

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

氧化性低密度脂蛋白之結構及其臨床應用研究(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-002-088-

執行期間：92年02月01日至93年01月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院內科

計畫主持人：李源德

共同主持人：張博淵，周綠蘋，李啟明，王水深，許秀卿

計畫參與人員：陳靜宜，葉修足

報告類型：精簡報告

報告附件：國際合作計畫研究心得報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 11 月 28 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫執行報告

氧化性低密度脂蛋白之結構及其臨床應用研究 (1/3)

Study on the Structure of Ox-LDL and Its Clinical Application (1/3)

計畫編號：NSC 92-2314-B002-088

執行期限：92年2月1日至93年1月31日

主持人：李源德 教授 執行機構及單位名稱：國立台灣大學醫學院內科

電子信箱：ytlee@ha.mc.ntu.edu.tw.

一、緣由與目的

許多研究結果證實，低密度脂蛋白的氧化和粥狀硬化的形成以及惡化程度密切相關，如何從氧化性低密度脂蛋白的氧化性修飾結構中，去尋找出具有專屬特性之生物標誌，是揭開粥狀硬化啟始機制及對應方針的不二法門。關於低密度脂蛋白上的脂質氧化，已有許多研究報告，然而對於低密度脂蛋白結構上的蛋白成分變化所知不多，脂質氧化的形成與堆積可藉由不飽和脂質之過氧化粒子產生來分析，相對地，低密度脂蛋白結構上的原脂蛋白，則具有化學性狀多樣性，再經過氧化性修飾之後，將提供更多的專屬生物標誌，是研究生物體內氧化性低密度脂蛋白性狀的重要課題。本計劃即是針對此種氧化性修飾結構做進一步探討，以期對粥狀硬化的初始步驟和進程做深入了解，並為治療預防工作提供指標。

二、初步結果

目前我們已採集從外科開刀手術取下之血管粥狀硬塊，且已從硬塊中萃取出低密度脂蛋白，經分析其成份組成為蛋白質佔 $19.8 \pm 1.6\%$ 、三酸甘油酯 $3.8 \pm 1.2\%$ 、膽固醇為 $12.1 \pm 3.2\%$ 、酯化膽固醇為 $13.6 \pm 2.4\%$ 、磷脂質為 $51.5 \pm 3.2\%$ 。進一步分析其蛋白質成分中已受氧化

的部位，我們利用 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 化合物與蛋白質作用與否來探尋受氧化的部分。如圖一所示，可以找到可能受氧化的部分在於區分 5、6、7，將此區分再經由 matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) 質譜分析(圖二)，可得可能受氧化的胜太質量，如表一所示。當將低密度脂蛋白中的原脂蛋白 B₁₀₀ 以梯度電泳分離出(圖三)，進行 in-gel digest，再行質譜分析如圖四所示可得可能的氧化部分如表二所示。這些氧化部分的發現將有助下一階段的探索分析。

三、承續之研究工作

本研究將持續探討受修飾的胺基酸種類與其鍵接結構，特別是目前進度已發現的可能胜太部位，將就這些胜太區類以 Q-TOF 質譜儀來輔助到定胜太序列、質量。由於分析物的含量為 nanogram 範籌，將尋求層析串聯質譜儀的分析方式來解決，順利完成即定目標，指日可待。

Table 1. The possible peptide site of oxidative modification for DNPH-treated LDL

	Mass (m/z)
Fraction 5	512.9153; 537.0244; 551.9941; 552.9992; 568.9724; 572.9630; 573.9607; 574.9831; 698.0545; 699.0513; 700.0531; 709.0213; 714.9749; 728.9782; 731.0018; 746.9750; 867.0237; 887.0146; 1043.0096; 1053.1359; 1069.0407 and 1085.0219
Fraction 6	1374.9931
Fraction 7	529.0261; 551.0115; 572.9975 and 573.9963

Table 2. The possible peptide site for oxidative modification of apo B₁₀₀.

