

# 间歇性低氧通过上调脂蛋白相关磷脂酶 A<sub>2</sub> 和氧化型低密度脂蛋白表达促进动脉粥样硬化形成

李月春, 刘国荣, 王宝军, 郝喜娃, 张京芬, 庞江霞, 闫洁

(包头市中心医院神经内科, 内蒙古包头市 014040)

[关键词] 间歇性低氧; 高脂饮食; 脂蛋白相关磷脂酶 A<sub>2</sub>; 氧化型低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 研究间歇性低氧及高脂饮食通过上调脂蛋白相关磷脂酶 A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>)、氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 的表达促进动脉粥样硬化的形成。**方法** 采用随机对照、前瞻性动物实验和析因设计的方法, 建立间歇性低氧和高脂饮食兔动物模型, 将 24 只 4 月龄新西兰大耳白兔随机分为四组: 对照组、间歇性低氧组 (IH 组)、高脂饮食组 (HFD 组) 和间歇性低氧 + 高脂饮食组 (IH + HFD 组), 每组 6 只。IH 组和 IH + HFD 组置于间歇性低氧舱中, 每天 8 h, 每循环 5 min, 舱内最低氧浓度 8%, 最高氧浓度 21%, HFD 组和 IH + HFD 组给予高脂饲料饲养, 间歇性低氧和高脂饮食干预 12 周, 利用酶联免疫吸附法测定间歇性低氧和高脂饮食干预 0、4、8 和 12 周血浆中 Lp-PLA<sub>2</sub> 和 ox-LDL 含量的变化, 在实验终点 12 周取主动脉弓和腹主动脉观察动脉粥样硬化的形成情况。**结果** 在第 8 周和 12 周时, IH 组、HFD 组和 IH + HFD 组 Lp-PLA<sub>2</sub> 含量较对照组和第 4 周时升高 ( $P < 0.05$ ); 在第 4、8 和 12 周时 IH + HFD 组 Lp-PLA<sub>2</sub> 含量分别较对照组、IH 组和 HFD 组升高 ( $P < 0.05$ ); 间歇性低氧和高脂饮食分别在第 4、8 和 12 周对 Lp-PLA<sub>2</sub> 的影响存在交互效应 ( $P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000$ )。在第 4、8 和 12 周时, IH 组、HFD 组和 IH + HFD 组 ox-LDL 含量较对照组均升高 ( $P < 0.05$ ), 在第 4 周时明显高于第 8 周和 12 周 ( $P < 0.05$ ); 在第 4、8 和 12 周时 IH + HFD 组 ox-LDL 含量分别较对照组、IH 组和 HFD 组升高 ( $P < 0.05$ ); 间歇性低氧和高脂饮食在第 4 周时对 ox-LDL 的影响存在交互效应 ( $P = 0.000$ ), 在第 8 周和 12 周时不存在交互效应 ( $P = 0.104$  和  $P = 0.166$ )。间歇性低氧和高脂饮食干预下腹主动脉油红“O”染色及主动脉弓和腹主动脉组织 HE 染色后可观察到动脉粥样硬化的形成。**结论** 间歇性低氧和高脂饮食可能通过上调血浆中 Lp-PLA<sub>2</sub> 和 ox-LDL 表达促进动脉粥样硬化形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Intermittent Hypoxia Promote the Formation of Atherosclerosis by Increasing Expression of Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub> and Oxidized Low Density Lipoprotein

LI Yue-Chun, LIU Guo-Rong, WANG Bao-Jun, HAO Xi-Wa, ZHANG Jing-Fen, PANG Jiang-Xia, and YAN Jie

(Department of Neurology, Baotou Center Hospital, Baotou, Neimenggu 014040, China)

[KEY WORDS] Intermittent Hypoxia; High-fat diet; Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub>; Oxidized Low Density Lipoprotein; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the intermittent hypoxia and high-fat diet promoting the formation of atherosclerosis through increasing expression of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) and oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** Using randomized controlled study, prospective animal and factorial experiment, the animal models were established by intermittent hypoxia and high-fat diet. 24 New-Zealand white rabbits (4 months old) were divided into the following 4 groups: control group, intermittent hypoxia group (IH), high-fat-feeding group (HFD) and intermittent hypoxia & high-fat-feeding group (IH + HFD). Each group had 6 rabbits. Rabbits in IH group and IH + HFD group were placed in a cabin which nitrogen and air were periodically infused every 5 minutes for 8 h/day. The lowest level of oxygen concentration was at 8%. The highest level of oxygen concentration was at 21%. The HFD group and IH + HFD

