

研究工作

维生素 C 抑制低密度脂蛋白的氧化修饰*

王东晓 周 玫 陈 媛

(第一军医大学脂质过氧化研究组, 广州 510515)

提 要

研究了不同浓度维生素 C 对 Cu^{2+} 诱导的低密度脂蛋白 (LDL) 氧化修饰的抑制作用, 通过测定硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS), 荧光物质 (lipofusion) 扫描及琼脂糖电泳, 显示一定浓度的维生素 C 在 24h 内对 LDL 的氧化修饰具有抑制作用, 并呈现量效效应。提示维生素 C 作为体内存在的一种抗氧化物, 可抑制 LDL 的氧化修饰, 从而在防治动脉粥样硬化的发生具有一定意义。

关键词 低密度脂蛋白, 氧化修饰, Cu^{2+} , 维生素 C, 动脉粥样硬化

血浆 LDL 水平升高是动脉粥样硬化的一个重要危险因素。正常情况下 LDL 是通过 LDL 受体介导进入细胞参加代谢。由于 LDL 受体受细胞内胆固醇含量的调节, 不易引起胆固醇的聚集, 而氧化修饰 LDL (OX-LDL) 通过清道夫受体途径进入细胞, 不受细胞内胆固醇含量的调控, 是引起细胞内脂质聚集和泡沫细胞形成的主要原因^[1]。由细胞、 Cu^{2+} 或 Fe^{2+} 所介导的 LDL 的氧化修饰, 主要是由氧自由基所介导的脂质过氧化反应, OX-LDL 通过以下几个方面促进动脉粥样硬化的发生与发展。a. 易于被巨噬细胞上清道夫受体识别、摄取, 促使泡沫细胞形成。b. 具有细胞毒作用, 可损伤内皮细胞。c. 促进循环单核细胞进入内膜下空间。d. 促使巨噬细胞在内膜下停留。动脉粥样硬化与机体内氧化修饰的 LDL 有关^[2], 因此寻找有效抑制 LDL 发生氧化修饰的药物, 对于动脉粥样硬化的防治, 是有重要意义的。维生素 C 作为体内的一种有效的抗氧化物, 近年研究表明, 血浆中, 无论是暴露在氧自由基引发剂, 还是在多形核白细胞产生的氧化物作用下, 只有当维生素 C 完全消耗以后, 脂质过氧化才会发生^[3]。而维生素 C 在抗 LDL 氧化修饰方

面的作用还未受到足够的注意。本研究的目的试图揭示它对 LDL 氧化修饰的抑制作用。

1 材 料 和 方 法

1.1 LDL 的分离和提取

采用一次性密度梯度离心法提取^[4]。分离的 LDL 在含有 EDTA (0.1%) 和 NaN_3 (0.01%) 的磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中透析 48h (4°C)。然后超滤除菌置 4°C 冰箱内保存。用 Lowry 法测定 LDL 蛋白含量^[5]。

1.2 LDL 的修饰

上述 LDL 在无 EDTA 的磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中, 4°C 透析 24h, 除去 EDTA。用磷酸缓冲液 (pH 7.4) 调 LDL 浓度为每毫升含 1mg 蛋白 (1mg/ml)。加入硫酸铜, 终浓度为 $3\mu\text{mol/L}$ ^[6], 置 37°C 水浴 3, 6, 12, 24h。修饰后 LDL 加 EDTA 至终浓度 1% 以终止修饰。维生素 C (50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$) 在加硫酸铜前加入。

1.3 硫代巴比妥酸反应物质的测定

采用改良的 Schuh 方法测定^[7], 取终止修

* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期: 1991-11-05 修回日期: 1992-01-10

饰的 LDL 100 μ l, 加 50% 三氯醋酸 1ml, 再加 0.67% 硫代巴比妥酸 1ml, 混匀、置 100 $^{\circ}$ C 水浴 45min, 冷却后, 3000r/min 离心 15min, 上清液在 721 型分光光度计上比色, 选择波长 532 nm, 测 A 值, 用四乙氧基丙烷作标准, 结果用每毫克 LDL 蛋白量中含 nmol MDA(nmol/mg) 表示。

