

[文章编号] 1007-3949(2007)15-12-0909-04

•临床研究•

高血压病患者高密度脂蛋白抗低密度脂蛋白氧化能力降低

伍悦蕾, 陈晓平, 蒋凌云, 彭勇

(四川大学华西医院心内科, 四川省成都市 610041)

[关键词] 内科学; 高血压病; 高密度脂蛋白; 低密度脂蛋白; 脂质氧化; 抗氧化; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 观察高血压病患者高密度脂蛋白抗氧化活性有无变化及可能的影响因素。方法 纳入 33 名高血压病患者及 32 名健康对照者, 采用一次性密度梯度超速离心法分离高密度脂蛋白及低密度脂蛋白, 体外 Cu^{2+} 诱导法作脂蛋白氧化, 用分光光度法、硫代巴比妥酸法测定高密度脂蛋白抗氧化能力、氧化延迟时间和体外过氧化程度, 分光光度连续监测法测定血清对氧磷酶 1 活性。结果 高血压病患者与正常对照组比较, 高密度脂蛋白抗氧化活性及对氧磷酶 1 活性下降 (P 均 < 0.05), 高密度脂蛋白氧化延迟时间、体外过氧化程度差异没有统计学意义; 高密度脂蛋白抗氧化活性与对氧磷酶 1 活性呈正相关, 与收缩压、舒张压和总胆固醇浓度呈负相关 (r 分别为 0.317、-0.387、-0.42 和 -0.259, P 均 < 0.05)。结论 高血压病患者高密度脂蛋白抗氧化活性降低可能是易患动脉粥样硬化的重要因素。血压、对氧磷酶 1 活性等影响高密度脂蛋白抗氧化活性。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Impaired Antioxidant Activity of High Density Lipoprotein in Patients with Essential Hypertension

WU Yue-Lei, CHEN Xiao-Ping, JIANG Ling-Yun, and PENG Yong

(Department of Cardiology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[KEY WORDS] Essential Hypertension; High Density Lipoproteins; Low Density Lipoprotein; Lipid Peroxidation; Antioxidant; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To compare the differences of high density lipoprotein (HDL) antioxidant activity between normal people and the essential hypertension patients, and to explore the factors that may affect the antioxidant capacity of HDL. **Methods** Thirty-three patients with essential hypertension and 32 normal people were included. HDL and low density lipoprotein (LDL) were isolated by one step density gradient ultracentrifugation, and induced oxidation with external Cu^{2+} . Antioxidant activity of HDL, lag time, lipid peroxidation degree were determined by spectrophotometric and thiobarbituric acid reactive substances methods. Paraoxonase 1 (PON1) activity was measured with continuous monitoring using phenylacetate as substrate.

Results In essential hypertension patients, the inhibitory effect of HDL on LDL oxidation and the activity of PON1 were reduced ($P < 0.05$), the lag time of oxidation and the lipid peroxidation degree did not show statistically significant difference. HDL antioxidant capacity was positively correlated with PON1 activity and negatively correlated with systolic pressure, diastolic pressure, and total cholesterol level (with $r = 0.317, -0.387, -0.42, -0.259$ respectively, $P < 0.05$). **Conclusions**

HDL antioxidant activity may be one of the most important determinants for the development of atherosclerosis in patients with essential hypertension. The impaired HDL antioxidant activity is affected by high levels of blood pressure, and low activity of PON1.

高血压病患者易合并动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As), 其发生与血脂异常关系密切。高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 是抗 As 因子, 但已有研究^[1,2] 表明, 高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 的量不能可靠反映其抗 As 能力的大小。目前研究认为 HDL 具有逆向转

运胆固醇、抗炎、抗氧化的作用^[3]。由于低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 被氧化修饰成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 是发生 As 的关键步骤, 而 HDL 可通过多种途径来抗 LDL 氧化^[4], 因此, 观察 HDL 抗氧化活性的变化可能更准确地反映发生 As 的危险性。已有研究发现, 肾功能衰竭^[5]、糖尿病^[6]、绝经后女性^[7] 易患 As 可能与 HDL 抗氧化活性降低相关。但高血压病患者 HDL 抗氧化活性有无改变, 目前尚未见报道。本研究通过观察高血压病患者 HDL 抗氧化活性有无变化及 HDL 的活性成分对其抗氧化能力的影响, 探讨 HDL 抗氧化能力在高血压发生 As 中发