[收稿日期] 2011-10-14

[作者简介] 李月春, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管疾病, E-mail 为 45369530@qq.com。刘国荣, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管疾病, E-mail 为 guorongliu@vip.163.com。王宝军, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病、睡眠障碍疾病及神经影像, E-mail 为 JBWWBJ@126.com。

group were fed with fat-rich-stoyer. The intervention experiment lasted for 12 weeks. Blood samples for measurements of Lp-PLA<sub>2</sub> and ox-LDL were collected at 0 w, 4 w, 8 w and 12 w. The formation of atherosclerosis in the aortic arch and abdominal aorta was observed. **Result** The Lp-PLA<sub>2</sub> level of IH group, HFD group and IH + HFD group at 8th and 12th week was higher than control group and at 4th week, the difference has statistic significance ( $P < 0.05$ ). The Lp-PLA<sub>2</sub> level of IH + HFD group at 4th, 8th and 12th week was higher than control group, IH group and HFD group ( $P < 0.05$ ). The two factors of IH and HFD had significant synergistic effects on the Lp-PLA<sub>2</sub> at 4th, 8th and 12th week ( $P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000$ ). The ox-LDL level of IH group, HFD group and IH + HFD group at 4th, 8th and 12th week was higher than control group ( $P < 0.05$ ). It was higher at 4th week than at 8th and 12th week ( $P < 0.05$ ). The ox-LDL level of IH + HFD group at 4th, 8th and 12th week was higher than control group, IH group and HFD group ( $P < 0.05$ ). The two factors of IH and HFD had significant synergistic effects on the ox-LDL at 4th week ( $P = 0.000$ ), however they had no significant synergistic effects at 8th and 12th week ( $P = 0.104$  and  $P = 0.166$ ). The formation of atherosclerosis was observed by oil red "O" staining in abdominal aortic and by HE staining in aortic arch and abdominal aorta under IH and HFD intervention. **Conclusion** The intermittent hypoxia and high-fat diet can promote the formation of atherosclerosis through increasing expression of Lp-PLA<sub>2</sub> and ox-LDL.

国内外新近研究显示<sup>[1,2]</sup>间歇性低氧(IH)可诱导动脉粥样硬化形成,具体机制仍未完全阐明,可能通过氧化应激、脂质过氧化、脂质代谢紊乱、炎症系统激活以及基因结构改变诱导动脉粥样硬化形成。长期持续的氧化应激反应会产生大量的活性氧族(ROS)可进一步脂质过氧化产生大量的氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)<sup>[3]</sup>。Wang等<sup>[4]</sup>发现 ox-LDL在体外能够通过促分裂原蛋白激酶 p38(p38MAPK)和磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)通路促进人单核细胞脂蛋白相关磷脂酶 A<sub>2</sub>(Lp-PLA<sub>2</sub>)表达上调。另外,研究表明 Lp-PLA<sub>2</sub>在动脉粥样硬化斑块形成中起着极其重要的作用<sup>[5]</sup>。然而间歇性低氧是否通过上调 Lp-PLA<sub>2</sub>和 ox-LDL表达促进动脉粥样硬化的形成未见报道,本研究构建间歇性低氧状态下动脉粥样硬化形成的兔动物模型,应用酶联免疫吸附技术研究 Lp-PLA<sub>2</sub>和 ox-LDL的改变,旨在为进一步阐明间歇性低氧促进动脉粥样硬化形成的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

ox-LDL和 Lp-PLA<sub>2</sub>酶联免疫吸附试剂盒购买于美国 RD 生物科技有限公司(批号分别为 CK-E90324和 CK-E80115);氮气(纯度 >99.99%)和氧气(纯度 >99.99%)购买于内蒙古包钢天源气体公司;饲料由北京科奥协力饲料有限公司提供(普通饲料配方为干草粉 40%,豆饼 10%,麸皮 13%,小麦 7%,玉米粉 23%,鱼粉 1.5%,酵母粉 3%,骨粉 1.5%,食盐 0.8%,复方维生素 0.1%,微量元素 0.1%;高脂饲料配方为胆固醇 1.5%,猪油 5%,蛋

