**分类号：R541.4 密级：公开**

**单位代码：10760** **学号：107601130649**



新 疆 医 科 大 学

**X i n J i a n g M e d i c a l U n i v e r s i t y**

**博 士 学 位 论 文**

**T H E S I S O F D O C T O R D E G R E E**

**学 术 性 学 位 （ 学 历 教 育 ）**

**论文题目：靶向干预 NF-κB 及内质网应激对 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化的作用和机制研究**

|  |  |
| --- | --- |
| **研** 究 生 | **陈清杰** |
| **指** 导 教 师 | **杨毅宁** **教授** |
| **学 科 专 业 名 称** | **内科学（心血管病学）** |
| **研** 究 方 向 | **动脉粥样硬化基础研究** |
| **研 究 起 止 时 间** | **2013 年 9 月-2015 年 12 月** |
| **所** 在 学 院 | **第一附属医院** |

**2016 年 3 月**

**靶向干预 NF-κB 及内质网应激对 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化的作用和机制研究**

|  |  |
| --- | --- |
| **研** 究 生 | **陈清杰** |
| **指** 导 教 师 | **杨毅宁** **教授** |
| **学科专业名称** | **内科学（心血管病学）** |
| **研** 究 方 向 | **动脉粥样硬化基础研究** |

**课题来源：**国家自然科学基金项目（靶向干预 NF-κB 信号通路防治动脉粥样硬化的作用及机制研究，81160042）

**2016 年 3 月**

**Targeting inhibition of NF-κB and endoplasmic reticulum stress prevents atherosclerosis of ApoE-/- mice**

**Ａ Dissertation Submitted to Xinjiang Medical University**

**In Partial Fullfillment of the Requirements for the Degree of**

**Doctor of Medicine**

**By Chen Qingjie**

**Internal Medicine (cardiovascular medcine)**

**Dissertation Supervisor**: **Pro. Yang yining**

**March, 2016**

**论文独创性说明**

本人申明所呈交的学位论文是在我个人在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名： 签字日期：

导师签名： 签字日期：

**关于论文使用授权的说明**

本人完全了解学校关于保留、使用学位论文的各项规定，

（选择“**同意/不同意**”）以下事项：

## 1. 学校有权保留本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文；

## 2. 学校有权将本人的学位论文提交至清华大学“中国学术期刊(光盘版)电子杂志社”用于出版和编入CNKI《中国知识资源总库》或其他同类数据库，传播本学位论文的全部或部分内容。

学位论文作者签名： 签字日期：

导师签名： 签字日期：

**中英文缩略词对照表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全名** | **中文译名** |
| **AS** | **Atherosclerosis** | **动脉粥样硬化** |
| **ACS** | **Acute coronary syndrome** | **急性冠脉综合症** |
| **ApoE** | **Apolipoprotein E** | **载脂蛋白 E 基因** |
| **CRP** | **C-reactive protein** | **C 反应蛋白** |
| **CHOP** | **C/EBP-homologous protein** | **C/EBP 同源蛋白** |
| **cDNA** | **Complementary DNA** | **互补 DNA** |
| **DEPC** | **Diethylpyrocarbonate** | **焦碳酸二乙酯** |
| **ECM** | **Extracellular matrix** | **细胞外基质** |
| **eGFP** | **Enhanced green fluorescent protein** | **增强型绿色荧光蛋白** |
| **EDTA** | **Ethylenediaminetetraacetic acid** | **乙二胺四乙酸钠** |
| **ER** | **Endoplasmic reticulum** | **内质网** |
| **GRP78** | **Glucose regulated protein 78** | **糖调节蛋白 78** |
| **HDL-C** | **High density lipoprotein cholesterol** | **高密度脂蛋白胆固醇** |
| **HE** | **Hematoxylin eosin** | **苏木素-伊红** |
| **HUVEC** | **Human umbilical vein endothelial cell** | **人脐静脉内皮细胞** |
| **ICAM-1** | **Intercellular cell adhesion molecule-1** | **细胞间黏附分子-1** |
| **Ldlr** | **Low density lipoprotein receptor** | **低密度脂蛋白受体基因** |
| **IHC** | **Immunohistochemistry** | **免疫组化** |
| **IKK** | **Inhibitor of nuclear factor kappa-B**  **kinase** | **IκB 激酶** |
| **IRE1** | **Inositol-requiring enzyme-1** | **需肌醇酶 1** |
| **IL-1** | **Interleukin-1** | **白细胞介素-1** |
| **IL-6** | **Interleukin-6** | **白细胞介素-6** |
| **IκB** | **Inhibitor kappa B** | **抑制性 kappa B 蛋白** |
| **LDL-C** | **Low-density lipoprotein cholesterol** | **低密度脂蛋白胆固醇** |
| **MAC** | **Macrophage** | **巨噬细胞** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全名** | **中文译名** |
| **MAPK** | **Mitogen-activated protein kinase** | **丝裂原活化蛋白激酶** |
| **MCP-1** | **Monocyte chemotactic protein-1** | **单核细胞趋化蛋白-1** |
| **MMP-2** | **Matrix metalloproteinase-2** | **基质金属蛋白酶-2** |
| **MMPs** | **Matrix metalloproteinases** | **基质金属蛋白酶** |
| **MOI** | **Multiplicities of infection** | **转染复数** |
| **mRNA** | **Messenger RNA** | **信使 RNA** |
| **NF-κB** | **Nuclear factor kappa B** | **核因子 κB** |
| **NIK** | **NF-κB inducing kinase** | **核因子 κB 诱导激酶** |
| **ox-LDL** | **Oxidized low density lipoprotein** | **氧化型低密度脂蛋白** |
| **PBA** | **4-Phenyl butyric acid** | **四苯基丁酸** |
| **PBS** | **Phosphate buffered saline** | **磷酸盐缓冲液** |
| **PCR** | **Polymerase chain reaction** | **聚合酶链反应** |
| **rAAV9** | **Recombinant adeno-associated virus**  **Serotype 9** | **重组 9 型腺相关病毒** |
| **ROS** | **Reactive oxygen species** | **活性氧物质** |
| **RT-qPCR** | **Real-time fluorescence quantitative**  **Polymerase chain reaction** | **实时荧光定量聚合酶链反应** |
| **SR-A** | **Class A scavenger receptor** | **A 类清道夫受体** |
| **TC** | **Total cholesterol** | **总胆固醇** |
| **TG** | **Triglyceride** | **甘油三脂** |
| **TNF-α** | **Tumor necrosis factor-alpha** | **肿瘤坏死因子** |
| **UPR** | **Un-folded protein response** | **未折叠蛋白应答** |
| **VCAM-1** | **Vascular cell adhesion molecule-1** | **血管细胞粘附分子-1** |
| **VSMC** | **Vascular smooth muscle cell** | **血管平滑肌细胞** |
| **WB** | **Western blot** | **免疫印迹法** |

**目 录**

[**摘 要 1**](#_bookmark0)

[**Abstract 4**](#_bookmark1)

[**前 言 8**](#_bookmark2)

[**第一部分 ApoE-/-小鼠动脉硬化模型的建立及重组腺相关病毒对小鼠主动脉粥**](#_bookmark3)

[**样硬化斑块的转染效率测定和安全性评价 14**](#_bookmark3)

[**1 材料与方法 16**](#_bookmark4)

[**1.1 实验材料 16**](#_bookmark5)

[**1.2 实验方法 18**](#_bookmark6)

[**1.3 统计分析 24**](#_bookmark7)

[**2 结果 24**](#_bookmark8)

[**3 讨论 32**](#_bookmark9)

[**4 小结 38**](#_bookmark10)

[**第二部分 重组腺相关病毒介导 IκBα 过表达对 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化的保**](#_bookmark11)

[**护作用研究 39**](#_bookmark11)

[**1 材料与方法 42**](#_bookmark12)

[**1.1 实验材料 42**](#_bookmark13)

[**1.2 实验方法 44**](#_bookmark14)

[**1.3 统计分析 56**](#_bookmark15)

[**2 结果 57**](#_bookmark16)

[**3 讨论 67**](#_bookmark9)

[**4 小结 72**](#_bookmark17)

[**第三部分 尼可地尔对ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化内质网应激及NF-κB 信号通路**](#_bookmark18)

[**的作用及机制研究 73**](#_bookmark18)

[**1 材料与方法 75**](#_bookmark19)

[**1.1 实验材料 75**](#_bookmark20)

[**1.2 实验方法 77**](#_bookmark21)

[**1.3 统计分析 85**](#_bookmark22)

[**2 结果 85**](#_bookmark23)

[**3 讨论 96**](#_bookmark24)

[**4 小结 102**](#_bookmark25)

[**结 论 103**](#_bookmark26)

[**致 谢 104**](#_bookmark27)

[**参考文献 105**](#_bookmark28)

[**综述 127**](#_bookmark29)

[**炎症和脂质代谢之间的相互作用 127**](#_bookmark30)

[**——有效的抗炎药物治疗动脉硬化 127**](#_bookmark31)

[**攻读博士学位期间取得的学术成果 148**](#_bookmark32)

[**个人简历 150**](#_bookmark33)

[**导师评阅表 151**](#_bookmark34)

**靶向干预NF-κB及内质网应激对ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化的作用和机制研究**

**博士研究生：陈清杰 导师：杨毅宁 教授**

摘 要

**目的：**研究干预炎症信号通路NF-κB及内质网应激对动脉粥样硬化的作用：1）通过重组腺相关病毒介导的IκBα过表达抑制NF-κB信号通路的激活，研究对ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化（AS）斑块的作用和对NF-κB下游因子表达的影响；2）通过药物尼可地尔干预动脉粥样中的内质网应激中凋亡相关蛋白和NF-κB信号通路，研究其对动脉粥样硬化小鼠的调控作用。**方法：**1）8周龄ApoE-/-小鼠分别给予高脂饮食和普通饮食8，12，16，20，24周后，检测血脂表达情况，油红O染色观察斑块面积。通过尾静脉注射AAV9-CMV-eGFP，5.0×10 11vg/只/100µl，转染ApoE-/-小鼠。

WB及激光共聚焦方法检测绿色荧光蛋白在粥样斑块内的表达情况。观察腺相关病毒对ApoE-/-小鼠肝功、肾功、心肌酶的影响。通过AAV9转染心肌细胞、肝脏细胞后使用TUNEL方法检测细胞凋亡情况；2）重组腺相关病毒介导的IκBα过表达对ApoE-/-小鼠AS的抑制作用：将8周龄雄性ApoE-/-小鼠分为空白对照组、AAV9-GFP空载病毒组和AAV9-IκBα病毒干预组，每组25只。生理盐水对照组小鼠尾静脉注射生理盐水，剩余两组小鼠分别给予注射AAV9-CMV-GFP空病毒或腺相关病毒IκBα载体（AAV9-CMV-IκBα）。干预后继续高脂喂养5周后，麻醉处死。检测血脂指标；油红O染色法检测动脉血管的脂质斑块面积；HE染色法检测小鼠主动脉血管粥样斑块的面积；天狼猩红染色法检测斑块的胶原含量；免疫组化检测斑块巨噬细胞

（MOMA-2）和平滑肌细胞（SMC），炎症因子比例；实时荧光定量法测定炎症因子的mRNA表达；免疫印迹法及免疫荧光检测主动脉血管NF-κB通路相关蛋白；3）药物尼可地尔抑制内质网应激和NF-κB通路，对ApoE-/-小鼠AS的抑制作用，实验分三组：生理盐水对照组，尼可地尔组，阿托伐他汀组，每组各25 只小鼠。三组

ApoE-/-小鼠喂养16周后，分别给予生理盐水，尼可地尔和阿托伐他汀灌胃治疗，药物灌胃连续治疗8周后，将小鼠麻醉处死。检测血脂指标。油红O染色法检测脂质斑块面积；HE染色法检测斑块的面积；天狼猩红染色法检测斑块的胶原含量；免疫组化法检测斑块内内质网应激标志蛋白GRP78和CHOP，以及巨噬细胞、平滑肌细胞、炎症因子的比例；实时荧光定量法测定小鼠主动脉组织炎症因子的mRNA表达；免疫印迹法检测主动脉血管内质网应激凋亡相关蛋白JNK、P-JNK、Caspase-12等及

1

NF-κB通路相关蛋白的表达。TUNEL方法检测斑块内细胞凋亡情况。**结果：**1）血脂检测结果显示高脂饮食组总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）和低密度脂蛋白（LDL-C）水平显著高于普通饮食组（*P*＜0.05），油红O 染色结果显示高脂饮食组形成斑块病变比普通饮食组更快（*P*＜0.05），ApoE-/-小鼠高脂饮食喂养16周时可形成稳定的动脉粥样模型。AAV9-eGFP病毒转染AS小鼠后，其主动脉血管激光共聚焦和Western

blot结果显示rAAV9-eGFP可有效转染小鼠主动脉粥样斑块并持续表达，病毒转染在第35天达高峰。转染病毒后的ApoE-/-小鼠血清中心肌酶、肝功、肾功较对照组小鼠无显著变化（*P*＞0.05），AAV9-GFP病毒转染心肌细胞和肝细胞，未对两者的凋亡产生影响（*P*＞0.05）。2）与对照组和空载病毒组相比，IκBα干预组小鼠的动脉脂质斑块面积和粥样斑块面积无明显减少（*P*＞0.05）。但IκBα小鼠组较生理盐水对照组和空载病毒组显著改善了粥样斑块的稳定性：生理盐水对照组、AAV9-GFP空载病毒组和AAV9-IκBα三组，天狼猩红染色检测斑块内胶原成分百分比分别为9.50±2.21; 9.31±2.62; 16.43±1.83；AAV9-IκBα较其他两组胶原含量显著增加（*P*＜0.01），巨噬细胞含量的百分比分别为27.91±3.32; 28.5±3.21; 17.84±3.35；平滑肌细胞含量的百分比分别为9.32±2.36; 9.90±2.42; 16.83±2.21；AAV9-IκBα组较对照组和空病毒载体组巨噬胞含量显著减少，而显著增加了斑块内的平滑肌的含量（*P*＜0.01）。三组小鼠斑块易损指数分别为1.24±0.20; 1.25±0.18; 0.54±0.14；AAV9-IκBα组较生理盐水对照组和AAV9-GFP空病毒组易损指数显著降低，改善了斑块的稳定性（*P*＜0.01）。

IκBα干预组无论是蛋白水平还是mRNA基因水平较生理盐水对照组和空载病毒组均可显著下调斑块内炎症因子IL-6(*P*＜0.05)、TNF-α（*P*＜0.05）、趋化因子MCP-1

（*P*＜0.05）及金属基质蛋白酶MMP-2（*P*＜0.05）的表达。IκBα基因过表达可以阻遏NF-κB通路的激活，抑制P-P65蛋白表达（*P*＜0.05）；AAV9-IκBα转染后，斑块内蛋白P65免疫荧光核转位水平较生理盐水对照组和AAV9-GFP空载病毒组明显下调（*P*＜0.05）。3）尼可地尔组和阿托伐他汀组与生理盐水组比较，均可抑制动脉粥样硬化斑块的进展。三组小鼠间体重、血压、血脂无明显差异（*P*＞0.05）。RT-PCR检测三组小鼠的主动脉mRNA，尼可地尔组和阿托伐他汀组较生理盐水组可显著降低内质网应激相关蛋白GRP78和CHOP mRNA的表达（*P*＜0.05）；IHC结果示：

GRP78蛋白在生理盐水对照组小鼠、尼可地尔组小鼠、阿托伐他汀组小鼠斑块内的百分率分别为22.31±3.32; 15.33±3.21; 10.64±2.35 (*P*＜0.01)；CHOP蛋白的百分率分别为12.40±2.57; 8.80±2.16; 4.90±2.20（*P*＜0.01）。油红O大体染色脂质斑块在三组小鼠间大体血管内皮的沉积分别为50.4±4.63、43.4±3.41、37.7±3.12（%），尼可地尔组或阿托伐他汀组与生理盐水组比较均可显著降低脂质斑块沉积（*P*＜0.05）；三组小鼠斑块易损指数分别为1.44±0.20; 0.77±0.14; 0.52±0.15；尼可地尔组或阿托伐他汀组与生理盐水对照组比较可显著降低斑块易损指数（*P*＜0.05）。尼可地尔组或

2

阿托伐他汀组可从蛋白及基因水平降低斑块内的炎症因子的表达（*P*＜0.05）。尼可地尔组和阿托伐他汀组均可抑制内质网应激相关蛋白GRP78、CHOP、P-JNK、Caspase-12的表达，上调凋亡相关蛋白Bcl-2/Bax(*P*＜0.05)；TUNEL检测两组均可抑制斑块内的细胞凋亡（*P*＜0.05）；还可以显著上调IκBα（*P*＜0.05），抑制P-P65蛋白表达（*P*＜0.05），阻遏NF-κB通路的激活。**结论：**1）AAV9-CMV-GFP病毒尾静脉注射转染AS模型ApoE-/-小鼠，可以持续在粥样硬化斑块中表达，转染高峰在

35天左右，血清学检测未发现明显的心脏、肝脏和肾脏毒性，具有一定的安全性，可作为基因治疗动脉粥样硬化的良好载体；2）通过AA9病毒作为载体，使IκBα基因在形成AS的ApoE-/-小鼠过表达后，靶向抑制小鼠主动脉斑块NF-κB信号通路的激活，稳定斑块，下调NF-κB信号通路下游的炎性靶基因的表达，从而抑制动脉粥样硬化的进展；3）动脉粥样内质网应激和NF-κB是过度激活的，尼可地尔通过抑制内质网应激凋亡和上调NF-κB中IκBα表达水平，抑制NF-κB信号通路的激活，抑制斑块炎症反应，减少小鼠动脉粥样硬化斑块形成，稳定斑块，从而达到抑制动脉粥样硬化的作用。

**关键词：**IκBα； 动脉粥样硬化； ApoE-/-小鼠； NF-κB 信号通路； 尼可地尔； 内质网应激

3

**Targeting inhibition of NF-κB and endoplasmic**

**Reticulum stress prevents atherosclerosis of ApoE-/- mice**

**Postgraduate: Chen Qingjie Supervisor: Yang Yining**

**Abstract**

**Objective:** To study the intervention about inflammatory NF-κB signaling pathway and endoplasmic reticulum stress on the role of atherosclerosis. 1) Though recombinant adeno-associated virus-mediated IκBα overexpression inhibited the activation of NF-κB signaling pathway to prevent ApoE-/-mice atherosclerosis (AS) plaque and down regulate the NF-κB downstream cytokine expression; 2) Using the drug nicorandil to prevent the endoplasmic reticulum stress and NF-κB signaling pathway in atherosclerosis and the effects of nicorandil regulation on atherosclerosis mice. **Methods:** 1) The eight-week-old male ApoE-/- mice were given high-fat diet and normal diet 8, 12, 16, 20, 24 weeks, the expression of lipids in aorta was detected by Oil Red O staining. AAV9-CMV-eGFP, 5.0×10 11vg/per mice/100μl, was via the tail vein injection transfected into ApoE-/-mice and the mice were observed at different time points after viral transfection to measure the transfection efficiency and safety. WB and laser confocal detection were used to detect the expression of green fluorescent protein in atherosclerotic plaque. Plasma from mice were collected from the adeno-associated virus-mediated gene therapy of ApoE-/- mice to observe the enzymes of liver, renal, cardiac. Using the TUNEL to detect AAV9 transfected cardiomyocytes and hepatocytes apoptosis; 2) The recombinant adeno-associated virus-mediated IκBα overexpression in inhibiting AS of ApoE-/- mice: The eight-week-old male ApoE-/-mice were divided into Saline control group, AAV9-GFP group and AAV9-IκBαgroup, 25 mice in each group. The three groups of mice were fed with high-fat diet for 12 weeks, the Saline control group mice were injected saline(per mice/100μl) via tail vien, and the remaining two groups were given a tail vein injection for AAV9-CMV-GFP virus (5.0×10 11vg/per mice/100μl) or IκBα adeno-associated virus vector (AAV9-CMV-IκBα，5.0×10 11vg/per mice/100μl). After the intervention, three groups of mice were fed with high-fat continuely for five weeks, then all mice were sacrificed, whole blood and vascular tissues were collected. Full-automatic Biochemical Analyzer was used to analyze the concentrations of total cholesterol (TC), triglyceride

4

**Abstract**

(TG), High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), respectively. Using the Oil Red O staining to detecte the lipids plaque area; HE staining for detecting mouse aortic plaque area; Sirius red staining for detecting the collagen of plaques; IHC were used to detect macrophages (MOMA-2) and smooth muscle cells (SMC), inflammatory cytokines IL-6, TNF-α, chemokine MCP-1 and matrix metalloproteinases MMP-2 inplaques; the measurement of mouse aorta tissue used RT-PCR to detect the IL-6, TNF-α, chemotactic factor MCP-1 and matrix metalloproteinase MMP-2 mRNA expression; and the aortic of NF-κB pathway related proteins expression were detected by Western blot and Immunofluorescence. 3) The drug nicorandil through inhibition of endoplasmic reticulum stress and NF-κB pathway preventing AS progression in ApoE-/-mice, the mice were divided into three groups: Saline control group, Nicorandil group and Atorvastatin group, each group with 25 mice. Three groups of ApoE-/- mice were fed with high fat diet for 16 weeks, then were intragastric injection with saline, nicorandil and atorvastatin respectively, consecutive treated for 8 weeks, then mice were anesthetized and sacrificed, whole blood and vascular tissue were collected. Full-automatic Biochemical Analyzer was used to analyze the concentrations of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), respectively. Using the Oil Red O staining to detecte the lipids plaque area; HE staining for detecting mouse aortic plaque area; Sirius red staining for detecting the collagen of plaques; IHC were used to detect endoplasmic reticulum stress marker GRP78 and CHOP, also the macrophages, smooth muscle cells and inflammatory factors in aortic plaque area; inflammation factor mRNA expression in mouse aorta tissues were measured in RT-PCR method; aortic endoplasmic reticulum stress apoptosis-related protein JNK, P-JNK, Caspase-12 and NF-κB pathway related proteins were detected by Western blot. TUNEL was used to detecte the apoptosis cells in plaques. **Results:** 1) Lipid test results showed high-fat diet group, total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein (LDL-C) levels were significantly

Higher than normal diet group (*P*＜0.05), Oil Red O staining the results showed that

High-fat diet group plaque lesions faster than the normal diet group (*P*＜0.05), ApoE-/- mice can form a stable model of atherosclerosis when fed high-fat diet for 16 weeks. AAV9-eGFP virus were transfected into AS mice, the aortic vasculars were detected by laser scanning confocal microscopy and Western blot. The results showed that rAAV9-eGFP can be transfected effectively and sustaining expression in atherosclerotic plaques for mice, the virus transfection reached the peak after transfected for 35 days.

