

西红花酸对高脂血症家兔 LDL 氧化易感性 及血清 Ox-LDL 水平的影响

郑书国^{1*}, 钱之玉², 王宏婷¹

(1. 皖南医学院药理教研室, 安徽 芜湖 241002; 2. 中国药科大学药理教研室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的: 观察西红花酸对高脂血症家兔低密度脂蛋白(LDL)氧化易感性及血清氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)水平的影响, 并探讨其可能机制。方法: 采用喂饲高脂饲料方法建立家兔高脂血症模型, ELISA 法测定血清 Ox-LDL 水平; 分离 LDL, 体外测定其氧化易感性; 测定血清总抗氧化能力(TAC)及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性。结果: 西红花酸能显著降低高脂血症家兔 LDL 氧化易感性和血清 Ox-LDL 水平; 西红花酸 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能明显降低血清 TC, TG, LDL-C 水平, 而 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对血脂水平无明显影响, 高、低剂量组皆可显著提高血清 TAC 及 SOD, GPX 活性。结论: 西红花酸能明显降低高脂血症家兔 LDL 氧化易感性及血清 Ox-LDL 水平, 其机制与提高血清 SOD, GPX 活性、提高血清 TAC 有关。

[关键词] 西红花酸; 高脂血症; 氧化低密度脂蛋白; 抗氧化剂; 动脉粥样硬化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)06-0050-04

Effects of Crocetin on the Susceptibility of LDL to Oxidation and Serum Level of Ox-LDL in Hyperlipidemic Rabbits

ZHENG Shu-guo^{1*}, QIAN Zhi-yu², WANG Hong-ting¹

(1. Department of Pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China;

2. Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of crocetin on the susceptibility of low density lipoprotein (LDL) to oxidation and serum level of oxidized LDL (Ox-LDL) in hyperlipidemic rabbits and the possible mechanisms involved. **Methods:** Hyperlipidemic rabbits were established by feeding the animals with a high lipid diet for 4 weeks. Serum level of Ox-LDL was determined by sandwich ELISA. Following isolation of LDL, the susceptibility of LDL to oxidation was evaluated by in vitro assay. Serum levels of lipids, serum total antioxidant capacity (TAC) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) were also determined. **Results:** Crocetin of dosages of 30 and $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ markedly reduced serum level of Ox-LDL and the susceptibility of LDL to oxidation, while serum levels of lipids were reduced only by $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of crocetin. Both dosages of crocetin significantly enhanced serum TAC and the activities of SOD and GPX. **Conclusion:** Crocetin significantly reduces serum level of Ox-LDL and the susceptibility of LDL to oxidation in hyperlipidemic rabbits, which might be attributed, at least partly, to the enhancement of serum TAC and the activities of SOD and GPX.

[Key words] crocetin; hyperlipidemia; Ox-LDL; antioxidant; atherosclerosis

[收稿日期] 2008-08-18

[通讯作者] * 郑书国, Tel: (0553) 3932464; E-mail: zhengsg2000

@ 163.com

脂代谢紊乱学说认为, 高脂血症是动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)最主要的危险因素, 血浆脂质在血管壁的沉积是 AS 形成的主要机制。随着近年来抗体技术的发展, 氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)

在 AS 斑块及患者血浆中相继被发现, 于是氧化应激及活性氧(ROS) 在 AS 中的作用开始引起人们的重视, 并形成了 AS 的氧化应激学说。该学说认为, 各种 AS 危险因素如高脂血症等均可增加机体 ROS 产生, 大量 ROS 除可直接引起机体氧化损伤外, 还可引起 LDL 氧化修饰, 而 Ox-LDL 的形成则是 AS 发生发展的关键环节^[1]。氧化应激学说的提出为使用抗氧化剂防治 AS 提供了理论依据。西红花酸为天然类胡萝卜素类化合物, 具有抗氧化、抗 AS 等多种药理作用。本文主要探讨西红花酸对高脂血症家兔血清 Ox-LDL 水平及 LDL 氧化易感性的影响, 以探讨其抗 AS 作用的可能机制。

1 材料

1.1 动物与饲料 新西兰白兔, 雄性, 体重 2.0~2.2 kg, 购自江苏省南京市金陵种兔场, 合格证号: SCXK(苏)2002-0025。高脂饲料^[4], 含胆固醇 1.2%, 猪油 4%, 普通饲料 94.8%。

