

# 高胆固醇血症患者高密度脂蛋白损伤血管功能

欧志君<sup>1,3,4</sup>, 常凤军<sup>2,3,4</sup>, 胡晓侠<sup>2,3,4</sup>, 董吁钢<sup>3,4,5</sup>, 区景松<sup>2,3,4</sup>

(1. 中山大学附属第一医院高血压血管病科; 2. 中山大学附属第一医院心脏外科; 3. 卫生部辅助循环重点实验室; 4. 广东省血管疾病诊治工程实验室; 5. 中山大学附属第一医院心血管内科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 动脉粥样硬化; 高密度脂蛋白; 趋炎; 血管舒张

[摘要] **目的** 观察高胆固醇血症患者高密度脂蛋白性质改变及其对血管功能的影响, 探讨高胆固醇血症患者中高密度脂蛋白促进动脉粥样硬化的可能机制。 **方法** 分别取 20 名健康志愿者 (男 12 例, 女 8 例) 和 20 例高胆固醇血症患者 (男 11 例, 女 9 例) 作为观察对象, 年龄均在 18~60 岁; 测定其血浆中总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇水平, 并对高密度脂蛋白的趋炎性进行分析。用血浆提取的高密度脂蛋白处理小鼠的主动脉, 观察血管的收缩与舒张功能。 **结果** 高胆固醇血症患者血浆总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平明显高于健康志愿者 ( $P < 0.05$ ), 高密度脂蛋白胆固醇水平与健康志愿者比较无明显差异 ( $P > 0.05$ )。高胆固醇血症患者与健康志愿者相比高密度脂蛋白趋炎性增加, 趋炎的高密度脂蛋白明显抑制内皮依赖的血管舒张功能。 **结论** 高胆固醇血症状态下高密度脂蛋白处于炎症状态, 失去对血管的保护作用, 抑制内皮依赖的血管舒张功能, 可能是促进动脉粥样硬化形成的一个重要原因。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## High Density Lipoprotein from Patients with Hypercholesterolemia Impaired Vascular Function

OU Zhi-Jun<sup>1,3,4</sup>, CHANG Feng-Jun<sup>2,3,4</sup>, HU Xiao-Xia<sup>2,3,4</sup>, DONG Yu-Gang<sup>3,4,5</sup>, and OU Jing-Song<sup>2,3,4</sup>

(1. Division of Hypertension and Vascular Diseases, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University; 2. Division of Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University; 3. The Key Laboratory of Assisted Circulation, Ministry of Health; 4. Engineering Laboratory for Diagnosis and Treatment of Vascular Diseases of Guangdong Province; 5. Division of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; High Density Lipoprotein; Proinflammatory; Vasodilation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the possible mechanisms by which high-density lipoprotein (HDL) lead to the development of atherosclerosis by analysing the properties changes of HDL from the patients with hypercholesterolemia and its influence on vascular function. **Methods** 20 patients (male = 11, female = 9, aged from 18 to 60 years old) with hypercholesterolemia were selected as hypercholesterolemia group and 20 healthy adults (male = 12, female = 8, aged from 18 to 60 years old) were chosen as control group. The plasma concentration of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDLC) and high density lipoprotein cholesterol (HDL) were measured. The inflammatory level of HDL was analyzed. HDL was isolated from the plasma and was incubated with the aortic of C57BL/6 mice to observe the vascular contraction and vasodilation. **Results** In patients with hypercholesterolemia, the plasma concentration of TC ( $6.49 \pm 0.76$  mmol/L vs  $4.67 \pm 0.34$  mmol/L,  $P < 0.05$ ), TG ( $3.16 \pm 1.85$  mmol/L vs  $1.27 \pm 0.53$  mmol/L,  $P < 0.05$ ), and LDLC ( $4.52 \pm 0.70$  mmol/L vs  $2.98 \pm 0.40$  mmol/L,  $P < 0.05$ ) were significantly higher than that in healthy subjects. However, the plasma concentration of HDL ( $1.28 \pm 0.41$  mmol/L vs  $1.16 \pm 0.23$  mmol/L,  $P > 0.05$ ) had no significant difference between hypercholesterolemia group and control group. The inflammatory level of