5

**新疆医科大学博士学位论文**

ApoE-/- mice transfected with virus compared with control group of mice, the serum enzymes, liver function, renal function showed no significant difference (*P*＞0.05), AAV9-GFP virus transfected cardiomyocytes and hepatocytes, did not affect the cells apoptosis respectively (*P*＞0.05). AAV9 virus is an ideal, safe carrier for atherosclerosis gene therapy; 2) IκBα overexpression improved the atherosclerotic plaque stability in ApoE-/- mice. Compared with the saline control group and empty viral group, IκBαintervention group were not decreased the arterial plaque area significantly (*P*＞0.05). But

IκBαintervention group could improve the plaque stability significantly compared with the saline control group and the empty viral group. Saline control group, AAV9-GFP group and AAV9-IκBαgroup were all detected as follow: Sirius red staining for collagen in plaque, the percentage was 9.50±2.21; 9.31±2.62; 16.43±1.83, respectively;

AAV9-IκBαgroup was significantly increased collagen content (*P*＜0.01) than the other

Two groups, the percentage of macrophages were 27.91±3.32; 28.5±3.21; 17.84±3.35, respectively; percentage of smooth muscle cells were 9.32±2.36; 9.90±2.42; 16.83±2.21, respectively; the macrophage cells were significantly reduced and the content of smooth muscle in the plaque were increased significantly in AAV9-IκBα group than in the saline

Control group and empty virus vector group, (*P*＜0.01). The three group of mice plaque

Vulnerability index were 1.24±0.20; 1.25±0.18; 0.54±0.14, respectively; AAV9-IκBαgroup compared to the saline control group and empty virus group AAV9-GFP the vulnerability index decreased significantly and improved the plaque stability (*P*＜0.01).

IκBαintervention group could reduce the plaque IL-6 (*P*＜0.05), TNF-α(*P*＜0.05), the

Chemokine MCP-1 (*P*＜0.05) and matrix metalloproteinase MMP-2 (*P*＜0.05) inflammatory factors significantly in both the protein levels and mRNA levels, compared with the saline control group and viral empty group. IκBαoverexpression could repress

NF-κB pathway activity and inhibite P-P65 protein expression (*P*＜0.05); 3) Nicorandil

Group and atorvastatin group compared with the saline group, could inhibit atherosclerotic plaque progression. Weight, blood pressure, blood lipids showed no significant difference among the three groups of mice (*P*＞0.05). Three groups of mice aorta were detected by

RT-PCR, nicorandil group and atorvastatin group significantly reduced the endoplasmic reticulum stress-related proteins GRP78 and CHOP mRNA expression than in the saline group (*P*＜0.05); IHC results were shown: saline control group, nicorandil group,

Atorvastatin group, the percentage of GRP78 protein in plaque were 22.31±3.32; 15.33±3.21; 10.64±2.35 (*P*＜0.01), respectively; CHOP protein percentages were 12.40±2.57; 8.80±2.16; 4.90±2.20 (*P*＜0.01). Oil Red O staining among the three groups

6

**Abstract**

Of mice were 50.4±4.63, 43.4±3.41, 37.7±3.12 (%), respectively; nicorandil group or atorvastatin group compared with saline group could significantly reduce plaque deposition (*P*＜0.05); the three group of mice plaque vulnerability index was1.44±0.20 ;

0.77±0.14; 0.52±0.15, respectively; nicorandil group or atorvastatin statin group compared with saline group significantly reduced plaque vulnerability index (*P*＜0.05). Nicorandil group and atorvastatin group could reduce the plaque inflammatory factors from the gene and protein level (*P*＜0.05). Nicorandil group and atorvastatin group could inhibit the expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins GRP78, CHOP, P-JNK, Caspase-12, and upregulate the apoptosis related protein Bcl-2/Bax (*P*＜0.05), also significantly raise IκBα(*P*＜0.05), inhibite P-P65 protein expression (*P*＜0.05), repress NF-κB pathway activity. TUNEL staining showed that the nicorandil group and atorvastatin group could reduce the apoptosis cells in plaques significantly(*P*＜0.05).

**Conclusion:** 1) AAV9-CMV-GFP virus through tail vein injection transfected in ApoE-/-mice AS model could be persistent expression in atherosclerotic plaques, the transfection peak nearly at 35th day. Serological tests found no significant heart, liver, and kidney toxicity. AAV9 is an ideal and safe vetor for atheroscleros gene therapy; 2) Atherosclerotic disease process in ApoE-/- mice, NF-κB signaling pathway was over-activated, IκBαgene was carried by AA9 virus transfected in ApoE-/- mice AS model by targeting inhibit the overexpressing activation of NF-κB signaling pathway in mice aortic plaque, and down-regulated NF-κB signaling pathway target inflammatory genes such as IL-6, TNF-α, MCP-1 and MMP-2, thereby inhibited artery atherosclerosis progression; 3) In atherosclerosis process, endoplasmic reticulum stress and NF-κB activation is excessive, nicorandil could inhibite atherosclerosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress related apoptosis proteins and upregulate IκBα expression level inhibiting NF-κB signaling pathway activation. Therefor nicorandil could reduce the inflammation in atherosclerotic plaque and the formation of plaque, remain plaque stable, could be an important role for inbibiting atherosclerosis.

**Key words:** IκBα; Atherosclerosis; ApoE-/- mice; NF-κB signaling pathways; Nicorandil; Endoplasmic reticulum stress

# 7

前 言

动脉粥样硬化（AS）是多种心血管疾病的病理学基础，包括心肌梗死和卒中，其占发达国家死亡率中很大的一部分，同时其占发展中国家的死亡率比例也日益上升。动脉粥样硬化往往发生在容易受影响的大血管或者中血管，特别是冠状动脉，肾下腹主动脉和颈动脉分叉处。动脉粥样硬化的危险因素包括遗传易感性、年龄、压力、生理性的退化、饮食习惯、糖尿病、感染、吸烟、高脂血症以及高血压等。众所周知动脉粥样硬化的发生并不仅仅是简单的血脂紊乱，其发生、发展还和慢性炎症性疾病密切相关。炎症反应发生在动脉粥样硬化的整个过程，是造成动脉粥样硬化的主要原因之一，其主要通过影响脂质代谢和血管壁的生物学活性来造成动脉粥样硬化[1]。先天性（单核细胞向巨噬细胞分化）免疫和后天获得性免疫（T细胞）系统均参与了动脉粥样硬化的病理过程。单核细胞和T细胞从血液循环中向动脉内皮迁移分化成巨噬细胞吞噬修饰后的脂质。承载脂质的巨噬细胞则向泡沫细胞转化，从而导致了动脉粥样斑块的形成、斑块破裂、血栓和最终的血管闭塞的发生[2]。数十年来，许多发展中国家如中国，人群的饮食结构发生很大变化逐渐趋向于高热量和高脂肪饮食，高脂血症和代谢综合征发病率异常增加，使得动脉粥样硬化及其相关疾病增长迅猛[3]，不仅严重威胁了人们的生命健康，而且增加了沉重的社会经济负担，因此关注动脉粥样硬化和防治动脉粥样硬化具有深远的意义。

动脉粥样硬化形成的病理过程主要包括脂质代谢紊乱，适应不良的免疫反应导致的血管壁慢性炎症反应。脂质聚集、免疫反应、通过白细胞转运的脂质清除、体内的趋化因子以及他们的受体被打破平衡从而导致动脉粥样硬化[4]。关于动脉粥样硬化形成的学说，有脂质侵入学说，内皮损伤学说，感染学说，氧化应激学说以及炎症反应学说。动脉粥样硬化的研究非常之多，但是关于动脉粥样硬化明确的发生机制还尚未完全揭示。现已有许多新的关于脂质代谢和生物学炎症反应有关的通路被研究发现，与此同时遗传谱的研究已经揭示了许多涉及人类冠心病的遗传学变化。随着对炎症过程和其调节因子的了解，进而揭示一个有趣的多样性的靶向机制可以进一步补充降脂治疗的不足。我们的目的是进一步探索炎症反应中NF-κB信号通路和内质网应激对动脉粥样硬化的作用。

### **1** 炎症和动脉粥样硬化

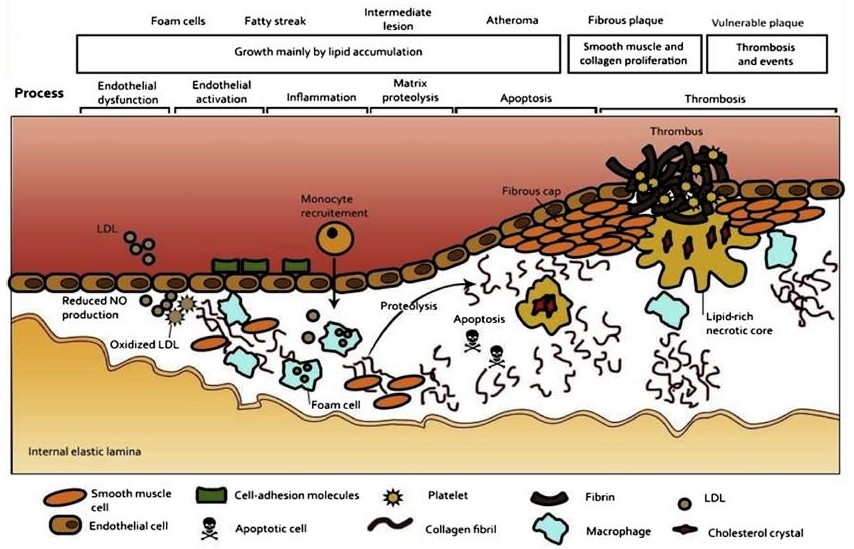
炎症在动脉粥样硬化斑块的形成、斑块破裂以及急性冠脉综合征的临床表现中起着非常重要的角色[5]。动脉粥样硬化斑块血栓形成的机制和单纯的炎症性疾病并无很大区别，但是动脉粥样硬化血栓的特点是慢性的、低级别的炎症反应，先天性免疫和获得性免疫参与了其中。

8

先天性免疫是防御外界病原体的第一道防线，在动脉粥样硬化血栓形成中参与了许多促炎反应机制：（a）大多数的泡沫细胞来源于单核巨噬细胞[6]；（b）在冠状动脉病变的巨噬细胞亚群表达特定CD14+CD16+且与高密度脂蛋白的浓度成负相关，而与导致动脉粥样硬化脂质水平正相关[7]；（c）巨噬细胞和单核细胞活化后通过释放细胞因子参与动脉粥样硬化促炎和抗炎过程；（d）冠状动脉干预治疗时的单核细胞与血液循环中的单核细胞相比表达了特殊的（TLR）-4受体，同时合成局部特殊形式趋化因子和细胞因子[8, 9]。通常TLR-4受体仅可被病原体刺激激活，其通过动脉粥样斑块中的内源性因子刺激浆细胞树突状细胞反应分泌产生的干扰素-α诱导激活[10]。此外，粥样斑块破裂的ACS患者整个冠状动脉树中聚集了大量活化的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞以及肥大细胞[11, 12]。这种现象和高水平的类胰蛋白酶有关，同时与冠心病病人的罪犯血管斑块及外周循环血中的中性粒细胞端粒末端转移酶高度活化相关[13, 14]。

最近业已证实血栓中聚集的血小板分别过度表达可识别细菌组分的TLR2和TLR4受体，上述受体还可诱导循环水平中的血小板向胶原纤维聚集和黏附[8, 9, 15]。因此，TLR-2和TLR-4的表达和活化表明血小板可表现为免疫系统细胞，活化参与动脉粥样硬化参与血栓形成。

非常重要的是，在ACS患者的粥样斑块中发现了一种活化的单克隆抗原，而在稳定性心绞痛的患者中并未发现该抗原，这表明在动脉粥样斑块形成血栓的病理基础中存在着一种特殊的抗原驱动免疫反应[16, 17]。事实上，对抗体、抗原，如肺炎衣原体，健康休克蛋白或者是氧化性低密度脂蛋白已在ACS患者动脉粥样硬化斑块中发现[18]。因此，对动脉粥样硬化中的炎症通路及因子进行探究和干预，有着非常重要的意义。



**图1** **动脉粥样硬化发生的病理过程**

**Figure** **1** The pathological process of **atherosclerosis**

9

### **2** **NF-κB**信号通路和动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是动脉血管壁疾病，现在已认识到其通过炎症过程来驱动[19]。动脉粥样硬化开始于多余的未代谢脂蛋白聚集在血液中。氧化的脂蛋白触发血管内皮分泌趋化因子MIP-1α和MCP-1，招募白细胞向炎症部位聚集[20]。还有粘附分子ICAM-1和VCAM-1在血管的表面促进单核细胞的吸附和阻碍血液循环中单核细胞的滚动迁移。单核细胞一旦与血管内皮接触，随即分化成巨噬细胞，摄取沉积的脂蛋白成为泡沫细胞，形成局部的炎症反应。巨噬泡沫细胞分泌IL-6，TNF-α等细胞因子，招募更多的免疫细胞，导致粥样硬化斑块的形成。这些含脂质分子和免疫细胞的病变，使得动脉壁狭窄促进心血管疾病和血栓的形成。

NF-κB的激活存在于动脉粥样硬化斑块形成的多个过程中。NF-κB调控的基因表达诱导动脉粥样硬化的发生和发展，其中包括细胞因子TNF-α，IL-1β，IL-6，趋化因子MCP-1和粘附分子ICAM-1. NF-κB在动脉粥样硬化病变中巨噬细胞的检测表明，NF-κB的活化与动脉粥样硬化有关[21]。总之，众多遗传研究揭示NF-κB在动脉粥样硬化的病理过程中扮演一个复杂的角色，因为动脉粥样硬化过程非常复杂其中存在着不同的机制和细胞，调节着其发生、发展以及消退。

因为发现内皮细胞和募集的骨髓细胞这两种细胞的炎症反应有助于动脉粥样斑块的形成，所以许多研究开始去明确不同细胞类型在粥样斑块的中的作用。在载脂蛋白E（ApoE基因）一种清除脂质的载脂蛋白缺陷小鼠中显示，循环中极低密度脂蛋白（VLDL）胆固醇水平极度地升高，因为高脂血症促进动脉粥样硬化斑块的形成，这些小鼠通常被用作动脉粥样硬化的模型[22, 23]。低密度脂蛋白受体（LDLR）缺陷的小鼠也易患动脉粥样硬化，也为类似的原因[24]。

高脂血症小鼠被用于动脉粥样硬化中需要IKK介导的NF-κB活化的血管内皮细胞研究[25]。通过Tie2-CRE使得ApoE-/-基因小鼠的血管内皮细胞NEMO缺失防止高脂饮食引起的动脉粥样硬化。内皮细胞NEMO缺失阻止了粘附分子ICAM-1和VCAM-1的表达。NEMO缺陷型内皮细胞，细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6和趋化因子MIP-1α和MCP-1的表达减少，同时也减少了动脉粥样硬化斑块中的巨噬细胞和T淋巴细胞的浸润。总之，在内皮细胞NEMO缺陷型动物，因粘附分子和促炎介质的减少使得动脉粥样硬化斑块病变的尺寸和严重程度均减少。这些发现支持了NF-κB信号通路在血管内皮细胞动脉粥样硬化起始传导中起重要的作用，因为当这些细胞中NF-κB炎症信号通路被抑制，不论巨噬细胞的募集还是斑块的形成均被大大降低。

如上所述，巨噬细胞在营养过剩和胰岛素抵抗联通代谢组织中的炎症反应中发挥重要作用。I型干扰素信号通路促进粥样硬化斑块内巨噬细胞的招募和聚集，是LDLR-/-小鼠发生动脉粥样硬化所必需的[26]。然而，通过巨噬细胞由NF-κB介导的炎症反应在动脉粥样硬化中的作用尚不明确。有关骨髓移植的研究发现，在造血干细

10

胞中NF-κB亚基P50缺失的LDLR-/-小鼠动脉粥样硬化斑块数量减少，斑块尺寸减小

[27]. 出人意料的是，造血干细胞P50基因敲除小鼠表现出一个高度炎症的表型，可完整性地表达炎性细胞因子。在这些小鼠的病变部位近乎完全没有泡沫细胞，支持以前的研究结果NF-κB靶向调解巨噬细胞清道夫受体和泡沫细胞的生成来摄取脂质

[28]. 然而P50和其他的NF-κB家族成员如何协调以支持促炎巨噬细胞在动脉粥样硬化的作用仍有待研究发掘。已有研究观点提出脂质消耗中巨噬细胞通过代谢性应激驱动细胞死亡和斑块的形成。事实上，从药理学上抑制内质网应激，减轻了高脂饮食诱导的动脉粥样硬化，提示在动脉粥样硬化的发展存在代谢性应激[29]。我们的研究正是契合于此，使用药物尼可地尔从炎症和代谢性应激的角度干预动脉粥样硬化进行研究。

除了控制炎性细胞的活化，NF-κB在细胞的存活中也起着起重要作用。在巨噬细胞的泡沫细胞，其坏死性死亡造成粥样硬化斑块的核心，NF-κB的促炎和促存活功能存在着交互作用。使用的ApoE-/-或LDLR-/-小鼠模型中，一些研究表明，从骨髓将IKKβ敲除后，并不能减轻高脂肪饮食喂养的小鼠动脉粥样硬化形成，相反，在LDLR-/-小鼠反而加重了动脉粥样硬化[30]。IKKβ的不完全缺失，和仅减少了50%的NF-κB蛋白质和其活性也许是造成上述研究结果的原因。研究中完全消除了IL-10的表达，而相比之下，IL-6的表达仅略有减少，表明NF-κB的靶基因存在不同的阈值可能需依赖描述的敲除表型。

此外，在骨髓细胞IKKβ基因敲除小鼠消除了NF-κB的促存活功能也可能促进动脉粥样硬化的发展。动脉粥样硬化比较严重时，泡沫细胞无法清除累积的脂质时坏死成为粥样斑块中的坏死脂核。如果在脂质充盈的泡沫细胞缺少IKKβ和NF-κB的促生存功能，则可能会增加和上调泡沫细胞的死亡例如增加动脉粥样硬化斑块中的坏死区域。IKKβ对于泡沫细胞的促存活功能的相对阈值是未知的。因此，虽然在内皮细胞和巨噬细胞的泡沫细胞的NF-κB活化诱导产生促动脉粥样硬化细胞因子，但其促存活功能和其消退炎症的功能似乎限制了动脉粥样硬化小鼠模型中斑块大小和病理性炎症。未来的研究将定义NF-κB家族各成员的靶基因和功能研究，以及其中调节坏死脂核形成和慢性炎症的破坏性后果的细胞类型。

再进一步的证据表明，NF-κB在调节动脉粥样硬化中起着重要的作用，NF-κB的负向调节物A20（*tnfaip3*），观察动脉粥样硬化的灵敏度较高。事实上，ApoE-/-小鼠的基因A20突变（*tnfaip3*+/-）表现出动脉粥样硬化病变大小增加。与WT相比A20上调表达的小鼠动脉粥样硬化病变减少，表明A20弱化NF-κB后在小鼠中有抗动脉粥样硬化作用[31]。A20 基因突变后增加了NF-κB 一些促炎靶基因的表达包括

VCAM1、ICAM1、MCF-1，同时也增加了炎性细胞因子的表达从而促进动脉粥样硬化的发生发展[31]。目前还不清楚A20基因是否在内皮细胞，泡沫细胞，未分化的单

11

核细胞调节信号通路，或者对上述细胞是否在动脉粥样硬化中负责减轻炎症反应的功能。然而，这些发现证明，IKK可促进NF-κB信号通路促动脉粥样硬化作用，为调节NF-κB信号通路的表达治疗动脉粥样硬化和心血管疾病提供了可能性。目前这些报道总结了关于NF-κB在脂质代谢和动脉粥样硬化中的作用，为我们发展以NF-κB为主要干预靶点干预动脉粥样硬化奠定良好的基础[1]。