黄粉 10%,加基础饲料 83.5%)。

### 1.2 动物分组及间歇性低氧动物模型的制备

24只健康新西兰大耳白兔(由北京市海淀区兴隆实验动物养殖厂提供),月龄 4个月,其中雌兔 12只,雄兔 12只,在实验室中适应性饲养 1周,实验开始时为 4月龄,基线体重  $2.47 \pm 0.09$  kg。采用分层随机抽样法,依照随机数字表分为四组:对照组( $n = 6$ ):在正常环境中以普通饲料和普通饮水饲养;间歇性低氧组(IH组, $n = 6$ ):每日间歇性低氧 8h,以普通饲料、普通饮水饲养;高脂饮食组(HFD组, $n = 6$ ):在正常环境中以高脂饲料、普通饮水饲养;间歇性低氧+高脂饮食组(IH+HFD组, $n = 6$ ):每日间歇性低氧 8h,高脂饲料、普通饮水饲养。

将 IH组和 IH+HFD组分别置入间歇性低氧舱内,每天 8h(上午 9时至下午 5时)。向间歇性低氧舱内交替充入氮气和氧气,间歇性低氧自动控制系统使每次交替时间在 5min左右,通过氧气传感器监测间歇性低氧舱内的氧浓度来程控输气和排气装置,通过调节氮气瓶电池阀使每一交替周期低氧舱内最低氧浓度达到 8%左右,持续 30s后通过排气阀排出舱内高浓度氮气,接着开始充入氧气,使舱内氧分压逐渐恢复到 21%左右,接着再往低氧舱内充入氮气,周而复始,每天持续 8h,间歇性低氧干预时间为 12周。

### 1.3 血浆 Lp-PLA<sub>2</sub>和 ox-LDL 的含量检测

第 0、4、8和 12周分别对每只兔进行耳背动脉抽血 6mL,送至包头市中心医院神经生物化学实验室,利用酶联免疫吸附法检查 Lp-PLA<sub>2</sub>和 ox-LDL 的含量。

### 1.4 病理学检查

各组兔均在实验终点 12周被处死,麻醉后剖腹

直视下迅速分离并取主动脉弓和腹主动脉约 1 cm 左右,固定于 4% 的甲醛溶液中,立即送至包头市中心医院病理科,进行常规脱水、石蜡包埋,病理切片做 HE 染色,光学显微镜下观察主动脉弓和腹主动脉粥样硬化的形成情况,剩余主动脉部分用 15% 中性甲醛溶液固定后,用油红“O”染色观察动脉粥样硬化形成的大体情况。

### 1.5 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间及组内两两比较采用 LSD-t 检验;间歇性低氧和高脂饮食两个因素进行析因设计两因素两水平的方差分析。 $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

表 1. 各组不同时间点组内及组间 Lp-PLA<sub>2</sub> 含量比较( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$ )

Table 1. Comparison of Lp-PLA<sub>2</sub> content between each group and within the group at different time points ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$ )

分 组	0 周	4 周	8 周	12 周
对照组	77.31 ± 1.50	77.78 ± 1.72	79.17 ± 3.66	79.19 ± 2.41
IH 组	77.37 ± 2.84	80.66 ± 3.56	132.52 ± 6.93 <sup>abc</sup>	135.05 ± 9.22 <sup>abc</sup>
HFD 组	77.33 ± 1.49	81.62 ± 4.70	128.35 ± 6.46 <sup>abc</sup>	132.27 ± 6.67 <sup>abc</sup>
IH + HFD 组	78.58 ± 2.53	130.28 ± 5.65 <sup>acd</sup>	153.93 ± 1.59 <sup>abcd</sup>	158.68 ± 7.94 <sup>abcd</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与 0 周时比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 4 周时比较; c 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; d 为  $P < 0.05$ , 与 IH 组和 HFD 组比较。

### 2.2 间歇性低氧和高脂饮食上调 ox-LDL 的表达

在第 4 周、8 周和第 12 周时, IH 组、HFD 组和 IH + HFD 组 ox-LDL 含量较本组 0 周时及对照组升高( $P < 0.05$ ), 在第 8 周和 12 周时较第 4 周时明显下降( $P < 0.05$ ), 但第 8 周与第 12 周之间变化不明显( $P > 0.05$ ); 在第 4、8 和 12 周时 IH + HFD 组 ox-

