

# 氧化型高密度脂蛋白与动脉粥样硬化

董敏, 赵明明, 潘兵, 郑乐民

(北京大学心血管研究所, 北京市 100191)

[关键词] 高密度脂蛋白; 氧化修饰; 动脉粥样硬化

[摘要] 高密度脂蛋白(HDL)在体内经过髓过氧化物酶氧化形成不同位点修饰的 HDL(ox-HDL), ox-HDL 通过损伤内皮细胞、影响胆固醇逆转运过程、促进平滑肌增生等方式降低抗动脉粥样硬化的作用。因此 HDL 不同位点的氧化修饰及相关功能改变或将为治疗动脉粥样硬化提供新的思路。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Research Progress of Oxidized High Density Lipoprotein and Atherosclerosis

DONG Min, ZHAO Ming-Ming, PAN Bing, and ZHENG Le-Min

(Key Laboratory of Molecular Cardiovascular Sciences of Ministry of Education & Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

[KEY WORDS] High Density Lipoprotein; Oxidation; Atherosclerosis

[ABSTRACT] High density lipoprotein can be modified in various amid acid sites through myeloperoxidase(MPO). ox-HDL can damage endothelia cells, lose the ability of reverse cholesterol transport, promote smooth muscle cell proliferation which will decrease HDL anti-atherosclerosis capacity. Therefore the association between HDL specific sites modification and function changes will provide a new method to prevent atherosclerosis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是西方发达国家的主要死亡原因,是一组动脉硬化血管病中最常见的、最重要的一种,近年来本病在我国逐渐增多,为心肌梗死和脑梗死的主要病因。As 主要累及大动脉和中动脉,病变特征是血中脂质在动脉内膜沉积;平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)、巨噬细胞及 T 淋巴细胞聚集;结缔组织增生,引起内膜灶性纤维性增厚及粥样斑块形成,使动脉壁变硬,官腔狭窄<sup>[1]</sup>。

高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)由于颗粒小,可以自由进出动脉管壁,可以摄取血管壁内膜底层沉积的低密度脂蛋白、胆固醇、甘油三酯等有害物质, HDL 主要是将肝外组织细胞中的胆固醇转运出来,然后被肝分解代谢,这一过程称为胆固醇的逆转运<sup>[2]</sup>。循证医学显示, HDL 具有抗 As

的作用,其水平的降低已作为心血管疾病的一个独立危险因素。HDL 通过逆向转运胆固醇,抵抗低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)氧化,保护内皮功能等机制起到了抗 As、减缓冠状动脉疾病进展的作用<sup>[3]</sup>。为了进一步防治冠心病,具有抗 As 功能的高密度脂蛋白胆固醇(high-density of lipoprotein cholesterol, HDLC)成了关注热点,有关提升或改善 HDLC 的研究不断问世,其中也发现了不少问题。例如,辉瑞生产的 torcetrapib 作为一种胆固醇酯转运蛋白(cholesteryl ester transfer protein, CETP)抑制剂,可以显著升高冠心病患者 HDLC 达 72.1%,令人困惑的是,反而导致心血管事件和死亡风险增加<sup>[4]</sup>。而在越来越多有关 HDL 的研究中,近年来, HDL 氧化修饰及相关功能改变,成了研究和讨论的热点之一。

[收稿日期] 2015-10-15

[修回日期] 2015-12-03

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370235, 81170101)

[作者简介] 董敏, 硕士研究生, 主要从事脂蛋白、脂质与血管功能研究。赵明明, 硕士研究生, 主要从事脂蛋白、脂质与血管功能研究。潘兵, 副教授, 主要从事脂蛋白、脂质与血管功能研究。通讯作者郑乐民, 博士, 教授, 主要从事脂蛋白、脂质与血管功能研究, E-mail 为 zhengl@bjmu.edu.cn。

