

L-精氨酸对高脂血症家兔血浆脂蛋白、 一氧化氮和脂过氧化物的影响

杨永宗 陈颜芳^① 刘易林^② 林曙光^① 焦鸿丽 王周亮^② 丁翠芬^② 万腊香 杨和平
(衡阳医学院分子生物学研究中心, ②第二附属医院心血管内科, 衡阳 421001)

Effect of L-arginine on Lipoprotein, Nitric Oxide and Lipid Peroxide in Hypercholesterolaemic Rabbits

YANG Yong-Zong, CHEN Yan-Fang^①, LIU Yi-Lin^②, LIN Xu-Guang^①, JIAO Hong-Li, WANG Zhou-Lian, DIN Cui-Fen^②, WAN La-Xian, YANG He-Ping
(Molecular Biology Center, ②The Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical College, Hengyang 421001; ①Guangdong Institute of Cardiovascular Disease, Guangzhou 510080; China)

ABSTRACT We reported the effect of L-arginine on lipoprotein, nitric oxide (NO), lipid peroxide (LPO) and superoxide dismutase (SOD) in hypercholesterolaemic rabbit. The results showed that 2% L-arginine fed in company with 2% cholesterol for 90 days and 4% L-arginine orally administrated for 90 days after 2% L-arginine and 2% cholesterol could significantly protect the activity NO and SOD, decrease the LPO content. L-Arg/NO may reduce the oxidative modification of LDL of hypercholesterolaemic rabbit.

KEY WORDS Hypercholesterolemia; rabbit; Lipid peroxidation; Nitric oxide; L-arginine; Lipoprotein

摘要 用雄性新西兰白兔观察了L-精氨酸对高脂血症时血浆脂蛋白、血清一氧化氮、脂过氧化物和超氧化物歧化酶的影响。结果发现2%L-精氨酸与2%胆固醇同时喂养90天,或喂养90天以后4%L-精氨酸治疗90天,均能有效地抑制高胆固醇所致血清脂过氧化物的升高,提高高脂血症家兔血清超氧化物歧化酶活性,促进血管内皮细胞一氧化氮的释放。结果提示,L-精氨酸/一氧化氮可能有抗高脂血症家兔低密度脂蛋白氧化修饰的作用。

关键词 L-精氨酸; 高脂血症, 家兔; 脂过氧化物; 一氧化氮; 脂蛋白

已有实验资料表明,高脂血症可引起一氧化氮(nitric oxide, NO)活性降低和血清脂过氧化物增加,从而导致血管内皮损伤,白细胞与内皮细胞间粘附加强,内皮细胞对低密度脂蛋白的氧化修饰加快,促使动脉粥样硬化病变的形成。L-精氨酸的代谢产物NO或其他相关成份是重要的内皮源性舒张因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)^[1,2],不仅可扩张血管,而且能抑制单核细胞-内皮细胞间的相互作用^[3-9],降低血小板粘附聚集反应^[10-11],减少血管平滑肌细胞增殖^[12]。近年来本实验室发现,给实验性高脂血症家兔加饲L-精氨酸,不仅可改善内皮依赖性舒张功能,而且可明显抑制动脉粥样硬化病变形成^[8,9]。本研究进一步观察L-精氨酸对实验性高脂血症家兔血浆脂蛋白、NO和脂过氧化物的影响,以探讨L-精氨酸抗动脉粥样硬化功效的可能机理。

1 材料和方法

1.1 动物模型制作

① 广东省心血管病研究所,广州 510080
② 广州军区南岳制药厂,衡阳 421002

实验用雄性新西兰白兔 36 只, 体重 2.0~2.4 kg, 一般状况良好。实验前喂基础饲料 1 周以稳定血脂水平和代谢状况。然后随机将实验动物分为三组, 每组 12 只: ①正常对照组喂以基础饲料; ②胆固醇组喂含 2% 胆固醇的基础饲料; ③精氨酸组喂以含 2% 胆固醇加 2% L-精氨酸的基础饲料。实验第 90 天, 各组随机处死家兔 6 只, 收集血样本, 分别测定各项指标。余下的动物按下述方法继续喂养: ①正常对照组继续喂基础饲料; ②胆固醇组停喂胆固醇饲料, 改喂基础饲料; ③精氨酸组停喂胆固醇, 改喂含 4% L-精氨酸的饲料。在实验第 180 天处死动物, 收集血样, 测定各项指标。

