

丁香有效部位对低密度脂蛋白弱氧化修饰的抑制效果

江慎华^{1,2} 万 严¹ 杨琼玉¹ 黄泽勇¹ 张化浩¹ 马海乐^{1,2}

(1. 九江学院药学与生命科学学院, 九江 332000; 2. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013)

摘要: 低密度脂蛋白(LDL)弱氧化修饰是形成动脉粥样硬化(AS)的关键因素。为了研究丁香有效部位(EFC)对LDL弱氧化修饰的抑制效果,采用 Fe^{2+} 体外诱导LDL弱氧化,通过测定脂质过氧化产物共轭二烯(CD)、硫代巴比妥酸反应物(TBARS)的产生、LDL紫外可见光谱及载脂蛋白B-100(apoB-100)中赖氨酸(Lys)游离氨基、色氨酸(Trp)活性的衰减程度反映抑制效果。结果表明,在LDL弱氧化过程中,对脂质过氧化保护方面,EFC(2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能有效延缓增殖阶段CD产生,其延缓效果强于0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阳性对照。EFC(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能延缓LDL降解阶段TBARS生成,延缓效果强于10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BHT;相应质量浓度(1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的EFC能减缓LDL因为氧化而改变的紫外可见光谱。对蛋白(apoB-100)氧化保护方面,EFC(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能显著抑制Lys中游离氨基活性衰减($P < 0.05$),其抑制效果与1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BHT无显著性差异;EFC(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能保护apoB-100中Trp免受破坏。结果表明EFC能有效抑制LDL弱氧化,为后续相关功能食品研发提供了参考。

关键词: 丁香; 低密度脂蛋白; 弱氧化; 氧化修饰

中图分类号: TS201.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2016)06-0242-08

Antioxidant Inhibition Effect of Effective Fraction of Clove on Minimally Modified Low Density Lipoprotein

Jiang Shenhua^{1,2} Wan Yan¹ Yang Qiongyu¹ Huang Zeyong¹ Zhang Huahao¹ Ma Haile^{1,2}

(1. School of Pharmacy and Life Science, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China

2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Minimally modified low density lipoprotein (mm-LDL) plays an important role in the progression of atherosclerosis. In order to further study the inhibition effect of effective fraction of clove (EFC) on mm-LDL, antioxidation was induced by ferrous sulfate in vitro and inhibition effect was examined by the following methods: determination of conjugated dienes (CD), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), UV-visible spectra, LDL-tryptophan fluorescence, free amino groups on lysine. The results indicated that EFC (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) effectively delayed the CD to be generated, and this delay effect of EFC was better than that of positive control-BHT (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the course of oxidation propagation. EFC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) also put off the generation of TBARS during the decomposition of LDL, this delay effect of EFC was better than that of BHT (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Likewise, the UV-visible spectra of LDL during the course of oxidation could be protected from being changed by EFC with certain concentrations (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Meanwhile, EFC (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) could significantly inhibit the decay of free amino groups on lysine in terms of protection on protein (apoB-100) oxidation of LDL, and this fraction (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) may effectively protect LDL-tryptophan from destruction ($P < 0.05$),

收稿日期: 2016-02-26 修回日期: 2016-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360371、31560308)、江西省自然科学基金项目(20132BAB204030)、江西省科技支撑计划项目(20151BBF60026)、江西省卫生厅科研计划项目(2013A017)、江苏省农产品物理加工重点实验室开放课题项目(JAPP2010-5)、江西省天然产物与功能食品重点实验室开放基金项目、九江市科技支撑计划项目(201438)和九江学院教学改革研究课题(2015-04)

作者简介: 江慎华(1973—),男,副教授,江苏大学博士后,主要从事天然产物开发研究,E-mail: jiangshenhua66@163.com

通信作者: 马海乐(1963—),男,教授,博士生导师,主要从事食品科学与工程研究,E-mail: mhl@ujs.edu.cn

furthermore, this distinction of inhibition effect was not significant with BHT (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In conclusion, these results proved that EFC had a significantly antioxidant activity on mild oxidation of LDL, which provides reference for further research and development of functional food.

Key words: clove; low density lipoprotein; antioxidation; oxidative modification

引言

低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)是血液中主要的胆固醇载体,直径为19~25 nm,平均分子量 2.5×10^6 ,密度1.019~1.063 g/mL ^[1-2],主要由胆固醇酯(40%~44%)、甘油三酯(3%~5%)和游离非酯化胆固醇组成的非极性中心和由 apoB-100(21%~26%)及游离非酯化胆固醇(与上述游离非酯化胆固醇共占9%~10%)组成的磷脂(20%~24%)单分子层膜组成^[3]。LDL中的脂质富含多不饱和脂肪酸,易被氧化,其氧化产物会进一步氧化脂类和蛋白,最终导致氧化型低密度脂蛋白(Oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)产生^[4-5]。

LDL氧化修饰分为2个阶段。在LDL氧化初级阶段即LDL弱氧化修饰阶段,仅其所含脂质发生氧化修饰而 apoB-100不发生或仅发生温和修饰,修饰后的LDL被称为弱氧化修饰低密度脂蛋白(Minimally modified low density lipoprotein, mm-LDL)^[6]。mm-LDL激活巨噬细胞表面受体的活性,导致巨噬细胞开始吞噬,并加剧巨噬细胞对组织液中天然和氧化LDL的吞噬作用,这会诱导一系列反应,最终促使动脉粥样硬化形成^[7]。随后,mm-LDL脂质和蛋白进一步氧化修饰形成完全氧化LDL^[6]。若在初级阶段抑制mm-LDL产生,可显著减少ox-LDL和抑制动脉粥样硬化(Atherosclerosis/AS)发生^[6,8]。近期研究表明,许多食源性提取物能有效抑制LDL氧化修饰^[9]。但是,这些原料对LDL弱氧化修饰的抑制效果均不清楚。

