

活性氧、一氧化氮与氧化型低密度脂蛋白

庞战军 陈 媛 周 玫

(第一军医大学自由医学研究室, 广州 510515)

摘要 在动脉粥样硬化性疾病的发生过程中,活性氧、一氧化氮和氧化型低密度脂蛋白分别担负着不同的角色。活性氧通过适当的途径对低密度脂蛋白进行氧化修饰引起动脉粥样硬化病变;一氧化氮对低密度脂蛋白氧化修饰的影响则具有正负两面性;氧化型低密度脂蛋白对一氧化氮的生物活性、一氧化氮合成酶活性及其基因的表达起调控作用。本文根据最近的文献资料,对此三者与动脉粥样硬化性疾病发生上的各自作用及相互影响作一综述。

关键词 动脉粥样硬化; 活性氧; 氧化型低密度脂蛋白

在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)性疾病的发生过程中,活性氧对低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化修饰起着重要的作用^[1]。而尽管氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, OXLDL)对于动脉粥样硬化发生发展所起的关键作用被人们认识已久,但体内 LDL 受氧化修饰的确切机理并不十分清楚,一氧化氮(nitric oxide, NO),又称活性氮,因具有抑制血管平滑肌细胞增殖、血小板聚集、单核细胞粘附、甚至抑制 LDL 氧化修饰的作用而被认为能预防动脉粥样硬化性疾病的发生。在易发生动脉粥样硬化的动脉血管壁中,同时存在着活性氧、NO 及 LDL、三者独立作用且又彼此影响,成为影响动脉粥样硬化发生发展过程的重要因素。本文就近年来动脉粥样硬化疾病发生机理中有关三者作用的研究进展进行综述。

1 低密度脂蛋白氧化修饰的途径

低密度脂蛋白是运送胆固醇的主要载体,由富含胆固醇酯的核、载脂蛋白 B 蛋白及磷脂外壳组成,正常 LDL 被氧化修饰成为 OXLDL 后,可被巨噬细胞上的清道夫受体识别而大量吞噬,与泡沫细胞的形成密切相关^[2]。过渡金属离子可以催化 LDL 的氧化修饰,巨噬细胞对 LDL 的氧化修饰作用依赖于微量 Fe^{2+} 的存在, Fe^{2+} 也可以增强人类单核细胞、平滑肌细胞对 LDL 的氧化修饰,EDTA 等金属螯合剂可以延迟或防止 LDL

氧化修饰的发生^[3],这些事实都提示过渡金属催化生成的氧自由基可以引起 LDL 的氧化修饰。

在机理上,了解细胞对 LDL 的氧化修饰过程更有助于理解动脉粥样硬化的发生机制。在一些实验中,超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的生成量与细胞氧化 LDL 的速率相关,且超氧化物歧化酶也影响细胞对 LDL 的氧化修饰。我们曾经由此认为 $O_2^{\cdot-}$ 在细胞对 LDL 的氧化修饰过程中起主要作用。但 Jessup 等^[4]的研究结果证明事实并非如此,刺激巨噬细胞呼吸爆发时产生大量 $O_2^{\cdot-}$,却并不伴有 LDL 脂质氧化的相应增加,说明 $O_2^{\cdot-}$ 的释放与 LDL 的氧化速率之间不存在严格的相关性;超氧化物歧化酶的金属螯合活性可以抑制非细胞体系 Cu^{2+} 催化的 LDL 氧化修饰,以及热失活的超氧化物歧化酶活性中心的 Cu^{2+} 可使 LDL 氧化等特性均使以前用超氧化物歧化酶来检测 $O_2^{\cdot-}$ 的方法需要重新考虑。可见, $O_2^{\cdot-}$ 本身不是引起 LDL 氧化修饰的中介,也不是这一过程发生的关键或限速步骤。虽然体外实验时高浓度的 H_2O_2 在过渡金属存在的条件下可以氧化 LDL,但无论是内皮细胞、单核细胞、平滑肌细胞,还是纤维母细胞都不可能释放如此高浓度的 H_2O_2 ,且过氧化氢酶也不能抑制细胞对 LDL 的氧化,因此生成 H_2O_2 也不是细胞对 LDL 进行氧化修饰的主要途径^[5]。羟自由基($\cdot OH$)作为脂质过氧化链支链式反应的主要引发剂,在 LDL 的氧化修饰中起着重要作用,但参与引发过程的 $\cdot OH$ 应来源于除 $O_2^{\cdot-}$ 与 H_2O_2 以外的途径,最常见的是过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$), $ONOO^- + H^+ \rightarrow NO_2 + \cdot OH$ 。