1.4 琼脂糖电泳

采用常规方法进行。

1.5 荧光物质扫描

取样品 50 μ l 加入 2.5ml 双蒸水, 用岛津 RF-540 荧光分光光度计, 在激发光波长 360nm 处扫描。

2 结果

2.1 LDL 与 3 μ mol/L Cu²⁺ 温育下 LDL 氧化修饰的变化

2.1.1 硫代巴比妥酸反应物质的生成 无

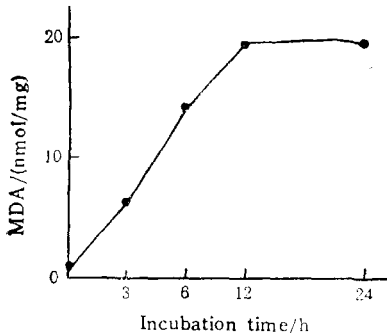


图1 LDL 修饰过程中 TBARS 的动力学变化
Fig. 1 Kinetics of the increase of TBARS during modification of LDL

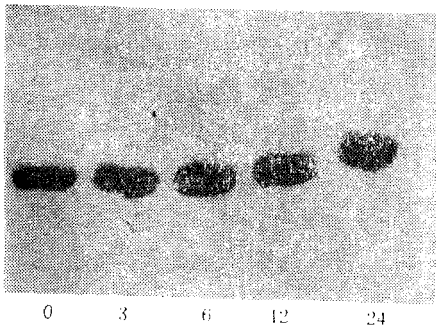


图2 LDL 修饰不同时间电泳迁移变化
Fig. 2 The patterns of agarose gel electrophoresis of LDL after Cu²⁺ modification with different length of time

EDTA 的 LDL (1mg/ml) 在 Cu²⁺(3 μ mol/L) 存在下 37 $^{\circ}$ C 水浴 3h, 可见原有黄色消失, 硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS) 明显增高, 于 12 h 达最高峰, 24h TBARS 值不再升高(见图 1)。

2.1.2 电泳迁移的变化 修饰后的 LDL, 电泳迁移加快, 迁移距离随修饰时间 (0, 3, 6, 12, 24h) 增加而增加(见图 2)。

2.1.3 荧光物质 (lipofuscin) 的生成

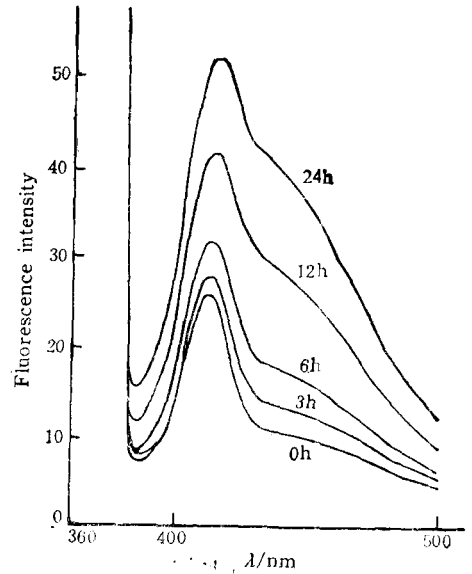


图3 LDL 修饰不同时间的发射荧光的变七
Fig. 3 Emission fluorescence spectra at 360nm excitation of LDL after Cu²⁺ modification with different length of time

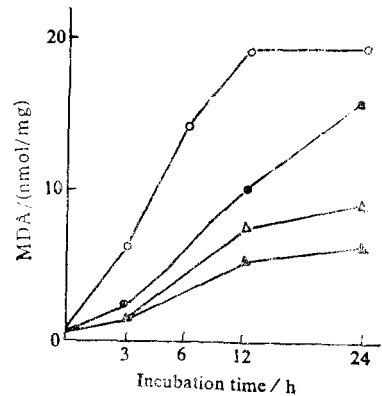


图4 不同浓度维生素 C 对 LDL 氧化修饰的影响
Fig. 4 Effect of different concentrations of vitamin C on the oxidative modification of LDL
—○—0; —●—50 μ mol/L; —△—100 μ mol/L; —▲—200 μ mol/L.