丁香为桃金娘科植物丁香(*Eugenia caryophyllata* Thunb)的干燥花蕾,具有抗氧化、抗病毒、抗血栓、抗炎、抗糖尿病、抑菌、麻醉和昆虫防御等功效^[10-11],是国家公布的药食两用植物^[12]。丁香中主要成分为多酚、黄酮类化合物及精油等^[13]。已有研究表明,丁香水提物、紫丁香叶提取物具有抑制LDL氧化修饰作用^[14-15]。实验室前期工作基础发现,丁香在国家公布的87种药食两用物品名单中抗氧化活性最强^[16],同时对LDL氧化修饰也具有很强的抑制效果,乙酸乙酯部位为抑制LDL氧化修饰的有效部位^[17]。但是,丁香有效部位(Effective fraction of clove, EFC)对LDL弱氧化修饰抑制效果尚不明确,从而限制后续相关功能食品研发进程。

因此,本文在实验室前期基础上对EFC抑制LDL弱氧化修饰作用进行研究,以期后续相关功能食品研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

丁香,购于江西黄庆仁棧华氏大药房(江西樟树天齐堂中药饮片有限公司分装),产自广西。材料买回后粉碎、过40目筛后置冰箱中备用;LDL,自健康人血浆中分离得到;肝素钠,购自上海阿拉丁试剂有限公司;2-巯代巴比妥酸(2-thiobarbituric acid, TBA),购自国药集团化学试剂有限公司;2,4,6-三硝基苯磺酸溶液(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS),购自成都格雷西亚化学技术有限公司。其余试剂均为国产分析纯或优级纯。

1.2 主要仪器与设备

TU-1901型双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;PB-10型pH计, Sartorius 仪器设备有限公司;日立F-4500型荧光分光光度计,日本岛津有限公司;CT15RT型高速冷冻离心机,上海天美生化仪器设备工程有限公司;DFY-C型高速粉碎机,温岭林大机械公司;FD-1A-50型冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;RE-52型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 生物活性追踪法制备EFC

采用图1所示方法制备丁香有效部位。丁香粉碎过40目筛后称取200.00 g干粉,采用甲醇按液料比10 mL/g、温度60℃、180 r/min水浴振荡提取40 min,重复1次,2次提取液合并、定容。量取1/10提取液制备丁香粗提物。剩余9/10提取液浓缩后加入适量蒸馏水混悬后,分别利用溶剂极性逐渐增大的溶剂石油醚、乙酸乙酯和正丁醇依次萃取,和剩余水相共4个极性分别浓缩,与上述粗提物浓缩液一起冻干后获得干粉,置真空干燥器中保存备用。

1.3.2 低密度脂蛋白提取

采用刘仁绿等^[18-19]的方法稍加修改。量取血浆300 mL,与10倍体积沉淀液(0.064 mol/L柠檬酸三钠,50 000 U/L肝素钠,5 mol/L盐酸调pH值至5.04)充分混匀,磁力搅拌30 s,37℃水浴静置

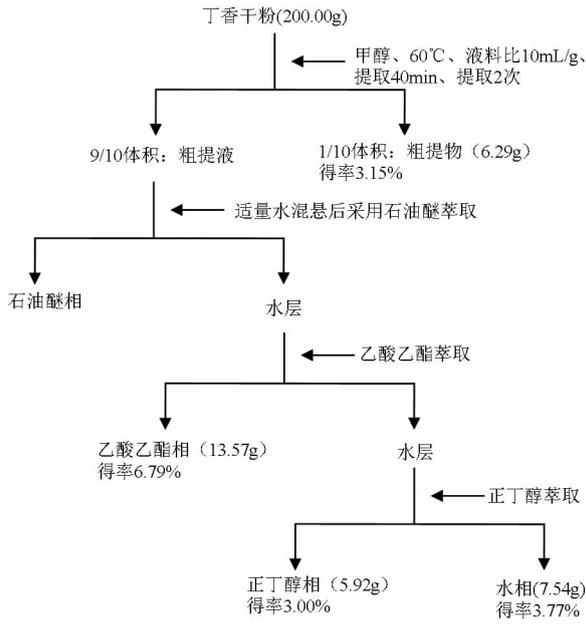


图1 生物活性追踪法制备丁香有效部位

Fig. 1 Effective fraction of clove based on bioassay guided method

15 min 后 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。向沉淀中加入 1 500 mL 洗涤液 (0.064 mol/L 柠檬酸钠 5 mol/L 盐酸调 pH 值为 5.11) 洗涤沉淀, 在 4℃ 下以转速 3 000 r/min 离心 10 min 去上清, 收集沉淀, 用少量磷酸盐缓冲液 (PBS) (160 g/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 8.1 mmol/L Na₂HPO₄, 1.5 mmol/L KH₂PO₄) 溶解 LDL 并置透析袋内 4℃ 透析 24 h, 每 6 h 更换一次 PBS。

