

· 综 述 ·

糖化低密度脂蛋白与糖尿病患者动脉粥样硬化的相关研究

杨琛, 殷思雨综述, 张春妮审校

【摘要】葡萄糖的非酶糖化使低密度脂蛋白(LDL)糖基化,最终形成过度糖化终末产物(AGEs)修饰的 LDL(糖化 LDL, AGE-LDL)。糖化 LDL 在糖尿病患者慢性血管病变中发挥重要作用,与动脉粥样硬化的发生发展密切相关。本文就糖化 LDL 的形成、检测方法、临床意义和在糖尿病患者动脉粥样硬化发生中的作用机制作一阐述。

【关键词】过度糖化终末产物;糖化低密度脂蛋白;糖尿病;动脉粥样硬化

【中图分类号】R725.872.3 【文献标志码】A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.03.020

近年来,我国糖尿病的发病率呈上升趋势,且伴有心脑肾等器官并发症者越来越多。据弗雷明翰^[1]研究表明,在糖尿病患者中心血管疾病的死亡率比正常人高两倍。有研究发现,过度糖化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)的积累是 2 型糖尿病的一个特征,在糖尿病并发心血管疾病的发病机制中扮演一个重要角色^[2-3]。其中糖化低密度脂蛋白(AGE-LDL, 亦称糖化 LDL)在糖尿病患者慢性血管病变中发挥重要作用,与动脉粥样硬化的发生发展密切相关。本文对糖化 LDL 的形成、检测方法、临床意义和在糖尿病患者动脉粥样硬化发生中的作用机制作一阐述。

1 糖化 LDL 的生成

早期糖化产物的形成是葡萄糖与蛋白质非酶糖化的第一步。首先葡萄糖的羰基迅速结合于蛋白质的氨基上,形成 Schiff 碱基, Schiff 碱基在若干小时内与血糖浓度达到平衡。接着 Schiff 碱基经化学重排形成稳定的 Amadori 产物,即 1-氨基-1-脱氧 D 酮糖,是早期糖化产物的一种。一些长寿命的大分子如胶原、DNA 上形成的早期糖化产物缓慢进入第 2 步反应,短寿命的则可因解离或降解被清除体外。

AGEs 的形成是葡萄糖与蛋白质非酶糖化结合反应的第 2 步。第 1 步反应生成的 Amadori 产物再经氨基糖的降解形成 3-脱氧葡萄糖醛酮, 3-脱氧葡萄糖醛酮再与蛋白质的氨基反应形成 AGEs^[4], 该步也称 Maillard 反应。第 2 步反应是不可逆的,其生成的 AGEs 很稳定,可在组织或血管壁上长期累积,即使高血糖被纠正, AGEs 的水平仍不能恢复正常。

蛋白质的非酶糖化可发生于载脂蛋白、核蛋白

及组织蛋白上。而 LDL 的糖化主要发生于载脂蛋白 B (apolipoprotein B, ApoB) 及磷脂上含赖氨酸的部位。ApoB 有许多带正电荷的赖氨酸残基,这些赖氨酸残基很容易被糖化,准确地说是靠近 LDL 可能的受体结合位点的赖氨酸残基易被糖化。ApoB 与葡萄糖经以上两步非酶糖化反应最终生成过度糖化终末产物修饰的低密度脂蛋白,亦称为糖化 LDL。

2 糖化 LDL 的测定方法

现有多种测定糖化 LDL 的浓度的方法,归纳起来有以下几种。

2.1 荧光分光光度法 用来定量血浆中的 AGEs。通过去蛋白和去脂,血浆中 AGEs 的交联累积可以用特征荧光(激发光 370 nm, 发射光 440 nm)分光光度法直接测量^[5-6]。

2.2 琼脂糖和 SDS-PAGE 电泳法 可用来评估脂蛋白的糖化。在琼脂糖电泳上, LDL 相对电泳迁移率的变化可以反映它的糖化改变。糖基化导致 ApoB 带正电荷的赖氨酸残基丢失,因此和天然的 LDL 相比较,糖基化后带负电荷的 LDL 增多,向正极移动的 LDL 也随之增多^[7-9]。而 SDS-PAGE 电泳对因交联而聚集的 LDL 颗粒比较敏感^[8-9],也可以用于鉴定脂蛋白的糖化。

