

细胞色素 P450 2J2 在细胞模型中具有抗动脉粥样硬化作用

李锐^{1,2}, 邱健², 石磊², 严华成², 张园², 李晋², 阮云军², 肖华²

(1. 南方医科大学研究生学院, 广东省广州市 510515; 2. 广州军区广州总医院心血管内科, 广东省广州市 510010)

[关键词] 细胞色素 P450 2J2; 动脉粥样硬化; 人脐静脉内皮细胞; 泡沫细胞; 细胞增殖; 细胞迁移; 总胆固醇

[摘要] **目的** 通过在离体培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)以及人外周单核细胞来源的泡沫细胞模型上过表达细胞色素 P450 2J2 (CYP2J2), 探讨 CYP2J2 对动脉粥样硬化的影响。**方法** 构建 pLVX-IRES-ZsGreen1-CYP2J2 慢病毒载体, 感染 HUVEC 及人外周单核细胞来源的泡沫细胞, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和 Western blot 分别检测 CYP2J2 在细胞内的表达情况。离体培养 HUVEC 分为空白对照组、空载体组 (pLV 组) 和 CYP2J2 基因过表达组 (pLV-CYP2J2 组), 通过 MTS 法分别于转染后的 12、24、48、72 h 测定细胞的增殖情况, 通过 Transwell 实验检测 48 h 后的细胞迁移能力。另外, 采用密度梯度离心法从冠心病患者外周血中分离出单核细胞, 以 50 nmol/L 佛波酯刺激 48 h 使之转化为巨噬细胞, 然后加入终浓度为 80 mg/L 的氧化型低密度脂蛋白使之转化为泡沫细胞; 细胞亦分为空白对照组、pLV 组和 pLV-CYP2J2 组, 培养 48 h 后收集细胞, 然后通过油红 O 染色观察细胞内脂滴变化, 通过总胆固醇测定试剂盒检测细胞内总胆固醇的含量。**结果** RT-PCR、Western blot 结果显示, pLV-CYP2J2 病毒感染后, HUVEC 以及泡沫细胞中 CYP2J2 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高。与空白对照组、pLV 组相比, pLV-CYP2J2 处理显著增强了 HUVEC 在 24、48、72 h 的细胞增殖能力以及在 48 h 的细胞迁移能力, 而对 12 h 的细胞增殖则无统计学差异。在人外周单核细胞来源的泡沫细胞模型中, pLV-CYP2J2 处理显著降低了泡沫细胞的数量、泡沫细胞内油红脂滴的数量以及总胆固醇的含量。**结论** CYP2J2 基因过表达可促进 HUVEC 的细胞增殖和迁移, 降低人外周单核细胞来源的泡沫细胞形成, 提示 CYP2J2 具有抗动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Cytochrome P450 2J2 Exhibits Anti-atherosclerosis Effects in Two Cultured Cell Models

LI Rui^{1,2}, QIU Jian², SHI Lei², YAN Hua-Cheng², ZHANG Yuan², LI Jin², RUAN Yun-Jun², and XIAO Hua²

(1. Graduate School of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Department of Cardiology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

[KEY WORDS] Cytochrome P450 2J2; Atherosclerosis; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Foam Cell; Cell Proliferation; Cell Migration; Total Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of cytochrome P450 2J2 (CYP2J2) on atherosclerosis by overexpression of CYP2J2 in the cultured human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human peripheral monocyte-derived foam cell model. **Methods** Recombinant pLVX-IRES-ZsGreen1-CYP2J2 lentiviral vectors were infected into HUVECs and human peripheral monocyte-derived foam cells. CYP2J2 expressions in cells were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. Cultured HUVECs were divided into control group, vehicle group (pLV group) and CYP2J2 overexpression group (pLV-CYP2J2 group). Cell proliferation and migration were determined by MTS and Transwell assay. In addition, monocytes were isolated from the peripheral blood of patients with coronary heart disease by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and plastic adsorptive process. The isolated cells were induced and stimu-

[收稿日期] 2015-06-10

[修回日期] 2015-07-19

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目 (S2013010011957); 广东省医学科学技术研究基金 (WSTJJ20111108; 广文字第 036092 号); 广州市珠江科技新星资助项目 (2013J2200027)

