O－LDL与动脉粥样硬化研究的新进展

第一军医大学脂质过氧化损伤研究组 周 玫 陈 瑗

摘 要 氧化修饰低密度脂蛋白(O－LDL)在动脉粥样硬化发生发展中的作用，日益受到人们的重视。特别是作为唯一能有效地缓解纯合子型家族性胆固醇血症患者的皮肤和肌腱黄色瘤及阻止纯合子型Watanabe遗传性高脂血症家兔动脉粥样硬化发展的降胆固醇药物Probucol，现在知道是一种抗氧化剂，它的治疗作用是通过阻止低密度脂蛋白(LDL)氧化修饰，而不是它的降胆固醇效应。已有大量的研究说明氧化修饰的低密度脂蛋白在动脉粥样硬化发生发展中具有重要作用。近年来研究在不断深入，特别是发现最小修饰LDL对基因的调控。它在体外能诱导内皮细胞(EC)JE基因mRNA表达和使单核细胞化学趋向性蛋白－1(MCP－1)含量增加，从基因水平说明动脉粥样硬化病变早期单核细胞粘着于内皮细胞与机体受到脂质过氧化损伤有关。MM－LDL静脉注射能使血液M－CSF含量升高，组织JE基因mRNA表达增加，富含巨噬细胞的主动脉病变区含有O－LDL和与其有关的特有的活性蛋白和mRNA，以及冠心病患者冠状动脉扩张反应减弱与O－LDL对内皮细胞、内皮依赖性扩张因子和平滑肌细胞的作用有关，从不同水平的实验进一步说明O－LDL在动脉粥样硬化发生发展中的作用。

关键词 氧化修饰低密度脂蛋白； 动脉粥样硬化

氧化修饰低密度脂蛋白(O－LDL)的研究始于1981年[1]，由于它与动脉粥样硬化(As)的主要病理改变之一的泡沫细胞形成有关而受到研究者的关注[2]，它在As发生发展中的作用日益受到人们的重视[3~7]。特别是作为唯一能有效地缓解纯合子型家族性胆固醇血症患者的皮肤和肌腱黄色瘤及阻止纯合子型Watanabe遗传性高脂血症家兔As发展的降胆固醇药物probucol，现在知道是一种抗氧化剂，它的治疗作用是通过阻止低密度脂蛋白(LDL)氧化修饰，而不是它的降胆固醇效应[8]。早在1989年Steinberg等[9]根据自己的工作和文献资料提出O－LDL致As的4个效应：对单核细胞的化学趋向性，吸引外周单核细胞；抑制内膜下巨噬细胞迁移至外周；通过清道夫受体巨噬细胞摄取O－LDL形成泡沫细胞；对内皮细胞的毒性效应，早期促使LDL和单核细胞进入内膜，晚期导致内皮细胞脱落。同时作者以O－LDL为损伤因子将有关As发生的二种主要学说，脂质浸润学说和内皮损伤学说统一起来。近年来研究在不断深入。尤其是轻度修饰LDL(MM－LDL)对基因的调控，O－LDL单克隆抗体的组化以及O－LDL与活性氮NO和As冠状动脉扩张性改变等的研究更进一步说明O－LDL在As发生发展中的作用。

1 MM－LDL诱导单核细胞和内皮细胞的相互作用

单核细胞与内膜结合进入内膜下是As发生的早期病变。与已形成脂肪条纹时相比，此时内膜下尚无细胞，因而受到氧化修饰的LDL量较少，氧化的程度也较轻。为了说明O－LDL在单核细胞与内皮细胞相互作用中的意义，Benliner等[9]用MM－LDL(2－5nmol TBARS/mg胆固醇)处理内皮细胞观察其对单核细胞的结合量和单核趋向性因子的产生量影响。结果显示MM－LDL的量小至0.12μg/ml即可使内皮细胞生成单核细胞趋向性因子增加(7倍)，并有明显的剂量效应。内皮细胞和单核细胞的结合量增加3～5倍，亦有明显的剂量效应。在MM－LDL作用后4hr最明显，可持续到48hr，单核细胞的结合量可以受到放线菌酮的抑制，说明它们的结合与蛋白合成有关。MM－LDL作用1～2hr后都未见到中性粒细胞结合。结合试验说明LDL的活性主要是其极性的脂类成分。