## 2 结 果

### 2.1 间歇性低氧和高脂饮食干预上调 Lp-PLA<sub>2</sub> 的表达

在第 8 周和 12 周时, IH 组、HFD 组和 IH + HFD 组 Lp-PLA<sub>2</sub> 含量较本组 0 周和第 4 周时及对照组升高( $P < 0.05$ ), 但各组第 8 周与第 12 周比较变化不明显( $P > 0.05$ ); 在第 4、8 和 12 周时 IH + HFD 组 Lp-PLA<sub>2</sub> 含量分别较对照组、IH 组和 HFD 组升高( $P < 0.05$ ; 表 1)。两因素两水平析因设计分析间歇性低氧和高脂饮食分别在第 4、8 和 12 周对 Lp-PLA<sub>2</sub> 的影响存在交互效应( $P = 0.000, 0.001$  和  $0.000$ )。

LDL 含量分别较对照组、IH 组和 HFD 组升高( $P < 0.05$ ; 表 2); 两因素两水平析因设计分析间歇性低氧和高脂饮食在第 4 周时对 ox-LDL 的影响存在交互效应( $P = 0.000$ ), 在第 8 周和 12 周时不存在交互效应( $P = 0.104$  和  $0.166$ )。

表 2. 各组不同时间点组内及组间 ox-LDL 含量比较( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$ )

Table 2. Comparison of ox-LDL content between each group and within the group at different time points ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$ )

分 组	0 周	4 周	8 周	12 周
对照组	56.27 ± 3.77	56.59 ± 5.17	59.47 ± 2.48	59.17 ± 2.38
IH 组	56.59 ± 5.17	133.87 ± 5.9 <sup>ac</sup>	95.74 ± 8.25 <sup>abc</sup>	90.94 ± 5.86 <sup>abc</sup>
HFD 组	59.17 ± 5.17	125.17 ± 11.55 <sup>ac</sup>	92.71 ± 8.59 <sup>abc</sup>	91.75 ± 7.86 <sup>abc</sup>
IH + HFD 组	59.47 ± 2.48	166.69 ± 6.04 <sup>acd</sup>	138.28 ± 6.66 <sup>abcd</sup>	131.15 ± 9.53 <sup>abcd</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与 0 周时比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 4 周时比较; c 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; d 为  $P < 0.05$ , 与 IH 组和 HFD 组比较。

### 2.3 腹主动脉粥样硬化形成的大体标本

油红“O”染色后观察到, 对照组无肉眼可见的脂质斑块, IH 组和 HFD 组可观察到脂质斑块形成, IH + HFD 组可观察到明显脂质斑块形成(图 1)。

### 2.4 主动脉弓和腹主动脉 HE 染色病理形态学变化

对照组主动脉壁内膜连续光滑, 内膜下未见泡

沫细胞, 中膜和外膜清晰可见, 各层结构正常, 无脂质沉积; IH 组和 HFD 组血管内膜内可见连续性中断, 结构紊乱, 内皮细胞脱落缺失, 在内皮下可见少量泡沫细胞; IH + HFD 组腹主动脉光镜下可见内皮细胞脱落缺失, 平滑肌细胞变性, 弹力纤维正常结构排列紊乱, 内皮下有较多泡沫细胞聚集, 胆固醇结晶析出, 不同程度的动脉粥样硬化形成(图 2)。