人体血液中含有丰富的抗氧化剂,使 LDL 的氧化修饰在血管内难以发生,所以曾认为 LDL 的氧化修饰发生在抗氧化能力特殊的动脉内壁组织。但研究表明正常动脉壁组织的抗氧化剂含量与血中并无差别^[6],因此 LDL 发生氧化修饰的机理并不能用以上单纯的生化反应来解释。脂加氧酶,尤其是 15-脂加氧酶可以向多价不饱和脂肪酸中引入过氧基,被认为在细胞对 LDL 氧化修饰的起始阶段起促进作用^[6]。另外,髓过氧化物酶生成的次氯酸($HOCl$)可通过优先氧化载脂蛋白 B

的赖氨酸残基对 LDL 进行氧化修饰^[5], 增加 LDL 带有的负电荷并使其易于受清道夫受体识别。LDL 的氧化修饰需要过氧化物的生成与分解同时存在, 这在一定程度上要求加氧酶类与过渡金属离子作用的协同。

2 一氧化氮对低密度脂蛋白氧化修饰的影响

•OH 的来源之一 ONOO⁻可以由 NO 与 O₂•反应生成: O₂• + NO → ONOO⁻。测得 NO 与 O₂•反应的速率常数为 6.7 × 10⁹ L/mol · s^[7], 比超氧化物歧化酶催化 O₂•, 发生歧化反应的速率至少快三倍。同时也证实水溶液中 ONOO⁻可以部分自发分解产生 NO₂及 •OH, 所以 O₂•可以通过与 NO 反应生成 ONOO⁻进而引发 LDL 的氧化修饰。用人工合成的过氧亚硝酸盐也可以引发 LDL 的氧化修饰^[8,9], 说明 NO 与 O₂•的同时产生是 LDL 氧化的原因之一。ONOO⁻引发 LDL 氧化修饰的机制可能并不限于能分解产生 •OH, 还包括直接氧化维生素 E 和对载脂蛋白 B 的修饰(硝化酪氨酸残基和氧化半胱氨酸巯基)。

与此相反的是, NO 对 LDL 的氧化修饰有抑制作用。细胞对 LDL 氧化修饰的能力与其 NO 合成酶的活性呈负相关^[10]。用 γ-干扰素和脂多糖诱导巨噬细胞 NO 合成酶活性可以减轻其对 LDL 的氧化^[11], 这种抑制效应可被阻断 NO 合成的 N^G-甲基-精氨酸(NMMA)和抑制 NO 合成酶活性的 DPI(diphenylene iodonium)逆转, 说明 NO 的合成是 γ-干扰素与脂多糖激活的巨噬细胞抑制 LDL 氧化的原因。能够释放 NO 的 SNAP(S-nitroso-N-acetyl-penicillamine)和 SNN(spermine NONOate)可以抑制 Cu²⁺及巨噬细胞对 LDL 的氧化修饰^[12], 而向反应体系中吹入 NO 或加入 GSNO(S-nitrosoglutathione)则可以抑制氧亚硝酸盐对脂质体的氧化作用^[13]。NO 抗 LDL 氧化修饰的生化机理并不十分清楚, 但已知 NO 可以抑制白细胞释放 O₂•^[14]。NO 可以在细胞内或细胞外作用等多个水平上发挥其抑制效应^[5], 如作用于细胞内含有血红素或 Fe-S 活性中心的鸟苷酸环化酶、脂加氧酶、与无机铁形成稳定的化合物、或与蛋白质形成相对稳定的亚硝胺或亚硝基巯基化合物等, 这都将引起细胞内或间质氧化水平的改变而调整细胞内活性氧的产生。另外, NO 还可与 LO•及 LOO•反应生成分子量不同的多种有机过氧亚硝基化合物^[13,15], 从而终止脂质过氧化的链式扩增反应。