## 1 HDL 氧化机制研究

在人体内,LDL 经氧化修饰后,可以被巨噬细胞清道夫受体(scavenger receptor)吞噬,这些受体中包括 CD36,形成 As 的早期病变——泡沫细胞。大量研究显示,人体内还存在氧化型高密度脂蛋白(ox-HDL),Nakajima 等<sup>[5]</sup>应用  $\text{Cu}^{2+}$  氧化 HDL 的特异性抗体,通过免疫组化的方法,在人腹主动脉粥样斑块内膜和血管内皮细胞中就检测到了 ox-HDL 的存在。随后,Nakano 等<sup>[6]</sup>证明了以单克隆抗体为基础的酶联免疫吸附反应能灵敏地检测出血浆中的 ox-HDL,并具有可靠的特异性。另外,有研究发现,内源性高甘油三酯患者血浆中也存在 ox-HDL。

目前,关于 HDL 的氧化机制尚不明确。在体外,HDL 可被不同的介质氧化,如金属离子  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  等,其中  $\text{Cu}^{2+}$  氧化法是体外介导脂蛋白氧化最常用的方法。次氯酸(HOCl)亦可引起 HDL 的氧化修饰,但 HOCl 和  $\text{Cu}^{2+}$  介导的 HDL 氧化修饰在性质和动力学改变上各不相同。2004 年 Zheng 等<sup>[7]</sup>第一次发现在冠心病患者血浆和斑块的 HDL 中酪氨酸可以被髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)硝化和氯化,降低其胆固醇逆转运能力。Bergt 等<sup>[8]</sup>研究发现,主动脉粥样斑块内膜中的 HDL 含有 HOCl 氧化反应的产物 3-氯化酪氨酸,并且其含量远高于血液中的 HDL,同时发现 MPO 是斑块 HDL 的组成成分,而 MPO 可以产生 HOCl,由此推测 MPO 可以经 HOCl 介导氧化 HDL。Shao 等<sup>[9]</sup>证明了 MPO 是 3-氯化酪氨酸的唯一来源,由此证明 MPO 可在体内氧化 HDL。Aviram 等<sup>[10]</sup>证实,HDL 颗粒中的对氧磷酶(paraoxonase, PON-1)与 HDL 的氧化易感性负相关,可抑制由  $\text{Cu}^{2+}$  介导的 HDL 氧化修饰。Deakin 等<sup>[11]</sup>发现,PON-1 能抑制 HDL 氧化修饰,并呈剂量依赖性,且氧化修饰后的 HDL 从肝细胞获取并稳定 PON-1 的能力下降,PON-1 含量下降使得 HDL 更容易被氧化。

## 2 HDL 氧化位点研究

HDL 是一组由蛋白质和脂质组成的大分子复合物,其主要成分为载脂蛋白 A1(apolipoprotein A1, ApoA1)。Zheng 等<sup>[7,12]</sup>发现在冠心病患者体内,166 和 192 位酪氨酸可以被 MPO 硝化和氯化,其修饰含量与胆固醇逆转运能力成反比。体外研究说明,MPO 通过产生亚硝酸盐和次氯酸氧化修饰人体 ApoA1 的多个氨基酸残基位点,例如 86、112、148 位

蛋氨酸残基以及 8、50、72、108 位色氨酸残基和 192、236 位酪氨酸残基等位点,均可被硝基化或者氯化修饰<sup>[13]</sup>,将 ApoA1 中的色氨酸突变为苯丙氨酸后既可以保留 HDL 正常功能,同时可以避免 HDL 发生氧化修饰<sup>[14]</sup>。Shao 等<sup>[13]</sup>用选择反应监测模式的串联质谱法测定 ApoA1 特殊区域的氧化情况,发现在人体 As 斑块中 ApoA1 的 192 位酪氨酸残基是主要的氯化位点,18 位酪氨酸残基是主要的硝基化位点,健康人体血液循环中 ApoA1 的 192 位酪氨酸残基既是主要的氯化位点,也是主要的硝基化位点。Huang 等<sup>[15]</sup>证实,72 位色氨酸(Trp72)是 ApoA1 氧化的一个位点,其主要作用机制为  $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}^-$  系统,而对 Trp72 在位点特异性突变后可以抵抗  $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}^-$  系统诱导的 HDL 氧化修饰和功能降低。DiDonato 等<sup>[16]</sup>发现酪氨酸 166(Try)是 ApoA1 硝化的一个位点,166 位点硝化 ApoA1 占人体动脉粥样斑块的 8%,并且与正常 HDL 相比功能受损。

