

研究论文

apoE/LDLR 双基因缺失幼龄小鼠主动脉中动脉粥样硬化相关基因的表达

戴学栋¹, 尹苗¹, 荆文¹, 杜会芹¹, 叶红燕¹, 商允菊¹, 张暉¹, 邹艳艳¹, 曲志萍², 潘杰^{1,*}

¹ 山东师范大学生命科学学院, 山东省动物抗性生物学重点实验室, 济南 250014; ² 济南市中心医院医学实验室诊断中心, 济南 250013

摘要: 利用 RT-PCR 以及实时定量 RT-PCR 检测 11 个动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)相关基因在 1、2 和 3 月龄的载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE)/低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)双基因缺失(apoE^{-/-}/LDLR^{-/-})小鼠主动脉中的表达变化, 同时应用血生化指标和病理形态学观察 AS 早期病变特点, 探讨 apoE 和 LDLR 基因联合缺失引发的血脂代谢紊乱和血管炎症损伤的关系以及 AS 的炎症反应机制。结果显示, apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠 IL-1 β 、TLR2、MCP-1、ICAM-1、VCAM-1、GM-CSF、CD36 和 ET-1 表达在 1 月龄时较同龄野生型(wild type, WT)小鼠显著上调($P<0.05$, $P<0.01$), PDGF- α 和 TNF- α 表达在 2 月龄时较同龄 WT 小鼠显著上调, 除 ET-1 表达在 2 月龄时以及 TLR2、VCAM-1 和 ICAM-1 表达在 3 月龄时降至 WT 小鼠水平以外, 其余各基因表达随年龄增长继续升高($P<0.05$, $P<0.01$), 其中 MCP-1 表达在 2 月龄时达到峰值。NF- κ B 在各年龄段 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠中的表达与同龄 WT 小鼠相比均无显著差异。各年龄段 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠血清 TC、TG、LDL、HDL、TNF- α 、IL-1 β 和 ox-LDL 含量均显著高于同龄 WT 小鼠($P<0.05$, $P<0.01$), 并随年龄增长逐渐升高。apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠 1 月龄时主动脉内膜出现少量的散在的脂质沉积, 随着年龄增长病变区域增多, 脂质沉积增厚。上述结果提示: apoE 和 LDLR 双基因缺失形成的高脂血症可能通过刺激主动脉中炎症基因时序表达, 起始并扩大病变部位的炎症反应, 共同促进 AS 的发生发展。

关键词: apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠; 动脉粥样硬化; 主动脉; RT-PCR; 动脉粥样硬化相关基因

中图分类号: Q463; R541.4

Expressions of atherosclerosis-related genes in aorta in young apoE/LDLR double knockout mice

DAI Xue-Dong¹, YIN Miao¹, JING Wen¹, DU Hui-Qin¹, YE Hong-Yan¹, SHANG Yun-Ju¹, ZHANG Liang¹, ZOU Yan-Yan¹, QU Zhi-Ping², PAN Jie^{1,*}

¹The Key Laboratory of Animal Resistant Biology of Shandong Province, College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; ²The Laboratory of Medical Diagnosis of Central Hospital, Jinan 250013, China

Abstract: To systematically clarify the effects of apolipoprotein E (apoE) and low-density lipoprotein receptor (LDLR) gene mutant on hyperlipidemia, vascular inflammation impairment and pathogenesis of atherosclerosis (AS), total RNA was isolated from fresh aortas of young apoE/LDLR double knockout (apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}) and wild type (WT) mice using TRIzol reagent. Then RNA was reversely transcribed to first-strand cDNA by reverse transcriptase for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time RT-PCR. Primer pairs were designed using primer design software according to the gene sequences available in GenBank. β -actin was used as an internal control. Then RT-PCR assay was used to analyze the expression patterns of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), nuclear factor- κ B (NF- κ B), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), CD36, endothelin-1 (ET-1), toll-like receptor 2 (TLR2), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and platelet-derived growth factor- α (PDGF- α). SYBR Green quantitative real-time RT-PCR was used

Received 2007-06-25 Accepted 2007-10-11

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571024).

*Corresponding author. Tel: +86-531-87771188; E-mail: jiepan@sdu.edu.cn

to validate gene expressions identified by RT-PCR. Blood samples were taken from the retro-orbital venous plexus, and serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) were measured by using biochemical techniques. Serum concentrations of circulating TNF- α , IL-1 β and oxidized LDL (ox-LDL) were determined by ELISA. Frozen sections of aortic sinus were stained with Sudan IV to visualize intimal fatty lesions. The results showed that the relative expressions of IL-1 β , GM-CSF, ET-1, TLR2, CD36, MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1 in apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice at the age of 1 month were higher than those in age-matched WT mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$), respectively. The expressions of PDGF- α and TNF- α in apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice at the age of 2 months were up-regulated compared to those in age-matched WT mice ($P < 0.05$). All the expressions of target genes continued to be up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$) except that ET-1 expression at the age of 2 months, TLR2, VCAM-1 and ICAM-1 expressions at the age of 3 months were down-regulated to that in WT mice. NF- κ B expression had no significant changes between two genotype mice at different ages. All the gene expressions kept unchanged in WT mice at different ages, except that IL-1 β expressions were slightly up-regulated at the ages of 2 and 3 months. Serum levels of TC, TG, LDL, HDL, TNF- α , IL-1 β and ox-LDL in apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice at different ages were higher than those in age-matched WT mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and were increasing with age. Primary atherosclerotic lesions were observed in 1-month old apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice and were progressing with age. There were no lesions observed in all WT mice at different ages. The data suggest that hyperlipidemia due to apoE and LDLR gene mutant may stimulate the temporal expressions of AS-related genes and contribute to primary atherogenetic lesions and vascular inflammation impairment.