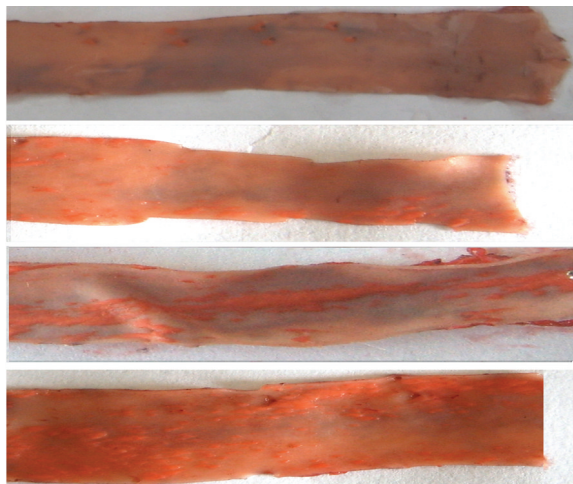


图 1. 各组腹主动脉大体标本 从上到下依次为对照组、HFD 组、IH 组和 IH + HFD 组。

Figure 1. Gross specimen about abdominal aorta in different group

### 3 讨论

研究表明间歇性低氧可诱导动脉粥样硬化形成,但其具体机制仍未完全阐明,可能通过基因结构改变、氧化应激、脂质过氧化、脂质代谢紊乱以及炎症系统激活诱导动脉粥样硬化形成。吴悦陶等<sup>[6,7]</sup>构建间歇性低氧动脉粥样硬化兔模型,发现间歇性低氧诱发动脉粥样硬化的发生发展涉及多个基因的改变,环氧合酶 2 可能是重要作用基因之一;组蛋白脱乙酰基酶 7 (HDAC7) 可能是高脂间歇性低氧诱发动脉粥样硬化发生中发挥重要作用的新基因。Savransky 等<sup>[2]</sup>建立间歇性低氧 C57BL/6J 鼠动脉粥样硬化模型发现,将 C57BL/6J 鼠给予间歇性低氧和高脂饮食干预,血浆 TC 和 LDLC 明显增加,血浆中脂质过氧化物酶、IL-6 和肝脏 TNF- $\alpha$  表达增加,一种肝脏分泌的不饱和和硬脂酰辅酶 A1 (SCD-1)mRNA 和蛋白表达增加,可

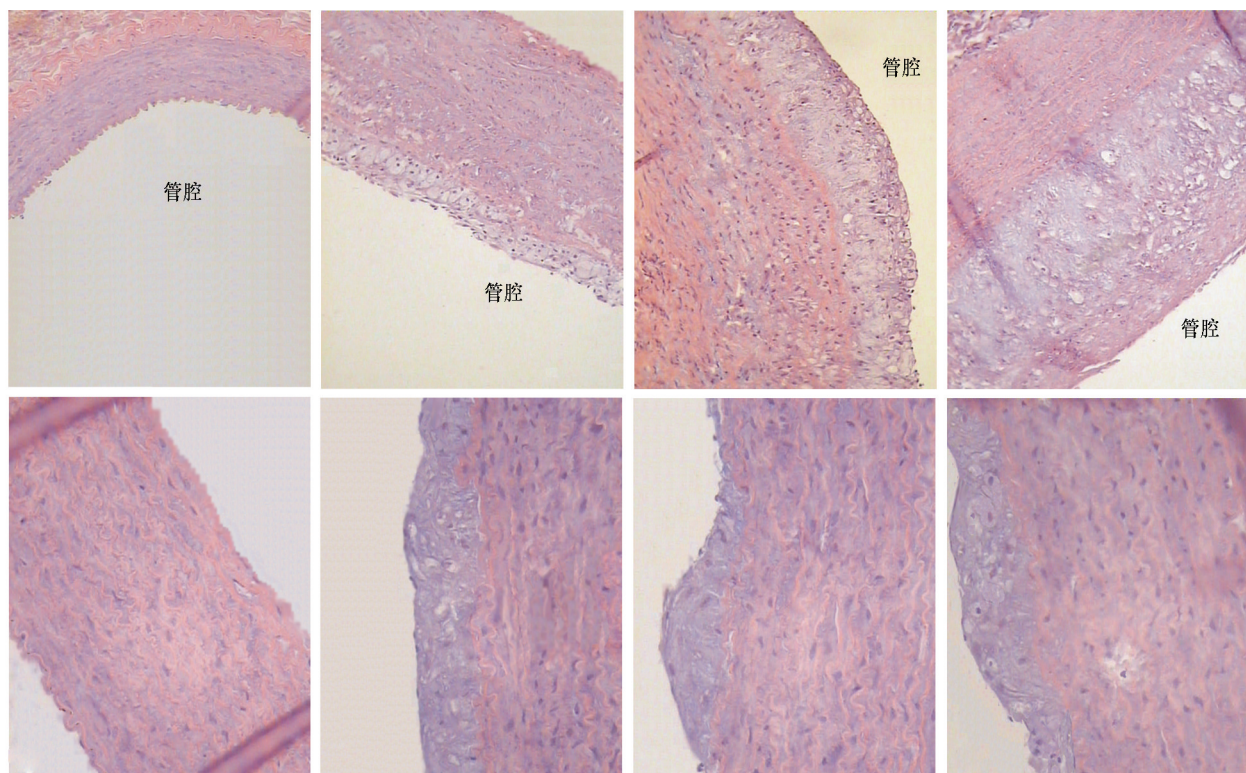


图 2. 主动脉弓(上图,  $\times 200$ )和腹主动脉(下图,  $\times 400$ )病理切片 HE 染色结果 从左到右依次为对照组、HFD 组、IH 组和 IH + HFD 组。

