

[文章编号] 1007-3949(2006)14-06-0511-03

• 实验研究 •

肝 X 受体激动剂对高脂载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠 动脉壁一氧化氮合酶、增殖细胞核抗原和 纤溶酶原激活物抑制剂 1 表达的影响

胡厚源, 颜伟, 周林

(第三军医大学西南医院心内科, 重庆市 400038)

[关键词] 药理学; 肝 X 受体激动剂的抗动脉粥样硬化机制; 免疫组织化学; 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠; 一氧化氮合酶; 增殖细胞核抗原; 纤溶酶原激活物抑制剂 1

[摘要] 目的 研究肝 X 受体激动剂 3 β -羟基-5 α , 6 α -环氧胆烷酸甲酯和 T-0901317 对高脂载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠动脉壁一氧化氮合酶、增殖细胞核抗原、纤溶酶原激活物抑制剂 1 表达的影响。方法 以高脂饲养载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠为动脉粥样硬化模型, 分为无药对照组、3 β -羟基-5 α , 6 α -环氧胆烷酸甲酯干预组[10 mg/(kg·d)]和 T-0901317 干预组[10 mg/(kg·d)], 每组 6 只小鼠, 灌胃 6 周。用免疫组织化学 SP 法检测主动脉壁中诱导型一氧化氮合酶、内皮型一氧化氮合酶、增殖细胞核抗原、纤溶酶原激活物抑制剂 1 蛋白的表达。结果 药物干预的两组主动脉壁中诱导型一氧化氮合酶的表达均显著低于对照组($P < 0.01$), 而血管内皮细胞中内皮型一氧化氮合酶的表达均显著高于对照组($P < 0.01$)。各组增殖细胞核抗原和纤溶酶原激活物抑制剂 1 的表达无显著性差异($P > 0.05$)。结论 肝 X 受体激动剂 3 β -羟基-5 α , 6 α -环氧胆烷酸甲酯和 T-0901317 均可促进血管内皮细胞中内皮型一氧化氮合酶的表达, 抑制动脉壁中诱导型一氧化氮合酶的表达。提示肝 X 受体激动剂还可通过调脂以外的其它途径, 如抑制炎症反应和保护内皮功能等方面, 发挥其抗动脉粥样硬化作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

The Effects of Liver X Receptor Agonists on the Expressions of Nitric Oxide Synthase, Proliferating Cell Nuclear Antigen and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in the Artery of Apolipoprotein E-Deficient Mice

HU Hou Yuan, YAN Wei, and ZHOU Lin

(Department of Cardiology, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein E-Deficient Mice; Nitric Oxide Synthase; Proliferating Cell Nuclear Antigen; Plasminogen Activator Inhibitor-1; Liver X Receptors; T-0901317

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of methyl 3 β -hydroxy-5 α , 6 α -epoxycholanate (MHEC) and T-0901317 on the expressions of nitric oxide synthase (NOS), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in the artery wall. **Methods** Apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice were fed with an atherogenic diet, two types of liver X receptor (LXR) agonists (T-0901317 and MHEC) were orally administered daily at dose of 10 mg/kg for 6 weeks. SP immunohistochemistry analysis was performed to detect the expressions of induced NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS), PCNA and PAI-1 in the aortic atherosclerotic lesions. **Results** The expression of iNOS in the aortic wall was decreased in MHEC group and T-0901317 group compared with control group ($P < 0.01$); while the expression of eNOS in the endothelium was increased significantly ($P < 0.01$). The expressions of PCNA and PAI-1 in each group didn't differ markedly ($P > 0.05$).

Conclusions MHEC and T-0901317 could induce the expression of eNOS in the endothelium, while the expression of iNOS in the aortic wall was partly inhibited. This suggests that LXR agonists may take its anti-atherosclerosis role by inhibiting the inflammation in the artery wall and protecting the endothelial function.

肝 X 受体(liver X receptor, LXR)激动剂可促进巨噬细胞中胆固醇外流和肝脏中胆汁酸合成, 并可

抑制肠道中胆固醇吸收^[1]。目前, 国外已通过化学方法人工合成了一些 LXR 配体, 如 T-0901317 等, 国内以猪去氧胆酸为原料合成了 LXR 激动剂 3 β -羟基-5 α , 6 α -环氧胆烷酸甲酯(methyl 3 β -hydroxy-5 α , 6 α -epoxycholanate, MHEC)^[2]。本研究采用两种 LXR 激动剂为实验用药, 以高脂饲养的载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠为动脉粥样硬化模型, 在已明确 MHEC 和 T-

[收稿日期] 2005-09-01

[修回日期] 2006-04-27

[作者简介] 胡厚源, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发病机理与防治研究, E-mail 为 houyuanhu@medmail.com.cn。颜伟, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为冠心病基础与临床。周林, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病。

0901317均有显著的抗动脉粥样硬化作用的基础上^[3],进一步研究两种LXR激动剂对血管壁中诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和纤溶酶原激活物抑制剂1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

