

# RNA 干扰 LOX-1 表达对氧化型低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护机制

刘洪光<sup>1</sup>, 陶贵周<sup>1</sup>, 李俊<sup>1</sup>, 黄建华<sup>2</sup>, 虞改雪<sup>3</sup>

(辽宁医学院附属第一医院 1. 心内科, 2. 组织工程重点实验室, 辽宁省锦州市 121001; 3. 莘县人民医院, 山东省莘县 252400)

[关键词] 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; RNA 干扰; 细胞间黏附分子 1; 单核细胞趋化蛋白 1; 一氧化氮; RhoA/Rho 激酶

[摘要] **目的** 构建血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (LOX-1) 基因的 RNA 干扰慢病毒载体并转染人脐静脉内皮细胞。观察干扰 LOX-1 表达后对氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导内皮细胞损伤的保护机制。**方法** 针对已经筛选确定的小干扰 RNA 有效干扰序列, 合成慢病毒 LV-si-OLR1 最佳干扰序列, 测定滴度。转染人脐静脉内皮细胞 96 h 后, 通过荧光显微镜观察转染效率, 逆转录聚合酶链反应和 Western blot 检测 LOX-1 的抑制效率。转染 72 h 后加入 150 mg/L ox-LDL 处理 24 h; 噻唑蓝比色法检测细胞存活率; 硝酸还原酶法检测各组内皮细胞培养液一氧化氮 (NO) 的含量; Western blot 检测各组细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、RhoA、Rho 激酶 1 (ROCK1)、Rho 激酶 2 (ROCK2) 的表达。**结果** 测序结果证实, 靶向人 LOX-1 的干扰慢病毒载体构建成功, 包装后慢病毒滴度为  $6 \times 10^{11}$  TU/L。转染组与未转染组比较, LOX-1 mRNA 与蛋白的表达明显减少 ( $P < 0.01$ )。与正常对照组相比, ox-LDL 处理组能明显减低内皮细胞的存活率及 NO 的生成量, 增高 ICAM-1、MCP-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 的表达 ( $P < 0.05$ ); 与 ox-LDL 处理组相比, 干扰 LOX-1 表达后对 ox-LDL 诱导的内皮细胞存活率、NO 生成量减低和 ICAM-1、MCP-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 表达增高均有明显抑制作用 ( $P < 0.05$ )。**结论** 干扰 LOX-1 表达, 对 ox-LDL 诱导内皮细胞引起的 ICAM-1、MCP-1 高表达和 RhoA/Rho 激酶信号通路的激活及细胞存活率、NO 生成量的减低均有明显抑制作用, 起到对内皮细胞损伤的保护作用。本研究为 LOX-1 作为靶基因治疗动脉粥样硬化提供了实验依据。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Protective Mechanisms on the Injury of the Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein with RNA Interference in the Expression of LOX-1

LIU Hong-Guang<sup>1</sup>, TAO Gui-Zhou<sup>1</sup>, LI Jun<sup>1</sup>, HUANG Jian-Hua<sup>2</sup>, and YU Gai-Xue<sup>3</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Key Laboratory of Tissue Engineering, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 3. People's Hospital of Shen County, Shen County, Shandong 252400, China)

[KEY WORDS] Lectin-like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1; RNA Interference; Intercellular Adhesion Molecule-1; Monocyte Chemotactic Protein-1; Nitric Oxide; RhoA/Rho Kinase

[ABSTRACT] **Aim** Lentiviral vectors targeting human lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene with RNA interference (RNAi) were transfected into human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), and the protective mechanisms on the injury induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) were observed. **Methods**

The LV-si-OLR1 optimal interference was selected from the small interfering RNA (siRNA) interference which validity had been verified and the virus titer was measured. HUVEC were transfected after 96 h. The expressions of mRNA and protein of LOX-1 were respectively detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot.