Key words: apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice; atherosclerosis; aorta; RT-PCR; atherosclerosis-related genes

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种多因素疾病,受多种遗传因素和外界因素的影响。目前普遍认为,是由血脂代谢异常和其它因素引发的一种慢性炎症性疾病^[1,2,5],它涉及多种细胞类型如内皮细胞、平滑肌细胞、单核/巨噬细胞、T/B淋巴细胞、树突状细胞以及肥大细胞;多种生物学过程参与如脂类代谢、细胞粘连、应激反应、细胞增殖和凋亡以及血液凝集,在每一生物学过程中又涉及多种AS相关基因参与和调控^[1,2,6-18]。载脂蛋白E (apolipoprotein E, apoE)作为极低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)、乳糜微粒(chylomicrons, CM)和高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)的主要成分,参与胆固醇的逆向转运,通过低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)途径和非LDLR途径发挥清除血脂的作用,降低血浆中的胆固醇浓度。apoE缺失的人和小鼠,由于apoE依赖的LDLR途径和非LDLR途径受阻,导致总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)和VLDL含量升高。LDLR作为血浆中重要的TC运输蛋白,通过与载脂蛋白B(apolipoprotein B, apoB)和apoE结合,介导LDL和VLDL的清除,起调节TC浓度的作用。LDLR缺失小鼠,由于其与中间密度脂蛋白(intermediate-density lipoproteins, IDL)和LDL结合受限,大量IDL转化为LDL,导致IDL、LDL和CM增加,TC含量中度升高^[3,4]。apoE/LDLR双基因缺失(apoE^{-/-}/LDLR^{-/-})小鼠由于apoE及其主要受体途径受阻,表现出显著

的高脂血症和AS病变,TC、甘油三酯(triglyceride, TG)和LDL水平及AS病变程度均高于apoE和LDLR单缺失小鼠^[4]。基因功能异常是疾病发生的重要原因,但目前对apoE和LDLR基因缺失与AS的研究多集中于血脂代谢方面,与血管炎症损伤的关系以及AS发病的炎症反应机制仍不完全明确,尤其在AS早期,apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}引发的脂代谢紊乱与血管炎症损伤的关系以及AS的可能发病机制仍待进一步研究。本实验以apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠为模型,利用RT-PCR以及实时定量RT-PCR技术检测主动脉中与AS相关的11个重要基因在1、2、3月龄与同龄野生型(wild type, WT)小鼠的表达差异,旨在进一步分析apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}引发的高脂血症与血管炎症损伤的关系,探讨AS发病的炎症反应机制。

1 材料与方法

1.1 小鼠基因型鉴定及分组 选用1、2和3月龄的雄性apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠及具有相同遗传背景的WT小鼠作为研究对象。apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠购自美国Jackson实验室,WT小鼠购自上海伊莱克动物实验中心。小鼠于山东师范大学生命科学学院SPF级小鼠房饲养、繁殖。小鼠出生后第22天停止哺乳,剪取小鼠尾巴,提取DNA,参照Jackson实验室提供的鉴定方法,采用PCR技术确定apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠基因型,并喂以普通饲料(含4%脂肪和0.07%胆固醇)。分别于不同年龄段禁食10 h后解剖小鼠用于实验。

1.2 RT-PCR 分析 分别取 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 和 WT 各年龄段小鼠主动脉($n=10$), 加入 TRIzol (BioFlux 公司)试剂, 抽提总 RNA, 采用紫外分光光度计测定其浓度。取 1 μ g 总 RNA, 以 Oligo(dT)(TaKaRa 公司)为引物进行逆转录反应。参照 GenBank 中靶基因 mRNA 序列设计引物(表 1)。在最佳条件下进行靶基因和内参 β -actin 的 PCR 扩增后, 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。应用 IPP 软件分析电泳条带灰度值, 以目的基因与 β -actin 电泳条带密度比值计算靶基因 mRNA 相对表达量, 然后比较 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠与同龄 WT 小鼠相对表达量。

