

研究论文

利用代谢组学研究血流剪切力对内皮细胞类二十烷酸代谢产物的影响

赵银娇^{1,2}, 刘乐^{1,2}, 姚柳^{1,2}, 朱毅^{1,2}, 张栩^{1,2,*}

天津医科大学¹基础医学院生理学与病理生理学系; ²代谢性心血管病重点实验室, 天津 300070

摘要: 本文旨在研究血流剪切力对内皮细胞多不饱和脂肪酸产生的类二十烷酸代谢产物的影响, 以阐明不同模式的血流剪切力对内皮细胞功能的影响及机制。首先, 分别给予人脐静脉内皮细胞对照静止(Static)、层流型剪切力(laminar shear stress, LSS)、振荡型剪切力(oscillatory shear stress, OSS)处理6 h后, 用新鲜的M199培养液孵育内皮细胞3 h, 利用超高效液相色谱-质谱联用技术检测孵育培养液中内皮细胞分泌的类二十烷酸代谢产物的水平。结果显示: 在不同的血流剪切力作用下, 类二十烷酸代谢的水平有显著改变。我们筛选出OSS组相对于LSS组显著上调的10种代谢物, 包括由环氧合酶产生的代谢产物PGD2、PGE2、PGF2 α 以及PGJ2, 由脂氧合酶或自发氧化作用产生的11-HETE、15-HETE、13-HDoHE, 以及由细胞色素P450氧化酶和可溶性环氧化物水解酶产生的12,13-EpOME、9,10-EpOME、9,10-DiHOME, 并从离体和 *in vivo* 水平验证了类二十烷酸代谢酶mRNA表达水平升高。以上结果表明OSS可能通过上调代谢酶基因的转录水平促进类二十烷酸代谢产物的升高, 从而在动脉粥样硬化发生与发展中起关键作用。本研究利用代谢组学技术从整体上研究了类二十烷酸代谢产物对血流剪切力的响应, 为血流动力学的系统生物学研究做出了重要的补充。

关键词: 血流剪切力; 类二十烷酸; 内皮细胞; 代谢组学; 动脉粥样硬化

中图分类号: R33

Effect of shear stress on eicosanoid metabolism in endothelial cells by metabolomic approach

ZHAO Yin-Jiao^{1,2}, LIU Le^{1,2}, YAO Liu^{1,2}, ZHU Yi^{1,2}, ZHANG Xu^{1,2,*}

¹Department of Physiology and Pathophysiology; ²Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: The article aims to study the effect and mechanism of shear stress on eicosanoids produced by the metabolism of polyunsaturated fatty acids in endothelial cells. First, human umbilical vein endothelial cells were treated by control (Static), laminar shear stress (LSS) and oscillatory shear stress (OSS) for 6 h. Then the endothelial cells were incubated with fresh M199 medium for 3 h, and the cell culture medium was collected. Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometer was used to detect the level of eicosanoid metabolites secreted by endothelial cells. The results showed that under different shear stress, the level of eicosanoid metabolites were changed significantly. We found 10 metabolites were significantly up-regulated by OSS compared with those in LSS group, including PGD2, PGE2, PGF2 α and PGJ2 produced by cyclooxygenase; 11-HETE, 15-HETE, 13-HDoHE produced by lipoxygenase or spontaneous oxidation; 12,13-EpOME, 9,10-EpOME, 9,10-DiHOME produced by cytochrome P450 oxidase and soluble epoxide hydrolase. The transcription levels of these up-regulated eicosanoids metabolic enzyme-related genes were also increased *in vitro* and *in vivo*. These results indicate that OSS may promote the increase of metabolites by up-regulating the transcription level of metabolic enzyme-related genes, which playing a key role in the development of atherosclerosis. This study reveals the effect of shear

Received 2021-03-29 Accepted 2021-05-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 91939302, 82070305) and the Natural Science Foundation of Tianjin, China (No. 19JCQNJC10100).

*Corresponding author. Tel: +86-22-83336591; E-mail: xuzhang@tmu.edu.cn

stress on eicosanoid metabolism in endothelial cells, which provides a novel supplement to the systems biology approach to study systemic hemodynamics.

Key words: shear stress; eicosanoids; endothelial cells; metabolomics; atherosclerosis

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种慢性代谢性疾病, 是心肌梗死和脑中风的主要原因^[1]。AS 斑块易发于动脉开口、分叉和弯曲的部位, 这一规律与该部位的解剖学和血流动力学特点有关^[2]。在血管的直部, 层流型剪切力 (laminar shear stress, LSS, 12 dyn/cm^2) 具有内皮保护作用, 而在血管分叉和弯曲部位的振荡型剪切力 [oscillatory shear stress, OSS, (0.5 ± 4) dyn/cm^2] 则造成内皮功能障碍^[3]。血管内皮功能障碍是 AS 的始发因素, 血流剪切力对内皮功能的调控机制复杂, 多种分子介导了从“力学刺激”到“细胞生物学效应”之间的信号传递, 呈现出系统生物学的调控特征^[4]。已有大量研究从基因和相关信号通路揭示了血流剪切力对内皮功能的调控^[5], 然而目前尚未有研究从“小分子代谢产物”的角度系统性阐述血流剪切力对内皮功能的影响。

类二十烷酸是由多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) 代谢产生的一系列生物活性脂质分子的总称。花生四烯酸 (arachidonic acid, AA, C20:4) 是哺乳动物产生类二十烷酸的最主要 PUFA 底物, 其主要以磷脂的形式存在于细胞的膜结构中。当细胞受到刺激时, AA 在磷脂酶 A2 的作用下从膜结构中解离到细胞内, 随后在细胞内环氧合酶 (cyclooxygenase, COX)、脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX)、细胞色素 P450 氧化酶 (cytochrome P450 oxidase, CYP450) 等一系列代谢酶以及自发氧化的共同作用下产生上百种类二十烷酸分子^[6]。除 AA 外, 亚油酸 (linoleic acid, LA, C18:2)、二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA, C20:5) 和二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA, C22:6) 等也是产生类二十烷酸的重要 PUFA。底物 PUFA、代谢酶的基因与主要类二十烷酸分子之间的对应关系如表 1 所示。类二十烷酸代谢系统中底物与代谢酶活性的精细调控以及代谢产物所具有的丰富的生物学功能是细胞实现多种复杂生物学过程的重要物质基础。由于产生于同一个代谢系统, 不同类二十烷酸分子的代谢水平之间可能存在密切联系, 因此对该系统的整体性研究具有重要意义。

类二十烷酸代谢系统能够响应血流剪切力的刺激并调控内皮细胞的功能。早期研究显示, LSS 能够促使内皮细胞释放前列环素, 从而诱导平滑肌细胞从分泌表型转换为收缩表型, 发挥血管保护作用^[7]; LSS 还能够促进内皮细胞产生环氧二十碳三烯酸 (epoxyeicosatrienoic acids, EETs), 从而发挥过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 介导的抗炎作用^[8]。上述前期工作仅针对几种 AA 来源的代谢产物进行了研究, 目前对于血流剪切力如何从整体上影响类二十烷酸代谢系统仍然未知。我们在前期工作中基于超高效液相色谱-质谱联用 (ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometer, UPLC-MS/MS) 技术建立了针对类二十烷酸的靶向代谢组学方法^[9]。在本研究中, 我们利用该方法系统性地研究血流剪切力如何影响内皮细胞的类二十烷酸代谢, 阐明 LSS 和 OSS 作用下类二十烷酸代谢谱的差异, 以期进一步揭示血流剪切力的内皮调控机制和类二十烷酸代谢系统在内皮细胞中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 M199 培养基和胎牛血清购买于 Gibco 公司; I 型胶原、胰酶和内皮细胞生长因子购自 Sigma 公司; 高效液相色谱试剂甲醇、乙腈、甲酸和乙酸乙酯购买于 Fisher-Chemicals 公司; 靶向检测类二十烷酸方法所需标准品和内参购买于 Cayman Chemical 公司; 固相萃取柱 (Oasis HLB, 60 mg, 3cc) 和 UPLC 色谱柱 (BEH C18, $1.7 \mu\text{m}$, $50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm i.d.}$) 购自 Waters 公司; 液相色谱仪型号为 Acquity UPLC (Waters); 质谱仪型号为 QTRAP-5500 (Sciex); 固相萃取装置型号为 Visiprep DL (Supelco)。