[作者简介] 李锐, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 lirui109xn@163.com。通讯作者邱健, 硕士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病和高血压的基础与临床, E-mail 为 xxgnkqj@yahoo.cn。石磊, 硕士, 主任药师, 研究方向为细胞色素 P450 基因多态性与疾病相关性, E-mail 为 lucyshi622._921@163.com。

lated by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) at concentration of 50 nmol/L for 48 h to transfer them into macrophages, then adding oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) at a final concentration of 80 mg/L to make the cells transformed into foam cells. Cells were also divided into control group, pLV group and pLV-CYP2J2 group, all of them were collected in 48 h after the virus transfection. Intracellular lipid droplets and total cholesterol were detected by oil red O staining and the total cholesterol assay kit. **Results** The results of RT-PCR and Western blot demonstrated that CYP2J2 mRNA and protein expression were significantly increased in both HUVECs and foam cells after pLV-CYP2J2 virus infection. Compared with the control group and pLV group, pLV-CYP2J2 infection significantly enhanced the cell proliferation of HUVECs in 24, 48, 72 h, and the cell migration in 48 h, but there was no significant difference in cell proliferation in 12 h. In addition, in human peripheral monocyte-derived foam cell model, pLV-CYP2J2 infection significantly reduced the number of foam cells, oil red lipid droplets and total cholesterol content. **Conclusion** CYP2J2 can be overexpressed in HUVECs and human peripheral monocyte-derived foam cells, which promotes the proliferation and migration of HUVECs, and reduces the formation of foam cells, so it suggests that CYP2J2 has the function of anti-atherosclerosis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心血管系统疾病中最常见的疾病,是一种严重威胁到人类健康的慢性炎症性疾病,其主要病变特征为脂质在动脉血管壁内膜沉积、内皮功能紊乱、单核/巨噬细胞的浸润和增生、泡沫细胞的形成,引起内膜灶性纤维性增厚及粥样斑块形成,从而使动脉壁变硬、管腔狭窄,其病因与发病机制目前尚未完全清楚^[1-2]。近年的研究表明,细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450)表氧化酶能促进牛主动脉内皮细胞的增殖和迁移^[3],降低动物的血压水平^[4],降低血中的低密度脂蛋白胆固醇和提高高密度脂蛋白胆固醇水平,以及减少致炎基因和蛋白的表达^[5],而 CYP450 表氧化酶的功能若被阻断则效果相反^[6]。此外, CYP450 表氧化酶还可催化体内的花生四烯酸(arachidonic acid, AA)生成环氧二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acid, EET),后者有很强的抗炎特性,具有保护内皮细胞、抗炎、松弛血管平滑肌等多种心血管保护作用^[7],提示 CYP450 表氧化酶可能对 As 的发生发展起重要作用。在人体内, CYP2J2 是 CYP450 表氧化酶最常见的亚型之一,它在心肌细胞、冠状动脉内皮细胞、血管内皮细胞、肾脏、肝脏以及肠道均有丰富的表达^[8-9]。本课题组及其他课题组的研究发现, CYP2J2 基因多态性增加了冠状动脉粥样硬化性心脏病发生的风险^[8,10]。本研究通过在离体培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)以及人外周血单核细胞来源的泡沫细胞模型上过表达 CYP2J2,探讨 CYP2J2 对 As 的影响,研究结果将为阐明 CYP2J2 的生理效应提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

HUVEC 细胞株、病毒包装细胞 293T 细胞、慢病

毒表达载体 pLVX-IRES-ZsGreen1 质粒、辅助包装原件载体 pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 质粒均由广州莱德尔生物科技有限公司提供。人外周静脉血取自广州军区广州总医院心血管内科经冠状动脉造影确诊的冠心病患者,冠状动脉造影结果显示至少有 1 支或 1 支以上冠状动脉的直径狭窄程度 $\geq 50\%$ 。