T-0901317为进口LXR激动剂,购于美国Cayman公司;MHEC为国产LXR激动剂,由第三军医大学药学教研室惠赠;胆固醇粉购自成都科龙公司;山羊ABCA1多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;免疫组织化学SP试剂盒购自北京中山公司。高脂饲料是在普通颗粒饲料中添加1.25%胆固醇和15%脂肪。

1.2 实验动物分组

健康雄性载脂蛋白E基因缺陷小鼠18只,12周龄,体重17~20g,购自北京大学医学部实验动物中心。小鼠于清洁级环境中分笼饲养,随机分为三组:高脂对照组在高脂饲料加对照溶液灌胃6周,MHEC组在高脂饲料加MHEC溶液灌胃6周,T-0901317组在高脂饲料加T-0901317溶液灌胃6周。MHEC、T-0901317以无水乙醇溶解,灌胃时配制成水溶液(乙醇浓度<0.05%),药物剂量10mg/(kg·d)。

1.3 主动脉壁中各观察指标的检测

取主动脉根部标本,以横断面行冰冻切片,厚度5μm,30min,4℃丙酮固定10min。免疫组织化学SP法检测iNOS、eNOS、PCNA、PAI-1的表达。染色结束后在光学显微镜下观测目的蛋白表达和分布情况。棕黄色颗粒为目的蛋白表达阳性着色,蓝色为苏木素复染细胞核着色。采用Image Pro Plus 4.5图像分析软件半定量分析目的蛋白的表达量,每张切片随机测定5个视野(400×)的阳性细胞的积分光密度(IOD)值,取其均值作为其表达量。

1.4 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 肝X受体激动剂对载脂蛋白E基因缺陷小鼠主动脉壁一氧化氮合酶表达的影响

对照组载脂蛋白E基因缺陷小鼠主动脉壁中

iNOS表达广泛,包括增殖的平滑肌细胞、巨噬细胞来源的泡沫细胞等,呈强阳性,着色部位主要在胞质。eNOS主要在血管内皮细胞中表达,对照组载脂蛋白E基因缺陷小鼠血管内皮细胞中均检测到eNOS的表达。MHEC组和T-0901317组载脂蛋白E基因缺陷小鼠主动脉壁中iNOS表达均显著减少,而血管内皮细胞eNOS表达均显著增加(表1和图1)。

表1. 载脂蛋白E基因缺陷小鼠主动脉壁一氧化氮合酶表达的积分光密度值($\bar{x} \pm s$, n=6)

分组	iNOS	eNOS
对照组	3 320.3 ± 243.1	1 523.3 ± 145.2
MHEC组	1 645.3 ± 189.5 ^a	2 356.2 ± 180.3 ^a
T-0901317组	1 723.7 ± 174.6 ^a	2 293.2 ± 211.3 ^a

a为P<0.01,与对照组比较。

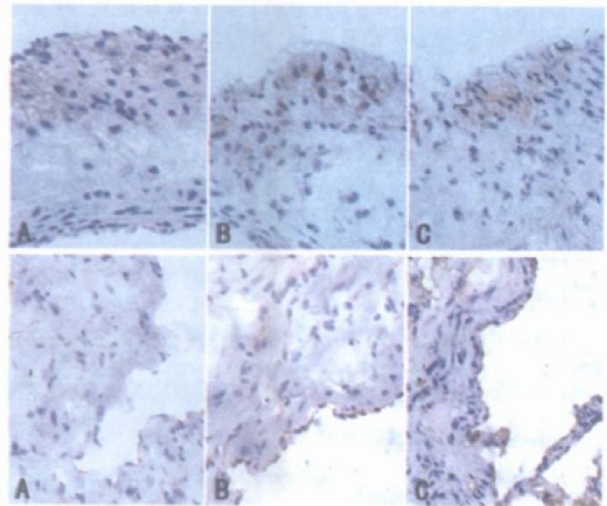


图1. 载脂蛋白E基因缺陷小鼠主动脉壁一氧化氮合酶的表达(×400) 上图为诱导型一氧化氮合酶,下图为内皮型一氧化氮合酶;A为对照组,B为MHEC组,C为T-0901317组。

2.2 肝X受体激动剂对载脂蛋白E基因缺陷小鼠主动脉壁增殖细胞核抗原、纤溶酶原激活物抑制剂1表达的影响

小鼠动脉血管平滑肌细胞和动脉粥样硬化斑块内PCNA表达呈阳性,通过图像分析测得PCNA的表达量(IOD值)对照组为1 989.4 ± 145.1, MHEC组为1 846.6 ± 155.4, T-0901317组为2 085.6 ± 167.5,各组间差异无显著性(P>0.05)。

主动脉壁内皮细胞胞质中PAI-1表达呈阳性,通过图像分析测得PAI-1的表达量(IOD值)对照组为1 562.0 ± 154.6, MHEC组为1 724.0 ± 171.5, T-0901317组为1 651.0 ± 123.8,各组间差异无显著性(P>0.05)。

