

黑米皮抗载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠 动脉粥样硬化形成及机制

夏 敏, 凌文华, 马 静, 张玉梅, 唐志红, 吴聪娥

(中山大学公共卫生学院, 广东省广州市 510089)

[主题词] 黑米皮; 低密度, 脂蛋白, 氧化型; 抗体,

[摘 要] 为研究黑米皮对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠血清抗氧化型低密度脂蛋白抗体水平的影响, 探讨黑米皮抗动脉粥样硬化作用的机制。选用载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠进行实验, 通过在载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠普通饲料 AIN-93 中添加 5% 黑米皮, 检测载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠主动脉窦动脉粥样斑块面积和血清抗氧化型低密度脂蛋白抗体的水平。结果发现, 黑米皮可降低载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠主动脉窦动脉粥样斑块面积以及血清中抗氧化型低密度脂蛋白抗体的水平, 且二者之间呈显著性相关($r = 0.638, P < 0.01$)。这表明黑米皮的抗动脉粥样硬化作用可能与其降低抗氧化型低密度脂蛋白抗体水平有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Black Rice Outlayer Fraction on Atherosclerotic Plaque Formation in Apolipoprotein E-deficient Mice and its Mechanism

XIA Min, LING WenHua, MA Jing, ZHANG Yu-Mei, TANG Zhi-Hong, and WU Cong-E

(School of Public Health, Zhongshan University, Guangzhou 510089, China)

[MeSH] Black Rice Outlayer Fraction; Lipoprotein, LDL, Oxidized; Antibody

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of black rice outlayer fraction (BRF) on atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice and find the possible mechanisms of BRF in anti-atherogenesis. **Methods** After 16 weeks intervention by 5% BRF, the atherosclerotic lesion area in aortic sinus were assessed by the method of image analysis and the serum anti-ox-LDL antibody levels were determined by ELISA. **Results** Serum anti-ox-LDL antibody levels in BRF group were lower than positive group and WRF group. This results correlated with the lesion area in aortic sinus. **Conclusion** BRF has dramatically reduced serum anti-ox-LDL antibody levels and this effect may be related to its anti-atherogenesis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种复杂的多因素疾病,其发病的分子和细胞机制至今尚未完全明确。近年来,大量研究表明氧化应激及此过程中产生的过量活性氧是As发生的一个重要的促进因素。当机体氧化应激水平升高时,低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)氧化修饰,产生氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox-LDL)。ox-LDL可刺激机体产生抗ox-LDL抗体,促进As的发生,血清抗ox-LDL抗体的水平是反映机体氧化应激水平的一个重要指标。本实验通过研究黑米皮对载脂蛋白E基因缺陷小鼠血清抗ox-LDL抗体形成的影响,探讨黑米皮的抗As作用的机制。

[收稿日期] 2002-06-12 [修回日期] 2002-09-25

[作者简介] 夏敏,男,1976年出生,安徽巢湖人,中山大学公共卫生学院2002级毒理学博士研究生,联系电话020-87330615, E-mail为xiamin1976@yahoo.com.cn。凌文华,男,1955年出生,安徽合肥人,教授,博士研究生导师,中山大学公共卫生学院院长,联系电话020-87331597, E-mail为whling@gzsums.edu.cn。马静,女,1957年出生,云南昆明人,副教授,中山大学公共卫生学院医学营养系,联系电话020-87331811。

1 材料与方法

1.1 试剂

新鲜健康人血浆购自广州市中心血站。酶标板购自Nunc Maxisorp公司。Lowry's法测定试剂盒购自Sigma公司。血清抗ox-LDL抗体测定试剂盒(Protein Detector™ ELISA Kit)购自Kirkegaard Perry Labs公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物和分组

45只雄性4周龄载脂蛋白E基因缺陷小鼠(品系为C57BL/6J,美国Jackson实验室)按体重随机分为3组:阳性对照组(positive group)、黑米皮组(black rice outlayer fraction group, BRF group)和白米皮组(white rice outlayer fraction group, WRF group),每组15只;15只雄性4周龄同一品系小鼠作为阴性对照组(control group)。

1.3 动物饲料

小鼠饲料是以美国营养学会1993年出版的啮齿类动物纯化饲料AIN-93^[1]作为基础饲料。不同实

验组小鼠饲料配方见表 1 (Table 1)。

表 1. 不同实验组小鼠饲料配方及营养成分.

