

[文章编号] 1007-3949(2008)16-07-0513-06

• 实验研究 •

丙丁酚对动脉粥样硬化小鼠抗氧化作用的比较

叶延平¹, 莫中成², 龙治峰², 尹小波³, 李霞³, 张青海³, 李媛彬³, 易光辉³

(南华大学 1. 公共卫生学院; 2. 组织胚胎学教研室;

3. 心血管疾病研究所暨动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠; 高脂血症; 丙丁酚; 氧化应激; 对氧磷酶 1

[摘要] 目的 观察丙丁酚对高脂高胆固醇饲养的 C57BL/6J 小鼠和载脂蛋白 E 基因缺陷(载脂蛋白 E^{-/-})小鼠抗氧化作用的影响, 比较丙丁酚对两种小鼠的作用差异。方法 以高脂高胆固醇饲料饲养小鼠, 制作高脂血症模型。采用酶比色法及相关检测试剂盒分别测定小鼠血脂水平及与氧化应激相关的指标; 采用双抗夹心 ELISA 法测定氧化型低密度脂蛋白的水平; 采用改良的 Eckerson 方法测定对氧磷酶 1 的活性, 采用逆转录聚合酶链式反应检测对氧磷酶 1 mRNA 的表达。结果 与两种小鼠各自的基础饲料组比较, 高脂高胆固醇组血脂水平均有升高; 与各自的高脂高胆固醇组比较, 丙丁酚处理后, C57BL/6J 小鼠血清的甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平分别降低了 41.0%、43.6%、44.8% 和 41.3% ($P < 0.05$), 载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠血清的甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平, 分别降低了 36.2%、28.2%、31.3%、33.9% ($P < 0.05$)。小鼠主动脉内膜的动脉粥样硬化病变与各自高脂高胆固醇组比较, C57BL/6J 小鼠经丙丁酚处理后病变面积减少了 61.1%, 载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠经丙丁酚处理后病变面积减少了 27.2% ($P < 0.05$)。与各自基础饲料组比较, 高脂血症小鼠丙二醛及氧化型低密度脂蛋白的水平增高, 而总抗氧化能力和超氧化物歧化酶水平降低 ($P < 0.05$); 与各自的高脂高胆固醇组比较, 丙丁酚处理组小鼠的总抗氧化能力和超氧化物歧化酶水平上升, 丙二醛及氧化型低密度脂蛋白的水平则降低 ($P < 0.05$)。两组小鼠高脂高胆固醇组血清对氧磷酶 1 的活性较基础饲料组均下降, 经高脂饮食加丙丁酚处理后对氧磷酶 1 活性比单纯高脂饮食组有所增加; 肝脏对氧磷酶 1 mRNA 的表达在高脂高胆固醇组下调, 而丙丁酚处理组则上调 ($P < 0.05$)。结论 丙丁酚可以减轻高脂血症小鼠动脉粥样硬化病变, 减轻高脂高胆固醇饮食诱导的氧化应激, 而载脂蛋白 E 基因缺陷则一定程度减弱丙丁酚的上述作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Comparison of Antioxidant Effects of Probucol in Atherogenic Mice

YE Yan-Ping¹, MO Zhong-Cheng², LONG Zhi-Feng², YIN Xiao-Bo³, LI Xia³, ZHANG Qing-Hai³, LI Yuan-Bin³, and YI Guang-Hui³

(1. School of Public Health, University of South China; 2. Department of Histology and Embryology, University of South China. 3. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China or key laboratory of atherosclerosis science in Hunan province Hunan, Hengyang, 421001, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein E Deficiency Mice; Hyperlipidemia; Probucol; Oxidative Stress; Paraonase 1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of probucol on high fat-high cholesterol (HFHC) diet-induced hyperlipidemia and oxidative stress in apo E deficient (apoE^{-/-}) mice and genetic background C57BL/6J mice. **Methods** The hyperlipidemic mice were induced by feeding HFHC diet which was supplemented with 15% lard and 0.25% cholesterol. The levels of plasma lipids were determined by standard assays. The oxidative stress was evaluated by the serum levels of total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), and malonic dialdehyde (MDA) determined by commercially provided kits. The aortic atherosclerotic lesions were demonstrated by Sudan IV staining. Activity of paraonase 1 (PON1) was assessed by modified Echerson's method. Expression level of PON1 in liver was evaluated by semi quantitative reverse transcription polymerase reaction (RT-PCR). **Results** HFHC diet elevated the levels of serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDLC), and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C). Probucol decreased the elevation of serum levels of lipids. In C57BL/6J mice, the levels of TG, TC, LDL-C, and HDL-C lowered 41%, 43%, 44.8%, and 41.3%, respectively, compared with control group ($P < 0.05$). In apo E^{-/-} mice, decrease of 36.2%, 28.2%, 31.3%, and 33.9%, respectively, was observed versus apo E^{-/-} control ($P < 0.05$). Probucol treatment prevented the atherosclerotic lesion development in both C57BL/6J and apoE^{-/-} mice. Compared with HFHC groups, the aorta lesions were significantly decreased by 61.1% in C57BL/6J mice and by 27.2% in apo E^{-/-} mice ($P < 0.05$), respectively, after treatment of probucol. Admi

