论著

文章编号:1000-5404(2012)13-1310-04

5-脂氧合酶通路在ApoE基因敲除小鼠动脉硬化中的作用

衡旭华,杨丽霞,郭瑞威,石燕昆,杨智华 (650032 昆明,成都军区昆明总医院心血管内科)

[摘要] **目的** 探讨5-脂氧合酶(arachidonate 5-Lipoxygenase,5-LO)通路在ApoE$^{-/-}$小鼠动脉硬化中的作用。**方法** 将8周龄ApoE$^{-/-}$雄性小鼠24只[体质量(22.42±1.21)g]随机分为2组:对照组(n=12,普通饲料)、动脉硬化模型组(n=12,高脂饲料)。16周后,病理检测分析校正斑块面积(PA/LA);RT-PCR和Western blot法检测主动脉中5-LO的表达;酶联免疫法检测白三烯B4(leukotriene B4,LTB4)和白三烯D4(leukotriene D4,LTD4)的血清水平。**结果** 建模成功,动脉硬化模型组粥样斑块形成。动脉硬化模型组较对照组小鼠主动脉中5-LO的mRNA的表达[(0.61±0.0) *vs* (0.18±0.03),P<0.01]及蛋白表达[(1.53±0.18) *vs* (0.52±0.40),P<0.01]明显升高,血清LTB4水平[(34.79±4.47) *vs* (12.07±2.35),P<0.01]及LTD4水平[(2 862.48±48.77) *vs* (2 357.10±53.57),P<0.01]显著升高。动脉硬化模型组血清LTB4(r=0.954,P<0.01)、LTD4(r=0.946,P<0.01)水平与校正斑块面积成正相关。**结论** 5-脂氧合酶通路在动脉粥样硬化发病机制中起着重要作用。

[关键词] 5-脂氧合酶;动脉粥样硬化;白三烯B4;白三烯D4

[中图法分类号] R329.26;R363.21;R543.5 [文献标志码] A

Role of 5-lipoxygenase pathway in atherosclerosis in ApoE knockout mice

Heng Xuhua, Yang Lixia, Guo Ruiwei, Shi Yankun, Yang Zhihua (Department of Cardiology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming, Yunnan Province, 650032, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of the 5-lipoxygenase pathway in atherosclerosis of ApoE knockout mice. **Methods** Twenty-four 8-week-old male ApoE$^{-/-}$ mice with body weight of 22.42±1.21 g were randomized into control group (n=12, normal diet) and atherosclerotic model group (n=12, high fat diet). After 16 weeks' feeding, all animals were sacrificed. The corrected plaque areas (PA/LA) of the aortic were measured. The expression of 5-lipoxygenase at gene and protein levels in aorta were detected separately through RT-PCR and Western blotting. Serum levels of leukotriene B4 (LTB4) and leukotriene D4 (LTD4) were measured by ELISA. **Results** Atheromatous plaques were found in the atherosclerotic model group, indicating the successful establishment of the model. The expression of 5-LO at mRNA (0.61±0.05) and protein (1.53±0.18) levels in the aorta of atherosclerosis model group were obviously higher than those in the control group (0.18±0.03 and 0.52±0.40, P<0.01). So were the serum levels of LTB4 (34.79±4.47 *vs* 12.07±2.35, P<0.01) and LTD4 (2 862.48±48.77 *vs* 2 357.10±53.57, P<0.01). The serum levels of LTB4 and LTD4 were positively correlated with the corrected plaque areas (r=0.954, P<0.01, and r=0.946, P<0.01). **Conclusion** The 5-lipoxygenase pathway may play a significant role in the pathogenesis of atherosclerosis in ApoE knockout mice.

[**Key words**] arachidonate 5-lipoxygenase; atherosclerosis; leukotriene B4; leukotriene D4

Supported by the Project of "Eleventh Five-year Plan" of Chengdu Military Command (MA07010). Corresponding author: Yang Lixia, E-mail: doctorylixia@yahoo.com.cn

动脉粥样硬化(atherosclerosis,As)是一种慢性炎症性疾病,炎症参与了动脉粥样硬化斑块的形成和进展[1]。5-脂氧合酶通路是炎症反应的重要机制之一,5-脂氧合酶通路的终产物白三烯(leukotrienes,LTs)是参与炎症反应的重要炎性介质,过去的研究发现,白三烯在哮喘、类风湿关节炎、炎症性肠病等疾病中发挥着至关重要的作用[2]。近年来研究表明,白三烯参与了动脉粥样硬化及血管重塑,是动脉硬化的机制之一[3]。