Table 1. Dietary Formulation of mice in different groups (g/kg)

成 分	阴性对照组	阳性对照组	黑米皮组	白米皮组
玉米淀粉	397.486	397.486	369	364.5
酪蛋白	200	200	191.5	193
糊精	132	132	132	132
蔗糖	100	100	100	100
大豆油	70	70	65	67
纤维素	50	50	50	50
矿物质混合物	35	35	35	35
维生素混合物	10	10	10	10
L-半胱氨酸	3	3	3	3
枸橼酸胆碱	2.5	2.5	2.5	2.5
叔丁基对苯二酚	0.014	0.014	0.014	0.014
黑米皮	-	-	50	-
白米皮	-	-	-	50

1.4 动物饲养及处理

将各组实验小鼠按组别在层流架中分笼喂养, 自由摄食, 饮高压消毒自来水。动物房室内温度控制在 24℃ 左右, 每两天用紫外灯消毒一次, 以保持层流架的无菌环境。每周称小鼠体重, 喂养 16 周后经小鼠眼眶静脉采血, 分离出小鼠血清, -20℃ 保存待测, 并取出各组实验小鼠的心脏。

1.5 小鼠主动脉窦的动脉粥样斑块面积的评价

取小鼠主动脉窦, 制作冰冻切片, 油红 O 染色, 将动脉粥样斑块呈红色。全自动图像分析系统 (Kontron IBAs 2.5, 德国) 分析各实验组小鼠主动脉窦动脉粥样斑块面积以及主动脉窦的管腔面积, 以动脉粥样斑块面积与管腔面积的比值来表示各实验组小鼠动脉粥样斑块的大小。

1.6 血浆低密度脂蛋白的分离、修饰和鉴定^[2,3]

采用密度梯度离心法分离血浆低密度脂蛋白。Lowry's 法检测 LDL 蛋白含量。采用 Cu²⁺ 氧化法对低密度脂蛋白进行氧化修饰。LDL 纯度和氧化程度用琼脂糖凝胶电泳法鉴定, 以相对迁移率 (relative electrophoretic mobility, REM) 来反映 LDL 的修饰程度。电泳结果发现 ox-LDL 的 REM 为 1.4。

1.7 小鼠血清抗氧化型低密度脂蛋白抗体水平的测定^[4]

根据试剂盒 Protein Detector™ ELISA Kit 说明书。用 1× 包被液将制备的 ox-LDL 和天然 LDL 的浓度

稀释至 10 mg/L, 然后在酶标板中 4℃ 下孵育过夜, 倒去酶标板中的液体, 扣干残余液体, 加入 300 μL 封闭液, 室温下孵育 2 h。倒去酶标板中的液体, 扣干残余液体, 加入用封闭液按 1:50 稀释的小鼠血清, 4℃ 下孵育过夜。用洗液洗三次, 然后加入用封闭液按 1:10 000 稀释的二抗溶液 (碱性磷酸酶结合的羊抗小鼠 IgG), 室温下孵育 1 h。充分洗涤后, 加入 100 μL 底物溶液, 反应 30 min 后, 加入 100 μL 反应中止液。在酶标仪上取波长为 405 nm 下读数。血清中抗 ox-LDL 抗体的水平是用 ox-LDL 与天然 LDL 的吸光度 (Optical Density, OD) 的差值来表示。

2 结果

2.1 不同实验组小鼠体重和进食量的变化

在实验开始时, 四组实验小鼠每组的平均体重为 17±1 g, 16 周后, 各组小鼠的平均体重为 26±1 g, 不同实验组小鼠体重均值无显著性差异 ($P>0.05$)。四组实验小鼠在实验期间日平均进食量亦无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.2 黑米皮和白米皮主要营养成分的比较

根据我实验室和加拿大 Forbes MediTech 公司对黑米皮和白米皮营养成分的检测数据。发现黑米皮与白米皮的蛋白质、脂肪和粗纤维含量相似, 白米皮糖类物的含量高于黑米皮。黑米皮中的维生素和

微量元素如硒、铁、锌等含量较高。黑米皮总黄酮的含量比白米皮高 5.4 倍。

2.3 不同实验组小鼠主动脉窦动脉粥样斑块面积的比较

显微镜下可见阳性对照组、黑米皮组和白米皮组小鼠主动脉窦均有不同程度的红色中性脂肪的聚积,而阴性对照组未发现有中性脂肪的聚积。图像分析发现各实验组小鼠主动脉窦动脉粥样斑块面积与管腔面积的比值可见,黑米皮组小鼠主动脉窦动脉粥样斑块面积占管腔面积百分比的均值低于阳性对照组和白米皮组($P < 0.05$),黑米皮组的主动脉窦动脉粥样斑块面积(13.54%)比阳性对照组(26.25%)低 48.42%;白米皮组和阳性对照组之间主动脉窦粥样斑块面积差异无显著性(表 2, Table 2)。

表 2. 不同实验组小鼠主动脉窦粥样斑块面积的比较.

