

胆固醇氧化产物毒害性作用的研究进展

张明霞, 周建科, 梁俊红

(河北大学理化分析研究中心, 河北省保定市 071002)

[主题词] 胆固醇氧化产物; 胆固醇; 动脉粥样硬化; 致突变性

[摘要] 胆固醇氧化产物可引起多种不良反应, 如导致动脉粥样硬化, 干扰固醇类代谢, 诱导基因突变甚至致癌等, 已引起广泛关注。本文就胆固醇氧化产物毒害性作用的研究进行综述。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

胆固醇几乎存在于人体所有器官中,具有多种生理功能。在光、热、氧存在下易发生自氧化反应产生一系列氧化产物,这种反应被认为是人体内脂质过氧化的一部分。最常见的胆固醇氧化产物有:25-羟基胆固醇、3 β ,5 α ,6 β -胆甾烷三醇、5 α ,6 α -环氧化胆固醇、5 β ,6 β -环氧化胆固醇、6-酮基胆固醇、7-酮基胆固醇、7 α -羟基胆固醇、7 β -羟基胆固醇和胆甾烯酮等^[1]。1966年Brooks等报道了人动脉粥样斑块内含有胆固醇氧化产物(cholesterol oxidation product, COP)。1969年,Kritchevsky等分别用含结晶胆固醇和无定型胆固醇的饲料喂养家兔,结果发现无定型胆固醇最易导致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生,后来证实这些无定型胆固醇中含有COP。当时人们普遍认为高胆固醇血症是As的主要危险因素,并未对COP引起重视。80年代的研究发现,COP与胆固醇同时存在,结构相似,但生物学作用大不相同。90年代以来,对低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL),特别是对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)与As关系的深入研究,发现ox-LDL含有大量的COP,且其毒性主要来自COP,从而引起研究者对COP的重视^[2]。

1 胆固醇氧化产物的毒性作用机制

大量离体和活体实验都证明COP对多种细胞有毒害作用,但作用机制尚无定论。目前主要有四种假说: COP抑制胆固醇合成学说。COP存在下,胆固醇合成限速酶3-羟-3-甲基戊二酰CoA还原酶受限,从而抑制胆固醇合成。胆固醇缺乏必然导致细胞膜的损害以及细胞多种功能障碍。④COP插入质膜后影响膜物理性质和膜功能,改变细胞的形态、生长、生存和影响细胞功能^[3]。⑤细胞内存在COP受体或载体,COP通过与受体结合进入胞核影响DNA的功能。

COP可经代谢活化(尤其是细胞色素P450系统的代谢活化作用)成为自由基或具有自由基性质的代谢中间产物,导致活性氧在体内蓄积而引起细胞毒性的过程^[4]。具体哪种假说更合理有待进一步研究。

2 致动脉粥样硬化作用

为研究COP对As的诱导作用,Jacobson等^[5]将6月龄的白色肉鸽分为两组,一组喂以高纯度胆固醇,另一组喂高纯度胆固醇加微量胆甾烷三醇,三个月之后发现对照组和研究组主动脉中总胆固醇含量、胆固醇酯量及胆固醇脂与胆固醇的比值基本没有明显差别,但研究组主动脉中钙积累量明显高于对照组。研究组冠状动脉狭窄率为5.23%,而对照组为2.8%,说明食物中含少量胆甾烷三醇是造成As的一个重要

[收稿日期] 2002-04-09 [修回日期] 2002-09-17

[作者简介] 张明霞,女,1970年9月出生,河北泊头市人,河北大学在职硕士研究生。主要研究方向为色谱分离及其在生物医学中的应用。已发表论文3篇。周建科,男,1956年3月出生,河北辛集市人,研究员,硕士研究生导师。主要研究方向为痕量有机物色谱分离方法研究,已在国内外公开发表学术论文40余篇。本文通讯联系人。梁俊红,女,1976年10月出生,河北徐水县人,河北大学在读硕士研究生,主要研究方向为色谱分离及其在生物医学中的应用,已发表论文2篇。