1.3 实时定量 RT-PCR 验证 分别取 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 和 WT 型 1 和 3 月龄小鼠主动脉, 按照上述方法抽取总 RNA, 并进行逆转录反应。参照 GenBank 中靶基因 mRNA 的序列设计引物, 血管黏附分子(vascular adhesion molecule-1, VCAM-1)上游 5'-GAACCCAAACAGAGGCAGAG-3', 下游 5'-GGTATCCCATCACTTGAGCAG-3'; 细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)上游 5'-CGCTGTGCTTTGAGAACTGT-3', 下游 5'-GGTGAGGTCCTTGCCTACTT-3'; β -actin 上游 5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3', 下游 5'-GTACTCCTGCTTGCTGATCC-3'; 针对目的基因和内参 β -actin, 选择一确定表达该基因的 cDNA 模板进行 PCR 反应, 并将 PCR 产物梯度稀释作为标准

品, 与适当浓度的待测样品 cDNA 1 μ L, 加入上下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L), SYBER Green I mixture (Molecular Probes 公司) 12.5 μ L, 无菌双蒸水补齐至 25 μ L, 于 Rotor-Gene 3000 Real-time PCR 仪中进行反应。在每个循环结束前系统会自动检测荧光产物的量。为建立 PCR 产物的熔解曲线, 扩增反应结束后继续从 72 $^{\circ}$ C 缓慢加热到 99 $^{\circ}$ C (每 5 s 升高 1 $^{\circ}$ C), 熔解曲线峰值单一性判断扩增特异性。将不同浓度标准品的模板量的对数和相应的 Ct 值绘制标准曲线, 根据标准曲线计算待测样品的拷贝数。以目的基因拷贝数与 β -actin 基因拷贝数比值计算目的基因 mRNA 相对表达量, 然后比较 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠与同龄 WT 小鼠相对表达量。

1.4 血生化指标检测 取各年龄段小鼠静脉血($n=10$), 离心分离血清, 采用 COD-PAP, GPO-PAP 酶学法^[4], 应用 Bayer ADVIA-2400 型自动生化分析仪分别测定血清 TC、TG、LDL 和 HDL 含量。血清肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)及氧化型 LDL (oxidized LDL, ox-LDL)含量均采用双抗夹心 ELISA 法测定, 试剂盒均为美国 RapidBio 公司产品, 具体操作严格按照说明书进行。

1.5 主动脉形态学观察 分别取上述两基因型的 1、2、3 月龄小鼠主动脉根部($n=10$), 4% 甲醛水溶液固定, 制备主动脉根部轮状冰冻切片, 苏

表 1. RT-PCR 基因表达分析所用引物序列

Table 1. Primers for RT-PCR analysis

GenBank accession	Gene	Forward primer	Reverse primer
NM_008361.2	IL-1 β	5'-TGACCTGGGCTGTCCAGATG-3'	5'-CTGTCCATTGAGGTGGAGAG-3'
NM_013693.1	TNF- α	5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'
NM_00764 3.2	CD36	5'-GAGCCATCTTTGAGCCTTCA-3'	5'-TCAGATCCGAACACAGCGTA-3'
MUSNFKP65	NF- κ B	5'-GGTCCCTTCCTCAGCCATGG-3'	5'-GAGCAGGGTCGCTGTCAGCAC-3'
NM_011905.2	TLR2	5'-CAGCTTAAAGGGCGGGTCAGAG-3'	5'-TGGAGACGCCAGCTCTGGCTCA-3'
NM_010104.2	ET-1	5'-GCTGTTCGTGACTTTCCA-3'	5'-GTGGCAGAAGTAGACACA-3'
NM_009970.1	GM-CSF	5'-GAGGTCACAAGGTCAAGGTG-3'	5'-GATTGACAGTGGCAGGCTTC-3'
NM011333	MCP-1	5'-ACTGAAGCCAGCTCTCTCTTCCTC-3'	5'-TTCCTTCTTGGGTCAGCACAGAC-3'
NM_008808	PDGF- α	5'-CCTGTGCCCATTGCGAGGAA-3'	5'-TTGGCCACCTTGACACTGCG-3'
NM_011693.2	VCAM-1	5'-CCCAAGGATCCAGAGATTCA-3'	5'-TAAGGTGAGGATGGCATTTC-3'
NM_010493.2	ICAM-1	5'-GGGACCACGGAGCCAAT-3'	5'-GCTTTGGGATGGTAGCTGGAA-3'
NM_007393.1	β -actin	5'-TGCTGTCCCTGTAGTCCTCT-3'	5'-AGGTCTTTACGGATGTCAACG-3'

IL-1 β , interleukin-1 β ; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; NF- κ B, nuclear factor- κ B; TLR2, toll-like receptor 2; ET-1, endothelin-1; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; PDGF- α , platelet-derived growth factor- α ; VCAM-1, vascular adhesion molecule-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1.