1.2 内皮细胞培养和血流剪切力系统的建立 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 由脐带上分离而来, 在 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中, 用 M199 培养基 (含 10% 胎牛血清、 $1 \times 10^5 \text{ U/L}$ 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 培养。细胞培养至 P5 代时, 按照 1:1 的比例铺至玻璃板上, 随机分为 3 组, 分别为对照静止 (Static) 组、

表1. 参与PUFA代谢的酶基因与主要的类二十烷酸产物
Table 1. Enzyme-related genes of PUFA metabolism and the main eicosanoids

PUFA	Pathway	Metabolic enzyme-related genes		Eicosanoid metabolites
		Human	Mouse	
AA	COX	<i>PTGS1, PTGS2, PTGDS, PTGES, TBXAS1, etc.</i>	<i>Ptgs1, Ptgs2, Ptgds, Ptges, Tbxas1, etc.</i>	PGD2, PGE2, PGI2, PGF2 α , PGJ2, 15d-PGJ2, TXA2
	LOX	<i>ALOX-5, ALOX-12, ALOX-15</i>	<i>Alox-5, Alox-12, Alox-15</i>	5-HETE, LTA4, LTB4, LTC4, LTD4, LTE4, 15-HETE, LXA4, LXB4, 8-HETE, 9-HETE, 11-HETE, 12-HETE
	CYP450	<i>CYP2J2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1, CYP2U1, EPHX2, etc.</i>	<i>Cyp2j6, Cyp2c38, Cyp2c39, Cyp2e1, Cyp2u1, Ephx2, etc.</i>	16-HETE, 17-HETE, 18-HETE, 19-HETE, 20-HETE; 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET; 14,15-EET; 5,6-DHET; 8,9-DHET; 11,12-DHET; 14,15-DHET
EPA	COX	<i>PTGS1, PTGS2, PTGDS, PTGES, TBXAS1, etc.</i>	<i>Ptgs1, Ptgs2, Ptgds, Ptges, Tbxas1, etc.</i>	PGD3, PGE3, PGF3 α , TXA3
	LOX	<i>ALOX-5, ALOX-12, ALOX-15</i>	<i>Alox-5, Alox-12, Alox-15</i>	5-HEPE, 12-HEPE, 15-HEPE, 11-HEPE, 8-HEPE, 9-HEPE; LXA5, LXB5; LTA5, LTB5, LTC5, LTD5, LTE5
	CYP450	<i>CYP2J2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1, CYP2U1, EPHX2, etc.</i>	<i>Cyp2j6, Cyp2c39, Cyp2c38, Ephx2, etc.</i>	18-HEPE, 20-HEPE; 5,6-EEQ; 8,9-EEQ; 11,12-EEQ; 14,15-EEQ; 17,18-EEQ; 5,6-DiHETE; 8,9-DiHETE; 11,12-DiHETE; 14,15-DiHETE; 17,18-DiHETE
DHA	LOX	<i>ALOX-5, ALOX12, ALOX-15</i>	<i>Alox-5, Alox-12, Alox-15</i>	4-HDoHE, 7-HDoHE, 8-HDoHE, 10-HDoHE, 11-HDoHE, 13-HDoHE, 14-HDoHE, 16-HDoHE, 17-HDoHE, 20-HDoHE, Maresins, Protectins, D-series Resolvins
	CYP450	<i>CYP2J2, CYP2C9, CYP2C8, EPHX2, etc.</i>	<i>Cyp2j6, Cyp2c38, Cyp2c39, Ephx2, etc.</i>	7,8-EDP; 10,11-EDP; 13,14-EDP; 16,17-EDP; 19,20-EDP; 7,8-DiHDPA; 10,11-DiHDPA; 13,14-DiHDPA; 16,17-DiHDPA; 19,20-DiHDPA
LA	COX	<i>PTGS1, PTGS2, PTGDS, PTGES, TBXAS1, etc.</i>	<i>Ptgs1, Ptgs2, Ptgds, Ptges, Tbxas1, etc.</i>	PGD1, PGE1, PGF1 α , TXB1
	LOX	<i>ALOX-15</i>	<i>Alox-15</i>	9-HODE, 13-HODE, 9-oxo-ODE, 13-oxo-ODE
	CYP450	<i>CYP2J2, CYP2C9, CYP2E1, CYP1A2, etc.</i>	<i>Cyp2j6, Cyp2c39, Cyp2e1, Cyp1a2, etc.</i>	9,10-EpOME; 12,13-EpOME, 9,10-diHOME; 12,13-diHOME

PUFA: polyunsaturated fatty acids; AA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; LA: linoleic acid; COX: cyclooxygenase; LOX: lipoxygenase; CYP450: cytochrome P450 oxidase.

LSS 组和 OSS 组。待其完全贴壁后，Static 组细胞置于相同条件的培养环境中，不做剪切力处理。血流剪切力流体系统 (IBIDI, Germany) 按照图 1 组建，培养液的流动方向如图中箭头和序号所示，其中铺满细胞的玻璃板、硅胶垫和 chamber 重叠合并，使细胞处于平板流室中。LSS 方向单一且稳定，流速为 40 mL/min，剪切力大小为 12 dyn/cm²；OSS 需

要注射泵施加方向不一且紊乱的剪切力，流速为 3 mL/min，大小为 (0.5 ± 4) dyn/cm²。

1.3 类二十烷酸代谢产物的提取 细胞培养液中的类二十烷酸通过固相萃取法提取：将 SPE 小柱装在固相萃取装置上，用 2 mL 100% 乙酸乙酯和甲醇分别过柱，活化柱填料；2 mL 5% 甲醇过柱，平衡；2 mL 培养液上样；2 mL 5% 甲醇清洗；抽真空 15

min, 排掉残留的液体; 更换样品收集管后, 使用 600 μ L 甲醇和 1.4 mL 乙酸乙酯洗脱; 氮吹仪吹干样品后, 用 30% 乙腈复溶, 使用 0.22 μ m 离心柱过滤后上机检测。

1.4 基于 UPLC-MS/MS 的靶向代谢组学检测

质谱仪使用 ESI 离子源 Turbo Ion Spray, 离子源参数如下: CUR = 40 psi, GS1 = 30 psi, GS2 = 30 psi, IS = -4 500 V, CAD = MEDIUM, TEMP = 500 $^{\circ}$ C。使用多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描模式检测类二十烷酸分子, 参数见本课题组前期方法学文章^[9]。使用 BEH C18 UPLC 色谱柱 (1.7 μ m, 50 mm \times 2.1 mm) 对类二十烷酸进行分离, 上样体积为 10 μ L, 色谱条件见表 2。

