

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-08-0618-04

# 兔动脉粥样硬化形成过程中血管平滑肌细胞 层肉碱棕榈酰转移酶 iv mRNA 表达下调

崇爱国, 刘伏元, 许明生, 李红旗, 严 激

(安徽医科大学附属省立医院心内科, 安徽省合肥市 230001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞; 肉碱棕榈酰转移酶 iv; 逆转录聚合酶链反应; 脂肪酸 $\beta$ 氧化; 兔

[摘要] 目的 观察高脂饮食复制兔动脉粥样硬化过程中血管平滑肌组织基因表达的变化, 以探讨动脉粥样硬化形成是否伴有血管平滑肌细胞能量代谢基因表达的变化。方法 36只新西兰大白兔随机分成对照组和高脂组, 在饲养的第8、16和第24周用逆转录聚合酶链反应方法检测血管壁平滑肌细胞层肉碱棕榈酰转移酶 iv mRNA 的表达水平。结果 高胆固醇饮食诱导兔形成动脉粥样硬化的过程中, 16周和24周组同对照组比较肉碱棕榈酰转移酶 iv mRNA 的表达明显减少, 24周同16周比较也明显减少。结论 兔动脉粥样硬化形成过程中, 随时间延长血管平滑肌细胞层肉碱棕榈酰转移酶 iv mRNA 表达下调。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Carnitine Palmitoyltransferase-iv mRNA Downregulated in Vascular Smooth Muscle Tissue of Rabbit During Atherosclerosis

CHONG Ai-Guo, LIU Fu-Yuan, XU Ming-Sheng, LI Hong-Qi, and YAN Ji

(Department of Cardiology, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Vascular Smooth Muscle Cell; Carnitine Palmitoyltransferase-iv; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of carnitine palmitoyltransferase-iv (CPT-iv) gene in vascular smooth muscle tissue during atherosclerosis at 8th, 16th, 24th week after high cholesterol diet to rabbit to determine whether atherogenesis is associated with the changes in the gene expression of vascular smooth muscle tissue energy metabolism. **Methods** 36 rabbits were randomly and equally assigned to control group and high cholesterol diet group. The gene expression of CPT-iv were detected in vascular smooth muscle tissue of aorta thoracalis by semi quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) at the end of 8th, 16th, and 24th week. **Results** 16 and 24 weeks after high cholesterol diet, the atherosclerosis formed and expression of CPT-iv mRNA was reduced. Compared with that of 16th week, CPT-iv mRNA was reduced at the end of 24th week. **Conclusion** During atherosclerosis of rabbit, the expression of CPT-iv mRNA was downregulated in vascular smooth muscle tissue.

血管内皮功能损伤是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成早期的始动环节, 在As病变早期, 甚至在形态学上尚无任何可见的血管内膜增厚之前, 内皮依赖的血管舒张效应已明显减弱<sup>[1]</sup>。也有学说认为平滑肌细胞的表型转化所引发的血管重构是As发生发展的根本原因<sup>[2]</sup>。新陈代谢是生命的基本特征之一, As形成过程中的能量代谢变化尚不清楚。作为产能物质, 葡萄糖和脂类物质在体内的代谢发生改变可能也是疾病发生发展过程的相关因

素。肉碱棕榈酰转移酶 iv(carnitine palmitoyltransferase-iv, CPT-iv)是细胞线粒体脂肪酸氧化的限速酶, 由于CPT缺乏, 患者可出现肝脏生酮衰竭、肌肉乏力、肌痛、横纹肌溶解、肌球蛋白尿、急性肾功能衰竭和急性呼吸功能衰竭<sup>[3-6]</sup>, 在As形成过程中平滑肌细胞CPT-iv是如何变化尚不清楚。本文通过高脂饮食建立兔As模型观察第8、16和24周时血管平滑肌细胞层CPT-iv mRNA的水平来阐述此问题。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物选择和分组

挑选健康雄性新西兰大白兔36只, 入选的大白兔血脂水平差异不大(由安徽医科大学实验动物中心提供), 平均体重 $1.73 \pm 0.24$  kg, 随机分成两组:

[收稿日期] 2007-04-16 [修回日期] 2007-08-14

[作者简介] 崇爱国, 硕士研究生, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail为aiguochong@yahoo.com.cn。通讯作者刘伏元, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及高血压病的预防和治疗, E-mail为liufuyuan@medmail.com.cn。许明生, 硕士研究生, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。

