

# 甲基莲心碱在体外对抗脂蛋白的氧化

吴捷莉<sup>①</sup> 冯友梅 从 容 宗义强 王淳本 冯宗忱

(同济医科大学基础医学院生物化学教研室, 武汉 430030)

主题词 甲基莲心碱; 氧化剂; 抗氧化剂; 脂蛋白, 低密度; 脂蛋白, 极低密度; 巨噬细胞, 腹腔; 小鼠

摘 要 为探讨甲基莲心碱能否对抗脂蛋白的氧化, 本文检测了甲基莲心碱对于  $\text{Cu}^{2+}$  介导低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白氧化修饰的效应。结果发现, 甲基莲心碱能抑制低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白的硫代巴比妥酸反应物质的生成, 还能抑制  $\text{Cu}^{2+}$  介导的极低密度脂蛋白电泳迁移率的增加。用甲基莲心碱保护的低密度和极低密度脂蛋白引起巨噬细胞内胆固醇和甘油三酯的堆积均低于相应的未保护脂蛋白。结果提示, 甲基莲心碱能够在体外对抗  $\text{Cu}^{2+}$  介导低密度和极低密度脂蛋白的氧化修饰, 而且由此抑制了巨噬细胞对脂蛋白的摄取。

## The Effects of Neferine on Copper Mediated Oxidative Modified Lipoproteins

WU Jie-Li, FENG You-Mei, CONG Rong, ZONG Yi-Qiang, WANG Chun-Ben and FENG Zong-Chen

(Department of Biochemistry, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

MeSH Neferine; Oxidants; Antioxidants; Lipoproteins, LDL; Lipoproteins, VLDL; Macrophages, Peritoneal; Mice

**ABSTRACT** **Aim** To study the effect of neferine (Nef) on copper mediated low density lipoprotein (LDL) and very low density lipoprotein (VLDL) oxidative modification. **Methods** Lipoproteins (LDL or VLDL) was isolated by ultracentrifugation from normal human plasma. The extent of lipid peroxidation was measured in terms of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents. The electrophoretic mobility of lipoproteins was determined on an agarose gel electrophoresis. Mouse peritoneal macrophages (MP) was obtained by the method of Goldstein.

**Results** Neferine inhibited the generation of TBARS in LDL and VLDL. Nef could decrease the electrophoretic mobility of VLDL, but it couldn't do this to LDL. The oxidized low density lipoproteins (ox-LDL) and oxidized very low density lipoproteins (ox-VLDL) was more efficient than  $\text{Cu}^{2+} + \text{Nef} + \text{LDL}$  and  $\text{Cu}^{2+} + \text{Nef} + \text{VLDL}$  in stimulating lipid accumulation in MP. **Conclusions** Neferine can inhibit copper mediated LDL or VLDL oxidation and by which inhibit lipid accumulation in MP.

氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的形成中起重要作用。研究发现, ox-LDL 较正常 LDL (native LDL, n-LDL) 更易导致巨噬细胞堆积脂类转变成泡沫细胞<sup>[1]</sup>; ox-LDL 的细胞毒作用可导致内皮细胞损伤<sup>[2]</sup>。近年来的研究又发现, 极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 也可导致巨噬细胞内脂类堆积<sup>[3]</sup>, VLDL 可被氧化修饰为氧化型 VLDL (oxidized VLDL, ox-VLDL)。由于 VLDL 和 LDL 都含载脂蛋白 B100, 免疫学特征上抗 ox-LDL 血清与 ox-VLDL 有交叉反应, 故体内可能存在 ox-VLDL, VLDL 也可通过氧化修饰加速 As 的形成<sup>[4]</sup>。由于脂蛋白的氧化修饰在 As 的发生发展中起重要作用, 寻找合适的抗氧化

剂预防和治疗 As 已成为可行<sup>[5]</sup>。甲基莲心碱 (neferine) 是从莲子心中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱, 具有抗实验性心律失常、降血压及抗羟自由基等作用<sup>[6,7]</sup>, 但甲基莲心碱能否对抗脂蛋白的氧化修饰尚未见报道。本文研究甲基莲心碱在体外对抗 LDL 及 VLDL 氧化并抑制巨噬细胞堆积脂类形成泡沫细胞的作用, 对 As 的防治具有一定的理论和实际意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