1.2 主要试剂和仪器

细胞培养试剂如胎牛血清、RPMI-1640 培养基、DMEM-F12 培养基、青霉素、链霉素、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)等购自 Hyclone 公司,佛波酯购自 Sigma 公司,氧化型低密度脂蛋白购自广州晶欣生物科技有限公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)优质内参购自上海康成生物公司,鼠抗人 CYP2J2 抗体购自 Origene 公司,兔抗鼠 IgG(H + L)-HRP 购自 Southern Biotech 公司,鼠 IgG₁ 对照异硫氰酸荧光素(fluoresceine isothiocyanate, FITC)、抗人 CD14 FITC 试剂购自 eBioscience 公司, CellTiter96AQ 单溶液细胞增殖检测试剂购自 Promega 公司,油红 O 染液购自广州赛业生物科技有限公司,总胆固醇测定试剂盒购自浙江东瓯诊断产品有限公司,定量 PCR 用的引物合成及相关试剂购自 Invitrogen 公司。洁净工作台(SW-CJ-IFD, 苏州安泰公司),低速离心机(SC3614, 中科中佳公司),倒置光学显微镜(CKX41、U-CTR30-2, Olympus 公司),细胞恒温培养箱(HERACELL150i, Thermo Scientific 公司),倒置荧光显微镜(DMI6000B, Leica 公司),荧光定量 PCR 仪(ABI PRISM[®] 7500),流式细胞仪(BD calibur),酶标仪(Multiscan MK3, Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 病毒包装及滴度测定

CYP2J2 基因过表达载体构建、慢病毒包装及滴

度测定由广州莱德尔生物科技有限公司完成,主要步骤如下:将 CYP2J2 基因克隆入慢病毒表达载体(pLVX-IRES-ZsGreen1)中,经 pHelper 1.0、pHelper 2.0 和 pLVX-IRES-ZsGreen1-CYP2J2 三质粒共转染法在 293T 细胞中包装成 pLVX-IRES-ZsGreen1-CYP2J2 病毒,并用同样的方法包装含绿色荧光蛋白基因的 pLVX-IRES-ZsGreen1 病毒(对照病毒),以梯度稀释计数法检测到 CYP2J2 基因过表达的慢病毒滴度为 2.54×10^{11} TU/L。

1.4 HUVEC 培养及分组

HUVEC 细胞株,复苏后于含 10% 胎牛血清、100 kU/L 青链霉素的 DMEM-F12 培养基中培养,置 37℃、5% CO₂ 培养箱内贴壁生长,用 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸溶液消化传代,倒置显微镜观察细胞形态。取处于对数生长期 3~5 代的 HUVEC 按每孔 5×10^3 个细胞的密度接种至 96 孔板,待细胞融合至 90% 时开始进行病毒感染。实验分组:(1)不加任何处理的空白对照组(Control 组);(2)感染空病毒载体的空载体组(pLV 组);(3)感染带有 pLV-CYP2J2 慢病毒颗粒的 CYP2J2 过表达组(pLV-CYP2J2 组)。

1.5 人单核细胞源性泡沫细胞制备及分组

取临床上确诊的冠心病患者外周血 10 mL,加入等体积的 PBS 溶液,混匀,制成细胞悬液,小心而缓慢地将其加入到 20 mL 的淋巴细胞分离液上面。然后在水平离心机上以 4℃、400 g 离心力离心 20 min(自动减速模式)。吸取中间呈乳白色的单核细胞层,用预冷的含 2% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基离心洗涤 3 次。取少量进行胎盼蓝细胞计数,然后加入一定体积的完全培养基重新混悬细胞,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2~3 h,去上清,即得贴壁的单核细胞;取一定体积的上述细胞,采用流式细胞仪进行细胞表面分子 CD14 检测,测得单核细胞的纯度为 87.66%。将分离出的单核细胞以 50 nmol/L 佛波酯刺激 48 h 使之转化为巨噬细胞,然后加入终浓度为 80 mg/L 的氧化型低密度脂蛋白共孵育 24 h,使之转化为泡沫细胞。油红 O 染色观察细胞内脂滴变化;总胆固醇测定试剂盒检测细胞内总胆固醇的含量。实验分组与 HUVEC 细胞相同。

1.6 RT-PCR 检测 CYP2J2 mRNA 的表达

细胞感染后培养 48 h,收集细胞,用 Trizol 法提取总 RNA。取 1 μL RNA 样品 50 倍稀释,在核酸蛋白测定仪上检测总 RNA 的浓度,琼脂凝胶电泳分析总 RNA 的质量。逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)按照