[收稿日期] 2008-02-24 [修回日期] 2008-06-20

[基金资助] 国家自然科学基金(30570958); 湖南省卫生厅课题(B2005-093)

[作者简介] 叶延平, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail 为 yeyanping@163.com。莫中成, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化的病因发病学及防治。通讯作者易光辉, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发病相关分子机制研究, E-mail 为 ghyi6108@163.com。

nistration of probucol lowered the serum levels of MDA and oxLDL, and elevated the levels of serum T-AOC and SOD. The results also demonstrated a more significant increase of PON1 activity and expression level in C57BL/6J mice than in apo E^{-/-} mice. **Conclusion** Probucol decreases the levels of serum lipids and alleviates the atherosclerotic lesions in HFHC diet-induced hyperlipidemic mice. Probucol may contribute to a significant decrease of the oxidative stress. The effects of probucol may be attenuated by apo E deficiency in mice.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一类多病因相互作用而产生的疾病。大量的基础研究表明, 高血脂水平导致体内自由基的产生与清除之间的失衡, 自由基清除剂超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性降低, 产生大量的脂质过氧化物。脂质过氧化物可直接损伤内皮细胞(endothelial cell, EC), 其产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL), 促使泡沫细胞形成, 导致As病变的形成^[1]。对氧磷酶1(paraoxonase1, PON1)是一种与高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)紧密结合的芳香酯酶, PON1能够抑制LDL脂质氧化产物的聚积, 它是一种与HDL的作用密切相关的抗As的保护性酶。丙丁酚是一种抗氧化及降脂的药物, 它可以调节血脂水平、改善内皮细胞功能、抑制泡沫细胞形成及强力抗氧化作用。本研究以高脂高胆固醇饮食饲喂载脂蛋白E基因敲除小鼠(apolipoprotein E knockout mice, 载脂蛋白E^{-/-})及其遗传背景相同的C57BL/6J小鼠为研究对象, 探讨丙丁酚的抗氧化作用, 比较丙丁酚对两种高脂血症小鼠抗氧化作用的差异。

1 材料与方法

1.1 动物和主要试剂

载脂蛋白E^{-/-}小鼠、C57BL/6J小鼠及小鼠标准饲料均购自北京大学医学部实验动物部; 丙丁酚由北京维信康医药有限公司提供; 血脂检测试剂盒均购自中生北控生物技术公司; PON1标准品及对硝基苯酚均购自上海楚柏实验室设备有限公司; 小鼠oxLDL ELISA检测试剂盒购自上海朗卡公司; 总抗氧化能力(total antioxidative capacity, T-AOC)、MDA及SOD测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; Trizol试剂盒购自美国Invitrogen公司; Reverse Transcription System购自美国Promega公司; PON1及GAPDH上、下游引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成; 2×Taq PCR Master Mix及100 bp DNA Ladder购自天根生化科技(北京)有限公司; Agarose, 购自西班牙Biowest公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 动物分组及饲养方法

饲喂小鼠的基础饲料即小鼠标准饲料(normal

diet, ND), 高脂高胆固醇(high fat and high cholesterol, HFHC)饲料, 即小鼠基础饲料+15%猪油+0.25%胆固醇。实验用60只雄性小鼠(载脂蛋白E^{-/-}小鼠和C57BL/6J小鼠各30只)均饲养在SPF级实验动物房中, 予以高脂高胆固醇饲料饲养至实验结束。随机将两种小鼠各分为3组, 每组10只。分组如下: C57-ND组, 仅饲标准饲料; C57-HFHC组, 加饲高脂高胆固醇饲料; C57-HFHC+P组, 加饲高脂高胆固醇饲料和0.5%的丙丁酚; 载脂蛋白E^{-/-}-ND组, 仅饲标准饲料; 载脂蛋白E^{-/-}-HFHC组, 加饲高脂高胆固醇饲料; 载脂蛋白E^{-/-}-HFHC+P组, 加饲高脂高胆固醇饲料和0.5%的丙丁酚。

