



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101787076 A

(43) 申请公布日 2010.07.28

(21) 申请号 201010109973.0

(22) 申请日 2010.02.03

(71) 申请人 徐州市心血管病研究所

地址 221000 江苏省徐州市解放南路 199 号

(72) 发明人 宫海滨 徐锁平 苏景力 王洁

庞慧 李春梅

(74) 专利代理机构 徐州市三联专利事务所

32220

代理人 何君

(51) Int. Cl.

*C07K 14/47* (2006.01)

*G01N 33/53* (2006.01)

*G01N 1/28* (2006.01)

*G01N 1/30* (2006.01)

*G01N 1/42* (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法及应用技术

(57) 摘要

本发明涉及一种低密度脂蛋白的制备方法,具体涉及一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法及应用,属医学检测技术领域。该方法通过对氧化型低密度脂蛋白的提取与鉴定、氧化型低密度脂蛋白体外促进心肌纤维化的研究,利用本发明提取的氧化型低密度脂蛋白对心肌纤维化的作用,探索心肌纤维化的发生机制,阻断其信号通路可促进抗心肌纤维化药物的研发。

1. 一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法,其特征是:它包括提取正常人血清,经高速离心机离心,去除上层乳糜微粒后调节密度,超速离心机离心两次,取上层低密度脂蛋白,琼脂糖凝胶电泳鉴定,然后催化氧化得到氧化型低密度脂蛋白,经琼脂糖凝胶电泳及MDA试剂盒测氧化值,BCA法测定蛋白浓度。

2. 根据权利要求1所述的一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法,其特征是:所述的催化氧化为用硫酸铜催化氧化,浓度为 $1 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3. 根据权利要求1所述的一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法,其特征是:所述的BCA法测定蛋白浓度是将大鼠分离的心肌细胞分别培养在90个培养皿中(每皿含培养液2mL),培养密度为 $2 \times 10^5$ 个心肌细胞/皿,随机选30个培养皿为空白对照组(其中加入相应体积的PBS缓冲液使低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白终浓度为 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),分别孵育0h、6h、12h、24h、48h;再选30皿为低密度脂蛋白对照组(加入低密度脂蛋白使其终浓度为 $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),分别孵育0h、6h、12h、24h、48h;其余30皿为实验组(加入氧化型低密度脂蛋白使其终浓度为 $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),分别孵育0h、6h、12h、24h、48h,用ELISA法检测细胞培养液上清中TGF- $\beta$ 1和bFGF浓度,留取细胞培养上清,在3000转/min下离心10min后冻存于 $-80^\circ\text{C}$ ,用ELISA试剂盒检测各组培养液中的TGF- $\beta$ 1、bFGF浓度。。

4. 一种权利要求1所述的氧化型低密度脂蛋白的应用技术,其特征是:将PBS缓冲液、低密度脂蛋白及氧化型低密度脂蛋白经大鼠尾静脉注入其血管内,每天注射一次,空白对照组中注射相应体积的PBS缓冲液,实验组注射氧化型低密度脂蛋白(血浆中终浓度为 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),低密度脂蛋白对照组中注射相同浓度的低密度脂蛋白。分别于第1、7、14、21及28天,在麻醉状态下取出实验大鼠心脏,用冰冻生理盐水冲洗干净,取心室肌放入4%多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋,切片厚度为 $5 \mu\text{m}$ ,每个石蜡块取10张切片进行Masson染色,普通光镜观察形态学改变,图像采用Image pro plus 6.0图像分析处理软件手动计算绿色纤维和红色胶原的面积,计算胶原容积分数,用ELISA法检测血浆中P I CP浓度,分别于第1、7、14、21及28天采血,在3000转/min下离心10min后得到血浆, $-80^\circ\text{C}$ 冻存,用ELISA试剂盒检测血浆P I CP浓度。

