

· 成果简介 ·

脂质过氧化损伤在动脉粥样硬化 发生发展中的作用

陈 璦 周 玫 刘尚喜 郭志刚 娄 宁

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

[关键词] 氧化修饰低密度脂蛋白, 动脉粥样硬化, 泡沫细胞形成

长期以来, 动脉粥样硬化 (AS) 发生机制主要有脂质浸润学说和内皮损伤学说, 但主要的损伤因素是什么, 两学说又如何统一起来, 不很清楚。我室从氧化修饰低密度脂蛋白 (O-LDL) 的特性及其对内皮细胞 (EC)、平滑肌细胞 (SMC) 和巨噬细胞 (MΦ) 的毒性效应以及整体研究, 证实 O-LDL 的毒性效应是导致 AS 发生发展的重要因素。研究从以下四个方面进行:

(1) 整体试验。对冠心病患者的研究揭示, 患者的血浆脂质过氧化物 (LPO) 含量升高, 溶血程度增加和硒谷胱甘肽过氧化物酶 (SeGSHPx) 活性下降。另对实验性 AS 家兔血液 LPO 和 SeGSHPx 的动态观察及心和主动脉 LPO 和 SeGSHPx 测定, 都说明 AS 机体受到脂质过氧化损伤和抗氧化能力下降。心肌梗塞可使心脏进一步受到脂质过氧化损伤。衰老在脂质过氧化机理上有共同性。在研究中我们发现:

(a) SeGSHPx/丙二醛 (MDA) 或 LPO 比值是反映机体抗氧化能力的有效指标。单用血浆 LPO 含量增加或 SeGSHPx 活性降低得出的结论是不全面的, 必须两者结合起来考虑。因为我们观察到, 有些正常的血浆 LPO 含量可以大大超过正常人平均值, 甚至接近冠心病患者的平均值; 同时, 个别病例血浆 LPO 含量大大低于患者的平均值, 甚至低于正常人的平均值。但若结合血浆 SeGSHPx 活性的变化分析, 则可发现, 这些正常人血浆 LPO 含量虽大大超过正常平均值, 但其血浆 SeGSHPx 活性也高于正常, 因此 SeGSHPx/LPO 比值还是属于正常范围; 而个别患者血浆 LPO 含量虽然接近甚至低于正常值, 但其血浆 SeGSHPx 活性极度下降, 因而 SeGSHPx/LPO 比值明显低于正常值。这一论点在实验性 AS 家兔和不同年龄大鼠的研究中得到证实。

(b) 血浆 LPO 含量升高主要来自低密度脂蛋白 (LDL)。LDL 是血浆 LPO 的主要载体。以往认为冠心病的发生与血浆 LDL 含量增加有关, 但有一些冠心病患者血浆 LDL 含量并不高, 而一些血浆 LDL 含量高的人并未发生 AS, 似难以解释。为此, 我们对 AS 家兔血浆总胆固醇和总 LPO, 以及 LDL 与高密度脂蛋白 (HDL) 的胆固醇和 LPO 含量进行了动态观察, 揭

国家自然科学基金资助项目。

本文于 1995 年 3 月 17 日收到。

示血浆总胆固醇的升高主要是由 LDL 胆固醇大幅度升高所致, 而 HDL 胆固醇的贡献相对很小; 血浆总 LPO 含量的升高与 LDL 中的 LPO 含量增加相关, HDL 中的 LPO 含量在实验的 70 天内一直未见明显增加, 这说明血浆 LPO 主要分布在 LDL 中。对正常人和冠心病患者血浆总 LPO 和 LDL 中的 LPO 含量的测定, 进一步说明血浆 LPO 主要来自血浆 LDL, LDL 是血浆 LPO 的主要载体。血浆 LPO 含量反映的是血浆 O-LDL 的含量和 LDL 氧化修饰的程度。LDL 易于受到氧化修饰, 冠心病的发生与 LDL 受到氧化修饰有关。结果提示, 防止和终止 LDL 过氧化是防治 AS 的重要措施。