1.2 血清一氧化氮水平测定

血清 NO 微量测定参照文献[13], 取血清 500 μ l, 加入 35% 磺基水杨酸 100 μ l 沉淀蛋白, 离心(-4 $^{\circ}$ C, 10 000 \times g, 15 min), 取上清液 100 μ l, 加 Griess 试剂和 4 mol \cdot L $^{-1}$ HCl 各 100 μ l, 室温反应 10 min, 用酶联免疫仪在 570 nm 读光密度。同时以亚硝酸盐作标准曲线, 结果以 NO 转变为亚硝酸盐 mg \cdot L $^{-1}$ 表示。

1.3 血浆脂蛋白分离

1.3.1 血浆密度的调整 血液用 EDTA(2 g \cdot L $^{-1}$) 抗凝, 尽快分离血浆, 血浆的密度借加入不同量固体 KBr 加以调整。按公式 $g = \frac{v(df-di)}{1-0.312(df)}$ 加入 KBr 的量。式中 g: 应加入固体 KBr 的克数, v: 血浆总体积的毫升数, d: 密度 kg \cdot L $^{-1}$, di: 血浆开始时的密度, df: 血浆需调整的密度, 0.312: KBr 的分布比容。

1.3.2 极低密度脂蛋白的分离 将血浆(d=1.006)置于超速离心机, 于 40 000~42 000 r \cdot min $^{-1}$, 8 $^{\circ}$ C 下离心 18 h, 离心后, d<1.006 的乳糜微粒及极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)即悬浮于离心管的上层, 用吸管收集。

1.3.3 低密度脂蛋白的分离 将上步操作各离心

管下层液体合并, 并于 4 $^{\circ}$ C 下混匀, 然后加入固体 KBr 使最终密度为 d>1.063, 再置超速离心机(40 000~42 000 r \cdot min $^{-1}$, 8 $^{\circ}$ C)离心 20 h。收集离心管顶部的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。

1.3.4 高密度脂蛋白的分离 先将离心管上层及底层之间无色透明的溶液吸出弃去, 然后将各管下层液收集、合并、混匀, 再加固体 KBr 将密度调整至 d=1.21, 置超速离心机(50 000 r \cdot min $^{-1}$, 8 $^{\circ}$ C)离心 24 h。上层淡黄色液层即高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)。

1.3.5 蛋白浓度定量采用 Lowry's 法。

1.3.6 LDL 凝胶电泳按常规方法。

1.4 血清总胆固醇和甘油三酯的测定

分离家兔血清, 用酶试剂(温州东欧生化试剂厂)测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)。

1.5 血清脂过氧化物及超氧化物歧化酶测定

分离血清, 按文献[14]测定血清脂过氧化物(lipid peroxide, LPO)含量, 结果以 μ mol \cdot L $^{-1}$ 丙二醛表示。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定参照文献[15,16]方法进行, 结果以 kU \cdot L $^{-1}$ 表示。

2 结果

2.1 血浆总胆固醇和甘油三酯水平

三组动物血浆 TC 和 TG 水平见 Table 1。可见喂饲含 2% 胆固醇的饲料 90 天后, 胆固醇组和精氨酸组动物这两类脂质显著升高。其中 TC 分别比对照组增加 16 倍($P<0.001$), TG 增加 33% 和 30% ($P<0.05$)。继续喂养 90 天后。两组动物血浆 TG 与对照组无显著性差异 ($P>0.05$)。

Table 1. Serum concentrations of total cholesterol and triglyceride in rabbit ($\bar{x} \pm s$, mg \cdot L $^{-1}$)

Groups	the first 90 days		the second 90 days	
	TC	TG	TC	TG
control	580 \pm 50	610 \pm 100	540 \pm 40	580 \pm 160
HCD ^①	9 950 \pm 1 530 ^d	790 \pm 130 ^b	1 160 \pm 590 ^c	590 \pm 140 ^a
HCD+L-Arg ^②	9 750 \pm 1 410 ^d	810 \pm 150 ^b	1 070 \pm 430 ^c	540 \pm 150 ^a

①HCD; high cholesterol diet group, ②HCD+L-Arg; HCD+L-Arginine group. a: $P>0.05$, b: $P<0.05$, c: $P<0.01$, d: $P<0.001$, compared with control group.