### **3** 内质网应激和动脉粥样硬化

动脉粥样硬化涉及动脉血管细胞、脂蛋白以及炎症细胞之间复杂的相互作用。动脉粥样硬化起始的关键环节是内皮下存留的载脂蛋白B富含脂蛋白，随后是炎性单核细胞的招募和它们分化成巨噬细胞[32]。巨噬细胞摄取脂蛋白成为脂质负荷的“泡沫细胞”，与其他免疫细胞和内膜平滑肌细胞一起，逐步加剧炎症状态。已经死亡的和垂死的巨噬细胞，再加上死亡的细胞清除能力不足，导致了向所谓的坏死脂质核心发展，这是一个复杂的过程和动脉粥样斑块的破裂密切相关，从而与急性心肌梗死和猝死相关[33]。坏死的脂核与斑块的不稳定性有关，可能是因为它们是金属基质蛋白酶、炎症介质和促血栓形成分子的聚集存储地。因此，巨噬细胞的凋亡可能是促进坏死脂核的形成促使病变从良性转变到不稳定病变表型的关键因素。在进展期的动脉粥样硬化中巨噬细胞凋亡的一个重要原因是慢性内质网应激途径促进细胞死亡[34]。内质网应激在粥样硬化病变其他细胞的作用知之甚少，但目前的证据支持内质网应激有调控平滑肌细胞和内皮细胞细胞存活的作用[35, 36]。

体内、体外和分子遗传最近的客观数据证明动脉粥样硬化的进展，特别是坏死性病变的形成和巨噬细胞ER应激之间有很强的因果关系。例如，有研究表明，ApoE-/-联合CHOP缺陷的动脉粥样硬化小鼠，进展性巨噬细胞死亡和斑块坏死性脂核形成明显减少[37, 38]。此外，Myoishi等已经证明在人类的冠状动脉病变CHOP的表达和细胞凋亡、易损性斑块之间的密切关系[39]，与Erbay等的报道内质网应激在动脉粥样硬化中的作用相一致。Erbay等人报道了通过脂肪酸结合蛋白4（AP2）降低了ER应激指标和小鼠粥样斑块大小，这对研究脂质诱导的ER应激和巨噬细胞的凋亡很有必要[29]。

内皮细胞开始接触氧化磷脂时表达促动脉粥样硬化的单核细胞粘附分子如VCAM-1，诱导启动内质网应激反应[40]。在人类动脉粥样硬化病变，内皮细胞中内质网应激的标记物如氧化磷脂等表达明显增加[41]。此外，已有报道提出在进展性斑块中，血管平滑肌细胞（SMC）的死亡损害了斑块完整性，减弱纤维帽的保护[42]。体外实验表明ER应激的诱导剂如高胆固醇负荷、高同型半胱氨酸血症、高糖和高葡糖胺均上调平滑肌ER应激标记物如CHOP，可促进这些细胞的死亡[35, 43]。另外，7-酮胆固醇，即在具有高心血管风险和冠脉患有严重病变的人群血浆中升高的一种氧

12

固醇，已经证实其可激活体外培养的人平滑肌细胞的UPR和凋亡[39, 44]。然而，与巨噬细胞不同的是，动脉粥样硬化中的UPR对平滑肌细胞作用的分子遗传学证据仍然缺乏。另外还有一些引人注目正在进行的研究提示UPR的一个或多个分支是动脉粥样硬化发病的重要机制。我们的研究基于上述报道，进一步探讨内质网应激在动脉粥样硬化中的作用和可能机制，为干预代谢性应激在动脉粥样硬化的作用提供理论依据。

### **4** 研究假说

根据上述研究结果，需要解决的科学问题有以下几点：（1）炎症假说是动脉粥样硬化发生、发展的重要学说之一，贯穿动脉粥样硬化的整个过程，但目前其确切的机制仍不明确。（2）重组腺相关病毒对心血管循环系统中的心脏、肝脏等研究较多，但对脉管系统尤其是动脉粥样硬化的血管内皮及斑块转染稳定性及安全性评价，系统地报道尚不多见。（3）外源性系统地干预NF-κB信号通路，从而抑制动脉粥样硬化斑块中NF-κB的活性，靶向干预动脉粥样硬化。（4）动脉粥样硬化是一种代谢性炎症疾病，炎症反应和内质网应激是动脉粥样硬化发生、发展、斑块破裂的核心环节，将其系统地结合，用药物干预内质网应激和NF-κB信号通路，从而有效地干预动脉粥样硬化，从代谢性炎症的角度系统地研究动脉粥样硬化的报道尚不多见。

本研究拟构建ApoE-/-小鼠的AS 模型。给予外源性的IκBα 重组腺相关病毒

（rAAV9-IκBα）干预，探讨通过外援性过表达IκBα对NF-κB活性的抑制对防治AS和稳定粥样斑块的作用，以及IκBα对发生AS时NF-κB的P65抑制以及对其信号通路下游的趋化因子及细胞因子表达的影响；用一种[ATP](http://baike.baidu.com/subview/37286/6285960.htm)敏感性钾通道开放剂类硝酸脂类药物尼可地尔干预高脂喂养的ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化，从代谢性炎症的角度干预内质网应激和NF-κB信号通路，研究尼可地尔对内质网应激的关键蛋白GRP78、

CHOP、NF-κB的P65蛋白及其下游的趋化因子、炎症因子和凋亡相关蛋白的影响，探讨尼可地尔通过抑制内质网应激和下调NF-κB的活性及其下游的炎症因子抑制动脉粥样硬化的形成和稳定斑块。

# 13

# 第一部分 **ApoE-/-**小鼠动脉硬化模型的建立及重组腺相关病毒对小鼠主动脉粥样硬化斑块的转染效率测定和安全性评价

动脉粥样硬化是一种多因素造成的过程，其中遗传因素和环境因素起着显著的作用[45]。人类动脉粥样硬化过程涵盖一段漫长的时间段。因为它的形成过程受很多因素影响，这是其难以研究的原因[46]。因此，动脉粥样硬化动物模型被开发，在很短的一段时间内模仿与人类相似的病理过程。小鼠模型是研究心血管疾病的一个很好模型。利用这种啮齿动物模型模拟人类代谢与病理生理过程的优点是：它的大小允许进行生理和代谢研究，且小鼠发生的终末期疾病可与人类类比[47]。1992年，一个有用的动物模型被用于动脉粥样硬化实验研究，载脂蛋白E（APOE）基因敲除（KO）小鼠或ApoE-/-[48]。在这种模式下，在胚胎干细胞通过基因靶向破坏其载脂蛋白E蛋白编码基因使得载脂蛋白E基因失活[22, 23, 49]。载脂蛋白E基因作为一个配体介导乳糜微粒的吸收，存在于极低密度脂蛋白（VLDL）及其残存肝受体（低密度脂蛋白

（LDL）受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白）。这些基因敲除动物缺乏载脂蛋白E蛋白受体，它们的血浆清除脂蛋白的能力受损。因此，载脂蛋白E基因敲除小鼠可以发生严重的高胆固醇血症和自发地形成动脉粥样硬化[49-52]，可通过在体的同步微血管造影行动脉粥样硬化检测[53]。不同于杂合子（ApoE+/-）和对照组小鼠，即使正常饮食也可引起载脂蛋白E基因敲除小鼠自发地形成粥样硬化斑块[23]。ApoE-/-小鼠出生后最早3个月即可观察到动脉脂肪条纹[54]，8月龄时冠状动脉几乎被闭塞[55]。基于载脂蛋白E基因缺陷小鼠以上这些动脉粥样硬化病变的特点已经被研究得很透彻，他们病变类似于人类的好发的部位和病变可进展到纤维增殖阶段[47, 56]。我们选取其作为研究动脉粥样的动物模型。给予ApoE-/-小鼠普通饮食和高脂饮食，在不同的时间点观察其血脂及动脉粥样硬化情况。

心血管疾病被认为是西方国家全因死亡率的头号原因，其中75%的心血管疾病可以归因于动脉粥样硬化[57]。动脉粥样硬化是引起心肌梗死、卒中、缺血性坏死等疾病的主要原因。不稳定斑块破裂形成血栓阻塞冠状动脉导致心肌梗死，虽然现在有许多治疗心肌梗死的方法，如冠状动脉介入治疗，药物治疗，但上述治疗仍有病患痛苦大、危及生命的副作用、社会经济负担重、患者依从性差等局限性，并未从根本上解决问题。因此，寻找一种减缓动脉粥样硬化形成和稳定粥样斑块的治疗措施具有非常重要的现实意义。目前还没有一种药物可以有效地稳定易损斑块，那么

14

非常有必要去寻找一种新的治疗方法和工具来研究和治疗动脉粥样硬化和易损斑块。基因治疗是一种很有前途的新策略来应对临床这种严峻的问题[58]。

根据治疗的目标，动脉粥样硬化的基因治疗方法大致分为2类。预防性治疗旨在降低胆固醇的水平主要是针对肝脏。第二个治疗的目标，即病变本身，是更具挑战性的。我们拟采取的研究策略为第二种，从基因干预的手段稳定易损动脉粥样硬化斑块。基因干预旨在防止不稳定粥样硬化斑块破裂，如果在斑块内特异性表达靶向基因的载体，静脉内注射是最有效的途径。这种方法需要确定适当的治疗剂量，以提供足够剂量的靶目标局部治疗。以前的研究已经清楚地表明，腺相关病毒 2

（AAV2）载体，肽暴露在病毒衣壳表面上，从而受体能够有效在斑块结合；因此，这是一种潜在有效的治疗载体[58, 59]。因为动脉粥样硬化是一种慢性疾病，对长期的基因表达存在潜在需求。但是，目前仍没有研究报道不同时间点特异性转病毒载体在粥样硬化斑块，以确定载体的最佳转染时间和安全性。

AAV2载体在各种基因治疗中使用，因为它显示出许多人们希望的性能，如可在在体实验中表达相当长的一段时间。然而AAV2病毒载体的全身系统性的干预后，在血管细胞的转染效率是低的[60, 61]，大量的病毒在肝和脾中发现[62, 63]。当AAV2和一些后来的血清型AAV1, AAV6, AAV8和AAV9比较[64, 65]，研究人员发现，上述的这些血清型载体通过血管内注射后，可更有效地通过内皮屏障，更有效地进行靶器官的基因表达[66-70]。在这些新的AAV病毒载体血清型中，AAV9血清型病毒是一种更具有吸引力的载体，基于其在肌肉，心脏和肺的转导的优越性能[68, 69, 71]。因为它的广泛组织嗜性，特别是在肝脏中，当AAV9载体通过血管内途径转染，肝脏是其一个大的存储器官。组织特异性启动子已经被用于减少意外基因的干预，但它们的效率远远比非特异性启动子如巨细胞病毒（CMV）启动子低[72]。许多研究都集中在确定心脏或肝脏基因治疗有效的AAV病毒载体血清，但一直未有研究报道由CMV为启动子的AAV9病毒载体在ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化斑块转染不同时间点的观察。

生产重组AAV9（rAAV9）最常用的方法是通过在HEK293细胞中辅助包装质粒，但传统的生产过程难以产生足够数量的用于大规模临床前期试验和临床试验的载体，从而阻碍了基因疗法的进展[73]。重组杆状病毒（rBac）的系统可以产生大量的

AAV载体，从而使临床基因治疗成为可能[73-75]。然而，关于rAAV9载体使用rBac系统生产的生物学信息目前是不够的。我们的研究目的是评估使用rBac系统生产的以CMV为启动子的rAAV9是否可以有效地通过全身系统性地转导到ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化斑块，并确定其转染效率、生物安全性以及转导基因的表达时间。

绿色荧光蛋白（Green Fluorescent Protein, GFP）是从美国西北海岸中的一种常见水母中分离得到的。GFP能够有效地发射荧光，成为公认的完整细胞和生物体中的基因表达和蛋白的标志物。增强型绿色荧光蛋白（enhanced Green Fluorescent

15

Protein，eGFP）是GFP突变系，eGFP发射的荧光强度比GFP大6倍以上，更适合用于研究基因表达变化、细胞增殖和分化、蛋白质在机体内翻译表达。腺病毒转染细胞，24到48小时后就能观察到eGFP的蛋白表达，通过鉴定eGFP在体内特定组织的表达，间接了解目的基因蛋白在特定组织的表达情况[76]。

本部分研究选择ApoE-/-小鼠，给予其普食和高脂饮食进行动脉粥样硬化造模。观察在不同的时间点小鼠血脂及动脉粥样硬化情况。在成功造成ApoE-/-小鼠的AS模型后通过尾静脉注射的方式转染重组腺相关病毒AAV9，使eGFP目的基因在体内表达，在0、14、21、28、35、60、90及120天通过WB及激光共聚焦方法检测绿色荧光蛋白在粥样斑块内的表达情况确定病毒的转染效率及最佳表达时间。通过生化方法检测血液指标了解病毒的生物学安全性，观察腺相关病毒介导的基因治疗对ApoE-/-小鼠肝功、肾功、心肌酶的影响。同时还通过AAV9转染培养的心肌细胞、肝脏细胞后使用TUNEL方法观察心肌细胞和肝脏细胞的凋亡情况进一步评价AAV9对重要生命器官的生物学毒性。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 实验材料

#### **1.1.1** 实验动物的选择

ApoE-/-小鼠因其形成的斑块分布与人类动脉粥样硬化高发处相似，是目前研究动脉粥样硬化较为可靠的动物模型。普通饮食下20周龄即可形成动脉粥样硬化斑块，高脂饮食下16周龄即可形成明显的动脉粥样硬化斑块。本实验选择SPF级ApoE-/-小鼠，8周龄，雄性，体重18-22g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司（许可证号：SCXK（京）2012-0001），所有实验过程均按照新疆医科大学伦理委员会的要求进行操作。动物饲养环境温度为22-25℃，相对湿度为60%，光-暗周期12h，所有小鼠自由饮水和摄食。高脂饲料（含0.25%胆固醇，21%脂肪）购自北京科澳协力饲料有限公司（许可证号：SCXK（京）2014-0010）。

#### **1.1.2** 重组腺相关病毒载体的选择

重组AAV9病毒载体：

滴度为2.45×10 13vg(virus genomes) /ml的rAAV9-CMV-eGFP病毒载体，由本实验室设计构建，美国Virovek公司生产；

#### **1.1.3** 主要仪器设备和试剂配置方法

##### **1.1.3.1** 仪器设备

冰冻切片机（德国Leica公司）

激光共聚焦显微镜（德国Leica公司）

16

光学显微镜（德国Leica公司）

全自动生化分析仪（日本日立公司）Quantity One分析软件（日本Bio-Rad公司）酶标仪（美国Thermo Scientific公司）

动物手术显微镜（中国蔡司光学仪器国际贸易有限公司）移液器（德国Eppendorf公司）

移液枪（美国Thermo Scientific公司）

电热恒温鼓风干燥箱（中国上海一恒科技有限公司）电泳仪（中国北京六一仪器厂）

脱色摇床（中国北京六一仪器厂）

雪花制冰机（中国北京长流科学仪器公司）电子天平（德国Sartorius公司）

超声波细胞粉粹机（中国宁波新芝生物科技有限公司）酸度计（中国上海盛磁仪器有限公司）

液氮生物容器（中国成都金凤液氮容器有限公司）

4℃冰柜（中国青岛海尔公司）

-20℃冰柜（中国青岛海尔公司）

-40℃低温冰箱（日本REVCO公司）

-80℃低温冰箱（日本REVCO公司）

##### **1.1.3.2** 实验试剂

高脂饲料（中国北京科澳协力饲料有限公司）

rAAV9-eGFP（美国Virovek公司）

油红O染色液（美国AMRESCO公司）苏木素染色液（中国北京中杉金桥公司）伊红染料（醇溶性）（中国北京博士德）滂胺天空蓝（美国Sigma公司）

蛋白定量试剂盒（中国北京百泰克公司）

RIPA裂解液（中国北京百泰克公司）电泳胶板（美国Invitrogen公司）

抗体：GFP，GAPDH（美国Cell Signaling Technology公司）

TUNEL试剂盒（瑞士ROCHE公司）

胎牛血清、胰蛋白酶、胶原酶（美国Giboco公司）

DMEM培养基（美国Hyclone公司）

BrdU（美国Giboco公司）

17

青链霉素双抗溶液（美国Giboco公司）

##### **1.1.3.3** 试剂配置

（1）Westeren Blot电泳液：用电子天平依次称取MOPS 10.46g, Tris-Base 6.06g, SDS 1.0g, Tris-Base 0.37g，将上述称量好的试剂溶解入800ml蒸馏水中，利用磁力搅拌器搅拌均匀，最后加入蒸馏水定容至1, 000ml。

（2）Westeren Blot转膜液：依次称取甘氨酸2.9g, Tris-Base 5.8g, SDS 0.37g，甲醇200mL，放入800mL蒸馏水中，用磁力搅拌器搅拌均匀，置于4℃冰箱保存备用。

（3）0.05%TBST洗膜液：依次称取Tris-Base 3g, NaCl 8g, KCl 0.2g，将上述称量好的试剂溶解入800ml蒸馏水中，用磁力搅拌器搅拌均匀后调整pH值至7.5，加入蒸馏水定容至1, 000ml，滴加0.5mL Tween-20充分混匀。

（4）磷酸盐缓冲液（PBS）：依次称取NaCl 8g, KCl 0.2g, Na2HPO4 1.44g, KH2PO4 0.24g，放入800mL蒸馏水中，利用磁力搅拌器混匀，使其充分溶解，调节

pH值至7.4，然后再加入蒸馏水定容至1, 000mL。

（5）5%封闭牛奶：称取脱脂奶粉2.5g，放进50mL 0.05%TBST中，利用磁力搅拌器混匀，使其充分混匀后置于4℃冰箱保存。

（6）抗体孵育液：每100ml 0.1%TBST中加入5g BSA，混匀后过滤，4℃保存。

（7）4%多聚甲醛固定液的配制：8g多聚甲醛加入0.1mol/LPBS溶液中，加热至60℃搅拌至溶解，或者加入一定的碱液加速溶解，容溶解完全后，待液体恢复为室温后，调节PH值于6.8，定容至200ml，常温保存即可。

（8）30%蔗糖脱水试剂的配制：蔗糖60g加入无菌0.01mol/L PBS中溶解，定容至200ml，4℃保存。

（9）0.1%TitonX-100通透液的配制：先配制含有0.1%枸橼酸钠的PBS，再以

V/V百分比为配制0.1%的比例加入TitonX-100即可。

（10）油红O染色液：

①油红O染色液原液配制（浓度为0.5%）：称取0.5g油红O粉剂，放进100mL异丙醇中，60℃水浴加热30min，利用磁力搅拌器混匀，使其充分混匀后置于4℃冰箱保存备用。

②油红O染色液工作液配制：组织染色前2h新鲜配制，取油红O原液6mL，加入4mL蒸馏水进行稀释，用滤纸进行过滤待用。

（11）伊红染色液：首先用少许蒸馏水将1g伊红调成浆糊状，然后缓慢加入75%酒精100ml，边加酒精边搅拌，至糊状物彻底溶解于酒精中。此时用吸管吸取少许冰醋酸，加入到伊红酒精混合液中，试剂逐渐转变为鲜红色。

### **1.2** 实验方法

18

#### **1.2.1** 实验动物分组

（1）动脉粥样硬化小鼠实验分为两组，所有小鼠在SPF级环境中适应性喂养1周后，随机将其分为高脂饮食组50只和普通饮食组50只，高脂饮食组给予高脂饲料喂养，普通饮食组给予普通饲料喂养，具体分组见下图：



**图 1-1** **实验分组示意图**

**Figure** **1-1** Experimental **groups**

（2）病毒转导小鼠实验分为两个大组即C57小鼠组和ApoE-/-小鼠组，在普食或者高脂饮食16周后，两组小鼠各随机选取35只通过尾静脉注射rAAV9-eGFP，另

5只为空白对照组注射生理盐水，于14、21、28、35、60、90和120天留取主动脉组织进行激光共聚焦检测和蛋白电泳检测。具体分组如下：



#### **1.2.2** 麻醉

**图 1-2** **实验分组示意图**

**Figure** **1-2** Experimental **groups**

麻醉药品选用氯胺酮（Ketamine, 8mg/100g）、甲苯噻嗪（Xylazine, 2mg/100g）

19

和阿托品（Atropine, 0.06mg/100g）的混合液进行术前麻醉。根据文献报道[77]该麻醉药品配制的混合液起效迅速，小鼠苏醒较快，在安全剂量的麻醉时间内，麻醉深度较好，安全系数较高。腹腔注射方法为：左手提起小鼠颈部皮肤并用手指固定住尾部，使小鼠的腹部朝上，小鼠头略低于尾部，右手持已吸好麻醉药的注射器将针头在下腹部靠近腹白线的两侧刺入皮肤后进针3mm左右，随后使针头与皮肤呈45°角刺入腹肌，当抵抗感消失后表明已穿过腹肌进入腹膜腔，固定针头，回抽针栓如无血液、肠液和尿液后即可注射麻醉药，注射剂量为0.1ml/10g体重。给药几分钟后小鼠倒下，表现为全身无力，反应消失，表明麻醉药已起效果。