Promega 公司的试剂盒说明书进行操作。CYP2J2 基因引物用软件 Primer 5.0 设计,由 Invitrogen 公司合成。引物序列如下:CYP2J2 为目的片段,上游引物为 5'-AGCACCCTGGACCTCTTCTT-3',下游引物为 5'-GGCCAATCACTCTGTCAATCT-3',基因扩增产物为 130 bp;18s rRNA 作为内参,上游引物为 5'-CCT-GGATACCGCAGCTAGGA-3',下游引物为 5'-GCG-GCGCAATACGAATGCCCC-3',基因扩增产物为 112 bp;PCR 扩增条件为:50℃ 2 min,95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 32 s,扩增 40 个循环。

1.7 Western blot 检测 CYP2J2 蛋白的表达

收集感染 48 h 的细胞,裂解并提取蛋白,用 BCA 法测定蛋白质含量。将制备好的样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转移至二氟化树脂膜上,用 5% 的脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,TBST 洗膜 3 次;加入 1:1000 稀释的鼠抗人 CYP2J2 抗体或者 1:1000 稀释的 HRP-GAPDH 于 4℃ 孵育过夜,同上洗膜 3 次;然后加入 1:4000 稀释的兔抗鼠 IgG(H+L)于 37℃ 孵育 1 h,同上洗膜 3 次;将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面,并使其反应持续 5 min,用试剂盒提供的滤纸吸去膜表面多余的底物溶液,放至暗盒曝光显影。

1.8 MTS 法检测细胞增殖能力

将细胞浓度调整为 1×10^8 个/升,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL(细胞数为 1×10^4 个)。待细胞贴壁后,加入转染的病毒液,收集各时间点(转染后 12、24、48、72 h)的细胞,加入 CellTiter96AQ 单溶液细胞增殖检测试剂 10 μL,比例为 1:10;孵育 4 h 后,用酶标仪检测,读取 490 nm 处的吸光度(absorbance,A)值。

1.9 Transwell 实验检测细胞迁移能力

收集不同处理组的细胞,调整细胞数量为 1×10^5 个,用 100 μL 无血清培养基重悬,加入到 Transwell 细胞培养板的小室上室,在下室加入 600 μL 完全培养基,置 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。48 h 后取出小室,用湿棉签轻轻擦去上室未移动的细胞,4% 多聚甲醛固定 20 min,1×PBS 洗涤 1 次,结晶紫染色 10 min,1×PBS 再洗涤 1 次,随机选择 5 个显微镜视野计数迁移至下层的细胞。

1.10 油红 O 染色观察细胞内脂滴变化

将培养基从孔中移走,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,用 2 mL 4% 的多聚甲醛固定细胞 30 min;PBS 洗涤 3 次,每次 1 min,然后用 1 mL 油红 O 染色液(用稀释水 3:2 稀释后用滤纸过滤)染色 30 min;

PBS 洗涤 3 次,每次 1 min,显微镜下观察细胞内脂质染色情况。

1.11 总胆固醇检测

消化、离心收集泡沫细胞或直接在培养皿内裂解,取已裂解的细胞混悬液 15 μ L 加入到 300 μ L 已配好的总胆固醇测定试剂,充分混匀,置 37 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 10 min;在酶标仪上先用蒸馏水(或无水乙醇) + 工作液的空白管调零,然后测定各管 560 nm 处的吸光度值。总胆固醇含量 (mmol/L) = $A_T/A_S \times C_S$; A_T :测定管 A 值, A_S :标准管 A 值, C_S :标准管浓度。

1.12 统计学分析

所有数据应用 SPSS 13.0 统计软件进行处理。实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,方差不齐者采用近似 F 检验 (Welch 法), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病毒感染后细胞内 CYP2J2 mRNA 和蛋白的表达水平

将包装好的病毒分别转染到 HUVEC 及人外周单核细胞来源的泡沫细胞中,48 h 后通过 RT-PCR 和 Western bolt 分别检测 CYP2J2 mRNA 和蛋白在各组细胞中的表达水平。RT-PCR 的检测结果显示,与空白对照组、pLV 组相比,pLV-CYP2J2 组在 2 种细胞内的 CYP2J2 mRNA 表达水平均显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.001$; 图 1A)。Western bolt 的检测结果显示,pLV-CYP2J2 感染 HUVEC 及泡沫细胞 48 h 后,细胞内 CYP2J2 的蛋白水平较空白对照组、pLV 组均显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.001$; 图 1B)。