[基金项目] 成都军区"十一五"计划课题(MA07010)

[通信作者] 杨丽霞,E-mail:doctorylixia@yahoo.com.cn

随着研究的深入,5-脂氧合酶通路在动脉粥样硬化中的作用越来越受到关注。本实验旨在研究 ApoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化病变组织内 5-脂氧合酶的表达及下游白三烯产物的血清水平的变化,探讨 5-脂氧合酶通路与动脉粥样硬化的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 ApoE$^{-/-}$小鼠 24 只,雄性,8 周龄,体质量(22.42±1.21)g,购自北京大学医学部实验动物中心,许可证编号:SCXK(京)2006-0008。

1.1.2 药品及试剂 5-LO 及 β-actin 引物由成都天泰生物技术有限公司合成。5-LO 的一抗购自 BIOASSAY TECHNOLOGY 公司,GAPDH 的一抗购自北京博奥森生物技术有限公司,二抗购自碧云天生物技术研究所。LTB4 酶联免疫试剂盒购自 R&D 公司,LTD4 酶联免疫试剂盒购自 BD 公司。RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。Western blot 试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立及取材 ApoE$^{-/-}$小鼠随机分为对照组、动脉硬化模型组(n=12)。对照组予普通饲料喂养,动脉硬化模型组予高脂饲料喂养。高脂饲料配方为:1.25% 胆固醇、15% 猪油、83.75% 普通饲料。16 周后,小鼠于末次给药后禁食不禁水过夜,通过腹腔注射戊巴比妥钠(80 mg/kg)麻醉,解剖小鼠,下腔静脉取全血用于酶联免疫测定,分别取主动脉根部 0.3 cm 用于病理学分析,取其余胸腹主动脉(自主动脉弓至髂总动脉分叉处)用于蛋白及 mRNA 分析。

1.2.2 主动脉粥样硬化的病理检测 将小鼠主动脉根部常规脱水后石蜡包埋,自主动脉根部横断面连续切片 30 张,每隔 5 张取 1 张,行 HE 染色,每只小鼠血管取 6 张连续切片的平均值进行分析。应用 Leica DMIRB 显微镜观察切片并拍照后,用 Image-Pro Plus 图像分析软件分析算出平均值进行分析,测量斑块面积(PA)、血管管腔面积(LA),计算校正斑块面积(PA/LA),并用百分比(%)表示。

1.2.3 RT-PCR 检测 5-LO 的 mRNA 表达量 按 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取总 RNA。取总 RNA 1μg 采用两步法逆转录合成 cDNA,再取逆转录产物 2 μl 进行 PCR 循环。5-LO 引物序列:上游 5′-TCTGACCTATTCCTCCCTGTGT-3′,下游 5′-CTCCCTGCTCTTGATGGACTT-3′,PCR 扩增产物长度为 274 bp。内参 β-actin 引物序列:上游 5′-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3′,下游:5′-GCTAGGAGCCAGAGCAGTAATCT-3′,PCR 扩增产物长度为 613 bp。β-actin 与 5-LO 在同一反应体系中扩增,反应体系为 50 μl。PCR 反应条件:94 ℃变性 30 s→60 ℃退火 30 s→72 ℃延伸 1 min,最后 72 ℃终止 5 min,共 30 个循环。反应结束后,取反应产物 5 μl 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,Gold vel 染色,凝胶图像分析系统扫描摄图,并分析各组 5-LO 及 β-actin 灰度值,以两者的比值代表 5-LO 转录水平。

1.2.4 Western blot 检测 5-LO 的蛋白表达量 按照蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白,各组蛋白上样 40 μg,用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭液 37 ℃ 封闭 30 min,按 1∶1 000 加入兔抗小鼠 5-LO 一抗及兔抗小鼠 GAPDH 一抗,4 ℃孵育过夜,TBST10min 洗 5 次,按 1∶1 000 的稀释倍数加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,37 ℃孵育 1 h,TBST10 min 洗 4 次,使用超敏 ECL 化学发光试剂盒发光显色,用凝胶成像仪扫描摄图并测定各组 5-LO 和 GAPDH 吸光度。GAPDH 作为内参,以二者的比值代表 5-LO 蛋白水平。