## 3 ox-HDL 影响胆固醇逆转运过程

胆固醇逆转运过程可分为 4 个主要步骤,首先,HDL 和外周细胞如血管内皮细胞、成纤维细胞和巨噬细胞等相互作用,游离的胆固醇从外周细胞流出并与 HDL 相结合。然后胆固醇被卵磷脂胆固醇酰基转移酶(lecithin:cholesterol acyltransferase,LCAT)转化成胆固醇酯,在 LCAT 的继续作用下,HDL 颗粒内胆固醇酯的浓度不断升高,HDL 颗粒变得成熟,成为 HDL3。继而在 CETP 的介导下,富含 ApoA1 的 HDL 中的胆固醇酯与富含 ApoB 的 LDL 和 VLDL 的甘油三酯互相交换。最后,LDL 和 VLDL 中的胆固醇酯通过 LDLR 被肝脏摄取,或者再回到外周细胞,而 HDL 中残留的胆固醇酯经肝酯酶的作用从 HDL 中释放出来,可被肝脏 B 族 I 型清道夫受体(scavenger receptor class B type I,SR-BI)选择性地吸收,完成胆固醇的逆转运<sup>[17]</sup>。体外研究显示,从冠心病患者血浆和体外  $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}^-$  系统氧化的 HDL,胆固醇逆转运能力明显降低,其激活 LCAT 能力也明显下降<sup>[13]</sup>,因此,HDL 的胆固醇逆向转运功能受损。HDL 中其他重要的功能分子如 ApoA1、PON-1、CETP 等被氧化修饰后结构发生改变,也会造成胆固醇逆转运受阻。例如,ApoA1 是介导 HDL 和泡沫细胞膜上的 ATP 结合盒转运体(ABCA1)的配体,ABCA1 是泡沫细胞内胆固醇转移至 HDL 的主要途径,ApoA1 与 ABCA1 结合是 As 斑块中胆固醇逆向转运的起始环节,ApoA1 结构发生

改变,不能与 ABCA1 结合,泡沫细胞内胆固醇流出受阻。

#### 4 ox-HDL 致使 HDL 保护血管内皮细胞作用减弱

血管内皮细胞(endothelial cell, EC)覆盖于血管表面的光滑内膜,维持血流状态,同时内皮还是机体最大的内分泌器官,它能够分泌多种生物活性物质,包括血管舒张因子和血管收缩因子,此二者在生理状态下处于平衡状态,对于维持循环的稳态起着十分重要的作用。Pan 等<sup>[18]</sup>研究发现体外经 MPO 氧化的 HDL 显著降低内皮细胞的迁移能力,在颈动脉电损伤模型中,体外修饰的 HDL 促内皮修复能力下降。血管内皮细胞损伤和功能失调是 As 的早期环节,表现为内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)活性下降和 NO 产生减少, HDL 具有激活 eNOS、促进 NO 生成和抗内皮凋亡功能<sup>[19-20]</sup>。NO 作为一种气体信号分子,在维持血管正常的舒张功能、抑制血小板聚集及动脉平滑肌细胞增殖、抑制单核细胞与内皮黏附方面发挥着重要作用。此外,NO 还是体内的氧自由基清除剂,能抑制脂蛋白被氧化。eNOS 是 NO 合成的关键酶,其活性和功能的变化直接调控 NO 的生成及生物学功能。HDL 氧化修饰后其改善内皮功能和抗内皮凋亡能力下降<sup>[20]</sup>,同时 ox-HDL 促进内皮释放内皮素 1(ET-1),使其呈现出强大的促动脉壁平滑肌细胞(SMC)增殖、收缩血管和升高血压的作用,从而加重 EC 的损伤并促进 As 的发展。