2.2 CYP2J2 过表达对 HUVEC 细胞增殖的影响

对 CYP2J2 基因转染后的 HUVEC 细胞,用 MTS 法检测细胞生长情况,连续检测 12、24、48、72 h 四个时间点,每个时间点设 3 个重复孔。结果显示,与转入空载体的 pLV 组相比,pLV-CYP2J2 组在转染后 24 h ($P < 0.05$)、48 h ($P < 0.01$) 及 72 h ($P < 0.001$) 的细胞数量明显增多 (图 2),并呈时间依赖性,而在转染后 12 h 的细胞数量则无明显差异。同时,pLV 组与空白对照组相比,其细胞数量亦无统计学差异 ($P > 0.05$; 图 2)。

2.3 CYP2J2 过表达对 HUVEC 细胞迁移的影响

对 CYP2J2 基因转染 48 h 后的 HUVEC 细胞,通过 Transwell 实验检测细胞迁移能力。结果显示,pLV 组、空白对照组均未发现有细胞迁移至下层,而

pLV-CYP2J2 组则明显增加了 HUVEC 的迁移数 (206.33 ± 31.88 个),差异具有统计学意义 ($P < 0.001$; 图 3)。

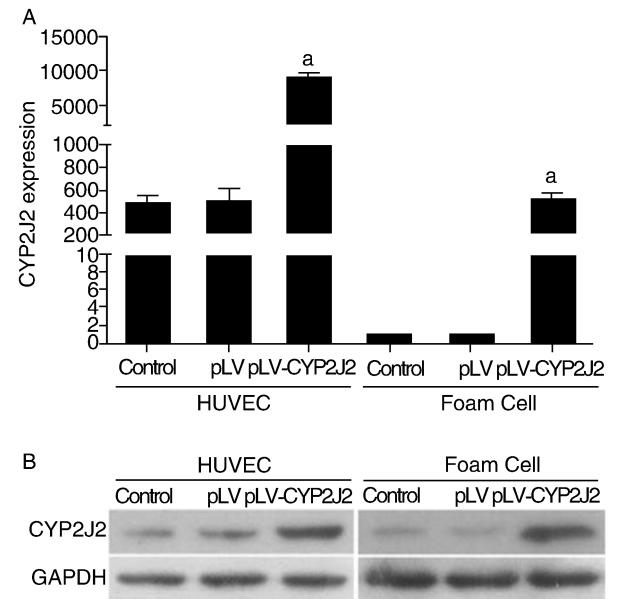


图 1. 病毒感染 HUVEC 及泡沫细胞 48 h 后细胞内 CYP2J2 mRNA 和蛋白的表达水平 A 为 RT-PCR 检测的统计结果 ($n = 3$), B 为 Western blot 的检测结果。a 为 $P < 0.001$, 与 Control 组、pLV 组比较。

Figure 1. The expression level of CYP2J2 mRNA and protein in HUVEC and foam cell after 48 h virus transfection

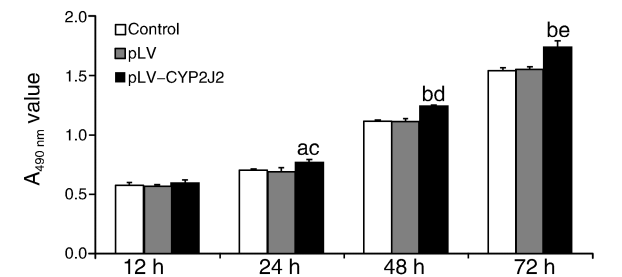


图 2. CYP2J2 过表达对 HUVEC 细胞增殖的影响 ($n = 3$) a 为 $P < 0.01$, 与 Control 组比较; b 为 $P < 0.001$, 与 Control 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 pLV 组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 pLV 组比较; e 为 $P < 0.001$, 与 pLV 组比较。

Figure 2. Effect of CYP2J2 overexpression on the cell proliferation of HUVEC ($n = 3$)

2.4 CYP2J2 过表达对泡沫细胞形成及其胞内油红脂滴的影响

CYP2J2 基因过表达后泡沫细胞形成的数量 (170.00 ± 27.40 个) 显著下降, 与 pLV 组 (256.33 ± 34.26 个)、空白对照组 (245.67 ± 31.53 个) 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 4)。油红 O 染色结果显示,pLV-CYP2J2 组细胞内的脂滴也出现显

