

凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 与 动脉粥样硬化易损斑块

尹凯¹综述, 涂玉林¹, 桂庆军²审校

(南华大学 1. 心血管病研究所, 2. 诊断学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 易损斑块; 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1

[摘要] 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 是新发现的主要在血管内皮细胞表达的氧化型低密度脂蛋白受体, 对动脉粥样硬化的发生发展有着重要意义。近年来, 越来越多的研究显示凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 与动脉粥样硬化易损斑块之间存在重要联系。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1, LOX-1) 是日本学者 Sawamura 等^[1]利用牛主动脉内皮细胞 cDNA 表达文库克隆出的新型氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 特异受体, 是一种主要在血管内皮细胞表达的④型单链跨膜蛋白, 结构上属于 C 型血凝素家族。生理条件下, LOX-1 在主动脉内膜微量表达^[2]; 在多种促动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 因素作用下可过量表达^[3,4]。LOX-1 除能结合 ox-LDL 外, 还能结合晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGE)^[5]、凋亡细胞^[6]和细菌^[7]等多种配体, 对 As 的形成与发展起重要作用。LOX-1 的编码基因 (OLR1 gene) 位于 12 号染色体 p12.3-p13.2 区, 长约 15 kb, 含有 5 个内含子和 6 个外显子, 内含子的长度不一, 从 324 bp 到 6 000 bp 不等。在 5' 端启动子框架区 -150 至 -90 位核苷酸片段显示出较强的启动子活性, 计算机辅助分析显示此区含有多个潜在的顺式调控元件, 如 GATA-2 结合元件、c-ets-1 结合元件、活化蛋白 1 (AP-1) 结合位点^[8], 表明 OLR1 基因表达可能受多种信号转导途径调控。近年来, 越来越多的研究表明 LOX-1 及 OLR1 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与 As 斑块易损性之间存在重要联系, 引起研究者关注。

1 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 影响动脉粥样硬化易损斑块的证据

1.1 临床观察

急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 是一组由急性心肌缺血引起的临床综合征, 普遍认为与斑块破裂

和/或血栓形成导致的血管腔严重狭窄或闭塞有关^[9]。ACS 的早期诊断具有极其重要的意义, 虽然肌酸激酶同工酶 (creatinine kinase isoenzyme, CK-MB) 和肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT) 等心肌损伤指标可以用于 ACS 的早期诊断, 但斑块不稳定的标志可以在更早期预示 ACS 的风险, 因此更具有临床应用价值。可溶性 LOX-1 (soluble LOX-1, sLOX-1) 是从 LOX-1 Arg86-Ser87 和 Lys89-Ser90 两位点通过蛋白水解分裂释放而产生^[10]。Kazutaka 等检查了 521 例病人的血浆 sLOX-1 水平, 其中 427 例因怀疑冠心病进行了冠状动脉造影, 34 例为非心脏的急性疾病, 60 例为非心脏慢性疾病。结果发现, ACS 患者血清 sLOX-1 水平明显高于其他组患者, 多变量回归分析结果表明 sLOX-1 水平与 ACS 相关联。以 1.0 μg/L 为切点, sLOX-1 能区别 ACS 与其他组患者, 敏感性为 81%, 特异性为 75%; sLOX-1 还可区别无 ST 段上抬、异常 Q 波或 TnT 升高的 ACS 与非 ACS 患者, 敏感性和特异性分别为 91% 和 83%。ACS 病人 sLOX-1 达峰值早于 TnT, 而且较高敏 C 反应蛋白 (high sensitive C-reactive protein, hs-CRP) 更具有 ACS 诊断特异性, 因此认为 sLOX-1 可能成为 ACS 早期诊断的有效指标^[11]。近期, OLR1 基因 SNP 与冠心病风险的相关性研究备受关注。Mango 等^[12]应用聚合酶链反应-变性液液相 (PCR-DHPLC) 研究了意大利裔患者 OLR1 基因 SNP 与急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 的相关性, 结果发现内含子 4、5 和 3'-UTR (非编码区域) 6 个 SNP 位点呈完全连锁不平衡, 其中 3'-UTR 等位基因 C>T 与 AMI 显著正相关。Chen 等^[13]研究了白种女性 OLR1 基因 SNP 与冠心病风险的关系, 结果显示 3'-UTR/T 等位基因 (TC+TT) 与冠心病风险显著正相关。Tatsuguchi 等^[14]则研究了一个缺血性心脏病家系, 发现 OLR1 基因 SNP (G501C) 导致 LOX-1 蛋白 K167N 错义突变, 与 AMI 显著相关。对于汉族人群研究较少, 国内强华等^[15]采用 PCR 和限制性片段长度多态性 (RFLP) 方法对 LOX-1 3'-UTR + 1073 位点 C/T 基因型多态性与冠心病遗传易感性进行了分析, 结果发现 LOX-1 3'-UTR + 1073 基因 CC、CT 与 TT 基因型及 C、T 等位基因在冠心病组和对照组中分布频率差异无显著性, 阴性结果可能与人群分布不同有关。从国内外研究