Mass (m/z)	Position
726.3893	1636-1642
1045.6040	2626-2634
1139.5367	101-110
1632.8380	718-732
1833.9745	3508-3524

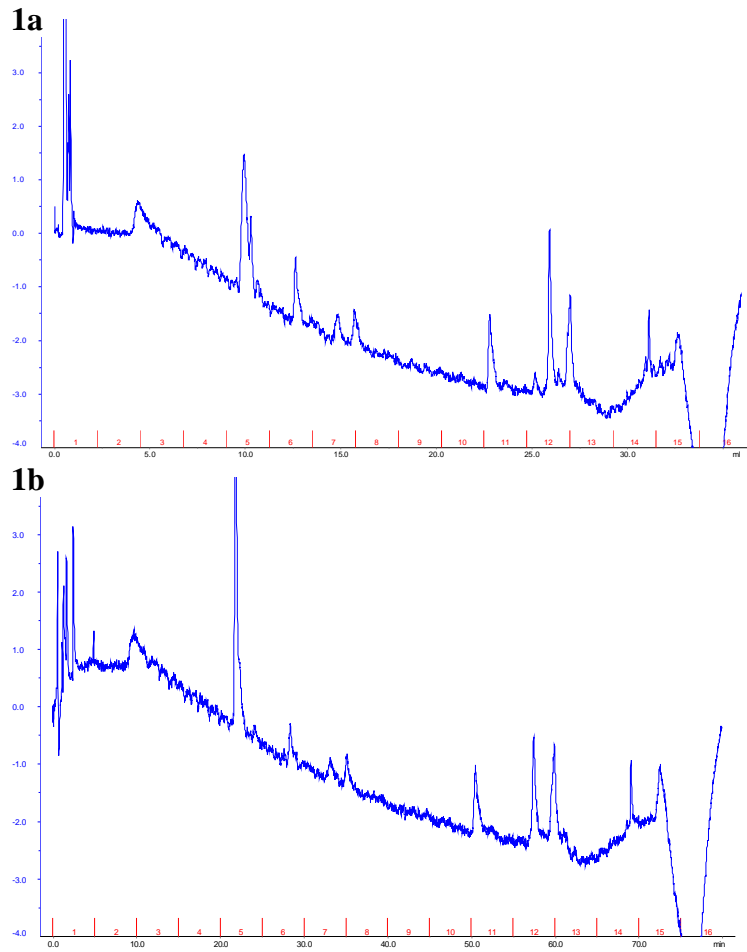
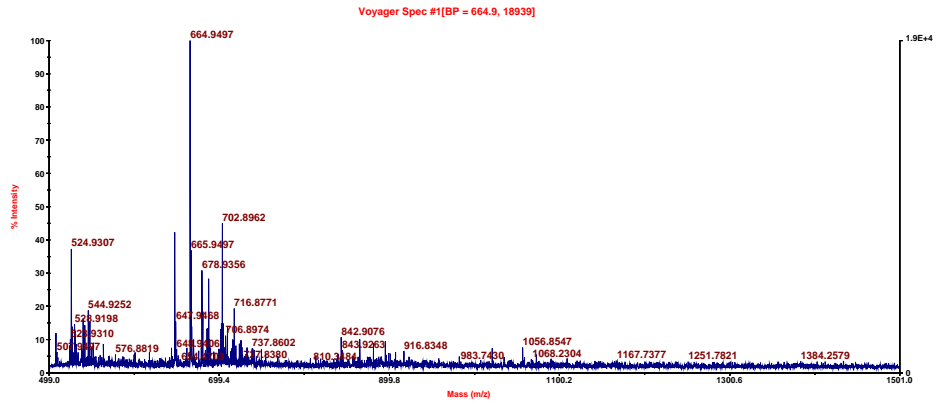
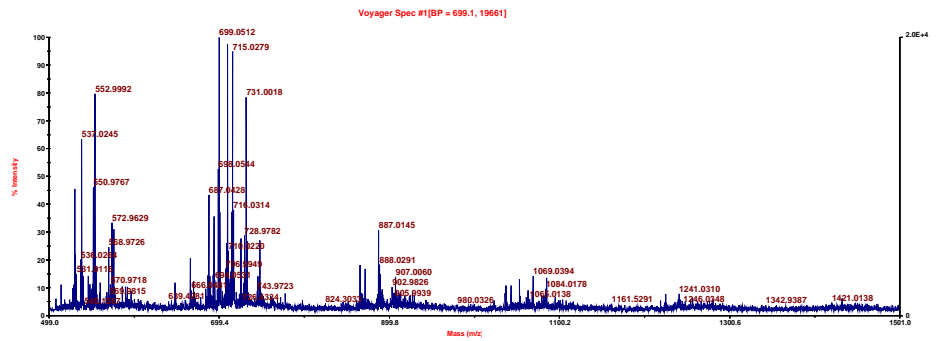
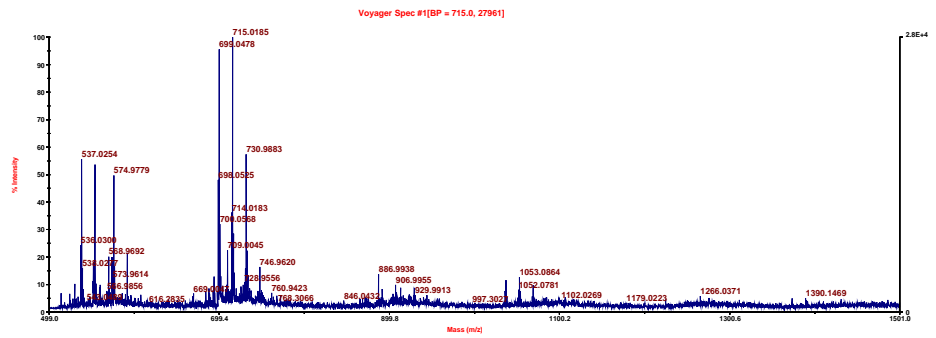
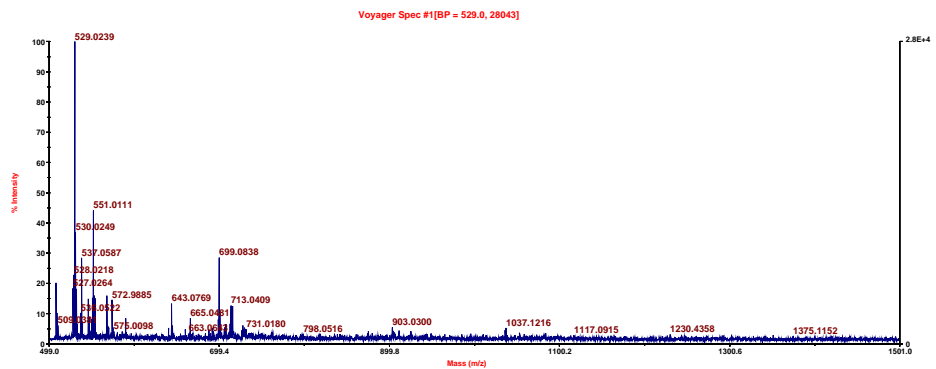


