氧化与糖基化修饰低密度脂蛋白和动脉粥样硬化

邱 近 明

(天津医科大学病理学教研室, 天津 300070)

氧化型低密度脂蛋白(OLDL)在动脉粥样硬化(As)发生中的作用现已引起人们广泛重视,因为实验证实它首先可促进单核源性泡沫细胞形成,后者为 As 的早期病变。近年来研究工作不断深入,更进一步发现修饰 LDL 尚具有多方面与促 As 有关的细胞生物学效应,从而使得以往 As 的复杂发病机理和学说(如炎症学说、脂质浸润学说和损伤反应学说等)进一步得到统一。并且现在已有较多研究证实体内,尤其在 As 病变区确有 OLDL 存在,这就更进一步说明了 OLDL 在体内促进动脉粥样硬化的重要意义。

修饰脂蛋白约有以下几种类型:如化学修饰、金属离子修饰、细胞修饰和糖基化修饰等。上述过程多为体外实验证实,如细胞修饰的研究也多依赖于低密度金属离子的存在。近期有文献指出,实际上金属在体内几乎全部以紧密结合的复合物形式存在,不催化氧化修饰作用。因此他们建立了一种体外不需加自由金属离子而使 LDL 氧化的简单方法以模拟体内过程,即利用辣根过氧化物酶和过氧化氢或脂质过氧化物共同作用导致 LDL 氧化修饰,其结果与金属离子修饰的程度一致。笔者指出这种非金属依赖性氧化修饰机制是否在体内存在,尚有待进一步证实。以下着重讨论细胞修饰、糖基化修饰 LDL 和动脉粥样硬化的关系。

1 细胞介导的低密度脂蛋白氧化修饰的可能机理

80 年代初期,实验室工作陆续报道动脉内皮细胞、平滑肌细胞和单核细胞在培养基中均可氧化修饰 LDL。孵育过程中首先细胞与 LDL 相互接触,细胞内的脂氧化酶[目前证实尤其是 15-脂氧化酶(大豆-脂氧化酶 SLO)能直接氧化 LDL 并使其具有毒性]在金属离子的催化下,可能产生以下作用:①脂氧化酶氧化细胞本身的脂质,然后将其转交给 LDL;②酶直接氧化 LDL 的脂质使其变为氧化型。此外还可有第三途径,即在细胞内产生超氧阴离子或活性氧,释放到培养基中参与 LDL 的氧化修饰;但对于超氧阴离子的作用也有阴性报道;③下一步由于 LDL 中不饱和脂肪酸大量氧化、脂质过氧化物明显升高、自由基增多、脂肪酸分解、双链被打开,同时伴有脂肪酸双链的重新排列,此外 LDL 中分离出来的磷脂酶 A_2(phospholipase A_2)导致大量卵磷脂(lecithin)分解为溶血卵磷脂(lysoleeithin),后者具有趋化作用;④与此同时一方面脂肪酸分解产生多种反应性中间产物,如丙二醛、酮等,另外载脂蛋白 B 发生降解。正常情况下 LDL 受体是通过识别 ApoB 上的赖氨酸残基而摄取 LDL,但当脂肪酸分解产物与赖氨酸残基共价结合后,LDL 受体便不能识别,反而被巨噬细胞表面的清道夫受体识别而大量摄取,从而导致泡沫细胞形成。

以上所述的氧化修饰过程的实验研究可被加入血浆而受到抑制,这提示细胞在体内氧化修饰 LDL 的过程必定发生在血管腔以外的与抗氧化剂隔离的微环境中,如内皮下间隙。

2 氧化修饰低密度脂蛋白致动脉粥样硬化机理研究

LDL 一旦进入动脉壁的内皮下间隙被氧化修饰后,将继发怎样的变化足以促进动脉粥样硬化的发生和发展?近年来在这方面的研究工作逐步增多而深入。

2.1 通过细胞因子吸引或激活血中单核细胞

过去的实验研究早已观察到动物实验性 As 的最早期病变是血中单核细胞粘附于内皮细胞表面或伸出伪足通过扩大的内皮细胞间连接的孔隙游入或游出内膜,并侵入内皮下间隙吞噬脂质形成泡沫细胞。显然这与 LDL 氧化修饰过程中产生的大量溶血卵磷脂的化学趋向作用有关,也说明这一过程是内皮和单核细胞相互作用的结果。

