DOI:10.16016/j.1000-5404.201601075

12-脂氧合酶基因过表达对大鼠颈动脉内皮功能的影响及机制

幸 欣,张 鹏,覃 数,刘 剑,张冬颖 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心血管内科)

[摘要] **目的** 研究12-脂氧合酶(12-lipoxygenase,12-LO)过表达对内皮功能的影响,并探讨其可能的机制。**方法** SD大鼠分为假手术组(sham)、球囊损伤组(balloon injury,BI)、球囊损伤+空载组(balloon injury + lentivirus-GFP,BI + Lv-GFP)、球囊损伤+过表达组(balloon injury + lentivirus-12-LO,BI + Lv-12-LO)。除sham组外,各组行颈动脉球囊损伤术,BI + Lv-GFP组与BI + Lv-12-LO组术后转染Lv-GFP、Lv-12-LO。HE染色观察内膜增生情况,Western blot检测12-LO转染情况。定量PCR、免疫组化及Western blot检测内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)、细胞间黏附分子-1(intracellular adhesion molecule-1,ICAM-1)的表达。**结果** Lv-12-LO在血管壁成功转染并表达($P<0.01$)。与sham组比较,BI组内中膜厚度(intima-media thickness,IMT)显著升高($P<0.01$),ICAM-1 mRNA($P=0.001$)及蛋白水平($P=0.038$)表达增加,eNOS mRNA($P=0.012$)及蛋白水平($P=0.009$)表达降低。与BI + Lv-GFP组比较,BI + Lv-12-LO组IMT升高($P=0.001$),ICAM-1 mRNA($P=0.009$)及蛋白水平($P=0.002$)进一步升高,eNOS mRNA($P=0.004$)及蛋白水平($P=0.020$)进一步降低。免疫组化结果显示,球囊损伤后ICAM-1在血管壁中表达增加($P=0.007$),eNOS表达减少($P=0.001$);与BI + Lv-GFP组相比,BI + Lv-12-LO组ICAM-1表达进一步增加($P<0.01$),eNOS表达进一步减少($P<0.01$)。**结论** 12-LO过表达可能通过影响内皮因子以及炎症因子的释放而加重血管内皮功能的损伤。

[关键词] 12-脂氧合酶;内皮功能;内皮因子;炎症因子
[中图法分类号] R345;R362;R543.4 [文献标志码] A

Effects of 12-lipoxygenase overexpression on endothelial function in rat carotid artery balloon injury model

Xing Xin, Zhang Peng, Qin Shu, Liu Jian, Zhang Dongying (Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of 12-lipoxygenase (12-LO) over-expression on endothelial function and investigate its underlying mechanisms. **Methods** Sprague Dawley rats were randomly divided into sham operation group, balloon injury group (BI), balloon injury + Lentivirus-GFP group (BI + Lv-GFP), balloon injury + Lentivirus-12-LO group (BI + Lv-12-LO). Except the rats of sham operation group, all the other rats were inflicted with carotid artery balloon injury operation. BI + Lv-GFP group and BI + Lv-12-LO group were followed by being transfected with lentivirus expressing GFP or 12-LO into the injured artery. In 12 d after transfection, all rats were sacrificed. Intimal hyperplasia was observed using HE staining. The expression of 12-LO was detected by Western blotting. The expression levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were detected by real time-qPCR, immunohistochemistry and Western blotting. **Results** Lv-12-LO was successfully transfected and expressed in the vascular wall ($P<0.01$). Compared with the sham operation group, the intima-media thickness (IMT) was increased ($P<0.01$), the expression of ICAM-1 at mRNA ($P=0.001$)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81570212);国家临床重点专科建设项目(2011-170);辉瑞制药有限公司资助的临床研究项目(WS1790576)
[通信作者] 张冬颖,E-mail:zdy.chris@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160412.1338.001.html(2016-04-12)