Table 2. The lesion area in the aortic sinus of different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$).

Groups	Atherosclerotic Plaque Area
Control	0
Positive	26.3% $\pm$ 9.2%
BRF	13.5% $\pm$ 4.1% ^a
WRF	25.1% $\pm$ 7.1%

a: $P < 0.05$, compared with positive group and WRF group.

2.4 不同实验组小鼠血清抗氧化型低密度脂蛋白抗体水平的比较

各组小鼠血清抗氧化型低密度脂蛋白抗体水平见表 3 (Table 3)。可见阳性对照组血清中抗 ox-LDL 抗体的水平高于阴性对照组($P < 0.05$),说明载脂蛋白 E 基因敲除后,血清抗 ox-LDL 抗体的产生增加,机体氧化应激水平升高。黑米皮组与阳性对照组相比,抗 ox-LDL 抗体的水平降低,差异具有显著性($P < 0.05$)。白米皮组与阳性对照组之间抗 ox-LDL 抗体的水平差异无显著性($P > 0.05$)。血清中抗 ox-LDL 抗体的水平与主动脉窦动脉粥样斑块面积百分比的均值呈显著性相关($r = 0.638$, $P < 0.01$)。

3 讨论

虽然 As 的发病机理至今尚未完全明确,但大量研究表明,氧化应激及此过程中产生的过量的 ROS 是动脉粥样硬化发生的一个促进因素,增强的氧化应激可以损伤血管内皮细胞和平滑肌细胞,还能促进 LDL 的氧化,加速动脉脂质斑块的形成和发展。

表 3. 不同实验组小鼠血清抗 ox-LDL 抗体的水平.

Table 3. The serum anti-ox-LDL antibody levels of mice in different groups ($\bar{x} \pm s$, %, $n = 15$).

Groups	Optical Density
Control	0.012 $\pm$ 0.001
Positive	0.079 $\pm$ 0.028
BRF	0.036 $\pm$ 0.013 ^a
WRF	0.061 $\pm$ 0.020

a: $P < 0.05$, compared with positive group and WRF group.

低密度脂蛋白(LDL)的氧化是 As 发生和发展过程中关键的影响因素。LDL 在机体内氧化修饰后产生 ox-LDL, ox-LDL 具有免疫原性,能刺激机体产生抗 ox-LDL 抗体,血清中可以检测到抗 ox-LDL 自身抗体^[5]。现在的研究认为,ox-LDL 自身抗体的滴度增加是体内 LDL 氧化易感性增加的一个生物标志物,反映了机体氧化应激的水平。患有与氧化应激有关疾病的病人,血清中抗 ox-LDL 自身抗体滴度增加^[6]。

在本研究中,阳性对照组和白米皮组的血清中抗 ox-LDL 抗体的水平高于黑米皮组($P < 0.05$),阳性对照组与白米皮组之间无显著性差异($P > 0.05$),这一结果表明黑米皮抑制了载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠血清中抗 ox-LDL 抗体的产生,降低了载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠体内氧化应激水平。通过进一步分析发现实验鼠血清中抗 ox-LDL 抗体的水平与动脉粥样斑块面积的大小呈显著正相关($P < 0.01$)。这提示黑米皮抗载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠 As 形成的作用可能与其降低机体氧化应激水平,减少脂质过氧化有关。

在对黑米的研究中发现:黑米比白米的抗氧化作用强,对氧自由基具有很强的清除作用。不仅如此,黑优粘米酶解水提液能显著提高小鼠肝脏超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和全血谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的活性,降低肝脏脂过氧化物(lipid peroxide, LPO)的含量^[7]。文献[8]报道,以 12 个种皮颜色深浅不同的代表性黑米品种为材料,发现其黑米水提液和醇提液对超氧阴离子的清除率与其黄酮和种皮色素含量呈显著性负相关。我们据此结果认为,黑米皮的抗 As 作用可能是与其米皮中黄酮类化合物的抗氧化作用,降低机体氧化应激水平有关。