[收稿日期] 2007-09-04 [修回日期] 2008-06-12

[基金项目] 湖南省科技厅项目 (2007SK3092); 湖南省卫生厅项目 (B2007092)

[作者简介] 尹凯, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化病因与防治研究, E-mail 为 boyuan128@yahoo.com.cn。通讯作者涂玉林, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化病因与防治研究。桂庆军, 教授, 主要从事心血管疾病的基础与临床研究。

结果分析,通过一定手段调控 OLR1 基因表达可能对某些存在相关基因型患者防范 AMI 发生具有重要意义。

1.2 实验研究

易损斑块常具有以下特点: 活动性炎症(大量单核细胞/巨噬细胞以及 T 细胞浸润)、大的脂质中心(脂核)、薄的纤维帽(纤维帽的厚度 $< 100 \mu\text{m}$, 脂质中心占斑块总容积 $> 40\%$) 和内皮剥脱伴表面血小板聚集等^[9, 16]。Ishino 等^[17] 利用自发性高胆固醇血症模型(渡边兔)观察了 LOX-1 与 As 易损斑块的关系,实验提取 30 份组织共 70 处动脉粥样斑块进行研究,利用免疫组织化学技术检测 LOX-1、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 及单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 表达; TUNEL、Azar-Mallory 染色以及免疫组织化学检测组织细胞凋亡、斑块不稳定形态系数(不稳定斑块周长/等面积圆周长之比)和纤维帽厚度,结果发现 LOX-1 与 MMP-9 及斑块不稳定形态系数明显正相关,具有薄纤维帽的斑块及大量炎症细胞浸润的脂质核心区域 LOX-1 表达更明显,而且 LOX-1 诱导 MCP-1 表达及凋亡事件的发生,提示 LOX-1 与体内 As 斑块的破裂密切相关。Li 等^[18] 观察了人体 As 斑块中 LOX-1 表达与斑块稳定的关系,相对于正常血管内膜,As 斑块内 LOX-1 表达升高,而且在进展性 As 肩部的新生血管区域 LOX-1 表达尤为明显,用双重免疫组织化学和 TUNEL 免疫荧光检测发现, LOX-1 与凋亡细胞共定位在斑块易破裂区域。