[收稿日期] 2007-08-13 [修回日期] 2007-11-06

[基金项目] 四川省科技攻关项目资助课题(07KJ1-05)

[作者简介] 伍悦蕾, 硕士, 主治医师, 主要从事高血压防治研究, E-mail 为 wuyuelei0325@yahoo.com.cn。通讯作者陈晓平, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管疾病的科研和临床工作。蒋凌云, 主治医师。

挥的作用及可能的影响因素。

1 对象与方法

1.1 研究对象和分组

病例组均来自四川大学华西医院心血管科门诊及病房就诊患者,纳入标准:新发现或停用降压药1个月以上的原发性高血压患者(诊断标准依据2005年中国高血压防治指南),年龄40~75岁,性别不限,共33例。排除标准:继发性高血压、冠心病、糖尿病、恶性肿瘤、肾脏疾病、血脂检查低密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, LDLC) > 4.16 mmol/L 或甘油三酯(triglyceride, TG) > 5.5 mmol/L 或 HDLC < 0.9 mmol/L,近1个月服用抗氧化剂、降压药、降脂药,每日吸烟 > 10支者。性别、年龄相匹配的健康人共32例作正常对照组。

1.2 血标本的准备

真空采血针采集空腹静脉血共10 mL,8 mL 装入0.01% EDTA 抗凝试管,2 mL 装入无抗凝剂试管。4℃冰箱静置30 min,析出血清/血浆后,LDZ4-0.8A 离心机3 000 r/min 离心15 min。部分血清用 OLYMPUS AU5400 全自动生物化学分析仪测定血糖、血脂,余血清-70℃冻存待检对氧磷酶1(paraoxonase 1, PON1)活性;血浆4℃保存,3天内作脂蛋白分离。

1.3 脂蛋白的准备

脂蛋白分离:采用一次性密度梯度超速离心法^[8]。血浆中加入 NaBr 调整密度到1 400 g/L,0.85% NaCl+0.01% EDTA_{a2} 配制 pH7.4、密度1 006 g/L 的母液,母液中加入 NaBr 配制密度1 100 g/L 的梯度液。选用 Beckman L8-55C 型离心机,50Ti 固定角度转头,离心管最下层铺密度1 400 g/L 的血浆4 mL,血浆上再依次铺密度1 100 g/L 的溶液4 mL 和密度1 006 g/L 的溶液5.5 mL,10℃50 000 r/min 离心5 h。离心后分段收集各脂蛋白带。④脂蛋白透析:分离出的脂蛋白分别装入透析袋中,配缓冲液(0.02 mol/L Tris-HCl,0.85% NaCl,0.01% EDTA,0.01 mol/L NaN₃,pH7.4)在4℃冰箱中避光充分透析48 h,去除高盐,4℃储存,1周内使用。作体外氧化研究前,再于 pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)中4℃避光透析24 h,去除 EDTA 等小分子量抗氧化物。④脂蛋白纯度鉴定:用琼脂糖凝胶电泳法。脂蛋白中蛋白质含量测定:用 Makwell 等的改良 Lowry 法。

1.4 高密度脂蛋白体外氧化延迟时间及过氧化程度测定

除去 EDTA 的 HDL (终浓度 0.2 g/L) 加入新鲜

配制的 CuCl₂(终浓度 10 μmol/L) 在恒温 37℃pH7.4 的 PBS 中氧化生成共轭二烯(conjugated diene, CD),用 Bio-Rad SmartSpec Plus 分光光度仪每5分钟连续监测 CD 在波长 234 nm 处的吸光度(absorbent values, A),120 min 后 2 mmol/L EDTA(终浓度)终止反应。采用 Esterbauer 等^[9]的方法,以时间为横坐标,234 nm 处的 OD 值为纵坐标作 HDL 氧化动力曲线,a 线(增殖期上升段斜率所得直线)与 b 线(过反应初始点 OD 值的 X 轴平行线)交叉得 A 点,A 点对应的 X 轴时间 B 为氧化延迟时间(图 1)。反应终止后,用硫代巴比妥酸法测定丙二醛含量表示 HDL 过氧化程度,HDL 中丙二醛含量(nmol/L) = (测定管吸光度值/标准管吸光度值) × 标准品浓度 ÷ HDL 蛋白含量。丙二醛试剂盒由南京建成生物工程公司提供,按说明书中微量检测法操作,所有标本 95℃水浴时间均延长至 80 min。

