

橙皮苷与芦丁体外抗高密度脂蛋白氧化修饰的作用

李琴山¹, 娄桂予², 钱民章¹

(1. 遵义医学院生化教研室, 贵州 遵义 563003; 2. 第三军医大学生化教研室, 重庆 400038)

[摘要] 目的: 探讨橙皮苷、芦丁体外抗高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 氧化的作用。方法: 采用一次性密度梯度超速离心方法分离血清 HDL, Cu^{2+} 诱导 HDL 氧化, 检测反应体系中的丙二醛 (malondialdehyde, MDA), 观察橙皮苷、芦丁对 HDL 氧化的抑制作用。结果: 橙皮苷、芦丁对 Cu^{2+} 诱导的 HDL 氧化有明显的抑制作用, 且呈剂量依赖关系。结论: 橙皮苷、芦丁体外抗 HDL 的氧化作用是它们抗动脉粥样硬化的机制之一。

[关键词] 橙皮苷; 芦丁; 高密度脂蛋白; 动脉粥样硬化

[中图分类号] R285 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2004)02-0115-02

Effect of hesperidin and rutin on oxidative modification of high density lipoprotein in vitro

LI Qin-Shan¹, LOU Gui-Yu², QIAN Min-Zhang¹

(1. Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province 563003, China; 2. Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of hesperidin and rutin on oxidative modification of high density lipoprotein (HDL) in vitro. Methods: HDL was isolated from healthy human plasma by sequential ultracentrifugation, and was oxidized by copper ions. The inhibitory effects of hesperidin and rutin on HDL oxidative modification were valued by the formation of malondialdehyde (MDA). Results: Hesperidin and rutin significantly inhibited copper-induced oxidation of HDL in a dose-dependent manner. Conclusion: Both hesperidin and rutin can prevent HDL from copper-induced oxidative modification in vitro. This result suggests that they might have antiatherogenic effect.

KEY WORDS hesperidin; rutin; high density lipoproteins; atherosclerosis

J Chin Integr Med, 2004, 2(2): 115-116, 119

近年来研究表明, 高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 被氧化形成氧化型高密度脂蛋白 (ox-HDL) 后, 其抗低密度脂蛋白氧化能力丧失, 介导巨噬细胞胆固醇流出能力显著降低, 并且转运胆固醇进入肝脏的能力也显著降低, 因此 HDL 氧化修饰后其抗动脉粥样硬化的能力显著减弱^[1]。橙皮苷、芦丁是两种结构相似的黄酮类化合物, 具有清除羟自由基^[2]和单线态氧^[3]、抗生物膜脂质氧化等作用, 我们的研究已证明二者能减轻家兔实验性动脉粥样硬化病变^[4], 但其机制有待探讨。本研究旨在观察二者能否在体外抑制 HDL 的氧化, 为深入研究他们防治动脉粥样硬化的机制提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 橙皮苷、芦丁、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (购于南京建成公司), 721 型可见分光光度计 (上海第三分析仪器厂产品), 超速离心机 (HITACHI, 55P-72 型), THZ-95 型恒温振荡器 (江苏省太仓市医疗仪器厂) 等, 其余试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 HDL 的制备 参照张林华等^[5]一次性密度梯度超速离心法分离人血浆脂蛋白, 按改良 Lowry 比色法测定 HDL 的含量。

1.2.2 ox-HDL 的制备 将终浓度为 50 mg/L 的 HDL 和终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuSO_4 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中温育 24 h^[6]。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳鉴定 HDL 和 ox-HDL 用苏丹黑 B 预染血清, 分离纯化的 HDL 及孵育 24 h 后的 ox-HDL, 0.5% 琼脂糖凝胶电泳, 70 ~80 V, 电泳 20 ~30 min^[7]。

1.2.4 不同剂量橙皮苷、芦丁体外抗 HDL 氧化的作用 (1) HDL 组: HDL + PBS (磷酸盐缓冲液); (2) ox-HDL 组: HDL + PBS + Cu^{2+} ; (3) 橙皮苷组: HDL + PBS + Cu^{2+} + 橙皮苷 (终浓度分别为 3、9、27、80、160 mg/L); (4) 芦丁组: HDL + PBS + Cu^{2+} + 芦丁 (终浓度分别为 3、9、27、80、160 mg/L), 总反