甲基莲心碱系我校药理教研室制备, 血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 测定试剂盒为浙江东瓯公司生产; 1, 1, 3, 3-四甲氧基丙烷 (1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane, TMP) 购自 Sigma 公司, 改良的

<sup>①</sup>现在解放军广州医学高等专科学校生物化学教研室

Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 为 Gibico 公司产品, 其余试剂均为国产分析纯。

## 1.2 脂蛋白的制备

按照王淳本等<sup>[8]</sup>超速离心二步法进行分离。

## 1.3 脂蛋白的氧化和抗氧化

将分离的 LDL 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 在 4℃、充 N<sub>2</sub> 的条件下透析 24 h, 调节 TC 含量为 2.0 g/L, 将其分四组: ① n-LDL 组: 冲 N<sub>2</sub> 贮存; ② ox-LDL 组: LDL 6 mL + 1 mmol/L CuCl<sub>2</sub> 60 μL; ③ 抗氧化 LDL 组: Cu<sup>2+</sup> + 甲基莲心碱 + LDL, LDL 5.9 mL + 1 mmol/L CuCl<sub>2</sub> 60 μL + 10 mmol/L 甲基莲心碱 60 μL; ④ 甲基莲心碱 + LDL 组: LDL 1 mL + 10 mmol/L 甲基莲心碱 10 μL, 上述四部分 LDL 在 25℃ 条件下作用 24 h, PBS 透析后备用。将分离的 VLDL 调节 TG 含量为 4.0 g/L, 同上分组并处理。

## 1.4 脂蛋白硫代巴比妥酸反应物质测定<sup>[9]</sup>

将 25 μg LDL 或 VLDL 与 0.67% 硫代巴比妥酸 1.5 mL、20% 三氯乙酸 1.5 mL 混合, 100℃ 水浴 30 min, 快速冷至室温, 在 Ex 515 nm、Em 553 nm 条件下测定荧光吸收, 以 TMP 作为标准计算脂蛋白中的硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 生成的量, 用蛋白量进行校正求得 TBARS 值。

## 1.5 脂蛋白琼脂糖凝胶电泳

各组 LDL 或 VLDL 以苏丹黑预染后在 0.4% 琼脂糖凝胶中 100 V 电泳 2 h。

## 1.6 小鼠腹腔巨噬细胞培养

按 Goldstein 等<sup>[10]</sup>法收集小鼠腹腔巨噬细胞于含 10% 小牛血清的 DMEM 中, 混匀后分装于 60 mm 培养皿中, 稳定 24 h 后用于细胞实验。

## 1.7 氧化和抗氧化脂蛋白对巨噬细胞的作用

用含 100 mg/L TC 的 ox-LDL、Cu<sup>2+</sup> + 甲基莲心碱 + LDL 培养基和用含 200 mg/L TG 的 ox-VLDL、Cu<sup>2+</sup> + 甲基莲心碱 + LDL 培养基继续培养细胞 48 h, 测定细胞内 TC、TG 的含量。

## 1.8 蛋白含量、胆固醇及甘油三酯含量的测定

用 Lowry 法<sup>[11]</sup>测定脂蛋白及细胞蛋白的蛋白含量。用酶法试剂盒测定脂蛋白 TC、TG 的含量。以 Folch 法<sup>[12]</sup>进行细胞内总胆固醇和甘油三酯抽提, 提取液蒸干后用上述试剂盒测定 TC、TG 含量。

# 2 结果

## 2.1 甲基莲心碱对低密度脂蛋白和极低密度脂蛋

白脂类组成的影响

由表 1 和表 2 (Table 1 and 2) 可知, 同类各组脂蛋白中 TC、TG 含量没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1. 甲基莲心碱和 Cu<sup>2+</sup> 对低密度脂蛋白脂类组成的影响