#### **1.2.3** 血液标本的采集及血脂检测

麻醉生效后，此时用剪刀将小鼠胸腔的皮肤剪开，用提前准备好的已肝素化的

1mL注射器，针头垂直刺入心脏部位，回抽针栓抽出血液放入EP管中，血液常温静置30min后，4℃，3, 000r/min，离心10min，离心后吸取上层血清于EP管内，-80℃冰箱保存待测小鼠血浆。实验采用全自动生化分析仪对血清中总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）的水平进行检测；同时检测心肌酶（LDH、CK）、肝功能（AST、ALT）、肾功能（尿素氮BUN、肌酐Cr）等指标。

#### **1.2.4** 油红**O**染色结合冰冻切片检测脂质表达

小鼠麻醉取血处死后，剖开小鼠胸腔和腹腔，剪掉其余组织，充分暴露主动脉血管（图1-3），手术显微镜下分离出头臂动脉，剔除血管周围结缔组织，取出头臂动脉于4%多聚甲醛中固定2h后，用PBS清洗3遍，每次5min，置于30%蔗糖中，

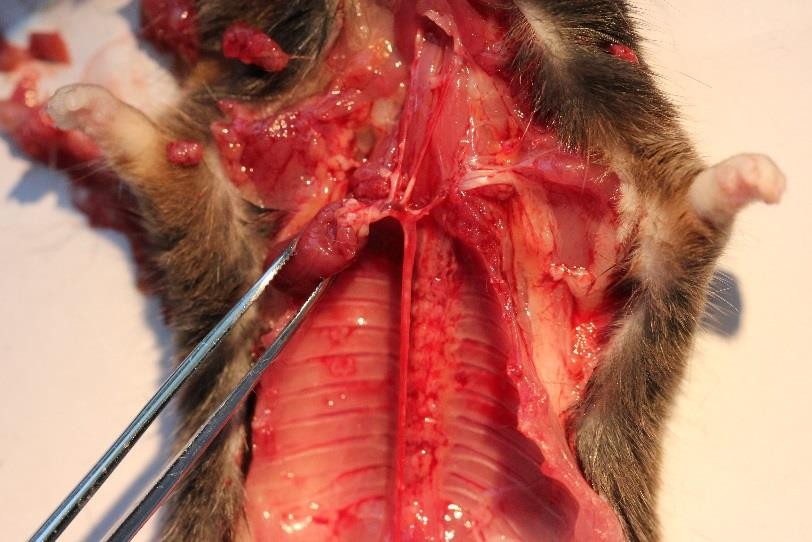
4℃冰箱过夜对组织进行脱水。次日用PBS清洗后制作冰冻切片，6μm连续冰冻切片。随后组织切片于室温放置30min后，用PBS清洗2遍，每遍5min，浸入已配制好的油红O染色液中10min，随后自来水下冲洗约2min，用吸水纸吸干组织周围液体，苏木素染色3min，自来水返蓝，浸入1%盐酸酒精5s后，自来水下冲洗约2min，于室温晾干，滴加甘油明胶进行封片，于光学显微镜下观察斑块表达情况。计算主动脉脂质面积（主动脉油红O阳性染色面积与斑块面积的百分比）。

#### **1.2.5** 大体油红**O**染色检测斑块脂质表达

手术显微镜下剥离主动脉周围结缔组织，取主动脉弓至腹主动脉肾动脉分支处，将主动脉用剪刀纵向剪开，平铺整根主动脉于油红O染色液中15min，取出主动脉置于70%酒精中分化5min后，再换一次酒精对组织进行分化，看到正常组织变为乳白色为止，PBS清洗2遍后观察斑块表达情况。计算主动脉斑块面积（主动脉油红

O阳性染色面积与管腔面积的百分比）。

20



**图 1-3** **ApoE-/-小鼠主动脉解剖图Figure 1-3** Anatomy of ApoE**-/-mice aortic**

#### **1.2.6** 尾静脉注射完成基因转导

喂养16周的ApoE-/-小鼠40只和C57小鼠40只，采用经尾静脉注射完成基因转导或生理盐水注射。将病毒滴度为2.45×10 13vg(virus genomes) /ml的rAAV9-eGFP病毒载体用生理盐水稀释为5.0×10 11vg/只/100µl，现配现用，以免病毒效价降低。通过尾静脉注射到小鼠体内，对照组静脉注射100µl生理盐水，每组5只。尾静脉注射时，用固定器固定小鼠，露出鼠尾。小鼠尾部分布有3条静脉，呈品字型分布，任选其中一条静脉。采用加热灯照射，促使静脉血管扩张，用75%酒精棉球揉搓鼠尾，消毒和促进血管扩张，压迫静脉血管阻断血流，便于寻找血管注射，待尾巴左右两侧的静脉血管清晰暴露后进行尾静脉注射。

尾静脉注射时，以左手捏住鼠尾并平行拉直，右手持0.45×15 RW LB的保护式静脉输液针连接1ml注射器，使针头与静脉平行（小于30°角），从尾巴末端处开始找血管注射，插入后推注，如果针头进入血管则推注基本无阻力，非常顺畅，如果推注阻力较大则说明针头没有进入静脉血管，需要重新找血管扎针。扎针原则是先从尾尖端部开始找血管，找不到再往尾根部移动，因为被针扎过的血管会有红肿和漏液，不利于再次扎针。注射完毕，短暂按压止血。操作时应注意不要将空气注入静脉，造成气栓。

#### **1.2.7** 小鼠主动脉标本留取及保存

麻醉具体操作步骤参照1.2.2，在已设计的不同时间点随机选取小鼠，麻醉取血处死后，打开胸腔和腹腔，剪去其余组织，充分暴露主动脉，将血管周围的结缔组织剥离干净，分离出头臂动脉，取出头臂动脉经4%多聚甲醛固定12h后，用PBS洗3次，每次5min，置于30%蔗糖中，4℃冰箱过夜对主动脉进行脱水，次日置换

PBS后，放入OCT包埋剂中，随后置于-80℃冰箱保存，用于制作冰冻切片检测HE

21

染色、油红O染色、eGFP的最佳在体表达时间点，剩余的主动脉组织快速冻存于液氮中5分中后转移到-80℃冰箱保存备用，用于蛋白电泳检测eGFP蛋白水平表达。



**图 1-4** **小鼠尾静脉注射和尾部血管分布示意图**

**Figure** **1-4** Mouse tail vein injection and blood vessel distribution **diagram**

#### **1.2.8** 激光共聚焦显微镜检测**eGFP**表达

激光共聚焦显微镜检测各组小鼠主动脉中eGFP的表达情况，确定病毒转染主动脉的最佳在体表达时间。具体实验操作过程如下：

将组织从-80℃冰箱中取出，室温静置使OCT包埋剂解冻，从包埋剂中取出主动脉，用PBS洗2次，每次5min，将适量的OCT包埋剂滴到样品托盘上，头臂动脉垂直朝上使其完全包埋到OCT包埋剂中，再用镊子调整使主动脉血管垂直朝上，迅速放入-20℃速冻台上对组织进行冷冻，待组织凝固后开始进行组织切片，组织切片厚度为6μm，首先使用普通载玻片对组织进行贴片，直到出现完整的血管形态时开始更换氨基载玻片贴片，此时开始正式保留贴片。切片完成后，将切片在常温下放置30min，随后组织切片经蒸馏水浸润，置于0.5%滂胺天空蓝中浸泡10min, PBS洗3次，每次5min，用吸水纸吸干周围液体，滴加DAPI复染细胞核5min, PBS 洗

3次，每次5min，吸干周围液体，滴加适量抗荧光淬灭剂对组织进行封片，在激光共聚焦显微镜下拍照，观察eGFP的荧光表达情况。计算eGFP转染效率（eGFP阳性表达面积与主动脉斑块面积的百分比）。

#### **1.2.9** **WB**法检测**GFP**蛋白在血管组织中的表达

检测转染病毒各组小鼠主动脉中eGFP蛋白表达差异，确定病毒转染主动脉的最佳在体表达时间。具体实验操作过程如下：

##### **1.2.9.1** 提取总蛋白

###### （1）将标本从-80℃冰箱取出，放置于冰上。

###### （2）从冻存管中取出主动脉组织于研钵中，加入液氮，对组织进行研磨呈粉状。

22

###### （3）将研磨完成的冻粉转入1.5mL尖底EP管中，加入200μL裂解液，充分混匀后置于冰上裂解30min。

###### （4）超声波裂解每个主动脉标本2min，间歇5s。

（5）离心机离心：4℃，13, 000r/min，离心10min，吸取上清液于EP管中。

（6）采用BCA蛋白定量试剂盒对所有蛋白进行定量。

（7）将定量完成的蛋白上清液与等量的上样缓冲液（4×稀释为2×）相混匀，放入沸水中煮10min，随后置于冰上冷却5min。

（8）根据计算好的蛋白定量结果，以2×上样缓冲液调整浓度。

##### **1.2.9.2** **BCA**法蛋白定量

（1）取57.6mL BSA标准品于EP管中，加入32.4μL PBS，使最终标准品浓度为3.2mg/mL，此管标记为1号。

（2）取7个2mL EP管分别标记为3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0，每管加入45μL PBS（最后一管除外），进行浓度的稀释，从1号EP管中取出45μL已配制好的标准品加入到2号管，依次加到最后一管，此时每管的浓度分别为：3.2、1.6、0.8、

0.4、0.2、0.1、0 mg/mL。

（3）取5μL待测蛋白样品加入45μL PBS后充分混匀。

（4）将上述标准品稀释液，样品稀释液各取20μL加入96孔酶标板中，每个样品均做复孔。

（5）标准品和样品稀释液加入完毕后，每孔加显色液200μL（A: B=50: 1），放置于37℃温箱中30min。

（6）取出96孔酶标板，采用酶标仪测定OD值，根据标准曲线计算蛋白浓度。

（7）将定量完成的蛋白上清液与等量的上样缓冲液（4×稀释为2×）相混匀，放入沸水中煮10min，随后置于冰上冷却5min。

（8）根据计算好的蛋白定量结果，以2×上样缓冲液调整浓度。-80℃冰箱储存备用。

##### **1.2.9.3** **Western blot**电泳

（1）电泳：将样品从-80℃冰箱取出置于冰上，倒入500mL配置好的电泳液于电泳槽内，取出电泳胶，撕掉胶板下方的白色封条，放入电泳槽中，将凝胶板底部的气泡赶出，扣紧胶板后缓慢拔出样品梳。在各样品孔中加入计算好的上样量加样，盖上电泳槽盖，打开电泳仪并进行连接，100V恒压电泳30min，待样品跑过积层胶后，再以120V恒压电泳约至1.5h，所有的样品达到分离胶底部时切断电源。

（2）转膜：电泳结束后，将凝胶板取出。将转膜液倒入大容器盒中，把用蒸馏水冲洗过的转膜夹、玻璃棒、滤纸、纤维垫泡入转膜液中。PVDF 膜在甲醇中浸泡

10s后转入蒸馏水浸泡2min后取出放入转膜液中。打开转膜夹，从下往上依次放纤

23

维垫、滤纸、PVDF膜、电泳胶、滤纸、纤维垫（注意用玻璃棒赶走膜与胶之间的气泡）。然后将转膜夹放入加入转膜液的转膜槽内开始转膜，接通电极后，80V恒压转膜2h。

（3）封闭：转膜完成后，将PVDF膜从转膜夹中取出，浸泡入已配置好的5%

脱脂牛奶3mL的方盒中，室温置于摇床上以最慢速度封闭2h。

（4）一抗孵育：牛奶封闭完成后，用蒸馏水洗膜3次，每次3min，洗膜完毕后，将PVDF膜置于小牛血清稀释好的一抗中（按1: 1, 000进行稀释），4℃冰箱孵育过夜。

（5）二抗孵育：取出PVDF膜，将膜放入大白盒中加入0.05%TBST洗膜3次，每次10min，随后将PVDF膜浸入已稀释好的辣根酶标记抗体孵育液中，室温避光摇床最小速度孵育2 h。二抗孵育完成后，0.05%TBST洗膜3次，每次10min。

（6）成像显色：洗膜完成后在小方盒中加入500μL显色液，观察见到条带清晰出现后，置于0.05%TBST中，凝胶成像系统下观察并检测相关蛋白表达，并对其进行结果分析。

#### **1.2.10** 心肌细胞和肝细胞凋亡检测

将心肌细胞和肝细胞按照3×10 5个/孔及2×10 6个/孔的密度，贴壁培养48h后，

按1×10 7 MOI进行转染，设定空白组、rAAV9-CMV-eGFP转染组，每组各设3个复孔，待转染4d后，经PBS清洗培养板2次后。利用TUNEL凋亡试剂盒检测心肌细胞和肝细胞凋亡指数，研究AAV9载体转染对心肌细胞和肝细胞凋亡的影响。

### **1.3** 统计分析

采用GraphPad Prism 6.0软件进行作图。采用SPSS 22.0统计软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差（*x**s*）表示，多组均数的比较采用两因素方差分析（General Linear Model-Univariate）或单因素方差分析（Oneway ANOVA），两两组间比较视方差齐性检验（以0.05作为检验水准进行误差方差的齐性Levene's检验）结果进行不同的选择，当方差齐时，选择LSD检验，当方差不齐时，选择秩和检验。以*P*＜0.05为差异有统计学意义。

## **2** 结果

### **2.1** 动脉粥样硬化小鼠模型的建立

#### **2.1.1** 不同饮食和不同周龄对**ApoE-/-**小鼠血脂的影响

两组ApoE-/-小鼠在喂养8，12，16，20，24周后，血脂指标显示，高脂饮食组血清中TC、TG和LDL-C水平与同周龄普通饮食组比较显著升高，并随高脂饮食时间的延长，其表达水平也逐渐增高，表达水平有显著意义（*P*＜0.05, 表2-1），HDL-C

24

水平无明显变化。说明高脂饮食喂养后可使血脂水平显著升高，并且和普通饮食相比可以加快AS病理进程。

**表 2-1** ApoE**-/-小鼠不同饮食不同周龄血脂的变化（***x**s***）**

| Table 2-1 The | expressio | N of lipids in Apo | E-/-mice of differe | Nt diets and differe | Nt weeks( x  s ) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 分组 | 周数 | TC  （mmol/L） | TG  （mmol/L） | HDL-C  （mmol/L） | LDL-C  （mmol/L） |
| 普通饮食组 | 8 周 | 8.50±1.19 | 0.39±0.22 | 1.11±0.09 | 1.99±0.3 1 |
|  | 12 周 | 10.83±0.76 | 0.71±0.09 | 1.09±0.1 1 | 2.54±0.47 |
|  | 16 周 | 12.75±0.96 | 1.01±0.0 1 | 1.04±0.1 1 | 3.10±0.22 |
|  | 20 周 | 14.38±0.43 | 1.26±0.06 | 1.05±0.10 | 3.62±0.16 |
|  | 24 周 | 16.04±1.19 | 1.52±0.1 2 | 1.08±0.12 | 4.14±0.23 |
| 高脂饮食组 | 8 周 | 13.81±1.84 \* | 0.71±0.18 \* | 1.20±0.10 | 3.50±1.09 \* |
|  | 12 周 | 17.75±1.88 \* | 1.10±0.10 \* | 1.12±0.09 | 5.04±0.71 \* |
|  | 16 周 | 21.02±2.99 \* | 1.43±0.08 \* | 0.95±0.07 | 6.16±0.40 \* |
|  | 20 周 | 23.84±1.72 \* | 1.79±0.18 \* | 0.96±0.10 | 6.94±0.27 \* |
|  | 24 周 | 27.12±1.14 \* | 2.24±0.45 \* | 0.99±0.11 | 8.04±0.24 \* |

\*与同周龄普通饮食组相比，*P*＜0.05

\* Compared with the normal diet group mice in different time point, *P*＜0.05

#### **2.1.2** 大体油红**O**染色测定脂质斑块表达

高脂饮食组主动脉管腔内斑块显著高于同周龄的普通饮食组，可见管腔狭窄明显，大量脂质堆积于管壁，脂质在血管内皮沉积，脂质斑块被染为红色，在高脂饮食8周时可观察到少量斑块，随着给予高脂饮食时间的增加，其斑块表达也逐渐增多，高脂饮食持续到16周时斑块面积约26%，持续到24周时斑块面积约56%，且各组小鼠主动脉的脂质斑块表达水平差异有显著意义（*P*＜0.05, 图1-5）。表明高脂饮食可以加快AS的病理进程。

25

8周12 周

16周20周24 周



普通饮食组

高脂饮食组



**图 1-5** ApoE**-/-小鼠不同饮食和不同周龄主动脉大体油红O染色**

\*与同周龄普通饮食组相比，*P*＜0.05

**Figure** **1-5** ApoE**-/-mice different diets and different weeks aortic by oil red O staining**

\* Compared with the same week age ordinary diet group*, P*＜0.05

#### **2.1.3** 冰冻切片油红**O**染色测定脂质斑块表达

ApoE-/-小鼠各周龄高脂饮食组头臂动脉内的脂质斑块面积显著高于普通饮食

26

组，可见主动脉内膜增厚，脂质沉积于管壁内，脂质斑块被染为红色，在高脂饮食

16周时斑块面积约25%，随着给予高脂饮食时间的延长，主动脉斑块的表达也逐渐增加，持续到24周时斑块面积约58%，各组小鼠主动脉的斑块表达水平有显著意义

（*P*＜0.05, 图1-6），与大体油红O 染色观察结果相符。结果表明，高脂饮食喂养ApoE-/-小鼠，形成脂质斑块的时间较普通饮食组更快，在高脂饮食组16周即可建立为稳定的AS模型。





**图 1-6** ApoE**-/-小鼠不同饮食和不同周龄头臂动脉冰冻切片油红O染色（×100 ）**

\*与同周龄普通饮食组相比，*P*＜0.05

**Figure** **1-6** ApoE**-/-mice different diets and different weeks brachiocephalic by oil red O staining of frozen sections(×100 )**

\* Compared with the same week age ordinary diet group, *P*＜0.05

27

### **2.2** 重组**9**型腺相关病毒在动脉粥样斑块内的表达及安全性测定

#### **2.2.1** 激光共聚焦显微镜测定重组**9**型腺相关病毒的表达

在激光共聚焦显微镜下观察，对于C57小鼠及ApoE-/-小鼠转染eGFP的血管组织，在未经滂胺天空蓝处理的冰冻切片可见自发绿色荧光，箭头指示处（图1-7A，

C），用滂胺天空蓝处理后可见本身的绿色荧光，箭头指示处为绿色荧光阳性表达（图1-7D）。转染eGFP后不同时间点结果显示，普通C57小鼠转病毒后的14天至120天，其主动脉切片经滂胺天空蓝处理后在激光共聚焦显微镜下未观察到eGFP阳性的表达；ApoE-/-小鼠在病毒转染的第14天，主动脉血管组织中可见少量绿色荧光eGFP的阳性表达，而未转染病毒的空白对照组未观察到绿色荧光表达。随着转染时的延长，主动脉斑块中eGFP表达逐渐升高，于转染35天时荧光强度最高，转染效率约

15%，且各时间点主动脉斑块中eGFP表达的水平差异有显著意义（*P*＜0.05, 图1-8）。当观察持续到第120天时仍有较强eGFP的表达（图1-8），结果表明eGFP可在AS小鼠主动脉斑块中呈持久、稳定地表达，为下一步转导病毒靶基因的实验奠定基础。



**图 1-7** **使用滂胺天空蓝后血管eGFP的表达（激光共聚焦显微镜，×200 ）**

**Figure** **1-7** Expression of eGFP after the vascular use of pontamine sky **blue(laser scanning confocal microscope,×200 ）**

28





**图 1-8** **用5.0×10 11vg/只病毒剂量转染ApoE-/-小鼠头臂动脉斑块内eGFP的表达（激光共聚焦显微镜，×200 ）**

\*与前一时间点相比，*P*＜0.05

**Figure** **1-8** Expression **of eGFP in brachiocephalic artery plaque of ApoE-/-mice at different time points after transfection of 5.0×10 11 vg virus（laser scanning confocal microscope,×200 ）**

\* Compared with the previous period points, *P*＜0.05

#### **2.2.2** **Western blot**测定重组**9**型腺相关病毒的表达

选用eGFP作为报告基因，用5.0×10 11vg/只的rAAV9-eGFP转染于普食喂养的

C57小鼠和高脂饮食喂养的ApoE-/-的AS模型小鼠主动脉中，Western blot检测不同时间点C57小鼠和ApoE-/-小鼠主动脉血管中eGFP蛋白的表达，确定rAAV9-eGFP

29

的最佳在体表达时间。Western blot结果显示，在C57小鼠中，病毒转染后第14天，

eGFP开始表达，eGFP的表达强度随着转染时间的延长而逐渐增强，随后表达维持在一定水平持续一段时间，转染120 天时表达开始明显减弱（图1-9, A, B）。在ApoE-/-小鼠转染病毒第14天时，eGFP开始表达，eGFP的表达强度随着转染时间的延长而逐渐增强，在转染35天时达高峰随后随转染时间的延长eGFP的表达开始下降，在转染120天时仍有eGFP的表达（图1-9, C, D）。上述结果与激光共聚焦显微镜观察结果相一致。结果提示rAAV9-eGFP可持久、稳定地在AS模型小鼠主动脉斑块中表达。



**图 1-9** **Western blot检测C57小鼠（1-9，A，B）和ApoE-/-小鼠（1-9，C，D）主动脉组织不同时间点eGFP蛋白表达**

\*与前一时间点相比，*P*＜0.05

**Figure 1-9** eGFP expression in aortic tissue at different time detected by western blot **assay in C57 mice (1-9, A, B) and ApoE-/-mice (1-9, C, D).**

