

[文章编号] 1007-3949(2008)16-06-0457-04

·实验研究·

## 5 脂氧合酶激活蛋白介导人脐静脉内皮细胞氧化损伤

朱武生<sup>1</sup>, 马玉苹<sup>1</sup>, 马敏敏<sup>1</sup>, 樊新颖<sup>1</sup>, 周广怡<sup>1</sup>, 葛 颂<sup>1</sup>, 徐格林<sup>1</sup>, 汪俊军<sup>2</sup>, 刘新峰<sup>1</sup>

(中国人民解放军南京军区南京总医院 1. 神经内科, 2. 解放军临床检验医学研究所, 江苏省南京市 210002)

[关键词] 病理学与病理生理学; 5 脂氧合酶激活蛋白; 白三烯 C4; 人脐静脉内皮细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨 5 脂氧合酶激活蛋白在人脐静脉内皮细胞氧化损伤中的机制。方法 体外分离、培养人脐静脉内皮细胞, 分别用 10、50、100 和 200 mg/L 氧化型低密度脂蛋白处理细胞 24 h, 采用酶联免疫吸附法检测细胞上清液白三烯 C4 水平, MTT 法检测细胞活力, 以及实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测细胞 5 脂氧合酶激活蛋白 mRNA 及蛋白表达的变化。结果 100 mg/L 和 200 mg/L 氧化型低密度脂蛋白作用人脐静脉内皮细胞 24 h 细胞活力显著下降 ( $P < 0.01$ ), 白三烯 C4 分泌显著增加 ( $P < 0.01$ ), 回归分析显示白三烯 C4 释放量与氧化型低密度脂蛋白浓度显著相关 ( $r = 0.953, P < 0.01$ )。PCR 和 Western blot 分析发现, 5 脂氧合酶激活蛋白 mRNA 表达和蛋白表达均显著增强 ( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ )。结论 氧化型低密度脂蛋白促进人脐静脉内皮细胞分泌白三烯 C4, 导致人脐静脉内皮细胞氧化损伤可能与 5 脂氧合酶激活蛋白异常表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Five Lipoxygenase Activating Protein-Mediated Human Umbilical Vein Endothelial Cells Oxidation Injury Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

ZHU Wu-Sheng<sup>1</sup>, MA Yu-Ping<sup>1</sup>, MA Min-Min<sup>1</sup>, FAN Xin-Ying<sup>1</sup>, ZHOU Guang-Yi<sup>1</sup>, GE Song<sup>1</sup>, XU Ge-Lin<sup>1</sup>, WANG Jun-Jun<sup>2</sup>, and LIU Xin-Feng<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, 2. Research Institute of Clinical Laboratory Medicine, PLA, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

[KEY WORDS] Five Lipoxygenase Activating Protein; Leukotriene C4; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Oxidized Low Density Lipoprotein; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether five lipoxygenase activating protein (FLAP) is involved in the mechanism of human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) oxidation injury induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL).

**Methods** Isolated and cultured hUVEC were used as experimental model. hUVEC were induced by ox-LDL at 10, 50, 100 and 200 mg/L for 24 hours. Leukotriene C4 (LTC4) levels in the cell supernatant fluid were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), cell viability was detected by MTT assay, and FLAP mRNA and FLAP protein were detected with fluorescent quantitation PCR and Western blot.

**Results** Ox-LDL at 100 and 200 mg/L significantly induced the release of LTC4 ( $P < 0.01$ ), the decrease of cell viability in hUVEC ( $P < 0.01$ ) and upregulation of FLAP mRNA expression and FLAP protein expression. The regressive analysis showed that the amounts of released LTC4 had significantly positive correlation with the concentration of ox-LDL ( $r = 0.953, P < 0.01$ ).