[收稿日期] 2015-09-27

[修回日期] 2015-12-02

[基金项目] 教育部长江学者奖励计划项目; 国家杰出青年科学基金 (81325001); 国家自然科学基金项目 (30971261, 81170271, 81370370); 广东省高等学校高层次人才项目 (珠江学者计划); 国家临床重点专科建设项目; 科技部国际合作专项 (2015DFA31070)

[作者简介] 欧志君, 硕士, 副主任医师, 从事心血管研究, E-mail 为 zhijunou@163.com。通讯作者区景松, 博士, 主任医师, 长江学者特聘教授, 珠江学者特聘教授, 从事心血管研究, E-mail 为 oujs@mail.sysu.edu.cn。

HDL in patients with hypercholesterolemia (RFU:  $1104.0 \pm 182.5$  vs  $366.2 \pm 84.5$ ,  $P < 0.05$ ) was significantly increased compared with the controls. This proinflammatory HDL dramatically inhibited the endothelium-dependent vasodilation.

**Conclusions** HDL in hypercholesterolemia not only turned to inflammatory states and lost its effect on protecting cardiovascular function, but impaired endothelium-dependent vasodilation. Proinflammatory HDL may be one of the key factors in promoting the formation of atherosclerosis.

动脉粥样硬化性心脏病严重危害人类健康, 高胆固醇血症是其主要发病因素。血管内皮功能受损或减退是动脉粥样硬化的始动因素。早期研究表明, 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 水平升高与冠心病的发生率正相关, 而高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 水平升高与冠心病的发生率负相关<sup>[1-2]</sup>。但最近的临床研究表明, 单纯升高血浆中高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平不能预防心血管事件的发生<sup>[3-5]</sup>, 提示可能是 HDL 功能而不是 HDLC 水平起关键作用<sup>[6-8]</sup>。但高胆固醇血症时 HDL 功能情况尚未清楚。本研究通过比较非高胆固醇血症与高胆固醇血症下 HDL 水平, 并测定其趋炎状态, 以及了解对小鼠主动脉内皮依赖的血管舒张功能的影响, 旨在探讨高胆固醇血症下 HDL 对动脉粥样硬化形成的影响情况和可能机制。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选择在本院就诊或体检无血脂异常的健康志愿者 20 例为对照, 血浆胆固醇水平升高 (TC 水平和/或 LDLC 水平) 的患者 20 例为高胆固醇血症组。健康志愿者组男 12 例, 女 8 例, 年龄 ( $43.8 \pm 17.0$ ) 岁, 体重 ( $63.8 \pm 19.0$ ) kg; 高胆固醇血症组男 11 例, 女 9 例, 年龄 ( $47.0 \pm 10.8$ ) 岁, 体重 ( $65.6 \pm 16.4$ ) kg。所有入组的对象均排除合并糖尿病、高血压病、冠心病以及其他慢性疾病, 无吸烟、酗酒史。

### 1.2 血浆胆固醇水平测定

采集禁食 12 h 后静脉血 2 mL, 分离血清。用 Beckman AU5821 全自动生物化学分析仪检测总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、LDLC 和 HDLC 水平。

### 1.3 血浆 HDL 的提取

所有患者及健康志愿者在抽血前一天禁止吸烟、饮酒, 且禁食  $\geq 8$  h, 次日清晨空腹抽取肘静脉血离心 ( $4^{\circ}\text{C}$  4000 r/min; 离心 10 min), 提取血浆, 将收集的 plasma 混合到 50 mL 的离心管内, 按比例加入 1:500 的 EDTA (134 mmol/L) 和 1:10000 的二丁基羟基甲苯 (BHT, 200 mmol/L), 混匀后用无菌注射

器将血浆移入超高速离心管内离心 ( $4^{\circ}\text{C}$  50000 r/min 离心 21 h)。按文献报道<sup>[8]</sup>超高速离心法提取 HDL。