Table 1. Effect of neferine and Cu<sup>2+</sup> on the lipid composition of LDL ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Groups	TC	TG	TC/TG
n-LDL	1.79 ± 0.10	0.52 ± 0.05	3.44
ox-LDL	1.76 ± 0.10	0.49 ± 0.06	3.59
Cu <sup>2+</sup> + Nef + LDL	1.73 ± 0.07	0.49 ± 0.05	3.84

表 2. 甲基莲心碱和 Cu<sup>2+</sup> 对极低密度脂蛋白脂类组成的影响

Table 2. Effect of neferine and Cu<sup>2+</sup> on the lipid composition of VLDL ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Groups	TG	TC	TG/TC
n-VLDL	4.44 ± 0.17	1.31 ± 0.07	3.39
ox-VLDL	4.45 ± 0.13	1.38 ± 0.10	3.22
Cu <sup>2+</sup> + Nef + VLDL	4.27 ± 0.12	1.29 ± 0.05	3.31

## 2.2 甲基莲心碱对脂蛋白中硫代巴比妥酸反应物生成的影响

氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 的 TBARS 值是 n-LDL 的 10.5 倍, Cu<sup>2+</sup> + 甲基莲心碱 + LDL 的 TBARS 值仅为 n-LDL 的 3.9 倍 (图 1, Figure 1), Cu<sup>2+</sup> + 甲基莲心碱 + VLDL 的 TBARS 值也低于 n-VLDL (图 2, Figure 2), 具有显著性差异, 说明甲基莲心碱对 TBARS 的产生有明显的抑制作用。

## 2.3 甲基莲心碱对脂蛋白电泳迁移率的影响

由图 3 (Figure 3) 可见, 甲基莲心碱未抑制 LDL 电泳迁移率的加快, 但是能够抑制 VLDL 电泳迁移率的增加。甲基莲心碱与正常脂蛋白单独作用对其电泳迁移率不产生影响。

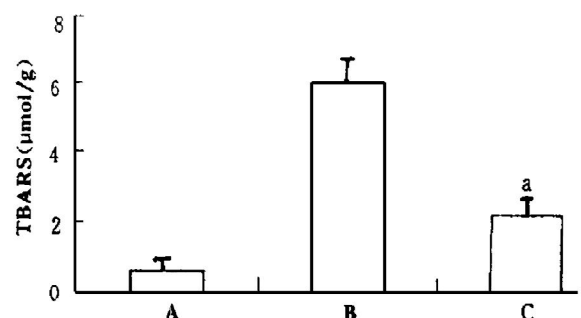


图 1. 各组低密度脂蛋白的硫代巴比妥酸反应物质值

Figure 1. The TBARS values of LDL in each group ( $n=8$ )

a: Denote the significant differences from other two groups. A: n-LDL group; B: ox-LDL group; C: Cu<sup>2+</sup> + Nef + LDL group.

## 2.4 甲基莲心碱对巨噬细胞蓄积的低密度脂蛋白脂类含量的影响

如表3 (Table 3)所示,  $\text{Cu}^{2+}$  + 甲基莲心碱 + LDL 组细胞内 TC、TG 含量均低于 ox-LDL 组, 具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 说明甲基莲心碱抑制 LDL 的氧化从而减少了巨噬细胞对 LDL 的摄取。

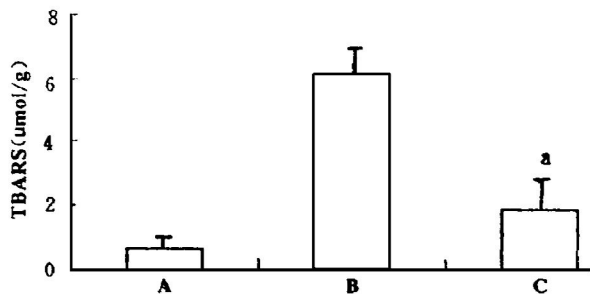


图2. 各组极低密度脂蛋白的硫代巴比妥酸反应物质值  
Figure 2. The TBARS values of VLDL in each group ( $n = 8$ ) a: Denote of the significant differences from other two groups. A: n-LDL group; B: ox-LDL group; C:  $\text{Cu}^{2+}$  + Nef + LDL group.