高脂组 ( $n = 18$ ) 采用每单位重量普通饲料里面含 5% 植物油、5% 猪油、15% 鸡蛋黄和 0.5% 胆固醇喂养, 对照组 ( $n = 18$ ) 用普通饲料喂养。高脂喂养组在喂养的第 8、16 和第 24 周随机处死 6 只; 对照组在喂养的第 8、16 和第 24 周随机处死 6 只作为对照观察点。

## 1.2 血脂的检测

高脂组和对照组每只兔在 8、16、24 周清晨空腹抽取耳中动脉血 5 mL, 用 (日本 Olympus AU5400 全自动生物化学分析仪及血生物化学测定试剂盒) 检测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。

## 1.3 升主动脉病理形态学观察和标本制备

在 8、16、24 周每组随机挑选 6 只兔, 称重后, 麻醉下迅速完整取出大中血管包括升主动脉、主动脉和腹主动脉至髂动脉分叉处, 并把标本置冰浴 PBS 液清洗去除血液及血管外组织, 取各组兔升主动脉少许 (距主动脉瓣环约 1 cm), 10% 甲醛固定后常规石蜡包埋标本, 连续切片, 切片厚度 4  $\mu$ m 行 HE 染色, 在光镜下观察其病理学改变并照相; 采用 Image-ProPlus 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司) 测量升主动脉平均内膜厚度 (intima thickness, IT)、中膜厚度 (media thickness, MT)、内膜面积 (intima area, IA) 与中膜面积 (media area, MA), 计算 IT+MT、IT/MT 和 IA/MA。高脂组取胸主动脉段粥样斑块堆积形成最明显处 3~4 cm, 对照组取相同位置, 用眼科手术器械剥离血管外膜, 再用刀片轻轻刮去血管内膜, 获取血管中膜平滑肌细胞层, 装于冻存管置于液氮罐后再转至 -80  $^{\circ}$ C 低温冰箱保存备用。

## 1.4 逆转录聚合酶链反应检测血管平滑肌层肉碱棕榈酰转移酶 ivmRNA 的表达

取血管中膜平滑肌细胞层, 迅速剪碎加入 1 mL Trizol 试剂, 置于组织匀浆器中匀浆, 抽提总 RNA, 采

用紫外分光光度计测定其浓度。取 1  $\mu$ g 总 RNA 进行逆转录反应, 反应体系 20  $\mu$ L 含 1  $\mu$ g 总 RNA、Mg-Cl<sub>2</sub> 4  $\mu$ L (25 mmol/L)、随机引物 1  $\mu$ L (50 pmol/L)、RNase inhibitor 20 U、AMV 逆转录酶 5 U、dNTP 2  $\mu$ L (10 mmol/L), 每一标本取逆转录产物 10  $\mu$ L 进行 CPT-iv 与  $\beta$ -actin 的反应; PCR 反应体系为 50  $\mu$ L, 含相应上、下游引物各 0.25  $\mu$ L, Taq 酶 1.25 U。CPT-iv 上游引物为 5'-GTG AAG AAA CAA CCC CCA GA-3', 下游引物为 5'-GGA AGC ACT TGA GAC AAG CC-3', 产物长度为 641 bp; 内参  $\beta$ -actin 上游引物为 5'-ACC CAC AC GGT GCC CAT CTA CGA GG-3', 下游引物为 5'-AGC TCG TAG CTC TTC TCC AGG GAG G-3', 产物长度为 248 bp (由上海生工生物技术有限公司合成)。CPT-iv 的扩增循环条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 45 s  $\rightarrow$  57  $^{\circ}$ C 退火 45 s  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外光灯下拍照, 将凝胶电泳图像输入美国 Kodak 凝胶分析系统, 应用 1D Image Analysis Software 计算同一管内 CPT-iv 与  $\beta$ -actin 扩增条带吸光度比值作为其相对表达强度。

## 1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件包, 所有数据存入数据文件中, 正态性分布资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 方差齐性指标多组间进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 及两两比较  $q$  检验, 方差不齐的指标采用秩和检验。

## 2 结果

### 2.1 两组血脂浓度的变化

高脂组血清 TC、TG 和 LDLC 浓度第 16 周和第 24 周较第 8 周升高, 第 24 周较第 16 周也升高, 且高脂组各时间点血清 TC、TG 和 LDLC 浓度均较对照组同时点升高 ( $P < 0.05$ ), 而对照组血清 TC、TG 和 LDLC 浓度各时间点无明显变化 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