**Conclusion** FLAP could be involved in the LTC4 secretion and oxidative injury induced by ox-LDL in hUVEC.

炎症反应是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的主要发病机制之一<sup>[1,2]</sup>。作为重要的炎症介质,白三烯(leukotrienes, LT)是由白细胞分泌、花生四烯酸(arachidonic acid, AA)经 5 脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LO)途径代谢的产物,其中白三烯 C4(leukotrienes C4, LTC4)是生物学活性最强的一种白三烯。已有

研究证实白三烯与 As 发病有关<sup>[3]</sup>。5 脂氧合酶是白三烯合成的关键酶,5 脂氧合酶的激活必须依靠 5 脂氧合酶激活蛋白(five lipoxygenase activating protein, FLAP)的存在。最近研究表明 FLAP 与 As 存在密切关系<sup>[4,5]</sup>,但是 FLAP 通过何种途径参与 As 的发生目前尚无明确报道。内皮细胞受损是 As 形成的始发环节,而氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)被公认为致内皮细胞损伤最重要的危险因子<sup>[6]</sup>。本研究采用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC)为研究对象,探讨 ox-LDL 氧化损伤 hUVEC 对 LTC4、FLAP mRNA 及 FLAP 蛋白表达的影响。

[收稿日期] 2007-11-05 [修回日期] 2008-05-12

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”基金资助(06-B-075)

[作者简介] 朱武生, 博士, 主治医师, 主要从事动脉粥样硬化及脑血管病的基础与临床研究, E-mail 为 zwsemail@gmail.com。汪俊军, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事脂蛋白与动脉粥样硬化发病机制的研究。通讯作者刘新峰, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化、脑血管病的基础与临床以及中枢神经损伤的再生修复研究, E-mail 为 xfliu2@yahoo.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

RPMI 1640 干粉、胎牛血清和胰蛋白酶购于 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT) 和二甲基亚砷(DMSO) 购于 Sigma 公司; ELISA(LTC4) 试剂盒购于美国 Cayman 公司; RNA 提取试剂盒(Trizol) 购于美国 Invitrogen 公司; PCR 扩增试剂盒购于大连宝生物工程有限公司; 逆转录试剂盒购于美国 Promega 公司; TaqMan 2 × PCR Master mixture 购于美国 ABI 公司; Stat Fax2100 型酶标仪为美国 Awareness 公司生产; CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱为美国 Fisher Scientific 公司生产; Beckman L8-80M 超速离心机为美国 Beckman 公司生产; 普通 PCR 仪为美国 ABI9700 型号; 定量 PCR 仪为美国 ABI7700 型号; SENCICAPTURE 凝胶图像分析系统为北京百晶生物技术有限公司; Quantity one 凝胶分析系统为美国伯乐公司。

### 1.2 引物设计

按文献报道设计目的基因引物及探针序列。FLAP 引物上游为 5'-TTG CCT TTG AGC GGG TCT AG-3', 下游为 5'-ACC AGA GCA CAG CGA GGA A-3', FLAP 探针为 5'-FAM-TGC CAA CCA GAA CTG TGT AGA TGC GTA CCT AMR A-3'; β-actin 引物上游为 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3', 下游为 5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3'。引物和探针由上海基康公司合成。

### 1.3 细胞培养

健康产妇产后新鲜脐带, 无菌剪取 10~15 cm。通过原代培养获得 hUVEC, 采用 (ID) 因子相关抗原检测鉴定。2~3 天细胞换液 1 次, 待细胞汇合生长至 85% 后, 即可传代, 第 3 代培养的 hUVEC 用于实验。细胞给予处理因素前 24 h 更换无血清培养基, 使细胞同步化至 G1 期。按照加入 ox-LDL 后终浓度的不同随机分为 5 组: 对照组细胞不做任何处理; ④10 mg/L ox-LDL 组; ④50 mg/L ox-LDL 组; 100 mg/L ox-LDL 组; 200 mg/L ox-LDL 组。每组 6 个样本, ox-LDL 与细胞共孵育 24 h, 离心收集细胞及培养上清液, 细胞用于检测 MTT、FLAP mRNA 及 FLAP 蛋白表达, 上清液用于测定 LTC4 水平。

### 1.4 氧化型低密度脂蛋白制备

按照文献[7]用密度梯度超速离心法分离制备 LDL 并测定其含量。健康成人空腹 12 h 静脉血在室温放置 1 h 使其凝固, 4℃、5 000 r/min 离心 30 min 分离血清。在血清中加入 5% EDTA 钠盐及 NaN<sub>3</sub>, 再在 4℃、10 000 r/min 离心 15 min, 吸去位于顶部的乳