[基金项目] 贵州省省长优秀人才基金资助项目 (No. C-194)

[作者简介] 李琴山 (1976-), 男, 助教, 在读硕士研究生。

Correspondence to: LI Qin-Shan. E-mail: liqinshan333@yahoo.com.cn

应体积为 5 ml, HDL 终浓度为 50 mg/L, CuSO₄ 终浓度为 10 μmol/L, 孵育 24 h。

1.2.5 各组 MDA 检测 按试剂盒说明书操作。

1.3 统计学方法 实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, P < 0.05 示有显著性差异。

2 结果

2.1 天然和氧化修饰型高密度脂蛋白琼脂糖凝胶电泳鉴定 HDL 与正常血清的 β-脂蛋白相对应, 而 ox-HDL 因所含电荷增多, 电泳迁移率较天然 HDL 大, 表明本研究所用 HDL 和 ox-HDL 均符合要求。见图 1。

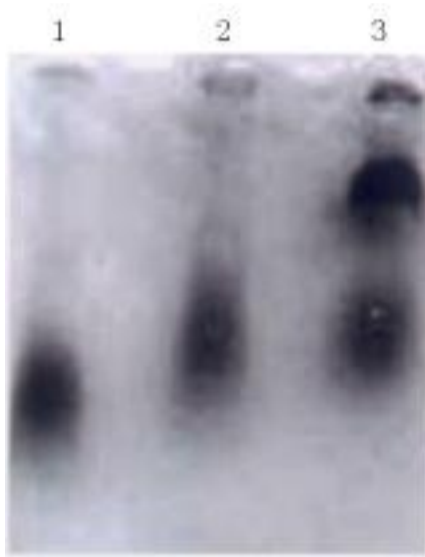


图 1 天然和氧化修饰型高密度脂蛋白琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of HDL samples

1: ox-HDL; 2: HDL; 3: Normal serum

2.2 Cu²⁺ 诱导的 HDL 体外氧化结果 ox-HDL 组和 HDL 组 MDA 含量分别为(29.54 ± 2.27) μmol/L 和(4.36 ± 2.23) μmol/L, ox-HDL 组较 HDL 组有显著升高(P < 0.01), 表明 HDL 发生了明显氧化修饰。见表 1。

表 1 不同剂量橙皮苷对 Cu²⁺ 诱导的 HDL 氧化反应中 MDA 的影响

Tab 1 Effect of hesperidin on MDA in Cu²⁺ induced oxidation of HDL

Group	n	MDA(μmol/L)
HDL	3	4.36 ± 2.23
ox-HDL	3	29.54 ± 2.27**
Hesperidin(3 mg/L)	3	25.00 ± 0.08
Hesperidin(9 mg/L)	3	17.17 ± 1.16
Hesperidin(27 mg/L)	3	12.12 ± 1.31
Hesperidin(80 mg/L)	3	6.06 ± 1.53
Hesperidin(160 mg/L)	3	4.51 ± 2.19

** P < 0.01, vs HDL; P < 0.05, P < 0.01, vs ox-HDL

2.3 不同剂量橙皮苷、芦丁对 HDL 氧化反应中 MDA 的影响

2.3.1 不同剂量橙皮苷对 Cu²⁺ 诱导的 HDL 氧化反应中 MDA 的影响 橙皮苷组与 ox-HDL 组相比, MDA 含量显著下降, P < 0.05 或 < 0.01, 且随着剂量的增加, 抗氧化作用呈剂量依赖关系。见表 1。

2.3.2 不同剂量芦丁对 Cu²⁺ 诱导的 HDL 氧化反应中 MDA 的影响 与 ox-HDL 组相比, 3 mg/L 的芦丁组无明显抗脂质氧化作用(P > 0.05), 当浓度达到 9 mg/L 时, MDA 含量显著下降, 且随着剂量的增加, 抗氧化作用呈剂量依赖关系(P < 0.01)。见表 2。

表 2 不同剂量芦丁对 Cu²⁺ 诱导的 HDL 氧化反应中 MDA 的影响

Tab 2 Effect of rutin on MDA in Cu²⁺ induced oxidation of HDL

Group	n	MDA(μmol/L)
HDL	3	4.36 ± 2.23
ox-HDL	3	29.54 ± 2.27**
Hesperidin(3 mg/L)	3	27.27 ± 2.18
Hesperidin(9 mg/L)	3	19.69 ± 1.36
Hesperidin(27 mg/L)	3	15.15 ± 2.62
Hesperidin(80 mg/L)	3	9.85 ± 1.39
Hesperidin(160 mg/L)	3	6.06 ± 1.25