著减少,与另两组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$;图 4)。

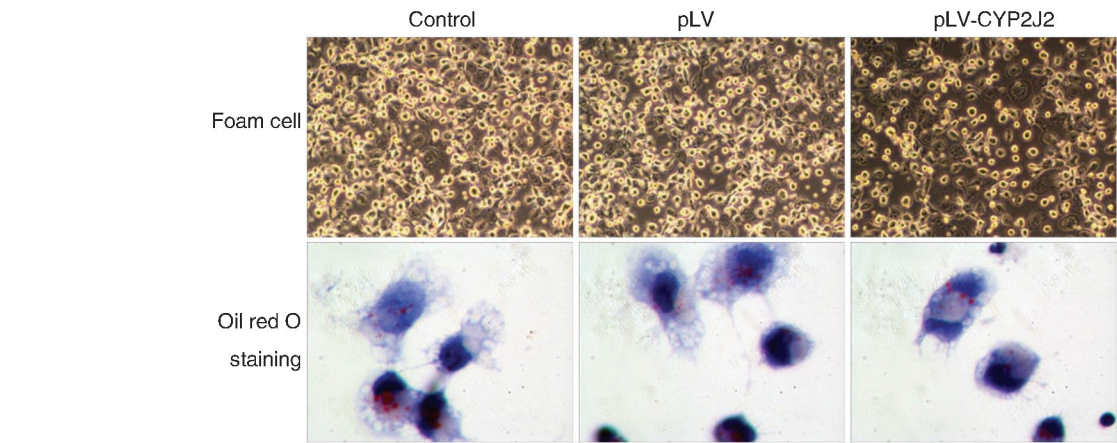
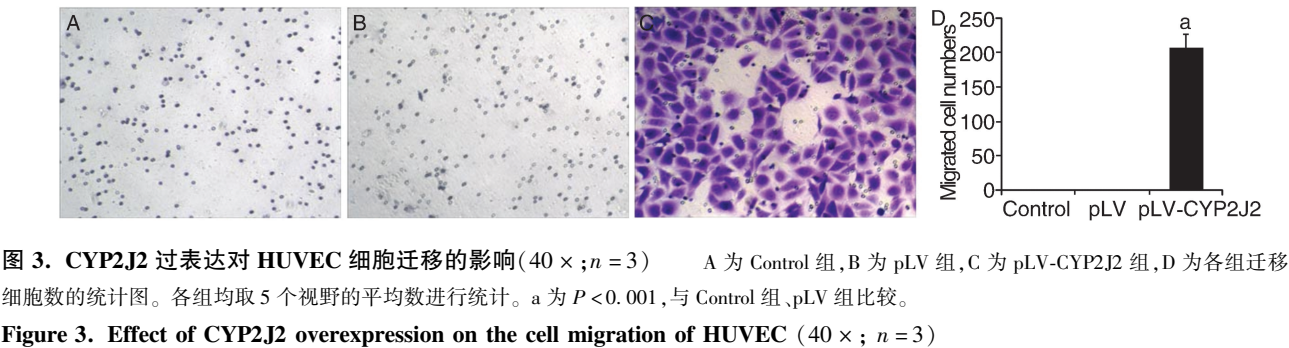


图 4. CYP2J2 过表达对泡沫细胞形成及其胞内油红脂滴的影响 上排图放大倍数为 20,下排图放大倍数为 100。

Figure 4. Effect of CYP2J2 overexpression on the cell formation and oil red lipid droplet of foam cells

2.5 CYP2J2 过表达对泡沫细胞内总胆固醇生成的影响

通过对细胞内的总胆固醇进行检测,发现泡沫细胞模型(Control)中细胞内的总胆固醇含量比正常细胞(Normal cell)的含量增多,差异具有显著性($P < 0.001$;图 5)。当转入空病毒载体(pLV 组)后,细胞内的总胆固醇含量与空白对照组(Control 组)相比无显著差异($P > 0.05$);然而,CYP2J2 基因过表达(pLV-CYP2J2)后,泡沫细胞内总胆固醇的含量显著下降,与空白对照组、pLV 组相比,差异均具有统计学意义($P < 0.001$;图 5)。