2.2 L-精氨酸对血清一氧化氮含量的影响

三组动物血清 NO 含量变化见 Figure 1。

可见第 90 天精氨酸组动物血清 NO 含量明显高于胆固醇组(120 \pm 15 对 61 \pm 6, $P<0.01$; 计

量单位 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,下同)而与对照组相近(120 ± 15 对 $125 \pm 18, P > 0.05$)。第180天精氨酸组动物血清NO含量与第90天相比,仅增加5% ($P > 0.05$),仍与对照组相近(126 ± 14 对 $129 \pm 20, P > 0.05$),明显高于胆固醇组(126 ± 14 对 $90 \pm 9, P < 0.05$)。然而,第180天胆固醇组动物NO含量比第90天增加48%,两者相比,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

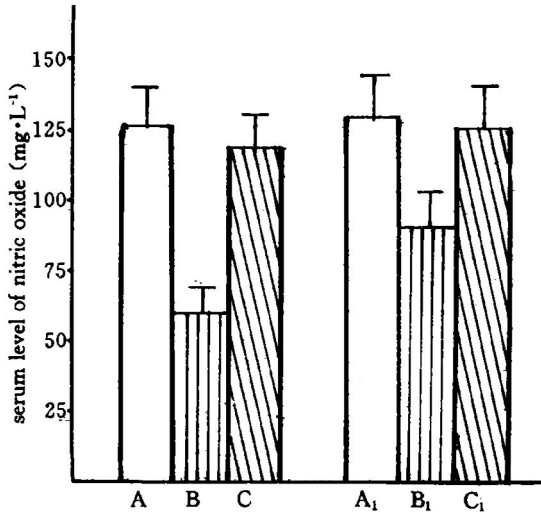


Figure 1. Effect of L-arginine on serum levels of nitric oxide in hypercholesterolaemic rabbits ($\bar{x} \pm s$). A: control group; B: cholesterol group; C: L-arginine group; A₁: control group; B₁: standard diet was administrated for 90 days after 2% cholesterol; C₁: 4% L-arginine was administrated for 90 days after 2% cholesterol + 2% L-arginine; the same below. A vs B, B vs C, A₁ vs B₁ and B₁ vs C₁, all of $P < 0.01$.

2.3 L-精氨酸对血清脂过氧化物含量和超氧化物歧化酶活性的影响

L-精氨酸对家兔血清LPO含量和SOD活性的影响见Figure 2和Figure 3。从Figure 2中可见,第90天精氨酸组动物血清LPO含量显著低于胆固醇组(11.0 ± 1.2 对 $15.4 \pm 3.2, P < 0.05$;计量单位 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,下同),而与对照组无显著性差别(11.0 ± 1.2 对 $8.6 \pm 1.1, P > 0.05$)。第180天时胆固醇组虽然因停喂胆固醇以致血清LPO含量下降了18%,但精氨酸

组仍明显低于前者(12.6 ± 2.9 对 $9.9 \pm 2.7, P < 0.05$),而与正常对照组(9.1 ± 1.0)相近。

从Figure 3中可见,血清SOD活性变化与上述LPO含量变化相反。精氨酸组动物血清SOD活性无论是第90天,还是第180天,均明显高于胆固醇组(前者 315 ± 15 对 $164 \pm 10, P < 0.01$;后者 $344 \pm 15273 \pm 13, P < 0.05$;计量单位 $\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$,后同),而与对照组(分别为 362 ± 14 和 358 ± 14)无显著性差别($P > 0.05$)。

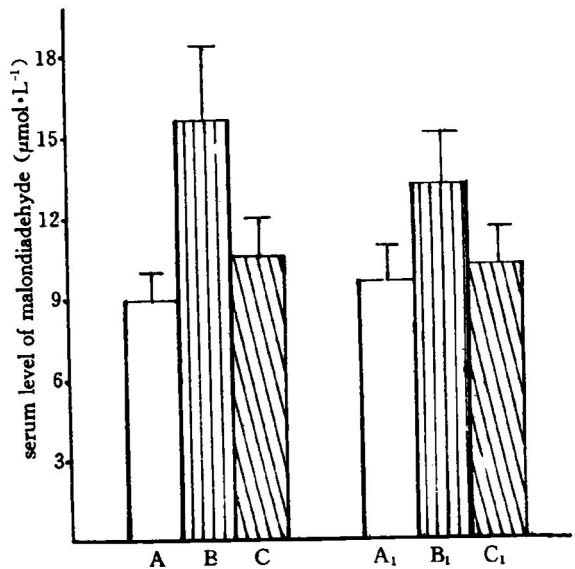


Figure 2. Effect of L-arginine on serum levels of malondialdehyde in hypercholesterolaemic rabbits ($\bar{x} \pm s$). A vs B, B vs C, A₁ vs B₁ and B₁ vs C₁, all of $P < 0.01$.