如上所述, 在活性氧存在时, NO 对 LDL 氧化修饰的作用表现出两面性, NO 对 LDL 氧化修饰的引发还是抑制取决于 NO 与 O₂•反应浓度的比值^[13]。当二者

接受或相等时, NO 对 LDL 显示出不依赖过渡金属催化的强大的氧化修饰作用, 而当 NO 浓度远远超过 O₂•时, 则强烈抑制 LDL 的氧化。因此, 以下三个方面的因素将决定 NO 的作用: ①NO 与 O₂•释放的相对速率; ②生成 NO 与 O₂•的细胞或组织环境; ③引起组织氧化损伤的主要原因。评价 NO 对 LDL 氧化修饰的作用应该注意到: ①NO 可以生成强氧化剂 ONOO⁻而引起 LDL 氧化; ②通过抑制依赖 ONOO⁻的毒性作用或阻断自由基链式反应, 将 O₂•介导的毒性反应引向其它氧化途径而对 LDL 起保护作用。

3 氧化型低密度脂蛋白抑制一氧化氮的活性与合成

以刺激纤维母细胞 cGMP 合成为观察指标, Chin 等^[16]发现用氧化修饰的 LDL 对缓激肽促使牛动脉内皮细胞释放的 NO/EDRF(endothelium-derived relaxing factor)活性有抑制作用, 且随 OLDL 浓度的增加而增强, 因吞噬大量 OLDL 而形成的泡沫细胞与无负载 OLDL 或负载乙酰低密度脂蛋白的细胞相比, 释放到培养基中的 NO(以亚硝酸盐含量推算)减少 68%~99%, 而同时其对正常 LDL 的氧化修饰作用平均增强 2 倍^[16]。用 γ-干扰素和脂多糖激活的巨噬细胞与 OLDL 孵育, 可以观察到 NO 合成的抑制随孵育时间的延长而增强^[17]。进一步的研究表明, OLDL 对非细胞体系中 NO 合成酶的活性无直接作用^[10], 但可以认为 OLDL 对 NO 活性的影响至少部分地缘于其与 NO 分子的直接反应。从 OLDL 提取的脂质成分对 NO 活性的抑制效应与 OLDL 作用相当, 而 OLDL 的蛋白质成分却并无此作用, 用人工合成的磷脂重复实验, 也观察到了与 OLDL 脂质成分相同的效应^[16]。用脂质过氧化产物硫代巴比妥酸反应物质表示的 LDL 氧化程度也与其抑制 NO 活性的能力呈正相关^[17]。这些都提示 OLDL 对 NO 的失活作用决定于其中氧化的脂质成分, 这用前文提到的脂氢过氧化物或 LO•、LOO•与 NO 的反应来解释似乎是顺理成章的。

氧化型低密度脂蛋白对 NO 的影响还在于它的合成。与 OLDL 孵育后的巨噬细胞受 γ-干扰素和脂多糖刺激释放的 NO 减低, 且随 OLDL 浓度的增高呈现其抑制效应增强^[17], 说明 OLDL 影响巨噬细胞 NO 合成酶的活性, 但其具体的作用机制还不清楚。在 LDL 氧化成 OLDL 的过程中, 其脂质成分磷脂酰胆碱(PC)转变成溶血磷脂酰胆碱(LPC), 而溶血磷脂酰胆碱是具有广泛生理作用的分子, 所以 OLDL 对 NO 合成酶活性的影响可通过溶血磷脂酰胆碱起作用。Liao 等^[18]揭