Cushing等[9]发现不仅内皮细胞而且平滑肌细胞也能受到MM－LDL作用生成单核细胞趋向性因子，该因子就是人神经胶质瘤U－105MG细胞

系产生的单核趋化性蛋白 1(monocyto chemotactile protein 1,MCP－1)。用平滑肌细胞趋化性因子制得的抗体(anti－SMCF)能完全抑制经和未经 MM－LDL 诱导的内皮细胞、平滑肌细胞和人神经胶质瘤细胞系产生的单核细胞趋化性活性，也能完全抑制单核细胞向内皮细胞下迁移。但 anti－SMCF 对 fMLP 诱导的单核趋化性活性无抑制作用。anti－SMCF 能特异性地沉淀 EC 介质中的 10 kDa 和 12.5 kDa 蛋白。同时也观察到 MM－LDL 能增强内皮细胞和平滑肌细胞的 MCP－1 mRNA 的表达，并显示明显的浓度效应。MM－LDL 对内皮细胞诱导的单核细胞趋化性活性、MCP－1 蛋白和 MCP－1 mRNA 的水平相平行。结果说明单核细胞趋化性因子就是 MCP－1 蛋白，以及 MCP－1 蛋白能被 MM－LDL 诱导。

最近已知小鼠 JE 基因产物是人 MCP－1 的相似物，能在静止的小鼠纤维母细胞中得到表达。为了进一步说明 MM－LDL 对 MCP－1 基因的调控机制，Bork[8]以静止期小鼠 L－细胞纤维母细胞为模型，观察到 JE－mRNA 的增加发生在 MM－LDL 处理后 1～4hr，以 4hr 为最多，达 20 倍。放线菌酮对 MM－LDL 诱导的增加无抑制作用，说明 JE mRNA 的增加不需要合成新的蛋白。但当加入放线菌素 D 时 MM－LDL 的诱导作用则完全受到抑制，说明基因表达的诱导作用是直接的。

上面从 MM－LDL 对内皮细胞的作用说明其对内皮细胞与单核细胞的相互作用的影响。Frostegard 从 O－LDL 对单核细胞的作用，提示受到 O－LDL 作用的单核细胞也易于粘着内皮细胞。同时观察到 O－LDL 可使单核细胞 HLA－DR(major histocompatibity complex class Ⅱ 抗原)、LeuM，表达增加和 CD4 表达降低，反映了巨噬细胞样高度分化的表型。结果说明 O－LDL 对单核细胞的作用，也可促使其对内皮细胞的粘着和促使其向巨噬细胞分化。这些都是有利于泡沫细胞的形成。

2　MM－LDL 诱导内皮细胞对 G－CSF 和 M－CSF 的基因表达

已知 M－CSF 能影响巨噬细胞的分化、成活、增殖、迁移和代谢；激活单核巨噬细胞；刺激单核巨噬细胞清道夫受体基因和 apo lipoprotein E 基因表达。巨噬细胞产生的生长因子可促进平滑肌细胞增生[9]。高脂血症动物外周单核细胞和骨髓前单核细胞(monocyte precursors)增加[9]。

Rajarshisth 等[3]研究 MM－LDL 对内皮细胞 M－CSF、GM－CSF 和 G－CSF 的表达的诱导作用，揭示 MM－LDL 能产生明显的诱导作用，未受到氧化修饰的 LDL 对 CSF 的表达无刺激作用。它们诱导的时间过程相似，作用 1hr CSF mRNA 即出现，4hr 达高峰。M－CSF 活性测定(集落形成方法)也说明受到 MM－LDL 作用的主动脉内皮细胞的培养介质中 M－CSF 的含量增加，与对照组相比，以作用 4hr 增加最明显，这种增加的活性可以受到 M－CSF 单克隆抗体阻断。不同来源的内皮细胞对 MM－LDL 的反应性不同，人和兔的主动脉内皮细胞对 MM－LDL 能反应，而人脐静脉内皮细胞则无反应，这说明不同区域的动脉壁对发生脂肪条纹和斑块的敏感性是不同的。丙二醛修饰的 LDL(MDA－LDL)和 LDL－样没有诱导作用，不同的是 LDL 对 MM－LDL 有竞争性抑制作用而 MDA－LDL 则没有，说明 MM－LDL 的作用是通过受体途径，给以高胆固醇食物兔主动脉的病变区和给以正常食物兔主动脉相应区的 M－CSF mRNA 测定显示病变区的含量较对照组高 2 倍。这与高血脂动物外周单核细胞和骨髓前单核细胞增加相一致。