(2) 对 EC、SMC 和 $M\Phi$ 的研究说明, O-LDL 对细胞有明显的毒性效应。用不同浓度叔丁基脂氢过氧化物 (tBOOH) 与 SMC 作用, 观察到: 一定浓度 tBOOH 对一定培养代的 SMC 有明显的刺激增生作用; 细胞内 LPO 含量同细胞生长状态呈负相关, 即细胞处于生长高峰时 LPO 值降低, 反之 LPO 浓度增高; 细胞增生与细胞内 SOD 活性的增高相对应。

通过比较 O-LDL 和丙二醛修饰 LDL (MDA-LDL) 在泡沫细胞形成方面的差异, 发现 O-LDL 对 $M\Phi$ 的脂质过氧化损伤是泡沫细胞形成的主要原因。O-LDL 和 MDA-LDL 都可被 $M\Phi$ 吞噬, 造成细胞内胆固醇酯聚集。但 MDA-LDL 造成的胆固醇酯聚集可被高密度脂蛋白 (HDL_3) 清除, 而 O-LDL 致的则不能。虽然 O-LDL 和 MDA-LDL 处理 $M\Phi$ 都可使 HDL_3 结合量有不同程度下降, 细胞内 LPO 含量有不同程度升高, 但当处理因素消除后, 细胞继续培养时, 由 MDA-LDL 处理的细胞其降低的 HDL_3 结合量有一定的恢复, 细胞 LPO 含量不再上升; 而由 O-LDL 处理的细胞, 其 HDL_3 结合量则继续下降, 细胞 LPO 含量继续升高; 由 O-LDL 致的 $M\Phi$ 结合 HDL_3 的量下降与细胞 LPO 含量升高呈负相关; 事先用 tBOOH 对 $M\Phi$ 作用, 然后用两种修饰的 LDL 处理, 则两种修饰 LDL 造成的胆固醇酯聚集都不能被 HDL_3 清除。

以上说明 O-LDL 对 $M\Phi$ 毒性效应是泡沫细胞形成的主要原因。由此提示, 提高 $M\Phi$ 的抗氧化能力, 防止泡沫细胞形成, 促进 $M\Phi$ 对 O-LDL 的清除是防治 AS 又一重要途径。

(3) O-LDL 和 MDA-LDL 的比较研究及与 O-LDL 和 MDA-LDL 结合的清道夫受体的特征研究

对 O-LDL 与 MDA-LDL 进行比较研究揭示, 两种修饰虽都可使 LDL 上的游离氨基减少, 琼脂糖电泳迁移率加快和产生荧光等, 但氧化修饰能产生大量的 LPO, 使 LDL 中的维生素 E (VE) 含量急剧下降, 以及引起 apoB₁₀₀ 的降解, 并随着氧化修饰程度的增加 apoB₁₀₀ 的降解物重新聚合成大分子。同时发现, 两种修饰 LDL 的荧光光谱有明显的差异, 在 360 nm 激发光时, 它们的最大发射光值和光谱谱型不同。荧光光谱的差异反映它们构象的不同。 $M\Phi$ 和 EC 浆膜表面的清道夫受体能结合、内吞并分解 O-LDL 和 MDA-LDL。在研究了 O-LDL 和 MDA-LDL 理化性质异同和细胞对 O-LDL 和 MDA-LDL 结合、降解特性的基础上, 用放射性受体分析方法从标记配体的可饱和性、可逆性、高亲和力和立体选择性等几方面, 比较分析了 $M\Phi$ 表面与 O-LDL 和 MDA-LDL 结合的清道夫受体的特征, 以及它们之间的关系, 获得了一系列反应受体特征参数, 发现 $M\Phi$ 结合 O-LDL 和 MDA-LDL 的受体至少有三个结合位点: 一个识别 O-LDL; 一个识别 MDA-LDL; 再一个识别二者。从 O-LDL 和 MDA-LDL 构象的差异以及作为配体在清道夫受体上有不同的结合位点, 说明它们的抗原决定簇不完全一样。这一结果为制备 O-LDL 和 MDA-LDL 特异性单克隆抗体研究冠心病患者和实验性 AS 动物