1.2.5 LTB4 及 LTD4 的 ELISA 检测 将小鼠血液室温静置 30 min,2 000 r/min 离心 15 min 后取血清。按试剂盒说明书进行检测,应用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值[D(450)]。以[D(450)]作为横坐标,以标准品的浓度值作为纵坐标,从而绘制出标准曲线。在坐标上根据样品[D(450)]测出相应浓度值。

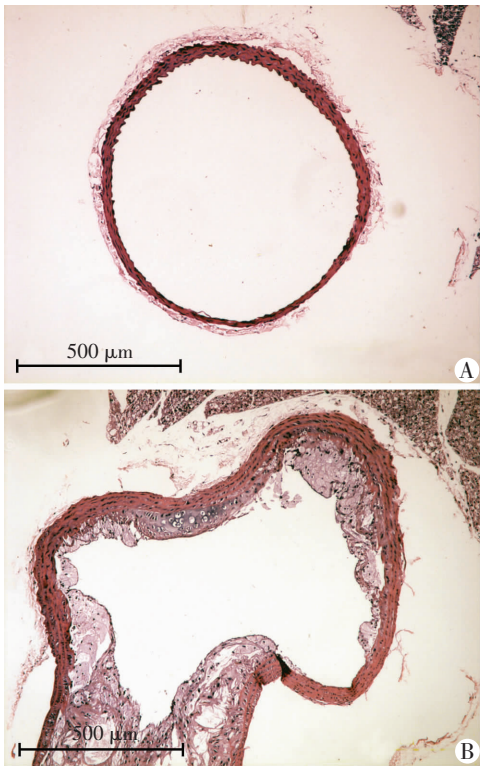
1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 t 检验进行组间差异性分析,应用 Pearson 相关分析进行血清 LTB4 及 LTD4 水平与动脉粥样硬化斑块相对面积的相关性分析,由 SPSS 17.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 主动脉粥样硬化的病理结果

对照组主动脉内膜无增厚,未见粥样斑块形成;动脉硬化模型组主动脉内膜增厚、斑块形成、管腔显著狭窄,斑块内见大量泡沫细胞、脂质丰富、纤维帽菲薄(图 1),动脉硬化模型组校正斑块面积较对照组显著升高(P<0.01,表 1)。



A:对照组;B:动脉硬化模型组

图 1 对照组与动脉硬化模型组 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉横断面粥样斑块情况的比较 (HE ×100)

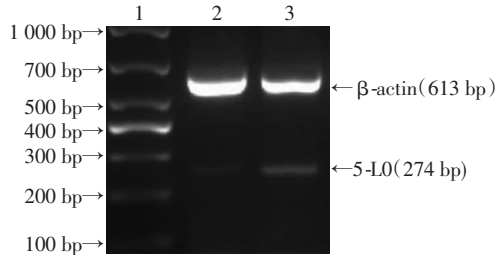
表1 对照组与动脉硬化模型组的主动脉校正斑块面积的比较($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

组别	LA(μm^2)	PA(μm^2)	PA/LA(%)
动脉硬化模型组	521 908.35±41 519.35	150 389.09±54 105.63[a]	29.08±6.46[a]
对照组	383 363.14±39 699.06	0	0

a:$P<0.01$,与对照组比较

2.2 主动脉中5-脂氧合酶的mRNA表达

动脉硬化模型组 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉中5-脂氧合酶的mRNA表达量(0.61±0.05)较空白对照组(0.18±0.03)明显升高($P<0.01$,图2)。

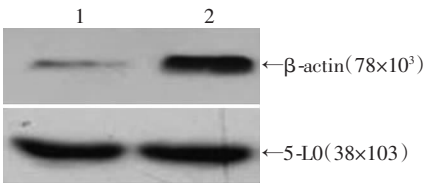


1:标准;2:对照组;3:动脉硬化模型组

图2 RT-PCR检测ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉中5-LO的mRNA表达情况

2.3 主动脉中5-脂氧合酶的蛋白表达

动脉硬化模型组 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉中5-脂氧合酶的蛋白表达量(1.53±0.18)较空白对照组(0.52±0.40)明显升高($P<0.01$,图3)。



1:对照组;2:动脉硬化模型组

图3 Western blot检测ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉中5-LO的蛋白表达

2.4 LTB4及LTD4的血清水平

动脉硬化模型组 ApoE$^{-/-}$小鼠的血清LTB4及LTD4水平较空白对照组明显升高($P<0.01$,表2)。

表2 ELISA检测ApoE$^{-/-}$小鼠的血清LTB4及LTD4水平($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