2 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 影响动脉粥样硬化易损斑块的机制

2.1 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 影响细胞外基质

纤维帽的主要成分是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 包括间质胶、弹性蛋白和蛋白多聚糖。纤维帽的胶原过度降解是导致斑块不稳定或易损的重要因素。胶原为三股螺旋结构,高度稳定,其降解需 MMP 完成。MMP 是能够降解 ECM 所有成份的一组含 Zn^{2+} 酶,包括间质胶原酶(MMP-1, 能首先破坏胶原的结构)、凝胶酶 A 和 B(MMP-2 和 MMP-9, 能继续分解胶原片段)及基质降解酶(MMP-3 和 MMP-7, 能分解基质,激活其它 MMP 酶原变成活性酶,降解弹性蛋白,也分解 ECM 的主要成份蛋白多聚糖核心蛋白)。研究发现 $\alpha\text{-LDL}$ 通过 LOX-1 介导促进人冠状动脉内皮细胞过度表达 MMP-1 和 MMP-3, 而不影响基质金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMP) 的表达,因此 MMP 对 ECM 的降解占明显优势,使斑块变得易损或易破,而使用 LOX-1 抗体可阻断 MMP-1 和 MMP-3 的过量表达^[19]。Chen 等^[20] 通过转染 LOX-1 质粒入成纤维细胞,观察 LOX-1 与 MMP-1 表达的关系,正常情况下成纤维细胞表达极微量的 MMP-1, 转染 LOX-1 基因后成纤维细胞 MMP-1 表达明显增加,提示 LOX-1 通过某种途径诱导 MMP 表达,从而在 ECM 降解中起重要作用。

2.2 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 参与炎症与免疫过程

炎症反应被认为与 As 的形成及发展密切相关,炎症活

动与 ECM 沉积之间的平衡状态对维持斑块的稳定性至关重要。研究证实, LOX-1 促进单核细胞与内皮细胞的粘附,是因为其对细胞间粘附分子 (intercellular adhesion molecule, ICAM)、血管细胞粘附分子 (vascular cellular adhesion molecule-1, VCAM-1) 和 E-选择素具有上调作用^[21]。CD40/CD40L 信号途径在介导炎症细胞活化中起重要作用,近来研究发现其广泛存在于与 As 相关的各种细胞及血小板中^[22], 可促进炎症因子如白细胞介素 1 (interleukin 1, IL-1) 和肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) 释放,诱导 MMP 和 VCAM-1 的表达,阻断 CD40/CD40L 信号途径可抑制炎症反应,减轻 As 病变^[23]。Li 等^[24] 发现 LOX-1 介导 $\alpha\text{-LDL}$ 诱导的人血管内皮细胞 CD40/CD40L 信号激活,使用 LOX-1 抗体可阻断这一过程。Honjo 等^[25] 则认为, LOX-1 不仅仅作为 $\alpha\text{-LDL}$ 受体介导上述炎症过程,可能本身就具有炎症细胞趋化和锚定作用。在内毒素诱导的 Lewis 鼠休克模型中,使用抗 LOX-1 抗体明显缓解了 Lewis 鼠炎症反应,降低鼠死亡率,而体外实验中使用 LOX-1 抗体降低了血管内皮白细胞数目,加快了白细胞在血管壁的滚动速度,缓解了炎症反应。

2.3 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 介导动脉粥样硬化斑块细胞凋亡

动脉粥样硬化 (As) 斑块细胞凋亡与斑块的破裂有着重要联系,促凋亡因素的增强和/或抑凋亡因素的减弱均可导致内皮细胞、平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 和巨噬细胞源性泡沫细胞凋亡。内皮细胞凋亡促使内皮功能紊乱,加速 As 发展;平滑肌细胞的数量减少和功能减弱则导致细胞外基质合成与分泌减少,纤维帽胶原修复障碍;泡沫细胞凋亡后,胞质中脂质内容物释放,堆积形成斑块的脂质核心。As 细胞凋亡的主要诱因有 $\alpha\text{-LDL}$ 、氧自由基和细胞因子等,大量研究表明 LOX-1 在此过程中发挥着重要作用。Chen 等^[26] 发现 LOX-1 介导 $\alpha\text{-LDL}$ 诱导的血管内皮细胞凋亡。通过 LOX-1 介导, $\alpha\text{-LDL}$ 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 c-IAP-1 的表达,上调细胞色素 C 和 Smac 因子等凋亡信号分子表达。Smac 作为 Caspase 的关键调节因子,通过激活 Caspase 信号通路引起细胞凋亡。而 Imanishi 等^[27] 则观察到此过程存在 Fas/FasL 凋亡途径的参与, Caspase 是否是其下游信号分子还有待进一步研究。Kataoka 等^[28] 观察了 LOX-1 介导的平滑肌细胞凋亡,认为 Bax/Bcl-2 参与调控该类细胞的凋亡。LOX-1 介导巨噬细胞的凋亡虽缺乏体外直接证据,但动物模型学者观察到 LOX-1 与巨噬细胞凋亡存在共表达现象^[18]。