1.3 血脂的测定

小鼠饲养12周, 经摘眼球取小鼠血0.5 mL, 离心(4 000 r/min × 15 min, 4 ℃), 取血清, 测其脂质含量。采用酶比色法检测试剂盒测定血清中甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC); 采用直接高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)检测试剂盒及直接低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)检测试剂盒分别检测HDLC和LDLC的浓度。具体操作步骤按各试剂盒所附操作方法进行。

1.4 苏丹IV染色及HE染色检测动脉病变

将纵向剖开的主动脉用苏丹IV染色后照相, 动脉脂纹与动脉总面积用图象分析软件进行计算, 检测脂纹占动脉总面积的百分比。取小鼠胸主动脉, 用10%福尔马林液固定后, 常规石蜡包埋切片, 采用苏木精-伊红染色, 观察血管上As病变。

1.5 血浆总抗氧化能力、超氧化物歧化酶活力及丙二醛含量的测定

采用T-AOC测定试剂盒, 通过比色可测出其抗氧化能力的高低的原理检测机体的总抗氧化能力。血浆测试前3 500 r/min离心10 min, 与测试试剂充分混匀, 放置10 min, 双蒸水调零, 1 cm光径, 520 nm处, 测各管吸光度。采用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)血浆中SOD活力。具体操作步骤及计算公式严格参照试剂盒说明书进行。

1.6 双抗夹心酶联免疫吸附法测定小鼠氧化低密度脂蛋白的浓度

采用双抗夹心ELISA检测试剂盒, 抗小鼠氧化

型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)单抗包被于酶标板上。实验前试剂盒应平衡至室温(20~25℃),临用前15 min配制工作液。取出所需反应板,具体操作步骤参照试剂盒说明书。

1.7 对氧磷酶 1 活力的测定

PON1 活性的测定参考文献[2],采用改良的Eckerson的测定方法。对氧磷酶水解对氧磷成为对硝基酚,对硝基酚为黄色化合物,在412 nm处有吸收峰。可依据颜色深浅进行比色定量,对硝基酚的量可反映对氧磷酶的活性水平。具体操作步骤参照试剂盒说明书,用测定管与对照管的吸光度差值查标准曲线得血清对氧磷酶活性单位($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$)。

1.8 逆转录聚合酶链式反应检测小鼠肝脏对氧磷酶 1 mRNA 的表达

用TRIzol试剂提取细胞总RNA,溶于无Rnase水中,紫外分光光度计测定 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值在1.8~2.0之间。取总RNA 2 μg ,用Promega公司逆转录试剂盒合成cDNA,再取逆转录产物1.0 μL 进行PCR循环。内参照采用GAPDH,引物序列为:上游5'-AAC TTT GGC AT TGT GGA AGG-3',下游5'-TGT GAG GGA GAT GCT CAG TG -3',扩增片段长度为599 bp。PON1的引物序列:上游:5'-CAG CCT GTC CAT CTG TCT CA -3',下游:5'-CTG CTG GCT CCT TCT TG TTC-3',PCR扩增产物全长313 bp。PCR反应条件:95℃温育3 min后,94℃变性30 s \rightarrow 60℃复性30 s \rightarrow 72℃延伸30 s,33个循环,末次循环72℃

延伸10 min。反应结束后,取RT-PCR产物在1.5%的琼脂糖凝胶中电泳,加样量均为5 μL ,溴化乙锭染色。电泳条带采用UVP型凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析,以各组目的基因与内参照基因的RT-PCR扩增DNA片段的吸光度值减去背景值的比值来比较待测基因的mRNA表达差异。

1.9 统计学处理

实验所得数据采用均数 \pm 标准差表示,统计方法采用单因素方差分析,两组间比较采用S-N-K检验,所用统计工具为SPSS 11.0统计软件。 $P < 0.05$ 提示差异有显著性。

2 结果

2.1 丙丁酚对高脂血症小鼠血脂水平的影响

测定实验结束时的终端血脂。结果发现与两种小鼠各自的基础饲料组比较,HFHC组血脂水平均升高。与各自的HFHC组比较,丙丁酚处理后可以显著降低高脂高胆固醇饮食饲喂的C57BL/6J小鼠的血脂水平($P < 0.05$),其中TG、TC、HDL和LDL水平分别降低了41%、43.6%、44.8%和41.3%。而对载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠,丙丁酚可以显著降低高脂高胆固醇饲喂的载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠的血清TG、TC、HDL和LDL水平($P < 0.05$),分别降低了36.2%、28.2%、31.3%、33.9%。在实验结束时组间小鼠体重差异无显著性(表1)。