糜颗粒。在 d=1.019 kg/L、4℃ 的条件下, 30 000 r/min 离心 18 h, 吸去位于顶部的极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)。将已去除 VLDL 的下层血清的密度调至 1.063 kg/L, 在 4℃、30 000 r/min 的条件下离心 24 h。离心完毕可见离心管顶层黄色的 LDL。取出 LDL 离心层, 在透析袋中反复透析 48 h, 过滤除菌, 4℃ 存放, 两周内使用。LDL 经 pH7.4、0.01 mol/L PBS 充分透析, 调蛋白浓度为 0.5 mg/L, 加入 30 μmol/L CuSO<sub>4</sub>, 37℃ 孵育 20 h 后, 用含 1 mmol/L EDTA 的 pH7.4、0.01 mol/L PBS 透析。经 0.22 μm 孔径的滤器过滤, 4℃ 避光保存备用, 两周内使用。用 Lowry 法进行蛋白定量检测。

### 1.5 MTT 法检测细胞活力

hUVEC 按  $5 \times 10^5$ /孔接种于 96 孔板, 置 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 24 h 后, 换成无血清培养基继续培养 24 h。各孔加入 5 g/L MTT 20 μL, 37℃ 培养 4 h, 弃上清, 各孔再加入 DMSO 100 μL, 振荡 15 min 后, 于酶标仪上读取 490 nm 处各孔的光密度值(OD 值)。根据实验记录结果取均数计算细胞存活率。细胞存活率(%) = 实验组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%。

### 1.6 酶联免疫吸附法检测上清液白三烯 C4

上清液 LTC4 检测按 LTC4 试剂盒说明书操作。

### 1.7 实时荧光定量 PCR 检测 5 脂氧合酶激活蛋白 mRNA

按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 含量和纯度。逆转录反应体系包括 MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 4 μL; 10 × RT Buffer 2 μL; dNTP (10 mmol/L) 2 μL; RNase Inhibitor ( $4 \times 10^7$  u/L) 0.5 μL; AMV 逆转录酶 XL ( $5 \times 10^6$  u/L) 1.0 μL; Oligo dT (2.5 μmol/L) 1.0 μL; 实验样品 RNA 小于 1 μg; RNase free dH<sub>2</sub>O 补足 dH<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应条件为 30℃ 变性 10 min, 42℃ 退火 40 min, 99℃ 延伸 5 min, 冰上 5 min。反应结束, 将样品放入 -20℃ 保存。用普通 TaqMan 探针方法 PCR 扩增。反应总体积为 25 μL, 其中荧光探针 0.625 μL, 上游引物 (20 μmol/L) 1.125 μL, 下游引物 (20 μmol/L) 1.125 μL, H<sub>2</sub>O 7.625 μL, ABI TaqMan 2 × PCR Master 混合物 12.5 μL, 模板 2 μL。反应条件为: 50℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 10 min → 95℃ 退火 15 s → 60℃ 延伸 1 min, 共 40 个循环。反应结束后, 由电脑自动分析并计算结果。FLAP mRNA = 目的基因 cDNA 拷贝数/β-actin cDNA 拷贝数 (β-actin 为看家基因)。

### 1.8 Western blot 检测 5 脂氧合酶激活蛋白含量

消化 hUVEC, PBS 洗涤 3 次, 1 000 r/min, 离心 1

min 收集细胞沉淀。在冰浴下加入细胞裂解液裂解细胞沉淀,离心,取上清,测定蛋白提取液浓度。绘制标准曲线,加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 200  $\mu$ L,充分混匀,测得样品实际浓度。制备分离胶和积层胶,样品中加入等体积  $2\times$  上样缓冲液,通电电泳。将 PVDF 膜切成与凝胶尺寸大小一致,置于转移缓冲液中平衡。用二张大滤纸贴于两张多孔垫料,将 PVDF 膜、胶夹于中间,在 PVDF 膜与大滤纸之间垫小滤纸。PVDF 膜朝正极,80 V 恒压转移 40 min。取下 PVDF 膜,做好标记,将 PVDF 膜放入封闭液中封闭。4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。将封闭好的 PVDF 膜加入一抗 1:500,室温,反应 1 h。T-PBS 洗 15 min  $\times$  4。加入二抗 1:5 000,室温,反应 1 h。T-PBS 洗 15 min  $\times$  4。采用 ECL 化学发光试剂盒进行蛋白检测,经凝胶成像系统采集图象,采用 Quantity one 凝胶分析系统进行图象分析。

### 1.9 统计学处理

使用 SPSS11.0 统计软件分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间均数比较采用方差分析,两组间均数比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。两者之间相关性采用直线回归分析。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞存活率的影响