丹 IV 染色, 亮绿复染, 光学显微镜观察、拍照。

1.6 统计学分析 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, SPSS 10.0 统计软件分析, 各组间平均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定结果

apoE 基因型鉴定: 纯合子(-/-)小鼠 PCR 扩增产物片段大小为 255 bp, WT(+/-)小鼠扩增产物片段大小为 155 bp (图 1A)。LDLR 基因型鉴定: 纯合子(-/-)小鼠 PCR 扩增产物片段大小为 800 bp, WT(+/-)小鼠扩增产物片段大小为 400 bp (图 1B)。所有实验小鼠均进行基因型鉴定, 确定为 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠或 WT 小鼠。

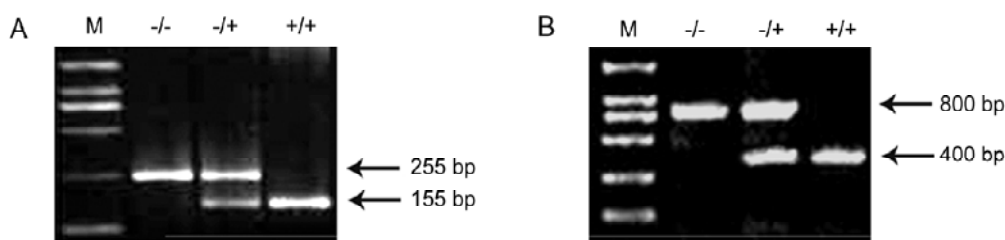


图 1. 小鼠基因型鉴定

Fig. 1. Multiplex PCR-based genotyping of mice. A: apoE genotyping. B: LDLR genotyping. -/-, homozygous; +/-, heterozygous; +/+, wild type; M, DNA marker.

高($P < 0.05$), IL-1 β 、GM-CSF 和 CD36 表达与 2 月龄小鼠相比变化不大, MCP-1 表达较 2 月龄小鼠略有下降, TLR2、VCAM-1 和 ICAM-1 表达降至 WT 小鼠水平。核转录因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)在各年龄段 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠中的表达与同龄 WT 小鼠相比均无显著差异。WT 小鼠中, 除 IL-1 β 表达在 2、3 月龄小鼠较 1 月龄小鼠轻微上调外, 其余基因表达在各年龄段小鼠之间均无显著变化(图 2)。

2.3 实时定量 RT-PCR 验证

1 月龄 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 相对表达量为 $3.71\text{E-}03$ 和 $1.46\text{E-}03$, 分别较同龄 WT 小鼠($6.94\text{E-}04$ 和 $1.43\text{E-}04$)高约 5 倍和 10 倍; 3 月龄 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠 ICAM-1 和 VCAM-1 表达量分别下降至 $2.34\text{E-}03$ 和 $3.18\text{E-}04$, 与同龄 WT 小鼠($1.88\text{E-}03$ 和 $3.42\text{E-}04$)比较变化不大。实时定

2.2 RT-PCR 半定量分析 AS 相关基因表达

1 月龄 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠 IL-1 β 、Toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, TLR2)、单核趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、ICAM-1、VCAM-1、粒细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、CD36 和内皮素 1 (endothelin-1, ET-1)表达均较同龄 WT 小鼠显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。2 月龄 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠 IL-1 β 、TLR2、MCP-1、血小板衍生生长因子 α (platelet-derived growth factor- α , PDGF- α)和 TNF- α 表达继续升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), GM-CSF 和 CD36 表达与 1 月龄小鼠相比无明显差异, 而 ET-1 表达降至 WT 小鼠水平。3 月龄 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠 PDGF- α 、TNF- α 表达继续升

量 RT-PCR 结果与半定量 RT-PCR 结果基本吻合。

2.4 血生化指标检测

各年龄段 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠 TC、TG、LDL、HDL、TNF- α 、IL-1 β 和 ox-LDL 含量明显高于同龄 WT 小鼠($P < 0.05$, $P < 0.01$), 除 ox-LDL 外均随年龄增长持续上升, 在 3 月龄时达到最高, TC 和 LDL 含量分别比 WT 小鼠升高约 6 倍和 40 倍($P < 0.01$), TG, HDL, TNF- α 、IL-1 β 及 ox-LDL 含量较同龄 WT 小鼠高出 2~3 倍($P < 0.05$, $P < 0.01$)(表 2)。

2.5 主动脉根部内膜形态学观察

apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠 1 月龄时主动脉内膜可观察到散在的轻微的脂质沉积病变(图 3A、D, 箭头所指区域); 在 2 和 3 月龄时病变区域增多, 病变加重(图 3B、C、E、F, 箭头所指区域)。WT 小鼠在各年龄段均未观察到明显的苏丹 IV 阳性染色区(图 3G~I)。