Lipofuscin 是脂质过氧化降解产物(醛类物质)与蛋白游离氨基结合后形成的希夫氏碱(Shiff's base),它可在特定的激发波长(360 nm)下产生荧光,在此激发光处扫描,在410 nm处有一较强荧光峰,其荧光强度随修饰时间延长而增高,有明显的时效关系(见图3)。

2.2 不同浓度维生素C对Cu²⁺引发的LDL氧化修饰的影响

在Cu²⁺与LDL温育之前预先加入不同浓度的维生素C,结果显示,在不同时间与未加

入维生素C的对照组相比,TBARS值都明显降低,降低程度随维生素C浓度增加而增加(见图4)。

在12h,与空白对照(不加维生素C)相比维生素C使TBARS的生成量分别降低49.2%(维生素C 50μmol/L),63.5%(维生素C 100μmol/L),73.6%(维生素C 200μmol/L)(见图5a)。琼脂糖电泳迁移明显降低(见图5b)。lipofuscin扫描,在410nm处的荧光峰也明显被维生素C所抑制(见图5c)。

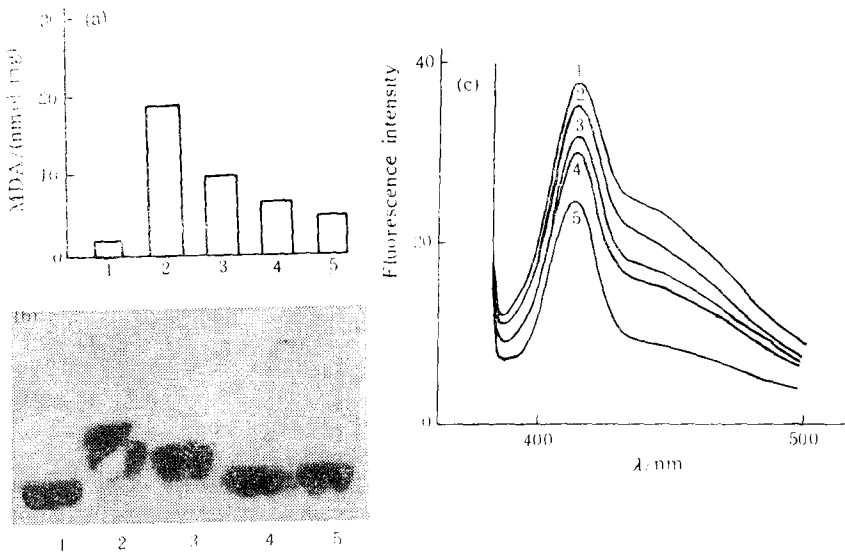


图5 不同浓度维生素C在LDL氧化修饰12h后的影响

Fig. 5 Effect of different concentration of vitamin C on 12h oxidative modification of LDL

(a) 硫代巴比妥酸反应物(TBARS); (b) 琼脂糖电泳; (c) 荧光扫描
 (a) TBARS; (b) Agarose gel electrophoresis; (c) Scanning spectra of emission fluorescence
 1: 正常对照 LDL (N-LDL); 2-5: LDL + Cu²⁺ + VitC (0,50,100,200μmol/L)

3 讨论

近年来氧化修饰的LDL在动脉粥样硬化的发生和发展中的作用日益被人们所重视^[1]。Cu²⁺所诱导的LDL的氧化修饰,是通过自由基引发的脂质过氧化反应,在这个过程中,生成了大量的TBARS,研究结果显示在12h达到最高峰值,24h TBARS值不再增加。反映LDL脂质过氧化反应在12h可能已达到完全。在脂质过氧化反应中,磷脂水解,载脂蛋白B降解等变化^[7],使LDL结构发生变化,生成的醛类物

