

[文章编号] 1007-3949(2006)14-01-0037-04

• 实验研究 •

## 动脉粥样硬化兔血管血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达及雷米普利的干预作用

刘忠志<sup>1</sup>, 董波<sup>1</sup>, 刘同宝<sup>1</sup>, 许晓群<sup>2</sup>, 于永慧<sup>1</sup>, 刘莹<sup>1</sup>

(1. 山东大学山东省立医院; 2. 山东省医学科学院, 山东省济南市 250012)

[关键词] 病理学与病理生理学; 雷米普利对血管血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响; 免疫组织化学与逆转录聚合酶链反应; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; 动脉粥样硬化; 雷米普利; 家兔

[摘要] 目的 探讨血管紧张素转化酶抑制剂对动脉粥样硬化家兔血管血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响。方法 以家兔动脉粥样硬化模型为研究对象, 采用免疫组织化学和逆转录聚合酶链反应方法评价动脉粥样硬化家兔血管血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白和信使核糖核酸表达及口服雷米普利的干预效应。结果 高脂组血管血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白和信使核糖核酸表达均显著增加, 雷米普利组血管血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白和信使核糖核酸表达水平较高脂组显著下降 ( $P$  均  $< 0.05$ )。结论 结果提示, 服用雷米普利可明显抑制动脉粥样硬化病变血管血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白和信使核糖核酸表达, 从而可能在动脉粥样硬化的预防中起重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of Ramipril on Expression of Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 in Rabbit Model of Atherosclerosis

LIU Zhong-Zhi<sup>1</sup>, DONG Bo<sup>1</sup>, LIU Tong-Bao<sup>1</sup>, XU Xiao-Qun<sup>2</sup>, YU Yong-Hui<sup>1</sup>, and LIU Ying<sup>1</sup>

(1. Shandong Provincial Hospital, Shandong University; 2. Shandong Provincial Medical Academy, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1; Ramipril; Rabbits; Immunohistochemistry; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Ramipril on expression of lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in a rabbit model of atherosclerosis. **Methods** Twenty-four male New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: normal diet group, hypercholesterol diet group and Ramipril-treated group. Expression of lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in a rabbit model of atherosclerosis was detected by immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Expression of LOX-1 in hypercholesterol group significantly increased compared with normal diet group. There was a significant decrease in expression of LOX-1 in the Ramipril-treated group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ramipril inhibits vascular LOX-1 expression, which may play an important role in prevention of atherosclerosis.

血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 的主要功能是介导血管内皮细胞摄取氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), 从而导致内皮细胞功能的损伤。研究表明 LOX-1 的表达是血管内皮细胞出现功能异常的最早期标志, 在粘附分子的产生及动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)

的形成中起重要作用<sup>1,2</sup>。Li 等<sup>3</sup>发现血管紧张素 (angiotensin, Ang) 可显著增加人冠状动脉内皮细胞 LOX-1 mRNA 及蛋白质的表达量, 且其表达量随着 Ang 浓度的增加而增加, Ang 的这些作用可以被洛沙坦阻断。但 LOX-1 在体血管表达及药物干预的报道尚少见。本文观察了血管紧张素转化酶抑制剂雷米普利对 As 家兔血管 LOX-1 表达的影响, 以探讨血管紧张素转化酶抑制剂预防 As 的机制。

[收稿日期] 2005-03-24

[修回日期] 2005-11-30

[作者简介] 刘忠志, 硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向为冠心病的发病机制及治疗, 联系电话为 0531-85186356, E-mail 为 liuzhongzhi@126.com。董波, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, 联系电话为 0531-85186356。刘同宝, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病, 联系电话为 0531-85186356。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及分组

雄性新西兰大白兔 24 只, 体重 1.45~1.62 kg (山东省农科院畜牧兽医研究所), 分笼喂养, 随机分为 3 组, 每组 8 只: 正常组, 饲以正常颗粒饲料; ④