2.3 高效液相色谱法 LDL 中的 ApoB 氨基酸的含量可以通过高效液相色谱法来估算。在特定的条件下可以用赖氨酸丢失和山梨醇-赖氨酸的形成反映糖基化程度^[8,10], LDL 果糖胺含量也可以用于糖化 LDL 蛋白评估^[11]。

2.4 m-氨基苯硼酸盐亲和色谱法 可以用来分离糖化和非糖化蛋白^[12-13]。固定凝胶中的配体结合到糖顺式二元醇基团的部分形成一个可逆的五元环复合物。先从样本中洗去未结合的分子,再解离

五元环复合物用山梨醇洗脱糖基化的蛋白。与非糖化的脂蛋白解离后,糖基化的 LDL 可通过免疫法检测 ApoB 的量。

2.5 竞争性 ELISA 法 利用能特异地识别糖化 LDL 的 ApoB 分子上一个特殊抗原表位的鼠单克隆抗体来直接测定血中糖化 ApoB 的量。该单克隆抗体具有较高的特异性,不与其他人血浆蛋白反应,包括非糖化的 LDL。

2.6 比色法 LDL 的修饰程度可以通过间接测量自由的非糖基化氨基基团得到。用硫酸三硝基苯在弱碱性条件下与自由氨基基团生成强显色的三硝基苯基(trinitrophenyl, TNP)衍生物进行比色分析。糖化 LDL 和天然 LDL 吸光度减少值的比值与 TNP 衍生物的浓度成线性函数关系。

3 血糖化 LDL 水平的临床意义

刘爱华等^[14]通过比较颈动脉粥样硬化患者与正常对照组之间血浆中糖化 LDL 的含量,探讨颈动脉粥样硬化与糖化 LDL 之间的关系。他们应用微柱亲和层析法测定血浆糖化 LDL 的含量,包括颈动脉粥样硬化组 103 例(其中合并糖尿病组 47 例,非合并糖尿病组 56 例),对照组 43 例。结果显示,颈动脉粥样硬化组糖化 LDL 含量较对照组明显增高($P < 0.01$)。糖化 LDL 的含量与动脉的狭窄程度呈显著正相关($r = 0.409, P < 0.01$),提示糖化 LDL 与动脉粥样硬化的发生和严重程度有关。

另一研究^[15]采用氯化硝基四唑氮蓝还原比色法测定 56 例 2 型糖尿病(其中 28 例并发大血管病变,28 例无血管病变)和 48 例健康人的血浆糖化 LDL 水平,分析其与糖尿病大血管病变的关系。发现 2 型糖尿病并发大血管病变组糖化 LDL 显著升高,但与脂蛋白浓度无显著相关,说明糖化 LDL 升高是 2 型糖尿病大血管病变独立的危险因素。

Stitt 等^[16]采用单克隆抗体法检测不同年龄组动脉粥样硬化患者血清糖化 ApoB 的含量。结果显示,无症状老人血清中糖化 ApoB 水平 $[(259 \pm 24) \text{ U/mg}]$ 较年轻人 $[(180 \pm 21) \text{ U/mg}]$ 明显升高($P < 0.01$),而有动脉粥样硬化症状的患者中糖化 ApoB 水平 $[(329 \pm 23) \text{ U/mg}]$ 增加更显著($P < 0.05$),由此认为糖化 ApoB 与动脉粥样硬化发生有显著的相关性。

Chang 等^[17]的研究发现,AGEs 与总胆固醇、三酰甘油及其他动脉粥样硬化指标呈正相关而与高密度脂蛋白胆固醇水平呈负相关,表明 AGEs 可能是糖尿病患者动脉粥样硬化的危险因素。此外,该研

究显示,不仅 AGEs 修饰的 LDL 而且 AGEs 的肽类都对糖尿病患者动脉粥样硬化的发展起一定作用,它们之间的关联甚至强于空腹血糖和糖化血红蛋白。

另有研究^[18]用 ELISA 法检测了 44 例非糖尿病患者血清 LDL 等指标,发现 $(67.8 \pm 21.9)\%$ 的糖化 ApoB 在小而密的 LDL 中,只有 $(32.2 \pm 21.9)\%$ 在大而轻的 LDL 中。说明在糖尿病甚至非糖尿病患者体内,小而密的 LDL 更易于糖化,且更易引起动脉粥样硬化。