1.3.3 不同 pH 值下 FeSO₄·7H₂O 对 LDL 修饰效果

采用 MORGAN 等^[20]的方法稍加修改。通过 Na₂HPO₄ 与 KH₂PO₄ 的配比配置 pH 值 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.4 的 PBS。在这些 pH 值条件下, 取 4.9 mL 已透析的 LDL (控制其终质量浓度为 3 mg/mL, LDL 浓度均以蛋白质含量计), 加入 50 μL FeSO₄·7H₂O (终质量浓度 75 μmol/L)、甲醇 50 μL, 在 37℃ 孵育 24 h 后用 TBARS 的产生量表示不同 pH 值条件下 FeSO₄·7H₂O 对 LDL 的修饰效果。取出 0.3 mL 孵育混合液, 加入 2.5 mL 20% 三氯乙酸后立即混匀, 再加入 1 mL 0.67% TBA, 混匀, 沸水浴 30 min, 冷却至室温 (20℃), 5 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清液在 532 nm 处测定 OD 值, 以不含 LDL 调零, 以 1,1,3,3-四甲氧基丙烷为标样绘制标准曲线, 硫代巴比妥酸反应物 (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 产生量单位为 nmol/mg (以蛋白计)。

1.3.4 CD 产生量的测定

采用 ESTERBAUER 等^[21]的方法稍加修改。测定 LDL 脂质过氧化初级产物共轭二烯 (Conjugated diene, CD) 的产生量及各样品的抑制效果。设置促

氧对照组、空白组、2,6-二叔丁基对甲基苯酚 (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, BHT) 阳性对照组、丁香不同浓度有效部位组。

本实验中各实验组设置如下: 促氧对照组, 以相同体积甲醇溶液代替样液, 其余操作全部相同; 空白组, 以相同体积甲醇溶液代替样液, 以相同体积的去离子水代替氧化剂 FeSO₄·7H₂O, 其余操作全部相同; BHT 阳性对照组及不同浓度 EFC 组添加相同体积的阳性对照试剂或者 EFC 样液, 其余操作全部相同。以 pH 值 4.5 的 PBS 溶解 LDL (以下实验均采用这种方法溶解 LDL), 控制 PBS pH 值为 4.5 前提下向 9.8 mL LDL (终质量浓度为 250 μg/mL) 中加入 100 μL FeSO₄·7H₂O (终浓度为 45 μmol/L), 最后加入 100 μL 不同浓度的样液, 37℃ 水浴孵育, 定时取出孵育混合液后测定 234 nm 处的 OD 值, 以不含 FeSO₄·7H₂O 调零。

1.3.5 TBARS 含量的测定

根据刘仁绿等^[18]的方法稍加修改。测定 LDL 脂质过氧化终末产物 TBARS 含量。控制 PBS pH 值为 4.5 前提下, 采用 1.3.3 节方法孵育并测定不同样品 TBARS 含量检测各样品的抑制效果。

1.3.6 LDL apoB-100 中赖氨酸活性的测定

采用 RAJASEKARAN 等^[22]的方法测定 LDL 弱氧化修饰过程中各样品对其 apoB-100 中赖氨酸 (Lys) 游离氨基活性减少的抑制效果。向 19.6 mL LDL (终质量浓度为 500 μg/mL) 中加入 200 μL FeSO₄·7H₂O (终浓度为 50 μmol/L), 再添加 200 μL 不同浓度的样液, 37℃ 水浴孵育 192 h。取出 1 mL 孵育混合液加入 1 mL 4% 的 NaHCO₃, 加入 0.1% TNBS 37℃ 水浴 1 h, 测定 340 nm 处的 OD 值, 以不加 TNBS 为调零。

1.3.7 色氨酸荧光的定量测定

采用 CHEN 等^[23]的方法稍作修改。测定各样品抑制 LDL 弱氧化修饰过程其 apoB-100 中色氨酸 (Trp) 荧光淬灭效果。向 4.9 mL LDL (终质量浓度为 500 μg/mL) 中加入 50 μL FeSO₄·7H₂O (终浓度为 25 μmol/L), 再加入 50 μL 不同浓度的样液, 37℃ 水浴孵育 12 h, 在 Ex 295 nm/Em 330 nm 处进行测定。

1.3.8 色氨酸荧光光谱的测定

采用 LETÍCIA 等^[24]的方法稍作修改。以 1.3.7 节的孵育混合液, 固定激发波长 280 nm, 扫描发射波长 (范围 300 ~ 450 nm) 对各样品进行荧光扫描。

1.3.9 紫外可见吸收光谱的测定

采用 1.3.4 节的孵育混合液于 200 ~ 900 nm 波

长范围内扫描紫外可见吸收光谱。

2 结果与分析

LDL常用的氧化剂主要包括硫酸铜和硫酸亚铁。较高浓度的硫酸铜因其氧化能力较强,可致LDL氧化成 ox-LDL,而硫酸亚铁氧化能力相对温和,可致LDL氧化成 mm-LDL^[2]。WATSON等^[25]均采用硫酸亚铁氧化 LDL 制备获得 mm-LDL 供相关研究。故本实验采用硫酸亚铁氧化修饰 LDL 制备获得 mm-LDL 供相关测定。