示了 OLDL 对 NO 合成酶基因转录水平和转录后水平的调控, OLDL 可将 NO 合成酶 mRNA 的半衰期由 36 h 降为 10 h 而降低处于稳定状态的 NO 合成酶 mRNA 水平。该效应随 LDL 氧化程度的增加而增强, 却能被抑制蛋白质合成的放线菌酮减轻, 说明 OLDL 对 NO 合成酶 mRNA 稳定性的影响依赖于某种蛋白质的合成。OLDL 对 NO 合成酶基因的转录则显示正反两方面的作用, 前 6 h 其转录受到 25% 的抑制, 而在后 18 h 里则显示最高达 2.2 倍的增强, 其原因有待进一步阐明。由此可见, OLDL 对 NO 合成酶活性的影响不仅在酶分子水平上, 而且还在于对其基因转录及转录后水平的调控作用。

4 活性氧、一氧化氮、氧化型低密度脂蛋白与动脉粥样硬化

人们早已认识到 OLDL 具有致动脉粥样硬化性。正常 LDL 受到氧化修饰成为 OLDL, 被巨噬细胞上的清道夫受体识别而吞噬。由于巨噬细胞对 OLDL 的吞噬缺乏象对正常 LDL 那样的负反馈机制, 致使巨噬细胞内脂质大量累积形成泡沫细胞, 甚至死亡崩解形成粥样硬化病变。而活性氧则是引起 LDL 氧化修饰的重要因子, OLDL 实际上充当了活性氧损伤载体的角色, 使得活性氧通过形成 OLDL 造成动脉粥样硬化疾病的发生。动脉粥样硬化被认为是一种由内皮细胞、平滑肌细胞、单核-巨噬细胞、血小板等多种细胞参与的“炎症性”疾病, 由这些细胞分泌的 NO/EDRF 参与动脉粥样硬化发生的病理生理过程, 并被认为是防止该病的发生, OLDL 的致动脉粥样硬化效应也至少部分是通过使 NO 失活而作用的。NO 的抗动脉粥样硬化作用在动物模型上也已得到验证: Cooke 等^[13]报道了给家兔饲以 L-精氨酸(NO 合成酶的底物)可以明显减小高胆固醇饮食造成的主动脉和冠状动脉粥样硬化病变的大小和范围; 而给予 NO 合成酶抑制剂使动脉粥样硬化动物模型的病损加重^[20]。由此可见, 活性氧、NO、OLDL 均是引起动脉粥样硬化病变的效应分子, 而动脉粥样硬化疾病的发生过程必然与此三者的相互作用密切相关。

5 结束语

虽然氧化型低密度脂蛋白(OLDL)早已被人们所熟悉, 但体内由细胞介导的对 LDL 的修饰作用过程还并不清楚, 在体外非细胞体系对 LDL 氧化修饰的模式似乎并不能完全解释在人体内发生的真实过程, 活性氧对 LDL 氧化修饰的引发机制也还需进一步的探索。

从证实 EDRF 就是或者部分是 NO 以来, NO 在动脉粥样硬化发生机制中各自的作用及相互的影响仍需进一步的研究, 但了解三者作用的正确机制必将会对动脉粥样硬化疾病的预防和治疗提供新的思路。