\* Compared with the previous period points, *P*＜0.05

#### **2.2.3** 病毒转染对**AS**小鼠血清学指标的影响

全自动生化仪测定生理盐水和rAAV9载体转导不同时间点（14、21、35、60、

90及120天）ApoE-/-的AS模型小鼠血清中心肌损伤标志物（LDH、CK）、肝功能

（AST、ALT）、肾功能（BUN、Cr）等指标变化，研究靶向应用AAV9载体对小鼠机体心脏、肝脏、肾脏代谢特性的影响，评价AAV9载体的安全性。与生理盐水组

30

相比，rAAV9-CMV-eGFP载体转导各时间点小鼠血清中LDH、CK、AST、ALT、BUN、

Cr指标无显著变化（图1-10）（*P*＞0.05），表明重组AAV9载体转导对心肌、肝功和肾功能无明显影响，对机体重要器官无明显损伤，因此rAAV9-CMV-eGFP作为动脉粥样硬化的基因治疗载体是安全的。



**图 1-10** **病毒转染ApoE-/-的AS模型小鼠后血清心肌酶、肝、肾功检测**

\*与相同时间点生理盐水组相比，*P*＞0.05

**Figure 1-10** Evaluation of cardiac and liver damage and renal function after **systemic AAV9 administration in ApoE-/- mice.**

\*Compared with the saline group at the same time point, *P*＞0.05

#### **2.2.4** **rAAV9**载体转染对心肌细胞及肝细胞凋亡的影响

为了评估AAV9 载体转导是否引起细胞毒性，将心肌细胞和肝细胞接种培养在

12孔板，分别以3×10 5个/孔及2×10 6个/孔的密度接种，然后用AAV9-CMV-GFP 以

1×10 7 MOI感染剂量转染，进行TUNEL检测；未处理的细胞作为对照组。在病毒转染细胞后第4天，用TUNEL法进行心肌细胞和肝细胞凋亡检测。无论是心肌细胞还

31

是肝细胞与对照组比较，转染病毒组与对照组之间TUNEL阳性细胞数量无明显差异

（图1-11）（*P*＞0.05）。从而进一步证实，AAV9载体的高剂量转染表达对心肌细胞和肝细胞没有明显的毒性。



**图 1-11** **AAV9病毒转染心肌细胞、肝脏细胞后的凋亡检测**

\*与对照组相比，*P*＞0.05

**Figure 1-11** **Apoptosis assay of cardiomyocytes and hepatocytes following AAV9-CMV-GFP transduction.**

\*Compared with the control group, *P*＞0.05

## **3** 讨论

本实验的研究结果显示，ApoE-/-小鼠无论是给予普通饮食还是高脂饮食都能形成动脉粥样硬化模型，还发现ApoE-/-小鼠给予高脂饮食16周即能形成稳定的动脉粥样硬化模型，ApoE-/-小鼠是AS造模理想的动物模型。本实验拟采用重组AAV9-CMV-GFP携带目的基因干扰动脉粥样硬化斑块。采用AAV9-CMV-GFP病毒尾静脉注射转染ApoE-/-的AS模型小鼠，发现AAV9-CMV-GFP可以稳定地在动脉粥样硬化斑块中表达，转染高峰在35天左右，且可以较长时间在斑块内表达，可作为基因治疗动脉粥样硬化的良好载体。同时我们还发现较高剂量地转染AAV9病毒后并未对ApoE-/-小鼠的心肌、肝肾功造成明显损害，这表明转染AAV9病毒对心脏、肝脏、肾脏等身体重要的器官无明显损害，进一步证明AAV9病毒作为干预动脉粥样硬化的基因载体是安全、有效的。

32

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病，影响大、中型动脉。先天和适应性免疫系统两者都常常以激活的状态参与血脂紊乱[78-80]。对大多数人群来说动脉粥样硬化是心血管疾病中导致心肌梗死、卒中、周围血管疾病的核心，除了热量摄入理想合理的个别人。动脉粥样硬化动物模型大大增加了我们对这个慢性炎症性疾病的认识。

目前，小鼠是动脉粥样硬化研究中最常用的模型。小鼠和人类中几个参数不同可能会影响动脉粥样硬化。此外，他们的病灶分布是不相同的。动脉粥样病变经常发生在人类的冠状动脉、颈动脉和周围血管如髂动脉；然而在小鼠中动脉粥样硬化则更频繁地出现在主动脉根部、主动脉弓和无名动脉。但是许多动脉粥样硬化过程的关键特征是相通的。小鼠作为动脉粥样硬化的研究模型主要优点是其价格相对便宜、容易安置、易于繁殖和进行基因学的操作，可在合理的时间窗监测动脉粥样硬化。大量的近交系小鼠品系对粥样硬化具有不同的敏感性，对确定形成动脉粥样硬化中的易感或抵抗动脉粥样硬化的基因具有很大的研究潜力，特别是涉及到基因操作的动脉粥样硬化模型[81-83]。小鼠动脉粥样硬化模型基于非HDL的高胆固醇血症。这是最容易通过遗传学消除载脂蛋白E基因或LDL受体（LDLR）基因来完成的。虽然在人类中的ApoE缺陷是罕见的，但是有功能的LDLR缺乏在家族性高胆固醇的人群能显著增加心血管疾病的风险[84]。人类家族性高胆固醇血症的动脉损伤病灶与小鼠病灶的特征有一定的相似，包括主动脉瓣膜的病变，并且在一些尸检的研究中，还发现在主动脉根部也存在粥样硬化病变。

虽然小鼠的模型对我们对动脉粥样硬化机制的理解有非常重要的作用，但是要作为模拟人类急性心血管事件的模型有待继续讨论[85]。大多数小鼠模型并没有表现出不稳定的动脉粥样硬化斑块与血栓形成，然而这种病变与临床最常见的急性心血管事件密切相关。小鼠的病变不具备人类慢性动脉粥样硬化病变的厚纤维帽。与人类不同，小鼠很少发生冠状动脉的粥样硬化，但容易在主动脉根部形成动脉粥样硬化。小鼠有更快的心室率，造成了血液动力学的紊乱使得动脉粥样硬化在这些部位好发。小鼠的体型很小，这在一定程度上使得动脉粥样硬化血管的一些复杂性分析很难进行，虽然近期技术的进步和免疫化学方法有所改善。野生型小鼠是一个“高密度脂蛋白”的动物（即高密度脂蛋白是主要的脂蛋白），这可能造成其抵抗动脉粥样硬化即使是在动脉粥样硬化易感小鼠品系亦是如此。此外，小鼠的HDL亚群也和人类中发现的范围的不同。作为HDL的亚类都表现出不同程度的抗动脉粥样作用，这可能是非常重要的[86, 87]。最后，野生型小鼠不表达胆固醇酯转移蛋白（CETP），但是该蛋白已经引起广泛关注作为保护动脉粥样硬化的一个潜在的靶点[88]。

尽管有其局限性，小鼠仍然是动脉粥样硬化研究青睐的模型。基因操作的简易性，允许转基因操作对基因敲除和插入以及时间和组织上特异性的敲除或基因过表达。遗传修饰特异性影响免疫细胞的水平或功能（如MCSF1-/-降低单核细胞）在解

33

析免疫系统在动脉粥样硬化中作用的细胞和分子机制发挥了重大作用。相对容易繁殖的小鼠允许多个基因在单个动物模型中的同时修改操作。由于动脉粥样硬化受多基因共同影响，这是其一个重要的优势。

2个最常用的小鼠动脉粥样硬化模型是ApoE-/-模型和LDLR-/-模型。ApoE-/-模型也许是最广泛使用的动脉粥样硬化模型。ApoE-/-模型的优点是喂食正常的低脂饲料，即使血浆胆固醇水平是300至500mg/dL之间也可形成复杂的血管病变，这些病变与人类病变很相似。动脉粥样硬化发生率可以通过高脂、高胆固醇西方式饮食（WTD）喂养明显加快，（通常是0.2%的胆固醇，21%的牛奶脂肪）[89]，导致血浆脂质水平显著升高（＞1,000mg/dL）。进食西方饮食的小鼠病变具有更丰富的泡沫细胞，而普食喂养的小鼠病变更加复杂具有更多的细胞。值得注意的是，当给予普食或高脂肪饮食喂养，不同的治疗或基因操作对动脉粥样硬化表型的影响并不一定是相同的。例如，当普食喂养免疫缺陷ApoE-/-RAG-/-小鼠时，免疫缺陷的小鼠在主动脉根部动脉粥样硬化是减弱的，但当给予小鼠高脂饮食时动脉粥样硬化没有发生减轻[90]。（重组活化基因RAG1和2参与免疫球蛋白基因和T细胞受体基因序列，这是T细胞和B细胞重组的标志。因此，没有这个重组，适应性免疫系统的细胞都是缺乏的。）在ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化的演变进程中进行普食或WTD的病理分析是病变发展的最佳系统分析[89]。粥样硬化病变主要分布在主动脉根部、无名动脉（头臂）和主动脉其他分支，以及肺动脉和颈动脉。当普食喂养小鼠时，泡沫细胞病变首先出现的时间是在8至10周龄。普食喂养15周后，含有梭形细胞（主要是SMC）的中膜病变出现；普食喂养超过20周，纤维斑块明显含有SMC、细胞外基质和纤维帽。这一段时间，病变主要集中在主动脉根部，这是因为病变在每个粥样硬化易发部位的发展速度不同。如果改用WTD喂食则可加速动脉粥样硬化，使这些小鼠的病变更严重，斑块中含有更多的胆固醇结晶、坏死的脂核和钙化。在早期病变多发区表达粘附分子ICAM-1和VCAM-1[91, 92]。在更大周龄的ApoE-/-小鼠，病变部位有一定程度的出血表明病变的不稳定[93]。ApoE-/-小鼠主动脉根部有3个窦，病变的发展速度不同，通常与左冠状动脉相关的窦首先发生病变。

鉴于上述ApoE-/-小鼠作为动脉粥样硬化的常规小鼠和我们对ApoE-/-小鼠的研究，我们最终选择了高脂饮食喂养ApoE-/-小鼠16周造成动脉粥样硬化模型以及我们后期的病毒及药物干预研究都是建立在ApoE-/-小鼠造成AS模型进行实施的。

在过去的十年，冠心病患者和卒中患者的预后明显改善这主要归功于现已存在的一级和二级预防保健以及新的介入方法，介入方面主要包括药物洗脱支架和球囊的发展。尽管这些发展很好，但是心血管疾病仍然是工业化国家的首要死亡原因。持续努力地研究为了阐明动脉粥样硬化，再灌注心肌损伤，缺血性心力衰竭的基本机制，促使我们明确了几个主要参与动脉粥样硬化发生和发展的靶基因。现在这方

34

面的认识，使得不仅对单个基因缺陷遗传性疾病可以进行基因治疗，诸如家族性高胆固醇血症的基因治疗，而且对多基因作用的疾病如动脉粥样硬化也可以进行遗传学的调节性治疗。传统药物治疗的方法疗效有限，基因治疗作为全新的治疗手段完全有可能成为防治心血管疾病的一种重要手段和途径，从基因治疗角度探索治疗心脏疾病的新方法有潜在的临床价值[94-96]。我们的研究AAV9病毒携带目的基因靶向干预动脉粥样硬化斑块，达到防治动脉粥样硬化的目的，为探索动脉粥样的基因治疗提供理论依据。

特异性的载体和治疗性基因的恰当组合是基因治疗成功的关键。AAV最初被确定为一个猴腺病毒制剂的污染物[97]。AAV是细小病毒家族的一部分，是一种小的，非致病性的，无包膜衣壳的人类单链DNA病毒[98]。到目前为止AAV已有13个血清型，已知的血清型AAV1、AAV6、AAV8和AVV9具有心脏靶向性[99]。有几个原因导致AAV病毒越来越多地在心血管疾病中被用作基因治疗载体。首先，用于基因治疗的重组AAV对人类是非致病性的，且不整合到宿主基因组[98]。第二，重组AAV病毒具有最低限度的免疫原性，特别是与腺病毒相比较[100]。第三，重组AAV病毒的体积小是有利的，正因如此允许它通过冠状动脉输注输送到心肌；最后，AAV载体单次转染非分裂细胞后能够长期诱导靶基因的表达[101]。

使用AAV作为一种基因治疗的载体的主要缺点是其有限的包装能力（＜4.7 kb）

[98]. 为了克服此限制，转拼或基于重组AAV重叠载体的方法都增加了其基因递送的能力。转导的基因每一个部分用适当的剪接信号或重叠序列元件装载，独立地包装在两个AAV载体[102]。最近，一个用三重AAV载体共感染小鼠，对小鼠的全长肌营养不良蛋白编码序列功能重构的测试已经成功[103]。这些方法对心脏基因转导是否有效仍须将来的研究进行评估。

重组AAV载体主链是直链结构：它包括一个转基因盒＜4.5kb的长度和2个反向之间克隆的病毒末端。这个区域对应于控制蛋白编码的cDNA，由聚合酶II的启动子或shRNA控制，由聚合酶III的启动子表达。一旦克隆到质粒中，这样的结构使其能够在其它因素存在的情况下通过反式结构生产感染性颗粒。这些结构组成了AAV的Rep、Cap蛋白和附加辅助蛋白，也是少数的腺病毒或疱疹病毒基因的产物，这些结构随着AAV载体质粒共转染进入包装的细胞[104]。AAV基因组复制的产物被包装到生产细胞的细胞核的空置质粒中，通过标准的细胞匀浆和生物化学程序进行病毒颗粒的收获和纯化。

目前生产AAV中最确定的方法，被广泛用于研究的核心技术是基于载体和辅助质粒在瞬时共转染贴壁的HEK293细胞的方法[105]。每个细胞生产AAV颗粒的滴度在1×10 4和1×10 5（通过病毒基因组的数量来测量）代表当前流行和持续但很可能受限的生产方式，适合于按一定比例放大到滚瓶中增加细胞数量或在细胞工厂进行生

35

产。另一种方法，在过去几年中取得了显著的势头，是基于非贴壁细胞的昆虫杆状病毒表达载体系统在生物反应器中进行生产，显著地简化生产方法[73, 106]。这个系统似乎很稳定、流行，特别适用于生产临床实验数量级别的载体。在临床试验中使用的AAV载体关键的挑战是不能生产足够量的高纯度载体。rBac-SF9生产AAV载体系统与HEK293系统相比具有更高的性价比（高于10倍）[75]。使用rBac系统生产

AAV9载体已被广泛采用，决定使用这个系统更重要的原因是，该系统生产的载体具有有效的感染性、恰当地分布、长期的表达和足够的安全性的特点。我们的研究显示，使用rBac系统所生产的AAV9病毒载体在体内表达良好，可诱导eGFP基因在

ApoE基因敲除小鼠颈动脉粥样硬化斑块表达长达120天。此外，转染的AAV9载体没有引起主要生命器官损伤，如心肌和肝脏损伤。

我们使用滂胺天空蓝溶液消除血管组织的自发荧光，通过检测GFP报告基因免疫荧光检测蛋白的表达间接反映病毒的表达。我们以5.0×1011vg/只的高剂量AAV9-CMV-GFP转染C57小鼠，在主动脉血管转染不同的时间点检测到很少的绿色荧光。同样，我们用蛋白电泳检测eGFP的表达也得到了类似的结果，eGFP的表达很少。这个结果与先前的研究一致使用AAV转导动脉壁是非常困难的[107]。在一个类似的研究中，发现主动脉平滑肌细胞很难转染AAV9病毒载体，通过改变转染途径（从静脉改变为动脉内注射）并没能增加新生小鼠的主动脉中的AAV9的转染效率[72]。有趣的是，人们发现AAV9转染小鼠主动脉在成年小鼠更高效，这也许突出了对主动脉可设计特异的年龄相关基因治疗。主动脉转染AAV9出现年龄特异性差异的原因可能是成年小鼠比新生小鼠具有更多的血管内皮细胞能够被AAV9感染。先前已有研究人员提出限制系统性地AAV9基因转导的屏障机制的假设。我们还发现AAV9-CMV-GFP可以转染到动脉粥样硬化斑块，诱导基因持续表达长达120天；免疫荧光和GFP免疫印迹检测表明其表达高峰在转然后35天，且其转染过程存在时间依赖性。这样的结果是类似于我们以前的研究，研究表明AAV9-CMV-GFP能够有效地转染心脏很长一段时间，在同一时间点35天达峰值[108]。AAV9介导的基因表达峰值延迟，可能是因为AAV9的单链DNA必须先转换成双链DNA后才能进行下一步的复制表达[109, 110]。这个必需的过程使得AAV9转导基因相比其他基因转导载体，如腺病毒和慢病毒延迟表达[111]。有趣的是，C57小鼠的主动脉很难进行AAV9-CMV-GFP转染，而在ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化斑块可进行有效地转染并且可持续很长时间一段时间。确切机制尚不清楚。一种可能的解释是，ApoE-/-小鼠的主动脉病变比C57小鼠的主动脉包含更多的细胞，如平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞。另一种解释是在CMV启动子对转染器官和细胞的靶向性。未来还需要进一步的研究阐明该机制，以提高基因治疗。

适应性反应决定了AAV在患者的转导效率和持续时间似乎更为贴切。虽然临床

36

前动物研究并没有表明对这些载体存在显著的免疫应答，但从在人类临床试验经验清楚地表明，AAV病毒粒子不能完全隐蔽于免疫系统的两个预先存在抗体和细胞毒性T细胞感受器，可能会损害长期的基因治疗[112]。中和抗体识别AAV2，使其长期较小程度表达，其他血清型在个体中表达可达很大比例（≈70%）[112]。在一个血友病

B的临床研究也有类似报道，一种细胞毒性CD8+T细胞反应，可能通过引起肌球蛋白重链退化暴露病毒衣壳抗原。这项研究中，用AAV2载体转导肝脏，免疫应答清除转导的细胞，导致了转导基因的短命[113]。在一些患者中，使用的AAV8载体具有自我互补的基因组，肝细胞特异性启动子驱动了因子IX的表达，清除T细胞针对衣壳引起的应答，升高的转氨酶随着部分转导基因的消失而恢复正常；这个问题很快就被糖皮质激素短程疗法解决且并没有转导基因的丢失[114]。众多不成功的尝试，期望建立一个复制这些人类的发现的动物模型，但目前仍停留在争论开放抗AAV衣壳感受器效应T细胞反应的重要性。

为了避免预先存在的免疫反应，最近一些用AAV作为载体的临床研究中，预防策略是通过排除那些可检测到中和抗体滴度的患者或使用轻度免疫抑制药物治疗方案。在经皮给药基因治疗对心脏衰竭患者进行基因治疗的（CUPID）试验中，只有抗AAV1衣壳的中和抗体滴度＜1: 2的受试者才被纳入研究[115]。

除了预防性进行免疫抑制，也可以构思其他策略，以避免针对AAV载体的免疫反应。.广泛的研究方法，包括改变涉及衣壳免疫原性表位通过随机诱变或合理设计，也包括修饰激活抑制调节性T的抗原表位[116, 117]。另一种可能性涉及使用空衣壳作为诱饵吸附抗AAV 抗体，但增加了病毒颗粒负荷可能增加细胞毒性T淋巴细胞反应

[112]. 尽管有这些警告，必须强调的是，迄今为止还没有急性临床反应或不希望的事

件出现，这可能归因于AAV载体免疫系统的激活已被几百名使用这些载体的受试者在临床试验中记录。我们的研究发现，AAV9载体系统与对照组小鼠相比没有造成血浆中LDH、CK、AST、ALT、Cr和BUN水平的升高，间接说明其未对心脏、肝脏和肾脏等生命重要器官造成显著损害。无论是心肌细胞还是肝细胞与对照组比较，转染AAV9病毒组与对照组之间TUNEL阳性细胞数量无明显差异。进一步证实，

AAV9载体的高剂量转染表达对心肌细胞和肝细胞没有明显的毒性。这些结果表明，单链AAV9-CMV载体可作为慢性心脏疾病基因治疗理想和安全的载体，特别是对于进展期的动脉粥样硬化疾病。然而，我们的研究也有一定的局限性。首先，我们没有比较AAV9-CMV不同的转染剂量以确定最佳的转染剂量；我们只是用了先前研究报告中所推荐的剂量。第二，我们没有明确AAV9-CMV转染的是哪种类型的细胞；还需要进一步研究清楚地确定转染细胞的类型，以提高基因的靶向治疗。

总之，我们根据前人的众多的研究和我们自己的研究，用ApoE-/-小鼠作为动脉硬化模型试验动物，且发现高脂饮食可明显加剧其动脉粥样硬化的发生，ApoE-/-小

37

鼠在高脂饮食喂养16周时即可形成成熟的动脉粥样硬化模型，为下一步的病毒或药物干预奠定了基础。与此同时根据AAV病毒载体对心血管疾病的特异性，以及较弱的免疫原性和可以长期在体内稳定的表达，本实验选取了AAV9-CMV-GFP作为载体干预动脉粥样硬化斑块。我们发现AAV9-CMV-GFP病毒尾静脉注射转染ApoE-/-的

AS模型小鼠，可以稳定地在动脉粥样硬化斑块中表达，转染高峰在35天左右，且可以较长时间在斑块内表达，可作为基因治疗动脉粥样硬化的良好载体。同时我们还发现较高剂量地转染AAV9病毒后并未对ApoE-/-小鼠的心肌、肝肾功造成明显损害，这表明转染AAV9病毒对心脏、肝脏、肾脏等身体重要的器官无明显损害，进一步证明AAV9病毒作为干预动脉粥样硬化的基因载体是安全、有效的。