[收稿日期] 2014-03-07

[基金项目] 辽宁省科技厅社会发展攻关计划(2011225015); 辽宁医学院校长基金-奥鸿博泽研究生科研创新基金

[作者简介] 刘洪光, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的诊断与治疗, E-mail 为 15940697106@163.com。通讯作者陶贵周, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的诊断与治疗及双心医学, E-mail 为 tgz56789@163.com。李俊, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的诊断与治疗。

72 h after transfection, HUVEC were cultured with ox-LDL, which final concentration was 150 mg/L. 24 h after cultured by ox-LDL, endothelial cells vigor were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method and the expression levels of nitric oxide (NO) were detected by nitrate reductase method; the changes in the expression level of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), RhoA, Rho kinase-1 (ROCK1), Rho kinase-2 (ROCK2) were detected by Western blot in each group. **Results** The sequencing results confirmed that interference targeting human LOX-1 lentiviral vector was successfully constructed, which packaged lentiviral titer  $6 \times 10^{11}$  TU/L. Compared the transfected with the non-transfected groups, the expression of LOX-1 mRNA and protein significantly decreased ( $P < 0.01$ ); Compared with the control group, ox-LDL treated group could decrease endothelial cells vigor and expression levels of NO, while increase the expression levels of ICAM-1, MCP-1, RhoA, ROCK1, ROCK2 ( $P < 0.05$ ); After suppressing the expression of LOX-1, compared with ox-LDL treated group, endothelial cells vigor and expression of NO were increased, while expressions of ICAM-1, MCP-1, RhoA, ROCK1, ROCK2 were restrained ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** RNA interference in the expression of LOX-1 could reduce endothelial cell injury by increasing endothelial cells vigor and expression of NO, while reducing expressions of ICAM-1, MCP-1 and the levels of Rho/Rho kinase activity, which provided experimental evidence for treating atherosclerosis for the use of targeting LOX-1 gene.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种炎症性疾病,其病因还没有被完全阐明,内皮功能障碍目前被认为是启动 As 最重要的步骤之一<sup>[1]</sup>。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是 As 发病的主要危险因素之一,可诱导内皮细胞损伤,在 As 的发生发展中起着重要作用<sup>[2]</sup>。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)是内皮细胞上 ox-LDL 的特异性受体。ox-LDL 与 LOX-1 特异性结合后可以触发一系列信号分子表达及信号通路的激活,引起内皮细胞(endothelial cell, EC)的功能紊乱和损伤。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是在转录后水平的基因沉默机制,从而特异性沉默目的基因。慢病毒载体因其具有稳定转染的优点,因此常作为 RNAi 的最佳载体工具<sup>[3]</sup>。本实验室前期研究已经证实 RNAi 序列能够对 LOX-1 的表达起到显著并且稳定的抑制作用<sup>[4]</sup>。我们在前期工作基础上进一步研究,通过构建针对 LOX-1 基因的 RNAi 慢病毒载体,转染人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)后,观察在 ox-LDL 诱导下对细胞存活率、一氧化氮(nitric oxide, NO)、细胞间黏附分子 1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)表达及 RhoA/Rho 激酶(Rho kinase, ROCK)信号通路激活的影响,重点探讨干扰 LOX-1 表达对 ox-LDL 诱导内皮细胞损伤的保护机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HUVEC 细胞(美国 ATCC), 293T 细胞、U6-