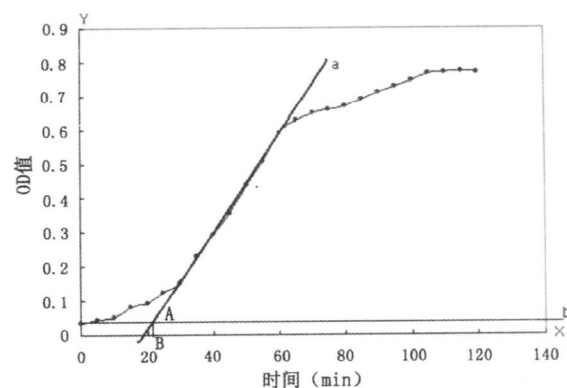


图 1. 从高密度脂蛋白氧化动力曲线求氧化延迟时间 B 点为延迟时间。

1.5 高密度脂蛋白抗氧化活性测定

按 Zago 等^[7]的方法,同一病人的 LDL(终浓度 0.1 g/L)、HDL(终浓度 0.2 g/L)、LDL(终浓度 0.1 g/L) + HDL(终浓度 0.2 g/L) 分别在恒温 37℃pH7.4 的 PBS 中加入新鲜配制的 CuCl₂(终浓度 10 μmol/L) 氧化 120 min 后,2 mmol/L 的 EDTA(终浓度)终止反应,然后用南京建成生物工程公司提供的丙二醛试剂盒检测脂质过氧化产物,以丙二醛含量表示。HDL 抗 LDL 氧化活性以氧化抑制百分比表示,即抑制率(%) = (测 LDL 的丙二醛 - (LDL 与 HDL 共同孵育的丙二醛 - HDL 的丙二醛)) ÷ LDL 的丙二醛 × 100%。

1.6 血清对氧磷酶 1 活性测定

根据 Eckerson 等^[10]的方法,100 mmol/L 的 Tris-HCl (含 2 mmol/L CaCl₂, pH8.0) 缓冲液 980 μL,加入 1 mol/L 乙酸苯酯 10 μL(无水乙醇稀释,当天临时配

制, -20℃储存), 37℃孵育 3 min 后, 加入用缓冲液稀释到 1:10 的血清, 用 Moleculardevice Spectramax M5 在 270 nm 处连续监测 180 s, 计算吸光度值升高的速率($\Delta A/\text{min}$)。以连续监测法检测 PON 水解底物乙酸苯酚时生成的苯酚在 270 nm 处吸光度的变化速率。PON1 活性计算公式如下: $\text{PON}(\text{kU/L}) = [(\Delta A/\text{min} \times \text{TV} \times 10^6)/\epsilon \times \text{SV} \times \text{L} \times 10^3] \times \text{稀释倍数}$, 其中 TV 为反应总体积(1000 μL), SV 为样本体积(10 μL), L 为比色杯光径(1 cm), ϵ 为苯酚摩尔消光系数[$1.31 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$]。

1.7 统计学方法

数据用 spss13.0 统计软件处理。正态或近似正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两组比较若满足正态分布、方差齐采用成组设计 t 检验, 否则用 t' 检验; 计数资料用构成比表示进行 χ^2 检验。资料的相关性用直线相关或逐步回归分析。

2 结果

2.1 一般情况比较

两组间性别、年龄、吸烟、TG、总胆固醇(total cholesterol, TC)、LDLC 和 HDLC 的差异无显著性($P > 0.05$); 高血压组收缩压、舒张压和体质指数(body mass index, BMI) 均高于对照组($P < 0.01$, 表 1)。