### 1.4 HDL 趋炎性测定

按照文献报道采用 cell-free 法来检测 HDL 的趋炎性<sup>[9]</sup>。用双蒸水配制葡聚糖硫酸盐 (Dextran sulfate 50, Warnick & CO, Cat#: 00502, 0.02 kg/L)-氯化镁 ( $\text{MgCl}_2$ , Sigma, M-1028, 1 mol/L) 1:1 混合液, 然后混合液与血浆按 1:10 混合在 1.5 mL 的离心管, 室温下反应 10 min。然后离心 ( $4^{\circ}\text{C}$  8000 r/min 离心 15 min), 取上清。采用 HDLC 试剂盒 (HDLC E kit, Wako, Cat#: 431-52501) 测量 HDL 的浓度。取 1  $\mu\text{g}$  的 HDLC 至 384 孔板内并用 PBS 将各组 HDL 调整至统一体积 50  $\mu\text{L}$ , 然后加入  $\text{CuCl}_2$  (终浓度 5  $\mu\text{mol/L}$ ) 室温孵育 1 h, 期间用甲醇将 DCFH-DA 配制为 2.0 g/L 的溶液并置暗处室温静置 30 min 后, 取 10  $\mu\text{L}$  加入孵育  $\text{CuCl}_2$  后的 HDL 中 (注意避光), 将加好 DCFH-DA 的 HDL 置酶标仪 (Spectra Max, Gemini XS; Molecular Devices) 内读数, 每 30 min 一次, 共 2 h, 检测各组 HDL 的相对荧光强度值 (relative fluorescence units, RFU), 记录数据以供后续分析, 理论上趋炎 HDL 的 RFU 较高。

### 1.5 正常 HDL 和趋炎 HDL 对内皮和一氧化氮合酶依赖的血管舒张功能的影响

采用 C57BL/6 小鼠 (体重约 20 g) 的主动脉。先用苯巴比妥钠作小鼠的腹腔腔内麻醉, 然后提取其主动脉。血管舒张试验的测量如文献所描述<sup>[8]</sup>。所有血管先测量最大血管内径, 然后用去甲肾上腺素 ( $10^{-6}$  mol/L) 作预收缩并测值, 依次用浓度为  $10^{-7} \sim 10^{-4}$  mol/L 的乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 扩张血管以测量在依次增加 Ach 浓度情况下的内皮依赖的血管舒张情况。实验分 3 组, 空白对照组: 不作任何特殊处理; 血浆胆固醇水平正常 HDL (nHDL) 组: 用 nHDL (0.26 mmol/L) 处理血管 30 min; 高胆固醇血症趋炎 HDL (pHDL) 组: 用 pHDL (0.26 mmol/L) 处理血管 30 min。上述 3 组血管处理后均用  $10^{-7} \sim 10^{-4}$  mol/L 的 Ach 扩张血管以测量血管舒张情况, 然后分别用左硝基精氨酸甲 (L-nitroargininemethylester, L-NAME 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处

理血管 30 min,再重复用去甲肾上腺素 ( $10^{-6}$  mol/L)和 Ach 处理血管以了解一氧化氮合酶 (NOS) 依赖的血管舒张功能;最后用硝普钠  $10^{-8} \sim 10^{-4}$  mol/L 处理血管以测量非内皮依赖的血管舒张功能。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 及 Prism 5.0、Graph Pad 软件对数据进行统计分析。受试者计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。所有变量均进行正态性检验。不符合正态分布变量将采取 Mann-Whitney U 秩和检验。变量符合正态分布且方差齐,二组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。变量间采用 Spearson 分析。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血脂水平

高胆固醇血症组血浆 TC、TG、LDLC 水平明显高于健康志愿者组 (*P* < 0.05), HDLC 水平以及年龄、性别比、体重等一般情况与健康志愿者组比较无明显差异 (*P* > 0.05; 表 1)。

表 1. 两组血脂水平比较

Table 1. Comparison of serum lipid levels between hypercholesterolemia patients and healthy subjects

血 脂	健康志愿者组 ( <i>n</i> = 20)	高胆固醇血症组 ( <i>n</i> = 20)	<i>P</i>
TC (mmol/L)	4.67 ± 0.34	6.49 ± 0.76	0.000
TG (mmol/L)	1.27 ± 0.53	3.16 ± 1.85	0.000
LDLC (mmol/L)	2.98 ± 0.40	4.52 ± 0.70	0.000
HDLC (mmol/L)	1.16 ± 0.23	1.28 ± 0.41	0.296