vshRNA-CMV-GFP 慢病毒载体、慢病毒包装辅助质粒 PhePer 1.0、PhePer 2.0 和聚凝胺(polybrene)、提高转染的解决方案(enhanced infection solution)(上海吉凯基因技术有限公司),脂质体(LiPofectamine) 2000、总 RNA 提取试剂(TRIzol 试剂)(Invitrogen 公司),限制性内切酶 Age I、EcoR I 和 T4 DNA 连接酶(New England Biolabs 公司),质粒提取试剂盒(荷兰 Qiagen 公司);内皮细胞专用培养基(ECM)(美国 Scien Cell 公司),其中添加 5% 胎牛血清和 1% 青霉素、链霉素以及 1% 内皮生长添加剂;721 分光光度仪、噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测试剂盒(Sigma 公司),NO 检测试剂盒(南京建成公司),LOX-1 兔抗人多克隆抗体(Abgent 公司),引物、PCR 试剂盒(上海生工公司), $\beta$ -actin 鼠抗人多克隆抗体(Cell Signaling 公司),ICAM-1 兔抗人多克隆抗体、MCP-1 兔抗人多克隆抗体(Santa 公司),RhoA 兔抗人多克隆抗体(Cell Signaling 公司),ROCK1 兔抗人多克隆抗体、ROCK2 兔抗人多克隆抗体(CST 公司)。

### 1.2 慢病毒载体构建及病毒包装

根据我们的前期研究,确定干扰序列为 CCA-GAAGTGAATCTCCAA,根据该序列设计并合成短发夹 RNA(shRNA)干扰序列的双链寡聚脱氧核苷酸,与双酶切的线性化慢病毒载体 U6-vshRNA-CMV-GFP 进行连接反应,转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌,挑选重组阳性克隆,进行测序鉴定。按 Invitrogen 公司 LiPofectamine 2000 说明书分别将慢病毒重组质粒与 PhePer 1.0、PhePer 2.0 共感染 293T 细胞,48 h 后收集感染后的细胞上清,经过滤、浓缩后得到慢病毒原液最佳干扰序列 LV-OLR1。同时设计合成阴性对照慢病毒 LV-NC,采用逐步稀释法计算病毒滴度。

### 1.3 实验分组及处理

HUVEC 采用 ECM 培养基培养,取对数生长期细胞制成细胞悬液,按照转染分组:未转染病毒组、阴性对照病毒转染组(LV-NC 组)、RNA 最佳干扰序列病毒转染组(LV-si-OLR1 组)。待细胞密度达 30% 左右时,按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)值为 20,转染条件 1.8 mL ECM 培养基 + 0.2 mL 聚凝胺进行转染,未转染病毒组加入 2 mL ECM 培养基。96 h 后在倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达情况,确定转染效率。收集细胞进行相关指标检测。细胞分组:(1)正常对照组:加入无血清培养基;(2)ox-LDL 处理组:加入含 150 mg/L ox-LDL 的无血清培养基;(3)ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组:转染 72 h 后,加入含 150 mg/L ox-LDL 的无血清培养基;(4)ox-LDL + LV-si-OLR1 慢病毒转染组:转染 72 h 后,加入含 150 mg/L ox-LDL 的无血清培养基。以上 4 组细胞培养 24 h 后,收集细胞进行相关指标检测。

### 1.4 逆转录聚合酶链反应检测 LOX-1 mRNA 表达

转染后 96 h 收集各处理组细胞,用 TRIzol 提取细胞总 RNA。LOX-1 上游引物为 5'-CCTTTGATGCCCACTTATTTA-3',下游引物为 5'-TGCTCTTAG-GTTTGCCTTCTTC-3',扩增产物片段 153 bp;磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)上游引物为 5'-CTTTGGTATCGTG-GAAGGACTC-3',下游引物为 5'-GTAGAGGCAGG-GATGATGTTAT-3',扩增产物片段 132 bp。逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)按照试剂盒说明进行操作。用 Quantity One 凝胶图像分析系统分析图像。

### 1.5 噻唑蓝法检测 HUVEC 存活率

取对数生长期 HUVEC,调整细胞密度至  $2 \times 10^8$ /L,按每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔板,培养 24 h 后弃培养基,按照“1.3”项分组处理细胞,每组设 8 个复孔,继续培养 24 h 后每孔加入 15 g/L MTT 20  $\mu$ L,37℃ 培养 4 h,弃掉上清,再加入二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)100  $\mu$ L,缓慢振荡 10 min。用酶标仪在 490 nm 处测定各孔吸光度(absorbance, A)值,计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率(%) = (正常对照组 A - 实验组平均 A) / 正常对照组 A  $\times$  100%。

