

云芝多糖对实验性动脉粥样硬化家兔血浆氧化型低密度脂蛋白含量的影响

欧阳谦 周玫 陈媛 阎道广 娄宁 刘尚喜

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

The effect of Polysaccharide krestin on plasma oxidized low density lipoprotein levels of experimental atherosclerotic rabbits

OUYANG Qian, ZHOU Mei, CHEN Yuan, YAN Dao-Guang, LOU Ning and LIU Shang-Xi

(Research Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT

Aim To observe the changes of plasma oxidized low density lipoprotein (LDL) levels of experimental atherosclerotic rabbits with or without polysaccharide krestin(PSK) treatment.

Methods All rabbits were fed standard chow supplemented with 1% cholesterol and 4% lard for 12 weeks, then injected intraperitoneally with 2.5% PSK (or saline) 3.5 ml. Plasma levels of LDL were measured by HOL2 and HOL5 monoclonal antibodies using ELISA method at 0, 4, 8 and 12 week after treatment. The atherosclerotic lesion areas were determined by computer.

Results We found that there is positive correlation between plasma LDL levels and the area of atherosclerotic plaque of atherosclerotic rabbits both in PSK treated group and in control group, detected either by HOL2 or by HOL5. Moreover, striking decrease of plasma levels after PSK treatment was found and there was significant decrease between two groups at 8 and 12 week ($P < 0.01$).

Conclusions The results suggested that LDL level in plasma detected by monoclonal antibodies is a good index to reflect the degree of atherosclerotic le-

sion. Furthermore, by using monoclonal antibodies, we present direct evidence that PSK can decrease plasma LDL levels, especially highly oxidized LDL, and find this effect is in accordance with the decrease of atherosclerotic plaque area.

KEY WORDS Polysaccharide krestin; Atherosclerosis; Oxidized low density lipoprotein; Monoclonal antibody

摘要 用本室制备的两株单克隆抗体(HOL2和HOL5)比较了经与未经云芝多糖治疗的实验性动脉粥样硬化家兔血浆氧化型低密度脂蛋白的含量。发现血浆氧化型低密度脂蛋白以低、中修饰度低密度脂蛋白为主;血浆氧化型低密度脂蛋白水平与主动脉粥样硬化斑块面积成正相关;云芝多糖能降低血浆氧化型低密度脂蛋白水平。提示利用单克隆抗体检测血浆氧化型低密度脂蛋白含量可初步预测动脉粥样硬化严重程度;云芝多糖降低血浆氧化型低密度脂蛋白水平可能是其减轻动脉粥样硬化斑块面积的机理之一。

关键词 云芝多糖; 动脉粥样硬化; 氧化型低密度脂蛋白; 单克隆抗体

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)与氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, LDL)密切相关已为越来越多的实验所证实。低密度脂蛋白受到氧化修饰以后,其结构和构象发生了很大改变,形成新的抗原决定簇并成为巨噬细胞清道夫受体的配体,被巨噬细胞大量吞噬,一系列的细胞毒效应促使巨噬细胞的泡沫样变性,并可能促进了泡沫细胞的坏死,最终导致动脉粥样硬化斑块的形成^[1]。最近的研究还揭示巨噬细胞泡沫样变性后对低密度脂蛋白(low density lipoprotein,

LDL)氧化修饰的能力增强,形成一种恶性循环^[2]。目前认为,防止 LDL 的氧化修饰应成为防治 As 的重要措施之一。我室以前的工作发现,从担子菌纲的 *Coriolus Versicolor* 中提取的蛋白多糖—云芝多糖(polysaccharide krestin, PSK)能保护巨噬细胞免受脂过氧化物损伤和防止 OLDL 所致泡沫样变,并能预防实验性动脉粥样硬化家兔斑块形成^[3~5]。为了进一步研究 PSK 的抗 As 作用,我们制作了实验性动脉粥样硬化家兔动物模型,在应用 PSK 治疗的同时利用我室制备的两株抗 OLDL 单克隆抗体比较了经与未经 PSK 治疗的动物血浆 OLDL 含量的区别。