1.5 小鼠左颈总动脉 (left common carotid artery, LCA) 部分结扎手术及其超声检测

8 周龄的雄性 WT 小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司, 且严格遵守天津医科大学医学伦理委员会的要求。该手术采用异氟烷吸入麻醉 (3% 异氟烷, 200 mL/

min)。首先分离出 LCA 分叉处, 绕过甲状腺上动脉, 用 6-0 号线分别结扎颈外动脉、左侧的颈动脉和颈内动脉, 颈部切口用 4-0 号线进行缝合。小鼠的右颈总动脉 (right common carotid artery, RCA) 经过分离后并不结扎, 作为对照组。一周后, 使用多普勒超声仪 (Vevo 2100, Visualsonics 公司) 进行颈动脉超声检测。4 周普通饮食喂养后, 取小鼠 LCA、RCA, 使用显微手术器械在显微镜下剖开血管并轻轻刮取血管内膜。

1.6 定量 RT-PCR 检测 用 Trizol 法提取内皮细胞和小鼠颈部血管内膜的 RNA, 使用 RevertAid First Strand cDNA 试剂盒 (Thermo Scientific 公司) 反转录获得 cDNA, 用 TransStart Top Green qPCR 试剂盒 (TransGen Biotech 公司) 进行定量 RT-PCR 反应, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环。引物序列见表 3。

1.7 统计学分析 本研究中的量化结果使用 mean \pm SEM 来表示, 连续性变量的两组间比较使

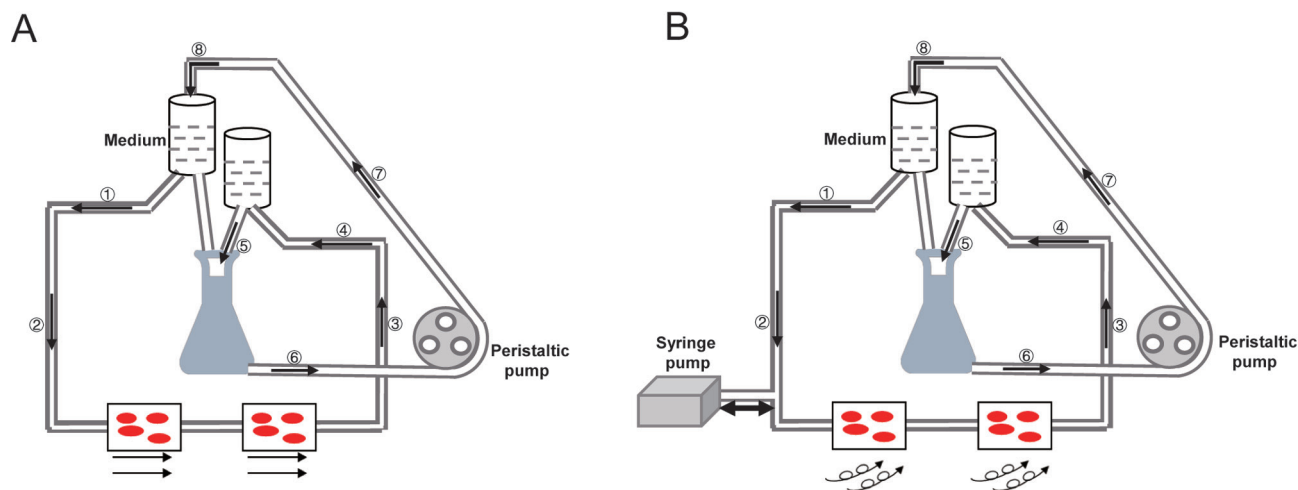


图 1. 体外细胞层流型剪切力 (laminar shear stress, LSS) 和振荡型剪切力 (oscillatory shear stress, OSS) 系统示意图

Fig. 1. Schematic diagram of laminar shear stress (LSS, A) and oscillatory shear stress (OSS, B) system *in vitro*.

表 2. 类二十烷酸产物高效液相色谱流动相条件

Table 2. Mobile phase conditions of eicosanoids by high performance liquid chromatography

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A: water (0.02% acetic acid) (%)	Mobile phase B: acetonitrile (%)
0	0.25	70	30
3	0.25	70	30
20	0.25	40	60
24	0.25	20	80
27	0.25	20	80
29	0.25	70	30
30	0.25	70	30

表3. 定量RT-PCR的引物序列

Table 3. The primers for real time quantitative PCR

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Human primer sequence		
<i>VCAM-1</i>	AGGAGCTGAATACCCTCCCA	AGGAAAAGAGCCTGTGGTGC
<i>KLF2</i>	GGGGTGAGTTCCCCATTCTG	CCAATGCACACAACAGGTGG
<i>GAPDH</i>	AAGACGGGCGGAGAGAAACC	CGTTGACTCCGACCTTACC
<i>PTGS1</i>	TTCTTGCTGTTCCTGCTCCT	GGAAGTGGGTGAAAGAGGGG
<i>PTGS2</i>	AATCCTTGCTGTTCCCACCC	CAAGGGAGTCGGCAATCAT
<i>PTGDS</i>	GACCGACTACGACCAGTACG	GCATTATCGGTTTGGGGCA
<i>PTGES</i>	TTCCTTTTCTGGGCTTCGT	GTGTAGGTCACGGAGCGGAT
<i>ALOX15</i>	GCTGTGAAAGACGACCCAGA	GCACCCAAGAGTACCAGTCC
<i>CYP2J2</i>	GGCAACATCATCCCCCTGAA	CCAACTGTTCTCCGAGGCAT
<i>CYP2C9</i>	CATCAAGATTTGAGCAGCCCC	GGGTTGTGCTTGTCTCTCT
<i>EPHX2</i>	CAGCCCCTGACTTGGGAAT	ACAAAATGCAGACGGACCCT
Mouse primer sequence		
<i>Vcam-1</i>	TGGTGGAGGCACAGAAATCC	GATCAAGCAGCCACTTTGCC
<i>Ptgs1</i>	AGTGCGGTCCAACCTTATCC	CACACGCGTTATGTTTACG
<i>Ptgs2</i>	TTGGAGGCGAAGTGGGTTTT	TGGCTGTTTTGGTAGGCTGT
<i>Ptgds</i>	TGGTTCCGGGAGAAGAAAGC	TGGTGCCTCTGCTGAATAGC
<i>Ptges</i>	CGCAACGACATGGAGACAATC	CCTGTGAGGACAACGAGGAA
<i>Alox15</i>	CGGCGACCAGTATCTCTGAC	TTCCAGGAGTTTCGAACCCG
<i>Cyp2j6</i>	CTACCGGCTCCTTGTTAGCC	ACCAACGGCTGGATTGAGAG
<i>Cyp2c39</i>	TCAAAGCCTATGGCCCTGT	ATTTTCGAGGGTTCGTGAGTG
<i>Ephx2</i>	AGCTATGGCAGCAAGAAGCA	TTGGGTTTTGCCTTCAGGGT

用配对 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one way ANOVA), 进一步组间两两比较采用 Tukey's multiple comparisons test 分析。GraphPad Prism 8 进行统计作图, $P < 0.05$ 时被认为有统计学意义。UPLC-MS/MS 结果使用 Analyst 1.5.1 软件进行分析, MultiQuant 3.0 软件用于选择 MRM 峰图定量并导出数据结果。偏最小二乘 - 判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 和变量投影重要性 (variable importance in the projection, VIP) 得分图通过代谢组学分析平台 (<https://www.metaboanalyst.ca>) 完成^[10]。