and protein ($P=0.038$) levels was elevated, and the expression of eNOS mRNA ($P=0.012$) and protein ($P=0.009$) was decreased in the BI group. Compared with the BI + Lv-GFP group, the IMT was increased ($P=0.001$), the expression of ICAM-1 mRNA ($P=0.009$) and protein ($P=0.002$) was significantly increased, and the expression of eNOS mRNA ($P=0.004$) and protein ($P=0.020$) were significantly decreased of BI + Lv-12-LO group. Immunohistochemical assay showed the positive rate of ICAM-1 was higher ($P=0.007$), meanwhile the eNOS positive rate was lower in the BI group than the sham operation group ($P=0.001$). Compared with the BI + Lv-GFP group, the ICAM-1 positive rate was significantly increased ($P<0.01$), and the eNOS positive rate was significantly decreased ($P<0.01$) in the BI + Lv-12-LO group. **Conclusion** 12-LO over-expression aggravates the damage of vascular endothelial function by affecting the expression of endothelial factors and inflammatory factors.

[**Key words**] 12-lipoxygenase; endothelial function; endothelial factors; inflammatory factors

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81570212), the National Clinical Key-discipline Construction Program of China (2011-170) and the Clinical Research Project of Pfizer Pharmaceutical Ltd (WS1790576). Corresponding author: Zhang Dongying, E-mail: zdy.chris@gmail.com

脂氧合酶(lipoxygenase,LOXs)是不饱和脂肪酸代谢的关键酶,可催化一系列多不饱和脂肪酸生成具有生物活性的脂类介质。12-脂氧合酶(12-lipoxygenase,12-LO)可分为3种类型:血小板型、白细胞型和表皮型。大鼠、小鼠、猪等主要表达白细胞型12-LO,与主要表达在人、兔的15-脂氧合酶(15-lipoxygenase,15-LO)高度同源,合称12/15-脂氧合酶(12/15-lipoxygenase,12/15-LO)[1]。既往研究表明12/15-LO的表达水平显著影响血管内皮细胞的功能,但这种作用尚存在争议[2]。因此,本实验通过建立大鼠颈动脉球囊损伤模型,探讨12-LO对血管内皮功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

雄性SD大鼠30只,体质量380~420 g,购于重庆医科大学实验动物中心;12-LO过表达慢病毒和慢病毒阴性对照(基因ID号:NM_031010),均购于吉凯基因公司;Fogarty动脉取血栓导管(2F),购于美国爱德华生命科学有限公司;RNA试剂盒、逆转录试剂盒、荧光染料SYBR,购于TaKaRa公司;PCR引物由TaKaRa公司合成;免疫组化试剂盒,购于中杉金桥;兔抗eNOS一抗购于Santa Cruz公司;小鼠抗12-LO一抗、小鼠抗ICAM-1一抗,购于Abcam公司;羊抗小鼠二抗、羊抗兔二抗,购于中国碧云天公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将30只SD大鼠分为假手术组(sham组,$n=6$)、球囊损伤组(balloon injury,BI组,$n=8$)、球囊损伤+空载组(balloon injury + lentivirus-GFP,BI + Lv-GFP组,$n=8$)、球囊损伤+过表达组(balloon injury + lentivirus-12-LO,BI + Lv-12-LO组,$n=8$)。除sham组外,所有大鼠行左颈总动脉球囊损伤术,BI + Lv-GFP组和BI + Lv-12-LO在损伤的颈动脉局部转染慢病毒。

1.2.2 球囊损伤与慢病毒转染 参考既往的建模方法[3],10%水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉,无菌操作暴露左颈总动脉,分离周围组织至动脉分叉处,结扎颈外动脉远端及其分支,并用动脉夹暂时阻断颈内动脉及颈总动脉近心端血流。在距动脉分叉处5~10 mm的颈外动脉远心端剪一小切口,插入2F动脉取血栓导管约2 cm,从导管注入0.2 mL空气扩张球囊,反复来回拉动球囊3次。撤除球囊导管后,用生理盐水冲洗管腔,注入慢病毒介导的GFP或12-LO(1.0×10^8 TU/mL)100 μL,夹闭颈总动脉分叉处,保留30 min。吸出病毒液,生理盐水冲洗管腔,颈动脉注入肝素100 U/kg,结扎颈外动脉切口。恢复颈内动脉和颈总动脉血流,封闭切口。sham组仅分离出左颈总动脉,不予以球囊损伤。