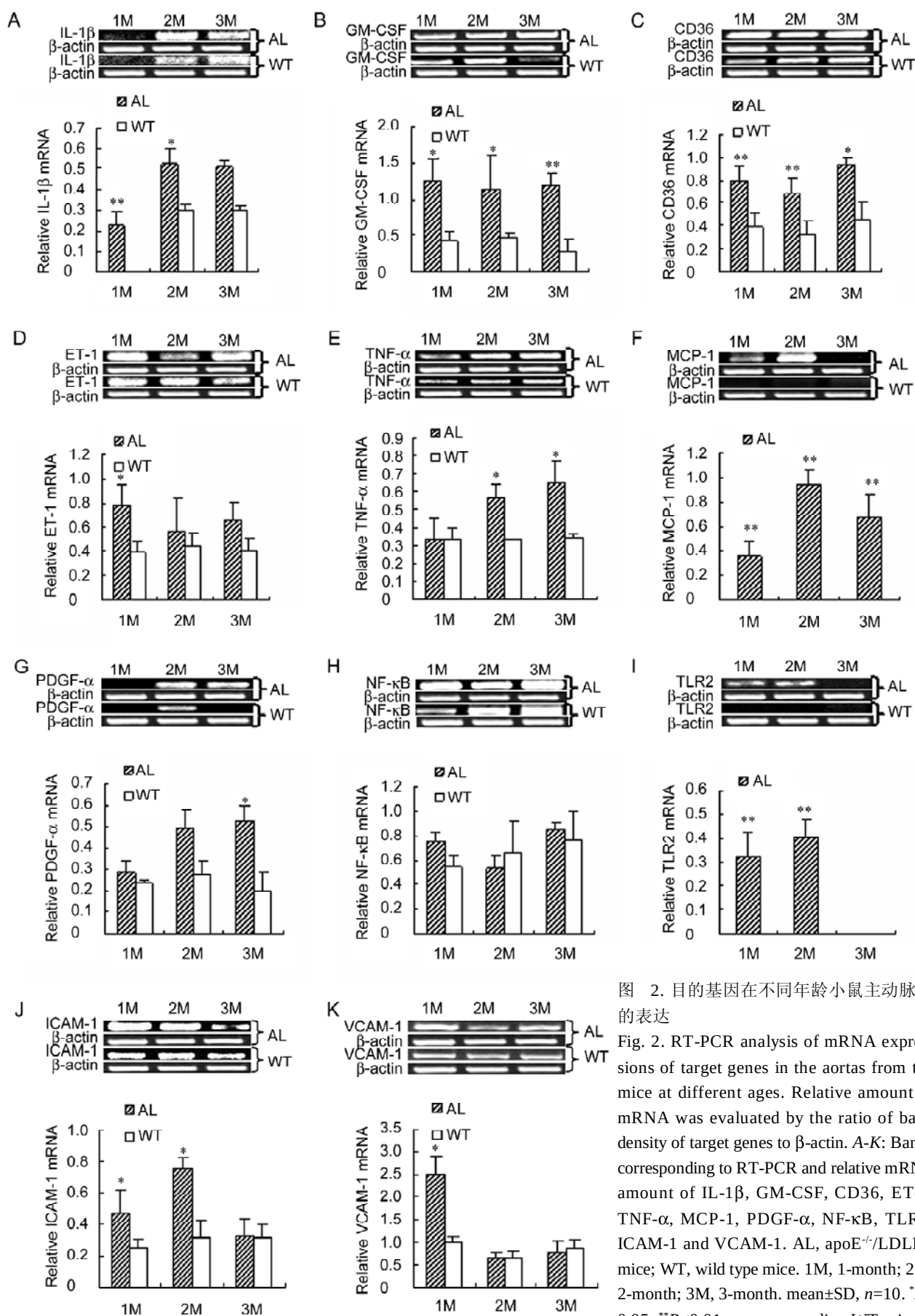


图 2. 目的基因在不同年龄小鼠主动脉中的表达

Fig. 2. RT-PCR analysis of mRNA expressions of target genes in the aortas from the mice at different ages. Relative amount of mRNA was evaluated by the ratio of band density of target genes to β -actin. A-K: Bands corresponding to RT-PCR and relative mRNA amount of IL-1 β , GM-CSF, CD36, ET-1, TNF- α , MCP-1, PDGF- α , NF- κ B, TLR2, ICAM-1 and VCAM-1. AL, apoE $^{-/-}$ /LDLR $^{-/-}$ mice; WT, wild type mice. 1M, 1-month; 2M, 2-month; 3M, 3-month. mean $\pm$ SD, $n=10$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs corresponding WT mice.

表2. 小鼠血清生化指标

Table 2. Serum biochemical parameters in apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} and WT mice

	1-month		2-month		3-month	
	apoE ^{-/-} /LDLR ^{-/-}	WT	apoE ^{-/-} /LDLR ^{-/-}	WT	apoE ^{-/-} /LDLR ^{-/-}	WT
TC (mmol/L)	14.35±0.50**	2.02±0.22	16.0±2.40**	2.07±0.25	16.37±0.52**	2.80±0.23
TG (mmol/L)	1.91±0.36**	0.71±0.08	2.35±0.57**	0.86±0.14	2.57±0.30*	1.36±0.59
LDL (mmol/L)	10.20±0.54**	0.45±0.07	10.50±0.21**	0.30±0.08	11.24±0.76**	0.31±0.06
HDL (mmol/L)	6.15±0.39**	1.56±0.29	6.75±1.81**	1.80±0.35	7.32±0.25**	2.41±0.21
TNF-α (pg/mL)	8.79±2.38	4.25±0.55	14.58±2.84*	5.69±1.12	17.80±1.36*	7.75±1.80
IL-1β (pg/mL)	20.31±3.54	14.54±1.74	25.41±2.70**	15.08±1.18	43.60±7.06*	16.13±1.24
ox-LDL (mg/L)	12.88±0.18**	5.25±0.77	11.99±0.87*	6.36±0.26	11.86±2.05*	6.35±0.43

P*<0.05, *P*<0.01 vs age-matched WT mice. TC, total cholesterol; TG, triglyceride; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; TNF-α, tumor necrosis factor-α; IL-1β, interleukin-1β; ox-LDL, oxidized LDL.