2.4 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 与血小板激活的联系

根据尸检结果,易损斑块的病理分型包括破裂斑块、蚀损斑块和钙化结节等。70% ~ 80% 的冠状动脉急性血管事件继发于斑块破裂导致的小血小板激活及血栓形成,但斑块破裂并不完全代表易损斑块,那些存在血小板激活及血栓形成倾向的非破裂性斑块亦属于易损斑块的范畴^[9, 29]。LOX-1 与血小板激活及血栓形成的联系,国外有不少研究报道。Chen 等^[30] 观察血小板上 LOX-1 表达,发现激活血小板明显上调 LOX-1 表达,使用 LOX-1 抗体可明显抑制 $\alpha\text{-LDL}$ 诱导的血小

板激活;在体研究对1例不稳定型心绞痛患者斑块组织进行免疫组织化学分析,发现LOX-1在斑块中血栓形成部位大量表达。Kakutani等^[31]认为LOX-1是一种粘附分子,结合并且激活血小板,促进血小板与内皮细胞的粘附。内皮功能失调被认为是血栓形成的重要因素,研究者发现LOX-1介导血小板与内皮细胞粘附并损伤血管内皮抗凝活性^[32]。Muhammad等^[33]发现LOX-1介导ADP诱导的血小板聚集,ADP使血小板LOX-1表达增强并通过LOX-1促进血小板聚集;使用LOX-1抗体、阿司匹林或其他汀类药物可抑制LOX-1的表达和血小板聚集。我们推断,LOX-1除了在斑块破裂过程中发挥重要作用外,在急性血栓形成过程也扮演重要角色。

3 结束语

As易损斑块与急性事件密切相关,严重影响患者预后,已引起研究者足够重视。但作为一种病理生理机制复杂、不同患者病理结构变异很大的病变,具体发病和调控机制仍有待进一步阐述。LOX-1是 α -LDL的受体,介导了 α -LDL致As的诸多过程,但其对As易损斑块的作用并不仅局限于 α -LDL受体的作用,还与其自身其他特性有关。相信LOX-1研究的不断深入将为我们稳定As易损斑块提供新的治疗策略和靶点。

[参考文献]