高脂组, 饲以高胆固醇饲料(1%胆固醇+5%猪油的颗粒饲料); 四雷米普利组, 饲以高胆固醇饲料加雷米普利每天1 mg/kg, 管饲法, 共喂养16周。

### 1.2 标本处理

麻醉状态下剖开动物胸腔, 剥离升主动脉全长, 去除外膜脂肪组织, 升主动脉分成2段, 上段置于液氮中保存, 下段置于4%多聚甲醛中固定。

### 1.3 血清学检测血脂浓度

在试验结束前, 分别于3组兔耳缘静脉取血, 利用日本Olympus AU5400全自动生物化学分析仪及血生物化学测定试剂盒, 测定总胆固醇(total cholesterol, TC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC), TC采用终点法, LDLC采用免疫比浊法。

### 1.4 病理形态学观察及免疫组织化学染色

取升主动脉常规固定, 石蜡包埋, 连续切片, 厚度为0.4~0.5  $\mu\text{m}$ , 做常规苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色及LOX-1免疫组织化学染色。LOX-1免疫组织化学染色采用ABC法, DAB显色, 棕黄色产物为阳性染色。羊抗鼠LOX-1多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 羊抗鼠多克隆抗体与兔同源性76%, 山羊ABC染色系统亦购自美国Santa Cruz公司。LOX-1多克隆抗体的工作浓度为1:100。具体步骤参照试剂盒说明书。阴性对照片以PBS替代LOX-1多克隆抗体。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应检测血管血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1信使核糖核酸表达

采用异硫氰酸胍(guanidinium isothiocyanate, GIT)一氯仿一步法提取快速冰冻胸主动脉组织内总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)。取细胞总RNA 1  $\mu\text{g}$ , 寡脱氧胸苷酸(oligodeoxythymidylic, oligo-dT)和莫洛尼氏鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, MMLV)逆转录酶(美国Invitrogen公司)在20  $\mu\text{L}$ 体系内37  $^{\circ}\text{C}$  1 h 逆转录、95  $^{\circ}\text{C}$  10 min 灭活MMLV。取全部逆转录后产物作为聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)模板进行PCR扩增。扩增以磷酸甘醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参照, 引物由上海生工公司合成, 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1上游引物序列为: 5'-CAA GAG GCT CTG AAG AGA ATG G-3', 下游引物序列为: 5'-TAT GCA CAG GTG CCT GAA GG-3', PCR产物344 bp; GAPDH上游引物序列为: 5'-GAG CTG AAC GGG AAA CTC AG-3', 下游引物序列为: 5'-GGT CTG GGA TGG AAA CTG TG-3', PCR产物476 bp。反应体系中加入上游引物1  $\mu\text{L}$ 、嗜热

水生菌脱氧核糖核酸(thermus aquaticus deoxyribonucleic acid, Taq DNA)聚合酶(立陶宛MBI公司)2  $\mu\text{L}$  (1 U/  $\mu\text{L}$ ), 在PTC-150型PCR扩增仪(美国MJ Research公司)上进行循环: 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min  $\rightarrow$  58  $^{\circ}\text{C}$  1 min  $\rightarrow$  72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共35个循环, 最后72  $^{\circ}\text{C}$  延长7 min。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 紫光灯下拍照, 将凝胶电泳图像输入美国Kodak凝胶分析系统, 应用1D Image Analysis Software进行表达强度分析, 计算LOX-1与GAPDH扩增条带吸光度比值作为其表达强度(相对系数=LOX-1吸光度值/GAPDH吸光度值)。

### 1.6 图像分析

采用美国Media Cybernetics公司Image-Pro Plus图像分析系统测量HE染色切片胸主动脉内膜厚度(intimal thickness, I)、中膜厚度(medial thickness, M), 计算I/M。同时采用该系统测量免疫组织化学染色切片上阳性染色信号的平均光密度值。

### 1.7 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验数据用SPSS11.0统计软件进行统计分析, 组间比较用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组血脂水平的比较