2.1 LDL 弱氧化修饰过程中 pH 值条件优化

有研究表明,过渡金属离子(如 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 等)对 LDL 氧化修饰作用与 pH 值密切相关^[20]。为探究 Fe^{2+} 介导 LDL 弱氧化修饰过程中的最适 pH 值,本实验设置 LDL 孵育体系中 PBS 的 pH 值范围为 4.5~7.4。通过测定 TBARS 产生量确定 Fe^{2+} 对 LDL 弱氧化修饰的最适 pH 值。根据 1.3.3 节的方法测定结果如表 1 所示。在 pH 值 4.5~7.4 范围内,随着 pH 值增大 TBARS 产生量逐渐降低($P < 0.05$)。pH 值 4.5 条件下 LDL 弱氧化修饰产生的 TBARS 是 pH 值 7.4 条件下的 15 倍左右。这表明 pH 值可显著影响 Fe^{2+} 对 LDL 的氧化修饰,且 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在 pH 值 4.5 条件下对 LDL 修饰作用最明显。SATCHELL 等^[26]也发现类似结果,并且在该条件下对 LDL 进行氧化修饰符合 mm-LDL 的标准(通常 mm-LDL 每 1mg 蛋白生成 3~12 nmol TBARS)^[7]。其原因可能是在酸性条件下铁离子的溶解度增加、使得 Fe^{2+} 的作用效果加强,从而使脂质过氧化链式反应增强,产生的脂质氢过氧化物进行分解形成醛类^[20,26]。因此,本实验选定 pH 值 4.5 作为后续所有 LDL 弱氧化的最适 pH 值反应条件。有研究表明,氧化或弱氧化 LDL 被巨噬细胞吞噬后会在溶酶体中进一步被氧化修饰,而溶酶体的生理 pH 值正好在 4.5 左右^[26-27],表明本文的优化结果与人体生理条件相吻合。

表 1 pH 值对 TBARS 产生量的影响

Tab.1 Effect of pH value to TBARS component

pH 值	TBARS 产生量/(nmol·mg ⁻¹)
4.5	4.35 ± 0.07 ^a
5.0	1.03 ± 0.08 ^b
5.5	0.70 ± 0.08 ^c
6.0	0.59 ± 0.01 ^d
6.5	0.36 ± 0.06 ^e
7.0	0.25 ± 0.04 ^f
7.4	0.28 ± 0.04 ^{ef}

注:不同字母代表各样品之间存在显著性差异, $P < 0.05$ 。

2.2 丁香有效部位(EFC)对 LDL 脂类氧化的抑制效果

2.2.1 共轭二烯(CD)产生的抑制效果

LDL 氧化修饰过程主要分为延迟、增殖、降解 3 个连续阶段^[2]。随着 LDL 中内源性抗氧化物质(如维生素 E 等)逐渐消耗,LDL 从脂质过氧化反应的延迟阶段过渡到增殖阶段。在这个过程中,首先, Fe^{2+} 对 LDL 中多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)的过氧化修饰引起脂质自由基重排,产生在 234 nm 处具有紫外吸收的 CD^[28]。然后,LDL 进入脂质过氧化自由基链式反应并导致大量 CD 和脂质氢过氧化物(LOOH)形成与累积。最后,当 CD 达到最大值时,增殖阶段结束、降解阶段开始。该阶段 CD 和 LOOH 开始降解。因此 CD 的形成充分反映延迟、增殖以及早期降解阶段中 LDL 脂质修饰的动态变化^[2]。根据 1.3.4 节方法测定结果如图 2 所示。与促氧相比,添加各质量浓度的 EFC(1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及阳性对照 BHT 均对 CD 的产生有抑制效果。CD 到达最大值所需时间用 T_{max} 表示。与促氧组的 T_{max} (35.4 h)相比,添加 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 的 T_{max} (47.4 h)明显延缓。该结果表明 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 能延缓 LDL 弱氧化修饰作用。添加 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BHT 样液的 CD 达最大值时,2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 样液的 CD 才缓慢开始上升,并且其增长速率明显低于 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阳性对照 BHT,这表明 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 抑制 LDL 弱氧化效果强于 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BHT。

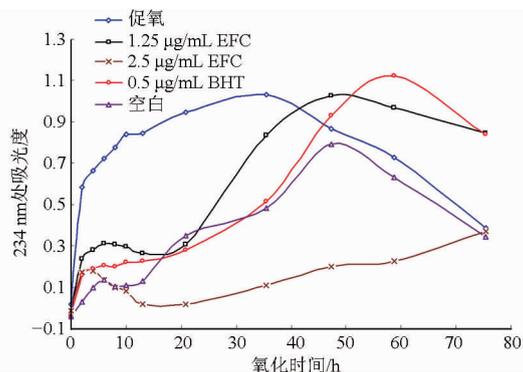


图 2 丁香有效部位对 LDL 弱氧化修饰过程中 CD 产生的延缓效果

Fig.2 Delayed effect of effective fraction of clove on the CD production from mm-LDL

CD 为 LDL 氧化早期形成的脂质自由基^[29], EFC 的抑制作用表明其能在早期阶段抑制 LDL 弱氧化。有研究表明 EFC 有很强的自由基清除能力^[12]。因此,以上结果的原因可能是 EFC 在 LDL 表面清除其弱氧化修饰过程衍生出来的过氧化氢自由基,进一步抑制脂质过氧自由基链式反应,抑制 CD 的形成从而抑制 LDL 弱氧化产生^[28]。

BAGHERI 等^[29]研究核桃提取液对 LDL 氧化的抑制作用时也得到了类似效果。

2.2.2 TBARS 产生的抑制效果

随着 LDL 脂质过氧化反应继续进行, LDL 氧化修饰从 2.2.1 节增殖阶段进入到降解阶段, 并导致在增殖阶段大量产生的 LOOH 发生降解, 形成大量的具有毒性的醛类, 其与硫代巴比妥酸 TBA 反应产生在 532 nm 处有特征吸收的粉色物质^[2,28,30]。因此, 通过测定 TBARS 产生量可评价 EFC 对降解阶段 LDL 脂质过氧化修饰的延缓效果。根据 1.3.5 节方法测定, 其结果如图 3 所示。与促氧相比, 2 个质量浓度的 EFC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及阳性对照 BHT 均对 LDL 弱氧化过程中 TBARS 的产生具有不同程度的延缓效果。促氧组 TBARS 产生量约 75 h 达最大, 添加 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 后 TBARS 产生量达最大值所需时间延后至 80 h 才出现, 比促氧组延长了 5 h, 这表明添加 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 能够延缓 LDL 受 Fe^{2+} 催化所形成的弱氧化作用。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BHT 比同浓度的 EFC 对 LDL 弱氧化产生 TBARS 的延缓效果强。然而, 当质量浓度增加到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, EFC 延缓效果明显强于 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BHT。RAHMAN 等^[28]也发现金针菇多酚提取液能延缓 LDL 过氧化修饰过程中醛类的产生。