### 1.6 硝酸还原酶法测定细胞培养液中 NO 含量

收集内皮细胞培养液,利用硝酸还原酶法测定内皮细胞培养液中 NO 的含量,具体操作步骤严格按南京建成公司的试剂盒说明书进行。

### 1.7 Western blot 测定 ICAM-1、MCP-1、LOX-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 的表达

将 100  $\mu$ L 预冷的细胞裂解液加入经过漂洗的细胞中,取蛋白上清液,测定蛋白浓度。进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析。二氟化树脂(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜转膜,用含 1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的 TBST 于 4℃ 封闭 1 h,分别加 1:500 兔抗人 ICAM-1 多克隆抗体、1:500 兔抗人 MCP-1 多克隆抗体、1:1000 LOX-1 兔抗人多克隆抗体、1:1000 RhoA 兔抗人多克隆抗体、1:1000 ROCK1 兔抗人多克隆抗体、1:1000 ROCK2 兔抗人多克隆抗体,4℃ 孵育过夜。洗膜液洗膜,加 1:1000 辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔 IgG 二抗,室温孵育 2 h。化学发光法分别检测 PVDF 膜上 ICAM-1、MCP-1、RhoA、LOX-1、ROCK1、ROCK2 与  $\beta$ -actin 的表达。用 Gel-Proanalyzer 4 凝胶图像分析系统分析,以  $\beta$ -actin 为内参,测定 ICAM-1、MCP-1、LOX-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白的表达。

### 1.8 统计学分析

计量数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 20.0 统计分析软件对数据进行处理,各组间比较采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒载体鉴定及滴度测定

将 PCR 阳性克隆测序,测序结果与设计的序列一致,表明慢病毒载体构建成功。转染 96 h 后在倒置荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。随着病毒稀释倍数增加,表达 GFP 的 293T 细胞数越来越少,逐步稀释法测定慢病毒滴度为  $6 \times 10^{11}$  TU/L。

### 2.2 慢病毒转染 HUVEC

病毒转染 HUVEC 96 h 后,通过倒置荧光显微镜观察 GFP 表达及细胞生长情况。通过荧光视野和明视野对比可见,阴性对照(LV-NC)及干扰慢病毒(LV-si-OLR1)转染效率均达 80% 以上(图 1)。

### 2.3 抑制 LOX-1 表达效率的检测

RT-PCR 和 Western blot 结果显示, LV-NC 组与未转染组比较, LOX-1 mRNA 和蛋白的表达均没有明显差异( $P > 0.05$ ); LV-si-OLR1 组与 LV-NC 组比较, LOX-1 mRNA 和蛋白的表达均被显著抑制,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),抑制率分别为 91.42%



$\pm 0.84\%$ 、 $96.61\% \pm 0.95\%$  (图2)。

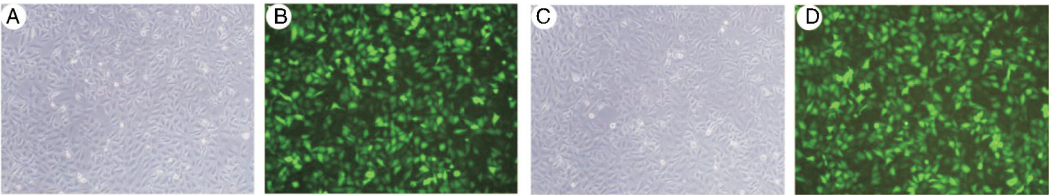


图1. 慢病毒转染 HUVEC A、B 为 LV-NC 转染 HUVEC,C、D 为 LV-si-OLR1 转染 HUVEC;A、C 为明视野,B、D 为荧光视野。