#### 5 ox-HDL 对血管平滑肌及血小板的影响

SMC 是 As 斑块中的主要细胞成分,它的增殖在 As 的形成过程中发挥着重要作用。早在 20 世纪就有文献报道过 ox-HDL 能促进 SMC 的增殖。生理状态下, HDL 能抑制血小板聚集,防止 As 的发生。ox-HDL 对血小板的影响有不一致的报道, Assinger 等<sup>[21]</sup>发现,次氯酸氧化修饰的 HDL 可以通过结合血小板上的 CD36 引起促炎和促凝血功能。CD36 属于 B 类清道夫受体家族,是 ox-LDL 在巨噬细胞上的受体。Ren 等<sup>[22]</sup>发现, CD36 帮助摄取 ox-HDL 后会导致泡沫细胞形成增加,同时在体外实验中, ox-HDL 会降低人外周巨噬细胞 CD36 的 mRNA 和表面蛋白的表达。而 Thorne 等<sup>[23]</sup>证实, CD36 能够选择性摄取  $\text{Cu}^{2+}$  氧化的 HDL 中的脂质,而不会摄

取普通 HDL 或 LDL 中的脂质,这可能会导致 As。Valiyaveetil 等<sup>[24]</sup>发现, MPO 或  $\text{Cu}^{2+}$  氧化的 HDL 可以结合血小板上的 SR-B I 受体,并抑制血小板聚集,产生抗血栓的作用。

#### 6 ox-HDL 对 LDL 氧化修饰的影响

正常 HDL 具有抗氧化能力,可抑制巨噬细胞、内皮细胞和平滑肌细胞对 LDL 的氧化修饰,但是 HDL 被氧化修饰之后便失去了抑制 LDL 氧化修饰的能力。当机体巨噬细胞感受到 LDL 变成 ox-LDL 时,便进入内皮下试图吞噬 ox-LDL。这些巨噬细胞来自血浆单核细胞,单核细胞在化学因子如血浆单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的刺激下,渗透进入血管壁,通过清道夫受体特异性地识别并吞噬 ox-LDL 后变为巨噬细胞,并进一步形成泡沫细胞。动脉血管壁大量泡沫细胞的聚集促使脂纹形成,形成 As 的早期病理改变,泡沫细胞是 As 脂质条纹病损形成的早期标志。目前认为 ox-HDL 丧失抑制 LDL 氧化修饰与 HDL 中 PON-1 活性降低有关。PON-1 由肝细胞合成, HDL 氧化修饰后从肝细胞获取并稳定 PON-1 的能力下降,导致 HDL 抗氧化能力下降<sup>[11]</sup>。Ferretti 等<sup>[25]</sup>研究表明,肥胖患者 HDL 中 PON-1 活力与 HDL 氧化程度呈负相关,这可能与肥胖患者心血管病风险增加有关。此外,体外  $\text{Cu}^{2+}$  氧化 HDL 时, HDL 中 PON-1 活力明显下降,且失活方式与  $\text{Cu}^{2+}$  介导的 PON-1 失活方式不一致,说明 ox-HDL 促使 PON-1 失活<sup>[26]</sup>。

#### 7 ox-HDL 与炎症反应

As 其实就是一种慢性炎症反应,在 As 发生机制的炎症效应中炎症细胞起到了重要作用。炎症细胞主要包括单核巨噬细胞、T 淋巴细胞和肥大细胞等。他们促使炎症过程不断加剧,在病变初期促进 SMC 迁移增殖, EC 脱落、凋亡,造成 EC 结构性损害;病变晚期,斑块内炎症进一步加剧可促进脂核增大,纤维帽平滑肌凋亡,纤维帽变薄,斑块破裂,诱发血栓形成,从而导致急性冠状动脉综合症(acute coronary syndrome, ACS)的发生。HDL 经氧化修饰后,能被巨噬细胞的清道夫受体所识别,进而被吞噬,造成胆固醇在巨噬细胞中堆积,加速泡沫细胞的形成,其结合位点与 ox-LDL 相同。因此, HDL 经氧化修饰后变成了促炎因子。Undurti 等<sup>[20]</sup>发现用 MPO 氧化的 HDL 处理内皮细胞会导致内皮

细胞的血管细胞黏附分子表达上调, NF- $\kappa$ B 活化, 提示 ox-HDL 产生促炎反应。

综上所述, HDL 经 MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系统氧化形成不同位点修饰的 ox-HDL 后, 不仅失去了其抗 As 的作用, 还会促进 As 的形成, 并且主要是通过损伤内皮细胞、影响胆固醇逆转运过程、促进平滑肌增生和促炎等方式。而 HDL 体内氧化的机制及位点则还需要进一步的研究。

#### [参考文献]

[1] Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(3): 1 317-542.