4 糖化 LDL 在动脉粥样硬化中的作用和机制

4.1 糖化 LDL 通过与 AGEs 受体结合发挥促炎作用 组织培养研究显示,糖化 LDL 不能被 LDL 受体清除,而是由特定的 AGEs 受体结合清除。AGEs 受体广泛分布于人体内皮细胞、平滑肌细胞、单核淋巴细胞及肾小球系膜细胞。糖化 LDL 与受体结合同时促进单核细胞趋化蛋白-1 和血管细胞黏附分子-1 的释放增加,而这两者又可趋化单核细胞附着于血管壁^[19],血管内皮细胞对单核细胞的黏附作用增加是动脉粥样硬化重要病理过程之一。该结果提示糖化 LDL 与 AGEs 受体结合后可促进动脉粥样硬化的形成^[20]。

4.2 糖化 LDL 促进泡沫细胞形成 正常生理条件下,LDL 有三分之一经吞噬细胞吞噬清除,其余的 LDL 可与吞噬细胞表面的 LDL 受体结合清除,且受 LDL 负反馈调节。现已用单克隆抗体证实,ApoB 被糖化的位点靠近 ApoB 与 LDL 受体结合部位。由此可推测,ApoB 被糖化后直接阻止了 ApoB 与 LDL 受体的结合,或导致 ApoB 构型改变使得 ApoB 与 LDL 受体的结合力下降,其结果是糖化 LDL 经 LDL 受体途径降解减少,血中糖化 LDL 浓度升高。目前已发现,糖化 LDL 可以被巨噬细胞和上皮细胞上的清道夫受体吞噬清除^[21-23],促进泡沫细胞形成^[24]。De 等^[25]用人冠状平滑肌细胞证明,糖化 LDL 可诱导依赖 MAPK/JNK 的信号转导途径和 AP-1 复合物的广泛级联,而肿瘤坏死因子 α 促进糖化 LDL 处理过的小冠状动脉中 JNK 的磷酸化,进一步使用 ApoE 基因敲除活体小鼠[ApoE 基因(-/-)]证明泡沫细胞的形成增量和 JNK1、JNK2 和 MMK4 的磷酸化的增量是相对应的。这些结果揭示糖化 LDL 通过 MAPK/JNK 途径诱导血管损伤。

4.3 糖化 LDL 增加 LDL 的氧化易感性 目前已证实^[26],LDL 氧化修饰与动脉粥样硬化密切相关。然而,LDL 的糖化和氧化可能同时在体内发生,并导致

LDL 的额外修饰。Akanji 等^[27]研究发现,糖化 LDL 比非糖化 LDL 更易氧化,即糖化 LDL 的氧化易感性增加,且无论有无糖化 LDL 都可促进脂质氧化。其可能的原因是在无氧和氧自由基的条件下,葡萄糖和 Amadori 产物的自身糖化能产生自由基,从而有利于糖化 LDL 的进一步氧化。目前普遍认为,氧化 LDL 是导致动脉粥样硬化的关键因素之一,糖化 LDL 可通过促进 LDL 的氧化导致动脉粥样硬化。同时,AGEs 可通过结合内皮细胞凝集素样氧化 LDL 受体 1 增加其表达,从而促进内皮细胞对氧化 LDL 的摄取。

4.4 糖化 LDL 对细胞外基质的影响 糖化 LDL 修饰的胶原对动脉粥样硬化具有促进作用。有研究证实^[28],糖化 LDL 可以与细胞外基质半衰期长的蛋白质如 IV 型胶原、层粘连蛋白、纤维结合蛋白之间形成不可逆的交联。这种病理的交联增加了基质的硬度,影响了基质的功能,并且能抵抗正常的蛋白水解酶的水解,影响了基质的更新^[29]。血液中可溶性的 LDL 以及免疫球蛋白 G(IgG)也可以结合到胶原上。病变的层粘连蛋白则降低了聚合体的自动装配和与 IV 型胶原以及硫酸类肝素蛋白多糖的聚合交联,硫酸类肝素的缺乏则通过产生过量的生长调控因子促进了其他基质的增生^[30]。胶原连接的糖化 LDL 还可以清除一氧化氮,造成血管舒张障碍,从而引起与动脉粥样硬化密切相关的内皮功能受损^[31]。