表 1. 实验兔血脂浓度的变化 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

血脂	对照组			高脂组		
	8 周	16 周	24 周	8 周	16 周	24 周
TC	1.61 $\pm$ 0.62	1.64 $\pm$ 0.86	1.58 $\pm$ 0.43	14.97 $\pm$ 2.877 <sup>a</sup>	21.43 $\pm$ 2.15 <sup>ab</sup>	29.56 $\pm$ 2.59 <sup>abc</sup>
TG	1.28 $\pm$ 0.35	1.19 $\pm$ 0.38	1.21 $\pm$ 0.39	1.79 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	3.24 $\pm$ 1.12 <sup>ab</sup>	4.65 $\pm$ 1.23 <sup>abc</sup>
LDLC	0.89 $\pm$ 0.31	0.93 $\pm$ 0.35	0.95 $\pm$ 0.42	7.42 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	10.95 $\pm$ 1.19 <sup>ab</sup>	16.82 $\pm$ 1.68 <sup>abc</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组同时点比较; b 为  $P < 0.05$ , 与本组第 8 周比较; c 为  $P < 0.05$ , 与本组第 16 周比较。

### 2.2 血管壁病理形态学观察

对照组兔胸腹主动脉柔软而有弹性, 内膜光滑。

高脂组血管壁变厚 (8 周)、内壁有黄白色脂纹 (16 周) 及蜡滴样斑块 (24 周, 图 1), 随喂养时间的延长

动脉内膜不断增厚(图2)。IT+MT、IT/MT和IA/MA在对照组随喂养时间的延长变化不明显( $P > 0.05$ ), 高脂组除了第8周与对照组相比较差异无显著性外, 第16周和第24周与对照组相比明显增加, 同高脂组第8周比较, 各值也都增加( $P < 0.01$ , 表2)。

### 2.3 高脂饮食不同时间血管平滑肌细胞层肉碱棕榈酰转移酶 iv mRNA 表达的变化

对照组与高脂饮食组在不同时间均能检测到CPT-iv mRNA的阳性条带(图3), 各阳性条带的位置与预期的CPT-iv逆转录聚合酶链反应产物大小相符。对照组中CPT-iv mRNA在不同时间表达差异无显著性; 高脂组除第8周与对照组比较差异无显著性外, 第16周和24周与对照组比较差异均有显

著性( $P < 0.01$ ), 且高脂组各时间点比较差异有显著性( $P < 0.01$ , 表3)。说明随高脂喂养时间的延长, 血管壁平滑肌细胞层表达CPT-iv mRNA逐渐下降。