Figure 2. Aortic arch ( $\times 200$ ) and abdominal aorta ( $\times 400$ ) by HE staining

能介导动脉粥样硬化形成。

Lp-PLA<sub>2</sub> 属于磷脂酶 A<sub>2</sub> 超家族中的一员,主要由巨噬细胞分泌。在人类血浆中 70% ~ 80% 与 LDL-C 结合,能够水解 ox-LDL 和氧化卵磷脂的 sn-2 键产生溶血磷脂酰胆碱 (Lyso-PC) 和氧化型不饱和脂

肪酸 (ox-NEFA),二者导致动脉内皮细胞功能和结构损害、炎症细胞(单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等)聚集、炎症因子分泌增加、巨噬细胞吞噬脂质形成泡沫细胞并聚集在内膜下,形成脂质核心,导致动脉粥样硬化形成及斑块不稳定<sup>[8]</sup>。Lp-PLA<sub>2</sub> 在

动脉粥样硬化斑块形成中起着极其重要的作用,引起科学家广泛关注,被认为是心脑血管疾病发生的新型标记物<sup>[5]</sup>,也是目前为止美国食品药品监督管理局批准的唯一用于缺血性心脑血管疾病预警的血液分子标记物<sup>[9]</sup>。本研究显示,间歇性低氧和高脂饮食可引起血浆中 Lp-PLA<sub>2</sub> 和 ox-LDL 含量增加,ox-LDL 在间歇性低氧 4 周时升高较明显,而 Lp-PLA<sub>2</sub> 在 12 周时升高较明显,并且间歇性低氧和高脂饮食对二者的影响存在交互效应,因此推断二者之间关系极其密切。Wang 等<sup>[4]</sup>研究发现 ox-LDL 能够通过 p38MAPK 和 PI3K 通路促进人单核细胞 Lp-PLA<sub>2</sub> 表达上调,而间歇性低氧能够启动氧化应激,在体内细胞中产生大量的 ROS 使体内 ox-LDL 水平升高,间歇性低氧是否通过此通路使 Lp-PLA<sub>2</sub> 表达增加仍未完全阐明。

鉴于本研究间歇性低氧在第 4、8 和 12 周时可引起血浆中 Lp-PLA<sub>2</sub> 和 ox-LDL 含量增加,并经油红“O”染色肉眼大体标本和 HE 染色从病理上证实间歇性低氧和高脂饮食可诱导兔动脉粥样硬化形成,推断间歇性低氧和高脂饮食可能通过上调血浆中 Lp-PLA<sub>2</sub> 和 ox-LDL 表达促进动脉粥样硬化的形成,如果再进一步证实间歇性低氧可导致 Lp-PLA<sub>2</sub> 和 ox-LDL 基因表达上调、蛋白含量和活性的增加将具有更重要的意义,将为临床上阻塞性睡眠呼吸暂停综合症致缺血性心脑血管卒中的防治提供思路 and 重要依据。

#### [参考文献]

[1] 吴悦陶,杨宇,张湘瑜,等. 间歇缺氧促动脉粥样硬化

形成的兔模型观察[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7 (9) : 1 934-936.

[2] Savransky V, Nanayakkara A, Li J, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175 (12) : 1 290-297.

[3] Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Circulation*, 2005, 112 (17) : 2 660-667.

[4] Wang WY, Li J, Yang D, et al. OxLDL stimulates lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> expression in THP-1 monocytes via PI3K and p38 MAPK pathways [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85 (4) : 845-852.

[5] Madjid M, Ali M, Willerson JT. Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> as a novel risk marker for cardiovascular disease: a systematic review of the literature [J]. *Tex Heart Inst J*, 2010, 37 (1) : 25-39.

[6] 吴悦陶,刘瑞洪,张湘瑜,等. 间歇低氧诱发兔动脉粥样硬化形成中差异基因分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (5) : 353-356.

[7] 吴悦陶,刘瑞洪,黄谷香,等. HDAC7 基因参与兔高脂间歇低氧诱发动脉粥样硬化[J]. 基础医学与临床, 2008, 28 (10) : 1 052-056.

[8] Gautier EL, Huby T, Witztum JL, et al. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage [J]. *Circulation*, 2009, 119 (13) : 1 795-804.

[9] Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study [J]. *Circulation*, 2005, 111 (5) : 570-575.

(此文编辑 许雪梅)