5 降低糖化 LDL 的药物研究

近年来的研究表明,多种药物可降低 LDL 的糖化。有研究显示^[32],他汀类药物是减少糖化 LDL 最好的药物。他汀类药物通过抑制胆固醇合成中的限速酶即 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶的活性,抑制脂质中的胆固醇合成,降低胆固醇浓度,因而是调脂治疗的首选药物之一。另外,急性冠状动脉综合征患者早期服用他汀类药物能够抑制血管内皮的炎症反应,稳定粥样斑块,改善血管内皮功能。他汀类药物具有抗炎、保护神经、抗血栓和延缓动脉粥样硬化程度等功效^[33-34]。氨基胍和胍屈嗪等一些因子^[8]也会干扰糖化过程,在体外这类因子大多通过和活性醛反应(羰基清除)来抑制糖化并且防止活性醛和脂蛋白的相互作用。另有证据表明^[35],一些具有抗氧化性的复合物能够延缓糖化,包括组氨酸、肌肽(β -内酰胺-L-组氨酸)以及在脑、骨骼肌和肝脏中表达的内源性合成肽等。有机硫复合物如硫化联丙烯、二硫联丙烯、S-半胱乙酯、S-乙酰半胱氨酸甲酯、S-烯丙(基)半胱氨酸和 S-丙基半胱氨酸

等也能部分延缓氧化 LDL 和糖化 LDL 进一步的氧化和糖化^[36]。最近研究证明^[21],维生素 P、毛地黄黄酮、桑黄素、槲皮(黄)素、4',5,7-三羟基黄酮醇、富含多聚酚番石榴、五黄酮醇和 5,7,3',4',5'-六羟黄酮在一定剂量下,也具有降低 LDL 糖化的作用。

6 展望

近年来的研究证实,糖化 LDL 在动脉粥样硬化患者体内显著升高,是糖尿病患者动脉粥样硬化的危险因素,可作为动脉粥样硬化的预测指标。而有很多药物可降低 LDL 的糖化,如果合理使用以上降低糖化 LDL 的药物,似有可能降低动脉粥样硬化的发病率,这有待于进一步的验证和研究。现已认识到不仅糖化 LDL,其他 AGEs 在动脉粥样硬化及冠心病中都会显著升高。加强对 AGEs 的研究,将有助于阐明在糖尿病患者动脉粥样硬化发生中的作用和机制,有利于探索新的预防、监测和治疗方法。

【参考文献】

- [1] Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, et al. Morbidity and mortality in diabetics in the framingham population, sixteen year follow-up study [J]. Diabetes, 1974, 23(2):105-111.
- [2] Low H, Hoang A, Forbes J, et al. Advanced glycation end-products (AGEs) and functiona- lity of reverse cholesterol transport in patients with type 2 diabetes and in mouse models [J]. Diabetologia, 2012, 55(9):2513-2521.
- [3] 王 黎, 金 晖, 孙子林, 等. 糖基化终产物对小鼠巨噬细胞基质金属蛋白酶诱导物表达、分泌及基质金属蛋白酶 9 活性的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(4):289-293.
- [4] Sasaki N, Toki S, Chowei H, et al. Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease [J]. Brain Res, 2001, 888(2):256-262.
- [5] Hein G, Weiss C, Lehmann G, et al. Advanced glycation end product modification of bone proteins and bone remodelling: hypothesis and preliminary immunohistochemical findings [J]. Ann Rheum Dis, 2006, 65(1):101-104.
- [6] Assimakopoulos D, Danielides V, Kontogianis N, et al. Sudden hearing loss as the presenting symptom of diabetes mellitus [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2001, 53(3):201-203.
- [7] Howes KA, Liu Y, Dunaief JL, et al. Receptor for advanced glycation end products and age-related macular degeneration [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(10):3713-3720.
- [8] Gebhardt C, Riehl A, Durchdewald M, et al. RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development [J]. J Exp Med, 2008, 205(2):275-285.
- [9] Allmen EU, Koch M, Fritz G, et al. V domain of RAGE interacts with AGEs on prostate carcinoma cells [J]. Prostate, 2008, 68(7):748-758.
- [10] Brown BE, Mahroof FM, Cook NL, et al. Hydrazine compounds in-