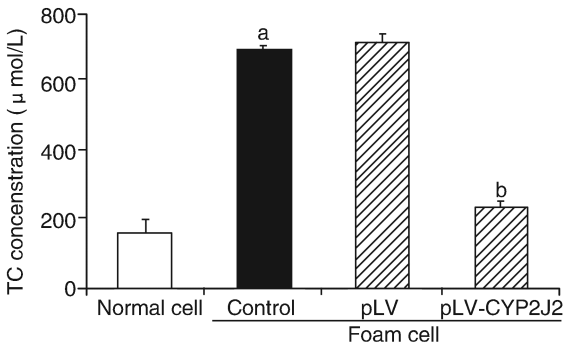


图 5. CYP2J2 过表达对泡沫细胞内总胆固醇生成的影响($n = 3$) a 为 $P < 0.001$,与 Normal cell 组比较;b 为 $P < 0.001$,与 Control 组、pLV 组比较。

Figure 5. Effect of CYP2J2 overexpression on the formation of total cholesterol in foam cells ($n = 3$)

3 讨论

本研究成功构建了人源 CYP2J2 的慢病毒表达载体 pLVX-IRES-ZsGreen1-CYP2J2,并转染至离体培养的 HUVEC 以及人外周单核细胞来源的泡沫细胞模型上,进而观察 CYP2J2 在这两种细胞中的表达情况及其对细胞增殖、迁移、油红脂滴及胆固醇生成等作用的影响,为进一步研究 CYP2J2 在动脉

粥样硬化中的作用提供新的方法及依据。研究发现,pLV-CYP2J2 病毒感染后,HUVEC 以及泡沫细胞中 CYP2J2 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高,提示该病毒能够在 HUVEC 及泡沫细胞中稳定高表达。与空白对照组、pLV 组相比,pLV-CYP2J2 处理显著增强了 HUVEC 在 24、48、72 h 的细胞增殖能力以及

在 48 h 的细胞迁移能力;此外,在人外周单核细胞来源的泡沫细胞模型中,pLV-CYP2J2 处理显著降低了泡沫细胞的形成数量、泡沫细胞内油红脂滴的数量以及细胞内总胆固醇的含量。以上结果提示,CYP2J2 具有抗动脉粥样硬化的作用。

内皮功能紊乱、单核/巨噬细胞的浸润和增生、泡沫细胞的形成是 As 的主要病变特征^[1-2]。在 As 的早期阶段,内皮细胞发生结构性损伤或出现功能性紊乱,从而导致单核细胞在内皮细胞上招募,随后迁移入内膜并分化为巨噬细胞。在受体和胞饮介导下,分化而来的巨噬细胞对内膜下的脂质进行摄取,脂质负荷的巨噬细胞转化为泡沫细胞,大量泡沫细胞的蓄积将形成 As 的脂质核心^[11-12]。因此,本研究选取了与 As 发病密切相关的 HUVEC 以及人外周单核细胞来源的泡沫细胞作为体外的细胞模型,探讨 CYP2J2 基因的过表达是否具有抗 As 的作用。

CYP450 是肝微粒体中最重要的混合功能氧化酶,主要参与外源性物质的代谢以及内源性底物的生物转化过程。近年的研究表明,CYP450 表氧化酶的过表达能够抑制丝裂原激活的蛋白激酶的去磷酸化以及激活 PI3K/Akt 信号通路,从而对肿瘤坏死因子 α 诱导的内皮细胞凋亡起保护作用^[7,13];通过 Transwell 实验和划痕愈合检测还发现,CYP450 表氧化酶能促进牛主动脉内皮细胞的增殖和迁移^[3];在动物实验中,通过转基因或者病毒感染的方式过表达 CYP450 表氧化酶均能降低动物的血压水平^[4]、降低血中的低密度脂蛋白胆固醇和提高高密度脂蛋白胆固醇、以及减少致炎基因和蛋白的表达^[5],而 CYP450 表氧化酶的功能若被阻断则效果相反^[6]。此外,CYP450 表氧化酶还能对心血管系统中的 AA 环氧化作用产生 4 种形式的 EET(包括 5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET、14,15-EET),后者能通过调控内皮细胞内多种细胞信号通路,促进内皮细胞的增殖、存活、迁移以及血管生成等,从而对心血管起保护作用^[7]。在人体内,CYP2J2 是 CYP450 表氧化酶最常见的亚型之一,它在心肌细胞、心脏冠状动脉内皮细胞、血管内皮细胞、肾脏、肝脏以及肠道均有丰富的表达^[8-9],提示 CYP2J2 极有可能与 As 的发生发展密切相关。除此之外,CYP2J2 存在广泛的基因多态性,截止目前,已发现了 218 个单核苷酸突变,并且有相当数量的突变位点能导致 CYP2J2 生物活性的下降,或者降低其蛋白表达水平,甚至导致血浆 EET 含量的下降^[8]。更重要的是,国内外的研究均表明,CYP2J2 的基因多态性能

