

## 硒和锌对细胞氧化低密度脂蛋白作用的影响

武军驻, 喻红, 洪嘉玲

(湖北医科大学生物化学教研室, 武汉 430071)

[关键词] 亚硒酸钠; 硫酸锌; 脂蛋白, 低密度; 硫代巴比妥酸反应物质; 髓过氧化物酶

[摘要] 为探讨微量元素硒和锌在体内抗低密度脂蛋白氧化的作用及其可能机制, 采用硫代巴比妥酸法测定大鼠动脉平滑肌细胞对低密度脂蛋白的氧化反应, 采用噻唑蓝法了解动脉平滑肌细胞增殖及邻联二茴香胺底物反应的方法测髓过氧化物酶活性。结果表明 10  $\mu\text{mol/L}$  亚硒酸钠显著减少了丙二醛的生成, 而相同浓度的硫酸锌效应不明显, 但二者均可见动脉平滑肌细胞增殖减少。此外, 低密度脂蛋白诱导动脉平滑肌细胞的髓过氧化物酶活性显著升高, 但 10  $\mu\text{mol/L}$  亚硒酸钠似乎不能抑制这种效应。提示硒与锌均抑制氧化型低密度脂蛋白促动脉平滑肌细胞的增殖作用, 前者与抗低密度脂蛋白氧化有关, 且可能发生在髓过氧化物酶催化形成酪酰基自由基之后的某个环节, 后者尚待进一步探讨。

[中图分类号] Q513.5, Q253, Q503

[文献标识码] A

### Effect of $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ and $\text{ZnSO}_4$ on Oxidation Modification of Human Low Density Lipoprotein

WU Jun- Zhu, YU Hong, and HONG Jia- Ling

(Department of Biochemistry, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China)

**MeSH**  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ;  $\text{ZnSO}_4$ ; Lipoprotein, LDL; Thiobarbituric Acid Reactive Substance; Myeloperoxidase

**ABSTRACT** **Aim** The antioxidation effect of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  and  $\text{ZnSO}_4$  on the oxidation of human low density lipoprotein (LDL) were investigated by rat's arterial smooth muscle cells (ASMC). **Methods** Oxidation of LDL was induced by rat's ASMC added 1  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ . The extent of LDL modification was assessed by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). **Results** Treatment of 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  and  $\text{ZnSO}_4$  inhibited ASMC proliferation by ox-LDL ( $P < 0.01$ ). Treatment of 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  inhibited MDA production ( $P < 0.01$ ), but 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{ZnSO}_4$  have no the effect. 50 mg/L LDL induced myeloperoxidase (MPO) activity, but 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  can not inhibit the effect. **Conclusion** 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  could protect LDL against rat's ASMC inducing oxidation modification in vitro, which might be contributed by its effect to tyrosyl radical generated by myeloperoxidase.

氧化型低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生和发展关系密切, 实验表明低密度脂蛋白不仅可在体外被酪酰基自由基、羟自由基或具有氧化还原活性的金属离子氧化, 产生不同的氧化产物, 而且可在体内如血管壁的内皮及平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC)、巨噬细胞等处氧化, 产生各种致 As 的效应。但是在人体内的 As 斑块中只有酪酰基自由基氧化低密度脂蛋白的产物。因此, Christiaan 等<sup>[1]</sup> 提出由髓过氧化物酶催化生成的酪酰基自由基可能在体内低

密度脂蛋白的氧化过程中起主导作用。硒和锌是体内抗氧化物质, 具有多方面的保护作用<sup>[2,3]</sup>。本实验观察二者对动脉平滑肌细胞诱发低密度脂蛋白氧化的影响, 探讨硒和锌在动脉粥样硬化防治中的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与仪器

1, 1, 3, 3- 四甲氧基丙烷 (1, 1, 3, 3- tetramethoxypropane)、硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA)、邻联二茴香胺 (dianisidine hydrochloride)、十六烷基三甲基溴化胺 (hexadecyltrimethylammonium, HTAB) 和噻唑蓝 (thiazolyl blue, MTT) 购自 Sigma 公司; 其余试剂为国产分析纯。UV-265 分光光度计为 Shimadzu 公司生产, 二氧化碳孵箱为 Shell/JB 公司

[作者简介] 武军驻, 男, 1971 年出生, 内蒙古人, 生物化学专业, 在读博士, 研究方向为动脉粥样硬化的分子机制。喻红, 女, 1968 年出生, 湖北人, 生物化学专业, 博士, 研究方向为动脉粥样硬化的分子机制。

产品。

## 1.2 平滑肌细胞的培养<sup>[4]</sup>

无菌条件下取大鼠主动脉,用含双抗 Hanks 液漂洗数次,取肌层切成  $1\text{ mm}^3$  大小组织块。种植培养瓶壁贴块后,补加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养,待细胞生长融合出现“峰”、“谷”结构,弃去培养液,加含 0.25% 胰蛋白酶 (pH7.6) 的消化液,镜下消化。再改用含 10% 小牛血清的 DMEM 进行传代,实验用第 3~8 代细胞。

