 150 μ L,加入等量的 Griess 试剂 (1% 对氨基苯磺酸、0.1% N- 萘基二乙胺和 2.5% 磷酸),室温下反应 10 min,560 nm 比色,用 NaNO₂ 作标准参考^[6]。

1.5 脂氢过氧化物含量测定

采用 FOX 法^[7]。取 50 μ L 培养上清液,加 950 μ L FOX 反应液 (100 μ mol/L 二甲酚橙、250 μ mol/L Fe²⁺、25 mmol/L H₂SO₄ 和 4 mmol/L BHT),室温反应 30 min,560 nm 测光吸收度。用叔丁基脂氢过氧化物 (tBOOH) 作标准参考。

表 1 各处理因素对巨噬细胞一氧化氮释放量和脂氢过氧化物浓度的影响

Table 1 Comparison contents of NO with LOOH in culture supernatants of macrophages with different treatments ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Groups	NO ₂ (μ mol/L)		LOOH (μ mol/g)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Cell- free			52.19 \pm 5.63	69.17 \pm 3.33
non- PSK	10.06 \pm 0.49	11.03 \pm 1.68	68.74 \pm 2.28	71.51 \pm 5.78
non- PSK+ IFN- γ	20.86 \pm 2.40 ^b	29.26 \pm 5.15 ^b	71.55 \pm 6.02	203.27 \pm 15.97 ^b
non- PSK+ LPS	100.12 \pm 3.54 ^{bc}	103.94 \pm 8.49 ^{bc}	106.16 \pm 5.19 ^{bc}	254.22 \pm 10.09 ^b
non- PSK+ IFN- γ + LPS	104.65 \pm 9.85 ^{bc}	106.03 \pm 1.44 ^{bc}	119.25 \pm 4.67 ^{bc}	268.70 \pm 16.10 ^{bc}
PSK	11.79 \pm 1.38	12.46 \pm 1.19	44.73 \pm 5.94 ^a	87.59 \pm 7.62 ^a
PSK+ IFN- γ	36.56 \pm 9.01 ^{ab}	39.80 \pm 9.10 ^{ab}	100.05 \pm 4.37 ^{ab}	227.77 \pm 11.91 ^{ab}
PSK+ LPS	103.08 \pm 5.02 ^{bc}	106.67 \pm 1.23 ^{bc}	118.17 \pm 3.89 ^b	242.52 \pm 1.57 ^b
PSK+ IFN- γ + LPS	107.85 \pm 3.86 ^{bc}	115.56 \pm 7.21 ^{abc}	158.85 \pm 8.57 ^{abc}	253.32 \pm 13.6 ^{bc}

a: $P < 0.05$, compared with non- PSK group; b: $P < 0.05$, compared with non- treatment group; c: $P < 0.05$, compared with IFN- γ group.

2.2 一氧化氮释放量与低密度脂蛋白氧化程度的相关分析

根据 MPM 与 LDL 共同培养的体系中 NO 释放量和 LOOH 的量进行相关分析发现,细胞 NO 释放量和 LOOH 的量有相关性 ($r = 0.753$, $P < 0.05$)。当 NO 释放量 ≤ 50 μ mol/L 时,它与 LOOH 的量呈负相关,即抑制细胞对 LDL 的氧化;当 NO 释放量 ≥ 90 μ mol/L 时,LOOH 的量随之增加,即促进 LDL 的氧化 (图 1, Figure 1)

1.6 蛋白质测定

用 Lowry's 法。以牛血清白蛋白为标准参考。

1.7 统计学处理

采用方差分析和相关分析。

2 结果

2.1 巨噬细胞一氧化氮释放量与脂质过氧化程度分析

从表 1 (Table 1) 中可知,注射 PSK 的各组巨噬细胞 NO 释放量较未注射 PSK 的各组高 ($P < 0.05$),初时随着 NO 产量的增多代表 LDL 氧化程度的脂氢过氧化物 (hydroperoxide, LOOH) 浓度降低。在有 IFN- γ 和 LPS 存在的鼠腹腔巨噬细胞 (mouse peritoneal macrophage, MPM) 与 LDL 共同孵育的体系 (non- PSK+ IFN- γ + LPS 组和 PSK+ IFN- γ + LPS 组) 中加入 L- 精氨酸增加 NO 的释放量,细胞对各刺激因素的反应性增强,产生 NO 越多的组别 LOOH 含量越高 ($P < 0.05$),提示细胞对 LDL 的氧化增强。

3 讨论

大量的研究表明,NO 在生物体内可作为 O₂⁻ 的一种清除剂,能终止 O₂⁻ 链式反应 ($3NO + O_2^- + H_2O \rightarrow 3NO_2 + 2H^+$),当 NO 产生增多时可通过清除 O₂⁻ 来抑制脂质过氧化^[8]。O₂⁻ 和 NO 能快速反应生成过氧亚硝酸 (ONOOH),后者能直接损伤脂质和蛋白。NO、O₂⁻ 和 ONOOH 三者之间的平衡或失衡关系直接影响细胞介导的 LDL 氧化,从而影响 As 病变