近年来 Berliner 等根据 As 病变最早时期内皮下间隙细胞成分极少的事实,而推断该氧化修饰 LDL 的量既少,而程度也轻,称之为轻度修饰 LDL(mm-LDL)。并报道应用 mm-LDL(Σ-与 5nmol TBARS/mg 胆固醇)与培养的内皮细胞相互作用,可促使内皮产生单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的量明显增加(7 倍于正常),内皮和单核细胞的结合量增加 3～5 倍。另有报道

不仅内皮，平滑肌细胞与 mm-LDL 作用后也能产生 MCP-1。这些研究工作进一步说明了趋化因子对早期脂纹形成的重要意义。

另外，Rajavashisth 等报道 mm-LDL 可促使主动脉内皮细胞集落刺激因子的 mRNA 水平升高，随后 Liao 等观察了给小鼠注射 mm-LDL 可使其血清中单核细胞集落刺激因子水平明显升高达 7～26 倍。

已知巨噬细胞集落刺激因子（macrophage colonystimulating factor，MCSF）具有激活巨噬细胞功能作用，能过增加巨噬细胞清道夫受体数目和活性促进对 O-LDL 的摄取。上述实验报道提示 mm-LDL 很可能在体内有刺激内皮细胞分泌 MCSF 而促进泡沫细胞形成的作用。

血中单核细胞不断的进入内皮下间隙并在该处储留并进一步氧化修饰 LDL，导致更多的泡沫细胞形成和趋化更多单核细胞进入内皮下，造成恶性循环。因而早期脂纹病灶不断形成和扩大。

2.2 氧化修饰 LDL 的毒性作用导致内皮功能性损伤以至坏死脱落

氧化型低密度脂蛋白可致内皮细胞功能性损伤、通透性增强。Gorog 等在研究主动脉内皮对 LDL 的摄取时；发现在体主动脉内皮摄取 OLDL 量比摄取 LDL 量增加 9 倍，培养的内皮摄取 OLDL 量比摄取 LDL 量增加 4 倍以上，其摄取途径可能通过非受体内饮途径或受体途径。进入内皮下间隙的 OLDL 更可进一步促进病变发展。内皮受损后，其 PGI_2 合成减少，改变了 PGI_2/TXA_2 比值，从而促进血小板聚集、血栓形成和 As 发展。内皮受损可激活血小板，释放血小板源性生长因子（PDGF），后者促使动脉内膜下平滑肌细胞增殖并移入内膜层，进一步产生纤维结缔组织成分，导致纤维斑块形成。内皮损伤后，激活血小板分泌一种蛋白样因子，可促进清道夫受体对 OLDL 的摄取。内皮严重变性脱落后，将使 LDL 和单核细胞大量进入内膜导致动脉粥样硬化的进一步发展。

2.3 修饰脂蛋白具有免疫源性

在早期动脉粥样硬化病灶中除了大量泡沫细胞以外现已观察到还有较多 T 淋巴细胞聚集，这些细胞的出现说明什么意义？

Palinski 主要应用免疫组织化学方法证实在 Watanabe 遗传性高脂血症兔（WHHL）主动脉粥样硬化病变区有 OLDL 存在而正常区则无；并证实在兔和人的血清中有抗 OLDL 的自身抗体，后来他应用 OLDL 免疫动物可产生抗 OLDL 抗体。根据以上实验推想抗 OLDL 抗体可与动脉壁中的 OLDL 相结合，形成免疫复合物，进一步引起类似炎症的免疫应答反应，这有利于 As 早期病变的发展。上述作用尚待进一步研究。