## 1.3 平滑肌细胞增殖的测定<sup>[5]</sup>

将  $0.1\text{ mL}$  生长良好的血管 SMC 以  $5 \times 10^7$  个/L 接种于 96 孔培养板,  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  孵育 24 h 后换无血清培养液继续培养 24 h,随机加入不同物质,以含 10% 小牛血清的 DMEM 分组培养 48 h,加入 MTT ( $5\text{ g/L}$ )  $15\text{ }\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  4 h 后,每孔加入异丙醇  $100\text{ }\mu\text{L}$ ,充分混匀,  $37^\circ\text{C}$  30 min。酶标仪上读取  $570\text{ nm}$  的光密度值。

## 1.4 丙二醛含量的测定

选用生长良好的细胞,以无血清 DMEM 培养液洗涤及  $37^\circ\text{C}$  温育 2 h,加含 10% 小牛血清、 $50\text{ mg/L}$  低密度脂蛋白及  $1\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  的 RPMI1640  $37^\circ\text{C}$  培养 48 h。并在培养过程中加入  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  或  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{ZnSO}_4$ ,测定过氧化产物丙二醛含量,以 TBARS 值  $\mu\text{mol/L}$  表示<sup>[7]</sup>。

## 1.5 髓过氧化物酶活性测定

离心收集细胞,加入 HTAB 缓冲液 ( $0.5\%$  HTAB,  $50\text{ mmol/L}$  PBS, pH6.0)  $1\text{ mL}$ ,悬浮细胞。超声 10 s,反复冻融 3 次,  $4\text{ }000\text{ r/min}$  离心 15 min。取上清加  $50\text{ mmol/L}$  PBS (含  $0.167\text{ g/L}$  邻联二茴香胺和  $0.0005\%$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$ )  $2.9\text{ mL}$ 。立即在  $460\text{ nm}$  测光密度值 ( $A_1$ ), 5 min 后再测光密度值 ( $A_2$ ),  $A_1 - A_2/5$  以 MPO 活性单位/mg 蛋白表示。

## 1.6 统计学分析

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有显著差异。

# 2 结果

## 2.1 硒和锌对动脉平滑肌细胞氧化修饰低密度脂蛋白的影响

低密度脂蛋白与动脉平滑肌细胞在  $1\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  介导下  $37^\circ\text{C}$  孵育 48 h 后,丙二醛含量为  $5.453 \pm 0.824\text{ }\mu\text{mol/L}$ ,较对照组 ( $2.581 \pm 0.343\text{ }\mu\text{mol/L}$ ) 显著升高 ( $P < 0.01$ )。表明低密度脂蛋白已经被动脉平滑肌细胞氧化修饰。在动脉平滑肌细胞修饰低密度

脂蛋白过程中加入  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,丙二醛含量显著降低 ( $3.537 \pm 0.867\text{ }\mu\text{mol/L}$ ) ( $P < 0.01$ ),加入  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{ZnSO}_4$  时丙二醛含量也有所降低 ( $4.745 \pm 0.623\text{ }\mu\text{mol/L}$ ),但无统计学意义。

## 2.2 硒和锌对氧化型低密度脂蛋白促动脉平滑肌细胞增殖的抑制

从表 1 (Table 1) 可见,将  $1\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  和  $50\text{ mg/L}$  低密度脂蛋白加入动脉平滑肌细胞培养液孵育 48 h 后,其 MTT 值 ( $0.812 \pm 0.043$ ) 较对照组 ( $0.490 \pm 0.053$ ) 显著升高 ( $P < 0.01$ )。当加入不同浓度的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  和  $\text{ZnSO}_4$  ( $1, 5$  和  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ ) 时可抑制氧化型低密度脂蛋白对平滑肌细胞的增殖效应,且在  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  范围内随浓度增加而抑制趋于明显,二者均在  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  条件下抑制作用最强 ( $P < 0.01$ ),而且  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  ( $0.638 \pm 0.024$ ) 的抑制作用较  $\text{ZnSO}_4$  ( $0.702 \pm 0.060$ ) 为显著 ( $P < 0.05$ )。

表 1 硒和锌对氧化型低密度脂蛋白促血管平滑肌细胞增殖的抑制 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 1 Effect of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  and  $\text{ZnSO}_4$  on ASMC proliferation in  $\text{Cu}^{2+}$  - LDL- induced ASMC