1.2.3 样本采集与保存 术后14 d处死大鼠,快速剪下左侧颈总动脉约2 cm,一部分迅速放入液氮中保存;另一部分生理盐水冲洗后置入4%多聚甲醛中固定。

1.3 指标检测

1.3.1 慢病毒在损伤动脉壁转染效率的测定 处死大鼠后,取出转染慢病毒的血管节段,PBS清洗血管腔,立即行冰冻切片,甘油封片。置于荧光显微镜下观察GFP表达情况,评价慢病毒在损伤动脉壁的转染情况。

1.3.2 组织形态学观察 血管组织经固定、脱水后,行石蜡包埋,间断切片,厚度约4 μm。切片行HE染色,光学显微镜观察血管内膜增生情况及平滑肌细胞的增殖、移行。并用Image Pro Plus 6.0图像分析软件测定血管内中膜厚度(intima-media thickness,IMT)。

1.3.3 定量PCR检测eNOS、ICAM-1 mRNA表达水平 取出左颈总动脉后,取适量血管组织加入

TRIzol 试剂充分裂解、匀浆管匀浆、提取 RNA、测定浓度、逆转录制备 cDNA。引物序列见表 1。以 cDNA 为模板,PCR 反应条件为:95 ℃预变性 2 min,95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,40 个 PCR 循环。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1　引物序列与片段长度

引物	引物序列	长度(bp)
ICAM-1	上游 5′-TGGGGTTGGAGACTAACTGGAT-3′	22
	下游 5′-TCGCTCTGGGAACGAATACAC-3′	21
eNOS	上游 5′-ATGTTTGTCTGCGGTGATGTC-3′	21
	下游 5′-AATGTCCTCGTGGTAGCGTTG-3′	21
GAPDH	上游 5′-AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3′	22
	下游 5′-CGCCAGTAGACTCCACGACATA-3′	22

1.3.4　免疫组织化学染色法检测 eNOS、ICAM-1 在血管壁的表达　　将血管石蜡包埋,常规切片,参照试剂盒方法步骤,行二甲苯脱蜡,水化,3% H_2O_2 阻断 10 min,组织抗原修复,正常山羊血清封闭 10 min,一抗 4 ℃孵育过夜:eNOS(1∶250)、ICAM-1(1∶200)。生物素化二抗工作液 37 ℃孵育 20 min,辣根酶标记链霉卵白素工作液 37 ℃孵育 20 min,DAB 显色,苏木精复染,封片。光学显微镜下每张随机取 5 个高倍镜视野,应用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件对每个视野中阳性细胞的光密度值行半定量分析。

1.3.5　Western blot 检测 12-LO、eNOS、ICAM-1 蛋白表达水平　　提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后煮沸变性。每组取 40 μg 蛋白上样,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,将蛋白转移到硝酸纤维 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗 12-LO(1∶500)、eNOS(1∶500)、ICAM-1(1∶1 000),4 ℃孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔 IgG 抗体、羊抗小鼠 IgG 抗体,均为 1∶1 000)37 ℃孵育 1 h。ECL 化学显色,Bio-Rad 凝胶成像系统分析条带,以 GAPDH 作为内参。

1.4　统计学分析

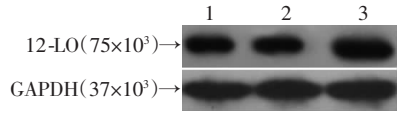
实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件分析,应用单因素方差分析比较多组数据的差异,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　慢病毒在球囊损伤血管内的表达

在荧光显微镜下观察发现,球囊损伤后未转染慢病毒的 BI 组仅见中膜弹力层有自发性绿色荧光,内膜组织无荧光。血管球囊损伤处转染慢病毒介导的 GFP、12-LO 后可见增生的内膜组织内有较强的绿色荧光分布(图 1)。

Western blot 检测结果显示,NC 组和 Lv-GFP 组的 12-LO 表达差异无统计学意义[(1.00 ± 0.20) *vs* (1.01 ± 0.14),$P=0.971$]。而 Lv-12-LO 组 12-LO 表达较 Lv-GFP 组明显升高[(2.48 ± 0.53) *vs* (1.01 ± 0.14),$P<0.01$]。上述结果说明慢病毒成功转染血管壁并表达(图 2)。