1 材料和方法

1.1 动脉粥样硬化模型的制备

雄性新西兰白兔(本校实验动物中心提供)16只,体重 2.5 ± 0.3 kg,单笼喂养,在适应性喂养 20 天后喂以含 1%胆固醇、4%猪油的高脂高胆固醇饮食,12 周后停止,改喂普通饮食。随机分成两组,实验组动物在停高脂饮食当天开始,腹腔注射 2.5% PSK 3.5 ml (PSK 由本室提取),连续 4 天,其后每两天注射 1 次,共 40 次,对照组动物腹腔注射同体积生理盐水。

1.2 单克隆抗体的产生、纯化和鉴定

参照文献[6]介绍的方法,HOL2 和 HOL5 单克隆抗体杂交瘤细胞复苏后扩大培养, 3×10^4 接种于 BALB/C 小鼠腹腔,一周后抽腹水,用 50%硫酸铵粗提,DEAE-52 层析柱纯化,聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度。

1.3 血浆氧化型低密度脂蛋白检测

以腹腔注射 PSK 治疗开始为实验第一天,分别于实验的 0、4、8 和 12 周经兔耳中央动脉采血,肝素抗凝,双抗体夹心酶联免疫吸附法测定血浆中的 OLDL 含量。

1.4 主动脉粥样硬化斑块面积计算

在实验的第 12 周,股动脉放血处死全部动物,小心分离主动脉(主动脉弓到髂动脉分支处),纵向剖开,暴露动脉内膜,10%福尔马林固定,计算出每条主动脉 As 斑块面积百分数。

1.5 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用 Student-t 检验。

2 结果

2.1 HOL2 和 HOL5 单克隆抗体测定

如 Table 所示,无论是 HOL2 和 HOL5,在实验的第 0 周治疗组与对照组之间无显著差别,对照组 HOL2 水平在停高脂饮食后继续升高,第 8 周达到最高,为 0.448 ± 0.062 ,第 12 周迅速降为 0.224 ± 0.054 ,实验组从第 4 周起即较对照组低,第 8 周两组之间差别最大,第 12 周仍有显著意义($P < 0.01$);而对 HOL5,对照组在停高脂饮食后变动不大,而在实验组从第 4 周起即明显下降,第 4、8、12 周与对照组相比均有明显差异($P < 0.01$)。

Table Comprison of plasma OLDL levels detected by HOL2 and HOL5 between PSK group and control group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$).

Time (week)	HOL2		HOL5	
	Control	PSK	Control	PSK
0	0.283 ± 0.048	0.316 ± 0.052	0.209 ± 0.052	0.203 ± 0.025
4	0.444 ± 0.158	0.345 ± 0.089	0.204 ± 0.054	0.106 ± 0.065^b
8	0.448 ± 0.062	0.154 ± 0.056^b	0.237 ± 0.084	0.129 ± 0.070^a
12	0.224 ± 0.054	0.127 ± 0.048^b	0.213 ± 0.065	0.111 ± 0.040^b

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, compared with control group.

2.2 主动脉斑块面积百分数

在 PSK 治疗组为 $26.7\% \pm 13.7\%$,较非 PSK 治疗组($50.4\% \pm 26.4\%$)明显减少($P < 0.05$)。同时将实验组与对照组全部 16 只动物第 12 周血浆 HOL2、HOL5 之光密度值与同一动物主动脉斑块面积进行直线相关分析处理,如 Figure 所示,HOL2 光密度值与斑块面积的相关系数为 0.691 ($P < 0.01$),HOL5 为 0.751 ($P < 0.01$),均为正相关。

3 讨论

低密度脂蛋白(LDL)受到氧化修饰以后,其结构发生了改变,蛋白质在 LDL 的表面折叠,脂相物理性质改变,蛋白质分解,载脂蛋白 B 构象发生改变,在 LDL 表面形成新的抗原^[7]。HOL2、HOL5 就是本室自己制备的能特