Figure 1. Lentiviral transfected for HUVEC

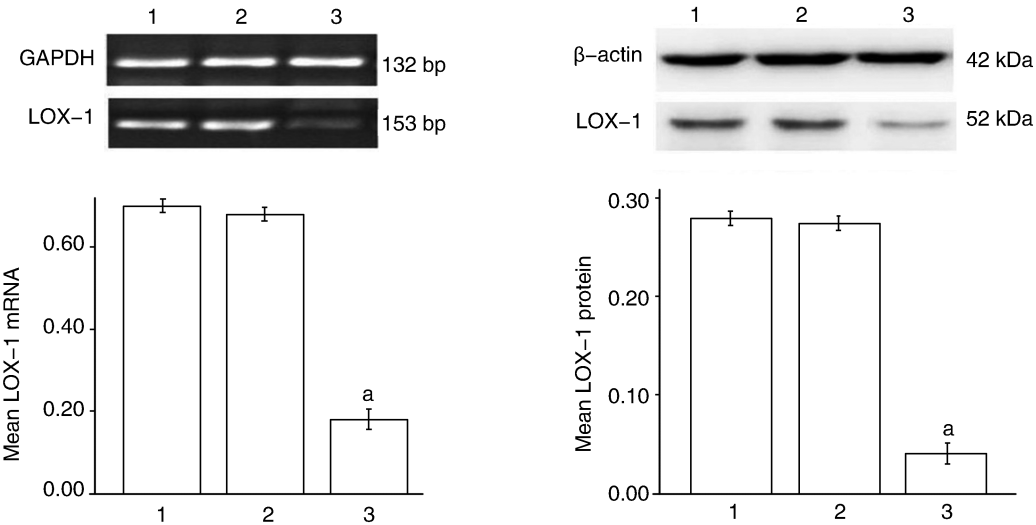


图2. 转染后 LOX-1 mRNA 和蛋白表达的检测 左图为 RT-PCR 检测 LOX-1 mRNA,右图为 Western blot 检测 LOX-1 蛋白。1 为未转染组,2 为 LV-NC 组,3 为 LV-si-OLR1 组。a 为  $P < 0.01$ ,与 LV-NC 组和未转染组比较。

Figure 2. Detection for the expression of LOX-1 mRNA and protein after transfection

2.4 各组 HUVEC 存活率的比较

MTT 检测结果显示,ox-LDL 处理组、ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组与正常对照组比较,细胞存活率明显降低,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组与 ox-LDL 处理组比较,细胞存活率无明显差异 ( $P > 0.05$ ),说明慢病毒对给予 ox-LDL 处理的 HUVEC 存活没有产生影响;ox-LDL + LV-si-OLR1 慢病毒转染组与 ox-LDL 处理组、ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组比较,细胞存活率明显升高,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ;表1)。

2.5 各组内皮细胞 NO 生成量的比较

ox-LDL 处理组、ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组与正常对照组比较,内皮细胞培养液中 NO 含量减少,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组与 ox-LDL 处理组比较,内皮细胞培养液中 NO 含量无明显变化 ( $P > 0.05$ ),说明慢病毒对给予 ox-LDL 处理的 HUVEC 的 NO 生成无明

显影响;ox-LDL + LV-si-OLR1 慢病毒转染组与 ox-LDL 处理组、ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组比较,内皮细胞培养液中 NO 含量明显升高,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ;表2)。

表1. 各组 HUVEC 活力的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1. Comparison of each groups' HUVEC vigor ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	<i>n</i>	<i>A</i> <sub>490 nm</sub>	生长抑制率
正常对照组	8	0.719 ± 0.028	-
ox-LDL 处理组	8	0.360 ± 0.036 <sup>a</sup>	49.9% <sup>a</sup>
ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组	8	0.352 ± 0.035 <sup>a</sup>	51.0% <sup>a</sup>
ox-LDL + LV-si-OLR1 慢病毒转染组	8	0.559 ± 0.028 <sup>b</sup>	21.9% <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与正常对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 ox-LDL 处理组和 ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组比较。