诱因。崔晓暄等^[6]发现25-羟基胆固醇处理培养的家兔主动脉中膜细胞组有细胞结节形成,von kossa染色阳性,培养上清液中骨钙素增多。由此可见25-羟基胆固醇可以促进这一体外钙化过程,表明其可能是促进动脉钙化的一个病理因素,推测骨钙素可能参与了这一体外钙化过程。正常人和动物的血浆及动脉组织中均存在低浓度的COP^[7],而高胆固醇血症患者与动物的血浆、动脉壁、动脉粥样斑块、泡沫细胞及ox-LDL中COP浓度升高。大量离体和活体实验表明,COP对参与As形成的多种细胞具有毒害作用,主要包括动脉平滑肌细胞、内皮细胞、血小板和单核巨噬细胞等^[8]。

2.1 致动脉平滑肌细胞损伤

主动脉平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)损伤及死亡是As的前期征兆。12种COP分别用少量乙醇溶解,然后加到含10%胎牛血清培养介质中,控制其浓度不超过0.8%,通过测定24h内培养细胞损伤及死亡的百分率确定COP毒性顺序。结果发现,在所有被检测COP中胆甾烷三醇和25-羟基胆固醇毒性最大^[9]。凤志慧等研究了胆甾烷三醇和25-羟基胆固醇对大鼠动脉SMC的损伤。结果发现,损伤早期,细胞的谷胱甘肽过氧化物酶活性增高,还原型谷胱甘肽含量减少。损伤后期谷胱甘肽过氧化物酶活性下降,细胞谷胱甘肽耗竭,细胞总巯基含量下降,细胞脂质过氧化产物和羰基含量明显增高,表明细胞出现严重的氧化性损伤。Yin等^[10]通过测DNA梯(DNA Ladder)和DNA碎片表明COP可诱导血管SMC凋亡。最近崔鸣等^[11]利用光镜、电镜、DNA电泳及TUNEL法,研究了胆甾烷三醇和25-羟基胆固醇对兔主动脉血管SMC凋亡的诱导作用。结果发现,可见典型的细胞凋亡形态学改变,电泳示“DNA Ladder”,TUNEL法显示正常兔SMC凋亡率为3.62%,且呈时间和剂量依赖性。

2.2 致内皮细胞损伤

血管内皮细胞(endothelial cell, EC)损伤是As发病的始动环节。Peng等^[12]研究了25-羟基胆固醇和胆甾烷三醇对家兔EC的损伤情况。结果发现,接受这两种氧化物的家兔在其主动脉内皮表面上有许多球状突起物,表示主动脉EC受到损伤。且胆甾烷三醇比25-羟基胆固醇造成损伤更大。这种损伤如反复出现将形成血栓,最后导致As。实验证明,胆甾烷三醇可引起90%的EC损伤,25-羟基胆固醇引起67%的损伤。类似的细胞损伤其他研究者也有报道。另外,Zhou等^[13]研究发现,心绞痛且冠状动脉狭窄程度为80%±8%的心导管插入术患者,其血浆中COP浓度明显高于正常人。用³H标记的胸腺嘧啶脱氧核苷和³H标记的甲羟戊酸内酯培养EC,发现患者血浆中培养的EC与正常控制组比较掺入更少,而对⁴⁵Ca²⁺培养的EC则掺入更多,也说明COP对EC有毒。还有研究发现,COP可降低EC存活率,增加其通透性,破坏EC的屏障功能,诱导血管EC发生凋亡^[14]。

2.3 对单核-巨噬细胞的毒性作用

外周血单核细胞粘附于内皮并迁入内皮下间隙,转变为巨噬细胞,继而摄取ox-LDL变成泡沫细胞是As病变形成的关键环节。Clare等研究了几种COP(7 α -羟基胆固醇、7 β -羟基胆固醇、7-酮基胆固醇、25-羟基胆固醇和26-羟基胆固醇)

对人离体单核-巨噬细胞的毒性。在 CuSO_4 氧化的低密度脂蛋白、巨噬细胞和 As 病灶中均发现这几种 COP 的存在。利用测定氙标腺嘌呤的单核-巨噬细胞放射性做为鉴定毒性的方法,发现几种 COP 均呈现时间和浓度依赖性增强的毒性,其中 26-羟基胆固醇毒性最大^[15]。Chang 等研究了 COP 对由中枢神经系统衍生的巨噬细胞的毒性。结果表明,25-羟基胆固醇在所检测 COP 中毒性最大,细胞死亡过程中出现典型的细胞凋亡的形态学改变和产生特征性 DNA 片段。还有报道显示,用人的离体巨噬细胞氧化的胆固醇亚油酸酯,其中含有 7 β -羟基胆固醇,对鼠腹膜巨噬细胞有毒^[16]。