2 结果

2.1 体外血流剪切力系统对HUVEC的刺激效应验证

我们先对血流剪切力的刺激效果进行评判。VCAM-1 激活是内皮细胞响应 OSS 的重要标志, 其激活可受到 LSS 的抑制。KLF2 是 AS 保护转录因子, 在 LSS 作用下升高。利用定量 RT-PCR 分析不同剪切力处理后内皮细胞 KLF2 和 VCAM-1 的表达, 结果 (图 2) 显示: 与 Static 组相比, OSS 显著

升高了 VCAM-1 的水平 ($P < 0.01$), 而 LSS 使其降低 ($P < 0.05$)。此外, LSS 还显著升高了 KLF2 的 mRNA 水平 ($P < 0.01$)。该结果表明本研究使用的

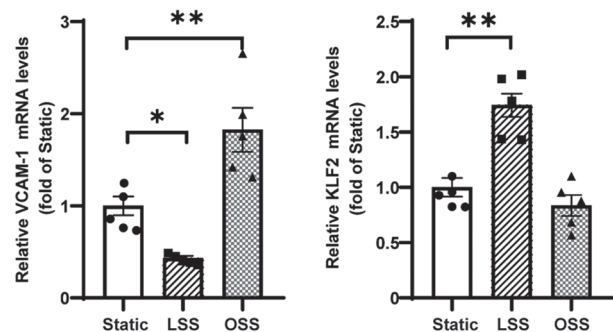


图 2. LSS和OSS系统对内皮细胞表型的模型验证

Fig. 2. Model verification of endothelial cell phenotype by laminar shear stress (LSS) and oscillatory shear stress (OSS) system. Endothelial cells were exposed to LSS (12 dyn/cm²) or OSS [(0.5 ± 4) dyn/cm²], and static as control. After 6 h, real-time quantitative PCR was used to detect the expression levels of KLF2 and VCAM-1 mRNA. Data were shown as mean ± SEM, $n = 5$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

血流剪切力系统能够有效模拟体内的血流动力学效应。

2.2 血流剪切力对HUVEC代谢谱的整体影响

为了研究血流剪切力对内皮细胞分泌的类二十

烷酸代谢产物的影响，我们使用上述验证过的血流剪切力系统处理内皮细胞 6 h 后，用新鲜的培养基孵育内皮细胞 3 h，收集培养基进行固相萃取，提取富含类二十烷酸的组分，利用靶向代谢组学手段

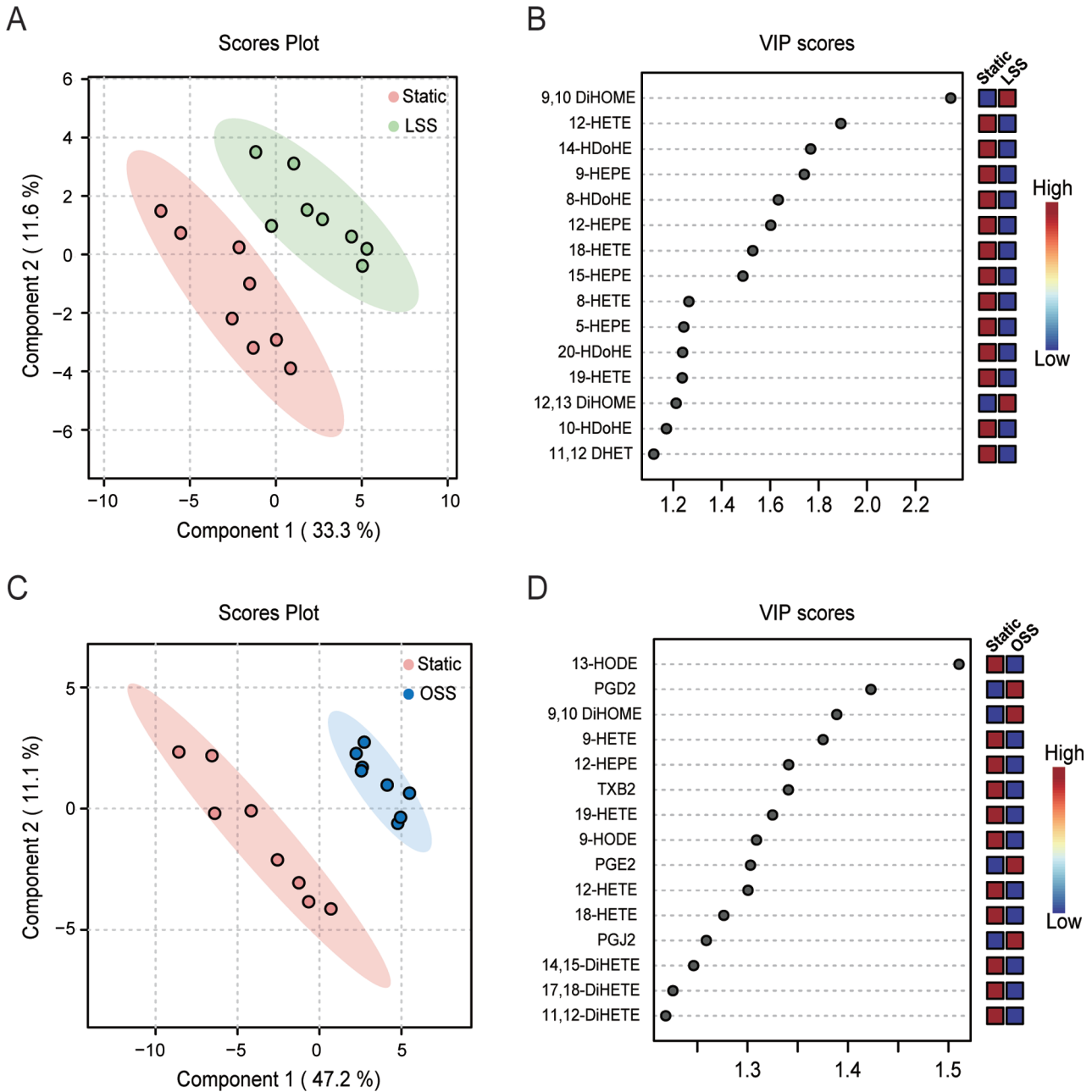


图 3. LSS组和Static组之间、OSS组和Static组之间类二十烷酸代谢系统的PLS-DA和VIP分析

Fig. 3. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and variable importance in the projection (VIP) analysis of eicosanoids between Static group and LSS group or OSS group. PLS-DA showed that there were significant overall differences between them (A and C). VIP showed that the changes induced by LSS mainly included decreased hydroxyl eicosanoids (e.g 12-HETE, 14-HDoHE, 9-HEPE, 8-HDoHE *etc.*) and increased diol eicosanoids (9,10-DiHOME and 12,13-DiHOME) of LA (B). In addition to the decrease of hydroxyl eicosanoids and the increase of diol eicosanoids from LA, the increasing trend of several prostaglandin metabolites (PGD2, PGE2 and PGJ2) also contributed to the overall changes induced by OSS (D). $n = 8$. PLS-DA and VIP analysis were completed by MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>).