3 糖基化修饰低密度脂蛋白致动脉粥样硬化机理

众所周知糖尿病性动脉粥样硬化的发生率明显高于非糖尿病患者而且病变严重，常成为患者致死并发症，其发生机理更为复杂。近年来糖基化修饰 LDL（GLDL）的研究提示它在糖尿病性 As 发生中具有重要作用。据报道糖尿病患者血中不但存在 OLDL，而且多种载脂蛋白，包括载脂蛋白 A_I、A_{II}、B_I、C_I 和 E 均被糖基化修饰。它们又随时与内皮和血管壁接触，然后会发生怎样的变化？尚不清楚。看来 GLDL 可能是糖、脂两大代谢互相影响的中间环节，从而可见重点研究 GLDL 的特性，研究它与细胞修饰 LDL 和 OLDL 的相互关系，以及其对 LDL 受体和清道夫受体活性的影响对深入探讨和阐明糖尿病性 As 发生机理和防治是非常重要的。

3.1 糖尿病患者 LDL 糖基化和氧化过程及其相互关系

目前研究已经明确糖尿病患者体内存在着糖基化和氧化 LDL 两种不同的修饰过程，而且两者可能有密切的内在关系，糖基化指的葡萄糖和蛋白的氨基酸残基（往往是赖氨酸）的非酶性结合过程，早期形成的产物（fructose-lysine）果糖-赖氨酸是可逆性的，但是由于过程中与氧自由基介导的氧化过程相关联，蛋白的侧链再排列从而形成稳定的不可逆性的终产物，其中之一是羧甲基赖氨酸（carboxymethyilysin），另一种为戊糖苷（pentosidine）、由上述两种产物可以看出它们是糖基化-氧化终产物，说明糖基化和氧化过程的关系极为密切。

轻型糖尿病患者一般均有蛋白的糖基化过程，有合并症的病人则氧化修饰 LDL 明显增加，从而促进动脉粥样硬化发展的危险性也就加大。

首先 LDL 受体识别 GLDL 能力下降，导致高脂血症。

其次葡萄糖和蛋白的氨基酸残基共价结合并储留在血管壁内，如此时血管壁内结构蛋白也已糖基化，则更进一步促进糖和氨基酸的共价结合。

此时单核巨噬细胞摄脂作用增强，并形成泡沫细胞。研究者指出 GLDL 可能是通过另一单独的低亲和力高容量的受体而进入巨噬细胞。

值得注意的是蛋白的糖基化将产生自由基，后者可明显增加随后发生的自身氧化损伤，这一紧密过程

称为糖基-氧化过程(glycoxidation),后者更进一步加重蛋白和脂质的损伤。

其次 GLDL 可加强血小板对其摄取,这可能由于改变了血小板膜的结构和对凝聚因子的反应性而促进血小板聚集所致。大量糖基-氧化修饰 LDL 足以引起抗体反应和潜在的致 As 的 LDL 免疫复合物形成。一旦 LDL 的氧化过程明显出现则进一步损害其自身的脂质和蛋白成分,产生更多的自由基造成恶性循环。

3.2 胶原的糖苷-氧化过程

胶原(包括晶体和血管壁基底膜)在正常人体内其糖基化过程随着年龄增长仅有非常轻微的增加,但在糖尿病患者则胶原糖基化明显增加,这是由于高水平的葡萄糖导致糖基-氧化产物堆积所致。因此氧化过程是胶原糖基化损伤的固定剂,此时胶原发生明显的物理性改变如胶原溶解性下降而交联(crosslinking)增加,因此血管壁胶原和体内其他结缔组织成分的糖基-氧化过程均与 As 的发生发展密切相关。

当糖基-氧化产物在血管壁内不断增加而不能移走时则胶原交联过程增加,使血管壁僵硬和张力失常,久之引起高血压和内皮损伤。

血浆成分通过上述的血管壁时会增加与胶原的粘附性,如果此时血浆成分也已糖基化,那么上述影响将更为扩大。

内皮下的糖基-氧化产物对单核具有趋化作用,促其迁入血管壁内转变为巨噬细胞,后者不仅通过 AGE 受体摄取糖基化蛋白产物也通过清道夫受体摄取内皮下修饰 LDL,促进泡沫细胞形成。