1.2 药品、试剂和主要仪器 西红花酸来源于茜草科植物栀子(*Gardenia jasminoides*) 果实, 由中国药科大学药理实验室制备, 并预先与适量高脂饲料混合压制成颗粒。总胆固醇(TC, 批号: 20050812)、甘油三酯(TG, 批号: 20050718)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C, 批号: 20050722)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C, 批号: 20050823) 测试盒由浙江东瓯生物工程有限公司提供; 超氧化物歧化酶(SOD, 批号: 20050608)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX, 批号: 20050615) 测试盒由南京建成生物工程研究所提供; 兔 Ox-LDL 测试盒由大连泛帮生物技术公司提供(批号: 20050607); 其他试剂均为分析纯。752 紫外分光光度计, 上海第三分析仪器厂; 酶联免疫检测仪, BiorRad; 超速离心机, Beckman 公司。

2 方法

2.1 模型建立与给药 新西兰白兔 32 只, 随机分为 4 组, 即正常对照组、模型对照组、西红花酸高剂量组 30 mg·kg⁻¹ 和低剂量组 15 mg·kg⁻¹, 每组 8 只, 单笼饲养。除正常组喂饲普通饲料外, 其余各组均给予高脂饲料。西红花酸组每天早晨先给予含药饲料(5 g·kg⁻¹ 体重), 待吃完后再给予高脂饲料, 以保证药物的完全摄入。每只家兔每天进食总量控制为 120 g 左右, 分两次于早晨和晚上投喂, 自由饮水, 共 4 周。

2.2 血清 Ox-LDL 水平及 LDL 氧化易感性测定 分

离血清, 双抗夹心 ELISA 法测定 Ox-LDL 水平。取 EDTA(1 mg·mL⁻¹) 抗凝全血, 1 500 g, 4 ℃, 离心 10 min, 分离血浆。密度梯度超速离心法分离 LDL, 并于 4 ℃在 10 mmol·L⁻¹ PBS (PH7.4) 中透析 24 h 以除去 EDTA, 每 8 h 更换 PBS 1 次。测定 LDL 中蛋白含量, 并调整浓度至 1 mg·mL⁻¹。于 96 孔酶标板中分别加入 LDL (1 mg·mL⁻¹) 20 μL, 10 mmol·L⁻¹ PBS 160 μL 及 50 μmol·L⁻¹ CuSO₄ 溶液 20 μL, 使 LDL 和 CuSO₄ 终浓度分别为 0.1 mg·mL⁻¹ 和 5 μmol·L⁻¹, 混匀, 置于酶联免疫检测仪中 37 ℃ 孵育, 每 15 min 测定 1 次 234 nm 处吸光度(A₂₃₄), 共检测 180 min。以时间为横坐标, A₂₃₄ 为纵坐标, 绘制 LDL 氧化曲线, 并根据曲线计算 LDL 氧化延迟时间(Lag time) 和达到最大氧化速率时间(T_{max})。Lag time 和 T_{max} 是反映 LDL 氧化易感性的两个重要指标^[2]。

2.3 血脂测定 第 4 周末, 禁食 12 h 后自心脏取血, 分离血清, 酶法测定 TC, TG 含量; LDL-C 和 HDL-C 分别采用聚乙烯硫酸沉淀法和磷钨酸镁沉淀法测定。

2.4 血清抗氧化能力测定 血清总抗氧化能力(TAC) 是综合衡量机体抵抗氧化损伤能力的重要指标, 采用血清 Fe³⁺ 还原能力法测定; 血清 SOD, GPX 活性分别采用黄嘌呤氧化酶法和二硫代二硝基苯甲酸(DTNB) 比色法测定。

2.5 统计学处理 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, 数据采用 SPSS10.0 处理, P < 0.05 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 西红花酸对血清 Ox-LDL 水平及 LDL 氧化易感性的影响 由表 1 可见, 喂饲高脂饲料 4 周后, 家兔血清 LDL 抗氧化能力显著降低, 表现为 Lag time 和 T_{max} 均明显缩短(P < 0.01), 同时血清 Ox-LDL 水平明显升高(P < 0.01); 西红花酸 30 mg·kg⁻¹ 和 15 mg·kg⁻¹ 均能显著提高 LDL 抗氧化能力, 降低血清 Ox-LDL 水平(P < 0.05 或 P < 0.01)。