高脂组及雷米普利组血脂较正常组明显升高( $P < 0.05$ ), 高脂组与雷米普利组比较血脂的差异无统计学意义(表1)。

表1. 各组血脂水平的比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

分 组	TC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)
正常组	0.82 $\pm$ 0.24	0.49 $\pm$ 0.14
高脂组	40.16 $\pm$ 6.55 <sup>a</sup>	14.29 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>
雷米普利组	38.99 $\pm$ 6.20 <sup>a</sup>	13.90 $\pm$ 3.03 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与正常组比较。

### 2.2 胸主动脉病理形态学改变

光镜下正常组兔内膜薄且结构完整; 高脂组兔主动脉管腔明显变窄且大小不规则, 内膜明显增厚, 脂质斑块弥漫, 内有泡沫细胞大量积聚, 几乎覆盖于整个管腔表面, 中膜平滑肌细胞排列紊乱; 雷米普利组管腔扩大, 斑块厚度减小, 泡沫细胞数目减少, 体积变小, 胞内空泡明显减少(图1)。形态学定量分析显示, 与正常组比较, 高脂组I/M显著增大, 雷米普利治疗后明显改善, 内膜厚度及I/M均较高脂组

明显减少(表 2)。

表 2. 三组胸主动脉病理形态学定量分析的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

分 组	内膜厚度( $\mu\text{m}$ )	中膜厚度( $\mu\text{m}$ )	内膜/中膜厚度
正常组	15 $\pm$ 4	321 $\pm$ 51	0.05 $\pm$ 0.01
高脂组	523 $\pm$ 57 <sup>a</sup>	396 $\pm$ 67	1.26 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>
雷米普利组	311 $\pm$ 63 <sup>ab</sup>	384 $\pm$ 80	0.82 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与正常组比较, b 为  $P < 0.05$ , 与高脂组比较。

### 2.3 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 免疫组织化学染色分析结果

棕黄色阳性颗粒主要表达在增厚的内膜内皮细胞和泡沫细胞的胞浆及胞膜中, 正常组未见 LOX-1 抗原表达, 高脂组 LOX-1 抗原表达明显增强, 棕黄色颗粒粗大密集(平均光密度值为  $0.2176 \pm 0.0162$ ), 雷米普利组 LOX-1 抗原表达较高脂组明显减弱, 棕黄色颗粒细小稀疏(平均光密度值为  $0.1409 \pm 0.0158$ ,  $P < 0.05$ ), 说明雷米普利可抑制 LOX-1 抗原表达(图 2)。