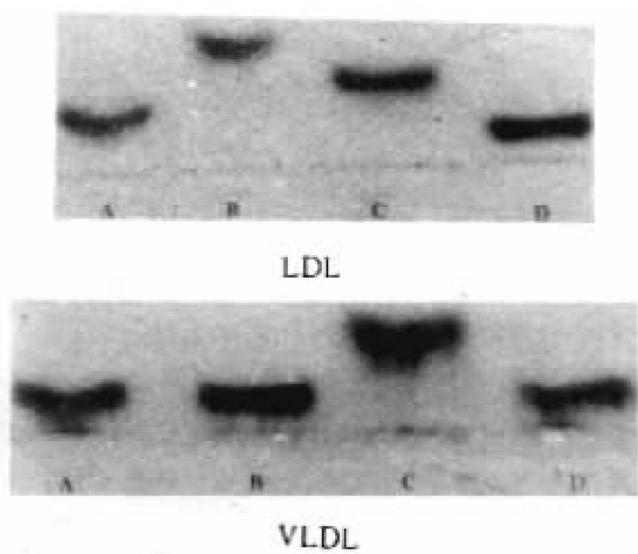


图3. 脂蛋白琼脂糖凝胶电泳

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of lipoproteins  
A: Nef + LDL group; B:  $\text{Cu}^{2+}$  + Nef + LDL group; C: ox-LDL group; D: n-LDL group.

表3. 甲基莲心碱对巨噬细胞蓄积的低密度脂蛋白脂类含量的影响

Table 3. Accumulation of TC or TG in macrophage exposed to LDL ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Groups	TC	TG
ox-LDL	91.60 ± 32.42	79.60 ± 2.51
$\text{Cu}^{2+}$ + Nef + LDL	52.64 ± 1.92 <sup>a</sup>	54.19 ± 2.86 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with ox-LDL group.  $\text{Cu}^{2+}$  + Nef + LDL;  $\text{Cu}^{2+}$  + 甲基莲心碱 + LDL.

## 2.5 甲基莲心碱巨噬细胞内脂类含量的影响

如表4 (Table 4)所示,  $\text{Cu}^{2+}$  + 甲基莲心碱 + VLDL 组细胞内 TC、TG 含量低于 ox-VLDL 组 ( $P < 0.05$ ), 说明甲基莲心碱抑制 VLDL 的氧化也减少了巨噬细胞对 VLDL 的摄取。

表4. 甲基莲心碱对巨噬细胞蓄积极低密度脂蛋白脂类含量的影响

Table 4. Accumulation of TC or TG in macrophage exposed to VLDL ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Groups	TC	TG
ox-VLDL	42.59 ± 2.67	157.70 ± 8.28
$\text{Cu}^{2+}$ + Nef + VLDL	33.81 ± 2.24 <sup>a</sup>	66.48 ± 5.10 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , compared with ox VLDL group.  $\text{Cu}^{2+}$  + Nef + VLDL;  $\text{Cu}^{2+}$  + 甲基莲心碱 + VLDL.

## 3 讨论

大量研究表明, LDL 的氧化修饰是其致 As 的关键, 所以采用合适的抗氧化剂保护 LDL 不被氧化对 As 的预防和治疗将具有重要的理论和实际意义。甲基莲心碱能够抑制肝细胞的脂质过氧化及中性粒细胞受乙酸豆蔻佛波醇 (PMA) 刺激后释放的氧自由基, 具有抗氧化作用<sup>[7]</sup>。本研究结果表明, 甲基莲心碱在体外能够有效抑制  $\text{Cu}^{2+}$  介导的 LDL 的氧化修饰。甲基莲心碱抑制了  $\text{Cu}^{2+}$  引发 LDL 的 TBARS 升高。在促进 MP 内脂类堆积方面,  $\text{Cu}^{2+}$  + 甲基莲心碱 + LDL 作用效果显著低于 ox-LDL, 说明甲基莲心碱可以通过抑制 LDL 氧化进而抑制巨噬细胞对 LDL 的摄取。Kerry 等<sup>[13]</sup>用红葡萄酒及其有效成份作抗氧化剂, 报道了与我们相似的结果。