3.2 西红花酸对血脂水平的影响 由表 2 可见, 喂饲高脂饲料 4 周后, 家兔血清 TC, TG, LDL-C 和 HDL-C 水平均较正常组显著升高(P < 0.01), 提示家兔已形成明显的高脂血症。西红花酸 30 mg·kg⁻¹ 可显著降低血清 TC, TG, LDL-C 水平(P < 0.05 或 P < 0.01), 但西红花酸 15 mg·kg⁻¹ 对血脂水平无明显影响(P > 0.05); 西红花酸 30 mg·kg⁻¹ 和 15 mg·kg⁻¹ 对

血清 HDL-C 水平无明显影响($P > 0.05$)。

表 1 西红花酸对血清 Ox-LDL 水平及 LDL 氧化易感性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Ox-LDL ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Lag time (min)	T_{max} (min)
正常组	—	62.50 ± 13.83 ²⁾	72.43 ± 14.65 ²⁾	148.65 ± 25.86 ²⁾
模型组	—	126.28 ± 30.68	45.24 ± 10.20	103.65 ± 21.48
西红花酸组	30	85.46 ± 19.87 ²⁾	62.78 ± 16.64 ¹⁾	136.55 ± 24.30 ²⁾
	15	95.66 ± 17.64 ¹⁾	58.50 ± 13.72 ¹⁾	129.28 ± 19.82 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 西红花酸对家兔血脂水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	TC ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TG ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	LDL-C ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	HDL-C ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
正常组	—	1.29 ± 0.22 ²⁾	1.07 ± 0.15 ²⁾	0.77 ± 0.18 ²⁾	0.30 ± 0.05 ²⁾
模型组	—	11.77 ± 3.07	1.62 ± 0.24	9.95 ± 2.79	0.81 ± 0.16
西红花酸组	30	8.58 ± 1.72 ¹⁾	1.39 ± 0.19 ¹⁾	6.87 ± 1.49 ¹⁾	0.71 ± 0.09
	15	10.43 ± 2.70	1.55 ± 0.21	8.70 ± 2.40	0.70 ± 0.17

3.3 西红花酸对血清抗氧化能力的影响 由表 3 可见, 喂饲高脂饲料 4 周后, 家兔血清 TAC 及 SOD, GPX 活性均明显下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而西红花酸 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均能显著升高血清 TAC 及 SOD, GPX 活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 西红花酸对家兔血清 TAC 及 SOD、GPX 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	TAC ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	SOD ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	GPX ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
正常组	—	5.55 ± 1.03 ²⁾	153.31 ± 17.56 ¹⁾	169.73 ± 20.27 ¹⁾
模型组	—	3.74 ± 0.89	122.50 ± 21.61	134.09 ± 26.51
西红花酸组	30	4.97 ± 0.82 ²⁾	159.37 ± 24.29 ¹⁾	178.64 ± 28.64 ²⁾
	15	4.79 ± 0.75 ¹⁾	155.61 ± 31.14 ¹⁾	165.30 ± 19.38 ¹⁾

4 讨论

脂代谢紊乱学说认为, 高脂血症尤其是 LDL 水平升高是 AS 最主要的危险因素之一, 它既可引起血管内皮损伤, 诱导其表达多种细胞粘附分子, 启动 AS 进程, 也可直接进入血管内膜下, 参与 AS 早期病变- 泡沫细胞的形成。临床资料和动物实验均证实了高脂血症与 AS 的密切关系^{13- 41}。然而, 体外研究却发现, 天然 LDL 本身并无致 AS 作用, 其氧化产物 Ox-LDL 才是促进 AS 发生发展的关键因素, 提示 LDL 在体内需要经过氧化修饰才能发挥促 AS 作用⁵¹。氧化应激学说明确强调了 ROS 在 AS 中的重要作用, 认为 LDL 氧化修饰是 AS 形成与发展的关