组别	LTB4(ng/ml)	LTD4(ng/L)
对照组	12.07±2.35	2 357.10±53.57
动脉硬化模型组	34.79±4.47[a]	2 862.48±48.77[a]

a:$P<0.01$,与对照组比较

2.5 血清LTB4、LTD4水平与校正斑块面积的相关性分析

对动脉硬化模型组的LTB4、LTD4的血清水平与校正斑块面积进行Pearson相关分析,结果表明,LTB4的血清水平与校正斑块面积成正相关($r=0.954$, $P<0.01$);LTD4的血清水平与校正斑块面积成正相关($r=0.946$, $P<0.01$)。

3 讨论

近年来以动脉粥样硬化为主要病理生理基础的心脑血管疾病发病率、死亡率持续上升,已严重威胁中老龄人群健康。炎症反应促进了粥样斑块进展和不稳定斑块的形成与破裂,导致心脑血管事件发生。动脉粥样硬化的发病机制相当复杂,目前认为炎症反应是动脉硬化的关键性致病机制之一。研究发现,炎症可促进主动脉脂质的异常积聚,导致动脉粥样硬化形成[4]。白三烯是参与炎症反应的重要炎性介质,也在动脉粥样硬化发生、发展以及斑块易损性中发挥着重要作用。白三烯包括LTB4和半胱氨酰白三烯(cysteinyl leukotrienes, CysLTs,包括LTC4、LTD4和LTE4)。LTB4是一种强效的化学趋化因子,可诱导白细胞及单核细胞黏附聚集于损伤处,介导炎症反应,并促进血管内膜增生。近年来研究进一步发现LTB4可诱导血管平滑肌细胞迁移和增殖,促进动脉粥样硬化形成[5]。我们前期的研究[6]发现,血浆LTB4水平与冠心病患者的Gensini积分水平即冠状动脉狭窄程度以及病变支数呈正相关。同时,CysLTs也是动脉粥样硬化形成的重要的信号分子。半胱氨酸白三烯可诱导单核细胞激活并趋化,导致单核细胞迁移入动脉壁转化为泡沫细胞[7]。CysLTs可通过其受体CysLT1和CysLT2的信号介导作用发挥生理作用。其中,LTD4与其相应受体的结合力最强,远超过LTC4和LTE4,相应的,其发挥生理作用也较LTC4和LTE4强[8-9]。基于以上原因,本实验选取了LTB4和LTD4进行检测,以代表白三烯的水平。5-脂氧合酶是催化花生四烯酸转化成白三烯的关键酶[10],也是引发动脉粥样硬化炎症发生、发展以及导致不稳定斑块形成起关键作用的物质。最近的临床研究[11]发现,急性冠脉综合征患者经5-LO抑制剂VIA-2291治疗后非钙化斑块的体积明显减少,证明了5-脂氧合酶通路在人类动脉粥样硬化病变中的作用。

本实验通过高脂饮食饲养ApoE$^{-/-}$基因敲除小鼠建立动脉粥样硬化模型,检测5-LO的表达及该通路终产物LTB4、LTD4的血清水平,探讨5-脂氧合酶通路在动脉粥样硬化发生、发展中的作用。在本研究中,动脉硬化模型组较对照组小鼠主动脉中5-LO的表达明显升高,同时伴随血清LTB4、LTD4水平的升高,且LTB4、LTD4的血清水平与校正斑块面积成正相关,提示5-LO通过上调LTB4、LTD4产物的生成,引发炎症,导致动脉粥样硬化,证实了5-脂氧合酶通路在动脉粥样硬化中的作用。本实验动脉硬化模型组的小鼠主动

脉内膜增厚、斑块形成、管腔显著狭窄,斑块内见大量泡沫细胞、脂质丰富、纤维帽菲薄,提示为不稳定性粥样斑块,结合5-LO和LTB4、LTD4的表达变化,可以推论5-脂氧合酶通路与斑块稳定性有密切关系。5-脂氧合酶通路引起斑块稳定性下降的机制目前尚不清楚。部分研究表明,5-LO及其代谢产物LTs可增强基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9在巨噬细胞中的表达,促进基质降解,导致斑块易损[12-14]。Chakrabarti等[15]发现5-脂氧合酶通路在激活大鼠内脏脂肪组织同时也上调了单核细胞趋化蛋白-1在脂肪细胞的表达,Vidal等[16]发现5-脂氧合酶抑制剂能够减少兔血管损伤模型的内/中膜比例,减轻巨噬细胞浸润,降低病变血管的核转录因子-κB(NF-κB)活性及单核细胞趋化蛋白-1的基因表达。以上研究提示5-脂氧合酶通路致斑块易损的机制可能与基质金属蛋白酶、NF-κB和MCP-1有关,具体机制有待进一步研究明确。