表1. C57BL/6J和载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠血清脂质水平(mmol/L , $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	C57BL/6J 小鼠			载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠		
	ND 组	HFHC 组	HFHC+ P 组	ND 组	HFHC 组	HFHC+ P 组
TG	0.32 \pm 0.20	0.78 \pm 0.23 ^a	0.46 \pm 0.12 ^b	1.04 \pm 0.27	1.99 \pm 0.60 ^a	1.27 \pm 0.30 ^b
TC	1.56 \pm 0.90	4.06 \pm 0.76 ^a	2.29 \pm 0.73 ^b	5.34 \pm 1.4	13.96 \pm 0.5 ^a	10.02 \pm 1.48 ^b
HDL	1.24 \pm 0.2	2.9 \pm 0.58 ^a	1.6 \pm 0.54 ^b	2.54 \pm 1.07	7.68 \pm 1.82 ^a	5.28 \pm 0.89
LDL	0.30 \pm 0.06	0.92 \pm 0.21 ^a	0.54 \pm 0.07 ^b	2.72 \pm 1.54	5.02 \pm 1.51 ^a	3.32 \pm 1.90 ^b

a为 $P < 0.05$,与ND组比较,b为 $P < 0.05$,与HFHC组比较。

2.2 苏丹 IV 染色小鼠主动脉内膜面动脉粥样硬化病变面积分析

苏丹IV染色后见C57小鼠主动脉上仅有脂纹病变,未见明显的斑块,而载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠则可以见明显的斑块样病变。以As病变面积占全内膜面积的比例计算各组小鼠的病变面积百分比,C57-ND组为3.56% \pm 0.20%、C57-HFHC组为7.20% \pm 1.90%、C57-HFHC+P组为2.80% \pm 0.60%;载脂蛋白 $E^{-/-}$ -ND组为7.70% \pm 1.50%、载脂蛋白

$E^{-/-}$ -HFHC组为19.05% \pm 3.90%、载脂蛋白 $E^{-/-}$ -HFHC+P组为13.87% \pm 2.65%。比较后发现C57BL/6J小鼠主动脉内膜的As病变较轻,远不如载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠明显。且两种小鼠经高脂高胆固醇处理后,与各自饲标准饲料的对照组比较,其血管As病变明显增加(与各自对照组比较,C57-HFHC组病变面积增加50.6%,而载脂蛋白 $E^{-/-}$ -HFHC组病变面积增加59.6%)。C57小鼠经丙丁酚处理后病变面积减少了61.1%($P < 0.05$),载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小

鼠经丙丁酚处理后病变面积减少了 27.2% ($P < 0.05$, 图 1)。

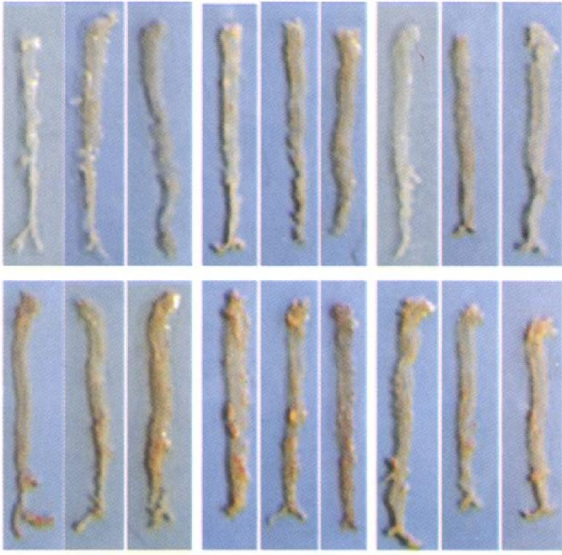


图 1. 苏丹Ⅲ染色观察小鼠主动脉内膜面动脉粥样硬化病变 ($n = 3$) 上图为 C57 小鼠, 下图为载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠; 从左到右分别为基础饲料组, HFHC 组和 HFHC+ 丙丁酚组。