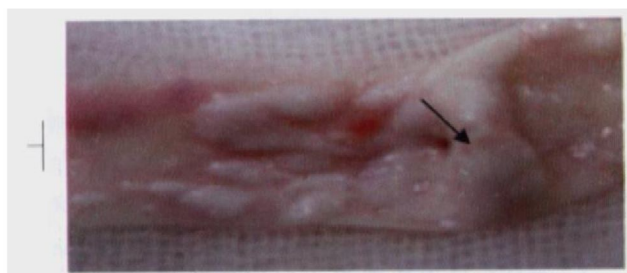


图1. 高脂组升主动脉及胸主动脉肉眼观察

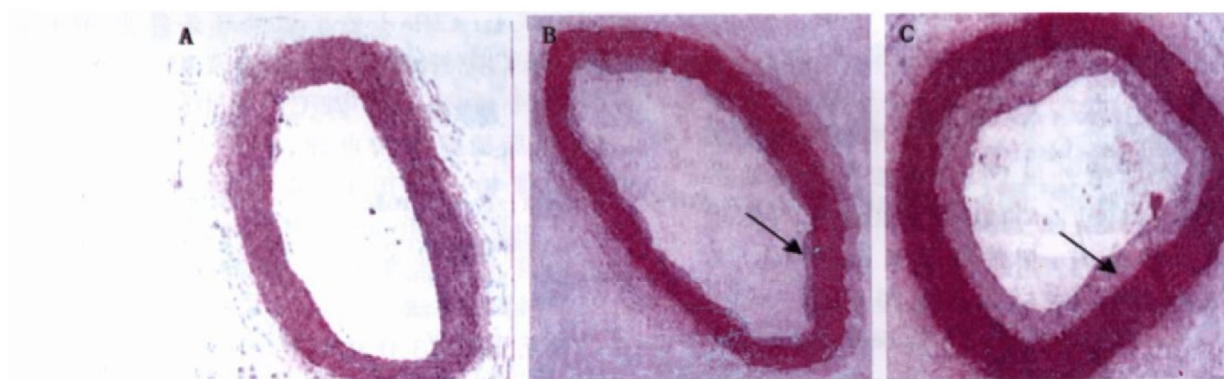


图2. 高脂组腹主动脉显微镜观察(HE × 40) A、B、C 分别为第8、16和24周。

表2. 各组病理形态学定量分析

指 标	对照组			高脂组		
	8周	16周	24周	8周	16周	24周
IT+MT (μm)	142.0 ± 7.9	144.0 ± 8.2	145.0 ± 8.9	146.0 ± 9.7	176.0 ± 8.3 <sup>ab</sup>	223.0 ± 7.6 <sup>abc</sup>
IT/MT	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.31 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.53 ± 0.08 <sup>abc</sup>
IA/MA	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.23 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.46 ± 0.06 <sup>abc</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组同期比较; b 为  $P < 0.01$ , 与本组第8周比较; c 为  $P < 0.01$ , 与本组第16周比较。

表3. 不同时间血管平滑肌细胞层肉碱棕榈酰转移酶 iv mRNA 的表达

分组	8周	16周	24周
对照组	0.82 ± 0.02	0.78 ± 0.01	0.79 ± 0.02
高脂组	0.77 ± 0.02	0.44 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>abc</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组同时期比较; b 为  $P < 0.01$ , 与本组第8周比较; c 为  $P < 0.01$ , 与本组第16周比较。

## 3 讨论

能量代谢是维持正常生命活动所必需的, 不同的病理生理条件下, 机体不同组织的能量代谢会出

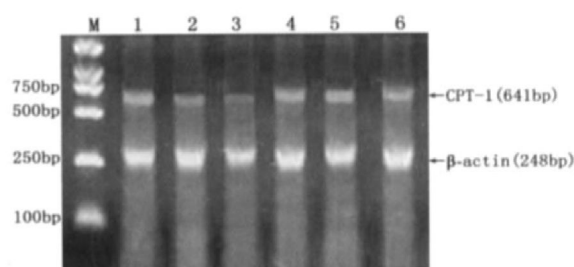


图3. 血管平滑肌细胞层肉碱棕榈酰转移酶 iv mRNA 的表达

1、2、3、4、5和6依次为高脂组第8、16、24周和对照组第8、16及24周。

现不同的变化。线粒体是体内产能的主要场所,能量产生主要通过脂肪酸 $\beta$ 氧化和葡萄糖代谢两种方式。在脂肪酸 $\beta$ 氧化过程中,CPT-iv是脂肪酸进入线粒体流量的关键调控位点,CPT-iv位于线粒体外膜上,催化长链脂酰辅酶A与肉碱合成脂酰肉碱,是长链脂肪酸进入线粒体进行 $\beta$ 氧化的限速酶。CPT-iv在哺乳动物中有L-CPT-iv和M-CPT-iv两种亚型,两者氨基酸序列同源性达62%<sup>[7]</sup>,L-CPT-iv主要在肝脏、心脏及胰岛中表达,M-CPT-iv仅表达在心脏、肌肉和睾丸。生理情况下,CPT-iv受丙二酰辅酶A抑制,丙二酰辅酶A是合成脂肪酸的原料,而丙二酰辅酶A的合成又受乙酰辅酶A羧化酶(acetyl coA carboxylase, ACC)调节,ACC在体内能量代谢平衡中具有重要作用。在肝细胞中,胰岛素和高脂饮食可通过诱导ACC的活化及合成丙二酰辅酶A浓度增加,进而抑制CPT-iv表达以限制胞浆内游离脂肪酸 $\beta$ 氧化,这被认为是高脂饮食引发脂肪肝的可能原因,而饥饿或禁食时胰岛素分泌减少,CPT-iv活性增高,转移长链脂肪酸进入线粒体氧化供能增加<sup>[8]</sup>。CPT-iv mRNA表达水平的明显下降可导致转录CPT-iv水平降低,影响脂肪酸转运进入线粒体过程的进行,使已进入细胞的脂肪酸及其活化产物脂酰辅酶A沉积在胞浆内,在线粒体的外膜外难以顺畅地进入线粒体基质中进行 $\beta$ 氧化以实现最终的能量生成,从而加剧细胞内大量脂质堆积<sup>[9]</sup>。