研究了血流剪切力对内皮细胞类二十烷酸代谢组的影响。我们首先比较了 LSS 组和 Static 组之间类二十烷酸代谢组的差异。PLS-DA 显示, LSS 组和 Static 组之间存在明显的整体性差异 (图 3A)。VIP 得分图 (图 3B) 显示: 造成 LSS 类二十烷酸代谢谱变化的差异主要体现在羟基类二十烷酸 (如 12-HETE、14-HDoHE、9-HEPE、8-HDoHE 等) 和 LA 来源的二醇类二十烷酸 (9,10-DiHOME 和 12,13-DiHOME) 这两类代谢产物上。而且, LSS 普遍造成羟基类二十烷酸代谢水平降低, LA 来源的二醇类二十烷酸代谢水平升高。

通过对 OSS 组和 Static 组之间的代谢组比较, 我们发现 OSS 同样能够造成类二十烷酸代谢组的明显变化 (图 3C)。但 VIP 得分图 (图 3D) 显示, OSS 所造成的差异与 LSS 存在明显不同, 除了羟基

类二十烷酸代谢水平降低、LA 来源的二醇类二十烷酸代谢水平升高外, 几种前列腺素类的代谢产物 (PGD2、PGE2 和 PGJ2) 所呈现出的升高趋势也是造成整体性变化的重要贡献因素。

2.3 LSS和OSS在HUVEC中造成的差异类二十烷酸

从以上结果中我们发现, 与 Static 组的代谢谱相比, 两种血流剪切力分别引起了类二十烷酸代谢产物的整体差异, 因此我们利用单变量统计分析比较了 LSS 和 OSS 之间具有显著差异的类二十烷酸代谢产物。与 LSS 组相比, OSS 组中 10 种类二十烷酸代谢产物水平显著升高, 包括由 COX 产生的代谢产物 PGD2、PGE2、PGF2 α 以及 PGJ2 (图 4A), 由 LOX 或自发氧化作用产生的羟基类二十烷酸 11-HETE、15-HETE、13-HDoHE (图 4B), 由 CYP450 氧化酶和可溶性环氧化物水解酶 (soluble epoxide

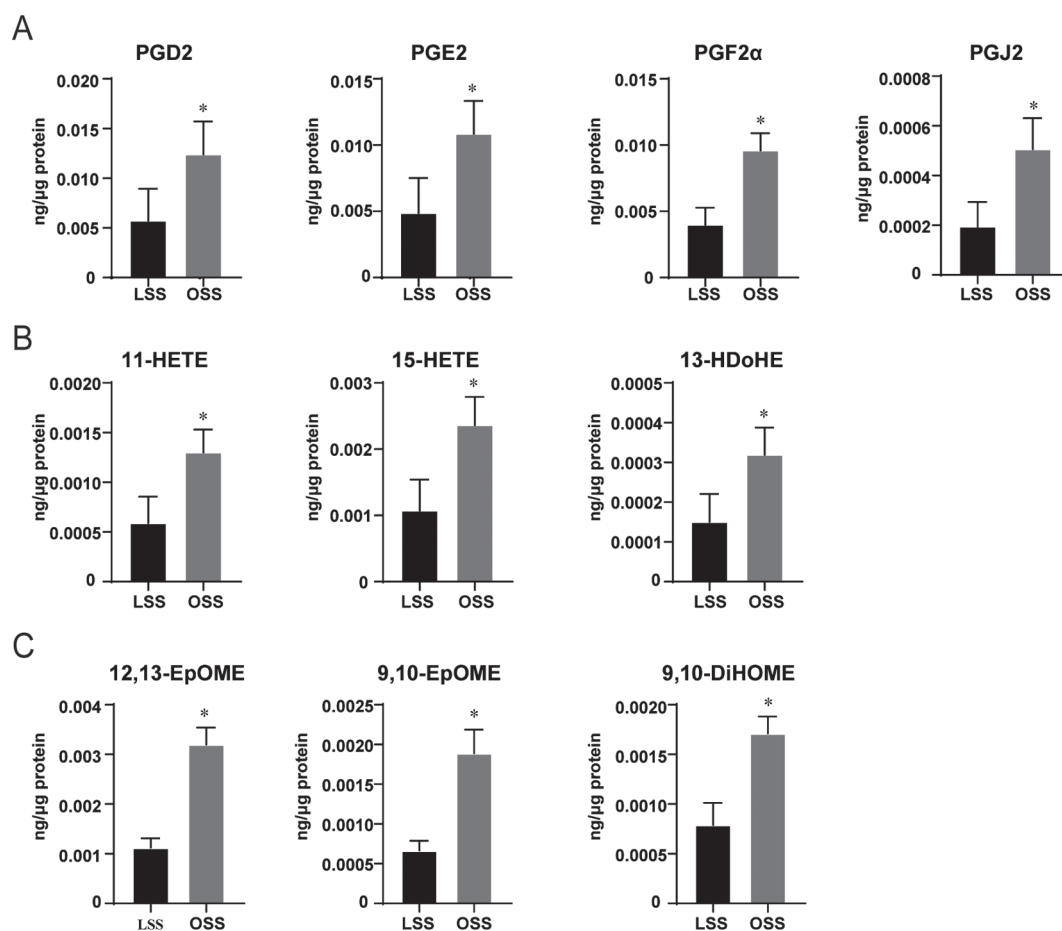


图 4. LSS和OSS在HUVEC中造成的差异类二十烷酸

Fig. 4. The different eicosanoids caused by OSS compared with LSS in HUVEC. OSS significantly increased the levels of 10 eicosanoids, including COX-produced metabolites PGD2, PGE2, PGF2 α and PGJ2 (A); hydroxy eicosanoids produced by LOX or spontaneous oxidation (B) and eicosanoids produced by CYP450 and soluble epoxide hydrolase (C). Data were shown as mean \pm SEM, $n = 8$, * $P < 0.05$ vs LSS.

hydrolase, sEH) 产生的类二十烷酸 12,13-EpOME、9,10-EpOME、9,10-DiHOME (图 4C)。

2.4 血流剪切力对HUVEC类二十烷酸代谢酶mRNA水平的影响

为了探究血流剪切力是否对以上代谢产物相关的代谢酶有影响, 我们利用定量 RT-PCR 实验检测了这些类二十烷酸代谢酶基因的转录水平。主要包括编码 COX-1 和 COX-2 的基因 *PTGS1* 和 *PTGS2*; 产生 PGE₂、PGD₂ 的合酶编码基因 *PTGES* 和 *PTGDS*; 产生 15-HETE、13-HDoHE 的 LOX 酶编码基因 *ALOX15*; 产生环氧化物的 CYP450 酶编码基因 *CYP2J2/2C9* 以及编码 sEH 的基因 *EPHX2* 等。结果显示: LSS 能够上调 *PTGS2*、*PTGDS* 的转录, 同时下调 *CYP2J2* 和 *EPHX2* 的转录; OSS 能够上调 *PTGS2*、*PTGDS*、*PTGES* 的转录, 同时下调 *CYP2J2* 和 *EPHX2* 的转录; OSS 在 LSS 的基础上进一步上调了 *PTGS1*、*PTGES*、*ALOX15*、*CYP2J2* 和 *EPHX2*

的转录水平 (图 5)。

2.5 小鼠血流模型证实OSS引起类二十烷酸代谢酶mRNA水平变化

为了验证血流剪切力在体内对内皮类二十烷酸代谢的影响, 我们利用小鼠 LCA 部分结扎建立了 OSS 手术模型。手术一周后对小鼠进行了颈部血管多普勒超声检测, 结果 (图 6A) 显示, 与对照组 RCA 相比, LCA 部分结扎导致血流速度明显下降, 血流方向改变, 出现反流波 (箭头), 表明手术结扎成功。我们进一步提取小鼠 LCA 和 RCA 内膜的 mRNA 进行定量 RT-PCR, 与未结扎的 RCA 相比, 结扎的 LCA 组中 *Vcam-1* 的转录水平明显增加, 表明内皮激活 (图 6B)。如图 6C 所示, 虽然仅有 *Ptgds* 和 *Alox15* 的转录变化具有显著性 ($P < 0.05$), 但类二十烷酸代谢酶 mRNA 的调控趋势与体外 OSS 对 HUVEC 的调控 (图 5) 以及代谢物水平变化趋势 (图 4) 基本一致。