[2] Feig JE, Hewing B, Smith JD, et al. High-density lipoprotein and atherosclerosis regression; evidence from preclinical and clinical studies[J]. *Circ Res*, 114(1): 205-213.

[3] Luscher TF, Landmesser U, von Eckardstein A, et al. High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target[J]. *Circ Res*, 2014, 114(1): 171-182.

[4] Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events[J]. *New Engl J Med*, 2007, 357(21): 2 109-122.

[5] Nakajima T, Origuchi N, Matsunaga T, et al. Localization of oxidized HDL in atheromatous plaques and oxidized HDL binding sites on human aortic endothelial cells[J]. *Ann Clin Biochem*, 2000, 37(2): 179-186.

[6] Nakano T, Nagata A. Immunochemical detection of circulating oxidized high-density lipoprotein with antioxidantized apolipoprotein A-I monoclonal antibody [J]. *J Lab Clin Med*, 2003, 141(6): 378-384.

[7] Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(4): 529-541.

[8] Bergt C, Pennathur S, Fu X, et al. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(35): 13 032-037.

[9] Shao B, Pennathur S, Heinecke JW. Myeloperoxidase targets apolipoprotein a-i, the major high density lipoprotein protein, for site-specific oxidation in human atherosclerotic lesions [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(9): 6 375-386.

[10] Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, et al. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(8): 1 581-590.

[11] Deakin S, Moren X, James RW. HDL oxidation compromises its influence on paraoxonase-1 secretion and its capacity to modulate enzyme activity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(5): 1 146-152.

[12] Zheng L, Settle M, Brubaker G, et al. Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(1): 38-47.

[13] Shao B, Cavigiolio G, Brot N, et al. Methionine oxidation impairs reverse cholesterol transport by apolipoprotein A-I [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(34): 12 224-229.

[14] Peng DQ, Brubaker G, Wu Z, et al. Apolipoprotein A-I tryptophan substitution leads to resistance to myeloperoxidase-mediated loss of function [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(11): 2 063-070.

[15] Huang Y, DiDonato JA, Levison BS, et al. An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma [J]. *Nat Med*, 2014, 20(2): 193-203.

[16] DiDonato JA, Aulak K, Huang Y, et al. Site-specific nitration of apolipoprotein A-I at tyrosine 166 is both abundant within human atherosclerotic plaque and dysfunctional [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(15): 10 276-292.

[17] Phillips MC, Gillotte KL, Haynes MP, et al. Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes [J]. *Atherosclerosis*, 1998, 137 Suppl: S13-S17.

[18] Pan B, Yu B, Ren H, et al. High-density lipoprotein nitration and chlorination catalyzed by myeloperoxidase impair its effect of promoting endothelial repair [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60: 272-281.

[19] Mineo C. Endothelial and antithrombotic actions of HDL [J]. *Circ Res*, 2006, 98(11): 1 352-364.

[20] Undurti A, Huang Y, Lupica JA, et al. Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(45): 30 825-835.

[21] Assinger A, Koller F, Schmid W, et al. Specific binding of hypochlorite-oxidized HDL to platelet CD36 triggers proinflammatory and procoagulant effects [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 212(1): 153-160.

[22] Ren J, Jin W, Chen H. oxHDL decreases the expression of CD36 on human macrophages through PPAR $\gamma$  and p38 MAP kinase dependent mechanisms [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 342(1-2): 171-181.

[23] Thorne RF, Mhaidat NM, Ralston KJ, et al. CD36 is a receptor for oxidized high density lipoprotein: Implications for the development of atherosclerosis [J]. *Febs Lett*, 2007, 581(6): 1 227-232.

[24] Valiyaveetil M, Kar N, Ashraf MZ, et al. Oxidized high-density lipoprotein inhibits platelet activation and aggregation via scavenger receptor BI [J]. *Blood*, 2008, 111(4): 1 962-971.

[25] Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, et al. Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(3): 1 728-733.

[26] Nguyen S. Copper ions and hypochlorite are mainly responsible for oxidative inactivation of paraoxon-hydrolyzing activity in human high density lipoprotein [J]. *Toxicol Lett*, 2004, 147(3): 201-208.