1:NC 组;2:Lv-GFP 组;3:Lv-12-LO 组

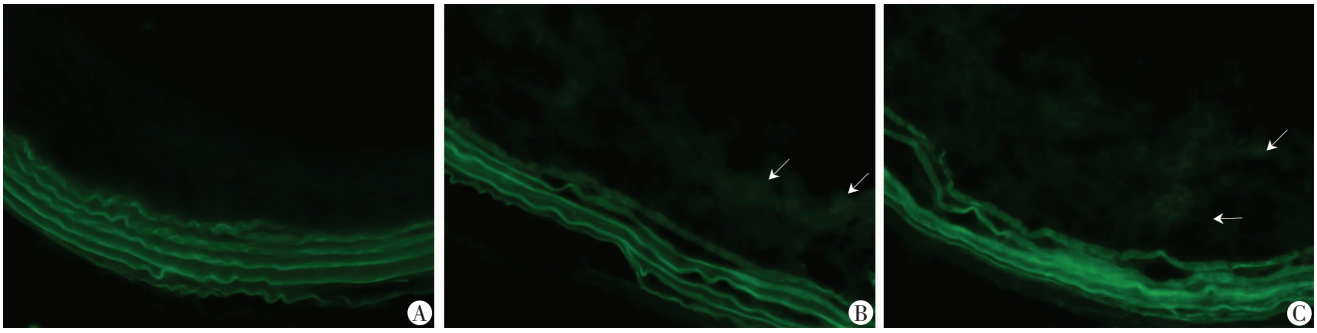
图 2　Western blot 检测各组大鼠转染慢病毒介导的 12-LO 表达水平

2.2　大鼠颈动脉病理变化

sham 组大鼠颈总动脉镜下仅见单层内皮细胞,内弹力膜完整。球囊损伤后可见损伤处新生内膜呈不均一增厚,管腔明显狭窄,管壁增厚,内皮下组织增生明显(图 3)。与 sham 组相比较,BI 组 IMT 升高[(0.13 ± 0.01) *vs* (0.08 ± 0.01),$P<0.01$];BI + Lv-12-LO 组 IMT 比值较 BI + Lv-GFP 组明显增加[(0.15 ± 0.01) *vs* (0.13 ± 0.01),$P=0.001$]。

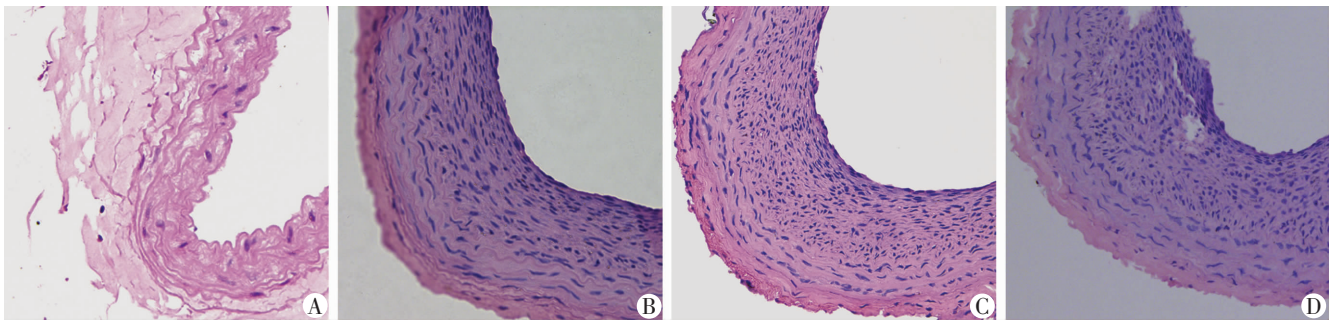
2.3　12-LO 过表达对 ICAM-1、eNOS 表达的影响

定量 PCR 检测结果显示,与 sham 组相比,BI 组 ICAM-1 表达显著升高[(1.80 ± 0.12) *vs* (1.00 ± 0.09),$P=0.001$],eNOS 表达显著降低[(0.79 ± 0.07) *vs* (1.00 ± 0.07),$P=0.012$]。与 BI + Lv-GFP 组相比,BI + Lv-12-LO 组中 ICAM-1 mRNA 表达水平进一步升高[(2.18 ± 0.14) *vs* (1.78 ± 0.18),$P=0.009$],eNOS mRNA 表达水平进一步降低[(0.49 ± 0.06) *vs* (0.73 ± 0.09),$P=0.004$]。