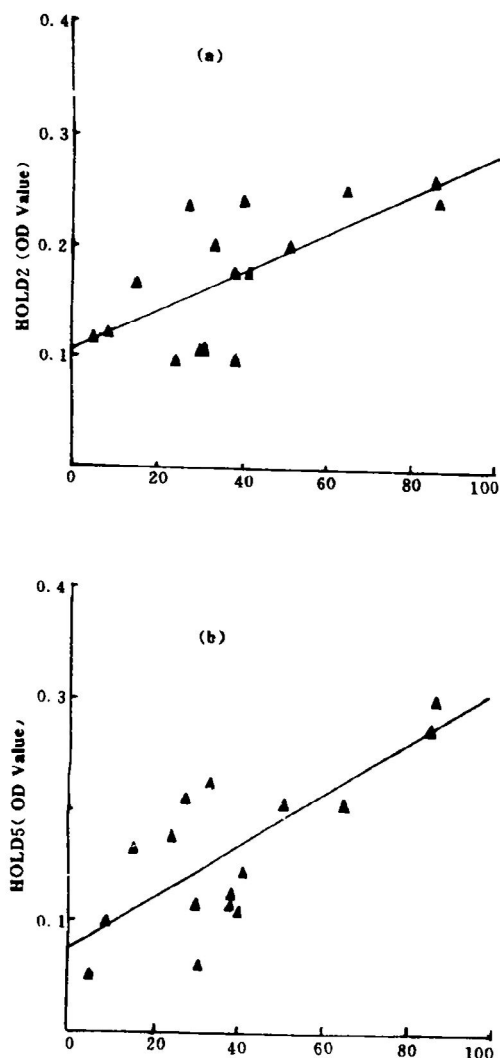


Figure Dependence of the levels of monoclonal antibodies HOL2 (a) and HOL5 (b) on the percentage of atherosclerotic plaque area.

异性识别 OLDL 的两株单克隆抗体,而且这两株单克隆抗体本身还存在差异,阎道广等^[6]运用单克隆抗体抑制试验发现,对于 HOL2,轻、中度修饰的 OLDL 有明显的抑制作用,随修饰程度的增加抑制作用减弱,HOL5 则相反,轻度修饰的 OLDL 无竞争性抑制作用,而修饰程度

高的 OLDL 则有明显抑制作用。其抑制程度与修饰程度成正比例关系,即说明 HOL5 主要反映血浆较高修饰度的 OLDL 水平,而 HOL2 则反映血浆轻、中度修饰的 OLDL 水平。从本实验我们看到,无论对照组或实验组,在高胆固醇饮食导致的实验性 As 家兔模型,其 HOL2 值均较 HOL5 高,提示在实验性 As 家兔,尽管 LDL 极易被氧化修饰,但血浆中仍以轻、中度修饰的 OLDL 为主,这是因为血浆及 LDL 中存在一定量的内源性抗氧化剂,如 α -生育酚、维生素 C 等,能防止 LDL 的过度氧化^[8]。

氧化型低密度脂蛋白(OLDL)能通过多种途径影响 As 的发生发展,包括增强巨噬细胞的摄取功能导致细胞内胆固醇酯聚积;增强循环血液中单核细胞的趋化性;抑制组织巨噬细胞的迁移;具有细胞毒性;改变邻近细胞的基因表达包括诱导单核细胞趋化因子-1 和集落刺激因子表达;OLDL 本身具有免疫原性能诱导自身抗体形成;病理性改变凝血途径及冠脉血管的舒张性等^[9]。因此,对血浆中 OLDL 含量的检测很有意义,本实验通过直线相关分析表明利用单克隆抗体测量的血浆 OLDL 水平与动脉粥样硬化斑块面积具有较好的相关性,表明血浆 OLDL 水平是一个能够反映动脉粥样硬化损伤程度的指标,提示可利用单克隆抗体检测血浆 OLDL 水平来初步预测动脉粥样硬化的严重程度。