10 mg/L ox-LDL 和 50 mg/L ox-LDL 对 hUVEC 存活率无明显影响;而 100 mg/L 及 200 mg/L 的 ox-LDL 作用于 hUVEC 24 h 后,细胞存活率显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ,表 1)。

表 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞存活率的影响

ox-LDL 浓度(mg/L)	n	细胞存活率
0 (对照组)	6	100%
10	6	99.0% $\pm$ 1.1%
50	6	98.3% $\pm$ 1.7%
100	6	88.6% $\pm$ 3.0% <sup>a</sup>
200	6	82.8% $\pm$ 2.6% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较。

### 2.2 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞分泌白三烯 C4 的影响

10 mg/L ox-LDL 和 50 mg/L ox-LDL 对 hUVEC 释放 LTC4 量无明显影响 ( $P > 0.05$ ); 100 mg/L 及 200

mg/L 的 ox-LDL 作用于 hUVEC 24 h 后, LTC4 的释放显著增加,与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,表 2)。回归分析表明, LTC4 水平与 ox-LDL 浓度呈正相关 ( $r = 0.953$ ,  $P < 0.01$ ), 直线回归方程为:  $Y = -4.92 + 1.434X$ 。

表 2. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞分泌白三烯 C4 的影响

ox-LDL 浓度(mg/L)	n	LTC4 含量(mg/L)
0 (对照组)	6	12.63 $\pm$ 1.38
10	6	13.67 $\pm$ 2.63
50	6	15.15 $\pm$ 2.89
100	6	172.70 $\pm$ 22.90 <sup>a</sup>
200	6	277.39 $\pm$ 31.96 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较。

### 2.3 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对 5 脂氧合酶激活蛋白 mRNA 和蛋白表达的影响

实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分析表明, 10 mg/L ox-LDL 和 50 mg/L ox-LDL 没有明显改变 FLAP mRNA 水平和蛋白水平 ( $P > 0.05$ ); 100 mg/L 及 200 mg/L 的 ox-LDL 作用于 hUVEC 24 h 后, FLAP mRNA 表达水平分别比对照组增加 1.74 和 2.13 倍 ( $P < 0.01$ ), 而 FLAP 蛋白水平分别比对照组增加 2.08 和 5.48 倍 ( $P < 0.05$ ,表 3 和图 1)。

表 3. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对 5 脂氧合酶激活蛋白 mRNA 和蛋白表达的影响

ox-LDL 浓度(mg/L)	n	FLAP mRNA	FLAP 蛋白
0 (对照组)	6	0.076 $\pm$ 0.011	0.09 $\pm$ 0.01
10	6	0.097 $\pm$ 0.017	0.112 $\pm$ 0.015
50	6	0.104 $\pm$ 0.015	0.128 $\pm$ 0.023
100	6	0.132 $\pm$ 0.016 <sup>b</sup>	0.187 $\pm$ 0.039 <sup>a</sup>
200	6	0.162 $\pm$ 0.019 <sup>b</sup>	0.493 $\pm$ 0.049 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较。

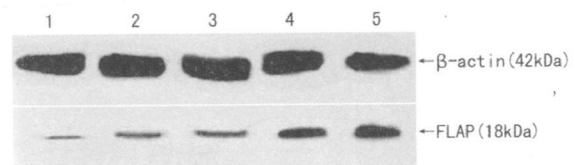


图 1. Western blot 检测不同浓度氧化型低密度脂蛋白对 5 脂氧合酶激活蛋白的影响 1 为对照组, 2~5 分别为 10、50、100 和 200 mg/L ox-LDL 组。