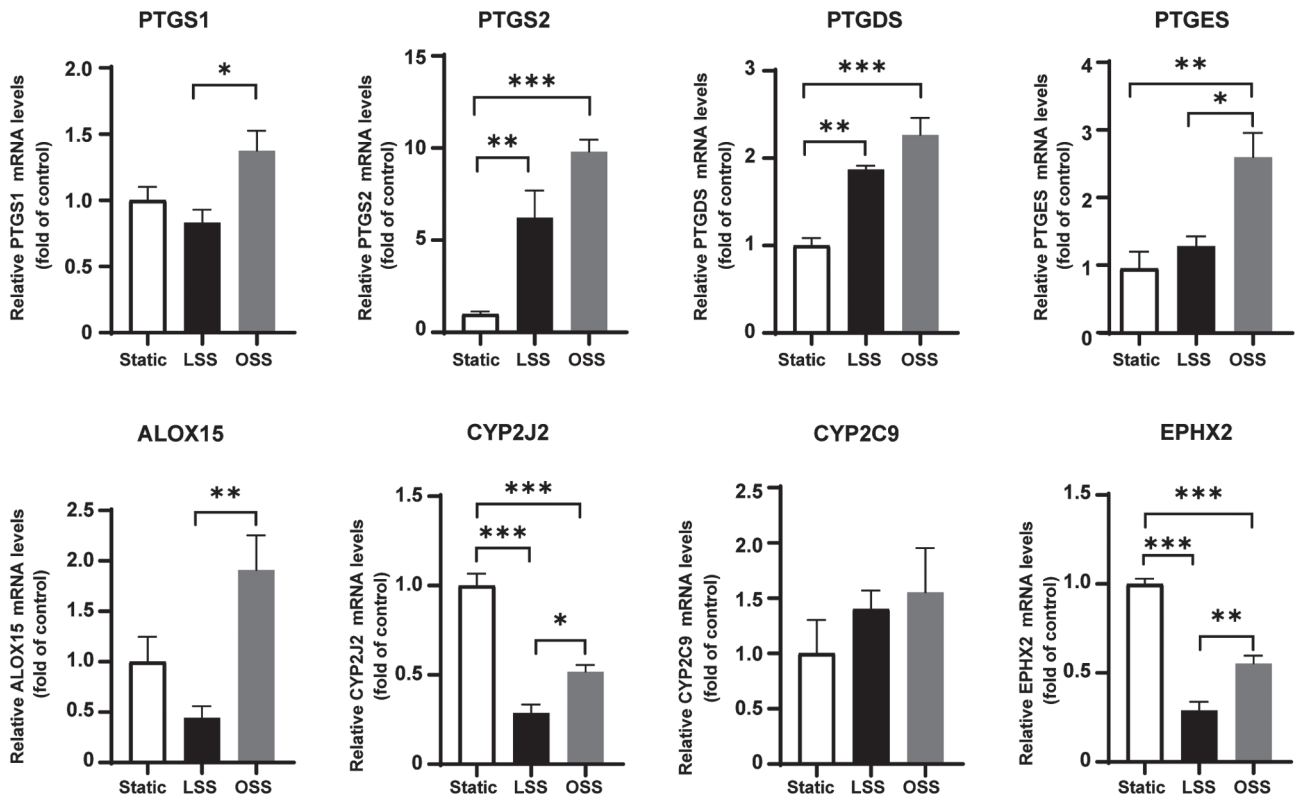


图 5. 血流剪切力对HUVEC类二十烷酸代谢酶mRNA水平的影响

Fig. 5. Effects of different shear stress on mRNA levels of eicosanoids metabolic enzyme-related genes in HUVEC. LSS up-regulated the transcription of *PTGS2* and *PTGDS*, and down-regulated the transcription of *CYP2J2* and *EPHX2*. OSS up-regulated the transcription of *PTGS2*, *PTGDS* and *PTGES*, and down-regulated the transcription of *CYP2J2* and *EPHX2*. Furthermore, OSS up-regulated the transcription levels of *PTGS1*, *PTGES*, *ALOX15*, *CYP2J2* and *EPHX2* on the basis of LSS. Data were shown as mean \pm SEM, $n = 4$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