肉碱棕榈酰转移酶iv(CPT-iv)在细胞能量代谢中起重要作用。当饥饿、高脂低糖膳食时,机体不能利用糖,需脂肪供能,这时CPT-iv表达增加,脂肪酸氧化增强,而葡萄糖的氧化率低下,也就是说能量代谢的途径发生了改变。虽然脂肪酸 $\beta$ 氧化和葡萄糖有氧化都可产生能量,但是脂肪酸氧化是以大量耗氧而产生较葡萄糖氧化更多的三磷酸腺苷为特征的。有研究表明<sup>[10]</sup>,腹主动脉缩窄导致心肌肥厚的过程中,随着心肌肥厚的增加,心肌M-CPT-iv mRNA表达呈进行性下降,而且M-CPT-iv表达下调与肥厚心肌游离脂肪酸蓄积相一致。目前能量代谢途径发生改变的研究主要集中在心肌细胞中,对于在血管平滑肌细胞中的研究还未见报道。

平滑肌细胞增殖并向内膜下迁移在As过程中起到非常关键的作用。高脂饮食下,大量脂质在血管壁中沉积,在一系列趋化因子的作用下,中膜的平

滑肌细胞增殖并向内膜下迁移,假设这些增殖迁移的平滑肌细胞是为了摄取沉积在内膜的脂质并将其代谢,当沉积的脂质超出平滑肌细胞的代谢能力时,随着时间的延长As就逐渐形成。平滑肌细胞增殖和吞噬脂质等一系列的活动中都需要能量的消耗,高脂饮食会诱导机体产生胰岛素抵抗<sup>[11]</sup>,平滑肌细胞因为不能利用葡萄糖氧化,只有通过脂肪酸 $\beta$ 氧化供能,此时CPT-iv表达量的下调或活性的下降必将影响平滑肌细胞氧化脂肪酸供应能量,从而影响平滑肌细胞的功能。有实验证实早期的As在停止高脂饮食时是可以逆转的。本实验发现,在第8周时CPT-iv mRNA与对照组相比较差异没有显著性,而在第16周和24周时CPT-iv mRNA明显减少。高脂喂养的兔血管平滑肌细胞层CPT-iv mRNA表达随时间延长而下降,但是该酶的表达及其活性是否也下降还有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 张焰,马虹,郑振声. 血管内皮细胞的剪切应力信号转导机制与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(4): 513-516.
- [2] 李琦,温进坤,郑斌. 血管平滑肌细胞表型调节机制的研究进展[J]. 生理科学进展, 2003, 34(1): 27-31.
- [3] Bennett MJ, Boriack RL, Narayan S, Rutledge SL, Raff ML. Novel mutations in CPT1A define molecular heterogeneity of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency [J]. *Mol Genet Metab*, 2004, 82(1): 59-63.
- [4] Deschauer M, Chrzanowska-Lightowler ZM, Bickmann E, Pourfarzam M, Taylor RW, Turnbull DM, et al. A splice junction mutation in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency [J]. *Mol Genet Metab*, 2003, 79(2): 124-128.
- [5] Isackson PJ, Bennett MJ, Vladutiu GD. Identification of 16 new disease-causing mutations in the CPT2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase II deficiency [J]. *Mol Genet Metab*, 2006, 89(4): 323-331.
- [6] Smolke KH, Kaufmann P, Gasser R. Recurrent rhabdomyolysis and acute respiratory failure due to carnitine palmitoyltransferase deficiency [J]. *Intensive Care Med*, 2001, 27(7): 1235.
- [7] Zhu H, Shi J, de Vries Y, Arvidson DN, Cregg JM, Woldegiorgis G. Functional studies of yeast-expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 347(1): 53-61.
- [8] Zang Y, Wang T, Xie W, Wang-Fischer YL, Getty L, Han J, et al. Regulation of acetyl CoA carboxylase and carnitine palmitoyl transferase-1 in rat adipocytes [J]. *Obes Res*, 2005, 13(9): 1530-539.
- [9] Hammond LE, Gallagher PA, Wang S, Hiller S, Kluckman KD, Posey-Marcos EL, et al. Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-deficient mice have reduced weight and liver triacylglycerol content and altered glycerolipid fatty acid composition [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(23): 8204-214.
- [10] 胡琴,李隆贵,耿昭华,方颖,吴立荣,刘兴德. 过氧化物酶体增殖剂活化受体 $\alpha$ 信号通路对肥厚心肌能量代谢胚胎型再演的调控作用[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(9): 685-689.
- [11] 李春霖,龚燕平,田慧,陆菊明,母义明,李明,等. 高脂饲养大鼠脂肪组织抵抗素、脂联素及其受体的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(6): 701-704.

(此文编辑 许雪梅)