为进一步了解 MM－LDL 在体内的生物活性及其对动脉粥样硬化发生的贡献，Liao[3]等观察了注射微克量 MM－LDL 小鼠血清 CSF 的含量和某些组织 JE mRNA 的表达。结果是：MM－LDL 能诱导血清 CSF 活性增加，并有明显的量效关系，其升高的时间过程是 MM－LDL 注射后 10hr 为最明显，20hr 开始下降；用抗 M－CSF 抗体说明血清中 CSF 主要是 M－CSF。MM－LDL 注射小鼠肝、心肺、脾和肾的 JE mRNA 水平明显增加而 LDL 注射对 JE mRNA 表达无诱导作用。有趣的是对二种食物诱导动脉粥样硬化敏感性(表现在单核细胞对内皮细胞粘着、进入内膜下转变为巨噬细胞和泡沫细胞形成)不同的纯种小鼠进行试验，发现敏感小鼠(C_3 BL/6)和不敏感小鼠(BALB/C 和 CBH)都能诱导血清 M－CSF 含量增加和组织 JE mRNA 表达。由此作者提出，对食物诱导的动脉粥样硬化早期病变的敏感性是由于它们氧化修饰低密度脂蛋白形成的差异。因为对食物诱导有抵抗力的小鼠

血清 HDL 含量较高，而 HDL 能防止 LDL 的氧化修饰。

3 富含巨噬细胞的主动脉病变区含有 O－LDL 和与其有关的特有的活性蛋白和 mRNA

体外研究已证明巨噬细胞 15－脂加氧酶(15－LO)能氧化修饰 LDL[3]，以及发现兔主动脉粥样硬化损伤区存在较高活性的 15－LO[3] 和 O－LDL[3~5]。Yla－Herttuala 等[3]用原位杂交和免疫组化技术，研究了 WHHL 兔主动脉病变区 15－LO 是否存在，哪一型细胞表达 15－LO 蛋白和 mRNA，以及它们的表达与 O－LDL 的部位关系。

用 15－LO mRNA 反义探针与组织切片杂交，显示早期和进展性病变区内膜下和侧缘(shoulder)区有 mRNA 表达，在某些内膜，可见到微弱的表达，内膜深层没有 15－LO mRNA 表达。15－LO 正义探针和 5－LO 反义探针对组织切片都不产生杂交。组织切片事先用 RNase A 处理，15－LO mRNA 表达受到抑制。用无关反义探针(人 retiroic acid 受体探针)杂交没有表达(没有显示)。与有明显 15－LO 表达的病变区相比，主动脉正常区没有表达或只有微弱表达。正常血管壁和内膜检测不到 15－LO mRNA。

用巨噬细胞特异的单克隆抗体免疫染色显示，与 15－LO 探针反应的是巨噬细胞。与抗 MDA－LDL 抗血清的显色与 15－LO mRNA 和巨噬细胞在同一部位。用抗 4－羟基壬烯醛修饰的 LDL(4HNE－LDL)的抗血清得到同样的结果。用抗蛋白 B(apoB)单克隆抗体在富含巨噬细胞区没有显色反应，而是在不含有巨噬细胞的内膜层呈现显色反应。

用 15－LO 特异的寡核苷酸作引物的 PCR 技术亦证明病变部位存在 15－LO mRNA，以扩增的 349bp 大小片段，用 3 个限制性内切酶进行酶切图谱分析与已知的 15－LO 的基因序列相一致。Ava 产生 270 和 82bp 片段，sca 1 产生 265 和 87bp 片段，pvu Ⅰ对放大的片段无切割作用。以上结果说明 WHHL 兔主动脉病变区有 15－LO 蛋白和 mRNA 的表达，并主要限于富含巨噬细胞的病变区，而且与 O－LDL 所在位置相一致。

作者[3]用相同的技术和方法对动脉粥样硬化患者主动脉脂肪条纹和进展性病变区进行研究，进一步说明患者的病变区同样有 15－LO 蛋白和 mRNA 表达以及 O－LDL、MDA－LDL 和 4HNE－LDL 存在，也主要限于富含巨噬细胞病变区，同时用 LDL 和乙酰化－LDL 受体 mRNA 探针揭示有清道夫受体 mRNA 的表达，和表达也限于富含巨噬细胞的病变区。但没有 LDL 受体 mRNA 表达。本结果提示巨噬细胞 15－LO 在病变区 LDL 氧化修饰和 As 发生中起重要作用。