A:NC 组;B:Lv-GFP 组;C:Lv-12-LO 组　↑:示 GFP

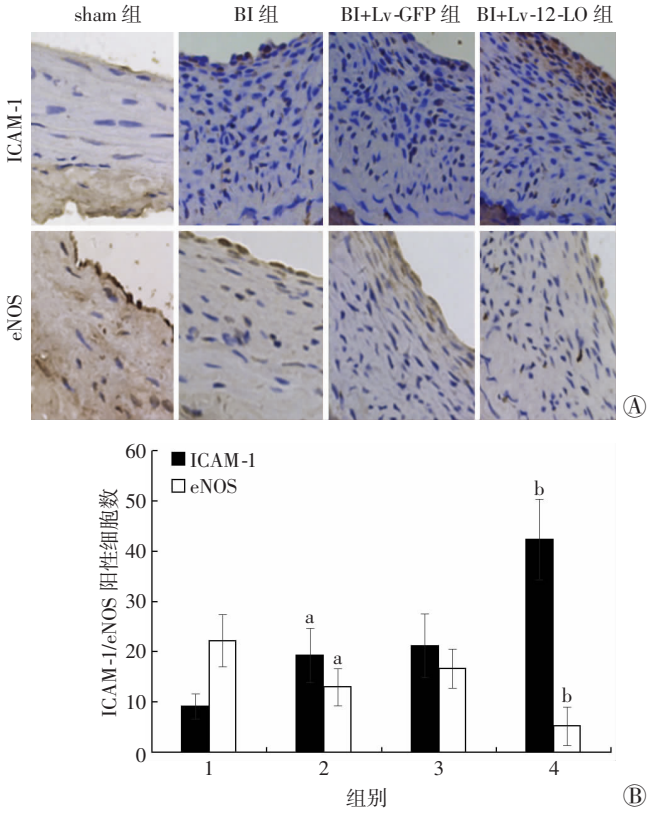
图 1　荧光显微镜观察各组大鼠转染慢病毒介导的 GFP、12-LO 表达　(×400)



A:sham 组;B:BI 组;C:BI + Lv-GFP 组;D:BI + Lv-12-LO 组

图 3　光学显微镜观察各组大鼠血管内中膜厚度变化　(HE ×200)

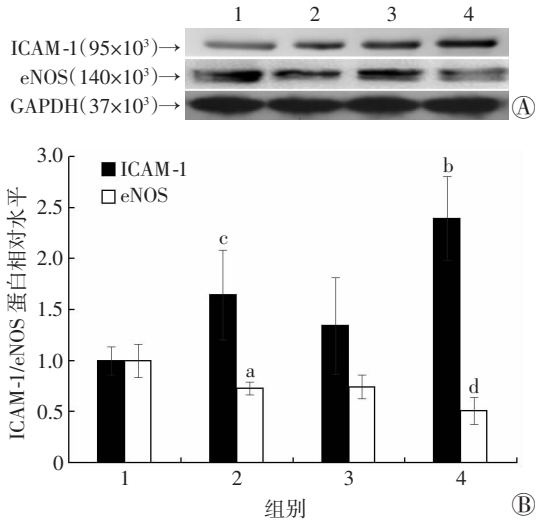
ICAM-1、eNOS 免疫组化阳性染色为棕黄色。与 sham 组相比,BI 组中 ICAM-1 阳性细胞数显著增多(P = 0.007),eNOS 阳性细胞数显著减少(P = 0.001),与 BI + Lv-GFP 组相比,BI + Lv12-LO 过表达组 ICAM-1 阳性细胞数进一步增多(P < 0.01),eNOS 阳性细胞数进一步减少(P < 0.01,图 4A、B)。