### 2.2 HDL 趋炎性比较

与健康志愿者组的 HDL (RFU: 366.2 ± 84.5) 相比,高胆固醇血症患者的 HDL 趋炎性明显增高 (RFU: 1104.0 ± 182.5, *P* < 0.05)。

### 2.3 正常 HDL 和趋炎 HDL 对内皮依赖的血管舒张功能的影响

用健康志愿者的 HDL (nHDL) 处理 C57BL/6 小鼠主动脉,内皮依赖的血管舒张功能与空白对照组比差异无显著性,提示内皮依赖的血管舒张功能未受损伤。用高胆固醇血症患者的 HDL (pHDL) 处理 C57BL/6 小鼠主动脉,内皮依赖的血管舒张功能明显受到抑制,与健康志愿者组和空白对照组比差异有显著性 (*P* < 0.05; 图 1)。

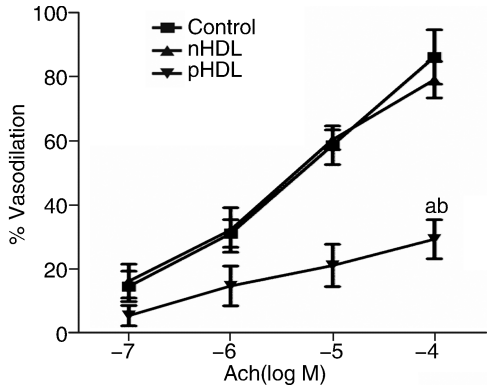


图 1. 正常 HDL 和趋炎 HDL 对内皮依赖的血管舒张功能的影响 (*n* = 10) Control: 空白对照组; nHDL: 健康志愿者的 HDL; pHDL: 高胆固醇血症患者的 HDL。a 为 *P* < 0.05, 与空白对照组比较; b 为 *P* < 0.05, 与 nHDL 比较。

Figure 1. The effect of normal HDL and proinflammatory HDL on endothelium-dependent vasodilation (*n* = 10)

### 2.4 正常 HDL 和趋炎 HDL 对 NOS 依赖的血管舒张功能的影响

用 NOS 抑制剂 L-NAME 处理血管后再按分组要求处理血管,血管舒张功能明显受到抑制,高胆固醇血症组 (趋炎 HDL)、健康志愿者组 (正常 HDL)、空白对照组差异无显著性 (*P* > 0.05),提示趋炎 HDL 对血管舒张功能的影响是 NOS 依赖性的 (图 2)。

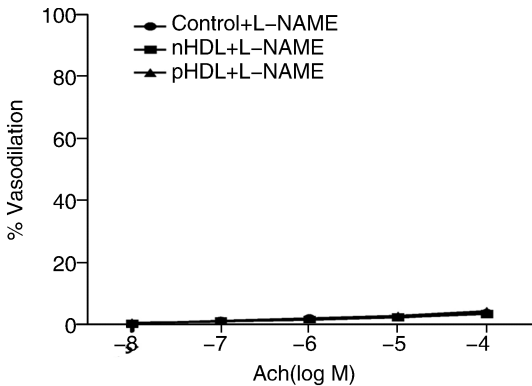


图 2. 正常 HDL 和趋炎 HDL 对 L-NAME 处理后的血管舒张功能的影响 Control: 空白对照组; nHDL: 健康志愿者的 HDL; pHDL: 高胆固醇血症患者的 HDL。

Figure 2. The effect of normal HDL and proinflammatory HDL on vasodilation pretreated with L-NAME