## 一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法及应用技术

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种低密度脂蛋白的制备方法,具体涉及一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法及应用,属医学检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 心肌纤维化是指心肌细胞外基质 (ECM) 中胶原纤维过量积聚、胶原浓度显著升高或胶原成分发生改变。它是胶原合成代谢和降解代谢失衡的结果,这种病理变化在肥厚性心肌病、心力衰竭等多种心血管疾病中存在,现认为其与心律失常、心功能障碍甚至心源性猝死密切相关。心肌纤维化是一个复杂的病理过程,长期的压力超负荷、炎症反应、细胞凋亡、氧化应激等是其主要原因,涉及到内分泌系统、免疫系统等。上述刺激因素均会引起内源性的心脏旁 / 自分泌系统的调控紊乱,这些旁 / 自分泌系统不仅诱导心肌损伤,也是心肌纤维化的促进因子。随着人口老龄化的进展,心肌纤维化越来越引起了人们的重视,因此,发现心肌纤维化危险因素及其机制的研究愈发显得重要。氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 在体内由低密度脂蛋白 (LDL) 经氧自由基氧化而来,它对心血管系统有着广泛影响:在泡沫细胞形成过程中起关键作用;诱导单核细胞向内皮细胞的粘附和向内皮下的趋化;促进巨噬细胞增殖退化;促进血小板粘附、聚集、血栓形成;加剧心脏和血管的炎症反应诱导巨噬细胞和平滑肌细胞产生血小板衍生生长因子 (PDGF),促进平滑肌细胞移行;损伤内皮细胞等。Cucina A 等研究发现氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 能刺激平滑肌细胞分泌 bFGF,刺激内皮细胞分泌 TGF- $\beta$  1,提示 ox-LDL 在心肌纤维化过程中可能起到重要作用,尤其是重新认识强化降脂治疗,及阻断 ox-LDL 的信号通路可以作为防治心肌纤维化的措施之一,对于临床治疗具有现实意义,目前国内外均处于研究阶段。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是为克服上述现有技术的不足之处,提供一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法及应用技术,该方法通过对氧化型低密度脂蛋白的提取与鉴定、ox-LDL 体外促进心肌纤维化的研究,利用本发明提取的氧化型低密度脂蛋白对心肌纤维化的作用,探索心肌纤维化的发生机制,阻断其信号通路可促进抗心肌纤维化药物的研发。

[0004] 本发明是以如下技术方案实现的:一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法,其特征是:它包括提取正常人血清,经高速离心机离心,去除上层乳糜微粒后调节密度,超速离心机离心两次,取上层低密度脂蛋白,琼脂糖凝胶电泳鉴定,然后用氧化剂氧化得到氧化型低密度脂蛋白,经琼脂糖凝胶电泳及 MDA 试剂盒测氧化值,BCA 法测定蛋白浓度。

[0005] 所述的催化氧化为用硫酸铜催化氧化,浓度为  $1 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

[0006] 所述的 BCA 法测定蛋白浓度是将大鼠分离的心肌细胞分别培养在 90 个培养皿中 (每皿含培养液 2mL),培养密度为  $2 \times 10^5$  个心肌细胞 / 皿,随机选 30 个培养皿为空白对照组 (其中加入相应体积的 PBS 缓冲液使低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白终浓度为  $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),分别孵育 0h、6h、12h、24h、48h;再选 30 皿为低密度脂蛋白对照组 (加入低密

度脂蛋白使其终浓度为  $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 分别孵育 0h、6h、12h、24h、48h; 其余 30 皿为实验组 (加入氧化型低密度脂蛋白使其终浓度为  $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 分别孵育 0h、6h、12h、24h、48h, 用 ELISA 法检测细胞培养液上清中 TGF- $\beta$  1 和 bFGF 浓度, 留取细胞培养上清, 在 3000 转/min 下离心 10min 后冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$ , 用 ELISA 试剂盒检测各组培养液中的 TGF- $\beta$  1、bFGF 浓度。

[0007] 所述的氧化型低密度脂蛋白的应用技术, 其特征是: 将 PBS 缓冲液、低密度脂蛋白及氧化型低密度脂蛋白经大鼠尾静脉注入其血管内, 每天注射一次, 空白对照组中注射相应体积的 PBS 缓冲液, 实验组注射氧化型低密度脂蛋白 (血浆中终浓度为  $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 低密度脂蛋白对照组中注射相同浓度的低密度脂蛋白。分别于第 1、7、14、21 及 28 天, 在麻醉状态下取出实验大鼠心脏, 用冰冻生理盐水冲洗干净, 取心肌放入 4% 多聚甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 切片厚度为  $5 \mu\text{m}$ , 每个石蜡块取 10 张切片进行 Masson 染色, 普通光镜观察形态学改变, 图像采用 Image pro plus 6.0 图像分析处理软件手动计算绿色纤维和红色胶原的面积, 计算胶原容积分数, 用 ELISA 法检测血浆中 P I CP 浓度, 分别于第 1、7、14、21 及 28 天采血, 在 3000 转/min 下离心 10min 后得到血浆,  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存, 用 ELISA 试剂盒检测血浆 P I CP 浓度。