3 讨论

炎症反应在动脉粥样硬化的发生和发展中起着十分重要的作用。最新的研究表明, LXR 激动剂能减少巨噬细胞中多种炎症因子的表达, 产生广泛的抗炎效应^[4]。因此, 推测 LXR 激动剂除了改善体内胆固醇代谢的作用外, 还可能存在抗炎及保护血管内皮功能等方面的抗动脉粥样硬化作用。在同步完成的实验中, 我们已经证实了 3 β -羟基-5 α , 6 α -环氧胆烷酸甲酯和 T-0901317 可显著减轻高脂饲养载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化病变形, 促进血管壁 ABCA1 蛋白表达的作用^[3]。本实验进一步检测了载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠动脉壁中 eNOS、iNOS、PCNA、PAF-1 等的表达, 发现两种 LXR 激动剂均明显抑制动脉粥样硬化病变中 iNOS 的表达, 同时促进血管内皮 eNOS 的表达, 而 PCNA 和 PAF-1 的表达没有明显变化。

LXR 激动剂抑制动脉粥样硬化病变组织中 iNOS 表达和促进 eNOS 表达的机制和意义, 可能在于抑制炎症反应, 保护内皮细胞功能。一氧化氮(nitric oxide, NO) 的生物学作用主要包括扩张血管、抑制血小板聚集和平滑肌细胞增殖等。内皮损伤导致内皮功能失调, 重要表现之一为 NO 产生减少, 表现为血管源性的 NO 产生减少, 而炎症细胞粘附分子表达增加^[5,6]。由于 NO 能抑制动脉粥样硬化过程中的许多关键步骤, 如血小板粘附、聚集, 粘附分子和趋化因子的表达, 以及炎症介质的释放、血管平滑肌细胞的迁移和增殖等, 因此, NO 的缺乏可促进动脉粥样硬化的发生^[7]。

在体内 NO 主要由 NOS 合成, NOS 是产生 NO 的限速酶。人体已经确定的 NOS 有 3 种亚型: 神经元型 NOS (nNOS 或 NOS1)、内皮型 NOS (eNOS)、诱导型 NOS (iNOS), 前两者又合称为结构型 NOS (cNOS)。eNOS 产生的 NO 迅速播散, 并与多种靶蛋白的巯基簇、金属结合位点和转录因子等结合, 发挥其生物学效应。iNOS 表达受到肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 2 和干扰素 γ 等的调节^[8]。eNOS 在

动脉粥样硬化的发病机制中有着双重作用: 在正常情况下, eNOS 产生低浓度的 NO, 可以发挥抗动脉粥样硬化作用; 在高脂血症、动脉粥样硬化时, eNOS 产生更少的 NO, 更多的超氧化物形成, 加之局部 iNOS 的活化, 后者产生的 NO 和过氧化物同时增加, 导致粥样硬化斑块内高浓度有细胞毒作用的过氧化亚硝酸盐形成, 干扰细胞内信号转导, 促进动脉粥样硬化的发生^[9]。研究显示, 受 LXR 调控的众多靶基因中并未包括 PCNA 和 PAF-1, 这可能是本研究中血管壁 PCNA 和 PAF-1 的表达不受 LXR 激动剂影响的原因, 即 PCNA 和 PAF-1 基因的表达不受 LXR 的调控。

本研究观察到 LXR 激动剂能够纠正动脉粥样硬化病变中 iNOS 表达增多和 eNOS 表达减少的失衡现象, 提示 LXR 激动剂具有一定的抑制炎症反应和保护内皮功能的作用。

[参考文献]

- [1] Schmitz G, Langmann T. Structure, function and regulation of the ABC1 gene product[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2001, **12** (2): 129-140
- [2] 颜伟, 胡厚源, 周林, 张同欣, 刘旭东. 肝 X 受体激动剂对人 THP-1 细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 和肝 X 受体 α 、 β 亚型表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (2): 158-162
- [3] 颜伟, 胡厚源, 周林, 周向东, 何国祥. 两种 LXR 激动剂对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化影响的对照研究[J]. *第三军医大学学报*, 2005, **27** (5): 381-384
- [4] Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors[J]. *Nature Medicine*, 2003, **9** (2): 213-219
- [5] Biegelsen ES, Loscalzo J. Endothelial function and atherosclerosis[J]. *Coron Artery Dis*, 1999, **10** (4): 241-256
- [6] Weissberg P. Mechanisms modifying atherosclerotic disease from lipids to vascular biology[J]. *Atherosclerosis*, 1999, **147** (Suppl 1): S3-10
- [7] Behr-Roussel D, Rupin A, Bonhomme E, Cordi A, Fabiani JN, Verbeuren TJ, et al. Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N^o-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits[J]. *Circulation*, 2000, **102** (2): 1 033-038
- [8] Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthase in the cardiovascular system[J]. *Cardiovasc Res*, 1999, **43** (1): 509-520
- [9] Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J, Hassing H, Burton C, Mundt S, et al. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *J Immunol*, 2000, **165** (8): 3 430-435

(此文编辑 文玉珊)