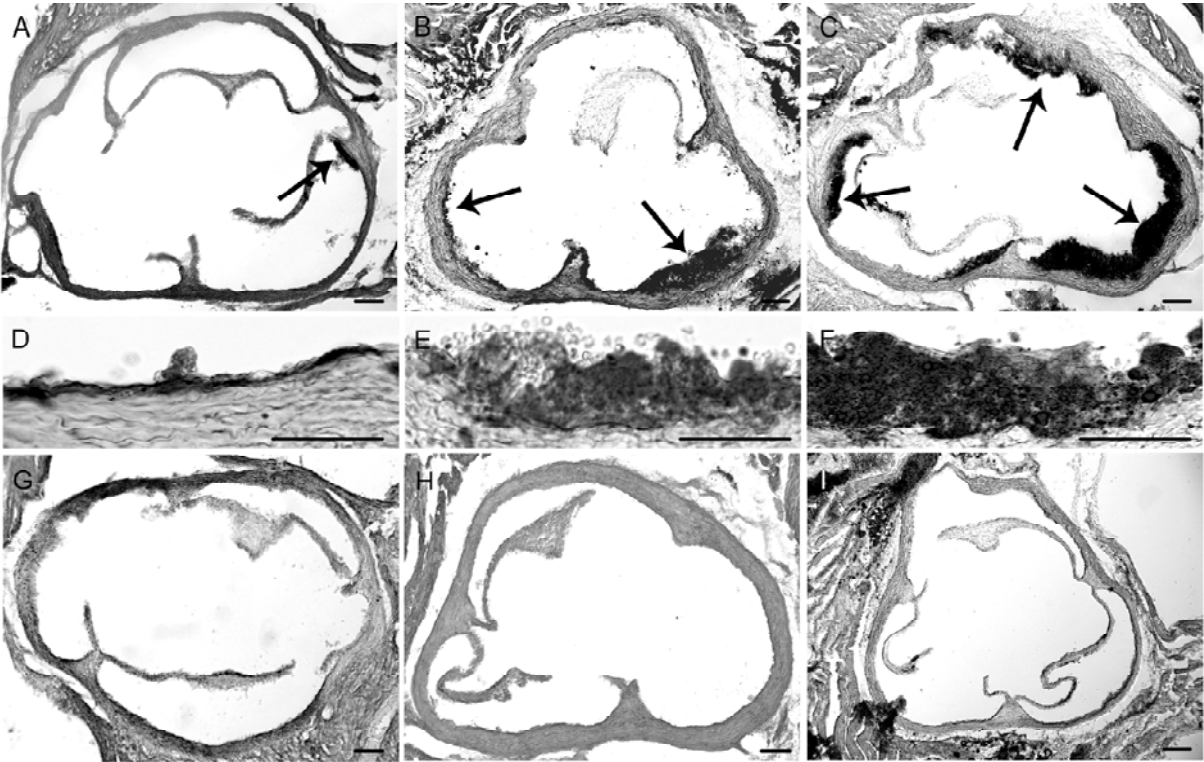


图 3. 不同年龄小鼠主动脉根部内膜形态(苏丹 IV 染色)

Fig. 3. Representative microphotographs of Sudan IV-stained aortic sinus in mice at different ages. A and D: 1-month old apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice. B and E: 2-month old apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice. C and F: 3-month old apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice. G-I: WT mice at ages of 1, 2 and 3 months. There were obvious primary atherosclerotic lesions in apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice at the age of 1 month, which were progressing with age. There were no lesions in WT mice at different ages. Scale bar, 50 μm.

3 讨论

目前认为AS是由血脂代谢紊乱等多种因素所引发的一种慢性炎症性疾病，高脂血症导致的内皮细胞损伤及功能障碍是导致AS的始发事件。把培养的人脐静脉内皮细胞与高脂血清孵育24 h后，发现内皮细胞超微结构明显受损，且细胞表面ICAM-1

表达明显增加，细胞培养液中NO含量明显减少。apoE作为VLDL、CM和HDL的主要成分，在脂类代谢中发挥重要作用。apoE参与胆固醇的逆向转运，将胆固醇从肝外组织转移至肝脏，通过LDLR途径和非LDLR途径发挥清除血脂的作用。LDLR是肝细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和单核/巨噬细胞