质与LDL蛋白上的ε-氨基结合导致其电负性增加,是琼脂糖电泳迁移加快的一个原因,也是被巨噬细胞清道夫受体所识别而引起大量吞噬形成泡沫细胞的原因^[8]。荧光物质的形成,也是由于醛类物质与蛋白游离氨基结合形成共轭二烯的产物。LDL修饰所发生的理化性质的改变,正是其具有动脉粥样硬化促进作用的基础。

维生素C作为体内存在的一个抗氧化剂,在许多方面都表现出它有力的抗氧化功能^[9,10]。有人报道,血浆维生素C消耗完以前,血浆不发

生脂质过氧化反应。最近有文献报道生理浓度的维生素 C ($40\mu\text{mol/L}$), 在 24h 内, 可以完全抑制 LDL 的氧化修饰^[11]。而我们的观察显示, 在 12h, $50\mu\text{mol/L}$ 浓度的维生素 C, 只能抑制 49.2% TBARS 的生成。这种差异可能是, LDL 实验浓度的不同, 我们所选择的 LDL 浓度为 1mg/ml , 前者仅为 $200\mu\text{g/ml}$ 。但所观察到的对 LDL 氧化修饰的抑制作用是一致的。

维生素 C 在体内主要起还原剂的作用是参与胶原合成的脯氨酸羟化酶及赖氨酸羟化酶的辅助因子。它的抗氧化作用表现在可以与 O_2^- , HO_2 , 甚至与 $\cdot\text{OH}$ 迅速反应生成半脱氢抗坏血酸, 以清除氧自由基。维生素 C 还可与维生素 E 偶联, 使 α -生育酚自由基还原成 α -生育酚, 恢复维生素 E 的抗氧化活性^[9]。这可能是维生素 C 能抑制 LDL 氧化修饰的原因。已知维生素 C 在血浆内的浓度为 $25-80\mu\text{mol/L}$ ^[12], 虽然没有资料说明维生素 C 在血管壁中的浓度, 但至少比血浆内浓度高^[12]。因此维生素 C 在体内是一个防止 LDL 氧化修饰的有意义的抗氧化剂。

参 考 文 献

1 Brown M S, Goldstein J L. Lipoprotein metabolism in

- the macrophage: implication for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem*, 1983; 52: 223
- 2 Steinberg D, Parthasarathy S, Carew T E *et al*. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 1989; 320: 915.
- 3 Frei B, Stocker R, Ames B N. Antioxidant defense and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 9748
- 4 张林华, 刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白, 生物化学与生物物理学报, 1989; 21: 257
- 5 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al*. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 1951; 193: 265
- 6 Barnhart R L, Busch S T, Jackson R L. Concentration-dependent antioxidant activity of probucol in low density lipoproteins in vitro: probucol degradation precedes lipoprotein oxidation. *J Lipid Res*, 1989; 30: 1703
- 7 Schuh J, Fairclough Jr G F, Haschemeyer R H. Oxygen mediated heterogeneity of apo low density lipoprotein, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75: 3173
- 8 Steinbercher U P, Wiltzum J L, Parthasarathy S *et al*. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL, *Arteriosclerosis*, 1987; 7: 135
- 9 Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids*, 1987; 44: 227
- 10 Wayner D D M, Burton G W, Ingold K U. The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration dependent. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 884: 119
- 11 Jialal I, Vega G L, Grundy S M. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of LDL. *Atherosclerosis*, 1990; 82: 185
- 12 Hornig D. Distribution of ascorbic acid metabolites and analogues in man and animals. *Ann N Y Acad Sci*, 1975; 258: 103

Vitamine C Inhibit the Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein

Wang Dongxiao Zhou Mei Chen Yuan

(Research group of lipid peroxidative damage, First medicine College of PLA, Guangzhou 510515)

Abstract

Oxidatively modification of low density lipoprotein (LDL) could contribute to the atherosclerotic process by its cytotoxic effect, e. g. being uptaked by the macrophage scavenger receptor, accelerating the foam cell formation and the influencing on monocyte and macrophage mobility. The aim of present study is to examine the effect of different concentrations of vitamin C on Cu^{2+} -induced oxidative modification of LDL. As evidenced by the lipid peroxide content, lipofusion and the electrophoretic mobility, vitamin C could inhibit the oxidative modification of LDL for 24h. The extent of the inhibition depended on vitamin C concentration. These findings indicate that vitamin C is a potent antio-

xidant *in vivo*, it can protect LDL from oxidative modification. Hence, vitamine C can prevent and treat atherosclerosis.