2.3 苏木精-伊红染色观察鼠胸主动脉病变

采用 HE 染色小鼠胸主动脉, 结果发现, C57 小鼠两组主动脉上未见明显的病变; 载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠中血管壁内膜处可见泡沫样细胞, 其中的高脂组为最为明显, 而载脂蛋白 $E^{-/-}$ 高脂+ 丙丁酚组较高脂组病变有较明显的减轻(图 2)。

2.4 丙丁酚对高脂血症小鼠总抗氧化能力、丙二醛、超氧化物歧化酶及氧化低密度脂蛋白的影响

C57BL/6J 小鼠和载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠经高脂高胆固醇饲料喂养后, T-AOC 和 SOD 水平下降明显 ($P < 0.05$), MDA 及 ox-LDL 的水平明显增高 ($P < 0.05$); 而与各自的 HFHC 组比较, C57 小鼠加丙丁酚处理组小鼠 T-AOC 水平升高 58.9%、MDA 降低 49.1%、SOD 上升 11.3%、ox-LDL 降低 25%, 载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠加丙丁酚处理组小鼠 T-AOC 升高 28.6%、MDA 降低 17.7%、SOD 上升 43.9%、oxLDL 降低 11.7% ($P < 0.05$, 表 2)。

2.5 丙丁酚对高脂血症小鼠血清对氧磷酶 1 的活性及肝脏组织对氧磷酶 1 mRNA 表达的影响

结果发现, 与基础饲料组相比, 两组小鼠经高脂高胆固醇饮食饲养后, 其血清 PON1 的活性下降 ($P < 0.05$)。而与各自的 HFHC 组比较, C57 小鼠 HFHC+ P 组血清 PON1 的活性则上升 37.5%, 载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠 HFHC+ P 组血清 PON1 的活性则上升 21.5% ($P < 0.05$, 表 3)。

采用 RT-PCR 技术检测各组小鼠肝脏 PON1 mRNA 表达结果发现, 与各自对 ND 组比较, 仅经高脂高胆固醇饲料处理的小鼠, 其肝脏 PON1 mRNA 的表达下调 ($P < 0.05$); 与 HFHC 组比较, 加丙丁酚处理后, C57 小鼠 HFHC+ P 组 PON1 mRNA 的相对灰度值增加 60.0%, 载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠 HFHC+ P 组则增加 21.4% ($P < 0.05$, 图 3 及表 4)。