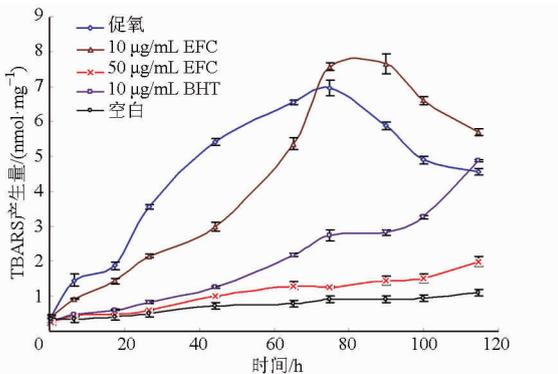


图3 丁香有效部位对 LDL 弱氧化修饰过程中 TBARS 产生的延缓效果

Fig.3 Delayed effect of EFC on the TBARS production from mm-LDL

EFC 能有效延缓 LDL 弱氧化修饰过程中的脂质过氧化作用(对 TBARS 及 CD 产生的抑制), 其可能的原因是 EFC 是弱极性的乙酸乙酯部位, 处于该极性提取剂中的有效成分具有一定的亲脂特性, 使该物质更易于进入脂质过氧化的疏水性环境, 对 LDL 脂质部位氧化起抑制作用^[28]。同时, 实验室前期基础中发现, 在丁香不同极性部位中, 乙酸乙酯部位总黄酮、总多酚含量最高^[12,31], 而国内外研究发现, 黄酮、多酚类化合物具有抗氧化活性^[32], 并能有效抑制 LDL 脂质过氧化作用^[28,33]。因此, EFC 中延缓 mm-LDL 的

脂质过氧化作用的主要物质可能为黄酮及多酚。

LDL 由脂类及蛋白组成^[3], 其弱氧化修饰主要体现在所含脂类及蛋白的氧化修饰。上述测定结果发现 EFC 对 LDL 脂类弱氧化修饰具有较好的抑制效果。LDL 所含蛋白的弱氧化修饰主要表现为 Lys 及 Trp 残基的氧化修饰^[2]。于是, 在 2.2 节基础上继续对 EFC 抑制 LDL 弱氧化过程中所含蛋白的抑制效果进行了测定。

2.3 EFC 对 LDL 蛋白组分氧化的抑制效果

2.3.1 Lys 游离氨基活性衰减的效果分析

正常代谢中 LDL 受体对 LDL 识别依赖于 Lys 残基^[30], 而降解阶段脂质过氧化产生的大量毒性醛类将对 LDL 中 apoB-100 的 Lys 进行修饰, 形成一系列加成物并导致 Lys 中的游离氨基活性衰减, 加成物进一步促进氧化 LDL 被巨噬细胞清道夫受体识别, 使 LDL 胆固醇在细胞中不受调节地聚集、形成泡沫细胞最终导致 AS 形成^[34]。

TNBS 能特异地与 Lys 游离氨基反应产生在 340 nm 有特异吸收的复合物, 利用 TNBS 活性反映 EFC 对 apoB-100 中 Lys 游离氨基活性减弱及 LDL 弱氧化修饰的抑制效果^[2,35]。根据 1.3.6 节方法测定结果如图 4 所示。与促氧相比, EFC 和阳性对照 BHT 都显著抑制 TNBS 活性降低 ($P < 0.05$)。随着 EFC 浓度增加, TNBS 活性增强, 表明 EFC 对 TNBS 活性降低的抑制效果与浓度相关。添加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 对 TNBS 活性减弱的抑制效果与阳性对照 BHT 无显著差异 ($P > 0.05$)。RIFICI 等^[35]研究红酒抑制 LDL 氧化也得到了类似的结果。根据 2.2.2 节中结果可知, LDL 能抑制醛类产生, 所以 EFC 对 ApoB-100 中 Lys 游离氨基活性减弱的抑制可能是因为它能抑制醛类产生。

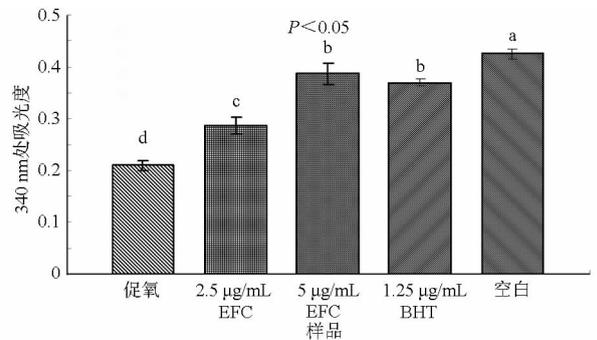


图4 丁香有效部位对 Lys 游离氨基活性减弱的抑制效果

Fig.4 Inhibited effect of EFC on reactivity decrease of free amino group on Lys

2.3.2 EFC 抑制 LDL 弱氧化修饰过程中色氨酸荧光淬灭效果分析

(1) 色氨酸荧光强度测定

除了上述 Lys 在 LDL 弱氧化过程中会产生修

饰,LDL 氧化修饰的早期 Trp 活性也会逐渐衰减,从而促进 LDL 脂质过氧化反应产生^[34]。天然 LDL 中 apoB-100 含有 37 个 Trp 残基,可产生荧光,随着 LDL 弱氧化其荧光发生淬灭^[23]。根据 1.3.7 节方法定量测定各样品抑制 Trp 荧光淬灭效果。如图 5 所示,与促氧组产生的荧光相比,添加 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 能对 Trp 荧光淬灭产生显著抑制效果($P < 0.01$)。该结果表明 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 能使 apoB-100 中 Trp 免受破坏。CHEN 等^[23]对于杏仁皮多酚和槲皮素对 LDL 和 apoB-100 氧化修饰的研究中也得到了类似结果。