A:免疫组化检测结果(S-P ×400);B:定量 PCR 检测结果　1:sham 组;2:BI 组;3:BI + Lv-GFP 组;4:BI + Lv-12-LO 组　a:P < 0.01,与 Sham 组比较;b:P < 0.01,与 BI + Lv-GFP 组比较

图 4　免疫组化检测各组大鼠炎症因子 ICAM-1 和内皮因子 eNOS 的表达

同免疫组化结果一致,Western blot 检测结果显示,与 sham 组相比,BI 组 ICAM-1 表达明显升高(P = 0.038),eNOS 表达明显降低(P = 0.009)。与 BI + Lv-GFP 组相比,BI + Lv-12-LO 组中 ICAM-1 蛋白表达水平进一步升高(P = 0.002),eNOS 蛋白表达水平进一步降低(P = 0.020,图 5A、B)。



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析　1:sham 组;2:BI 组;3:BI + Lv-GFP 组;4:BI + Lv-12-LO 组　a:P < 0.01,与 sham 组比较;b:P < 0.01,与 BI + Lv-GFP 组比较;c:P < 0.05,与 sham 组比较;d:P < 0.05,与 BI + Lv-GFP 组比较

图 5　Western blot 检测各组大鼠炎症因子 ICAM-1 和内皮因子 eNOS 的表达

3　讨论

血管内皮功能障碍是动脉粥样硬化发生和加重的关键因素。血管内皮损伤后可导致血管张力异常,脂质浸润增加,白细胞黏附迁移,血管平滑肌细胞增殖等,是动脉粥样硬化形成的早期始动环节[4]。研究发现,12/15-LO 通过调节炎症反应参与动脉粥样硬化疾病的发生、发展[5]。尽管其具体作用尚存在争议,但更多的研究表明,12/15-LO 具有促动脉粥样硬化的作用。本模型研究结果显示,球囊损伤术后,大鼠左颈动脉平滑肌细胞增生迁移,排列紊乱,内膜明显增厚,管腔狭窄。血管内皮功能紊乱和内皮完整性的破坏是动

脉粥样硬化发生的始动环节,主要表现为血管张力的变化和粘附分子的异常表达。eNOS 是血管中一氧化氮(nitric oxide,NO)的主要来源,在血管内皮保护中具有重要意义。ICAM-1 在增生的血管内皮细胞中表达最强,ICAM-1 与单核细胞表面的整合素类结合,促进单核细胞与内皮细胞的黏附,为单核细胞迁入内皮下创造条件[6]。本实验球囊损伤后,大鼠颈动脉 eNOS 表达减少,ICAM-1 表达增加,提示内皮功能障碍。这与常静等[7]和王敬祥等[8]的报道一致,其机制可能与内皮细胞损伤后激活,继而表达大量粘附分子有关。

本实验成功建立 12-LO 过表达模型,同时我们发现,与阴性载体组相比,12-LO 过表达后大鼠颈动脉 IMT 增厚更加显著,也提示我们 12-LO 的过表达可能通过对炎症以及内皮因子的影响从而导致这种现象的发生。本研究发现 12-LO 的过表达使得 ICAM-1 的表达进一步增高,同时,eNOS 表达进一步降低,提示 12-LO 过表达在体内似乎起着促进炎症因子以及减少内皮因子释放的作用。既往关于 12/15-LO 对炎症的影响存在争议。Kronke 等[9]研究发现随着 12/15-LO 表达下降,小鼠体内炎症反应和组织损伤逐渐加重。12/15-LO 的产物 12(S)-HETE、15(S)-HETE 等为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的内源性配体[10],在大鼠脑缺血损伤模型中,给予外源性的 12(S)-HETE、15(S)-HETE 可激活 PPARγ,抑制核转录因子的活性,从而抑制炎症反应[11]。同时有研究表明 12/15-LO 可能具有促进炎症因子释放的作用。Ibrahim 等[12]研究发现 12/15-LO 可通过 NADPH 氧化酶生成氧自由基,从而通过多种信号通路,促进炎症因子表达、单核细胞聚集粘附等。12/15-LO 参与低密度脂蛋白的氧化,是血管炎症发生的早期关键事件,氧化型低密度脂蛋白通过启动下游信号的级联反应,加重炎症反应,引起内皮功能紊乱,进而形成动脉粥样硬化斑块。Anning 等[13]研究发现,在 12/15-LO$^{-/-}$小鼠中 eNOS 表达增加,NO 生物活性显著增强。造成以上研究的差异可能与研究种属类别、饮食情况以及 12/15-LO 及其代谢产物在不同细胞种类之间的表达差异有关。