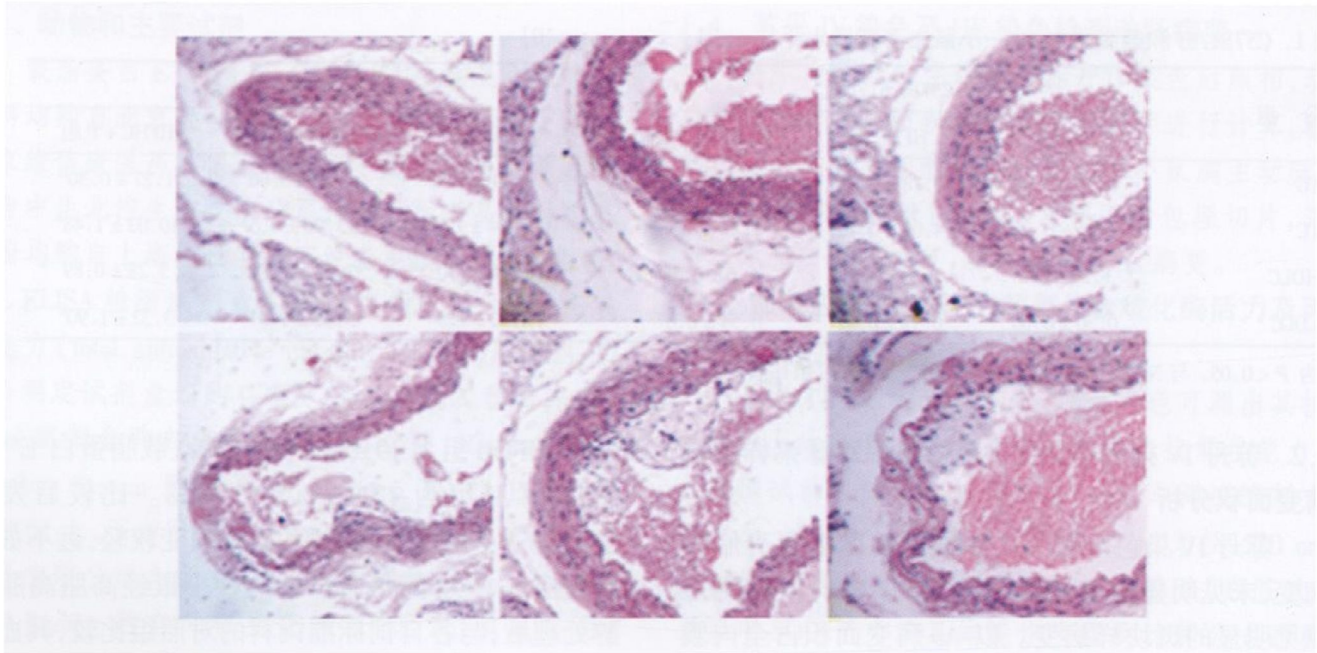


图 2. 苏木精-伊红染色观察小鼠主动脉内膜面动脉粥样硬化病变 ($n = 3, \times 40$) 上图为 C57 小鼠, 下图为载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠; 从左到右分别为基础饲料组, HFHC 组和 HFHC+ 丙丁酚组。

表 2. 小鼠血清总抗氧化能力、丙二醛、超氧化物歧化酶及氧化低密度脂蛋白的水平($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

指 标	C57BL/6J 小鼠			载脂蛋白 E ^{-/-} 小鼠		
	ND 组	HFHC 组	HFHC+ P 组	ND 组	HFHC 组	HFHC+ P 组
T-AOC (kU/L)	42.30 ± 12.44	18.90 ± 6.73 ^a	30.03 ± 10.37 ^b	37.50 ± 9.89	18.53 ± 6.87 ^a	23.83 ± 8.86 ^b
MDA (μmol/L)	28.30 ± 5.00	59.96 ± 15.28 ^a	30.53 ± 11.11 ^b	37.77 ± 10.04	61.47 ± 14.56 ^a	50.57 ± 19.16 ^b
SOD (kU/L)	433.37 ± 83.56	365.97 ± 28.85 ^a	407.50 ± 86.86 ^b	258.13 ± 30.09	165.10 ± 22.73 ^a	237.67 ± 40.28 ^b
αLDL (μg/dL)	17.23 ± 3.71	28.93 ± 6.35 ^a	21.70 ± 4.01 ^b	39.20 ± 5.40	58.10 ± 9.70 ^a	51.30 ± 6.30 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与 ND 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 HFHC 组比较。

表 3. 小鼠血清对氧磷酶 1 的活性($\bar{x} \pm s$, μmol/min/L)

分 组	n	C57BL/6J 小鼠	载脂蛋白 E ^{-/-} 小鼠
ND 组	10	153.3 ± 31.92	118.83 ± 4.67
HFHC 组	10	100.27 ± 13.69 ^a	70.47 ± 22.02 ^a
HFHC+ P 组	10	137.90 ± 46.36 ^b	85.60 ± 16.41 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与 ND 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 HFHC 组比较。

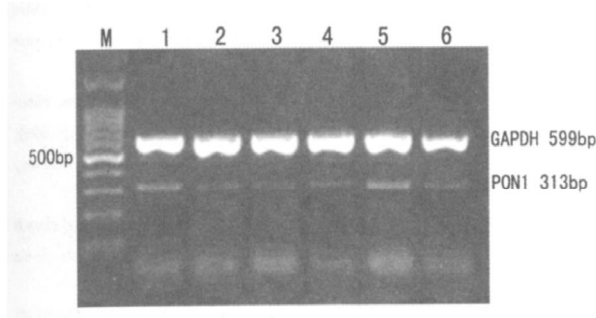


图 3. 逆转录聚合酶链式反应检测小鼠肝脏对氧磷酶 1 mRNA 的表达 1 为 C57-ND 组; 2 为载脂蛋白 E^{-/-}-ND 组; 3 为 C57-HFHC 组; 4 为载脂蛋白 E^{-/-}-HFHC 组; 5 为 C57-HFHC + P 组; 6 为载脂蛋白 E^{-/-}-HFHC + P 组。

表 4. 逆转录聚合酶链式反应检测小鼠肝脏对氧磷酶 1 mRNA 的相对灰度值

分 组	C57BL/6J 小鼠	载脂蛋白 E ^{-/-} 小鼠
ND 组	0.26 ± 0.05	0.18 ± 0.04
HFHC 组	0.15 ± 0.03 ^a	0.14 ± 0.04 ^a
HFHC+ P 组	0.24 ± 0.03 ^b	0.17 ± 0.05 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与 ND 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 HFHC 组比较。