键环节。抗氧化剂对 AS 的抑制作用进一步证实了 ROS 与 AS 的密切关系, 也为使用抗氧化剂防治 AS 提供了依据⁶¹。本研究发现, 喂饲高脂饲料 4 周可使家兔形成明显的高脂血症, 表现为血清 TC, TG, LDL-C, HDL-C 等水平显著升高, 其中尤以 TC 和 LDL-C 水平升高最为明显。临床研究显示, 血清 TAC 与 LDL 抗氧化能力呈正相关, 而与血清 Ox-LDL 水平明显负相关¹⁷¹。本研究也发现, 高脂血症兔血清 TAC 及 LDL 抗氧化能力明显下降, 而 Ox-LDL 水平则明显升高, 这一结果与文献报道基本一致, 提示高脂血症可诱导机体的氧化应激状态, 损伤机体抗氧化能力, 引起 LDL 氧化修饰。西红花酸 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能明显降低家兔血脂水平, 而 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 西红花酸对血脂水平则无明显影响。由于两个剂量的西红花酸均能明显提高血清 TAC 及 LDL 抗氧化能力, 降低血清 Ox-LDL 水平, 且两组间无明显差异($P > 0.05$) 提示西红花酸降低血清 Ox-LDL 水平不依赖于其调血脂作用, 这一结果与 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 西红花酸明显抑制高脂饮食诱导的家兔 AS 相一致¹⁸¹, 提示西红花酸抗 AS 并不依赖于其调血脂作用, 而主要与其提高血清 TAC 及 LDL 抗氧化能力、降低血清 Ox-LDL 水平有关。

血清总抗氧化能力(TAC) 是衡量机体抵抗氧化损伤能力的重要指标, 主要与血清 SOD, GPX 等抗氧化酶活性和血清维生素 E、类胡萝卜素类等活性氧清除剂含量有关。本研究显示, 西红花酸能明显提高血清 SOD, GPX 等抗氧化酶活性, 提示西红花酸提高血清 TAC, 降低 LDL 氧化易感性与提高 SOD 等抗氧化酶活性有关。此外, 西红花酸分子中含有长链共轭多烯结构, 能对多种 ROS 发挥直接清除作用, 这可能也是西红花酸提高血清 TAC 的机制之一。近年来研究发现, 脂溶性类胡萝卜素类化合物玉米黄质和 β -胡萝卜素等可直接掺入 LDL 等脂蛋白, 当脂蛋白受到氧化剂攻击时此类化合物首先被氧化, 从而保护脂蛋白免受氧化修饰⁹¹。由于西红花酸也为脂溶性类胡萝卜素类化合物, 具有相似的化学结构, 推测它也可能通过掺入 LDL 而提高其抗氧化能力。

综上所述, 西红花酸能显著提高高脂血症家兔血清 LDL 抗氧化能力, 降低血清 Ox-LDL 水平, 这一作用并不依赖于其调血脂作用, 而主要与其提高血清 SOD, GPX 等抗氧化酶活性, 提高血清 TAC 有关,

至于其提高抗氧化酶活性的确切机制仍有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis[J]. *Atherosclerosis*, 1998, 141: 1-15.
- [2] Kleinvelde HA, Hak-Lemmers HLM, Stalenhoef AFH, *et al.* Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein[J]. *Clin Chem*, 1992, 38: 2066-2072.
- [3] Wei W, Li CL, Wang YY, *et al.* Hypolipidemic and anti-atherogenic effects of long-term Cholestin (Monascus purpureus-fermented rice, red yeast rice) in cholesterol fed rabbits[J]. *J Nutr Biochem*, 2003, 14: 314-318.
- [4] Zheng SG, Qian ZY, Tang FT, *et al.* Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits[J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70: 1192-1199.
- [5] Hsieh CC, Yen MH, Yen CH, *et al.* Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 49: 135-145.
- [6] Rimm EB, Stampfer MJ. Antioxidants for vascular disease [J]. *Med Clin North Am*, 2000, 84: 239-249.
- [7] Orem A, Yandi YE, Vanizor B, *et al.* The evaluation of autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein (LDL), susceptibility of LDL to oxidation, serum lipids and lipid hydroperoxide levels, total antioxidant status, antioxidant enzyme activities, and endothelial dysfunction in patients with Behcet's disease[J]. *Clin Biochem*, 2002, 35: 217-224.
- [8] Zheng SG, Qian ZY, Sheng L, *et al.* Crocetin attenuates atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits through inhibition of LDL oxidation[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47: 70-76.
- [9] Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 385: 20-27.