

调脂新抗氧化作用的实验研究

瞿晓梅, 刘青云, 赵冬生, 凤 翼(安徽中医学院药理学系, 合肥 230038)

中图分类号: R285.5 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2000)06-0044-03

调脂新(TZX)为一临床经验方,主要由黄芩、生蒲黄、酸枣仁、决明子等6味中药组成,具有燥湿利水,化痰生津功效,用于高脂血症的治疗,对动脉粥样硬化(As)的形成和发展亦有预防及治疗作用。已知As的发生和发展与内皮细胞脂质过氧化损伤密切相关^[1],氧化修饰的脂蛋白,尤其是氧化修饰的低密度脂蛋白(OX-LDL)的研究进一步揭示了As的发病机理,并为其预防、诊断与治疗提供了新的思路^[2]。抑制LDL氧化修饰已成为近年来开发抗As药物的新途径。本文就TZX的抗氧化作用进行了探讨。

1 材料

1.1 动物 Wistar大白鼠,180±30g,雌雄兼用,由省医研所实验动物中心提供。

1.2 药品 TZX药材由安徽中医学院一附院中药房提供,经水煎醇沉后制备成浸膏,临用时NS或PBS稀释成所需浓度。

1.3 试剂 胆固醇:北京市化学试剂公司,

批号:980708,胆盐进口分装,上海化学试剂分装站分装厂,批号:971018;丙基硫氧嘧啶:第二军医大学朝晖制药厂;TBA:上海试剂二厂;三氯醋酸:AR,如皋市化学试剂厂;EDTA-Na₂:中国上海试剂一厂,批号:910710;OX-LDL酶标单抗测定试剂盒、TC酶法试剂盒,上海荣盛生物技术有限公司,批号:980308。

1.4 仪器与设备 721分光光度计:上海分析仪器三厂生产;DG3022型酶联免疫检测仪:南京华东电子管厂;TGL-16型冷冻低温离心机:上海安亭科学仪器厂。

2 方法

2.1 实验性高脂血症大鼠模型的建立 高脂乳剂:参照文献^[3]制备成含10%胆固醇、20%猪油、2%胆盐、1%丙基硫氧嘧啶的脂肪乳剂,每周配制一次,冰箱保存,用时置37℃水浴融化。造模:按1ml乳剂/100g体重/d,给大鼠ig。

2.2 分组及给药 取大鼠24只随机分为正常对照组,高脂模型对照组、TZX大、小剂量

组, 给药组系在造模基础上加 ig TZX 80、40g · kg⁻¹, 每组 6 只动物, 连续给药 400d。

2.3 LPO(MDA) 含量测定 末次给药后禁食 12h, 取血, 3000rpm 离心 10min 分离血清, 并制备组织匀浆。主动脉匀浆: 大鼠放血处死后, 分离主动脉弓至髂动脉分叉处之动脉, 剥离, 称重, 用匀浆器冰水浴中制成 10% 的主动脉 NS 匀浆。肝脏匀浆: 各组取同一部位的肝脏, 用匀浆器制成 10% 肝脏生理盐水匀浆及 10% 肝脏的甲醇-氯仿匀浆。用 TBA 法^[4]测定血清、肝脏、主动脉 NS 匀浆中 LPO (MDA) 含量, 用酶法测肝脏甲醇-氯仿匀浆中之 TC。

2.4 OX-LDL 测定 实验分组、给药同上, 给药 40d 后, 按 OX-LDL 酶标单抗试剂盒说明书要求, 测主动脉匀浆中 OX-LDL 含量。

2.5 体外 Cu²⁺ 对人 LDL 的氧化修饰 LDL 的分离制备: 取健康成年人新鲜静脉血, 自然凝固, 1000g 离心 10min 取血清, 用 PH5.04 的枸橼酸钠缓冲液 (含肝素 50000iu/l) 沉淀 LDL^[5], 沉淀用 1~2 倍于血

清体积的高盐磷酸缓冲液处理^[6]即得 LDL 提取液。LDL 中总胆固醇定量用胆固醇酶法测定试剂盒测定。用 PBS 将 LDL 稀释成含胆固醇 50μg/ml 的 LDL 应用液。分组给药: 取 35 只试管, 每管加入 1ml LDL 应用液, 随机分为 5 组: 空白、模型、TZX 高、中、低剂量组, 空白及模型组加入 1ml PBS, 给药组分别加入用 PBS 溶解的 TZX 药液 1ml, 终浓度分别为 1190.5, 238.1, 47.6μg/ml。Cu²⁺ 对 LDL 的氧化修饰^[7]: 除空白组加入等容量 PBS 外, 其余各组均加入 CuSO₄ 液开始氧化, 使 Cu²⁺ 终浓度为 50μmol/l, 37℃ 孵育 3h, 再加入终浓度为 0.1mmol/l 的 EDTA-Na₂ 终止反应。LDL 氧化程度的判定: 测定 LDL 混悬液中 TBARS(MDA) 的量来判断 LDL 的氧化修饰程度^[8]。