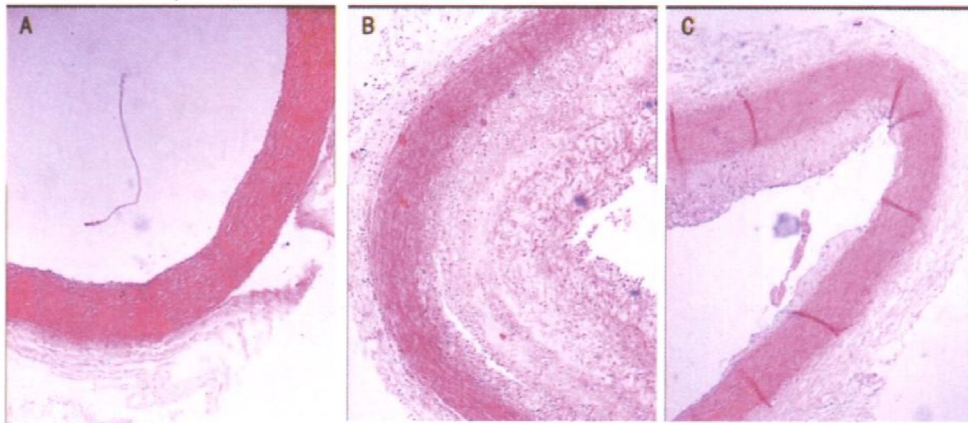


图 1. 各组光镜下兔胸主动脉病理改变(HE 染色  $4 \times 10$ ) A 为正常组, B 为高脂组, C 为雷米普利组。

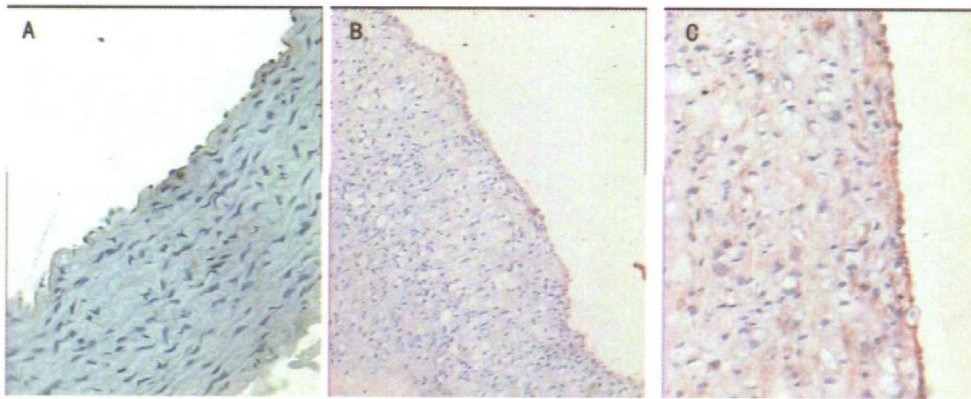


图 2. 各组光镜下兔胸主动脉免疫组织化学切片( $20 \times 10$ ) A 为正常组, B 为高脂组, C 为雷米普利组。

### 2.4 胸主动脉信使核糖核酸表达

逆转录聚合酶链反应检测显示, 正常组胸主动脉有极微量 LOX-1 mRNA 表达(相对系数  $0.1813 \pm 0.0795$ ), 高脂组其表达较对正常组明显升高(相对系数  $0.6750 \pm 0.1363$ ,  $P < 0.05$ ), 而雷米普利治疗后其表达较高脂组明显下调(相对系数  $0.4638 \pm 0.1385$ ,  $P < 0.05$ )(图 3)。

## 3 讨论

动脉粥样硬化(As)是心脑血管病的共同病理基

础, LOX-1 在动脉粥样硬化的发生发展中具有重要的作用。LOX-1 能够促进内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞  $\text{ox-LDL}$  的摄取; 促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)的合成; 减少内皮细胞 NO 分泌; 促进炎性细胞聚集; 促进平滑肌细胞增殖; 促使平滑肌细胞和巨噬细胞转变为泡沫细胞<sup>[4]</sup>。

本研究发现, 动脉粥样硬化兔中 LOX-1 的表达明显增加, 这与国外研究结果类似, 其机制可能与高脂血症导致的脂质代谢紊乱有关。研究表明, 残余脂蛋白颗粒可以促进 LOX-1 表达, 激活还原型辅酶



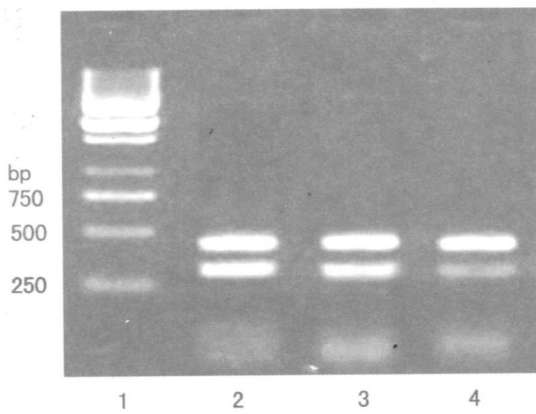


图3. 雷米普利对血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1 mRNA表达的影响 1为Marker, 2为高脂组, 3为雷米普利组, 4为正常组。

⑤ (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶, 从而导致超氧阴离子和细胞因子(肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素 $1\beta$ )表达明显增多<sup>[5]</sup>, 超氧阴离子和细胞因子(肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素 $1\beta$ )又可促进 LOX-1 的表达, 形成一个正反馈, 导致 LOX-1 大量表达。同时 Maingrette 等<sup>[6]</sup>发现, 十八碳二烯-9, 12-酸 (linoleic acid, LA) 能够促进人主动脉内皮细胞 (human aortic endothelial cell, HAECs) LOX-1 基因和蛋白的表达, 随着时间延长和 LA 剂量的增加, LOX-1 表达量增加。