参考文献

- 1 陈瑗, 周玫, 刘尚喜, 等. 脂质过氧化损伤在动脉粥样硬化发生发展中的作用. 中国科学基金, 1995, 9(4): 43~45.
- 2 Liu SX, Zhou M, Chen Y, et al. Lipoperoxidative injury to macrophages by oxidatively modified low density lipoprotein may play an important role in foam cell formation. *Atherosclerosis*, 1996, 121: 55~61.
- 3 Leake DS, Rankin SM. The oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem J*, 1990, 270: 741~748.
- 4 Jessup W, Simpson JA, Dean RT. Does superoxide radical have a role in macrophage mediated oxidative modification of LDL. *Atherosclerosis*, 1993, 99: 107~102.
- 5 Garner B, Jessup W. Cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein the elusive mechanism(s). *Redox Report*, 1996, 2(2): 97~104.
- 6 Jessup W. Cellular modification of low density lipoproteins. *Biochem Soc Trans*, 1993, 21: 321~325.
- 7 Huie RE, Padmaja S. The generation of superoxide. *Free Rad Res Comm*, 1993, 18(4): 195~199.
- 8 Hogg N, Darley-Usmar VM, Graham A, et al. Peroxynitrite and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*, 1993, 21: 358~361.
- 9 Darley-Usmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, et al. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comm*, 1992, 17(1): 9~20.
- 10 Bolton EJ, Jessup W, Stanley KK, et al. Enhanced LDL oxidation by murine macrophage foam cells and their failure to secrete nitric oxide. *Atherosclerosis*, 1994, 106: 213~223.
- 11 Jessup W, Dean RT. Autoinhibition of murine macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein by nitric oxide synthesis. *Atherosclerosis*, 1993, 101: 145~155.
- 12 Hogg N, Struck A, Goss SP, et al. Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric oxide donors. *J Lipid Res*, 1995, 36: 1756~762.
- 13 Rubbo H, Radi R, Trujillo M, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid

- peroxidation. *J Biol Chem*, 1994, **269**(42): 26 066~075.
- 14 Morikawa M, Inoue M, Tokumaru S, et al. Enhancing and inhibitory effects of nitric oxide on superoxide anion generation in human polymorphonuclear leukocytes. *Br J Pharmacol*, 1995, **115**: 1 302~306.
 - 15 Padmaja S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Comm*, 1993, **195**(2): 539~544.
 - 16 Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest*, 1992, **89**: 10~18.
 - 17 Yang X, Cai B, Sciacca RR, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthetase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins. *Circ Res*, 1994, **74**(2): 318~328.
 - 18 Liao JK, Shin WS, Lee WY, et al. Oxidized low density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthetase. *J Biol Chem*, 1995, **270**(1): 319~324.
 - 19 Cooke JP, Singer AH, Tsao P, et al. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1 168~172.
 - 20 Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M, et al. Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 746~752.
- (1996-08-02 收到, 1996-11-30 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(Ⅲ)

硬脂酰辅酶 A	stearoyl-CoA, S-CoA
遗传多肽性	genetic polymorphism, GPM
糖基化低密度脂蛋白	glycosylated low density lipoprotein, gLDL
糖基化终产物	advanced glycosylated end product, AGE
诱导型一氧化氮合成酶	inducible nitric oxide synthetase, iNOS
诱导分化	induced differentiation
诱导补体结合抗原	induced complement fixing antigen, ICFA
诱发变异	induced variation
单胺氧化酶	monoaminoxidase, MAO
单核细胞趋化因子	monocyte chemotactic factor, MCF
胆固醇羟化酶	cholesterol hydroxylase, CHOase
胆固醇饱和指数	cholesterol saturating index, CSI
胆固醇酯水解酶	cholesteryl ester hydrolase, CEHase
动脉粥样硬化指数	atherogenic index, AI
琼脂糖电泳	agarose electrophoresis, AE
琼脂糖凝胶电泳	agarose gel electrophoresis, AGE
I 型纤溶酶原激活剂抑制物	type I plasminogen activator inhibitor, PAI-1
膜流动性	membrane fluidity, MF
缬氨酸转氨酶	valine aminotransferase, VATase
液相色谱法	liquid chromatography, LCG
液体闪烁计数器	liquid scintillation counter, LSC
移动界面电泳	moving boundary electrophoresis, MBE
肌醇磷酸酶	inositol phosphatase
乳糖肝褐质	lactoferrin, LF
乳酸谷胱甘肽	lactylglutathion
乳酸脱氢酶	lactic dehydrogenase, LDHase