从黑、白米皮营养成分的分析中可以看出,本次研究采用的黑米皮总黄酮含量为 64 mg/g,黑米皮与白米皮相比,总黄酮的含量差异很大,较白米皮的含

量(12 mg/g)高 5.4 倍。黑米皮中的总黄酮物质主要是由黑色素组成,后者是一类水溶性的花色素(anthocyanidin)及其苷类物质(anthocyanin),其中以花青定-5-葡萄糖苷(cyanidin-5-glucoside)为主。花色素具有 C6C3C6 基本骨架, C3 多带有羟基,它与黄酮(flavone)、异黄酮(isoflavone)、二氢黄酮(flavanone)、儿茶素(catechins)及它们的衍生物,总称为黄酮类物质(flavonoids)。黄酮类物质具有良好的抗氧化性能和清除自由基的作用,其许多生理功能都与之相关联。研究发现,黄酮类化合物槲皮素(querceetin)可以抑制 15-脂氧酶(15-lipoxygenase)所诱导的 LDL 的氧化和脂质过氧化^[9],槲皮素和儿茶素(catechin)还能降低 LDL 的氧化易感性和 LDL 聚集性^[10]。

黑米皮中的微量元素硒、锌和维生素 E 的含量与白米皮也有较大差异,研究发现它们能够降低机体 LPO 的生成,降低机体氧化应激水平^[11-13]。黑米皮中较高含量的硒、锌和维生素 E 也可能参与了黑米皮抗 As 作用。至于何种成分起主要作用还有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr*, 1993, **123** (11): 1 939-951
- [2] Wang X, Greilberger J, Ledinski G, et al. Binding and uptake of differently oxidized low density lipoprotein in mouse peritoneal macrophages and THP-1 macrophages: involvement of negative charges as well as oxidation-specific epitopes. *J Cell Biochem*, 2001, **81** (3): 557-569
- [3] 王淳本, 宗义强, 吴万生, 等. 两步超速离心法快速分离大量血浆极低密度脂蛋白及低密度脂蛋白. 同济医科大学学报, 1995, **24** (3): 169-171
- [4] Shaish A, George J, Gilburd B, et al. Dietary β carotene and tocopherol combination does not inhibit atherogenesis in an apo E deficient mouse model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (6): 1 470-475
- [5] Parlinski W, Tangirala RK, Miller E, et al. Increased autoantibody titers against epitopes of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice with increased atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15** (10): 1 569-576
- [6] Yasunobu Y, Hayashi K, Shingu T, et al. Coronary atherosclerosis and oxidative stress as reflected by autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and oxysterols. *Atherosclerosis*, 2001, **155** (2): 445-453
- [7] 施鸿飞, 王磊, 唐粉芳, 等. 黑米对小鼠 HyP 和 GSH-Px 的影响. 南京中医药大学学报, 1997, **13** (6): 346-347
- [8] 孙玲, 张名位, 池建伟, 等. 黑米的抗氧化性及其与黄酮和种皮色素的关系. 营养学报, 2000, **22** (3): 246-249
- [9] Luiz da Silva E, Tsushida T, Terao J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **349** (2): 313-320
- [10] Hayek T, Fuhman B, Vaya J, et al. Reduced progression of atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin, or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and to aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (11): 2 744-752
- [11] Bor MV, Cevik C, Uslu I, et al. Selenium levels and glutathione peroxidase activities in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiol*, 1999, **54** (5): 271-276
- [12] Hennig B, Meerarani P, Toborek M, et al. Antioxidant-like properties of zinc in activated endothelial cells. *J Am Coll Nutr*, 1999, **18** (2): 152-158
- [13] Pryor WA. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med*, 2000, **28** (1): 141-164

(此文编辑 胡必利, 文玉珊)

•消息•

北京大学心血管研究所 招聘研究员或副研究员

北京大学心血管研究所现面向全国招聘具有博士学位、从事动脉硬化性疾病基础研究人员。凡熟悉并应用分子生物学、细胞生物学、病理学、免疫学或分子生理学等方法在相关领域内研究,并取得一定成绩者均可申请。待遇根据本人条件从优。有意应聘者请 E-mail 简历至 georgeliu@bjmu.edu.cn。