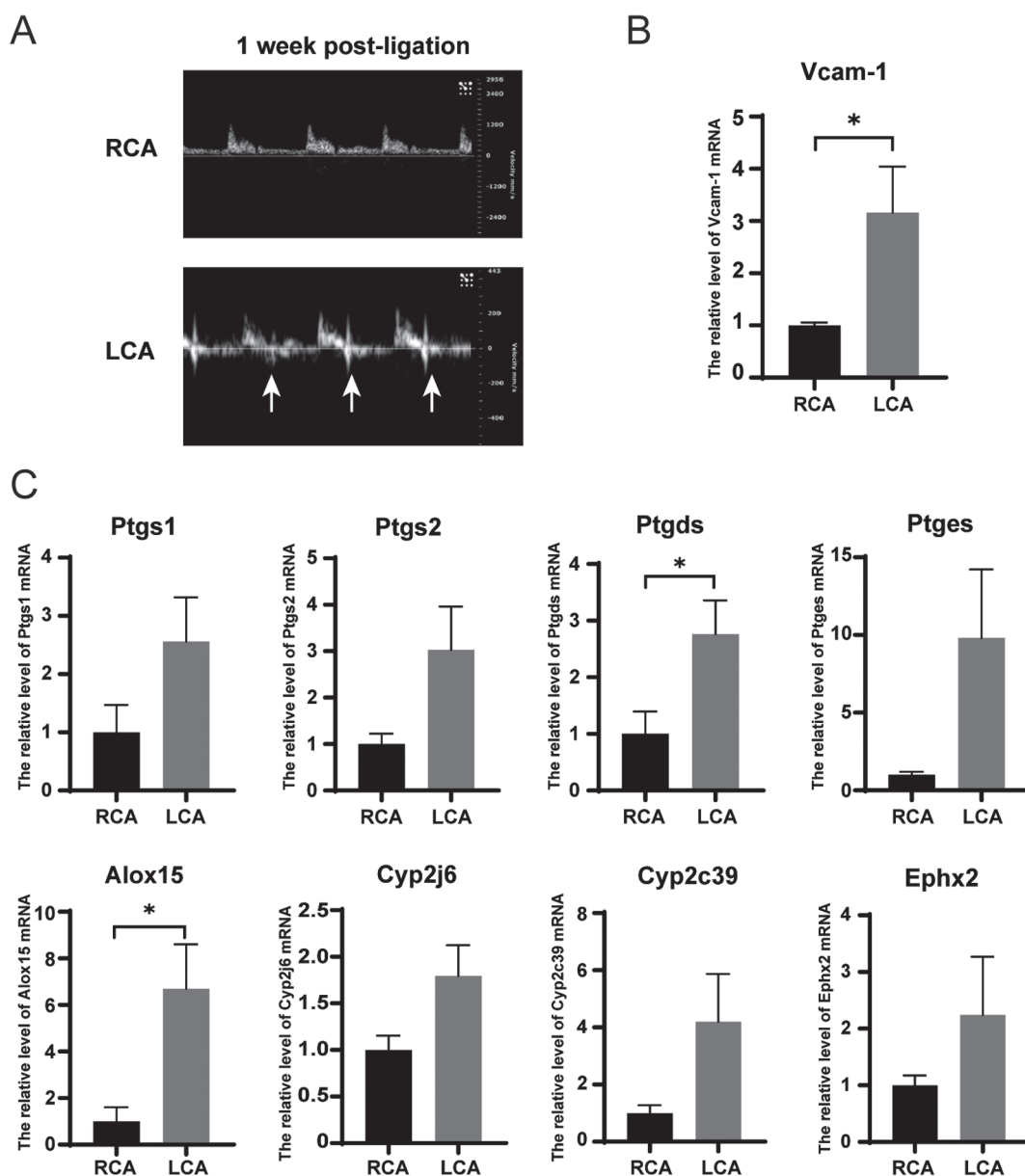


图 6. 小鼠左颈总动脉部分结扎OSS模型对类二十烷酸代谢酶mRNA水平的影响

Fig. 6. Effects of OSS on mRNA levels of eicosanoids metabolic enzyme-related genes in WT mice. Doppler ultrasonography in mice showed left common carotid artery (LCA) partial ligation resulted in a significant decrease in blood flow velocity, a change in blood flow direction and a regurgitation wave (arrow) (A). We extracted mRNA from the RCA and LCA for RT-qPCR. Compared with RCA, and the mRNA level of *Vcam-1* in LCA was also significantly increased, indicating endothelial activation (B). Although only the changes of *Ptgs* and *Alox15* mRNA were significant, the regulation trend of OSS on the enzyme-related genes mRNA *in vivo* was consistent with that in HUVEC *in vitro* (C). Data were shown as mean \pm SEM, $n = 5$, * $P < 0.05$.

3 讨论

血流剪切力对内皮细胞具有重要的调控作用，之前的研究发现了很多介导血流剪切力调控作用的基因和相关信号通路，例如 YAP/TAZ-JNK、integrin $\alpha 5\beta 1$ -/c-Abl/YAP^{Y357}、Annexin A2-integrin $\alpha 5$ /piezo1/PTP1B 等^[11-13]。尤其是 Ajami 等人基于 RNA-

seq 技术系统地研究了血流剪切力对转录组的影响，从而在转录水平对血流剪切力的信号转导途径做出了相对完整的描述^[14]。然而，除了基因-蛋白之间的调控外，小分子代谢产物也发挥了极其重要的调控作用，目前尚未有关血流剪切力如何影响小分子代谢的系统性研究。类二十烷酸是一类具有重

要生物活性的代谢产物，这些代谢产物主要以自分泌或旁分泌的方式发挥作用。这类代谢产物种类繁多，凭借各自在结构上的细微差异，作用于不同的细胞膜受体或核受体，触发一系列细胞生物学事件的发生，从而发挥重要的调控作用。鉴于类二十烷酸功能的重要性的和代谢的复杂性，我们在本研究中利用代谢组学技术从整体上研究了类二十烷酸代谢产物对血流剪切力的响应，以期对血流动力学的系统生物学研究做出重要的补充。

通过对 HUVEC 培养液中的类二十烷酸代谢组学研究，我们发现无论是 LSS 还是 OSS 均能够引起类二十烷酸分泌模式的明显变化 (图 3)，其中共性的特征是羟基类二十烷酸代谢水平的降低和 LA 来源的二醇类二十烷酸代谢水平的升高。该结果提示尽管血流模式不同，但力学刺激均能够造成一些共性影响。通过对每个代谢产物的单变量统计分析，我们鉴定出 LSS 与 OSS 之间具有显著性差异的代谢产物，OSS 上调的类二十烷酸代谢通路如图 7 所示。为了研究这些代谢产物的变化趋势是否与代谢酶有关，我们在 HUVEC 和小鼠 LCA 部分结扎模型中分别研究了血流剪切力在“体外”和“体内”两种情况下对类二十烷酸代谢酶 mRNA 的影响

(图 5, 图 6C)。尽管部分基因转录水平的结果未达到显著性统计学差异，但代谢产物以及 mRNA 的一致性变化趋势提示 OSS 整体上改变了 COX、LOX 以及 CYP450 通路中的多个基因，这些上调的基因是否受同样的转录因子调控值得我们未来进一步研究。总的来看，OSS 造成类二十烷酸代谢的系统性改变，最终造成内皮细胞 PGD2、PGE2、PGF2 α 、PGJ2、11-HETE、15-HETE、13-HDoHE、9,10-EpOME、12,13-EpOME 和 9,10-DiHOME 等 10 种产物代谢水平的升高。

已有部分研究证实如上所述的某些代谢产物可能是受血流剪切力刺激，并参与内皮细胞功能调控的关键分子。例如，Taba 等报道在 LSS (15~30 dyn/cm²) 作用下，HUVEC 中 PTGDS mRNA 在 6 h 时开始增加，孵育的细胞培养液中的 PGD2 也随之增加^[15]；Aoki 等报道剪切力 (15 dyn/cm²) 刺激后 PGE2 升高，通过内皮细胞中的 COX2-PGE2-EP2 途径诱导 NF- κ B 的激活和 CCL2 的表达，放大了炎症效应，从而导致脑动脉瘤的形成^[16]。本研究进一步证实了血流剪切力对这些代谢产物的调控作用，提示 OSS 通过 PGD2、PGE2 等代谢产物及其受体依赖的信号途径可能是导致血管炎症的重要机制。其他某些

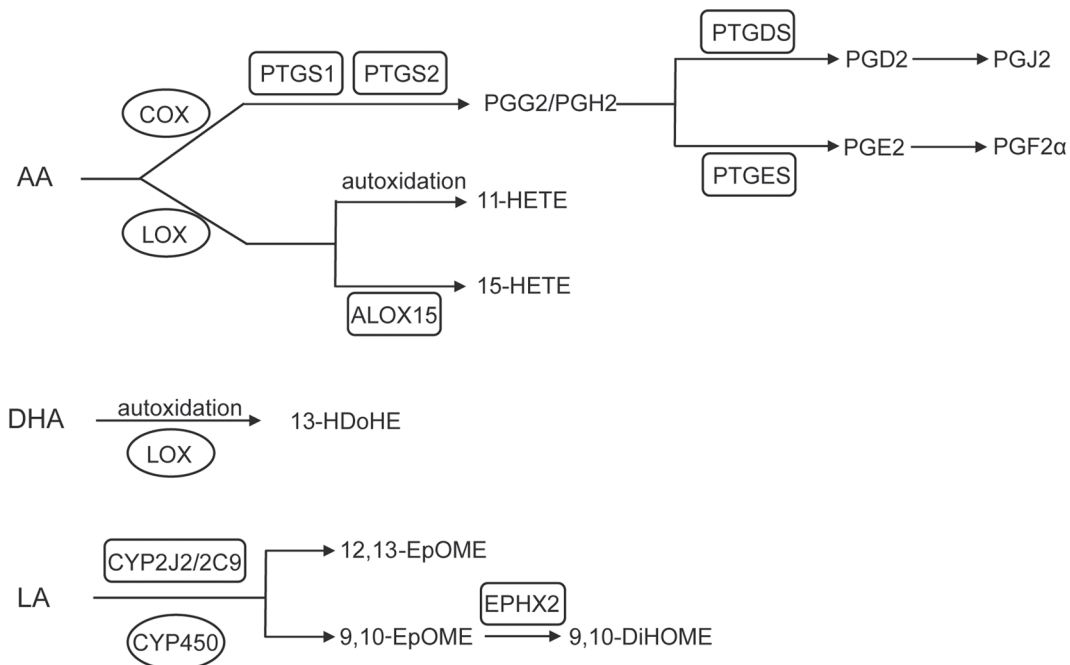


图 7. OSS显著上调的类二十烷酸代谢通路图

Fig. 7. Diagram of up-regulated eicosanoids metabolism pathway by oscillatory shear stress (OSS) compared with laminar shear stress (LSS). Shown in the box are eicosanoids metabolic enzyme-related genes, and the circle represents three major enzymatic routes of polyunsaturated fatty acids (PUFA).