表 1. 两组间一般情况比较

变 量	高血压组 ($n=33$)	正常对照组 ($n=32$)
男/女(例)	17/16	15/17
吸烟/不吸烟(例)	10/23	12/20
年龄(岁)	56.61 \pm 11.28	56.72 \pm 10.24
BMI(kg/m^2)	25.23 \pm 3.59 ^a	22.35 \pm 2.67
TG(mmol/L)	1.94 \pm 0.95	1.55 \pm 0.68
TC(mmol/L)	5.16 \pm 0.84	4.81 \pm 0.67
LDLC(mmol/L)	3.43 \pm 0.73	3.09 \pm 0.73
HDLC(mmol/L)	1.35 \pm 0.34	1.43 \pm 0.32
收缩压(mmHg)	151.32 \pm 14.38 ^a	118.25 \pm 12.73
舒张压(mmHg)	85.48 \pm 12.17 ^a	68.94 \pm 6.50

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比。

2.2 高密度脂蛋白抗氧化活性、血清对氧磷酶 1 活性、高密度脂蛋白氧化延迟时间及过氧化程度

高血压组 HDL 抗氧化活性和 PON1 活性(分别为 72.6% \pm 13.0% 和 116.48 \pm 39.35 kU/L) 均低于正常对照组(分别为 80.6% \pm 8.5% 和 142.02 \pm

55.25 kU/L, $P < 0.05$)。高血压组 HDL 氧化延迟时间和丙二醛水平(代表过氧化程度)(分别为 18.61 \pm 5.42 min 和 20.35 \pm 4.41 $\mu\text{mol}/\text{g}$) 与正常对照组(分别为 21.22 \pm 5.98 min 和 20.95 \pm 3.22 $\mu\text{mol}/\text{g}$) 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 高密度脂蛋白抗氧化活性与可能影响因素的相关分析

选择年龄、BMI、收缩压、舒张压、TC、LDLC、HDLC、TG、氧化延迟时间、丙二醛、PON1 活性为自变量, 与 HDL 抗氧化活性作直线相关分析发现, HDL 抗氧化活性与收缩压、舒张压、TC 呈负相关, 与 PON1 活性呈正相关($r = -0.387$, $P = 0.001$; $r = -0.42$, $P < 0.001$; $r = -0.259$, $P < 0.05$; $r = 0.317$, $P = 0.01$)。将上述单因素分析中有相关性的自变量与 HDL 抗氧化活性作逐步回归分析发现, 即便排除其它因素影响, HDL 抗氧化活性仍与舒张压负相关, 与 PON1 活性正相关(表 2)。

表 2. 高密度脂蛋白抗氧化活性的逐步回归分析

自变量	HDL 抗氧化活性		
	偏回归系数	标准偏回归系数	P 值
PON1 活性	0.065	0.272	0.017
舒张压	-0.354	-0.389	0.001

3 讨论

近年有学者提出, 用代表 HDL 功能的指标预测 As 可能比 HDLC 的量更为准确、可靠。抗氧化是 HDL 的重要功能, 已有研究发现, 在肾功能衰竭^[5]、糖尿病^[6] 患者及绝经后女性^[7], HDL 抗 LDL 氧化能力降低, 并由此推测这可能是他们易患 As 的重要原因, 但高血压病患者 HDL 抗氧化活性有无改变, 目前尚未见报道。本课题与过去大多数研究高血压病患者 HDL 不同的是, 两组入选对象的 HDLC 水平无统计学差异, 而将 HDL 的抗氧化能力、活性成分等作为主要观察内容。

本研究采用体外 Cu^{2+} 诱导法观察脂蛋白的氧化及 HDL 抗氧化作用, 该方法在以往的脂蛋白氧化研究中早已广泛用于基础和临床, 得到公认。在体液中, HDL 的颗粒数量大概是其它脂蛋白的 10~20 倍, 体外试验中采用 HDL 与 LDL 蛋白浓度比为 2:1 (HDL 浓度为 0.2 g/L, LDL 浓度为 0.1 g/L), 这大概相当于 HDL 颗粒与 LDL 颗粒数量比为 10:1, 理论上接近人体生理情况下体液中 HDL 与 LDL 的构成

比^[11]。

本研究发现,两组的 HDL 抗氧化活性均大于 0,但高血压组显著低于正常对照组,说明在体外 Cu²⁺ 诱导的氧化体系中, HDL 的存在确实可以降低 LDL 中脂质过氧化物的形成,具有抗 LDL 氧化作用,但高血压患者的 HDL 抗氧化能力却受到了损害。