** P < 0.01, vs HDL; P < 0.01, vs ox-HDL

3 讨论

近年来国内外研究发现, HDL 同低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) 一样, 能被体内多种因素氧化修饰, 而且一旦形成 ox-HDL, 不但丧失其抗动脉粥样硬化作用, 反而有致动脉粥样硬化作用。在实验性高胆固醇血症家兔及内源性高甘油三酯患者体内, 不仅存在 ox-LDL, 也存在 ox-HDL。因此, 抑制 HDL 的氧化对防治动脉粥样硬化有重要意义。

本实验采用一次性密度梯度超速离心法分离人血清 HDL 后, 用 Cu²⁺ 与 HDL 共孵育 24 h, 测定琼脂糖凝胶电泳相对迁移率及反应体系中产生的 MDA 量的变化, 鉴定 HDL 发生了明显的氧化修饰, 在此基础上, 在反应体系中分别加入不同剂量的橙皮苷和芦丁两种结构相似的黄酮类化合物共孵育, 结果显示橙皮苷在 3 mg/L 和芦丁在 9 mg/L 浓度下均能在体外抑制 Cu²⁺ 诱导的 HDL 的氧化, 此条件下反应体系中产生的 MDA 量与无橙皮苷、芦丁组比较, 差异有显著性, 且抑制率呈剂量依赖关系。相同剂量的橙皮苷组与芦丁组之间比较, 橙皮苷抑制率强于芦丁, 差异有显著性。

(下转第 119 页)