## **4** 小结

4.1本实验发现ApoE-/-小鼠无论是给予普通饮食还是高脂饮食都能形成动脉粥样硬化模型，ApoE-/-小鼠给予高脂饮食16周即能形成稳定的动脉粥样硬化模型，ApoE-/-小鼠是AS造模理想的动物模型。

4.2本实验采用AAV9-CMV-GFP病毒尾静脉注射转染ApoE-/-的AS模型小鼠，发现AAV9-CMV-GFP可以稳定地在动脉粥样硬化斑块中表达，转染高峰在35天左右，且可以较长时间在斑块内表达，可作为基因治疗动脉粥样硬化的良好载体。

### 4.3 本实验发现较高剂量地转染AAV9病毒后并未对ApoE-/-小鼠的心肌、肝肾功造成明显损害，这表明转染AAV9病毒对心脏、肝脏、肾脏等身体重要的器官无明显损害，证明AAV9病毒作为干预动脉粥样硬化的基因载体是安全、可行的。

38

# 第二部分 重组腺相关病毒介导IκBα过表达对**ApoE-/-**

**小鼠动脉粥样硬化的保护作用研究**

动脉粥样硬化是引起心肌梗死、卒中和缺血性坏疽的原因，是一种炎症性疾病。当低密度脂蛋白在内膜聚集，激活了内皮表达白细胞粘附分子和趋化因子促进单核细胞和T细胞的募集。单核细胞衍生的巨噬细胞上调模式识别受体，包括介导修饰

LDL摄取的清道夫受体和Toll样受体，其激活信号通路导致细胞因子、蛋白酶和血管活性分子的释放。T细胞在病变局部识别抗原和增加Th1免疫应答参与促炎细胞因子的分泌，从而促进局部炎症反应和斑块的进展。增强的炎症反应可能导致局部蛋白水解、斑块破裂、血栓形成，引发缺血和梗死。炎症标记物已被用于监测动脉粥样硬化疾病的进程，抗炎治疗也许可以很好地控制该疾病的进展。

从细胞膜来看，Martın等人推测CD74作为一种非多态II型整合膜蛋白具有潜在的促炎功能[118, 119]。CD74也可以作为一个辅助信号分子，诱导信号的级联反应导致AKT和NF-κB的活化以及细胞的增殖[120]。该研究通过分析比较人体颈动脉内膜切除组织的免疫组织化学（IHC），外周血单核细胞（PBMC）的实时定量PCR和体外培养的人主动脉平滑肌细胞（VSMC）的实时定量PCR和免疫印迹，发现CD74在粥样硬化斑块的炎性区域相比纤维区域显著增加，在血管平滑肌细胞和巨噬细胞中与NF-κB 共定位。这一证据的发现支持体内这些蛋白质之间存在潜在的关联。

CD74的小干扰RNA（siRNA）降低了IFN-γ诱导的血管平滑肌细胞NF-κB的活化同时减少了MCP-1的表达。值得注意的是，一种AKT的抑制剂可阻止这种效果。这项研究还发现，既抗CD74又抗IFN-g后进行试验，可诱导NF-κB调节基因MCP-1在血管平滑肌细胞的表达。虽然CD74的沉默可显著减少NF-κB的活化和MCP-1的分泌，但这不能完全阻止这种效果，这表明IFN-g诱导MCP-1的产生存在其他的机制[118]。

高血糖水平产生的蛋白质糖基化终末产物（AGEs）有促进细胞炎症和细胞毒性反应的作用，可能会导致蛋白质功能障碍或糖基化产物受体的激活[121-124]。在此基础上Mas等人应用代谢组学和影像分析，试图确定在人类糖尿病患者斑块的非酯化脂肪酸（NEFA）化合物的成分和分布位置，声称已经证明了它们与炎症过程存在联系

[125]. 出于这个原因Mas等人，在体外和体内研究分别使用来自高胆固醇血症的糖尿病（II型）和非糖尿病患者颈动脉内膜切除术的标本对比模型以及人主动脉平滑肌细胞进行培养比较分析。原位杂交发现激活的NF-κB和丰富的NEFA部位共定位。石蜡包埋的糖尿病粥样硬化斑块与非糖尿病患者粥样斑块相比NF-κB活化核染色阳

39

性的数量更高。在培养的血管平滑肌细胞实验中，核提取物中增加NF-κB的DNA结合能力被记录。应当指出的是用NF-κB的抑制剂白菊进行预处理可以防止亚油酸增加脂蛋白脂酶（LPL）和MCP-1的mRNA和蛋白的表达[126]。总之，糖尿病患者的斑块有较高水平的随着NF-κB的活性变化的NEFA和增加的MCP-1 mRNA的表达。这些研究结果提出了一个问题NEFA和炎症之间也许是相互促进的关系，表明

NEFA在斑块的炎症反应中的关键作用涉多个通道的共同作用。

炎症反应涉及细胞粘附和迁移的协调调节，并且引导炎性细胞到受损的组织。该功能由细胞因子和趋化因子介导，其协调炎性细胞的募集、存活、扩张和效应功能[127-129]。在这个方面Calvayrac等，在体内和体外研究使用了人冠状动脉粥样硬化的标本和人血管平滑肌细胞进行比较分析[130]。他们研究CCL20趋化因子是否选择性吸引未成熟的树突状细胞、效应/记忆T细胞和幼稚B细胞[131, 132]，可以在血管平滑肌细胞的炎症反应中起一个敏感的介质作用。在体外环境，高胆固醇血症患者的

CCL20循环水平显著升高，且时间依赖性地被LDL上调。此外，LDL诱导人脐静脉内皮细胞CCL20的表达。另外，用转录因子的抑制剂对人血管平滑肌细胞预处理可以防止由LDL引起的CCL20 mRNA水平的增加。值得注意的是，白菊和BAY 11-7082，两个NF-κB的抑制剂，显著抑制LDL对CCL20的上调。LDL显著激活人类血管平滑肌细胞的NF-κB信号，细胞胞浆降低的IκBα水平与从细胞质至细胞核的

P65易位平行。通过白菊可以预防这种现象。染色质免疫沉淀实验，证实了NF-κB的这种结合和LDL可以显著增加体内NF-κB的这种结合。此外，粥样硬化的动脉与非粥样硬化的动脉比较存在更高NF-κB的DNA结合活性。

Liao等人的比较研究提出，基因变异对动脉炎症影响的观点。BRCA-1的相关蛋白（BRAP）基因最近被认为是心肌梗死的易感基因，其中rs11066001基因的多态性与心肌梗死风险显著相关[133, 134]。参与动脉粥样硬化的不同阶段的许多基因被转录因子NF-κB调节[135]。因此，BRAP多态性和BRAP的遗传变异可促进颈动脉的粥样硬化，潜在的原因是BRAP有促动脉粥样硬化的效果。在该方面的结果表明，经超声筛选颈部动脉至少一处有粥样斑块的患者与颈部无粥样斑块的受试者相比出现纯合子GG的频率显著增加。BRAP的siRNA可以显著抑制BRAP的mRNA水平和蛋白的表达。当BRAP下调，可减少脂多糖（LPS）刺激诱导的炎性细胞因子（MCP-1和IL-8）的分泌。BRAP下调阻遏LPS刺激诱导细胞MCP-1/IL-8的分泌，BRAP水平的减少抑制NF-κB的核转位从而下调NF-κB的活化。值得注意的是，BRAP与IKK复合物中的两个主要组成部分IκB-β和IKK-β相互作用。蛋白电泳分析进一步证实，

BRAP沉默可能影响IκB-β的降解。总之，该研究表明LPS诱导BRAP上调激活Iκκ信号小体，增强NF-κB的核转位，从而增加炎性细胞因子的表达。另一方面，最近的研究证据支持，骨髓来源的Iκκα并未影响ApoE-/-小鼠的动脉粥样硬化[136]。在这

40

项研究中，推测该Iκκα的造血细胞的多种功能可以相互抵消或不是强到足以影响动脉粥样硬化，这表明单独靶向干预造血干细胞的Iκκα激酶活性并不能作为一种治疗方法。

Dhar等最近进行的体外研究，TNF-α诱导冠状动脉平滑肌细胞（CASMCs）中NF-κB的活化[137]。NF-κB和信号传导和转录激活子（STAT）的活化是由不同的途径激活和转位到细胞核带来转录活性。这项研究还评估STAT3在人类冠状动脉平滑肌细胞（CASMCs）中IGF-1和NF-κB存在时与SOCS3的转录和翻译的潜在关联。免疫共沉淀发现经IGF-1和TNF-α处理后细胞的pSTAT3和NF-κB是完全共同存在于细胞核的部分。SOCS3启动子基因甲基化后减少TNF-α和IGF-1在人类冠状动脉平滑肌细胞蛋白和mRNA水平的表达，以减少冠状动脉介入手术造成的机械性损伤后释放的炎性细胞因子和促细胞分裂原造成的内膜增生。

上述这些研究表明动脉粥样硬化是一种炎症反应，NF-κB信号通路在其发生过程中起着重要的作用。NF-κB与多个信号通路存在着交互作用，可能存在着炎症级联反应，NF-κB激活后激活其下游的炎症和趋化因子靶基因的表达，从而促进动脉粥样硬化的发生和发展。同时还提示在动脉粥样硬化的细胞损伤或者动物模型中给予NF-κB的抑制剂可显著抑制动脉粥样硬化的进展。我们的研究拟寻找一种可很好抑制NF-κB活性的物质，从而减缓动脉粥样硬化的进程。

NF-κB存在于大多数类型细胞中以同二聚体（例如，P50）或异二聚体（例如, P50/P65）形式存在，为一族结构相关的蛋白[138, 139]。每个该家族的成员结构包括含氨基末端的区域称为相对同源结构域（RHD），它位于DNA结合部位；二聚体作用域；以及核定位信号区域（NLS）。目前在哺乳动物中NF-κB家族的五种蛋白已被明确。

NF-κB与其抑制蛋白IκB结合以非活化状态存在于细胞中，其抑制蛋白包括IκB-α，IκB-β，IκB-ε和Bcl-3[140]. IκB的家族成员调节DNA结合和通过亚细胞定位掩蔽位于靠近IκB的RHD结合存在的非活动Rel-NF-κB蛋白质[141]。经过磷酸化，泛素化和IκB蛋白的水解，允许NF-κB易位至细胞核，导致cAMP反应元件结合蛋白（CREB）的基因转录和蛋白结合。磷酸化的IκB-α选择性地被一个E3泛素连接酶泛素化[142]。在这种信号级联反应的最后一级，磷酸化和泛素化的IκBs仍与细胞质的NF-κB相关联，有选择地通过26S蛋白酶体降解。该途径暴露NLS，释放NF-κB进行核易位结合其靶基因以启动转录。

刺激引起IκB-α的降解和NF-κB激活的是众所周知的事；然而，NF-κB的调控一个重要特点是未受刺激的细胞它被IκB-α紧密地抑制着。NF-κB活性升高与许多人类疾病相关，包括关节炎，动脉粥样硬化和癌症[143]。尽管如此，NF-κB的活性在休眠细胞中的控制目前还不清楚。研究已经显示，IκB-α蛋白在未经刺激的细胞中连

41

续合成；事实上，IκB-α蛋白合成被抑制激活NF-κB，这个过程的激活需要底物IKK的活化[144, 145]。这意味着一个存在在未刺激的细胞中IKK依赖的IκB-α降解途径，连续地合成IκB-α是必不可少的，以防止基底的NF-κB的活化。已知IκB-α在细胞存在两个不同的储存池；较大的IκB-α池与NF-κB相关联[146]，而小的储存池是相对

“自由”的蛋白。最近的研究已揭示游离和NF-κB结合的IκB-α的降解的半衰期存在三个数量级的差异[145]。虽然游离的IκB-α很快被降解，但一直有报道，其IKK比与NF-κB结合的IκB-α结合力差[147]。低效的IKK磷酸化和游离的IκB-α短的半衰期之间的主要矛盾仍然没有得到解决。

因此，鉴于上述研究，IκB-α作为NF-κB活化很重要的成员，IκB-α的降解可能是NF-κB活化转位入核启动靶基因所必须的，但其具体的机制尚不明确。上述多数为离体的细胞实验，且在体关于动脉粥样硬化动物中的IκB-α与NF-κB关系尚不明确。因此我们的研究拟利用AAV9载体外源性地使IκB-α过表达将其转导入动脉粥样硬化的ApoE-/-小鼠观察其是否可抑制NF-κB的活性，从而抑制NF-κB下游的炎症和趋化因子靶基因的表达，达到抑制动脉粥样硬化形成和稳定斑块的作用。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 实验材料

#### **1.1.1** 实验动物的选择

ApoE-/-小鼠因其形成的斑块分布与人类动脉粥样硬化高发处相似，是目前研究动脉粥样硬化较为可靠的动物模型。普通饮食下20周龄即可形成动脉粥样硬化斑块，高脂饮食下16周龄即可形成明显的动脉粥样硬化斑块。本实验选择SPF级ApoE-/-小鼠，8周龄，雄性，体重18-22g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司（许可证号：SCXK（京）2012-0001），所有实验过程均按照新疆医科大学伦理委员会的要求进行操作。动物饲养环境温度为22-25℃，相对湿度为60%，光-暗周期12h，所有小鼠自由饮水和摄食。高脂饲料（含0.25%胆固醇，21%脂肪）购自北京科澳协力饲料有限公司（许可证号：SCXK（京）2014-0010）。

**1.1.2主要仪器设备和试剂配置方法**

**1.1.2.1仪器设备**

（1）PCR仪（美国BIO-RAD My Cycler）

（2）电泳仪（中国六一牌DYY-6D）

（3）高速冷冻离心机（美国HC-3018R）

（4）酶标仪（美国Thermo Scientific）

（5）荧光定量PCR仪（美国CFX96）

42

（6）手术显微镜（德国ZEISS）

（7）纯水系统（美国Elix系统）

（8）全自动生化分析仪（美国BECKMAN LX20）

（9）液氮罐（中国新疆贝斯明生物技术发展有限公司）

（10）pH计（美国HACH公司）

（11）恒温金属浴（中国杭州博日科技有限公司）

（12）超低温冰箱（美国Thermo Scientific）

（13）病理切片机（德国LEICA RM2016）

（14）冰冻切片机（德国LERICA 3050S）

（15）全自动荧光倒置显微镜（德国ZEISS 3, 000）

##### **1.1.2.2** 实验试剂

（1）小鼠的高脂饲料（中国北京科澳协力公司）

（2）PCR引物和胰蛋白酶（中国上海生工公司）

（3）rAAV9-CMV-eGFP和rAAV9-CMV-IκBα重组腺相关毒载体（美国Virovek

公司）

（4）PCR扩增酶（日本宝生物公司）；琼脂糖（中国武汉博士德生物公司）

（5）反转录试剂盒（美国Thermofisher公司）

（6）实时荧光定量试剂盒（美国Thermofisher公司）

（7）DNA纯化回收试剂盒（中国天根生物有限公司）

（8）免疫组化透明剂（中国南京建成生物工程研究所）

（9）油红O染色液（美国AMRESCO公司）

（10）天狼星红（美国Sigma公司）

（11）苏木素染色液（中国北京中杉金桥）

（12）P65，P-P65，P50, GAPDH一抗（美国CST公司）

（13）IκBα一抗（美国SANTA CRUZ公司）

（14）IL-6，MCP-1，TNF-α，MMP-2，α-SMA，（美国ABCAM公司）

（15）巨噬细胞（MOMA-2）单克隆抗体，（美国AbD Serotec公司）

（16）免疫组化二抗，ft羊抗大鼠IgG/HRP聚合物（中国北京中杉金桥）

（17）免疫组化二抗，ft羊抗兔IgG/HRP聚合物（中国北京中杉金桥）

（18）免疫组化二抗，ft羊抗小鼠IgG/HRP聚合物（中国北京中杉金桥）

（19）荧光二抗DYLIGHTTM 488和DYLIGHTTM 594（美国Thermofisher公司）

（20）浓缩型DAB试剂盒（中国北京中杉金桥）

其他参照第一部分。

43

### **1.2** 实验方法

#### **1.2.1** 实验动物的分组及动脉粥样硬化模型的建立

ApoE-/-小鼠因其形成的斑块分布与人类动脉粥样硬化高发处相似，是目前研究动脉粥样硬化较为可靠的动物模型。根据我们研究第一部分的实验结果提示：ApoE-/-小鼠高脂饮食下16周龄即可形成明显的动脉粥样硬化斑块。本实验使用8周龄，雄性，体重20-22g的ApoE-/-小鼠。实验分为3组，所有小鼠在SPF级环境中适应性喂养1周后，随机将其分为生理盐水对照组，空载重组腺相关病毒组和IκBα病毒干预组，每组25只小鼠，小鼠自由采食，高脂饲料饲养（小鼠高脂饲料由北京科澳协力公司生产，真空包装：饲料配方是20%的脂肪，40%的碳水化合物，0.25%胆固醇），高脂喂养。三组ApoE-/-小鼠分别在喂养12周后，尾静脉注射生理盐水（100µl/只）、rAAV9-CMV-eGFP、rAAV9-CMV-IκBα病毒5.0×10 11vg/只/100µl，干预后三组小鼠继续高脂饮食喂养5周，麻醉处死。小鼠麻醉后，心脏采血取全血约0.8-1.0ml。在ZEISS手术显微镜下小心分离小鼠主动脉，从主动脉弓根部开始向下分离直至髂动脉分叉处，全部离段取出。造模成功的标准是根据血管总体油红染色或者油红病理切片进行判断，剔除没有斑块形成的小鼠。



#### **1.2.2** 标本的留取

**图 2-1** **实验分组示意图**

**Figure** **2-1** Experimental **groups**

在空病毒组，病毒转染2周后和4周后分别取三只小鼠，麻醉小鼠后使小鼠安

乐死后，取标本检测斑块内GFP的表达。其余实验鼠于转染5周后处死，每组取7只进行斑块组织病理学检查。PBS液体灌洗血管，继之灌注4%的多聚甲酸固定液。分离头臂动脉及主动脉根部血管，取材后标本置于4%的多聚甲醛固定液中浸泡固定

44

12小时，OCT包埋，制作6μm冰冻切片，标本每间隔50μm即连续切片20张，分别做苏木素-伊红染色、苦味酸天朗猩红染色、油红O染色。其它相邻切片做免疫组化检测斑块内的平滑肌细胞、巨噬细胞、炎症因子的分布和含量。

#### **1.2.3** 主动脉血管大体油红**O**染色检测脂质斑块损伤

手术显微镜下剥离主动脉周围结缔组织，取主动脉弓至腹主动脉肾动脉分支处，将主动脉用剪刀纵向剪开，平铺整根主动脉于油红O染色液中15min，取出主动脉置于70%酒精中分化5min后，再换一次酒精对组织进行分化，看到正常组织变为乳白色为止，PBS清洗2遍后观察斑块表达情况。计算主动脉斑块面积（主动脉脂质斑块面积与管腔面积的百分比）。使用Image J软件分析计算主动脉斑块面积和斑块损伤区域占管腔的比率（主动脉脂质斑块面积与管腔面积的百分比）。

油红O染色液的配置：

（1）配制油红O染色液原液（浓度为0.5%）：称取0.5g油红O粉剂，量取100mL异丙醇溶解，磁力搅拌器加热搅拌助溶，混匀直至其完全溶解，密封后4℃冰箱保存备用。