### 2.5 正常 HDL 和趋炎 HDL 对平滑肌依赖的血管舒张功能的影响

先用空白对照组和正常 HDL 以及趋炎 HDL 处理血管,再用硝普钠处理血管,血管舒张功能良好,未受到抑制,三者差异无显著性 (*P* > 0.05)。提示

正常 HDL 和趋炎 HDL 对平滑肌依赖的血管舒张功能无影响(图 3)。

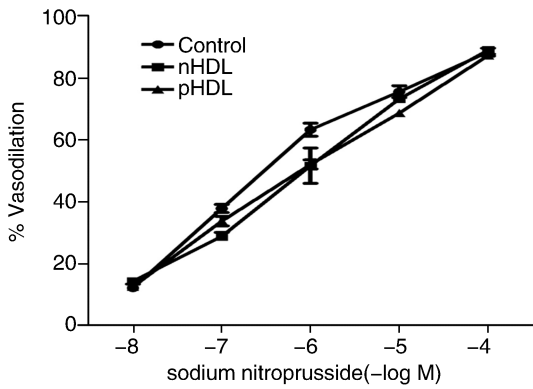


图 3. 正常 HDL 和趋炎 HDL 对平滑肌依赖的血管舒张功能的影响 Control: 空白对照组; nHDL: 健康志愿者的 HDL; pHDL: 高胆固醇血症患者的 HDL。

Figure 3. The effect of normal HDL and proinflammatory HDL on smooth muscle-dependent vasodilation

### 3 讨论

HDL 是由多种蛋白和脂质组成,主要有载脂蛋白、磷脂、非酯化胆固醇等<sup>[10]</sup>。HDL 功能复杂,研究表明 HDL 参与胆固醇的逆向转运,将外周组织中的胆固醇转运至肝脏代谢,以减少血管壁胆固醇的沉积;另外还能促进前列环素、一氧化氮生成,抑制内皮素 1 分泌;此外还具有抗氧化抗炎、维护内皮功能,促进损伤内皮修复对抗动脉粥样硬化<sup>[11-13]</sup>。而在动脉粥样硬化形成的早期,血管内皮功能失调早已存在<sup>[14]</sup>。血管内皮是血管壁与血流之间的屏障,具有选择性通透功能及信息传递功能。它可以产生内皮素 1、血管内皮生长因子、一氧化氮等多种血管活性物质来调节血管的收缩与舒张,从而维持血管张力。因而 HDL 对抗动脉粥样硬化的作用同样反映在其对血管内皮的保护作用。但近年的临床研究显示升高血浆的 HDLC 水平并未能明显降低冠心病的风险<sup>[3-5]</sup>,表明 HDL 的功能,而不仅仅是它的数量至关重要。因此,本研究探讨高胆固醇血症这种重要致动脉粥样硬化因素下的 HDL 的趋炎状态和对血管舒张功能的影响。

从健康志愿者和高胆固醇血症者的一般资料可以看出,两者在年龄、性别、体重、HDLC 水平无明显差异,但后者的 TC、TG、LDLC 水平明显高于健康志愿者。而两者的 HDLC 水平虽然无明显差异,但是与健康志愿者的 HDL 相比,高胆固醇血症患者的

HDL(趋炎 HDL)趋炎性明显增高,提示在血脂紊乱的代谢水平下,HDL 的性质发生了改变。HDL 表面的脂蛋白和脂质含量、密度、大小比例均可能与其功能有关。不同条件下,HDL 中的卵磷脂、脂类、胆固醇以及载脂蛋白均可发生氧化。其氧化可导致 HDL 功能不全,称为失功能的 HDL<sup>[15]</sup>。我们最近发现心脏瓣膜疾病和心脏体外循环手术的急性炎症反应均可修饰 HDL,使其趋炎性增加,功能发生改变<sup>[8]</sup>。因此,我们进一步探讨高胆固醇血症的 HDL 对血管舒张功能的影响。

血管舒张功能的损伤是血管内皮受损的表现,也是动脉粥样硬化性疾病血管损伤的早期表现,是动脉粥样硬化的始动因素。我们发现,正常 HDL 处理的血管,舒张功能未受损害,而高胆固醇血症的 HDL 处理的血管舒张功能明显受抑制,并且是内皮依赖性的。提示高胆固醇血症的 HDL 不能发挥其正常状态下对血管的保护作用。研究还发现,健康志愿者和高胆固醇血症患者的 HDLC 水平都是在正常范围,无明显差异,但是后者的趋炎性明显增加,并且抑制内皮依赖性的血管舒张功能,提示 HDL 对血管的保护作用与血浆中的 HDLC 水平无明显相关,而是与其性质改变相关。在高胆固醇血症状态下,HDL 已经由健康的、正常的抗炎性 HDL 转变为趋炎性的 HDL,这种趋炎状态下的 HDL 不但失去了对血管的保护作用,即失功能 HDL,而且损伤内皮依赖性的血管舒张功能。这与其它研究报道在炎症性疾病、糖尿病、冠心病和慢性肾病等疾病中 HDL 的组分发生改变、结构重构或非正常修饰,引起内皮功能紊乱,令其血管保护功能受损一致<sup>[16-18]</sup>。