Kuzuya 等^[10]认为 OLDL 的毒性效应是因为其载有脂过氧化物,能均裂产生脂过氧基和脂氧基,引发细胞膜脂质双分子层的脂过氧化损伤,进而引起泡沫细胞形成和动脉粥样硬化。我们以前的工作发现 PSK 能增强巨噬细胞的免疫功能和呼吸爆发功能^[4],提高巨噬细胞内抗氧化酶—硒谷胱甘肽过氧化物酶(selenium dependent glutathione peroxidase, Se-GP)活性和增强 Se-GP 基因表达,提高巨噬细胞抗活性氧损伤的能力^[5]。动物实验发现腹腔注射 PSK 不仅能提高小鼠心、肝、脾、肾组织和红细胞 Se-GP 活性并降低组织中脂过氧化物含量^[11],还能在不降低血脂的同时预防实验性动

脉粥样硬化家兔粥样斑块形成^[3],这些作用提示 PSK 能提高机体抗 OLDL 引发的脂质过氧化损伤的能力。本实验以抗 OLDL 单克隆抗体为指标,对已形成 As 斑块的实验性高胆固醇血症家兔用 PSK 治疗后,发现其血浆轻、中、重度修饰 OLDL 水平显著降低,直接证实 PSK 能降低血浆 OLDL 水平,尤其是重度修饰 OLDL 水平。基于体内 OLDL 的清除主要通过巨噬细胞完成,结合我室以往的工作,进一步证实 PSK 能提高巨噬细胞清除 OLDL 的能力,减少 OLDL 的毒性效应,这可能是 PSK 能减少实验性 As 家兔斑块面积的重要原因之一。

参考文献

- 1 Liu SX, Zhou M, Chen Y, et al. Lipoperoxidative injury to macrophages by oxidatively modified low density lipoprotein may play an important role in foam cell formation. *Atherosclerosis*, 1996, **121**: 55~61.
- 2 Bolten EJ, Jessup W, Stanley K, et al. Enhanced LDL oxidation by murine macrophage foam cells and their failure to secrete nitric oxide. *Atherosclerosis*, 1994, **106**: 213~223.
- 3 娄宁, 陈瑗, 周玫, 等. 云芝多糖对实验性动脉粥样硬化家兔脂质过氧化损伤的保护作用. 第一军医大学学报, 1995, **15**(2): 107~110.
- 4 李军, 周玫, 陈瑗. 活性氧对巨噬细胞呼吸爆发的影响及云芝多糖的保护作用. 生物化学与生物物理进展, 1992, **19**(5): 361~365.
- 5 陈瑗, 周玫. 云芝多糖防止氧化修饰低密度脂蛋白所致的巨噬细胞泡沫样变和预防实验性动脉粥样硬化形成. 中国动脉硬化杂志, 1995, **3**(2): 126~129.
- 6 阎道广, 周玫, 陈瑗, 等. 抗人氧化修饰低密度脂蛋白单克隆抗体的制备和生物学物质. 第一军医大学学报, 1995, **15**(2): 99~101.
- 7 陈瑗, 周玫. LDL 氧化修饰和氧化修饰 LDL 的组成和结构变化. 生物物理学报, 1993, **9**(2): 332.
- 8 Illingworth DR. The potential role of antioxidants in the prevention of atherosclerosis. *J Nutr Sci Vitaminol Tokyo*, 1993, **39**(Suppl): S43~47.
- 9 Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 1785~792.
- 10 Kuzaya M, Naito M, Funaki C, et al. Lipid peroxide and transition metals are required for the toxicity of oxidized low density lipoprotein to cultured endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1096**: 155~161.
- 11 娄宁, 陈瑗, 周玫. 云芝多糖对小鼠心、肝、脾、肾和红细胞抗氧化能力的影响. 中国药理学通报, 1996, **5** (待发表)

(1996-07-05 收到, 1996-09-06 修回)