### 3 讨论

5脂氧合酶激活蛋白 (FLAP) 是一种分子量为 18 kDa 的膜结合蛋白, 能与细胞膜磷脂释放出来的 AA 特异性结合, 将 AA 传递给 5 脂氧合酶, 激活 5 脂氧合酶后催化 AA 为白三烯。作为 5 脂氧合酶上游的激活蛋白, FLAP 对维持 5 脂氧合酶的活性、调控白三烯的生成非常重要<sup>[8,9]</sup>。本研究结果表明, 100 mg/L 以上浓度的 ox-LDL 刺激 hUVEC 24 h 能够上调 FLAP mRNA 的表达。Fair 等<sup>[10]</sup> 采用体外实验研究, 结果发现 20 mg/L 的 ox-LDL 作用 24 h 能使人单核细胞 U937 细胞 FLAP mRNA 转录水平增加 10 倍, 推测 ox-LDL 可以通过上调 FLAP mRNA 表达, 增加 5 脂氧合酶活性而参与 As 发生与发展, 这与本文研究结果相类似。但是 ox-LDL 作用于 hUVEC 对 FLAP 蛋白转录的影响未有研究报道。本实验中我们观察到 ox-LDL 既能上调 FLAP mRNA, 也能上调 FLAP 蛋白的表达, 表明 ox-LDL 诱导 hUVEC 能引起 FLAP 基因表达, FLAP 在血管内皮细胞损伤过程中起重要作用。最近的动物研究结果表明, FLAP 参与了 As 的炎症反应过程<sup>[11]</sup>。Qiu 等<sup>[4]</sup> 则比较 72 例 As 患者和 6 例正常人, 发现 As 患者颈动脉粥样斑块 FLAP mRNA 水平为正常人髂动脉 FLAP mRNA 水平的 2.7 倍 ( $P=0.003$ ), 认为 FLAP 参与 As 的发病机制。

人脐静脉内皮细胞 (hUVEC) 能够通过特异性的微粒体谷胱甘肽 S-转移酶产生 LTC<sub>4</sub><sup>[12]</sup>。LTC<sub>4</sub> 主要的生物学活性表现为增加血管通透性, 作用于平滑肌细胞导致支气管和血管收缩。本实验结果表明浓度超过 100 mg/L 的 ox-LDL 作用 hUVEC 24 h 后导致 LTC<sub>4</sub> 分泌显著增高及细胞活力下降, 结合 FLAP mRNA 及 FLAP 蛋白表达上调, 表明 ox-LDL 可能是通过上调 FLAP 基因及蛋白的表达, 增加 LTC<sub>4</sub> 分

泌, 诱导 hUVEC 损伤的病理生理过程。因此对 FLAP 的调控可能为 As 的治疗提供一个新思路。而最新的研究结果已证实, FLAP 抑制剂 MK-886 能够减轻载脂蛋白 E 和低密度脂蛋白受体双敲除小鼠 As 斑块的程度<sup>[13]</sup>。

#### [参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Eng J Med*, 1999, **340** (2): 115-126.
- [2] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 249-253.
- [3] Khan Z, Tripathi CD. Leukotrienes and atherosclerosis [J]. *Indian Heart J*, 2005, **57** (2): 175-180.
- [4] Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, et al. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (21): 8161-166.
- [5] 朱武生, 刘新峰. 白三烯与动脉粥样硬化的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (11): 879-880.
- [6] Galle J, Hanser-Hagge T, Wanner C, et al. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells [J]. *Atherosclerosis*, 2006, **185** (2): 219-226.
- [7] Guan S, Wang B. Effects of fosinopril and valsartan on expressions of ICAM-1 and NO in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chin Med J*, 2003, **116** (6): 923-927.
- [8] Montero A, Uda S, Kelavkar U, et al. Increased 5-lipoxygenase activating protein in immune-mediated experimental nephritis [J]. *J Nephrol*, 2003, **16** (5): 682-690.
- [9] Peters-Golden M, Brock TG. 5-lipoxygenase and FLAP [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003, **69** (2-3): 99-109.
- [10] Fair A, Pritchard KA Jr. Oxidized low density lipoprotein increases U937 cell 5-lipoxygenase activating protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **201** (2): 1014-020.
- [11] Bock M, Sultan A, Ovchinnikova O, et al. 5-Lipoxygenase activating protein: a potential link between innate and adaptive immunity in atherosclerosis and adipose tissue inflammation [J]. *Circ Res*, 2007, **100** (7): 946-949.
- [12] Sjöström M, Jakobsson PJ, Heimburger M, et al. Human umbilical vein endothelial cells generate leukotriene C<sub>4</sub> via microsomal glutathione S-transferase type 2 and express the CysLT<sub>1</sub> receptor [J]. *Eur J Biochem*, 2001, **268** (9): 2578-586.
- [13] Jawien J, Gajda M, Rudling M, et al. Inhibition of five lipoxygenase activating protein (FLAP) by MK-886 decreases atherosclerosis in apoE/LDLR double knockout mice [J]. *Eur J Clin Invest*, 2006, **36** (3): 141-146.

(此文编辑 许雪梅)