- hibit glycation of low-density lipoproteins and prevent the in vitro formation of model foam cells from glycolaldehyde-modified low-density lipoproteins [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(4): 775-783.
- [11] Umudum F, Yucel O, Sahin Y, et al. Erythrocyte membrane glycation and Na(+) - K(-) levels in NIDDM [J]. *J Diabetes Complications*, 2002, 16(5): 359-362.
- [12] Knott HM, Brown BE, Davies MJ, et al. Glycation and glycooxidation of low-density lipoproteins by glucose and low-molecular mass aldehydes. formation of modified and oxidized particles [J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(17): 3572-3582.
- [13] Brown BE, Dean RT, Davies MJ. Glycation of low-density lipoproteins by methylglyoxal and glycolaldehyde gives rise to the in vitro formation of lipid-laden cells [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(2): 361-369.
- [14] 刘爱华, 谢淑萍, 王拥军. 糖化低密度脂蛋白与颈动脉粥样硬化的关系研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 1999, 1(1): 23-26.
- [15] 韩萍, 郭津津. 血浆糖化低密度脂蛋白, 脂蛋白(a)与 2 型糖尿病大血管病变的关系[J]. *中国糖尿病杂志*, 2000, 8(1): 30-32.
- [16] Stitt AW, He C, Friedman S, et al. Elevated AGE-modified apoB in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs [J]. *Mol Med*, 1997, 3(9): 617-627.
- [17] Chang JB, Chu NF, Syu JT, et al. Advanced glycation end products (AGEs) in relation to atherosclerotic lipid profiles in middle-aged and elderly diabetic patient [J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 228.
- [18] Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, et al. Glycation of LDL in non-diabetic people; small dense LDL is preferentially glycated both in vivo and in vitro [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(1): 162-168.
- [19] Ichiki T, Funako shi Y, Ito K, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 21 by nonenzymatically glycated album in (Amadori adducts) in vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269(3): 666-670.
- [20] Wang Z, Jiang Y, Liu N, et al. Advanced glycation end-product Nε-carboxymethyl-lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(2): 387-396.
- [21] Sobal G, Menzel J, Sinzinger H. Why is glycated LDL more sensitive to oxidation than native LDL? A comparative study [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000, 63(4): 177-186.
- [22] Rashid I, van Reyk DM, Davies MJ. Carnosine and its constituents inhibit glycation of low-density lipoproteins that promotes foam cell formation in vitro [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(5): 1067-1070.
- [23] Shiu SW, Wong Y, Tan KC. Effect of advanced glycation end products on lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 expression in endothelial cells [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2012, 19(12): 1083-1092.
- [24] Ravandi A, Kuksis A, Shaikh NA. Glycated phosphatidylethanolamine promotes macrophage uptake of low density lipoprotein and accumulation of cholesterylesters and triacylglycerols [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(23): 16494-16500.
- [25] De Nigris F, Rienzo M, Sessa M, et al. Glycoxydation promotes vascular damage via MAPK-ERK /JNK pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(11): 3639-3647.
- [26] Soran H, Durrington PN. Susceptibility of LDL and its subfractions to glycation [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22(4): 254-61.
- [27] Akanji AO, Abdella N, Mojiminiyi OA. Determinants of glycated LDL levels in nondiabetic and diabetic hyperlipidaemic patients in Kuwait [J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 317(1-2): 171-176.
- [28] Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced glycation end products: their receptors and diabetic angiopathy [J]. *Diabetes Metab*, 2001, 27(5 Pt 1): 535-542.
- [29] R Singh, A Barden, T Mori, et al. Advanced glycation end-products: a review [J]. *Diabetologia*, 2001, 44(2): 129-146.
- [30] Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications [J]. *N Engl J Med*, 1988, 318(20): 1315-1321.
- [31] Riccardo Candido, Michela Zanetti. Current perspective. Diabetic vascular disease: from endothelial dysfunction to atherosclerosis [J]. *Ital Heart J*, 2005, 6(9): 703-720.
- [32] Younis NN, Soran H, Sharma R, et al. Small-dense LDL and LDL glycation in metabolic syndrome and in statin-treated and non-statin-treated type 2 diabetes [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2010, 7(4): 289-295.
- [33] 秦 娟, 杨政杰, 全文超, 等. 阿托伐他汀治疗冠心病临床观察 [J]. *临床合理用药*, 2012, 5(1B): 54.
- [34] 叶 瑛, 贾 楠. 瑞舒伐他汀的临床研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2010, 29(11): 813-816.
- [35] Zimmermann R, Panzenbock U, Wintersperger A, et al. Lipoprotein lipase mediates the uptake of glycated LDL in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages [J]. *Diabetes*, 2001, 50(7): 1643-1653.
- [36] Gambino R, Uberti B, Alemanno N, et al. In vivo oxidizability of LDL in type 2 diabetic patients in good and poor glycemic control [J]. *Atherosclerosis*, 2004, 173(1): 103-107.

(收稿日期: 2013-01-11)

(本文编辑: 张仲书)