Rosenfeld 等[2]从兔 As 主动脉损伤部位分离纯化和经鉴定得的巨噬细胞，不但能与抗 MDA－LDL 和 4HNE－LDL 单抗结合，而且对台盼兰有排斥反应，以及能使 LDL 氧化和降解 O－LDL，说明 O－LDL 和泡沫细胞之间能建立恶性循环，以加重 As 的发展，因此阻断血管壁中巨噬细胞 15－LO 活性，有可能抑制 As 的发展。

4 O－LDL 抑制 As 冠状动脉的扩张

As 和高胆固醇血症患者冠状动脉痉挛可以导致心绞痛、心肌梗塞和突然心脏病死亡。近年来对内皮依赖性扩张因子(EDRF)就是 NO 的阐明，促进了 As 冠状动脉痉挛机理的研究，发现其扩张性改变与 O－LDL 有关。

内皮细胞(EC)受到激活剂刺激释放 NO，其扩散至平滑肌细胞(SMC)激活鸟苷酸环化酶，使 cGMP 含量增加，血管扩张。除乙酰胆碱外，p 物质、激肽、5－羟色胺(5－HT)和钙载体 A23187 等也都可刺激 EC 释放 NO。NO 是由 NO 合成酶催化精氨酸胍基氮氧化生成的。由于其氮原子上存在单电子，属氮自由基，又称活性氮。

Chester 等[4]对冠心病和非冠心病患者心包外冠状动脉(由心脏移植患者取得的)扩张程度的测定。在基础条件下和在 P 物质和激肽的刺激下，冠心病患者冠状动脉的扩张程度都较非冠心病患者的为小，冠状动脉的扩张可以受到 NO 合成酶抑制剂 L NMMA 的抑制。结果说明 As 患者控制血管张力平衡机制受损。Kugiyama 等[5]根据 O－LDL 与 As 的发生发展有关，以乙酰胆碱为刺激剂，研究了 O－LDL 对兔主动脉扩张的影响。与 n－LDL 和去除脂类的 O－LDL(A－O－LDL)相比，O－LDL 对血管扩张有明显的抑制作用，用猪冠状动脉的研究[6]也显示 O－LDL 对 5－HT 刺激的血管扩张有抑制作用，并有明显的浓度效应；CAT 能减弱 O－

LDL 的抑制作用，SOD 对 O－LDL 的抑制作用无影响。以上研究说明 O－LDL 除了致 As 作用外，还与 As 和高胆固醇血症患者好发生冠状动脉痉挛有关。

对 As 冠状动脉对内皮依赖性扩张因子介导的扩张反应减弱的机理研究，Kugiyama[3]的实验说明是由于 O－LDL 生成的可溶性磷脂使 EC 膜发生改变，使血管扩张刺激的特异性受体遭到破坏。

Minor 等[3]在观察内皮依赖性血管扩张的同时测定了 NO 含量，结果发现，As 家兔降主动脉的基础性和受乙酰胆碱或 A29187 刺激的 NO 产量与正常家兔相应主动脉相比，非但不降低，而且明显升高。若以释放 NO 产生的血管扩张作用作图，可见，As 生成的 NO 的血管扩张作用明显减弱，As 血管释放的是相对无活性状态的 EDRF，酶性合成 NO 的过程及激活酶的信号传递机制没有受损。作者提出，可能是在氧自由基和 O－LDL 作用下，NO 不能生成活性更强的硝基化合物（nitrosylated compound）或是加速了细胞内外 EDRF 的分解（$NO \rightarrow NO_2^-$ 或 $RNO \rightarrow R^+ + NO_2^-$）。硝基化合物可能是硝基半胱氨酸（nitrosocystein），因其比 NO 更稳定，更像 EDRF。Chin 等[3]以牛主动脉 EC（BAEC）作为 EDRF 源，以富含鸟苷酸环化酶的肺纤维母细胞 RFL－6 作为检测细胞和以 cGMP 含量作为 EDRF 的活性指标，研究结果也支持以上观点，表现在 O－LDL 加到 BAEC 或 RFL－6 中的抑制作用一样，以及 O－LDL 与 RFL－6 细胞作用后在加入受激肽刺激的 BAEC 条件培养液前将 O－LDL 洗除，O－LDL 则无作用。作者还用 NO 直接对 RFL－6 作用，观察了 O－LDL 的影响。在用 NO 作用于 RFL－6 前加 O－LDL 能明显地减弱 cGMP 的生成，在加 NO 前同时加入抗氧化剂 BHT，能明显地消除 O－LDL 的抑制作用以及一些氧自由基生成系统和活性氧 H_2O_2 与 O－LDL 一样能明显地抑制 NO 对鸟苷酸环化酶的激活作用。结果进一步说明 As 冠状动脉的扩张性受抑制还可能与 O－LDL 对 EDRF 的直接作用有关。Galle 等[3]最近用去 EC 的动脉研究了 O－LDL 对 NO（cGMP 通路）和前列腺环素（cAMP 通路）诱导血管扩张作用的影响。用 forskolin 和 nitroprusside 分别作为 cGMP 和 cAMP 的刺激剂，发现 O－LDL 对两种刺激剂所致的血管扩张和 cGMP 和 cAMP 生成都明显的抑制作用，而且这种抑制是特异性的，因为对钙拮抗剂硝吡甲酯（nitroendipine）的扩张作用则无影响。