升高的代谢产物也具有明显的血管调控作用或可能具有临床意义。例如, Setty 等报道 LOX 途径产生的 15-HETE 具有增强凝血酶诱导的血小板聚集作用^[17], 且该产物在 AS 患者的血管斑块中明显增加^[18]。15-HETE 是否介导了 OSS 造成的内皮损伤值得进一步研究。此外, OSS 还使 LA 的 CYP450 代谢产物 EpOMEs 及 sEH 水解产物 DiHOMEs 的代谢水平升高, 而对于 AA 的 CYP450 代谢产物 EETs 及其下游的 DHETs 却无明显的调控作用, 该结果提示血流剪切力的调控可能具有底物选择的偏向性, 但其机制并不清楚。虽然已有大量研究证实 EET 具有抗炎、促血管舒张等保护作用^[19, 20], 但其 LA 来源的类似物 EpOME 的功能却报道较少, 人们推测 EpOME 可能具有与 EET 类似但较弱的生物学效应。值得注意的是, EpOME 也曾被认为是一种白细胞毒素, 但后续研究证明只有在细胞中存在 sEH 时才会产生毒性反应, 从而证实 DiHOME 是真正的毒性介质^[21]。因此我们推测 OSS 引起 EpOME 的升高可能发挥一定的保护作用, 但其在 sEH 的进一步催化作用下所产生的 DiHOME 可能具有促炎的作用。

综上所述, 我们利用靶向代谢组学技术系统地研究了血流剪切力对内皮细胞类二十烷酸代谢的影响, 研究结果进一步证明血流剪切力对内皮细胞的调控是一个系统性作用, 这对于深入理解该病理生理学过程具有重要意义。本研究也发现了一些可能介导 OSS 所造成的血管损伤的类二十烷酸代谢物, 产生这些代谢物的酶可能成为抗 AS 的干预靶点。

参考文献

- 1 Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407(6801): 233–241.
- 2 Cheng C, Tempel D, van Haperen R, van der Baan A, Grosveld F, Daemen MJ, Krams R, de Crom R. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* 2006; 113(23): 2744–2753.
- 3 Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 2011; 91(1): 327–387.
- 4 Niu N, Xu S, Xu Y, Little PJ, Jin ZG. Targeting mechanosensitive transcription factors in atherosclerosis. *Trends Pharmacol Sci* 2019; 40(4): 253–266.
- 5 Souilhol C, Serbanovic-Canic J, Fragiadaki M, Chico TJ, Ridger V, Roddie H, Evans PC. Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes. *Nat Rev Cardiol* 2020; 17(1): 52–63.
- 6 Hanna VS, Hafez EAA. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *J Adv Res* 2018; 11: 23–32.
- 7 Tsai MC, Chen L, Zhou J, Tang Z, Hsu TF, Wang Y, Shih YT, Peng HH, Wang N, Guan Y, Chien S, Chiu JJ. Shear stress induces synthetic-to-contractile phenotypic modulation in smooth muscle cells via peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta activations by prostacyclin released by sheared endothelial cells. *Circ Res* 2009; 105(5): 471–480.
- 8 Liu Y, Zhang Y, Schmelzer K, Lee TS, Fang X, Zhu Y, Spector AA, Gill S, Morisseau C, Hammock BD, Shyy JY. The antiinflammatory effect of laminar flow: the role of PPAR-gamma, epoxyeicosatrienoic acids, and soluble epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(46): 16747–16752.
- 9 Zhang X, Yang N, Ai D, Zhu Y. Systematic metabolomic analysis of eicosanoids after omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation by a highly specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based method. *J Proteome Res* 2015; 14(4): 1843–1853.
- 10 Pang Z, Chong J, Li S, Xia J. MetaboAnalystR 3.0: toward an optimized workflow for global metabolomics. *Metabolites* 2020; 10(5): 186.
- 11 Wang L, Luo JY, Li B, Tian X Y, Chen LJ, Huang Y, Liu J, Deng D, Lau CW, Wan S, Ai D, Mak KK, Tong KK, Kwan KM, Wang N, Chiu JJ, Zhu Y, Huang Y. Integrin-YAP/TAZ-JNK cascade mediates atheroprotective effect of unidirectional shear flow. *Nature* 2016; 540(7634): 579–582.
- 12 Li B, He J, Lv H, Liu Y, Lv X, Zhang C, Zhu Y, Ai D. c-Abl regulates YAPY357 phosphorylation to activate endothelial atherogenic responses to disturbed flow. *J Clin Invest* 2019; 129(3): 1167–1179.
- 13 Zhang C, Zhou T, Chen Z, Yan M, Li B, Lv H, Wang C, Xiang S, Shi L, Zhu Y, Ai D. Coupling of integrin $\alpha 5$ to Annexin A2 by flow drives endothelial activation. *Circ Res* 2020; 127(8): 1074–1090.
- 14 Ajami NE, Gupta S, Maurya MR, Nguyen P, Li JYS, Shyy JYJ, Chen Z, Chien S, Subramaniam S. Systems biology analysis of longitudinal functional response of endothelial cells to shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114(41): 10990–10995.
- 15 Taba Y, Sasaguri T, Miyagi M, Abumiya T, Miwa Y, Ikeda T, Mitsumata M. Fluid shear stress induces lipocalin-type prostaglandin D₂ synthase expression in vascular endothelial cells. *Circ Res* 2000; 86(9): 967–973.
- 16 Aoki T, Nishimura M, Matsuoka T, Yamamoto K, Furuyashiki T, Kataoka H, Kitaoka S, Ishibashi R, Ishibazawa A, Miyamoto S, Morishita R, Ando J, Hashimoto N, Nozaki K, Narumiya S. PGE₂-EP₂ signalling in endothelium is activated

- by haemodynamic stress and induces cerebral aneurysm through an amplifying loop via NF-kappa B. *Br J Pharmacol* 2011; 163(6): 1237–1249.
- 17 Setty B N, Werner MH, Hannun Y A, Stuart MJ. 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid-mediated potentiation of thrombin-induced platelet functions occurs via enhanced production of phosphoinositide-derived second messengers--sn-1,2-diacylglycerol and inositol-1,4,5-trisphosphate. *Blood* 1992; 80(11): 2765–2773.
- 18 Waddington E, Sienuarine K, Puddey I, Croft K. Identification and quantitation of unique fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2001; 292(2): 234–244.
- 19 Spiecker M, Liao JK. Vascular protective effects of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Arch Biochem Biophys* 2005; 433(2): 413–420.
- 20 Imig JD. Prospective for cytochrome P450 epoxygenase cardiovascular and renal therapeutics. *Pharmacol Ther* 2018; 192: 1–19.
- 21 Moghaddam MF, Grant DF, Cheek JM, Greene JF, Williamson KC, Hammock BD. Bioactivation of leukotoxins to their toxic diols by epoxide hydrolase. *Nat Med* 1997; 3(5): 562–566.