[0008] 本发明的优点是: 该方法通过对氧化型低密度脂蛋白的提取与鉴定、ox-LDL 体外促进心肌纤维化的研究, 利用本发明提取的氧化型低密度脂蛋白对心肌纤维化的作用, 探索心肌纤维化的发生机制, 阻断其信号通路可促进抗心肌纤维化药物的研发。

## 具体实施方式

[0009] 实施例 1、

[0010] 氧化型低密度脂蛋白的提取与鉴定:

[0011] 提取正常人血清, 经高速离心机离心, 去除上层乳糜微粒后调节密度, 超速离心机离心两次, 取上层 LDL, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 然后用硫酸铜催化氧化得到 ox-LDL。经琼脂糖凝胶电泳及 MDA 试剂盒测氧化值, BCA 法测定蛋白浓度。

[0012] 实施例 2、

[0013] ox-LDL 体外促进心肌纤维化的研究:

[0014] 1、液体配制

[0015] ① 1mM 含钙 KH 液 ( $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ ): NaCl 119, KCl 4.7,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.94,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25, Glucose  $\cdot \text{H}_2\text{O}$  11.5,  $\text{CaCl}_2$  1, 通 5%  $\text{CO}_2$ +95%  $\text{O}_2$  混合气体, pH 为 7.4。② 无钙液 ( $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ ): NaCl 120, KCl 5.4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5, Sodium pyruvate 5, Glucose  $\cdot \text{H}_2\text{O}$  20, Taurine 20, HEPES 10。③ 临分离前在无钙液中加入 5mM NTA 和  $12 \mu\text{M}$ - $14 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  即为低钙液, 调 pH = 6.95, 充 100%  $\text{O}_2$ 。④ 酶液, 在无钙液的基础上加入  $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  胶原酶 II 和  $50 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 溶解后, 调 pH = 7.4, 充 100%  $\text{O}_2$ 。⑤ M199 培养液, M199 培养基中加入以下添加剂 ( $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ ): Ascorbic Acid 100, Creatine 5, Taurine 5, Carnitine 2, Insuline 0.0001 和 0.2% BSA。常规加入 100U Penicillin-100mg Streptomycin。

[0016] 2、大鼠心肌细胞分离与培养

[0017] 大鼠麻醉前 30min 腹腔注射肝素钠 (500U/100g), 麻醉开胸取心脏与冰冷 KH 液中, 并挂于 Langendroff 灌流装置上, KH 液、低钙液、酶液依次经主动脉逆行灌流后剪下心肌于培养皿中, 剪碎后振荡并尼龙网过滤, 所收集的滤液用含 Ca 的 KH 液洗两次后复钙, 复钙后

用含 10% 胎牛血清的 M199 基础培养基培养, 培养温度为 37℃, 饱和湿度 5% CO<sub>2</sub>。

[0018] 3、ox-LDL 的提取与鉴定

[0019] 提取正常人血清, 经高速离心机离心, 去除上层乳糜微粒后调密度, 超速离心机离心两次, 取上层 LDL, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 然后用硫酸铜催化氧化得到 ox-LDL。经琼脂糖凝胶电泳及 MDA 试剂盒测氧化值, BCA 法测定蛋白浓度。

[0020] 4、实验分组

[0021] 将大鼠分离的心肌细胞分别培养在 90 个培养皿中 (每皿含培养液 2mL), 培养密度为  $2 \times 10^5$  个心肌细胞 / 皿, 随机选 30 个培养皿为空白对照组 (其中加入相应体积的 PBS 缓冲液使 LDL、ox-LDL 终浓度为  $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 分别孵育 0h、6h、12h、24h、48h; 再选 30 皿为 LDL 对照组 (加入 LDL 使其终浓度为  $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 分别孵育 0h、6h、12h、24h、48h; 其余 30 皿为实验组 (加入 ox-LDL 使其终浓度为  $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 分别孵育 0h、6h、12h、24h、48h。

[0022] 5、ELISA 法检测细胞培养液上清中 TGF- $\beta$  1 和 bFGF 浓度

[0023] 留取细胞培养上清, 3000 转 /min、10min 离心后冻存于 -80℃。用 ELISA 试剂盒检测各组培养液中的 TGF- $\beta$  1、bFGF 浓度。操作按照说明书进行。