- [1] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein [J]. *Nature*, 1997, **386** (6620): 73-77.
- [2] Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, et al. Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions [J]. *Circulation*, 1999, **99** (24): 3 110-117.
- [3] Br•sen JH, Nieminn•r•kelh• M, Markmann D, et al. Lectinlike oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor (LOX-1)-mediated pathway and vascular oxidative injury in older-age rat renal transplants [J]. *Kidney Int*, 2005, **67** (4): 1 583-594.
- [4] 全智华, 李全忠, 邓衡, 等. 洛伐他汀能下调人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体mRNA的表达(英文)[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (1): 26-29.
- [5] Jono T, Miyazaki A, Nagai R, et al. Lectinlike oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE) [J]. *FEBS Lett*, 2002, **511** (1-3): 170-174.
- [6] Oka K, Sawamura T, Kikuta K, et al. Lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95** (16): 9 535-540.
- [7] Shimaoka T, Kume N, Minami M, et al. LOX-1 supports adhesion of Granr positive and Granr negative bacteria [J]. *J Immunol*, 2001, **166** (8): 5 108-114.
- [8] Aoyama T, Sawamura T, Furutani Y, et al. Structure and chromosomal assignment of the human lectinlike oxidized low-density-lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene [J]. *Biochem J*, 1999, **339** (Pt 1): 177-184.
- [9] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I and Part ② [J]. *Circulation*, 2003, **108** (15): 1 772-778.
- [10] Murase T, Kume N, Kataoka H, et al. Identification of soluble forms of lectinlike oxidized ldl receptor-1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (3): 715-720.
- [11] Hayashida K, Kume N, Murase T, et al. Serum soluble lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels are elevated in acute coronary syndrome a novel marker for early diagnosis [J]. *Circulation*, 2005, **112** (6): 812-818.
- [12] Mango R, Clementi F, Borgiani P, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the oxidized LDL receptor 1 (OLR1) gene in patients with acute myocardial infarction [J]. *J Med Genet*, 2003, **40** (12): 933-936.
- [13] Chen Q, Reis SE, Kammerer C, et al. Genetic variation in lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX1) gene and the risk of coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2003, **107** (25): 3 146-151.
- [14] Tatsuguchi M, Furutani M, Hinagata J, et al. Oxidized LDL receptor gene (OLR1) is associated with the risk of myocardial infarction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **303** (1): 247-250.
- [15] 强华, 周朝霞, 刘平, 等. LOX-1 3'-UTR+ 1073 多态性与冠心病的相关性[J]. *心脏杂志*, 2007, **18** (4): 428-430.
- [16] Arakawa K, Isoda K, Ito T, et al. Fluorescence analysis of biochemical constituents identifies atherosclerotic plaque with a thin fibrous cap [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (6): 1 002-007.
- [17] Ishino S, Mukai T, Kume N, et al. Lectinlike oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression is associated with atherosclerotic plaque instability—analysis in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 2007, **195** (1): 48-56.
- [18] Li DY, Chen HJ, Staples ED, et al. Oxidized low-density lipoprotein receptor LOX-1 and apoptosis in human atherosclerotic lesions [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2002, **7** (3): 147-153.
- [19] Li D, Liu L, Chen H, et al. LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells [J]. *Circulation*, 2003, **107** (4): 612-617.
- [20] Chen K, Chen J, Liu Y, et al. Adhesion molecule expression in fibroblasts alteration in fibroblast biology after transfection with LOX-1 plasmids [J]. *Hypertension*, 2005, **46** (3): 622-627.
- [21] Li L, Sawamura T, Renier G. Glucose enhances endothelial LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced human monocyte adhesion to endothelium [J]. *Diabetes*, 2003, **52** (7): 1 843-850.
- [22] Br•chner K, Henn V, Gr•fe M, et al. CD40 ligand is selectively expressed on CD4+ T cells and platelets: implications for CD40/CD40L signalling in atherosclerosis [J]. *J Pathol*, 2003, **201** (2): 288-295.
- [23] 张峻, 陈纪林, 顾晴, 等. 阻断CD40-CD40配体系统对动脉粥样硬化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (2): 119-122.
- [24] Li D, Liu L, Chen H, et al. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (5): 816-821.
- [25] Honjo M, Nakamura K, Yamashiro K, et al. Lectinlike oxidized LDL receptor 1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (3): 1 274-279.
- [26] Chen J, Mehta JL, Haider N, et al. Role of caspases in α -LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2004, **94** (3): 370-376.
- [27] Imanishi T, Hano T, Sawamura T, et al. Oxidized low density lipoprotein potentiation of fas-induced apoptosis through lectinlike oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human umbilical vascular endothelial cells [J]. *Circ J*, 2002, **66** (11): 1 060-064.
- [28] Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, et al. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike α -LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (6): 955-960.
- [29] Farb A, Burke AP, Tang AL, et al. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core: a frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death [J]. *Circulation*, 1996, **93** (7): 1 354-363.
- [30] Chen M, Kakutani M, Naruko T, et al. Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **282** (1): 153-158.
- [31] Kakutani M, Masaki T, Sawamura T. A platelet-endothelium interaction mediated by lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97** (1): 360-364.
- [32] Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, et al. The platelet-endothelium interaction mediated by lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **41** (3): 499-507.
- [33] Muhammad MR, Hu CP, Mohandas B, et al. Modulation of ADP-induced platelet activation by aspirin and pravastatin [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, **322** (3): 1 324-332.

(此文编辑 许雪梅)