在 As 的发生发展中, 脂质代谢紊乱和 RAS 系统相互作用、相互影响。Ang ⑤可显著增加 LOX-1 mRNA 及蛋白质的表达量, 并且其表达量的增加随着 Ang ⑤浓度的增加而增加。在 Ang ⑤存在的情况下, LOX-1 表达的增加是内皮细胞对 ox-LDL 摄取增加的基础。另外, Ang ⑤增强 ox-LDL 介导的人冠状动脉内皮细胞 (human coronary artery endothelial cell, HCAECs) 损伤<sup>[7]</sup>。同时研究发现, ox-LDL 在 HCAECs 中通过 LOX-1 的激活诱导血管紧张素转化酶 (angiotensin conversion enzyme, ACE) 的基因表达, 促细胞分裂素-活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的激活在此过程中发挥信号传导作用; 3-羟基-3-甲戊二酰辅酶 A (hydroxy-methyl-glutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制剂斯伐他汀通过抑制 MAPK 的激活从而阻抑 ox-LDL 介导的 ACE 上调<sup>[8]</sup>。

本研究进一步观察了血管紧张素转化酶抑制剂雷米普利对 LOX-1 蛋白和基因表达的影响, 发现雷米普利能够显著抑制 LOX-1 蛋白和基因表达。其机制有待进一步深入研究, 可能与雷米普利抑制血管紧张素 ⑤生成, 阻断了 Ang ⑤ AT1R-还原型辅酶 1 氧化酶信号途径<sup>[9]</sup> 与 Ang ⑤ AT1R-核因子  $\kappa$ B 信号途径有关<sup>[10]</sup>。同时 Marielle 等<sup>[11]</sup>发现雷米普利能够抑制小鼠巨噬细胞 ox-LDL 的摄取, 从而阻断了 ox-LDL 介导的 LOX-1 的表达。

综上所述, 雷米普利能抑制动脉粥样硬化兔 LOX-1 表达, 具有明确的抗动脉粥样硬化作用。

#### [参考文献]

- [1] Murase T, Kume N, Kataoka H, Minami M, Sawamura T, Masaki T. Identification of soluble forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1 [J]. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (3): 715-720
- [2] Mehta JL, Li D. Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, **39** (9): 1429-435
- [3] Li DY, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cell by angiotensin ⑤ type 1 receptor activation [J]. *Circ Res*, 1999, **84** (9): 1043-049
- [4] Cilingiroglu M, Ozer K. The lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor and its role in atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2005, **7** (2): 103-107
- [5] Shin HK, Kim YK, Kim KY, Lee JH, Hong KW. Remnant lipoprotein particles induce apoptosis in endothelial cell by NAD(P)H oxidase-mediated production of superoxide and cytokines via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 activation: prevention by cilostazol [J]. *Circulation*, 2004, **109** (8): 1022-028
- [6] Maingrette F, Renier G. Linoleic acid increases lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in human aortic endothelial cell [J]. *Diabetes*, 2005, **54** (5): 1506-513
- [7] Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cell: the potential role of transcription factor NF- $\kappa$ B [J]. *Circulation*, 2000, **102** (16): 1907-919
- [8] Li D, Singh RM, Liu L, Chen H, Singh BM, Kazzaz N, et al. Oxidized LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cell [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, **57** (1): 238-243
- [9] Rueckschloss U, Quim MT, Holtz J, Morawetz H. Dose-dependent regulation of NADPH oxidase expression by angiotensin ⑤ in human endothelial cell: protective effect of angiotensin ⑤ type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease [J]. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (11): 1845-851
- [10] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, et al. Role of renin-angiotensin system in vascular disease [J]. *Hypertension*, 2001, **38**: 1382-387
- [11] Marielle K, Ayelet R, Shlomo K, Raymond C, Michael A. Ramipril administration to atherosclerotic mice reduce oxidized low-density lipoprotein uptake by their macrophage and blocks the progression of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **161** (1): 65-74

(此文编辑 朱雯霞)