以上结果说明，当 As 发生时，O－LDL 可以使冠状血管扩张反应减弱，它除了可以直接影响 EC 外，它还能降低 EDRF 的效应，或通过直接的灭活，或影响 SMC 的信号传递。

参 考 文 献

1. Esterbuauer H, et al. Biochemical structural and functional properties of oxidzed low density lipoprotein. Chem Res Toxicol 1990;3(2):77～92
2. Heinecke JW, et al. Free radical modification of low－density lipoprotein: machanisms and biological consequences. Free Redical Biol Med 1987;3:65～73
3. Steinberg D, et al. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. New Eng J Med 1989;320:915～924
4. Steinbrecher UP, et al. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. Free Radical Biol Med 1990;9:155～168
5. Witxum JL, et al. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J Clin Invest 1991;88:1785～1792
6. 陈瑗，周玫. 脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化. 陈瑗，周玫主编，自由基医学. 北京：人民军医出版社，1991：223～257
7. 陈瑗，周玫. 氧化修饰的低密度脂蛋白在 As 发生发展中的作用. 方元中主编，自由基生命科学进展. 北京：科技出版社，1993：52～57
8. Steinberg D, et al. In vivo inhibition of foam cell development by probucol in watanabe rabbits. Am J Cardiol 1988;62:6B～12B
9. Berliner JA, et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulate monocyte endothelial interaction. J Clin Invest 1990;85:1260～1266
10. Cushing SD, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:5134～5138
11. Bork RW, et al. Mechanism controlling competent gene expression in murine fibroblsts stimulated with minified LDL. Arteriosclerosis and Thrombosis 1992;12:800～806
12. Frostegard J, et al. oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes

and the monocytic cell line U937. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:904～908

13. Clinto SK, Libby P. Cytokines and growth factors in atherogenesis. Arch Pathol Lab Med 1992;116:1292～1300
14. Bajavashisth TB, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony—stimulating factor by modified low density lipoprotein. Nature1990;344:254～257
15. Liao F, Berliner JA. Minmally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. J Clin Invest 1991;87:2253～2257
16. Rankin SM, et al. Evidence for domimant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophage. J Lipid Res 1991;32(3)499～456
17. Simon TC, et al. Formation of 15 — hydroxyeicosatraenoic acid (15—HETE) as the predominant eicosanoid in aortas from Watanabe heritable hyperlipidemic and cholesterol — fed rabbits. Atherosclerosis 1989;75:31～38
18. Yla — Herttuala S, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage—rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. Proc Natl Acad Sci USA 1990;88:5252～5256
19. Yla—Herttuals S, et al. Gene expression in macrophage—rich human atherosclerotic lesions: 15—lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein acceptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid— protein adducts. J Clin Invest 1991;87:1146～1152
20. Rosenfeld ME, et al. Macrophage—derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low—density lipoproteins, and contain oxidation—specific lipid—protein adducts, J Clin Invest 1991;87:90～99
21. Chester AH, et al. Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. Lancet 1990;336:897～900
22. Kugiyama K, et al. oxidized LDL impairs endothelium—dependent arterial relaxation. Circulation (Suppl Ⅱ) 1989;80(4):279
23. Simon BC, et al. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium — dependent relaxation in the pig coronary artery. J Clin Invest 1990;86:75～79
24. Kugiyama K, et al. impairment of endothelium—dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low—density lipoproteins. Nature 1990;334:160～162
25. Minor R, et al. Diet—induced atherosclerosis increase the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. J Clin Invest1990;86:2109～2116
26. Chin JH, et al. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. J Clin Invest 1992;89:10～18
27. Calle J, et al. Inhibition of cyclic AMP— and cyclic GMP—mediated dilations in isolated arteries by oxidized low density lipoproteins Arteriosclerosis and Thrombosis 1992;12:180～186
28. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993;362:801～809