志谢 感谢第三军医大学新桥医院全军心血管病研究所黄岚、高旭滨教授、康华丽女士提供的实验支持

参考文献:

[1] Kriszbacher I, Koppan M, Bodis J. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. N Engl J Med, 2005, 353(4): 429-430.
[2] Sharma J N, Mohammed L A. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? [J] Inflammopharmacology, 2006, 14(1/2): 10-16.
[3] Merched A J, Ko K, Gotlinger K H, *et al*. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators[J]. FASEB J, 2008, 22(10): 3595-3606.
[4] 刘宏, 柳青, 雷寒, 等. 炎症促进清道夫受体基因敲除小鼠主动脉脂质积聚的分子机制[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(16): 1728-1731.
[5] Moraes J, Assreuy J, Canetti C, *et al*. Leukotriene B4 mediates vascular smooth muscle cell migration through αvβ3 integrin transactivation [J]. Atherosclerosis, 2010, 212(2): 406-413.
[6] 李劲松. 冠心病患者血浆内脏脂肪素、抵抗素、白三烯-B4水平及其在急性冠脉综合征易损斑块病变中的意义[D]. 昆明: 昆明医学院, 2010.
[7] Woszczek G, Chen L Y, Nagineni S, *et al*. IL-10 inhibits cysteinyl leukotriene-induced activation of human monocytes and monocyte-derived dendritic cells[J]. J Immunol, 2008, 180(11): 7597-7603.
[8] Lynch K R, O'Neill G P, Liu Q, *et al*. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor [J]. Nature, 1999, 399(6738): 789-793.
[9] Heise C E, O'Dowd B F, Figueroa D J, *et al*. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor[J]. J Biol Chem, 2000, 275(39): 30531-30536.
[10] Rodmark O, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation[J]. J Lipid Res, 2009, 50(Suppl): S40-S45.
[11] Tardif J C, L'allier P L, Ibrahim R, *et al*. Treatment with 5-lipoxygenase inhibitor VIA-2291 (Atreleuton) in patients with recent acute coronary syndrome[J]. Circ Cardiovasc Imaging, 2010, 3(3): 298-307.
[12] Lee S J, Kim C E, Yun M R, *et al*. 4-Hydroxynonenal enhances MMP-9 production in murine macrophages *via* 5-lipoxygenase-mediated activation of ERK and p38 MAPK[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 242(2): 191-198.
[13] Seo K W, Lee S J, Kim C E, *et al*. Participation of 5-lipoxygenase-derived LTB(4) in 4-hydroxynonenal-enhanced MMP-2 production in vascular smooth muscle cells[J]. Atherosclerosis, 2010, 208(1): 56-61.
[14] Yun M R, Im D S, Lee S J, *et al*. 4-Hydroxynonenal enhances CD36 expression on murine macrophages via p38 MAPK-mediated activation of 5-lipoxygenase[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(5): 692-698.
[15] Chakrabarti S K, Wen Y, Dobrian A D, *et al*. Evidence for activation of inflammatory lipoxygenase pathways in visceral adipose tissue of obese Zucker rats[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011, 300(1): E175-E187.
[16] Vidal C, Gomez-Hernandez A, Sanchez-Galan E, *et al*. Licofelone, a balanced inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, reduces inflammation in a rabbit model of atherosclerosis[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 320(1): 108-116.

(**收稿**:2011-11-12;**修回**:2012-02-08)
(编辑 栾 嘉)

声 明

本刊已入编中国知网(包括优先数字出版)和《中国学术期刊》(光盘版)。作者稿件一经录用,将同时被中国知网和《中国学术期刊》(光盘版)等数据库收录;已被本刊录用并经编辑加工的部分稿件,编辑部审查符合条件者将在印刷版期刊出版前以单篇或整期定稿的形式在中国知网平台上优先数字出版。如作者不同意收录或发布,请在投稿本刊时提出声明,否则将视为同意。

本刊编辑部