2.4 对血浆脂蛋白的影响

喂胆固醇饲料第90天精氨酸组血浆脂蛋白变化与胆固醇组相似,均见LDLC和VLDLC量明显增加,而HDLC没有改变。停喂胆固醇饲料,实验第180天两组血浆脂蛋白中LDLC和VLDLC量均有所下降,HDLC含量有所上升,两组变化无明显差别(Table 2)。

2.5 低密度脂蛋白凝胶电泳

从LDL电泳谱可以看到胆固醇组LDL迁移率明显增快,而精氨酸组LDL迁移率虽比正常对照组快,但其程度明显低于胆固醇组(Figure 4)。

Table 2. Concentration of serum lipoprotein in each rabbit group (mg · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

Group	90 days of prevention			90 days of treatment		
	VLDLC	LDLC	HDLC	VLDLC	LDLC	HDLC
control	210 ± 60	960 ± 130	160 ± 40	200 ± 50	940 ± 140	140 ± 30
HCD	410 ± 70 ^b	1 830 ± 210 ^b	150 ± 50 ^c	350 ± 60 ^b	1 230 ± 160 ^b	190 ± 70 ^b
HCD+L-Arg	370 ± 60 ^c	1 740 ± 270 ^c	170 ± 60 ^c	340 ± 80 ^c	1 1260 ± 160 ^c	210 ± 80 ^c

control, standard diet group. HCD; ① 2% cholesterol administrated 90 days as control of 2% cholesterol + 2% L-arginine group; ② Standard diet was administrated 90 days after 2% cholesterol as control of 4% L-arginine group. HCD+L-Arg; ① 2% cholesterol + 2% L-arginine was administrated 90 days (90 days of prevention); ② 4% L-arginine was administrated 90 days after 2% cholesterol + 2% L-arginine (90 days of treatment). a, P > 0.05 compared with control group; b and c, P < 0.01 compared with control group; c, P > 0.05 compared with HCD group.

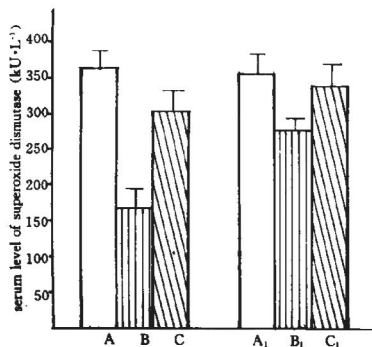


Figure 3. Effect of L-arginine on serum levels of superoxide dismutase in the hypercholesterolaemic rabbits ($\bar{x} \pm s$). A vs B, B vs C, A₁ vs B₁, B₁ vs C₁, all of P < 0.01.

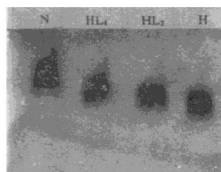


Figure 4. Changes of agarose gel electrophoretic mobility of LDL. N: normal group. HL₁: 4% L-arginine was administrated 90 days after 2% cholesterol + 2% L-arginine. HL₂: 2% cholesterol + 2% L-arginine was administrated 90 days. H: 2% cholesterol was administrated 90 days.

3 讨论

我们实验室的工作发现, L-精氨酸可明显抑制家兔实验性动脉粥样硬化病变成形^[6, 52], 但其机理尚未阐明. 本研究结果发现, 长时间加喂 L-精氨酸并不显著改变高脂血症兔的血脂水平和各脂蛋白的含量. 显然 L-精氨酸的抗动脉粥样硬化功效并不是通过减少致粥样硬化作用的 LDL 或增加具有抗粥样硬化作用的 HDL 的量来实现. 值得重视的是, LDL 量没有显著差别, 但凝胶电泳谱显示各组动物的 LDL 迁移率明显不同. 高胆固醇组的 LDL 迁移率较对照组明显增快, 这说明 LDL 已被氧化后负电荷增加, 而精氨酸组动物 LDL 迁移率虽比对照组有所加快, 但远不比高胆固醇组明显. 据此可以推测 L-精氨酸可能抑制 LDL 的氧化修饰过程. 本实验测定的各组动物血清 LPO 含量的差别, 精氨酸组 LPO 含量显著低于高胆固醇组而接近对照组, 就进一步支持上述设想.