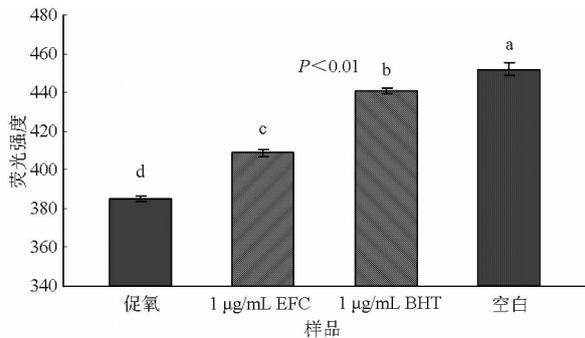


图 5 丁香有效部位抑制色氨酸荧光淬灭定量测量结果
Fig. 5 Inhibition effect of effective fraction of clove on Trp fluorescence quenching by quantitative determination

(2) 色氨酸荧光扫描分析

采用 1.3.8 节方法进一步对 mm-LDL 荧光光谱进行扫描分析,其结果如图 6 所示。与促氧相比,添加 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 可抑制 LDL 中 apoB-100 色氨酸荧光淬灭。该结果与上文所得结果相互佐证,进一步证明 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 能避免 apoB-100 中 Trp 免遭弱氧化修饰。

LDL 在发生弱氧化修饰过程除了其所含的脂类及蛋白组分发生氧化修饰变化外,其紫外、可见吸收光谱也会产生相应的变化。于是,本文就 EFC 对 LDL 弱氧化修饰过程中光谱吸收的影响进行了测定。

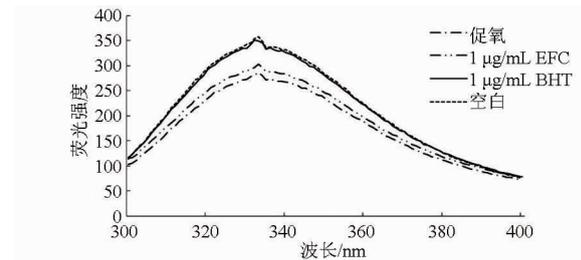
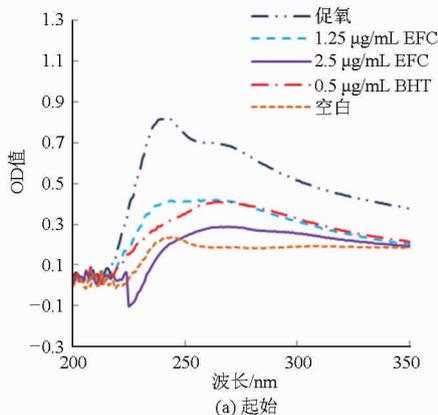


图 6 丁香有效部位抑制色氨酸荧光淬灭扫描结果
Fig. 6 Inhibition effect of EFC on Trp fluorescence quenching by fluorescence scanning

2.4 丁香有效部位对 LDL 弱氧化修饰过程中紫外、可见吸收光谱变化

天然 LDL 在 222 nm 有最大吸收,随着 LDL 逐渐被氧化,在 220 ~ 230 nm 范围内的吸光度增大。光谱的改变可用于反映抗氧化物质对 LDL 的保护效果。LDL 脂质过氧化反应的主要产物为脂质氢过氧化物,在 234 nm 附近有最大吸收^[21]。

所有样品 LDL 弱氧化修饰在起始及氧化约 56 h 光谱变化结果如图 7 所示。弱氧化起始阶段,除促氧外,其他样品的吸收峰值未发生显著改变。氧化约 56 h 后,添加 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 吸收峰值未发生大的变化,其余样品的吸收峰值趋同于促氧组样品。

同一样品在不同时间段的紫外光谱扫描结果如图 8 所示。促氧与添加 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EFC 相比,在弱氧化 17 h 之前,1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EFC 能有效抑制 LDL 弱氧化修饰,随着氧化时间的延长,添加 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EFC 吸收峰值逐渐上升。与 BHT 阳性对照相比,添加 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 的吸收峰值几乎不增加。以上结果表明添加 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EFC 样液通过抑制脂质氢过氧化物的形成进而抑制 LDL 弱氧化修饰。

以上测定结果中,EFC 对 LDL 弱氧化修饰抑制效果不及相同浓度的阳性对照 BHT,其原因主要可能是 BHT 为分析纯级化合物,而 EFC 仅为混合物,

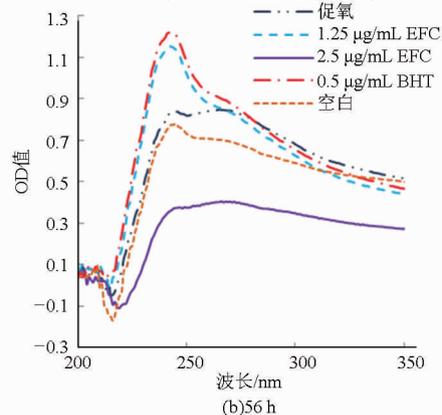


图 7 所有样品 LDL 弱氧化修饰起始及氧化 56 h 紫外可见吸收光谱变化

Fig. 7 UV-visible spectra between different samples during the incubation initiation and after incubation 56 h