2.6 各组内皮细胞 ICAM-1、MCP-1、LOX-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白表达水平的比较

ox-LDL 处理组、ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组与正常对照组比较,ICAM-1、MCP-1、LOX-1、RhoA、R-

OCK1、ROCK2 蛋白表达升高,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组与 ox-LDL 处理组比较,ICAM-1、MCP-1、LOX-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白表达无明显差异 ( $P > 0.05$ ),说明慢病毒对给予 ox-LDL 处理的 HUVEC ICAM-1、MCP-1、LOX-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白的表达无明显影响;ox-LDL + LV-si-OLR1 慢病毒转染组与 ox-LDL 处理组、ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组比较,ICAM-1、MCP-1、LOX-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白表达降低,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ;图 3)。

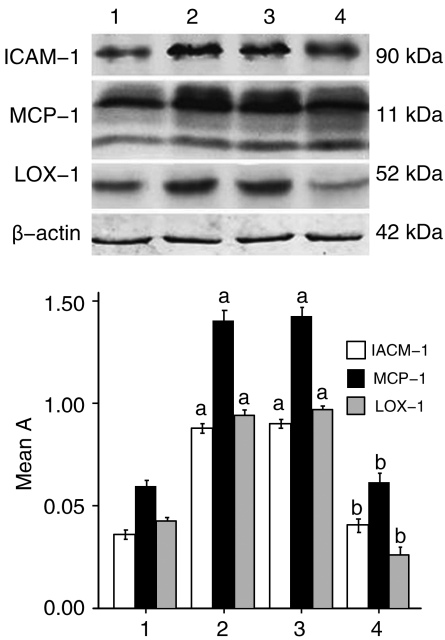


图 3. Western blot 检测 ICAM-1、MCP-1、LOX-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 的表达 左图为 ICAM-1、MCP-1、LOX-1,右图为 RhoA、ROCK1、ROCK2。1 为正常对照组,2 为 ox-LDL 处理组,3 为 ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组,4 为 ox-LDL + LV-si-OLR1 慢病毒转染组。a 为  $P < 0.05$ ,与正常对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 ox-LDL 处理组和 ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组比较。

Figure 3. The expressions of ICAM-1, MCP-1, LOX-1, RhoA, ROCK1, and ROCK2 detected by Western bolt

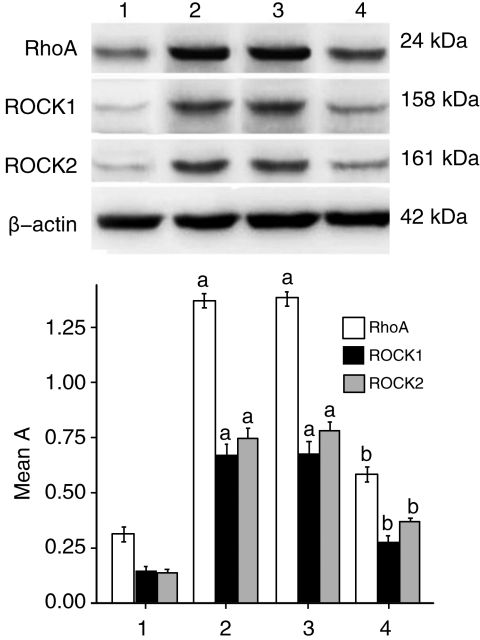
3 讨论

动脉粥样硬化主要是一种包括炎症细胞浸润、平滑肌细胞增殖、细胞外基质增加及血栓形成等多种病理过程的慢性炎症性疾病<sup>[5]</sup>。其中 ox-LDL 可诱导血管内皮细胞 ICAM-1、MCP-1 表达,使黏附于血管内皮细胞的外周血单核细胞迁入内皮下间隙进而转为巨噬细胞,病理性摄取、吞噬 ox-LDL 而成为泡沫细胞,在内皮细胞损伤早期发挥重要作用<sup>[6]</sup>。NO 是重要的内皮依赖舒张因子,它具有舒张血管,减轻内皮细胞损伤,减少白细胞黏附,抑制平滑肌细胞增殖和血小板聚集等作用,是重要的抗 As 因子<sup>[7]</sup>。RhoA/Rho 激酶信号通路在诸多血管疾