3 讨论

高血脂症是临床多发病、常见病,也是 As、冠心病的主要危险因素之一。As 是一类多病因相互作用而产生的疾病,自 1799 年 Parry 发现硬化的斑块以来,As 病变发生的原因和机制一直是医学领域内的重要研究课题。

机体的氧化应激是指由于氧自由基过量生成和/或细胞内抗氧化防御系统受损,导致氧自由基及其相关代谢产物过量聚集,从而对细胞产生多种毒性

作用的病理状态。氧化应激也是导致心血管系统结构、功能异常的重要原因之一。T-AOC 是反映机体整体水平上抗氧化水平高低的重要指标。SOD 为酶性抗氧化物质,能清除超氧阴离子,保护细胞免受损伤,通过测定 SOD 活性的高低可间接反映机体清除氧自由基的能力。MDA 是脂质过氧化反应的主要代谢产物,测定 MDA 水平可间接反映出细胞受氧自由基损伤的程度,是反映氧化应激较好的指标^[3]。α-LDL 是低密度脂蛋白的氧化产物,它可激活内皮细胞,增强细胞黏附分子的表达,从而促进单核巨噬细胞的黏附和浸润;同时可刺激单核巨噬细胞表达基质金属蛋白酶,增加纤维帽内细胞外基质降解,削弱纤维帽抗损伤能力,使斑块易损性增加^[4,5]。另外,α-LDL 还可进一步加剧血管粥样病变的炎症反应。本实验中检测了血浆中 T-AOC, SOD, MDA 及 α-LDL 的水平,发现小鼠经高脂高胆固醇饲料喂养后, T-AOC 和 SOD 水平下降明显,而 MDA 及 α-LDL 的水平明显增高,表明实验中小鼠在高脂高胆固醇饮食的诱导下产生了大量的脂质过氧化物,机体的 T-AOC 降低, SOD 减少,从而使机体的抗氧化损伤的防御机制受损。

丙丁酚是一种降胆固醇和抗 As 的药物。化学名为 4,4'-(1, 甲亚乙基)双(硫)双[2,6-双(1,1-二甲基乙基)苯酚],其抗 As 的机制十分复杂。有研究发现,丙丁酚或其代谢产物可以增加胆固醇酯的选择性吸收,增加 HDL 与其 B 类 I 型清道夫受体 (scavenger receptor class B type I, SR-BI) 之间的相互作用^[6],这可能是丙丁酚抗 As 和再狭窄的一种机制^[7]。Braun 等^[8]就发现,丙丁酚可减少 B 类 I 型清道夫受体 (SR-BI) 和载脂蛋白 E 基因双敲除鼠早发性冠心病的发生。早期研究^[9]报道了丙丁酚同时抑制细胞介导和 Cu²⁺ 催化的 LDL 氧化修饰,并且用丙丁酚处理从患者血浆中分离的 LDL,其抗氧化的能力增强,从而引导研究者将研究焦点开始集中于丙丁酚的抗氧化活性而非其降低胆固醇的作用。动物实验亦证明,丙丁酚可明显增加灵长类动物 LDL 对

体外氧化作用的抵抗力^[10],抑制脂质过氧化^[11]。本实验也观察到以丙丁酚处理高脂高胆固醇饲养的As易感鼠(C57BL/6J小鼠及载脂蛋白E^{-/-}小鼠)后,高脂血症小鼠的T-AOC和SOD水平上升,MDA及ox-LDL的水平则降低,提示丙丁酚在高脂血症小鼠体内起着抗氧化作用。本实验还发现,与载脂蛋白E^{-/-}小鼠相比,丙丁酚对C57BL/6J小鼠的T-AOC、MDA、oxLDL等氧化应激指标的影响较为明显。

PON1是由肝脏合成,存在于血清及肝脏的一种水解酶。PON1位于HDL的一个亚结构上,HDL的降解脂质过氧化物和防止血液中LDL堆积作用大部分依靠位于其上的PON1。体外实验证实,PON1可以防止HDL的氧化修饰,保护LDL免受氧化修饰,降低体内ox-LDL水平,并且PON1可以破坏和减少LDL在氧化过程中产生的具有细胞毒作用的溶血磷脂^[12]。Mackness等^[13]证实剔除PON1的转基因小鼠的HDL不能对抗LDL的氧化特性,这支持PON1保护脂蛋白的抗氧化性生理作用。尽管如此,有关PON1作用的基础生化机制及控制PON1合成分泌的药理学方面的作用尚不清楚。本研究中检测了高脂血症小鼠体内血清PON1的活性及肝脏PON1的表达,结果发现经高脂高胆固醇饮食处理的小鼠,其血清PON1的活性下降,而经丙丁酚处理后,PON1的活性上升。提示丙丁酚尽管存在降低HDL水平的副作用,但它可能通过调节PON1的活性而产生抗As作用。此外,作者也发现丙丁酚对C57BL/6J小鼠的PON1活性及肝脏mRNA的表达的影响要强于载脂蛋白E^{-/-}小鼠。