2.4 导致血小板聚集作用

血小板聚集功能与 As 的形成有密切关系。Michael 等用至少两周内未服过任何药物且不吸烟的健康成年人血样为实验对象,将其离心获得富含血小板的血浆,在不同 COP 溶液中 37℃ 温育 1 h。结果发现,3,5-二烯胆甾-7-酮、5 α ,6 α -环氧化胆固醇、5 β ,6 β -环氧化胆固醇、7-酮基胆固醇、7 α -羟基胆固醇、胆甾烷三醇和 26-羟基胆固醇均有增强血小板聚集和加速血小板中血栓素 A₂ 合成的作用,且 5 β ,6 β -环氧化胆固醇和 7-酮基胆固醇还能加速凝血酶和胶原蛋白诱导的血小板磷脂中花生四烯酸的漏出,从而引起血小板聚集,导致血凝,促进血栓形成及 As 发生^[17]。动物实验表明,COP 种类不同时,对血酶和 ADP 诱导的血小板聚集作用影响也不同。

3 抑制固醇类代谢作用

研究发现,某些 COP 明显抑制培养的细胞中 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 CoA (HMG-CoA) 还原酶的活性。如 25-羟基胆固醇在培养介质中浓度为 3 mg/L 可造成 83% 的胆固醇合成受到抑制。另有研究发现,在胆固醇的 6, 7, 15, 20, 22, 24 或 25 位上引入一个酮基或羟基官能团而衍生的一系列氧化物,均对胆固醇合成具有潜在的抑制作用。并用活体实验证明了某些 COP 能抑制固醇类在肝和肠内的合成。还有报道 COP 影响大鼠体内脂类代谢。一方面,降低 HMG-CoA 还原酶、肝微粒体中胆固醇 7 α -羟化酶和胆固醇合成与分解的关键酶的活性;另一方面,肝微粒体中 Δ^6 -脱氢酶和亚油酸代谢生成花生四烯酸关键酶的活性显著增加。在大鼠中喂含 COP 饮食比喂纯胆固醇饮食的酸性甾类化合物排泄物要少,也说明 COP 明显影响胆固醇和脂肪酸的代谢^[18]。

4 胆固醇氧化产物的致突变性及致癌性

胆固醇环氧化产物具有弱的诱变性,被认为是基因毒性。但其诱变机理尚待阐明,可能是由于环氧化物本身为弱的亲电体。报道显示,5 α ,6 α -环氧化胆固醇对成纤维细胞具有诱变性,同时还可诱发仓鼠胚胎细胞和老鼠 CH3 细胞发生形态转变。且它与皮肤癌有关,皮肤成纤维细胞暴露于紫外辐射下可导致形成高浓度的此种氧化物。结肠癌在病因上也与 COP 有关,研究发现结肠癌患者体内胆甾烷三醇含量高于正常人水平。另外还发现患有良性乳房疾病的妇女乳房液体中 5 α ,6 α -环氧化胆固醇含量明显升高,这可能是导致乳腺癌发生率上升的一个因素^[19]。Bischoff 和 Rupp 将粗

黄体酮和纯化的黄体酮分别溶解在芝麻油中,给切除卵巢的老鼠进行皮下注射,结果发现接受粗黄体酮注射液的老鼠患癌率为 32%,而接受纯化黄体酮注射液的老鼠患癌率为 0%。对粗黄体酮进行分析发现其中含有 COP。Bischoff 又报道了用 6 β -过氧化氢-4-胆甾烯-3-酮对雄性和阉割的雌性沼泽老鼠进行皮下注射,出现 15%~19% 的局部肉瘤发生率。相似的实验处理其它品系老鼠局部肉瘤发生率为 5%~20%。尽管对 COP 的致癌作用研究仍处于初级阶段,越来越多的证据表明他们对某些癌症具有诱导作用。