表 2. 各组内皮细胞培养液中 NO 含量的比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2. Comparison of each groups' NO content in the endothelial cells' culture ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	NO( $\mu\text{mol/L}$ )
正常对照组	9	63.28 $\pm$ 2.83
ox-LDL 处理组	9	30.45 $\pm$ 3.12 <sup>a</sup>
ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组	9	32.52 $\pm$ 5.41 <sup>a</sup>
ox-LDL + LV-si-OLR1 慢病毒转染组	9	55.25 $\pm$ 4.01 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与正常对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 ox-LDL 处理组和 ox-LDL + LV-NC 慢病毒转染组比较。



病的血管张力异常、内皮功能障碍、炎症、氧化应激和血管重塑等方面发挥了重要的作用<sup>[8]</sup>。

本实验成功构建针对 LOX-1 的 RNA 干扰序列并且包装得到有感染能力的慢病毒载体,转染 HUVEC 后成功抑制 LOX-1 的表达。同时建立 ox-LDL 损伤模型,通过实验证实在 ox-LDL 诱导下,与正常对照组相比,ox-LDL 处理组 ICAM-1、MCP-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 表达量明显增高;内皮细胞生存活力及 NO 生成量明显减低。干扰 LOX-1 表达后,在 ox-LDL 诱导下与未干扰 LOX-1 相比,ICAM-1、MCP-1、RhoA、ROCK1、ROCK2 表达量降低;内皮细胞生存活力及 NO 的生成量增高。进一步证实 ox-LDL 诱导引起 ICAM-1、MCP-1 的高表达,RhoA/ROCK 信

号通路激活以及 NO 生成减低是通过与 LOX-1 结合而实现的,与其他学者的研究结果<sup>[9,10]</sup>一致。

以往研究证实小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 干扰 LOX-1 表达对 ox-LDL 诱导引起的 MCP-1 表达增高具有明显的抑制作用<sup>[11]</sup>; 脑肠肽 (ghrelin) 可以减弱 ox-LDL 诱导内皮细胞引起的 ICAM-1 高表达<sup>[12]</sup>。刘慧婷等<sup>[13]</sup>研究表明氨氯地平可以对 ox-LDL 诱导引起的一氧化氮合酶表达下调起到抑制作用,进而引起 NO 的生成量增多。Saito 等<sup>[14]</sup>研究表明法舒地尔可以减轻 ox-LDL 引起的内皮细胞功能损伤; 另有研究指出,他汀类药物可以对 ox-LDL 引起的 RhoA/ROCK 信号通路激活起到抑制作用<sup>[15]</sup>。上述研究均提示抑制 ICAM-1、MCP-1 的高表达及 RhoA/Rho 激酶信号通路的激活,均能促进 NO 的生成,起到减轻内皮损伤的作用; 学者们并提出了针对内皮细胞损伤的干预机制,研究出治疗内皮细胞损伤的相应药物。上述这些研究为我们的研究提供了依据,但采取慢病毒作为载体从基因水平对 LOX-1 与 ox-LDL 作用的下游机制进行研究国内外尚属少见。本实验通过成功构建 LOX-1 的 RNA 干扰序列慢病毒载体,并转染 HUVEC,成功抑制 LOX-1 基因的表达。因慢病毒稳定性好,转染细胞后可以达到持久性表达的目的。这种利用慢病毒作为载体从基因水平研究 LOX-1 与 ox-LDL 作用的下游机制对临床试验更具有指导意义。在 ox-LDL 与 RhoA/ROCK 信号通路关系的研究中,分别检测了 RhoA、ROCK1、ROCK2 水平,使得对 RhoA/ROCK 信号通路的研究更深入化,为进一步分别研究 ROCK1 和 ROCK2 下游作用机制提供了依据。但本研究只是通过体外细胞实验,对 RNA 干扰 LOX-1 表达后,ox-LDL 诱导引起内皮细胞损伤的部分机制的保护作用进行了验证; 对其他引起内皮细胞损伤的未知机制以及基因干扰等,尚需设计更科学的动物实验、临床实验予以进一步研究。