Figure 1a and 1b. HPLC of DNP-treated **LDL** tryptic peptides separated by reverse phase chromatography. 3a: **LDL** extracted from atheroma without DNP. 3b: LDL extracted from atheroma with DNP.

A**B****C****D**

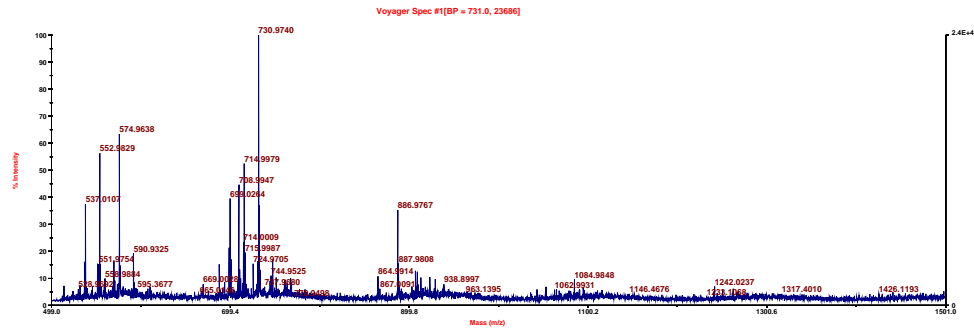
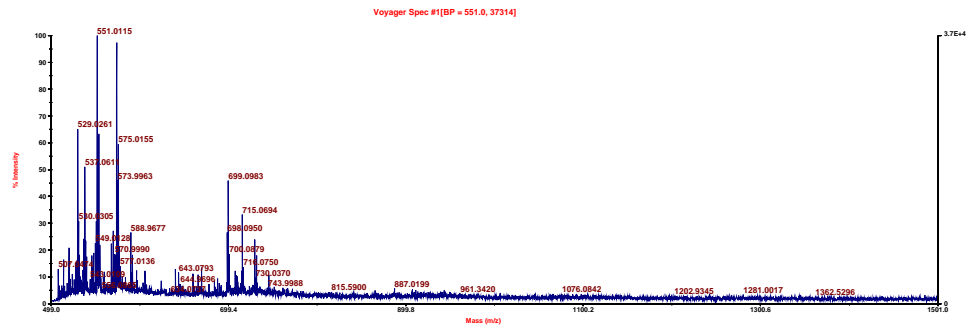
E**F**

Figure 2. a: mass spectra of LDL without DNPH treatment from fraction 5. b: mass spectra of LDL with DNPH treatment from fraction 5. c: mass spectra of LDL without DNPH treatment from fraction 6. d: mass spectra of LDL with DNPH treatment from fraction 6. e: mass spectra of LDL without DNPH treatment from fraction 7. f: mass spectra of LDL with DNPH treatment from fraction 7.