由于丙丁酚降低HDL的副作用,使丙丁酚作为一种调脂药物在临床上的应用受到一定的限制,目前正积极探讨丙丁酚抗As的其他机制。有关丙丁酚在As中的作用,除了认为它抗As的作用之外,还存在着矛盾的观点,Zhang SH等^[6]研究就认为,丙丁酚可以增加载脂蛋白E基因缺陷小鼠As的病变范围,加速As的进程,而Choy K等^[14]研究发现丙丁酚可以增加载脂蛋白E基因敲除小鼠主动脉窦的As病变面积,但丙丁酚可以通过发挥抗炎作用减少巨噬细胞在病变部位的聚积,从而使主动脉窦处病变部位稳定。在本研究中,本实验则发现,丙丁酚可以降低C57BL/6J小鼠和载脂蛋白E^{-/-}小鼠的血脂水

平,减轻其As病变,并且对C57BL/6J小鼠的作用要优于载脂蛋白E^{-/-}小鼠,提示载脂蛋白E在其中可能起着一定的作用。另外,高脂血症小鼠经丙丁酚处理后,其脂质过氧化物代谢产物减少,PON1表达增加,对机体产生抗氧化的保护作用,这可能是丙丁酚抗As的一种重要的机制。通过对两种小鼠作用的比较,丙丁酚的处理,在氧化/抗氧化有关指标方面,C57BL/6J小鼠的变化更有利于阻止As的发展。

[参考文献]

- [1] Chen J, Mehta JL. Interaction of oxidized low-density lipoprotein and the renin-angiotensin system in coronary artery disease [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2006, **8** (2): 139-143.
- [2] 周志俊, 郭红梅, 胡云平, 等. 血清对氧磷酶活性测定方法研究[J]. *中国公共卫生*, 2000, **16** (4): 303-304.
- [3] 冯毅, 王积慧, 沈成兴, 等. 急性冠状动脉综合征患者血浆蛋白氧化产物升高的机制及意义[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (11): 983-985.
- [4] Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized low density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **41** (3): 360-370.
- [5] Holvoet P, Kritchewsky SB, Tracy RP, et al. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort [J]. *Diabetes*, 2004, **53** (4): 1068-073.
- [6] Hong SC, Zhao SP, Wu ZH. Effect of probucol on HDL metabolism and class B type I scavenger receptor (SR-BI) expression in the liver of hypercholesterolemic rabbits [J]. *Int J Cardiol*, 2007, **115** (1): 29-35.
- [7] 易光辉, 莫中成, 曾颖, 等. 动脉粥样硬化小型猪SR-BI和PPAR γ 表达的变化[J]. *中国应用生理学杂志*, 2006, **22** (4): 439-443.
- [8] Braun A, Zhang S, Miettinen HE, et al. Probucol prevents early coronary heart disease and death in the high-density lipoprotein receptor SR-BI/apolipoprotein E double knockout mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (12): 7283-288.
- [9] Regnstrom J, Walldius G, Carlson LA, et al. Effect of probucol treatment on the Susceptibility of low density lipoprotein isolated from hypercholesterolemic patients to become oxidatively modified in vitro [J]. *Atherosclerosis*, 1990, **82** (1-2): 43-51.
- [10] Sasahara M, Raines EW, Chait A, et al. Inhibition of hypercholesterolemia induce atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation [J]? *J Clin Invest*, 1994, **94** (1): 155-164.
- [11] Aarnisalo AA, Aalto-Setälä K, Holthofer H, et al. Puromycin induced lipid peroxidation in the cochlea of ApoE knockout mice [J]. *Acta Otolaryngol*, 2000, **543** (Suppl): 102-104.
- [12] Tward A, Xia YR, Wang XP, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice [J]. *Circulation*, 2002, **106** (4): 484-490.
- [13] Mackness B, Davies GK, Turkie W, et al. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (9): 1451-457.
- [14] Choy K, Beck K, Png FY, et al. Processes involved in the site-specific effect of probucol on atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (8): 1684-690.

(此文编辑 李小玲)