2.6 实验数据处理 各组实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验。

3 结果

3.1 TZX 对高脂大鼠体内 LPO 生成的影响

表 1 TZX 对高脂大鼠各指标的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	肝脏 TC (mmol/100g)	MDA (nmol/100mg)			OX-LDL (μg/dl)
			血清	肝脏	主动脉	
正常对照组	—	231 ± 0.82	3.48 ± 0.38	5.92 ± 1.18	2.44 ± 1.81	23.22 ± 6.25
模型对照组	—	3.23 ± 0.72	5.13 ± 1.26 ^Δ	7.17 ± 1.86	4.04 ± 1.73	33.64 ± 9.79
TZX 小剂量组	40	1.36 ± 1.09**	3.28 ± 0.78*	5.84 ± 1.46	1.72 ± 1.03*	27.82 ± 10.41
TZX 大剂量组	80	2.19 ± 0.47*	2.42 ± 0.17**	5.79 ± 0.35	1.36 ± 0.82**	24.08 ± 8.54

注: 与正常对照组相比: ^Δ*P* < 0.05, ^{ΔΔ}*P* < 0.01; 与模型对照组相比: **P* < 0.05, ***P* < 0.01。(下同)

表 1 结果可见, 高脂模型大鼠体内 MDA 水平均有升高, TZX 大、小剂量对血清及主动脉中 MDA 有明显的降低作用, 与模型组相比对肝组织中 MDA 水平有降低趋势。TZX 大小、小剂量对高脂大鼠肝 TC 水平升高亦有明显的抑制作用。

3.2 TZX 对高脂大鼠动脉壁 OX-LDL 的影响 表 1 结果显示, TZX 大、小剂量对高脂大鼠动脉壁中 OX-LDL 水平的升高有一定的抑制趋势。

3.3 TZX 对体外 Cu²⁺ 诱导的人 LDL 氧化修饰的影响 由表 2 结果可见, Cu²⁺ 体外对

表 2 TZX 对体外人 LDL 氧化修饰的抑制作用 ($n=7, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (μg/ml)	肝脏 TC (mmol/mg)
正常对照组	—	8.9 ± 2.35
模型对照组	—	21.8 ± 3.21 ^{ΔΔ}
TZX 高剂量组	1190.5	11.9 ± 2.44**
TZX 中剂量组	238.1	17.5 ± 1.83**
TZX 低剂量组	47.6	21.7 ± 4.62

LDL 有明显的氧化修饰作用($P < 0.01$)。TZX 高、中剂量可显著地抑制这几种氧化修饰,三个剂量组对 Cu^{2+} 诱导的 LDL 氧化修饰的抑制效应呈明显的剂量相关性。

4 讨论 我们曾报道 TZX 可调节脂质代谢,抑制高脂饮食所致的 As 早期病理改变^[9]。本文研究结果显示 TZX 可明显降低高脂大鼠血清及主动脉中 LPO 水平,对主动脉中 OX-LDL 升高有一定的抑制趋势,显著抑制体外 Cu^{2+} 对人 LDL 的氧化修饰。表现出明显的抗氧化作用,这可能是其抑制 As 的重要机理之一。

参考文献:

- [1] 周玫,陈瑗. 内皮细胞脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化[J]. 中华心血管病杂志, 1990, 18(4): 248~ 250.
- [2] Parthasarathy S, Steinberg D, Wittum JL. The role of oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of Atherosclerosis [J]. Annu. Rev. Med, 1992, 43: 219~ 225.
- [3] 刘明,董超仁,苏静怡. 一种简便实用的大鼠高血脂症模型[J]. 中国药理学通报, 1989, 5(2): 119~ 121.
- [4] 陈顺志,金有余,李常孝,等. 过氧化脂质 TBA 显色的三种方法学比较[J]. 临床检验杂志, 1984, 2(1): 8~ 10.
- [5] Wieland H, Seidel D. A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins [J]. J lipid Res, 1983, 24(3): 904~ 909.
- [6] 姜远英,曾华武,李全力,等. 改良沉淀法快速分离制备人血清低密度脂蛋白[J]. 第二军医大学学报, 1997, 18(4): 389~ 391.
- [7] 姜远英,曾华武,李全力,等. α -甲基-4(3-氧-2H-1, 2-苯并异噻唑-2-基) 苯乙酸对 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 氧化修饰人 LDL 的抑制作用[J]. 中华病理学与毒理学杂志, 1998, 12(1): 28~ 31.
- [8] Cathcart MK, McNally AK, Chisolm GM. Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex [J]. J lipid Res, 1991, 32(1): 63~ 70.
- [9] 瞿晓梅,刘青云,翟必华,等. 调脂新的降脂及抗动脉粥样硬化作用研究[J]. 中成药, 1997, 19(1): 30~ 31.