本实验通过建立颈动脉球囊损伤和慢病毒转染的模型,发现 12-LO 过表达可能减少内皮因子表达和促进炎症因子释放,从而加重血管内皮损伤。12-LO 与动脉粥样硬化密切相关,明确 12-LO 在动脉粥样硬化中的作用将为以后治疗动脉粥样硬化提供一个新的方向。

参考文献:

[1] Rossaint J, Nadler J L, Ley K, *et al*. Eliminating or blocking 12/15-lipoxygenase reduces neutrophil recruitment in mouse models of acute lung injury[J]. Crit Care, 2012, 16(5): R166. DOI: 10.1186/cc11518

[2] Wuest S J, Crucet M, Gemperle C, *et al*. Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages[J]. Atherosclerosis, 2012, 225(1): 121 - 127. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.022

[3] Zhang X W, Wang Y, Cai J B, *et al*. Downregulation of quinone reductase 2 attenuates vascular smooth muscle cells proliferation and neointimal formation in balloon injured rat carotid artery[J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 29(3/4): 453 - 462. DOI: 10.1159/000338499

[4] Vanhoutte P M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis[J]. Circ J, 2009, 73(4): 595 - 601. DOI: 10.1253/circj.CJ-08-1169

[5] Powell W S, Rokach J. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1851(4): 340 - 355. DOI: 10.1016/j.bbalip.2014.10.008

[6] 陈旭, 朱莉, 郝青青, 等. 血管紧张素转化酶 2 基因转染对动脉硬化血管内皮细胞的保护作用[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2014, 34(4): 496 - 500. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2014.04.019

[7] 常静, 芦玲巧, 曾翔俊, 等. 细胞色素 2J3 基因转染减轻大鼠胸主动脉球囊损伤后血管狭窄程度的初步机制[J]. 微循环学杂志, 2013, 23(4): 24 - 26. DOI: 10.3969/ j.issn.1005-1740.2013.04.007

[8] 王敬祥, 张月兰, 田文, 等. 阿托伐他汀在大鼠颈总动脉球囊损伤模型中对 NF-κB 及其相关炎性因子的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(2): 135 - 139. DOI: 10.7666/d.y1892466

[9] Kronke G, Katzenbeisser J, Uderhardt S, *et al*. 12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis[J]. J Immunol, 2009, 183(5): 3383 - 3389. DOI: 10.4049/jimmunol.0900327

[10] 韩晶, 孙莉, 梁浩, 等. 12/15-脂氧酶反义寡核苷酸对氧糖剥夺损伤皮质神经元中 PPARγ 核移位的影响[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(15): 1179 - 1183. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2014.15.016

[11] Sun L, Xu Y W, Han J, *et al*. 12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPARgamma: a possible neuroprotective effect in ischemic brain[J]. J Lipid Res, 2015, 56(3): 502 - 514. DOI: 10.1194/jlr.M053058

[12] Ibrahim A S, Elshafey S, Sellak H, *et al*. A lipidomic screen of hyperglycemia-treated HRECs links 12/15-Lipoxygenase to microvascular dysfunction during diabetic retinopathy *via* NADPH oxidase[J]. J Lipid Res, 2015, 56(3): 599 - 611. DOI: 10.1194/jlr.M056069

[13] Anning P B, Coles B, Bermudez-Fajardo A, *et al*. Elevated endothelial nitric oxide bioactivity and resistance to angiotensin-dependent hypertension in 12/15-lipoxygenase knockout mice[J]. Am J Pathol, 2005, 166(3): 653 - 662. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62287-0

(**收稿**:2016-01-13;**修回**:2016-01-17)

(编辑 邓强庭)