综上所述,本研究成功构建了能有效抑制 LOX-1 表达的慢病毒载体,并转染 HUVEC,通过建立 ox-LDL 损伤模型验证了抑制 LOX-1 表达后对 ox-LDL 诱导的 ICAM-1、MCP-1 高表达, RhoA/ROCK 信号通路激活,细胞存活率及 NO 生成减低均有明显抑制作用,进而起到内皮细胞损伤的保护作用,为 LOX-1 作为靶基因治疗 As 提供实验依据。

[参考文献]

[1] Anogeianaki A, Angelucci D, Cianchetti E, et al. Atherosclerosis: a classic inflammatory disease[J]. Int J Immunopatholarmacol, 2011, 24(4): 817-825.

[2] 何平平, 欧阳新平, 唐艳艳, 等. 甘油三酯水平升高与动脉粥样硬化性心血管疾病的系数的研究新进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(10): 951-954.

[3] Rouas R, Uch R, Cleuter Y, et al. Lentiviral-mediated gene delivery in human monocyte-derived dendritic cells: optimized design and procedures for highly efficient transduction compatible with clinical constraints[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(9): 715-724.

[4] 李俊, 陶贵周, 黄建华. 靶向 LOX-1 基因 RNAi 慢病毒载体的构建及鉴定[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(7): 973-978.

[5] Higashi Y, Sukhanov S, Anwar A, et al. IGF-1, oxidative stress and atheroprotection[J]. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21(4): 245-254.

[6] Niu N, Sun SZ, Han B, et al. Relationship of ox-LDL/LOX-1 and vascular endothelial dysfunction of diet-induced obese immature rats and nicotinic acid's intervention outcomes[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2013, 93(42): 3388-3393.

[7] 吴淳淳, 杜心清. 内皮型一氧化氮合酶与冠心病的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(10): 1756-1758.

[8] Oka M, Fagan KA, Jones PL, et al. Therapeutic potential of RhoA/Rho kinase inhibitors in pulmonary hypertension[J]. Br J Pharmacol, 2008, 55(4): 444-454.

[9] Wang GF, Shi CG, Sun MZ, et al. Tetramethylpyrazine attenuates atherosclerosis development and protects endothelial cells from ox-LDL[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2013, 27(3): 199-210.

[10] Sawada N, Itoh H, Miyashita K, et al. Cyclic GMP kinase and RhoA Ser188 phosphorylation integrate pro-and antifibrotic signals in blood vessels[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(22): 6018-6032.

[11] 张社兵, 姜德谦, 欧柏青, 等. 血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1 基因沉默抑制人脐静脉内皮细胞表达分形趋化因子和单核细胞趋化蛋白 1[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(7): 578-582.

[12] 蒋艳, 姜孝新, 雷小勇. ghrelin 抑制 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞黏附分子表达[J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40(2): 144-146.

[13] 刘慧婷, 杨简, 童海, 等. 氨氯地平对 ox-LDL 致大鼠骨髓 EPCs 损伤的保护作用与上调一氧化氮合酶表达有关[J]. 中南医学科学杂志, 2011, 39(2): 139-143.

[14] Saito A, Shimizu H, Doi Y, et al. Immunoliposomal drug-delivery system targeting lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 for carotid plaque lesions in rats[J]. J Neurosurg, 2011, 115(4): 720-727.

[15] Senokuchi T, Matsumura T, Sakai M, et al. Statins suppress oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation by inactivation of the small G protein-p38 MAPK pathway[J]. J Biol Chem, 2005, 280(8): 6627-6633.

(此文编辑 曾学清)