一氧化氮是 L-精氨酸的代谢产物, 已有许多实验结果表明 NO 的释放量与 L-精氨酸量呈密切的剂量依赖关系^[17-19]. 显然可以设想 L-精氨酸的抑制 LDL 氧化修饰过程和抗动脉粥样硬化的生物学性能, 可能是通过增加 NO 释放, 提高 NO 活性而发挥作用. 已有文献报道, 高脂血症时 NO 活性明显降低^[20-24]. 而 NO 具有明显的抗氧化作用. Mao 等^[25]报道 NO 可有效地预防巨噬细胞对 LDL 的氧化修饰作用, 其氧化程度与 NO 产量成反比. Clancy 等^[26]根据实验结果指出, NO 可能直接作用于

NADPH 氧化酶而抑制超氧负离子的产生。这些文献资料也提示 L-精氨酸抑制 LDL 氧化, 减少 LPO 生成, 可能与其增加内皮细胞 NO 的生成与释放有关。

已有资料报道 L-精氨酸可改善高脂血症病人内皮依赖性血管舒张功能, 可抑制高脂血症时内皮粘附性增强, 可减轻动脉损伤后的内膜增生程度。本实验还观察到 L-精氨酸可提高高脂血症时 SOD 活性。显然 L-精氨酸的这些生物活性均有助于抑制动脉粥样硬化病变过程, 但这些复杂的作用是否都通过增加 NO 的生成与释放来实现, 还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988, **333**: 664~666.
- 2 Rees DD, Palmer RM, Schulz R, et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 1990, **101**: 746~752.
- 3 Cooke JP, Tsao P. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation*, 1993, **88**: 2 451~54.
- 4 Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide, an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 4 651~55.
- 5 Bath PMW, Hassall DG, Gladwin A-M, et al. Nitric oxide and prostacyclin; divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 254~260.
- 6 Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation*, 1992, **86**: 279~288.
- 7 Siegfried MR, Carey C, Ma XL et al. Beneficial effects of SPM-5185, a cysteine-containing NO donor in myocardial ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*, 1992, **263**: H771~H777.
- 8 杨爱莲,唐显庆,王小平, et al. L-精氨酸能改善血管内皮依赖性舒张和抗动脉粥样硬化损伤. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3**(1): 36~39.
- 9 杨和平,杨爱莲,王小平, et al. L-精氨酸抗家兔动脉粥样硬化内皮损伤. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3**(1): 40~44.
- 10 Provost P, Lam JYT, Lacoste L, et al. Endothelium-derived nitric oxide attenuates neutrophil adhesion to endothelium under arterial flow conditions. *Arterioscler*

- Thromb*, 1994, **14**: 331~335.
- 11 Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, Nitric oxide, and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol*, 1987, **92**: 181~187.
- 12 Stamler JS, Mendelsohn ME, Amarante P, et al. N-Acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor. *Circulation Res*, 1989, **65**: 789~795.
- 13 Termin A, Hoffmann M, Bing RJ. A simplified method for the determination of nitric oxide in biological solutions. *Life Sciences*, 1992, **51**: 1 621~29.
- 14 Ohkaws H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, **95**: 351~358.
- 15 Mardland S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 1974, **74**: 469~474.
- 16 季健平,吴再彬,刘波山, et al. 超氧化物歧化酶超微量快速测定法. *南京铁道医学院学报*, 1991, **10**: 27~30.
- 17 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Res*, 1991, **43**: 109~42.
- 18 Ward SM, Mcheen ES, Sanders KM. Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory function potentials in canine ileocolonic sphincter. *Br J Pharmacol*, 1992, **105**: 776.
- 19 Kitamura K, Lian Q, Carl A, et al. S-nitrosocysteine, but not sodium nitroprusside, produces apamin-sensitive hyperpolarization in rat gastric fundus. *Br J Pharmacol*, 1993, **109**: 415-23.
- 20 Drexler H, Zeiher Am, Meinzer K et al. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet*, 1991, **338**: 1 546~50.
- 21 Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, et al. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1 248~53.
- 22 Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H. et al. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation*, 1994, **89**: 2 176~82.
- 23 Hamon M, Vallet B, Bateurs C, et al. Long-term oral administration of L-arginine reduces intimal thickening and enhances neointelium-dependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury. *Circulation*,

- 1994, **90**: 1 357~62.
- 24 Tarry WC, Makhoul RG. L-arginine improves endothelium-dependent vasorelaxation and reduces intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 938~943.
- 25 Mao S, Yates M, Lambert L, et al. Nitric oxide protects the oxidative modification of low density lipoprotein by macrophages. *FASEA J*, 1992, **6**: A1 030(abstract).
- 26 Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxidation production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1 116~21.

(本文 1995-08-31 收到)