（2）配制油红O染色液工作液：组织染色前2h新鲜配制，取油红O原液6mL，加入4mL蒸馏水进行稀释，用滤纸进行过滤待用。

#### **1.2.4** **HE**染色

（1）从冰箱中取出片子室温平衡10至30min。

（2）蒸馏水洗5min。

（3）HE染色：苏木精染色5min，水洗3min，0.5%盐酸酒精分化20sec。自来水洗2min。伊红染色3min。自来水洗1min，洗去多余染液。

（4）脱水：梯度酒精脱水，80%乙醇脱水5sec，95%的乙醇Ⅰ和95%的乙醇Ⅱ各2min，无水乙醇Ⅰ和无水乙醇Ⅱ各3min。

（5）透明：透明剂I、透明剂II各5min。

（6）封片用中性树胶。用吸水纸吸去组织周围的透明剂。在中央滴一小滴树胶，然后用镊子夹取干净盖玻片，仔细加在封固剂上，慢慢压平。或平置凉干后装盒。

（7）观察主动脉血管和斑块的形态结构。使用Image J软件分析计算主动脉斑块损伤区域面积。

#### **1.2.5** 油红**O**染色

具体方法详见第一部分1.24。

#### **1.2.6** 天狼星红染色

###### （1）冰冻切片室温干燥30分钟，蒸馏水冲洗3-5min×3次；

###### （2）0.1%苦味酸天狼猩红染色液浸染1h；

###### （3）流动水冲洗30sec；

45

###### （4）苏木素染色液浸染3-5min；

###### （5）流动水冲洗30sec；

###### （6）1%盐酸酒精分化10sec；

###### （7）流动水冲洗3-5min返蓝；

（8）浓度梯度酒精脱水步骤：70%酒精30sec；80%酒精1min；90%酒精2min；

95%酒精3min；无水乙醇I 4min；无水乙醇II 5min；

（9）环保透明剂使切片透明处理：透明剂I 5min，透明剂II 5min；

（10）封片：中性树胶和盖玻片封固；

（11）图像采集：偏振光显微镜照相。I型胶原纤维显示为橙红色区域，III型胶原纤维显示为绿色区域。Image J图像分析软件分析。

#### **1.2.7** 标本的免疫组化染色

##### **1.2.7.1** **α-SMA actin**免疫组化步骤：

（1）从-80℃冰箱中取出切片室温放置20min；

（2）蒸馏水浸泡20min；

（3）PBS洗5min×3次；

（4）浸入3%H2O2 10min；

（5）PBS洗5min×3次；

（6）5%ft羊血清封闭，室温孵育20min；

（7）甩去血清，滴加a-SMA actin一抗（1: 50），4℃孵育过夜；

（8）PBS洗5min×3次；

（9）滴加辣根过氧化酶标记的二抗，37℃孵育40min；

（10）PBS洗5min×3次；

（11）避光情况下，DAB显色；

（12）流水冲洗；

（13）Harris苏木素染液2min；

（14）流水冲洗30sec；

（15）1%盐酸酒精分化5-10sec；

（16）流水冲洗5min；

（17）70%乙醇30sec；

（18）80%乙醇1min；

（19）90%乙醇2min；

（20）95%乙醇2min；

（21）无水乙醇I 3min；

（22）无水乙醇II 5min；

46

（23）透明剂I 5min；

（24）透明剂II 5min；

（25）滴加中性树胶，盖玻片封片。阳性细胞抗原存在处着色呈棕褐色。

##### **1.2.7.2** **MOMA-2**免疫组化步骤：

（1）从-80℃冰箱中取出切片室温放置20min；

（2）蒸馏水浸泡20min；

（3）PBS洗5min×3次；

（4）浸入3%H2O2 10min；

（5）PBS洗5min×3次；

（6）5%ft羊血清封闭，室温孵育20min；

（7）甩去血清，滴加MOMA-2一抗（1: 50），4℃孵育过夜；

（8）PBS洗5min×3次；

（9）滴加辣根过氧化酶标记的二抗，37℃孵育40min；

（10）PBS洗5min×3次；

（11）避光情况下，DAB显色；

（12）流水冲洗；

（13）Harris苏木素染液2min；

（14）流水冲洗30sec；

（15）1%盐酸酒精分化5-10sec；

（16）流水冲洗5min；

（17）70%乙醇30sec；

（18）80%乙醇1min；

（19）90%乙醇2min；

（20）95%乙醇2min；

（21）无水乙醇I 3min；

（22）无水乙醇II 5min；

（23）透明剂I 5min；

（24）透明剂II 5min；

（25）滴加中性树胶，盖玻片封片。阳性细胞抗原存在处着色呈棕褐色。

##### **1.2.7.3** TNF-α免疫组化步骤：

（1）从-80℃冰箱中取出切片室温放置20min；

（2）蒸馏水浸泡20min；

47

（3）PBS洗5min×3次；

（4）浸入3%H2O2 10min；

（5）PBS洗5min×3次；

（6）5%ft羊血清封闭，室温孵育20min；

（7）甩去血清，滴加TNF-α一抗（1: 100），4℃孵育过夜；

（8）PBS洗5min×3次；

（9）滴加辣根过氧化酶标记的二抗，37℃孵育40min；

（10）PBS洗5min×3次；

（11）避光情况下，DAB显色；

（12）流水冲洗；

（13）Harris苏木素染液2min；

（14）流水冲洗30sec；

（15）1%盐酸酒精分化5-10sec；

（16）流水冲洗5min；

（17）70%乙醇30sec；

（18）80%乙醇1min；

（19）90%乙醇2min；

（20）95%乙醇2min；

（21）无水乙醇I 3min；

（22）无水乙醇II 5min；

（23）透明剂I 5min；

（24）透明剂II 5min；

（25）滴加中性树胶，盖玻片封片。阳性细胞抗原存在处着色呈棕褐色。

##### **1.2.7.4** **IL-6**免疫组化步骤：

（1）从-80℃冰箱中取出切片室温放置20min；

（2）蒸馏水浸泡20min；

（3）PBS洗5min×3次；

（4）浸入3%H2O2 10min；

（5）PBS洗5min×3次；

（6）5%ft羊血清封闭，室温孵育20min；

（7）甩去血清，滴加IL-6一抗（1: 100），4℃孵育过夜；

（8）PBS洗5min×3次；

（9）滴加辣根过氧化酶标记的二抗，37℃孵育40min；

48

（10）PBS洗5min×3次；

（11）避光情况下，DAB显色；

（12）流水冲洗；

（13）Harris苏木素染液3min；

（14）流水冲洗30sec；

（15）1%盐酸酒精分化5-10sec；

（16）流水冲洗5min；

（17）70%乙醇30sec；

（18）80%乙醇1min；

（19）90%乙醇2min；

（20）95%乙醇2min；

（21）无水乙醇I 3min；

（22）无水乙醇II 5min；

（23）透明剂I 5min；

（24）透明剂II 5min；

（25）滴加中性树胶，盖玻片封片。阳性细胞抗原存在处着色呈棕褐色。

##### **1.2.7.5** **MCP-1**免疫组化步骤：

（1）从-80℃冰箱中取出切片室温放置20min；

（2）蒸馏水浸泡20min；

（3）PBS洗5min×3次；

（4）浸入3%H2O2 10min；

（5）PBS洗5min×3次；

（6）5%ft羊血清封闭，室温孵育20min；

（7）甩去血清，滴加MCP-1一抗（1: 200），4℃孵育过夜；

（8）PBS洗5min×3次；

（9）滴加辣根过氧化酶标记的二抗，37℃孵育40min；

（10）PBS洗5min×3次；

（11）避光情况下，DAB显色；

（12）流水冲洗；

（13）Harris苏木素染液3min；

（14）流水冲洗30sec；

（15）1%盐酸酒精分化5-10sec；

（16）流水冲洗5min；

49

（17）70%乙醇30sec；

（18）80%乙醇1min；

（19）90%乙醇2min；

（20）95%乙醇2min；

（21）无水乙醇I 3min；

（22）无水乙醇II 5min；

（23）透明剂I 5min；

（24）透明剂II 5min；

（25）滴加中性树胶，盖玻片封片。阳性细胞抗原存在处着色呈棕褐色。

##### **1.2.7.6** **MMP-2**免疫组化步骤：

（1）从-80℃冰箱中取出切片室温放置20min；

（2）蒸馏水浸泡20min；

（3）PBS洗5min×3次；

（4）浸入3%H2O2 10min；

（5）PBS洗5min×3次；

（6）5%ft羊血清封闭，室温孵育20min；

（7）甩去血清，滴加MMP-2一抗（1: 100），4℃孵育过夜；

（8）PBS洗5min×3次；

（9）滴加辣根过氧化酶标记的二抗，37℃孵育40min；

（10）PBS洗5min×3次；

（11）避光情况下，DAB显色；

（12）流水冲洗；

（13）Harris苏木素染液3min；

（14）流水冲洗30sec；

（15）1%盐酸酒精分化5-10sec；

（16）流水冲洗5min；

（17）70%乙醇30sec；

（18）80%乙醇1min；

（19）90%乙醇2min；

（20）95%乙醇2min；

（21）无水乙醇I 3min；

（22）无水乙醇II 5min；

（23）透明剂I 5min；

50

（24）透明剂II 5min；

（25）滴加中性树胶，盖玻片封片。阳性细胞抗原存在处着色呈棕褐色。

#### **1.2.8** 组织病理学测量

根据每个标本连续切片的组织学染色结果，选择斑块面积最大的切片做形态学分析。使用图像分析软件（Image J软件）测量，每个切片均测量3次，取其平均值计算，所有测量均在相同的条件下进行。计算参数如下：

胶原含量：天狼猩红阳性染色面积，及阳性染色面积占斑块面积的比例；脂质含量：油红O阳性染色面积，及阳性染色面积占斑块面积的比例；

平滑肌细胞含量：α-SMA actin免疫组化阳性染色面积，及阳性染色面积占斑块面积的比例；

巨噬细胞含量：MOMA-2免疫组化阳性染色面积，及阳性染色面积占斑块面积的比例；

易损指数：易损指数=（巨噬细胞含量+脂质含量）/（胶原含量+平滑肌细胞含量），各变量分别以阳性染色面积占总斑块面积的百分比表示。

#### **1.2.9** 血脂指标检测

心脏穿刺采血得到0.8-1.0ml 全血放置半小时后，析出血清，4000 r/min 离心

10min，可以得到300-400µl的血清，将血清用移液枪吸出，放在-80℃超低温冰箱保存。全自动生化仪检测小鼠血清TC、TG、HDL-C、LDL-C的水平。

#### **1.2.10** 实时荧光定量法测定小鼠主动脉血管炎症因子**mRNA**表达

##### **1.2.10.1** 组织总**RNA**提取

实验原理是通过变性剂破碎组织细胞，用氯仿等有机溶剂抽提RNA，再经过沉淀，洗涤，晾干，最后溶解得到提纯的总RNA。实验中需要用到的试剂有无水乙醇

（DEPC水配制成75%乙醇）、氯仿、异丙醇、Trizol、DEPC水；用到的耗材有各种大小的枪头和EP管、研钵。提取高纯度RNA的关键是RNA提取过程中，RNA对于RNAase酶是非常敏感的，所以枪头、EP管、研钵都要做RNAase酶的灭活处理，尽可能地避免RNAase酶污染降解RNA. RNase酶的灭活的操作步骤是先用DEPC水浸泡枪头和EP管，过夜后烘干，高压消毒烘干。研钵的外层用锡箔纸包住，用时打开。也可购买RNase-free的EP管和枪头等耗材。

（1）高温干烤过的研钵加入液氮使其遇冷，取出标本放入研钵中，按顺序做好标记，充分研磨至粉末。

（2）为了避免有毒试剂挥发对环境的危害和保护样品，提取RNA的工作在通风橱中进行操作。取约50mg液氮中冷冻的组织，放在预冷的研钵中，加入1ml Trizol，研磨至水样，使组织细胞充分裂解，吸取全部约1ml Trizol混合液，转移到无RNA

51

酶的EP管中，混匀，室温放置5min。

（3）在1ml Trizol混合液中加入0.2ml的氯仿，盖紧EP管，剧烈摇荡15秒钟，提取RNA，随后室温静置5min。

（4）高速离心机4℃条件下，13, 000 r/min离心10min，取上层水相于一新的EP

管中，洗去蛋白和杂质，提纯RNA。

（5）新离心管中加入0.5ml异丙醇，室温放置10min。4℃，13, 000 r/min离心

10min，弃去上清液，提纯RNA。

（6）加入1ml 75%的乙醇清洗，4℃条件下13, 000 r/min, 5min离心弃去上清，重复操作一次，洗涤两次RNA。弃去上清液，室温或真空干燥5-10min。

（7）加适量DEPC水溶解EP管底的RNA。

（8）取1μl RNA进行定量及纯度的鉴定，取5μl RNA进行电泳检测是否降解。

（9）在EP管中加入DEPC H2O 20μL，轻轻吹打几次，使RNA完全溶解，获得的RNA溶液保存于-80℃待用。

（10）提取的总RNA，取2μL的总RNA溶液，和2×loading buffer磷酸缓冲液混匀，在新制备的RNA溶液中加了核酸染料，随后在1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳检测。正常情况下，28S rRNA和18S rRNA核糖体的条带亮而着色重，而且这两个条带的亮度为2: 1时，提示RNA没有发生降解，有时在溴酚蓝前面还有一条较浅的5S条带。将每管样品取2µl用于微量核酸蛋白检测仪检测RNA浓度，A260/A280吸光度比值在1.8-2.0之间，说明总RNA提取比较成功，RNA的纯度及浓度较好。

##### **1.2.10.2** 逆转录反应合成**cDNA**

（1）按照Thermo Scientific公司的RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit的说明书，向200ul的RNasefree PCR管中加入下表中的成分按下表配置总体系为20ul的反转录体系，并充分混匀各个成分。

|  |  |
| --- | --- |
| Reaction Component | Volume(ul) |
| Total RNA  RNase-Free ddH2O Oligo Primer 5×Reaction Buffer | 定量后体积补足至 11ul 1  4 |
| RiboLock RNase Inhibitor | 1 |
| 10 mM dNTP Mix RevertAid M-MuLV RT  Total volume | 2  1  20 |

（2）将配置好的反转录体系放入PCR仪中，按42℃60min，72℃5min设置反

52

应条件，反转录结束后的cDNA保存于-20℃备用。

##### **1.2.10.3** 实时荧光定量**PCR**标准品的建立

从上述组织中提取的RNA，并以反转录的cDNA为模板，分别以IκBα、TNF-α、IL-6、MCP-1、MMP-2和GAPDH为引物，进行普通PCR，上述因子的引物如表2-1。

IκBα扩增DNA片段长度113bp. TNF-α扩增DNA片段长度103bp. IL-6扩增长度105bp. MCP-1扩增DNA片段长度101bp. MMP-2扩增DNA片段长度105bp。

GAPDH扩增DNA片段长度123bp。

**表 2-1** PCR**反应的引物序列**

**Table** **2-1** Sequences of primers for **PCR**

| Genes | Forward | Reverse |
| --- | --- | --- |
| GAPDH | 5′-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3′ | 5′-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3′ |
| IκBα | 5′-AGCATCTCCACTCCGTCCT-3′ | 5′-AGCACCCAAAGTCACCAAGT-3′ |
| TNF-α | 5′-TCTCATGCACCACCATCAAG-3′ | 5′-GAGGCAACCTGACCACTCTC-3′ |
| IL-6 | 5′-CGGAGAGGAGACTTCACAGAG-3′ | 5′-CATTTCCACGATTTCCCAGA-3′ |
| MCP-1 | 5′-CCACTCACCTGCTGCTACTC-3′ | 5′-ACAGCTTCTTTGGGACACCT-3′ |
| MMP-2 | 5′-GCCAAGGTGGAAATCAGAGA-3′ | 5′-GTTGAAGGAAACGAGCGAAG-3′ |

扩增标准品DNA，进行普通PCR，反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| Premix Ex Taq | 10.0µl |
| Forward primer | 0.5µl |
| Reverse primer | 0.5µl |
| CDNA Template | 2.0µl |
| ddH2O | 7.0µl |

将以上物质轻轻混匀后加入灭菌去离子水补到总体积为20µl后放入200µl PCR

管中，离心15秒，置于PCR仪中，反应条件为：

94℃预变性3min；94℃变性30 sec，退火温度，72℃延伸1min，共反应35个循环，72℃延伸5min，-20℃保存。

##### **1.2.10.4** 琼脂糖电泳分析

（1）制胶：取0.4克琼脂糖粉，加入20ml干净无菌的1×TBE溶液，微波炉内高温加热至沸腾，摇匀，待凝胶温度降至约60℃左右时加入2µl核酸染料，轻柔、缓慢摇匀玻璃皿避免气泡产生，将凝胶倒入插好加样孔梳子的制胶盒中，如有气泡及时用枪头将其移出。倒好的凝胶水平放在水平台面上，室温下静置30min待其完

53

全凝固后，轻轻抽走齿梳。

（2）上样：将制好的凝胶放在电泳槽中，加样孔端朝向负极，倒入1×TBE电泳缓冲液，液面略淹没、高出凝胶，将各组DNA样品以每孔6µl的量加入到凝胶加样孔中，加入8µl DNA Marker于加样孔中。

（3）电泳：将电压调至120mV，电泳时间约25-30min，当上样缓冲液超过凝胶2/3后关闭电泳槽开关。

（4）拍照并分析结果：关闭电泳仪从电泳槽中取出凝胶，置于凝胶成像仪中黑板上观察结果，以DL 500bp大小的DNA Marker作为参照，判断所扩增片段分子量大，拍照并图像保存至电脑中。将符合实验所需的凝胶条带切胶回收并纯化，用于目的基因标准曲线的制备。

（5）扩增出的DNA回收后的纯化，操作步骤依据DNA纯化回收试剂盒（离心柱型）说明书，进行操作。对从凝胶中回收的DNA样品进行定量。

##### **1.2.10.5** 实时荧光定量**PCR**实验

收集纯化后的DNA样品进行定量，按照8倍梯度稀释的方法，稀释成8管，每管各取2µl DNA作为模板，IκBα、IL-6、TNF-α、MCP-1、MMP-2和GAPDH为引物进行实时荧光定量PCR，反应体系和反应条件如下：

反应体系：

2×SYBR Green PCR premix 10µl

Forward primer 0.5µl

Reverse primer 0.5µl

DNA Template 2.0µl

ddH2O 13.0µl

将以上总物质体积20µl放入200µl PCR管中，离心15秒，以上操作均在冰上进行。反应条件：

**表 2-2** **实时定量PCR反应条件**

**Table** **2-2** Real-time fluorescence quantitative PCR reaction **conditions**

|  | 时间和温度/Times and Temperatures | | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 仪器型号  Thermal Cycler | 起始步骤  Initial Steps | 每 35 个循环/Each of 35 cycles | | 熔解曲线步骤 |
|  | 熔解/Melt | 退火/延伸 Anneal/Extend |
| ABI 7500 FAST 型  荧光定量 PCR 仪 | 保持/HOLD | 循环/CYCLE | |
| 3min 94℃ | 30 sec 94℃ | 30 sec 60℃ |  |

54

完成上述步骤后，将加好样样品的目的基因和管家基因放在荧光定量PCR仪中进行实时定量聚合酶链反应。对同一个样品，同时进行实时荧光定量聚合酶链反应扩增目的基因和管家基因。设定电压80伏特，注意扩增的PCR产物是否单一。如图2-2所示，目的基因的扩增和溶解曲线情况如下，左图显示的是目的基因的扩增曲线，右图显示的是目的基因的熔解峰。在实时定量PCR反应中，质量控制至关重要，其中熔解曲线代表了选择引物的特异性。如果熔解曲线都是单一的峰，并且TM值在80-90之间，就表示扩增基因的引物设计合理，无非特异性扩增和生成引物二聚体。各样品扩增曲线的拐点清楚，扩增曲线相互平行，基线平无上扬现象，低浓度样本指数期明显。标准品的C*t*值的间隔均匀，10倍稀释的两个标准品之间相差3.3个C*t*值，代表各管的扩增效率相近，扩增过程质控良好。



**图2-2内参基因GAPDH, 目的基因IκBα、IL-6、TNF-α、MCP-1、MMP-2的荧光扩增情况（*n*=6）Figure 2-2** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction test was **used to assess mRNA expression of endogenous control gene Beta-actin、objective gene IκBα，IL-6,**

**TNF-α，MCP-1，MMP-2(*n*=6)**

55

##### **1.2.10.6** **RT-qPCR**结果的测量和计算

通过相对定量公式：2-△△Ct，△C*t*=Ct（目的基因）-Ct（GAPDH），△△C*t*=△

Ct（实验组）-△Ct（对照组），计算目的基因的相对表达量，统计分析。

#### **1.2.11** **Western blot**检测血管组织中**NF-κB**信号通路中相关蛋白表达

本研究应用WB蛋白免疫印迹检测血管组织中，IκBα、P-P65、P65、P50炎症因子的表达。同时检测GAPDH的表达量并作为内参对照用来校正上样可能带来的误差，将该方法用于检测对照组和实验组的蛋白表达，从而使得结果更加准确。

###### （1）从组织中提取实验所需的检测指标总蛋白：取约30mg的组织，用干净的研钵加液氮研磨组织。150µl/30mg细胞裂解液匀浆裂解。裂解30min后，14000 r/min离心5min，取上清液分装-80℃保存。

###### （2）运用BCA比色法检测样品中的蛋白浓度

蛋白样品稀释液和标准品25µl分别加入每孔，然后加入显色液200μL（A: B=50: 1），放置于37℃温箱中30min。转移过程需轻柔、果断，防止产生气泡。酶标仪测量其光密度值。计算蛋白样品的浓度和上样的体积。

（3）SDS-聚丙烯酸胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

具体步骤见第一章。相关蛋白分子量的大小：IκBα为39kDa, P-P65为65kDa，

P65为65kDa, P50为50kDa, GAPDH为37kDa。

#### **1.2.12** 免疫荧光法测定主动脉血管**P65**蛋白的表达

免疫荧光方法检测冰冻切片中血管斑块组织的NF-κB中P65的蛋白表达。P65

（CST, USA）1∶100倍比稀释。二抗second antibody(thermo, USA) 1∶75倍比稀释。常规冰冻切片，取出放置30分钟，PBS洗3次，3%H2O2室温下静置10min，封闭液封闭半小时，滴加浓度为1∶100的一抗，阴性对照滴加PBS，4℃过夜，滴加浓度为1∶75的二抗，DAPI核染色。

### **1.3** 统计分析

采用GraphPad Prism 6.0软件进行作图。采用SPSS 22.0统计软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差（*x**s*）表示，多组均数的比较采用两因素方差分析（General Linear Model-Univariate）或单因素方差分析（Oneway ANOVA），两两组间比较视方差齐性检验（以0.05作为检验水准进行误差方差的齐性Levene's检验）结果进行不同的选择，当方差齐时，选择LSD检验，当方差不齐时，选择秩和检验。以*P*＜0.05为差异有统计学意义