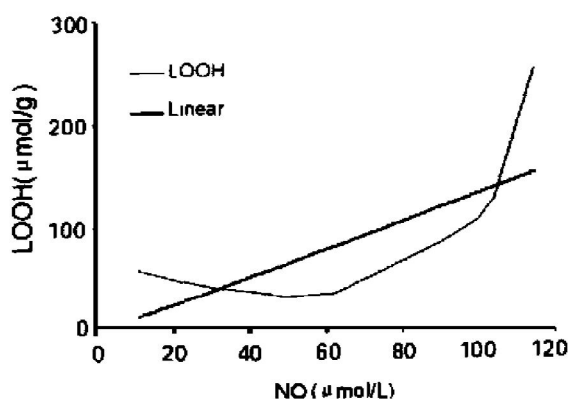


图1 一氧化氮释放量与低密度脂蛋白氧化程度的相关关系

Figure 1 Correlation analysis on contents of NO and degree of LDL oxidation. Linear correlation and regression analysis show: correlation is significant at the 0.05 level ($P = 0.012$, $r = 0.753$).

的发生发展^[9]。NO 对 LDL 氧化修饰的引发或抑制取决于 NO 与 O₂ 反应浓度的比值^[10], 当 NO 浓度远远超过 O₂ 时, 则强烈抑制 LDL 的氧化。我们的实验结果发现, 当添加 NO 的生成底物 L- 精氨酸后, NO 大量产生, LOOH 也同时增加, 反而促进了 LDL 的氧化。Rubbo 等^[10] 在近期的研究中证明, NO 既可与 O₂ 反应形成 ONOOH 而作为氧化剂, 也可因条件的不同而作为抗氧化剂。

本研究中预先用 IFN- γ 和 LPS 刺激细胞产生较多的 NO, 代表 LDL 氧化程度的 LOOH 的量降低, 表明细胞对 LDL 的氧化程度减轻。NO 有保护细胞防止 LDL 氧化、抗动脉粥样硬化的作用。当刺激 NO 产生的因子中添加底物 L- 精氨酸和/ 或鼠腹腔注射 PSK (我室近年来的研究表明, PSK 可刺激巨噬细胞进一步产生 NO, 并可增强 IFN- γ 和 LPS 的刺激作用^[11, 12]) 进一步使 NO 大量产生时, 却发现 LOOH 的量反而升高, LDL 的氧化程度增加, 其结果可能是损害了巨噬细胞或泡沫细胞并促其死亡 (这在我们第二阶段的实验中已得到证实)。说明 NO 在 LDL 氧化中的作用与它的产生量有关, 具有双向性。

近年来的一些报道认为, NO 可毒害宿主细胞并可诱导血管细胞凋亡^[2~4]。NO 的负向作用是否是通过 ONOOH 实现的目前尚不清楚。当然 NO 的负

向作用或对宿主细胞的损害作用并不一定就是恶性事件, 它可促使巨噬细胞来源的泡沫细胞凋亡, 从而使动脉粥样斑块缩小甚至消退, 但若此作用过强则可造成斑块纤维帽塌陷、出血等真正的恶性效应。因此 NO 作为一种重要的生物活性介质, 它的作用是复杂多向的, NO 在动脉粥样硬化防治中的应用应慎重地考虑其特性并充分利用。

参考文献

- [1] Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, et al. Inhibition of low density lipoprotein oxidation by nitric oxide: potential role in atherogenesis [J]. *FEBS*, 1993, **334**: 170-174
- [2] Mehmer UK, Lapetina EG, Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis in raw 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A- activating compounds [J]. *Molecular Pharmacology*, 1995, **47**: 757-765
- [3] Albina JE, Cui S, Mateo RB, et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages [J]. *J Immunol*, 1993, **150**: 5080-5085
- [4] Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells [J]. *FASEB J*, 1992, **6**: 3051-3064
- [5] 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 [J]. *生物化学和生物物理学报*, 1989, **21** (3): 257
- [6] Green LC, Wagner SA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids [J]. *Anal Biochem*, 1982, **126**: 131-138
- [7] Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for the measurement of hydroperoxide [J]. *Methods in Enzymology*, 1994, **223**: 182-189
- [8] Radi R, Beckman JS, Bush KM, et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991, **288**: 481-487
- [9] Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide [J]. *Am J Physiol*, 1995, **864**: 699-722
- [10] Rubbo H, Radi R, Tryjillo M, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation, formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 26066-26075
- [11] 王瑾雯, 陈 媛, 周 玫. 一氧化氮在低密度脂蛋白氧化中的作用及调控研究 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (3): 222-224
- [12] 王瑾雯, 陈 媛, 周 玫, 等. 云芝多糖对巨噬细胞氧化 LDL 的抑制作用与 iNOS 基因表达 [J]. *第一军医大学学报*, 1999, **19** (4): 292-295

(此文 2000-03-28 收到, 2000-12-06 修回)

(此文编辑 文玉珊)