Key words LDL oxidative modification, Cu²⁺, vitamine C, atherosclerosis

苄基异喹啉类化合物 D₂₀ 抑制钙调素激活磷酸二酯酶的研究*

张虞安 胡卓逸 赵 焯**

(中国药科大学生化研究室,南京 210009)

蔡惠民

(中国药科大学药化研究室)

提 要

苄基异喹啉化合物是一类钙调素拮抗剂。对新合成的双苄基异喹啉化合物 D₂₀ 对钙调素依赖的磷酸二酯酶的抑制作用进行了研究, IC₅₀ = 5 μmol/L, 表明其拮抗作用大于三氟啦嗪, 是强的拮抗剂。荧光分析表明, 钙调素与化合物 D₂₀ 的结合常数为 2.64 (μmol/L)⁻¹, 一个化合物 D₂₀ 分子与两个钙调素分子结合, 并显示了结合方向性及空间位阻影响。

关键词 钙调素, 磷酸二酯酶, 拮抗剂, 苄基异喹啉类化合物 D₂₀, Scatchard 分析

钙调素 (calmodulin CaM) 是 70 年代初发现的耐热钙结合蛋白, 广布于所有真核细胞, Ca²⁺ 存在下形成 Ca²⁺-CaM 复合物活化许多重要酶类而调节细胞功能。

CaM 拮抗剂是研究 CaM 生理功能的良好工具, 是探讨药物作用机理、开发新药的重要途径。如 CaM 拮抗剂的降压和扩张冠脉作用治疗心脑血管疾病^[1]。本文研究了半合成苄基异喹啉类化合物 D₂₀ (化合物 D₂₀) 拮抗 CaM 对磷酸二酯酶的激活作用, 并用荧光分析法研究了化合物 D₂₀ 与 CaM 间的相互作用。

1 材 料 和 方 法

1.1 材 料

三羟甲基氨基甲烷 Tris, 生化试剂, 常熟福山生化试剂厂; 乙二胺四乙酸 (EDTA), 分析纯, 上海试剂二厂; 乙二醇双(α-氨基乙基)醚四乙酸 (EGTA), 分析纯, 湖州生物化学厂; 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 环腺苷磷酸(cAMP)、牛血清白蛋白 (BSA) 均为生化试剂, 上海生化所

产品; 蝮蛇毒, 浙江金华地区产; 三氟啦嗪 (TFP), 上海黄河制药厂; 化合物 D₂₀, 本校药化研究室合成; Phenyl-Sepharose CL-4B 为 Pharmacia 公司产品; DEAE-Cellulose 52 为 Whatman Company 产品; 其它试剂为国产分析纯。荧光测定用 HITACHI MPF-4 荧光分光光度计。

1.2 方 法

1.2.1 猪脑 CaM 制备^[2]: 取 350g 去脂肪及血管的新鲜猪脑组织, 加 2 倍体积缓冲液 A (0.05mol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L 巯基乙醇, 0.5mmol/L PMSF, pH 7.5) 匀浆, 离心(10000 × g) 1h, 取上清, 沉淀再用缓冲液 A 提取一次, 合并上清, 四层纱布滤去脂肪, 滤液用 6mol/L HAc 调 pH 至 4.3, 搅拌 10min, 离心 (10000 × g) 1h, 弃去上清, 沉淀溶于小体积缓冲液 A 中, 用 Tris 调 pH 7.5, 搅

* 国家自然科学基金资助项目。

** 九一届本科实习生。

收稿日期: 1991-09-25 修回日期: 1992-02-22