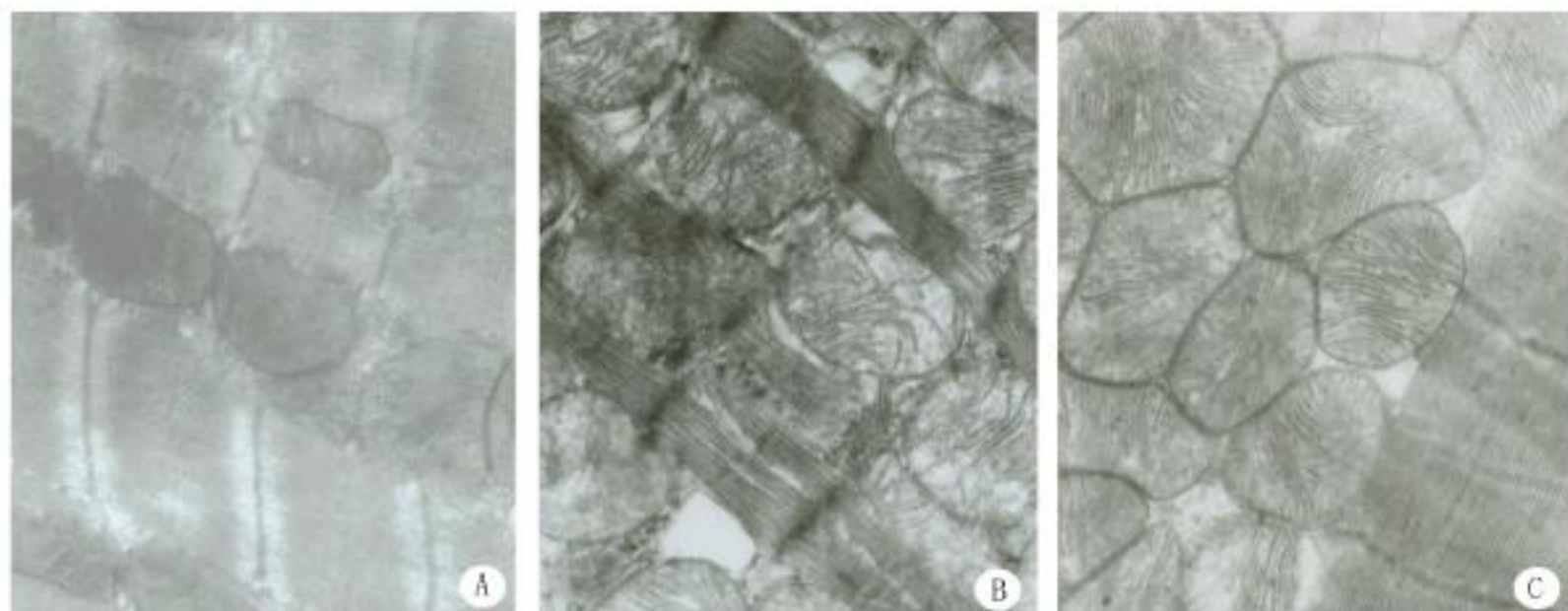


图 1 心肌超微结构

Fig 1 Ultrastructure of myocardium

A: Control rat(× 17 K); B: Hypoxic rat(× 20 K); C: Breviscapus Injection treated hypoxic rat(× 20 K)

有报道认为, NO 对低氧心肌损伤具有保护作用^[5,6]。本实验发现:与对照组比较,低氧组心肌 NOS 活性明显降低,血浆 NO 含量明显降低(P 分别 <0.01、0.05);与低氧组比较,灯盏花组心肌 NOS 活性升高(P <0.05),说明灯盏花注射液通过增加心肌组织 NOS 活性,促进 NO 的局部释放而起到保护心肌的作用。灯盏花组血浆 NO 含量较低氧组虽然未见统计学意义(P = 0.077),但也有明显升高的趋势。所以,灯盏花注射液对慢性低氧性心肌损伤具有保护作用,其机制与灯盏花注射液抵抗氧自由基的损伤,增强抗氧化系统的活性,减少钙超载,调节 NO 含量有关。

[参考文献]

- 1 蔡永敏.最新中药药理和临床[M].北京:华夏出版社,1999.572-574.
- 2 王丽娟,王勇,邱丽萍,等.灯盏花素对豚鼠单一心室肌细胞 I_{Ca} 的抑制作用[J].中国现代应用药学杂志,2000,17(4):272-274.
- 3 谢于鹏,王辰,陈少贤.灯盏花注射液对大鼠低氧性肺动脉高压作用的实验研究[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(3):173-174.
- 4 宋学立,钱令嘉.氧化应激和心肌损伤[J].国外医学·卫生学,2000,27(1):30-32.
- 5 周玉峰,黄梅,谢增柱.低氧大鼠冠状血管储备的变化及一氧化氮和内皮素-1 的调节作用[J].中国病理生理杂志,2001,17(3):255-258.
- 6 张峰,曹云新,罗晓星.缺氧诱导的心肌细胞凋亡及一氧化氮的保护作用[J].细胞与分子免疫学杂志,2000,16(3):225-227.

[收稿日期] 2003-03-15 [本文编辑] 周庆辉

(上接第 116 页)

橙皮苷、芦丁的抗氧化作用已有报道,本实验结果提示它们能在体外直接抑制 Cu²⁺ 诱导的 HDL 的氧化,这为进一步研究两者抗动脉粥样硬化的机制及开发富含橙皮苷和芦丁的食物提供了实验依据。

[参考文献]

- 1 张警,尹炳生.中西医结合高脂血症治疗学[M].北京:人民军医出版社,2001.39-41.
- 2 秦德安,苏丹,王晓玲.橙皮苷对羟自由基的清除作用[J].中国药学杂志,1996,31(7):396-398.
- 3 Limasset B, le Doucen C, Dore JC, et al. Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. Multivariate analysis of structure-activity relationships (SAR) [J].

Biochem Pharmacol, 1993,46(7):1257-1271.

- 4 娄桂予,钱民章.橙皮甙、芦丁抗家兔动脉粥样硬化及对单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 表达的影响[J].中国动脉硬化杂志,2002,10(增刊):1-4.
- 5 张林华,刘秉文.一次性密度梯度超速离心法分离人血清脂蛋白[J].生物化学与生物物理学学报.1989,21(3):257-259.
- 6 Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, et al. Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein [J]. Chem Res Toxicol, 1990,3(2):77-92.
- 7 江渝,刘秉文,傅明德.高脂膳食诱发家兔血清 LPO 升高及 LDL、VLDL 和 HDL 在活体内的氧化修饰[J].华西医科大学学报,1997,28(1):1-5.

[收稿日期] 2003-03-20 [本文编辑] 白玉金