5 其他作用

胆固醇氧化产物(COP)对大鼠小脑颗粒细胞产生潜在的神经毒性,20 mg/L COP 试剂两天内能杀死 80% 的神经元细胞,而此浓度下 7 β -羟基胆固醇在 7 h 内杀死 50% 的细胞^[20]。COP 对人淋巴细胞也有毒性作用,其中 25-羟基胆固醇毒性最大。Kuroki 等测定了肝硬化患者、慢性肝炎患者和控制组血清中总的 7 α -羟基胆固醇含量,发现肝硬化患者血清中 7 α -羟基胆固醇水平明显低于控制组,而在慢性肝炎患者中其含量却保持很高。从而得出结论,在慢性肝炎患者中胆汁酸的合成作用受到较好的保护,而在肝硬化患者中其作用减弱。所以提出血清中 7 α -羟基胆固醇可作为检验慢性肝炎患者肝功能的一个新参数。

[参考文献]

- [1] Smith LL. Cholesterol autoxidation. *Plenum Press*, 1981, 125
- [2] Guardiola F, Codony R, Addis PB, et al. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem Toxicol*, 1996, **34**: 193-211
- [3] Verhagen JCD, ter Braake P, Teunissen J, et al. Physical effects of biologically formed cholesterol oxidation products on lipid membranes investigated with fluorescence depolarization spectroscopy and electron spin resonance. *Lipid Res*, 1996, **37**: 1 488-502
- [4] 风志慧,葛淑君,仲崇霞,等. 氧化型胆固醇引起的血管平滑肌细胞氧化应激损伤研究. *生物物理学报*, 1999, **15** (1): 200-207
- [5] Jacobson MS, Price MG, Shamoo AE, et al. Atherosclerosis in white carneau pigeons effects of low-level cholestanetriol feeding. *Atherosclerosis*, 1985, **57**: 209-217
- [6] 崔晓暄,王士雯,齐鹏. 25-羟基胆固醇促进培养的家兔主动脉中膜细胞体外钙化. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 199-201
- [7] Saisho Y, Shimada C, Umeda T. Determination of 7 α -hydroxycholesterol in dog plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Biochem*, 1998, **265**: 361-367
- [8] Andrew JB, Wendy J. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999, **142**: 1-28
- [9] Peng SK. Cytotoxicity of oxidation derivatives of cholesterol on culture aortic smooth muscle cells and their effect on cholesterol biosynthesis. *Am J Clin Nutr*, 1979, **32**: 1 033-042
- [10] Yin JL, Chaufour X, Melachlan C, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by cholesterol and its oxides in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*, 2000, **148**: 365-374
- [11] 崔鸣,陈凤荣,朱应葆. 氧化型胆固醇诱导血管平滑肌细胞凋亡. *北京大学学报*, 2001, **33** (2): 173-177
- [12] Peng SK, Taylor CB, Hill JC, et al. Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage. *Atherosclerosis*, 1985, **54**: 121-133
- [13] Zhou Q, Wasowicz E, Handler B, et al. An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2000, **149**: 191-197
- [14] 崔鸣,陈凤荣,宋清华. 氨基地平抑制氧化型胆固醇诱导的血管内皮细胞凋亡. *中国病理生理杂志*, 2001, **17** (2): 104-107

- [15] Clare K, Hardwick SJ, Carpenter KLH, et al. Toxicity of oxysterols to human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis*, 1995, **118**: 67-75
- [16] Carpenter KLH, Ballantine JA, Fussell B, et al. Oxidation of cholesteryl linoleate by human monocyte macrophages in vitro. *Atherosclerosis*, 1990, **83**: 217
- [17] Selley ML, McGuinness JA, Ardlie NG. The effect of cholesterol oxidation products on human platelet aggregation. *Thrombosis Research*, 1996, **83** (6) : 449-461
- [18] Osada K, Kodama T, Li Cui, et al. Effects of dietary oxidized cholesterol on lipid metabolism in differently aged rats. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, **58** (6) : 1 062-069
- [19] Morin RJ, Hu B, Peng SK, et al. Cholesterol oxides and carcinogenesis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1991, **5**: 219-225
- [20] Chang JY, Liu LZ. Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochem Int*, 1998, **32** (4) : 317-323
(此文编辑 文玉珊)