综上所述,高胆固醇血症时 HDL 变为趋炎性的 HDL,失去其对血管的保护作用,并损伤内皮依赖性的血管舒张功能,可能是动脉粥样硬化形成的一个重要原因。我们的研究结果提示抑制动脉粥样硬化的形成不但需要降低胆固醇水平,而且需要将趋炎 HDL 改变为正常抗炎 HDL,保护血管功能。因此,趋炎 HDL 是预防动脉粥样硬化形成的治疗新靶标。

#### [参考文献]

- [1] Weissglas-Volkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum hdl-cholesterol[J]. J Lipid Res, 2010, 51 (8): 2 032-057.
- [2] Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, et al. Hdl cholesterol, very low levels of ldl cholesterol, and cardiovascular events



- [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(13): 1 301-310.
- [3] Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, et al. Niacin in patients with low hdl cholesterol levels receiving intensive statin therapy[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(24): 2 255-267.
- [4] Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, et al. Effects of extended-release niacin with laropirant in high-risk patients[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(3): 203-212.
- [5] Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, et al. Effects of dalce-trapib in patients with a recent acute coronary syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(22): 2 089-099.
- [6] Rader DJ, Tall AR. The not-so-simple hdl story: Is it time to revise the hdl cholesterol hypothesis? [J]. *Nat Med*, 2012, 18(9): 1 344-346.
- [7] van Capelleveen JC, Brewer HB, Kastelein JJ, et al. Novel therapies focused on the high-density lipoprotein particle[J]. *Circ Res*, 2014, 114(1): 193-204.
- [8] Chang FJ, Yuan HY, Hu XX, et al. High density lipoprotein from patients with valvular heart disease uncouples endothelial nitric oxide synthase[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 74: 209-219.
- [9] Ou J, Wang J, Xu H, et al. Effects of D-4F on vasodilation and vessel wall thickness in hypercholesterolemic LDL receptor-null and LDLreceptor/apolipoprotein A-I double-knockout mice on Western diet [J]. *Circ Res*, 2005, 97(11): 1 190-197.
- [10] Rizzo M, Otvos J, Nikolic D, et al. Subfractions and subpopulations of hdl: An update [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(25): 2 881-891.
- [11] Gauthamadasa K, Rosales C, Pownall HJ, et al. Specia-ted human high-density lipoprotein protein proximity profiles[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(50): 10 656-665.
- [12] Rosenson RS, Brewer HB, Davidson WS, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: Advancing the concept of reverse cholesterol transport[J]. *Circulation*, 2012, 125(15): 1 905-919.
- [13] Yokoi K, Adachi H, Hirai Y, et al. Plasma endothelin-1 level is a predictor of 10-year mortality in a general population: The tanushimaru study [J]. *Circ J*, 2012, 76(12): 2 779-784.
- [14] Ruggiero D, Paolillo S, Ratta GD, et al. endothelial function as a marker of pre-clinical atherosclerosis: Assessment techniques and clinical implications[J]. *Monaldi Arch Chest Dis*, 2013, 80(3): 106-110.
- [15] 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.
- [16] Kim JB, Hama S, Hough G, et al. Heart failure is associated with impaired anti-inflammatory and antioxidant properties of high-density lipoproteins[J]. *Am J Cardiol*, 2013, 112(11): 1 770-777.
- [17] Stahlman M, Fagerberg B, Adiels M, et al. Dyslipidemia, but not hyperglycemia and insulin resistance, is associated with marked alterations in the hdl lipidome in type 2 diabetic subjects in the diwa cohort: Impact on small hdl particles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(11): 1 609-617.
- [18] Moradi H, Vaziri ND, Kashyap ML, et al. Role of hdl dysfunction in end-stage renal disease: A double-edged sword[J]. *J Ren Nutr*, 2013, 23(3): 203-206.

(此文编辑 许雪梅)