高血压病人的 PON1 活性显著低于正常对照组。相关分析发现, HDL 抗氧化活性与 PON1 活性呈正相关,与血压、TC 浓度呈负相关;进一步排除混杂因素的干扰, PON1 活性、血压值与 HDL 抗氧化活性的这种相关性仍然存在,说明 PON1 活性和血压值是 HDL 抗氧化活性的主要影响因素。作为一种异质性脂蛋白, HDL 的生理功能受其结构和成分等变化的影响。PON1 通过载脂蛋白 A1(apolipoprotein A1, apoA1) 与 HDL 紧密结合,基础研究表明 PON1 具有抗氧化作用,是 HDL 具有抗氧化能力的重要组成成分^[12]。有研究发现,在高血压情况下体内氧化应激增强,此时 HDL 可能被氧化,载脂蛋白 A1 发生聚合、交联或者裂解反应,从而影响 PON1 活性^[13];另外, HDL 结构成分的变化还使其自身更易发生氧化修饰,从而损害抗 LDL 氧化能力。

本研究发现,反映 HDL 自身氧化的指标——氧化延迟时间、丙二醛浓度两组间虽差异无显著性,但是高血压组氧化延迟时间的均数(18.61 min)小于正常对照组(21.22 min),两组比较的 *P* 值接近 0.05(0.069),两者差的可信区间范围较大(-0.214, 5.44),增加样本量可能会得到有差异性的结果。

高密度脂蛋白(HDL)抗氧化功能与 As 的关系已受到越来越多的关注,本研究和已有研究^[6,8]均表明,在存在易患 As 的病理生理情况下, HDL 抗氧化活性降低。2007 年 ACC 年会公布的最新临床研究表明,胆固醇酯转移蛋白抑制剂虽有效提高了 HDLC 水平,但并未使患者进一步受益,提示如果对

HDL 的研究仅停留在 HDLC 含量的层面可能将走入误区。随着对 HDL 功能的深入研究, HDL 的抗氧化活性及其亚组分有可能成为 As 新的预测指标和防治目标,值得进一步探讨。

[参考文献]

- [1] von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. Acceleration of reverse cholesterol transport [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2000, **15** (5): 348-354.
- [2] Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, et al. Inflammatory/antiinflammatory properties of high density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment [J]. *Circulation*, 2003, **108** (22): 2751-756.
- [3] 赵水平. 高密度脂蛋白的研究现状[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (6): 673-675.
- [4] Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **161** (1): 1-16.
- [5] Jurek A, Turyna B, Kubit P, Klein A. LDL susceptibility to oxidation and HDL antioxidant capacity in patients with renal failure [J]. *Clin Biochem*, 2006, **39** (1): 19-27.
- [6] Sanguinetti SM, Brites FD, Fasulo V, Verona J, Elbert A, Wikinski RL, et al. HDL oxidability and its protective effect against LDL oxidation in type 2 diabetic patients [J]. *Diabetes Nutr Metab*, 2001, **14** (1): 27-36.
- [7] Zago V, Sanguinetti S, Brites F, Berg G, Verona J, Basilio F, et al. Impaired high density lipoprotein antioxidant activity in healthy postmenopausal women [J]. *Atherosclerosis*, 2004, **177** (1): 203-210.
- [8] Liu BV, Jiang Y, Fu MD. Oxidative modification of serum LDL, VLDL and HDL in vivo [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **134** (1-2): 224.
- [9] Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein [J]. *Free Radic Res Commun*, 1989, **6** (1): 67-75.
- [10] Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism [J]. *Am J Hum Genet*, 1983, **35** (6): 1126-1138.
- [11] Hasselwander O, McEneny J, McMaster D, Fogarty DG, Nicholls DP, Maxwell AP, et al. HDL composition and HDL antioxidant capacity in patients on regular haemodialysis [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **143** (1): 125-133.
- [12] 于碧莲, 赵水平. 对氧磷酶 1 与动脉粥样硬化的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (5): 655-658.
- [13] Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goonastic M, Settle M, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease [J]. *J Clin Invest*, 2004, **114** (4): 529-541.

(此文编辑 许雪梅)