表面的糖蛋白,是血浆中重要的TC运输蛋白,通过与apoB和apoE结合,介导LDL和VLDL的内吞清除,起调节TC含量的作用。apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠表现出显著的高脂血症和AS病变^[3,4]。在本实验中,我们也发现apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠1月龄时血清TC、TG和LDL含量显著升高,主动脉内膜出现散在的脂质沉积,与他人报道^[4]一致。血管内皮细胞的主要功能是屏障作用,同时合成和分泌多种血管活性物质,在血管的自身稳态调节中起重要的作用。在人和动物中均发现,脂代谢紊乱尤其是LDL含量急剧升高可能导致内皮下间隙LDL的氧化作用及其它修饰作用增强^[6,7]。氧化LDL过程中形成的溶血磷脂酸可与内皮细胞膜上相应的G蛋白耦联受体结合,导致内皮细胞骨架纤维收缩和细胞间通道形成^[8],内皮通透性增加,循环中的LDL更容易透过内皮沉积于内皮下间隙,产生更多的ox-LDL。ox-LDL通过降低NO合成、促进ET-1表达破坏血管舒缩功能的稳定,从而引起内皮损伤^[9]。ox-LDL还可以刺激内皮细胞分泌MCP-1、ICAM-1、VCAM-1以及E、P-选择素等,从而使单核/巨噬细胞被募集、渗透进入病灶区的内膜^[1,2,6-8,10]。浸润的巨噬细胞通过清道夫受体CD36、SR-A识别并结合ox-LDL,将胆固醇吞噬入胞内,形成泡沫细胞^[6-8,11]。在本实验中,我们也发现apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠1月龄时其血清ox-LDL含量显著升高,同时主动脉中MCP-1、ICAM-1、VCAM-1、GM-CSF、CD36以及ET-1表达较同龄WT小鼠显著升高。MCP-1、ICAM-1以及VCAM-1能诱导单核/巨噬细胞募集和内皮下的渗透,GM-CSF选择性调节单核巨噬细胞,刺激巨噬细胞增殖^[12],清道夫受体CD36则在胆固醇的摄取、泡沫细胞的形成过程中发挥重要作用。ET-1/NO是由内皮细胞分泌产生的一对重要的血管活性物质,ET-1具有强烈的血管收缩功能和促进平滑肌细胞增殖作用,NO则相反,两者相互制约、相互影响,共同维持血管舒缩功能的稳定。这提示血清LDL含量升高尤其是ox-LDL含量升高,可能通过诱导ET-1/NO平衡失调而破坏血管舒缩功能的稳定,从而引起内皮损伤,并进一步刺激内皮细胞分泌MCP-1、ICAM-1、VCAM-1,使单核/巨噬细胞被募集、渗透进入病灶区的内膜,浸润的巨噬细胞再通过其表面的清道夫受体CD36识别并结合ox-LDL,将胆固醇吞噬入胞内形成泡沫细胞,形成早期AS病变。

NF- κ B广泛存在于真核生物中,是一个由复杂的多肽亚单位组成的蛋白家族,它作为信号转导途径的枢纽,在许多免疫和炎症反应调节中起重要作用。TNF- α 、IL-1、血管紧张素II、ox-LDL、细菌感染以及氧自由基等均可激活NF- κ B,诱导参与调控MCP、多种细胞黏附分子(VCAM-1、ICAM-1、E、P-选择素)、GM-CSF和组织因子等多种细胞因子的表达,在AS的发生发展中发挥重要的作用^[1,6,10,13,14]。在本研究中,NF- κ B下游基因明显被激活,但NF- κ B mRNA的表达在两基因型小鼠主动脉中并无显著差异,我们推测这可能是由于NF- κ B的激活发生在翻译后水平,在转录水平上其表达可能变化不大。具体机制还有待进一步研究。TLRs是存在于细胞膜上的一类跨膜受体,它不仅可以被脂多糖和聚糖等外源性配体识别激活,也可被在细胞发生应激或损伤时产生的内源性配体热休克蛋白、纤连蛋白的EDA和透明质酸等激活^[14]。TLRs通过激活NF- κ B传递跨膜信号,介导先天免疫及慢性炎症反应^[1,14]。在本实验中,我们发现1和2月龄apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠TLR2表达上调,而同期WT小鼠却仅有微量表达,这可能是由内皮细胞损伤后产生的内源性配体识别激活造成的。这也提示TLR2在内皮损伤介导的慢性炎症反应中起重要的起始作用。IL-1 β 是由免疫细胞分泌的促炎细胞因子,是心血管疾病的危险指标,在高胆固醇血症病人血清中IL-1 β 含量明显升高^[15]。本研究中,各年龄段的apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠血清IL-1 β 含量和主动脉中的mRNA表达均显著高于同期WT小鼠,有可能是早期升高的IL-1 β 激活NF- κ B信号通路,诱导IL-1 β 及其它促炎因子表达,诱导表达的IL-1 β 又进一步激活NF- κ B信号通路^[1,15],这种正性调节进一步加重了AS的炎症反应。提示早期IL-1 β 表达上调在AS的发生发展过程中起到了起始和扩大炎症反应的作用。TNF- α 是由平滑肌细胞、巨噬细胞等分泌的促炎细胞因子。TNF- α 含量升高与复发性心肌梗死、动脉内膜增厚及TG和糖类在体内失调有关^[16]。LDL可诱导内皮细胞表达TNF- α ^[17]。本实验中,apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠血清TNF- α 含量及主动脉mRNA表达在2和3月龄时明显升高。我们推测TNF- α 表达升高与NF- κ B信号通路激活有关。一方面IL-1 β 、TLR2以及其它因素诱导的NF- κ B信号通路的激活诱导TNF- α 表达上调^[1,6-8,13,14],另一方面诱导表达的TNF- α 又反过来激活NF- κ B,起扩大炎症反应