[0024] 6、统计学方法

[0025] 所有数据用 SPSS 10.0 软件处理, 结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析比较各组间差异。

[0026] 7、结果

[0027] 7.1 ox-LDL 对大鼠心肌细胞分泌 TGF- $\beta$  1 的影响

[0028] 与空白对照组和 LDL 对照组相比, 浓度为  $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 ox-LDL 增加细胞培养上清液中 TGF- $\beta$  1 表达, 以 24h 时最明显。ox-LDL 组大鼠心肌细胞培养上清中 TGF- $\beta$  1 含量在 6h、12h、24h 及 48h 均明显高于空白对照组和 LDL 对照组 ( $P < 0.01$ ), 详见下表 1。

[0029] 7.2 ox-LDL 对大鼠心肌细胞分泌 bFGF 的影响

[0030] 与空白对照组和 LDL 对照组相比, 浓度为  $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 ox-LDL 增加细胞培养上清液中 bFGF 表达, 以 24h 时最明显。ox-LDL 组大鼠心肌细胞培养上清中 bFGF 含量在 6h、12h、24h 及 48h 均明显高于空白对照组和 LDL 对照组 ( $P < 0.01$ ), 详见下表 1。

[0031] 表 1、 $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LDL、ox-LDL 组大鼠心肌细胞 TGF- $\beta$  1 和 bFGF 因子的分泌 ( $x \pm s$ )

	0h	6h	12h	24h	48h
<b>TGF-<math>\beta</math>(ng/mL)</b>					
空白对照组	0.57±0.13	0.57±0.06	0.56±0.09	0.58±0.08	0.57±0.12
LDL对照组	0.55±0.12	0.59±0.16	0.66±0.06	0.62±0.14	0.63±0.14
[0032] Ox-LDL实验组	0.54±0.12	1.56±0.28*	2.56±0.61*	7.69±1.12*	5.92±0.54*
<b>bFGF(pg/mL)</b>					
空白对照组	4.41±0.88	4.67±1.16	4.53±1.23	4.52±0.84	4.41±1.06
LDL对照组	4.07±0.98	5.61±1.39	5.59±1.18	5.16±1.12	5.75±1.23
Ox-LDL实验组	4.15±1.35	15.26±3.42*	21.09±2.61*	55.29±6.59*	45.11±9.44*

[0033] 注:与 0h 组相比, \*P < 0.01

[0034] 实施例 3、

[0035] ox-LDL 体内促进心肌纤维化的研究:

[0036] 1、ox-LDL 的提取与鉴定

[0037] 提取正常人血清,经高速离心机离心,去除上层乳糜微粒后调密度,超速离心机离心两次,取上层 LDL,琼脂糖凝胶电泳鉴定,然后硫酸铜催化氧化得到 ox-LDL。经琼脂糖凝胶电泳及 MDA 试剂盒测氧化值,BCA 法测定蛋白浓度。

[0038] 2、实验分组实验分组空白对照组、LDL 对照组及实验组(每组 8 只)。

[0039] 3、给药方式 尾静脉注射。

[0040] 将 PBS 缓冲液、LDL 及 ox-LDL 经尾静脉注入大鼠血管内,每天注射一次。空白对照组中注射相应体积的 PBS 缓冲液,实验组注射 ox-LDL(血浆中终浓度为  $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), LDL 对照组中注射相同浓度的 LDL ( $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

[0041] 4、ELISA 法检测细胞血浆中 P I CP 浓度

[0042] 留取大鼠血浆,在 3000 转 /min 下离心 10min 后冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。用 ELISA 试剂盒检测各组培养液中的 TGF- $\beta$  1、bFGF 浓度。操作按照说明书进行。

[0043] 5、组织学方法

[0044] 分别于第 1、7、14、21 及 28 天,麻醉状态下取出心脏,用冰冻生理盐水冲洗干净,取心室肌放入 4%多聚甲醛中固定。常规石蜡包埋,切片厚度为  $5 \mu\text{m}$ ,每个石蜡块取 10 张切片进行 Masson 染色,普通光镜观察形态学改变。图像采用 Image pro plus 6.0 图像分析处理软件手动计算绿色纤维和红色胶原的面积,计算胶原容积分数。