含有很多杂质。若将 EFC 纯度提高,其对 LDL 弱氧

化抑制效果会显著增加。

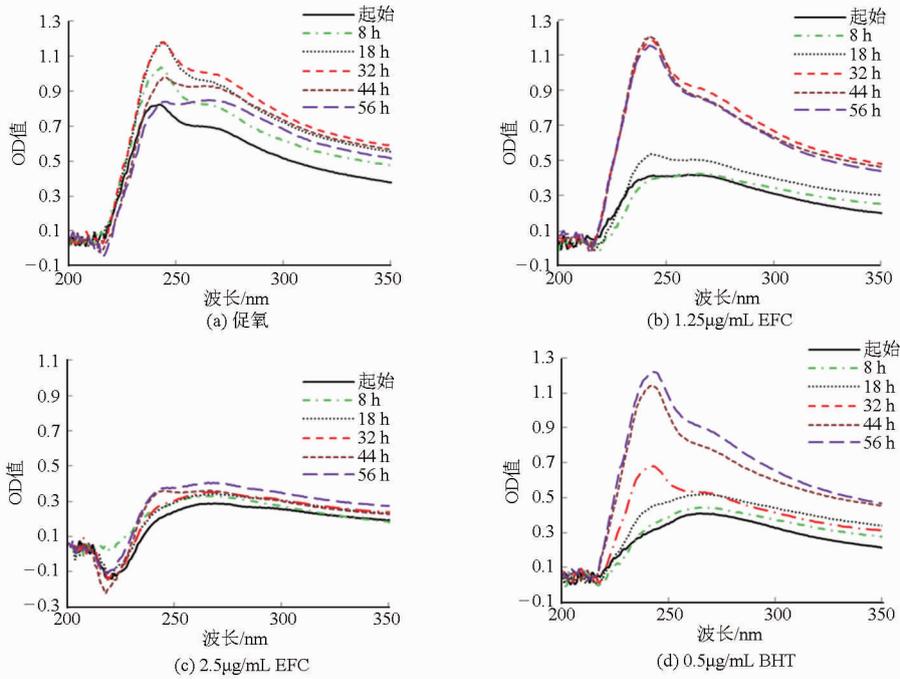


图 8 在不同时间段的同一样品 LDL 紫外可见吸收光谱扫描

Fig. 8 UV-visible spectra on the same samples in the different time

3 结论

(1) EFC 能够延缓/抑制 LDL 脂质过氧化反应中 CD 和 TBARS 的产生,反映其能在延迟、增殖、降解阶段对 LDL 弱氧化进行抑制。

(2) EFC 能够延缓/抑制 LDL 脂质过氧化反应形成的醛类对 apoB - 100 的修饰。

(3) EFC 能够延缓/抑制 LDL 弱氧化过程中 apoB - 100 的氧化修饰。

参 考 文 献

- 1 ESTERBAUER H, DIEBER-ROTHENEDER M, WAEG G, et al. Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 1990, 3(2): 77 - 92.
- 2 ESTERBAUER H, GEBICKI J, PUHL H, et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1992, 13(4): 341 - 390.
- 3 PRASSL R, LAGGNER P. Molecular structure of low density lipoprotein: current status and future challenges [J]. *European Biophysics Journal*, 2009, 38(2): 145 - 158.
- 4 ITABE H. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis [J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2012, 51(1): 1 - 8.
- 5 SONA M, ABHISHEK D, RAJESH S. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy [J]. *The American Journal of the Medical Sciences*, 2011, 342(2): 135 - 142.
- 6 YOSHIDA H, KISUGI R. Mechanisms of LDL oxidation [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2010, 411(23 - 24): 1875 - 1882.
- 7 LEVITAN I, VOLKOV S, SUBBAIAH P V. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology [J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2012, 13(1): 39 - 75.
- 8 DEVARAJ S, JIALAL W. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2010, 30(12): 2311 - 2316.
- 9 GUNATHILAKE K D, RUPASINGHE H P V. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in vitro by ginger extracts [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2014, 17(4): 424 - 431.
- 10 ADEFEGHA S A, OBOH G. *In vitro* inhibition activity of polyphenol-rich extracts from *syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (clove) buds against carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type 2 diabetes and Fe²⁺-induced lipid peroxidation in rat pancreas [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, 2(10): 774 - 781.
- 11 刘常金, 赵锦, 江慎华, 等. 丁香抗氧化活性物质超声波-微波协调提取技术 [J]. *农业机械学报*, 2014, 45(11): 223 - 229.
- 12 LIU Changjin, ZHAO Jin, JIANG Shenhua, et al. Extraction technology of antioxidants from clove based on simultaneous ultrasonic/microwave assisted extraction [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(11): 223 - 229. (in Chinese)
- 13 江慎华, 王书源, 马海乐, 等. 丁香活性物质提取工艺优化与抗氧化活性研究 [J]. *农业机械学报*, 2010, 41(1): 132 - 138.
- 14 JIANG Shenhua, WANG Shuyuan, MA Haile, et al. Extracting technology and antioxidant activity of bioactive components from