Group	Dose	$A_{260}$
$\text{Cu}^{2+}$	$1\text{ }\mu\text{mol/L}$	$0.490 \pm 0.053$
$\text{Cu}^{2+}$ - LDL	$50\text{ mg/L}$	$0.812 \pm 0.043^a$
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	$1\text{ }\mu\text{mol/L}$	$0.737 \pm 0.022$
	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	$0.713 \pm 0.021$
	$10\text{ }\mu\text{mol/L}$	$0.638 \pm 0.024^b$
$\text{ZnSO}_4$	$1\text{ }\mu\text{mol/L}$	$0.750 \pm 0.041$
	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	$0.715 \pm 0.038$
	$10\text{ }\mu\text{mol/L}$	$0.702 \pm 0.060^b$

a:  $P < 0.01$ , compared with  $\text{Cu}^{2+}$  group; b:  $P < 0.01$ , compared with  $5$  and  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  groups

## 2.3 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 对动脉平滑肌细胞髓过氧化物酶活性的影响

低密度脂蛋白与动脉平滑肌细胞在  $1\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  介导下  $37^\circ\text{C}$  孵育 48 h 后,髓过氧化物酶活性 ( $5.357 \pm 0.824\text{ u/g}$  蛋白) 较对照组 ( $3.2 \pm 0.343\text{ u/g}$  蛋白) 显著升高,而外加  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  后髓过氧化物酶活性无统计学意义上的改变 ( $5.6 \pm 0.623\text{ u/g}$  蛋白) ( $P > 0.05$ )。

# 3 讨论

研究结果表明,  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  显著抑制动脉平滑肌细胞对低密度脂蛋白的氧化,并因此导致

动脉平滑肌细胞增殖。已知硒除本身有直接清除氧自由基的作用外,它还是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的重要组成部分,可使有毒的过氧化物转变成无毒的羟化物,并且与抗氧化剂 VitE 有相互节约的效应<sup>[2]</sup>。锌也是重要的抗氧化剂,它可与细胞膜磷脂部分的磷酸根和蛋白质分子中的巯基结合形成牢固复合物,从而防止自由基损害,因此起到稳定细胞膜的作用<sup>[3]</sup>。在本实验中 10  $\mu\text{mol/L}$  ZnSO<sub>4</sub> 对血管平滑肌细胞氧化低密度脂蛋白作用的抑制虽无统计学意义,但其抑制氧化的趋势是明显的。虽然我们推论锌抑制动脉平滑肌细胞增殖基于同硒一样的机制,但也不能完全排除。或者锌是通过拮抗氧化型低密度脂蛋白对细胞的损伤,防止动脉平滑肌细胞释放碱性成纤维细胞生长因子来实现抑制增殖的效应<sup>[8]</sup>,值得进一步探讨。

髓过氧化物酶被认为是体内氧化低密度脂蛋白的重要酶类之一,它催化氯离子与过氧化氢反应生成次氯酸<sup>[9]</sup>,进而氧化低密度脂蛋白的产物酪酰基,自由基在 As 斑块中可将其检测出<sup>[1,10]</sup>。本文研究了解到低密度脂蛋白促进动脉平滑肌细胞髓过氧化物酶的活性,但 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 对此似乎没有抑制作用。推测硒抗低密度脂蛋白氧化的作用可能在于对过氧化氢的分解和酪酰基自由基的捕获。低密度脂蛋白在体内的具体氧化机制尚不明了。低密度脂蛋白对动脉平滑肌细胞髓过氧化物酶活性的影响有待进一步研究,而对髓过氧化物酶活性的调节可能是抗低

密度脂蛋白氧化以防治 As 的有效途径。

#### 参考文献

- [1] Christiaan L, Jane E, Fong FuHsu, et al. Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 3 520- 526
- [2] 张爱元, 杨国钧. 硒与冠心病的研究进展 [J]. 微量元素与健康研究, 1995, **12**(1): 54- 55
- [3] 章净霞, 黄萍. 锌对细胞保护作用的研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1994, **21**(2): 147- 151
- [4] 赵三妹, 夏人仪, 王守立, 等. 动脉平滑肌细胞的培养方法及其应用 [J]. 中华病理学杂志, 1987, **16**(4): 260- 262
- [5] Kotnic V, Fleischmann WR. A sample and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity [J]. *J Immunol Method*, 1990, **129**: 23- 30
- [6] Heinecke JW. Iron and copper promote modification low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture [J]. *J Clin Invest*, 1984, **74**: 1 890- 894
- [7] 钟福孙, 胡文饶, 冯 驰. 硫代巴比妥酸法测定血清过氧化脂质 [J]. 临床检验杂志, 1986, **4**: 129- 130
- [8] Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 20 963-966
- [9] Carr AC, Tijerina T, Frei B. Vitamin C protects against and reverses specific hypochlorous acid and chloramine dependent modification of low density lipoprotein [J]. *Biochem J*, 2000, **346**: 491- 496
- [10] Yang CY, Gu ZW, Yang M, et al. Identification of modified tryptophan residues in apolipoproteinB- 100 derived from ion oxidized low density lipoprotein [J]. *Biochemistry*, 1999, **38**: 15 903- 908

(此文 2000- 04- 26 收到, 2000- 11- 02 修回)

(此文编辑 朱雯霞)