够增加冠状动脉粥样硬化性心脏病发生的风险^[8,10]。由此不难假设,如果心血管内 CYP2J2 的表达减少或发生功能异常,其对血管的保护作用将减弱甚至消失,最终会导致 As 的发生及发展。在本研究中,MTS 实验和 Transwell 实验检测发现,CYP2J2 过表达可以显著促进 HUVEC 的细胞增殖及迁移能力,说明 CYP2J2 基因转染可以提升内皮细胞的活力和功能,从而在血管损伤修复中发挥积极作用;此外,巨噬细胞中脂质蓄积形成泡沫细胞是动脉粥样硬化斑块的显著特征^[14],而本研究在人外周单核细胞来源的泡沫细胞模型上,通过油红 O 染色及总胆固醇的检测,发现 CYP2J2 过表达可以显著降低泡沫细胞的形成数量、泡沫细胞内油红脂滴的数量以及细胞内总胆固醇的含量,提示 CYP2J2 基因转染对 As 具有很好的保护作用。本研究的结果为以上的假设提供了有力证据,并对确定 CYP2J2 基因在动脉粥样硬化发生发展中的作用提供了重要的科学依据。

总之,本研究结果表明,CYP2J2 基因过表达可促进 HUVEC 的细胞增殖和迁移,降低人外周单核细胞来源泡沫细胞的形成、胞内脂滴的数量以及总胆固醇的生成,提示 CYP2J2 具有抗动脉粥样硬化的作用。本研究为阐明 As 发生机制并为 As 的防治提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1410-422.
- [2] Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis[J]. J Cell Biol, 2015, 209(1): 13-22.
- [3] Wang Y, Wei X, Xiao X, et al. Arachidonic acid epoxygenase metabolites stimulate endothelial cell growth and angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 314(2): 522-532.
- [4] Lee CR, Imig JD, Edin ML, et al. Endothelial expression of human cytochrome P450 epoxygenases lowers blood pressure and attenuates hypertension-induced renal injury in mice[J]. FASEB J, 2010, 24(10): 3770-781.
- [5] Xu XZ, Zhang XA, Wang DW. The roles of CYP450 epoxygenases and metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, in cardiovascular and malignant diseases[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63(8): 597-609.

(下转第 1262 页)

(上接第 1228 页)

- [6] Athirakul K, Bradbury JA, Graves JP, et al. Increased blood pressure in mice lacking cytochrome P450 2J5[J]. FASEB J, 2008, 22(12): 4 096-108.
- [7] Fleming I. The pharmacology of the cytochrome P450 epoxide/soluble epoxide hydrolase axis in the vasculature and cardiovascular disease[J]. Pharmacol Rev, 2014, 66(4): 1 106-140.
- [8] Askari A, Thomson SJ, Edin ML, et al. Roles of the epoxide hydrolase CYP2J2 in the endothelium[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2013, 107(12): 56-63.
- [9] Yan HC, Kong YY, He BX, et al. CYP2J2 rs890293 polymorphism is associated with susceptibility to Alzheimer's disease in the Chinese Han population[J]. Neurosci Lett, 2015, 593: 56-60.
- [10] 詹同运, 石磊, 赵树进, 等. CYP2J2 *7 与中国汉族人冠心病相关性研究[J]. 广东医学, 2011, 32(12): 1 543-545.
- [11] 刘守钾, 杨智承, 刘苑, 等. 动脉粥样硬化中单核细胞招募与泡沫细胞形成[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(11): 957-960.
- [12] 陈孔, 曾高峰, 唐朝克. 巨噬细胞增殖和凋亡与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(9): 965-969.
- [13] Yang S, Lin L, Chen JX, et al. Cytochrome P-450 epoxide hydrolases protect endothelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor- α via MAPK and PI3K/Akt signaling pathways[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(1): H142-H151.
- [14] 孟磊, 谭艳美, 袁中华. 中性胆固醇酯水解酶与动脉粥样硬化[J]. 中南医学科学杂志, 2015, 43(2): 217-221.
- (此文编辑 曾学清)