同样甲基莲心碱也抑制了  $\text{Cu}^{2+}$  引发的 VLDL 的 TBARS 升高, 而且甲基莲心碱能够抑制 VLDL 电泳迁移率的加快。 $\text{Cu}^{2+}$  + 甲基莲心碱 + VLDL 组细胞内 TC 和 TG 的增加量低于 ox-VLDL 组。说明甲基莲心碱也对抗了  $\text{Cu}^{2+}$  介导的 VLDL 的氧化修饰, 并由此抑制了巨噬细胞对 VLDL 的摄取。

随着对脂蛋白氧化致 As 发病作用认识的加深, 抗氧化剂在 As 防治中的作用逐步受到重视。已有研究证实, 给予一些能够阻止 LDL 氧化的药物 (如 BHT、probucol、VitE 等), 可以减缓鼠、兔、荷兰猪和非人灵长类动物 As 的发生<sup>[14]</sup>。而甲基莲心碱作为中药莲子心中的有效成份, 具有药源丰富, 提取工艺简单等优点。因此本文所探讨的甲基莲心碱抗 LDL 和 VLDL 氧化进而抑制 MP 对 LDL 和 VLDL 的摄取, 具有重要的理论和实际意义。

## 参考文献

- 1 Hreiksen T, Mahoney EM, Steinberg D, et al. Enhanced macrophage degradation of LDL previously incubated with cultured endothelial cells; recognition by receptors for acetylated LDLs. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1981, **78**: 6 499—503
- 2 Glans G, Armstrong VW, Kostering H, et al. Enhanced procogulatory activity (PCA) of human monocyto/macrophages after in vivo stimulation with chemically modified LDL. *Atherosclerosis*, 1989, **78**: 109—112
- 3 黄强, 冯宗忱, 邓耀祖, 等. 巨噬细胞极低密度脂蛋白受体的调节作用. *生物化学杂志*, 1992, **8**: 234—241
- 4 赖祥进, 冯宗忱, 王式平, 等. 氧化修饰极低密度脂蛋白增强其致动脉粥样硬化作用. *生物化学杂志*, 1994, **10**: 350—356
- 5 Steinberg D. Antioxidants in the prevention of human atherosclerosis. *Circulation*, 1992, **85**: 2 335—348
- 6 夏国瑾, 刘玉芬, 吕富华, 等. 甲基莲心碱对实验性心律失常的影响. *同济医科大学学报*, 1986, **15**: 200—204
- 7 贾菊芳, 敖明章, 胡本容, 等. 甲基莲心碱对脂质过氧化和活性自由基的作用. *同济医科大学学报*, 1995, **24**: 62—64
- 8 王淳本, 宗义强, 吴万生, 等. 快速制备人血浆脂蛋白的超速离心法. *同济医科大学学报*, 1995, **24**: 169—172
- 9 Steinbercher UP, Parthasaethy S, Leake PS, et al. Modification of LDL by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of LDL phospholipid. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1984, **81**: 3 883—887
- 10 Goldstein JL, Ho YK, Brown MS, et al. Cholesteryl ester accumulation in macrophage resulting from receptor mediated uptake and degradation of hypercholesterolemia canine  $\beta$ -very low density lipoproteins, producing massive cholesterol. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1979, **76**: 333—337
- 11 Lowry OH, Rosenfeld NJ, Earr AL, et al. Protein measurement with the phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265—269
- 12 Folch J, Ascoli I, Lees M, et al. Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J Biol Chem*, 1951, **191**: 833—841
- 13 Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractioned phenolic compounds prepared from red wine inhibit LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 1997, **135**: 93—102
- 14 Steinberg D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1997, **131** (Suppl): 55—57

(此文1998—08—11收到, 1999—02—10修回)

(此文编辑 文玉珊)