[0045] 6、统计学方法

[0046] 所有数据用 SPSS 10.0 软件处理,结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析比较各组间差异。

[0047] 7、结果

[0048] 7.1 ox-LDL 对大鼠血浆中 P I CP 浓度的影响与空白对照组和 LDL 对照组相比,浓度为  $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 ox-LDL 增加血浆中 P I CP 表达,以第 21 天时最明显。ox-LDL 组大鼠血浆中 P I CP 浓度在第 7、14、21 及 28 天均明显高于空白对照组和 LDL 对照组 ( $P < 0.05$ ), 见下表 2。

[0049] 7.2 ox-LDL 对大鼠胶原容积分数的影响与空白对照组和 LDL 对照组相比,浓度为  $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 ox-LDL 增加心肌胶原容积分数,以第 21 天时最明显。ox-LDL 组大鼠心肌胶原容积分数在第 7、14、21 及 28 天均明显高于空白对照组和 LDL 对照组 ( $P < 0.05$ ), 见下表 2。

[0050] 表 2、 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LDL、ox-LDL 组大鼠血浆中 P I CP 浓度和胶原容积分数

[0051]

	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
<b>PICP (ng/mL)</b>					
( $\bar{x} \pm s$ )					
空白对照组	53.10±5.25	54.29±5.41	55.68±4.46	55.69±6.11	53.51±4.31
LDL对照组	54.62±4.88	55.27±4.89	59.19±5.14	56.33±6.87	55.92±8.94
Ox-LDL实验组	56.69±8.73	64.53±5.88 <sup>△</sup>	71.65±8.53 <sup>△</sup>	75.81±6.97 <sup>*</sup>	67.76±7.35 <sup>△</sup>
<b>胶原容积分数</b>					
( $\bar{x} \pm s$ , % )					
空白对照组	2.85±0.66	2.60±0.52	2.69±0.62	2.65±0.67	2.79±0.73
LDL对照组	3.15±0.59	2.94±0.74	2.59±0.67	2.69±0.65	2.91±0.81
Ox-LDL实验组	2.97±0.41	3.23±0.76	3.83±0.85 <sup>△</sup>	4.67±0.94 <sup>*</sup>	4.13±0.49 <sup>△</sup>

[0052] 注 :与 0h 组相比, \*P < 0.01 △ P < 0.05

专利名称(译)	一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法及应用技术		
公开(公告)号	<a href="#">CN101787076A</a>	公开(公告)日	2010-07-28
申请号	CN201010109973.0	申请日	2010-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	徐州市心血管病研究所		
申请(专利权)人(译)	徐州市心血管病研究所		
当前申请(专利权)人(译)	徐州市心血管病研究所		
[标]发明人	宫海滨 徐锁平 苏景力 王洁 庞慧 李春梅		
发明人	宫海滨 徐锁平 苏景力 王洁 庞慧 李春梅		
IPC分类号	C07K14/47 G01N33/53 G01N1/28 G01N1/30 G01N1/42		
代理人(译)	什么先生		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种低密度脂蛋白的制备方法，具体涉及一种氧化型低密度脂蛋白的制备方法及应用，属医学检测技术领域。该方法通过对氧化型低密度脂蛋白的提取与鉴定、氧化型低密度脂蛋白体外促进心肌纤维化的研究，利用本发明提取的氧化型低密度脂蛋白对心肌纤维化的作用，探索心肌纤维化的发生机制，阻断其信号通路可促进抗心肌纤维化药物的研发。

	0h	6h	12h	24h	48h
<b>TGF-β(ng/mL)</b>					
空白对照组	0.57±0.13	0.57±0.06	0.56±0.09	0.58±0.08	0.57±0.12
LDL对照组	0.55±0.12	0.59±0.16	0.66±0.06	0.62±0.14	0.63±0.14
Ox-LDL实验组	0.54±0.12	1.56±0.28*	2.56±0.61*	7.69±1.12*	5.92±0.54*
<b>bFGF(pg/mL)</b>					
空白对照组	4.41±0.88	4.67±1.16	4.53±1.23	4.52±0.84	4.41±1.06
LDL对照组	4.07±0.98	5.61±1.39	5.59±1.18	5.16±1.12	5.75±1.23
Ox-LDL实验组	4.15±1.35	15.26±3.42*	21.09±2.61*	55.29±6.59*	45.11±9.44*