血清中存在的 O-LDL 及其自身抗体的免疫学特性、选择较特异的单克隆抗体应用于临床诊断提供实验依据, 以及为深入研究 O-LDL 在 AS 发生发展中的作用提供理论依据。

(4) 不同方法对 LDL 氧化修饰的比较研究和以 LDL 氧化修饰为模型对某些物质抗氧化修饰研究。

用化学 (Cu^{2+})、物理 (紫外线) 和生物 ($\text{M}\Phi$) 方法对 LDL 氧化修饰的比较研究发现, 紫外线和 Cu^{2+} 两种修饰在有乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 存在的条件下, 紫外线修饰不受明显的抑制, 说明紫外线修饰的机理不同于 Cu^{2+} 修饰。由于 LDL 结构在一定程度上与细胞膜相类似, 这一机理的揭示为紫外线对细胞损伤机理研究以及对其预防研究提供了新线索。LDL 氧化修饰是评价和筛选抗氧化剂及其机理研究的很好模型, 为今后寻找有效的抗 AS 药物提供了新的方法。

值得提出的是: 根据 O-LDL 对 $\text{M}\Phi$ 的脂质过氧化损伤是泡沫样变的主要原因, 我们在寻找能提高 $\text{M}\Phi$ 抗氧化能力的药物时, 发现云芝多糖 (PSK) 能提高 $\text{M}\Phi$ 中的 SeGSHPx 基因表达^[1-3], 保护 $\text{M}\Phi$ 免受脂质过氧化损伤^[1,2]和防止 O-LDL 致的 $\text{M}\Phi$ LPO 聚集和泡沫样变^[4], 以及能防止实验性 AS 形成^[5]。PSK 作用的揭示, 证实了我们提出的 O-LDL 的脂质过氧化损伤是造成 $\text{M}\Phi$ 泡沫样变的主要原因, 并进一步说明 AS 的发生发展与 LDL 受到氧化修饰有关。提高 $\text{M}\Phi$ 抗氧化能力, 防止泡沫样变, 促进 O-LDL 的清除, 是防治 AS 又一重要途径。该研究结果为 PSK 的实际应用提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] Li Jun (李军), Zhou Mei (周玫), Chen Yuan (陈媛). Reversal of inhibition of reactive oxygen species on respiratory burst of macrophage by polysaccharide from *Coriolus Versicolor*. *Int J Immunopharmac*, 1993, **15** (3): 492.
- [2] Chen Yuan (陈媛), Zhou Mei (周玫), Li Jun (李军) et al. Injurious effect of reactive oxygen species on macrophage and its prevention by PSK. *J Clin Lab Immunol*, 1995, **43**: 99-115.
- [3] Liu Shangxi (刘尚喜), Chen Yuan (陈媛), Zhou Mei (周玫) et al. A preliminary study on the enhancement of gene expression of SeGSHPx in mouse peritoneal macrophage by polysaccharide krestin. *J. Med. Coll. PLA*, 1994, **9** (4): 303-305.
- [4] 乐毅, 陈媛, 周玫. 云芝多糖对受 O-LDL 攻击小鼠腹腔巨噬细胞保护作用及其免疫调节作用. *第一军医大学学报*, 1994, **14** (1): 15.
- [5] 娄宁, 陈媛, 周玫等. 云芝多糖预防实验性动脉硬化形成的病理形态学观察. *第一军医大学学报*, 1995, **15** (2): 114.

THE ROLE OF LIPOPEROXIDATIVE DAMAGE IN ATHEROGENESIS

Chen Yuan Zhou Mei Liu Shangxi Guo Zhigang Lou Ning

(Free Radical Medicine Research Laboratory, The First Military Medical University, Guangzhou 510515)

Key words oxidatively modified low density lipoprotein (O-LDL), atherosclerosis (AS), foam cell formation