的作用。本实验中, 2 和 3 月龄 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠 TNF- α mRNA 表达以及血清 TNF- α 含量较 1 月龄升高, 主动脉根部内膜病变逐渐加重, 提示 TNF- α 有可能通过激活 NF- κ B 信号通路, 诱导促炎因子表达, 扩大病变部位的炎症反应, 起加速 AS 病变的作用。PDGF 是一种重要的促细胞分裂剂, 可刺激多种细胞分裂和增殖, 如成纤维细胞、平滑肌细胞。损伤的内皮细胞、激活的血小板、移行于内皮下的单核巨噬细胞以及表型转化后的合成型平滑肌细胞都能以自分泌或者旁分泌形式释放大量的 PDGF, 并与相应的细胞膜受体结合, 促进内皮细胞、纤维母细胞以及血管平滑肌细胞生长和增殖, 促进平滑肌细胞迁移。在本实验中, 我们发现 3 月龄 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠主动脉 PDGF- α 表达较同期 WT 小鼠显著上调, 这可能是由于内皮损伤、平滑肌细胞转型后 NF- κ B 被激活从而诱导 PDGF- α 表达升高^[18]。我们推测 PDGF- α 的上调可能与平滑肌细胞的活化和迁移有一定的关联。

本实验主要利用 RT-PCR 技术分析了不同年龄段 apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 小鼠主动脉中与 AS 相关的 11 个重要基因的表达变化, 展示了这些基因在 AS 发生发展过程中动态的时序表达变化特点, 同时观察了主动脉病变、血脂含量和血清中细胞因子变化的特点。发现血脂代谢和血管的炎症反应有着密切的关联, apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} 所引发的高脂血症可能通过刺激主动脉中炎症基因时序表达, 起始并扩大病变部位的炎症反应, 进而加重 AS 病变。脂代谢紊乱和血管的炎症反应之间可能相互联系, 共同促进 AS 的发生发展。

参考文献

- Alain T, Ziad M. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; 86: 515-581.
- Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
- Ishibashi S, Herz J, Maeda N. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in “knockout” mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4431-4435.
- Sun WX (孙文夏), Shi YP, Jin XL, Li JH, Lin HB, Chen HM, Pan J. The characteristics of atherosclerotic early lesion in treble lipid metabolism genes mutant mouse. *Chin J Cardiol (中华心血管病杂志)* 2004; 32 (11): 1009-1012 (Chinese, English abstract).
- Wang BH (王保华), Ouyang JP, Liu YM, Wei L, Yang JW. Protective effect of angelica on ECV₃₀₄ from injury induced by hyperlipidemic serum *in vitro*. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2001; 53(3): 240-243 (Chinese, English abstract).
- Eiji M, Kazuhiro K, Masako T, Luis R. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 2006; 45: 466-486.
- Stocker R, John F, Keaney J. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381-1478.
- Navab M. The oxidation hypothesis of atherogenesis: The role of oxidized phospholipids. *J Lipid Res* 2004; 45: 993-1007.
- Maemura K, Kurihara H, Morita T. Production of endothelin-1 in vascular endothelial cells is regulated by factors associated with vascular injury. *Gerontology* 1998; 38: 27-33.
- Quehenberger O. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2005; 46: 1582-1590.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein R. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001; 108: 785-791.
- Michael D, Ban-Hock T, Alex B. GM-CSF deficiency reduces macrophage PPAR- γ expression and aggravates atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2337-2344.
- Menno P, Edwin K, Georg K, Marten H. Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 904-914.
- Schoneveld A, Nijhuis M, Middelaars B, Laman J, Kleijn D, Pasterkamp G. Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 162-169.
- Ferroni P, Martini F, Cardarelli CM, Gazzaniga PP, Davi G, Basili S. Enhanced interleukin-1 β in hypercholesterolemia: effects of simvastatin and low-dose aspirin. *Circulation* 2003; 108: 1673-1675.
- Ridker P, Rifai N, Pfeffer M. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101: 2149-2153.
- Niemann JA, Dimayuga P, Jovinge S. Accumulation of LDL in rat arteries is associated with activation of tumor necrosis factor- α expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2205-2211.
- Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R. The transcription factor NF- κ B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 83-88.