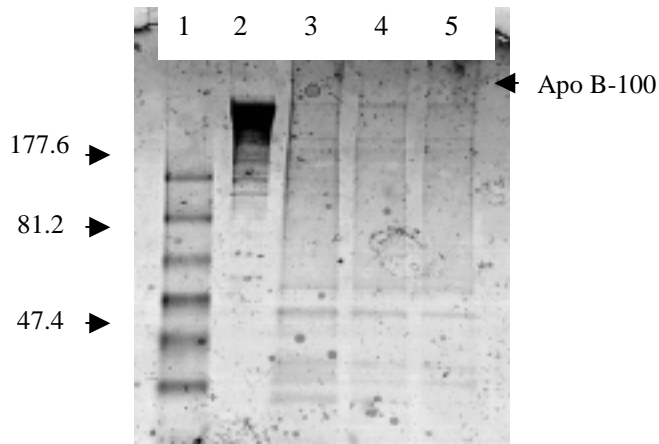
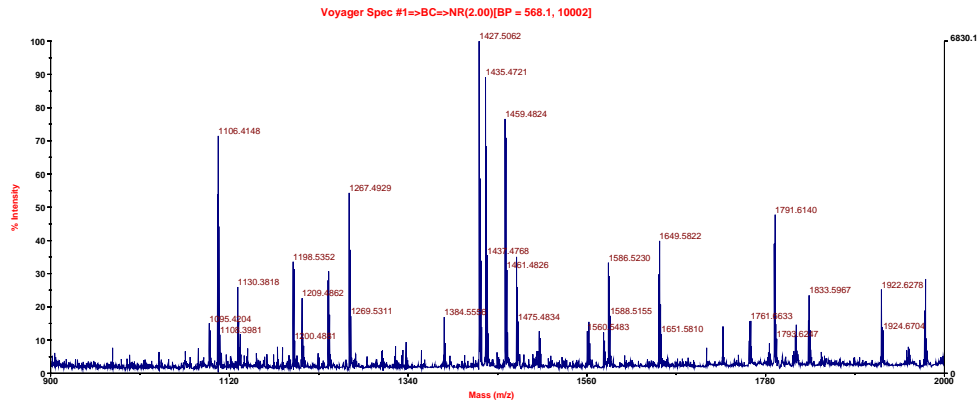


Figure 3. Apo B-100 in 4-20% gradient gel. Lane 1: marker, lane 2: plasma LDL for positive control, lane 3: LDL from atheroma with DNP treatment, lane 4 and 5: LDL extracted from atheroma without treatment. Each lane was loaded 10 μ g protein.

4a



4b

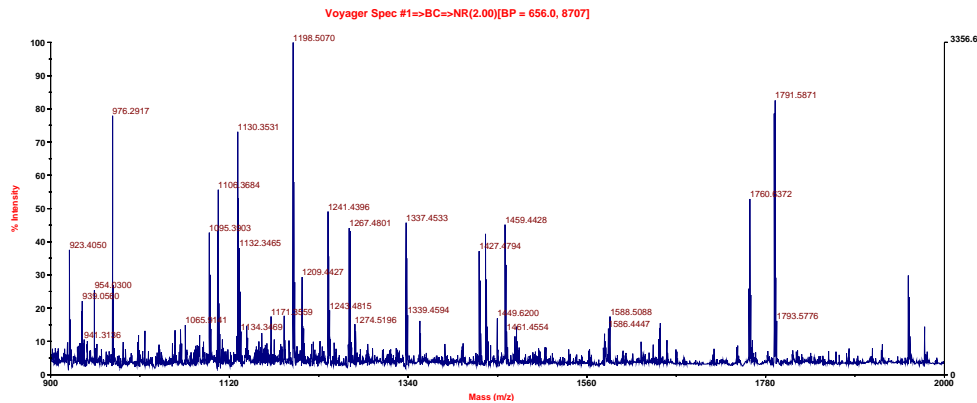


Figure 4a and 4b. 2a: mass spectra of apo B-100 without DNP treatment. 2b: mass spectra of apo B-100 with DNP treatment.