- clove [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010,41(1): 132 - 138. (in Chinese)
- 13 CHARLES D J. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources [M]. New York: Springer-Verlag,2013:245 - 253.
- 14 SEORI J, KYUNG-HYUN C. Water extracts of cinnamon and clove exhibits potent inhibition of protein glycation and anti-atherosclerotic activity *in vitro* and *in vivo* hypolipidemic activity in zebrafish [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(7): 1521 - 1529.
- 15 王丽丽, 赵新淮. 紫丁香叶提取物对低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用 [J]. 东北农业大学学报, 2007,38(5): 641 - 644.
WANG Lili, ZHAO Xinhui. Inhibition of the extract from clove leaf (*Syringa oblata*) on oxidative modification of low-density lipoprotein [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007,38(5): 641 - 644. (in Chinese)
- 16 JIANG Shenhua, LI Hanquan, MA Haile, et al. Antioxidant activities of selected Chinese medicinal and edible plants [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2011, 62(5): 441 - 444.
- 17 江慎华, 肖敏, 江春霞, 等. 生物活性追踪法对丁香抗低密度脂蛋白氧化修饰的研究 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(9): 2063 - 2067.
JIANG Shenhua, XIAO Min, JIANG Chunxia, et al. Oxidation modification of clove anti-low-density-lipoprotein by bio-assay guided method [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(9): 2063 - 2067. (in Chinese)
- 18 刘仁绿, 肖敏, 江卫青, 等. 诃子粗提物及不同极性部位抑制低密度脂蛋白氧化修饰的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 100 - 104.
LIU Renlv, XIAO Min, JIANG Weiqing, et al. Anti-low density lipoprotein oxidation of the crude extract and different fractions of *Terminalia chebula* Retz [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(16): 100 - 104. (in Chinese)
- 19 WIELAND H, SEIDEL D. A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins [J]. Journal of Lipid Research, 1983, 24(7): 904 - 913.
- 20 MORGAN J, LEAKE D S. Acidic pH increases the oxidation of LDL by macrophages [J]. Febs Letters, 1993, 333(3): 275 - 279.
- 21 ESTERBAUER H, STRIEGL G, PUHL H, et al. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein [J]. Free Radical Research, 1989, 6(1): 67 - 75.
- 22 RAJASEKARAN N S, SATHYANARAYANAN S, DEVARAJ N S, et al. Chronic depletion of glutathione (GSH) and minimal modification of LDL *in vivo*: its prevention by glutathione mono ester (GME) therapy [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 2005, 1741(1 - 2): 103 - 112.
- 23 CHEN C Y, MILBURY P E, CHUNG S K, et al. Effect of almond skin polyphenolics and quercetin on human LDL and apolipoprotein B - 100 oxidation and conformation [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(12): 785 - 794.
- 24 LETÍCIA B S, ANDREA M M, RICARDO E S, et al. Study of tryptophan lifetime fluorescence following low-density lipoprotein [J]. Applied Spectroscopy, 2013, 67(4): 379 - 384.
- 25 WATSON A D, LEITINGER N, NAVAB M, et al. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte endothelial interactions and evidence for their presence *in vivo* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(21): 13597 - 13607.
- 26 SATCHELL L, LEAKE D S. Oxidation of low-density lipoprotein by iron at lysosomal pH: implications for atherosclerosis [J]. Biochemistry, 2012, 51(12): 3767 - 3775.
- 27 WEN Y C, LEAKE D S. Low density lipoprotein undergoes oxidation within lysosomes in cells [J]. Circulation Research, 2007, 100(9): 1337 - 1343.
- 28 RAHMAN M A, ABDULLAH N, AMINUDIN N. Antioxidative effects and inhibition of human low density lipoprotein oxidation *in vitro* of polyphenolic compounds in *Flammulina velutipes* (Golden Needle Mushroom) [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 2015: Article ID403023.
- 29 BAGHERI S, AHMADVAND H, KHOSROWBEYGI A. Various antioxidative activities of iranian walnut (*Juglans regia* L) green husks hydroalcoholic extract and its effects on LDL oxidation [J]. Journal of Biologically Active Products from Nature, 2012, 12(6): 330 - 340.
- 30 REQUENA J R, FU Minxin, AHMED M U, et al. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein [J]. Biochemical Journal, 1997, 322: 317 - 325.
- 31 沈勇根, 蔡志鹏, 江慎华, 等. 丁香非挥发性成分抗氧化活性 [J]. 农业机械学报, 2012, 43(10): 131 - 137.
SHEN Yonggen, CAI Zhipeng, JIANG Shenhua, et al. Antioxidant activity of non-volatiles from clove [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(10): 131 - 137. (in Chinese)
- 32 江慎华, 蔡志鹏, 廖亮, 等. 丁香抗氧化活性物质提取及人工胃肠液对其活性的影响 [J]. 农业机械学报, 2012, 43(7): 149 - 155.
JIANG Shenhua, CAI Zhipeng, LIAO Liang, et al. Extraction of antioxidants from clove and effect of artificial gastrointestinal juice immersion on its antioxidant properties [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(7): 149 - 155. (in Chinese)
- 33 DE LIMA PORTELLA R L, BARCELOS R P, DE BEM A F, et al. Oximes as inhibitors of low density lipoprotein oxidation [J]. Life Sciences, 2008, 83(25 - 26): 878 - 885.
- 34 WAKATSUKI A, OKATANI Y. Melatonin inhibits oxidative modification of low-density lipoprotein particles in normolipidemic post-menopausal women [J]. Journal of Pineal Research, 2000, 28(3): 136 - 142.
- 35 RIFICI V A, STEPHAN E M, SCHNEIDER S H, et al. Red wine inhibits the cell-mediated oxidation of LDL and HDL [J]. Journal of the American College of Nutrition, 1999, 18(2): 137 - 143.