在糖基化基质中,糖基-氧化过程将抑制血管壁细胞(内皮、SMC、外皮细胞)的增生和修复过程。

近年来还发现胶原的糖基-氧化过程抑制内皮依赖性扩张因子(EDRF)的活性导致实验性糖尿病的内皮依赖性血管扩张异常。

4 前列腺素 E_2 等药物防治低密度脂蛋白修饰的初步研究

4.1 氧化修饰 LDL 对巨噬细胞形态、代谢和清道夫受体活性影响及前列腺素 E_2 等的防治作用

我们在以往研究中发现大剂量 PGE_2 明显抗实验性 As 形成,实验数据之一表明其机理可能与抗氧化密切相关,为此本实验从受体水平观察了氧化 LDL 对巨噬细胞形态、代谢和清道夫受体活性影响,并着重研究了 PGE_2 对氧化损伤的保护作用和机理。

在实验中将从人血浆分离出的 LDL 分为 4 组:即正常组、氧化组、以及预加亚硒酸钠(0.2 ppm/ml)和 PGE_2(25 mg · L^{-1})4 组。48 小时后除 NLDL 组加 EDTA 外,其他三组均加入 Cu^{2+},终浓度 10 μmol · L^{-1},6 小时后,透析 48 小时,超滤保存,取小鼠腹腔巨噬细胞制备成细胞数为 5×10^6/ml 的原始悬液待用;应用过氧化脂质微量测定法检测各组 LPO 含量,依照 Palia 和齐凤菊等方法进行 GSH-Px 活性测定并计算两者比值;此外应用 BA-ELISA 酶联免疫技术进行了巨噬细胞清道夫受体活性检测和免疫组化定位观察,另外对各组油红 O 染色的巨噬细胞进行了形态观察和含脂的相对定量分析。

上述研究结果显示:①大剂量 PGE_2 明显保护 LDL 中的 GSH-Px 活性,抑制 LPO 生成,从而有直接抗 LDL 氧化修饰作用;②PGE_2 抑制巨噬细胞清道夫受体活性和泡沫细胞形成,具有防治早期动脉粥样硬化作用;③PGE_2 的抗氧化作用略高于抗氧化剂亚硒酸钠。

4.2 激素类药物对 LDL 氧化和糖基化保护作用的比较观察

在这一实验中,将 LDL 分为以下 8 组:

N-LDL;O-LDL;LDL + PGE_1 + Cu^{2+};LDL + PGE_2 + Cu^{2+};LDL + T_4 + Cu^{2+};G-LDL;LDL + PGE_1 + G;LDL + PGE_2 + G,各组 Cu^{2+} 终浓度为 10 μmol · L^{-1},PGE_1 和 PGE_2 分别为 25 mg · L^{-1},T_4 为 400 μg · L^{-1},糖基化过程为 LDL 加葡萄糖 PBS 液(1 mmol · L^{-1} EDTA,pH7.4),37℃,5 天。

然后依顺序检测各组 LPO 含量、GSH-Px 和 SOD 活性,并分别计算了两者比值。

结果显示:①PGE_1,PGE_2 和 T_4 均有抗 LDL 氧化修饰作用,其中 PGE_2 的作用更为明显些;②PGE_1 和 PGE_2 对 LDL 的糖基化修饰也有保护作用,其机理尚待进一步研究;③与 OLDL 组相比,糖基化修饰 LDL 导致 LPO 明显升高,而两酶活性却仅相应下降。似乎说明 GLDL 过程和机理较为复杂,其 LPO 含量明显升高是否由于 LDL 的蛋白成分糖基化促进了自由基的产生,从而随即发生了 GLDL 的氧化过程所致,即糖基化氧化过程。如果然如此,则足以说明糖尿病患者的动脉壁细胞和组织的损伤远较非糖尿病患者严重,因此促进 As 的机会也就大大增加。