56

## **2** 结果

### **2.1** IκBα过表达对**ApoE-/-**小鼠动脉粥样硬化斑块进展的影响

#### **2.1.1** IκBα过表达对**ApoE-/-**小鼠体重及血脂的影响

转染病毒5 周后，分别测定生理盐水对照组小鼠、rAAV9-GFP 组小鼠、

rAAV9-IκBα小鼠组的体重及血脂四项水平的变化。结果显示：三组小鼠间的BW、

TC、TG、HDL-C、LDL-C进行比较，均无明显差异（表2-3, *P*＞0.05）结果表明转导IκBα基因后未对小鼠的体重造成影响，对AS小鼠的血脂水平也无明显影响。

**表 2-3** **转染病毒5周后三组血脂比较（***x**s***）**

| Table 2-3 Transfectio | N of virus after | 5 weeks of bod | Y weight and li | Pids comparis | On( x  s) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 分组 | BW  （g） | TC  （mmol/L） | TG  （mmol/L） | HDL-C  （mmol/L） | LDL-C  （mmol/L） |
| 生理盐水对照组 | 30.5±3.1 | 20.32±2.41 | 1.54±0.10 | 1.26±0.15 | 6.73±0.36 |
| rAAV9-eGFP 组 | 29.8±2.2 | 19.86±1.97 | 1.49±0.09 | 1.12±0.10 | 6.50±0.67 |
| rAAV9-IκBα 组 | 30.9±2.8 | 20.64±1.46 | 1.52±0.14 | 1.29±0.18 | 6.47±0.22 |

\*三组小鼠间的体重和血脂四项比较无明显差异，*P*＞0.05

\* Compared the three groups of mice with bodyweight and lipids there was no difference，

*P*＞0.05

#### **2.1.2** IκBα在**ApoE-/-**小鼠主动脉粥样斑块的表达

将AAV9-eGFP和AAV9-IκBα以5.0×10 11vg/只的剂量转导于动脉粥样硬化的

ApoE-/-小鼠，分别于转导5周后收集主动脉。Western blot和RT-PCR定量检测蛋白

IκBα在主动脉血管中的表达变化。Western blot结果显示，AAV9-IκBα病毒组，采用AAV9-IκBα转染后，IκBα在蛋白水平表达较生理盐水对照组和AAV9-GFP空载病毒组明显上调，差异有统计学意义（*P*＜0.05, 见图2-3, A, B）。提示尾静脉转染IκBα在蛋白水平水平可明显上调主动脉斑块内的IκBα水平。

RT-PCR检测斑块内IκBα在mRNA水平的表达情况。IκBα在生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组和AAV9-IκBα病毒组三组含量的百分比分别为1.01±0.08; 1.03±0.18; 4.64±0.24；AAV9-IκBα病毒组斑块内IκBα基因的mRNA水平显著高于生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组（*P*＜0.05, 见图2-3, C）。

总之，尾静脉转染IκBα无论是蛋白水平还是基因水平均可明显上调主动脉斑块内的IκBα水平。

57



**图 2-3** Westernblot**和RT-PCR检测三组小鼠斑块内IκBα蛋白和mRNA水平的表达**

（*n*=5, *x**s*）；\**P*＜0.01vs生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组

**Figure** **2-3** Westernblot and **RT-PCR to dectect the IκBαprotein and mRNA expression on the plaque in 3 groups of mice**

(*n*=5, *x**s*) \**P*＜0.01 vs Con group or AAV9-GFP group.

#### **2.1.3** IκBα过表达对**ApoE-/-**小鼠动脉粥样斑块的影响

大体血管油红O染色后，可见管腔狭窄明显，大量脂质堆积于管壁，脂质在血管内皮沉积，脂质斑块被染为红色。脂质斑块在生理盐水对照组、AAV9-GFP空载病毒组、AAV9-IκBα病毒组，三组小鼠间血管内皮的沉积分别为34.4±4.52、32.4±4.16、33.8±4.93（%）（见图2-4），三组间无明显差异（*P*＞0.05）。结果提示IκBα病毒干预组较其他组并未减少主动脉大体脂质斑块面积。

58



**图 2-4** **小鼠主动脉大体斑块损伤**

A，大体油红O染色；B，主动脉表面损伤面积比率（*n*=5, *x**s*）注:三组之间对比无明显差异，*P*＞0.05

**Figure** **2-4** Surface of whole aortas **lesion**

A, surface of lesion stained by Oil-red O; B, the aortic surface damage area ratio(%)(*n*=5, *x**s*) Notes: Compared with the three groups, there was no significant difference between them, *P*＞0.05

主动脉切片HE染色后，可见明显动脉粥样硬化斑块，斑块表层有瓷白色的纤维帽，斑块内部呈黄色粥样，部分形成斑块的血管内膜和中膜区域聚集了大量的泡沫细胞、还存在泡沫细胞和坏死崩解物质混合构成的脂质核心，部分斑块内有胆固醇结晶，在脱水透明的过程中由于胆固醇被溶解所以呈针形空隙。斑块底部及周围肉芽组织呈不同程度增生，周围有少量的泡沫细胞，少量淋巴细胞浸润。斑块底部的中膜平滑肌细胞增生情况不同，在斑块损伤较重的区域平滑肌细胞呈不同程度的萎缩，部分迁移至内膜。生理盐水对照组、AAV9-GFP空载病毒组、AAV9-IκBα病毒组，三组小鼠间粥样斑块病损面积分别为0.157±0.052、0.17±0.038、0.164±0.043（mm2）

（见图2-5），三组间无明显差异（*P*＞0.05）。结果提示IκBα病毒干预组较其他组并未减少粥样斑块损伤面积。

59



**图 2-5** **小鼠粥样斑块损伤面积**

A，头臂动脉HE染色（×200）；B，HE染色定量分析图（*n*=7, *x**s*）注：三组之间对比无明显差异，*P*＞0.05

**Figure** **2-5** Mice atheromatous plaque damage **area**

A, HE for brachiocephalic artery staining (×200); B, HE stainging quantify (*n*=7, *x**s*) Notes: compared with the three groups, there was no significant difference between them, *P*＞0.05

### **2.2** IκBα过表达对**ApoE-/-**小鼠动脉粥样硬化斑块稳定性的影响

主动脉头臂动脉切片油红O染色后，可见主动脉内膜增厚，脂质沉积于管壁内，脂质斑块被染为红色，脂质斑块在生理盐水对照组、AAV9-GFP空载病毒组、AAV9-IκBα病毒组，三组小鼠间血管内皮的沉积分别为15.3±2.57、15.8±2.15、14.9±2.20（%）（见图2-6A, 2-6B），三组间无明显差异（*P*＞0.05）。结果提示IκBα病毒干预组较其他组并未减少局部粥样斑块脂质面积。

天狼猩红红染色检测斑块内胶原成分，生理盐水对照组、AAV9-GFP空载病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组胶原含量的百分比分别为9.50±2.21; 9.31±2.62; 16.43±1.83；AAV9-IκBα病毒组较其他两组胶原含量显著增加（*P*＜0.01）（见图2-6A，

60

2-6B)。

MOMA-2免疫组化检测斑块内巨噬细胞，生理盐水对照组、AAV9-GFP空载病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组巨噬细胞含量的百分比分别为27.91±3.32; 28.5±3. 21; 17.84±3.35；AAV9-IκBα 病毒组较其他两组巨噬胞含量显著减少（（*P*＜0.01）（见图

2-6A，2-6B)。

SMA免疫组化检测斑块内平滑肌细胞，生理盐水对照组、AAV9-GFP空载病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组平滑肌细胞含量的百分比分别为9.32±2.36；9.90±2.42; 16.83±2.21；AAV9-IκBα病毒组较其他两组平滑肌细胞含量显著增加（*P*＜0.01）（见图2-6A, 2-6B）。

易损指数=（巨噬细胞含量+脂质含量）/（胶原含量+平滑肌细胞含量），生理盐水对照组、AAV9-GFP空载病毒组和AAV9-IκBα病毒组三组易损指数分别为1.24±0.20; 1.25±0.18; 0.54±0.14；AAV9-IκBα病毒组较对生理盐水对照组和AAV9-GFP空病毒组易损指数显著降低（*P*＜0.01）（见图2-6C）。



61



**图 2-6** IκBα**过表达对小鼠斑块成分和稳定性的影响**

A，3组斑块巨噬细胞、平滑肌细胞、胶原及脂质染色结果（×400）；

B，对图A所代表结果的统计分析（*n*=7, *x**s*）；\**P*＜0.01vs生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组；C，3组斑块易损指数的统计分析结果（*n*=7, *x**s*）；\* *P*＜0.01vs生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组。

**Figure 2-6** Effects of IκBαover expression on the plaque composition and vulnerability **index in 3 groups of mice.**

A, Staining for the carotid plaques, macrophages, lipids, collagen, SMCs（×400）;

B, Quantitative analysis of the carotid plaque composition in A (*n*=7, *x**s*); \**P*＜0.01 vs Con group

or AAV9-GFP group. C, Vulnerability index in 3 groups (*n*=7, *x**s*); \**P*＜0.01 vs Con group or AAV9-GFP group.

### **2.3** IκBα过表达对**ApoE-/-**小鼠动脉粥样硬化斑块炎症因子的影响

免疫组化检测斑块内IL-6、TNF-α、MCP-1和MMP-2阳性面积占斑块总面积的百分比。IL-6在生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组含量的百分比分别为22.91±3.32; 22.5±3.21; 10.84±2.35；TNF-α在生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组含量的百分比分别为12.30±2.57; 12.80±2.15; 6.90±2.20；MCP-1在生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组含量的百分比分别为11.50±2.21; 11.31±2.62; 4.43±1.23；MMP-2在生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组含量的百分比分别为10.32±1.36; 10.90±1.42; 3.83±0.80（见图2-7A, 2-7B）。

62





**图 2-7** IκBα**过表达对小鼠斑块炎症因子的影响**

A，3组斑块IL-6、TNF-α、MCP-1和MMP-2免疫组化染色结果（×200）；B，对图A所代表结果的统计分析（*n*=7, *x**s*）；\**P*＜0.01vs生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组。

**Figure** **2-7** Effects of IκBαover expression on the plaque in 3 groups of **mice.**

A, IHC staining for the carotid plaques, IL-6, TNF-α，MCP-1, and MMP-2（×200）; B, Quantitative analysis of the carotid plaque composition in A (*n*=7, *x**s*); \**P*＜0.01 vs Con group or AAV9-GFP group.

63

RT-PCR检测斑块内IL-6、TNF-α、MCP-1和MMP-2在mRNA水平的表达。IL-6在生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组的mRNA水平分别为1.01±0.03; 1.05±0.03: 0.31±0.02；TNF-α在生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组的mRNA水平分别为1.02±0.04; 1.03±0.04: 0.45±0.03；MCP-1在生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组的mRNA水平分别为1.02±0.03; 1.02±0.05: 0.49±0.01；MMP-2在生理盐水空白组、AAV9-GFP空病毒组和AAV9-IκBα病毒组，三组的mRNA水平分别为1.03土0.05；1.03±0.02; 0.48±0.02（见图2-8）。

总之，ApoE-/-小鼠尾静脉转染IκBα后，无论是在蛋白水平还是mRNA水平，较生理盐水对照组和AAV9-GFP空病毒组可显著降低斑块内炎症因子的表达，提示

IκBα过表达后可抑制斑块炎症因子，减缓动脉粥样硬化进程。



**图 2-8** **RT-PCR检测3组小鼠斑块内IL-6、TNF-α、MCP-1和MMP-2 mRNA水平的表达**

（*n*=5, *x**s*）；\**P*＜0.01vs生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组。

**Figure** **2-8** **RT-PCR to dectect the IL-6, TNF-α, MCP-1, and MMP-2 mRNA expression on the plaque in 3 groups of mice**

(*n*=5, *x**s* ), \**P*＜0.01 vs Con group or AAV9-GFP group.

### 2.4 IκBα过表达对**ApoE-/-**小鼠主动脉**NF-κB**信号通路蛋白的影响将AAV9-eGFP和AAV9-IκBα以5.0×10 11vg/只的剂量转导于动脉粥样硬化的ApoE-/-小鼠，转导5周后处死小鼠收集主动脉。Western blot定量检测NF-κB信号通

64

路关键蛋白IκBα、P-P65、P65、P50在主动脉血管中的表达变化。Western blot结果显示，生理盐水对照组和AAV9-GFP空载病毒组和AAV9-IκBα病毒组三组间P65、

P50表达水平无明显差异，而采用AAV9-IκBα病毒转染后，AAV9-IκBα病毒组蛋白

IκBα表达水平较生理盐水对照组和AAV9-GFP空载病毒组明显上调，而蛋白P-P65表达较其他两组明显下调，差异有统计学意义（*P*＜0.05, 见图2-9）。提示在AS病变中NF-κB信号通路是激活的，AAV9携带的IκBα基因导入后，IκBα病毒干预组

IκBα蛋白表达显著上调，上调后可以干预NF-κB信号通路相关蛋白P-P65的活化，进而起到抑制NF-κB信号通路激活的作用，一定程度上延缓AS的病程进展。



**图 2-9** **Western Blot检测NF-κB信号通路相关蛋白表达水平**

（*n*=5, *x**s*）；\**P*＜0.05 vs生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组。

**Figure** **2-9** Western blot detected the key proteins expression of NF-κB signaling **pathway.**

(*N*=5 in each group), \**P*＜0.05 vs Con group or AAV9-GFP group.

### **2.5** IκBα过表达对**ApoE-/-**小鼠粥样硬化斑块**P65**免疫荧光的影响

正常情况下，血管内膜和中膜中的NF-κB P65核蛋白的表达很低，高脂饮食激活了NF-κB信号通路，随着高脂饮食时间的延长，NF-κB P65核蛋白在小鼠主动脉血管斑块的表达逐渐增加。在生理盐水对照组、AAV9-GFP空载病毒组、AAV9-IκBα病毒组三组小鼠斑块内进行P65免疫荧光，检测P65核转位的情况，三组小鼠P65核转位的百分比分别为：8.62±1.74; 8.36±1.57; 5.31±1.34。采用AAV9-IκBα病毒转染后，AAV9-IκBα病毒组蛋白P65免疫荧光核转位水平较生理盐水对照组和AAV9-GFP 空载病毒组明显下调，差异有统计学意义（*P*＜0.05, 见图2-10）。提示

65

在AS病变中NF-κB信号通路是激活的，AAV9携带的IκBα基因导入后，IκBα病毒干预组可显著抑制P65蛋白的核转位，进而起到抑制NF-κB信号通路下游炎症靶基因激活的作用，一定程度上延缓AS的病程进展。



**图2-10** **免疫荧光检测P65蛋白核转位情况**

（*n*=5, *x**s*）；\**P*＜0.05 vs生理盐水对照组、AAV9-GFP空病毒组。

**Figure** **2-10** Immunofluorescencedetected the P65 protein translocated into cell **nuclear.**

(*n*=5, *x**s* ), \**P*＜0.05 vs Con group or AAV9-GFP group.

66

**.3****讨论**

IκBα基因过表达，可以改变ApoE-/-小鼠AS斑块成分比例，降低斑块内炎症反应，提示IκBα有稳定斑块，有延缓AS的病程发展作用。ApoE-/-小鼠动脉粥样硬的疾病进程中NF-κB信号通路过度激活，IκBα基因在形成AS的ApoE-/-小鼠过表达后，靶向抑制小鼠主动脉斑块NF-κB信号通路的激活，抑制P65蛋白的核转位，从而抑制了NF-κB信号通路下游的炎性靶基因的表达如TNF-α，IL-6及趋化因子MCP-1和金属基质蛋白酶MMP-2的表达，抑制动脉粥样硬化的进展，为基因靶向转导防治动脉粥样硬化供了理论依据。我们具体的研究假说示意图如下：



**图 2-11** **研究假说**

**Figure** **2-11** Research **hypothesis**

### **3.1** 动脉粥样硬化的病理生理基础

动脉粥样硬化是一种以纤维组织和脂质成分在内皮下堆积为特征的慢性炎性疾病，在美国是死亡的一个首要原因[148]。目前公认炎症反应在动脉粥样硬化的生化级联中起着一个非常重要的作用（从脂肪条纹的形成到斑块破裂血栓形成）[149]，且导致生物力学因素（例如振荡剪切应力，周向应变）异常，导致内皮细胞（EC）功能障碍[150]。大家认识到在动脉粥样硬化斑块的微环境中，细胞因子、趋化因子、粘附分子、胶原蛋白、弹性蛋白和酶等混合物是由不同类型的细胞分泌的。这种损伤通常是动脉壁内皮细胞或平滑肌细胞（SMC）长期的低水平损伤，在血管内皮功能障

67

碍时显示出来[151]。

#### **3.1.1** 内皮功能受损、炎症和脂质条纹形成

动脉粥样硬化的发生起始为大动脉的内皮细胞下脂质条纹层的形成，这个阶段往往在生命阶段的第一个十年。根据损伤反应假说，内皮具有三个动脉粥样硬化相关的重要功能。首先是维持血管管腔和组织间隙之间选择性渗透屏障的能力，其次是对白细胞提供非粘附的表面的能力，最后是修饰和运输脂蛋白进入血管壁的能力

[152]. 内皮损伤是形成动脉粥样硬化的最根本基础[153]。致损伤的物质引起的炎症反

应，最终通过细胞凋亡导致内皮细胞死亡[154]。

#### **3.1.2** 脂质堆积

脂质堆积是动脉粥样硬化的首要表现，认为是引起血管损伤的反应，其参与血管损伤发生的机制描述颇为充分[155]。首先，功能性内皮细胞失去选择性屏障的功能

[156]. 虽然内弹性膜渗透性高压仍相对不变，但是在内膜可以观察到大分子堆积。紧

接着第二步，内皮细胞功能障碍损伤了脂蛋白受体表达能够内化和修饰脂蛋白的能力，如对氧化型低密度脂蛋白（oxLDL）的清除，oxLDL通过这种损伤激活内皮细胞，引发炎症的级联反应[156, 157]。最后，为了响应血管损伤，脂质被转运到内膜下组织，在那里由平滑肌细胞和巨噬细胞通过清道夫受体摄取脂蛋白（例如氧化型低密度脂蛋白）进行存储[158]。因为这些受体不下调，巨噬细胞继续摄取脂质造成脂质堆积，最终这些细胞成为泡沫细胞[159, 160]。

#### **3.1.3** 白细胞趋化和活化的机制

通常情况下，内皮细胞有抗流动血液中白细胞粘附的作用。单核白细胞已经被确认存在于动脉粥样硬化病变的不同阶段[161-163]。单核细胞和T淋巴细胞粘附到内皮细胞层改变动脉腔的表面[164]。他们沿着血管腔的表面传播/迁移，通过血管内皮的渗透，进入内膜下空间。趋化因子的介导过程使得炎性细胞可以到受损伤区域的

“家”[165]，而粘附分子为细胞从血管腔到血管壁的迁移提供了必要的接触和连接[166]。随后，氧化性低密度脂蛋白诱导内皮细胞释放粘附分子，如血管细胞粘附分子-1

（VCAM-1），并增加趋化分子的表达，如单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)[167, 168]。血液单核细胞粘附到内皮细胞迁移到内皮下的空间，需要许多趋化因子的参与[169]。在动脉内膜，单核细胞分化成的巨噬细胞表达清道夫受体可摄取许多修饰的脂蛋白颗粒。巨噬细胞的清道夫受体（CD36, SR-A）摄取氧化低密度脂蛋白进而导致泡沫细胞形成[170]。

选择素和免疫球蛋白是动脉粥样硬化中介导炎症的粘附分子。选择素，包括P-选择素，E-选择素和L-选择素为白细胞提供松散的附着，允许它们沿血管腔表面滚动[171, 172]。因损伤而增加的免疫球蛋白允许白细胞牢固地粘附于内皮，渗透进入血管壁，这其中包括细胞内粘附分子-1（VCAM-1）等[173]。

68

在动脉内膜，单核细胞获得巨噬细胞的形态特征，发生了一系列的变化，导致形成泡沫细胞，最终死亡，造成了脂质条纹形成和炎症反应[170]。

#### **3.1.4** 炎症和斑块进展（斑块破裂机制）

动脉斑块的平滑肌增生，形成纤维帽后，伴随动脉粥样硬化的进展变得膨松，动脉管腔变窄，直到它阻碍了血流表现出一些临床疾病的特点，如急性心肌梗死（MI）或不稳定型心绞痛[174]。富含循环促凝蛋白的纤维帽通常将富含脂核的血栓与血液隔绝开来。它的破裂促使凝血因子与组织因子接触是病灶脂质核心中主要的促血栓形成因素[4, 174]。浅表糜烂或内皮细胞从覆盖的单层内膜脱落，有限的内皮细胞脱落可形成所谓的“巢”形成血小板血栓[159, 175]。在粥样硬化斑块中微血管破裂和新的微血管形成通常为突发的斑块进展提供了一个额外的负担，因为斑块中新生血管可能特别脆弱，容易出现微出血[176, 177]。间质胶原分子赋予纤维帽很大的拉伸强度，经过若干严格的调节过程后的胶原水平能够使其形成此稳定的结构[178]。

鉴于上述动脉粥样硬化的病理生理过程，我们发现IκBα干预ApoE-/-小鼠的动脉粥样硬化模型并不能减少斑块的形成，而是改变了斑块的成分，减少了斑块的炎症反应，从而稳定了粥样斑块，减缓动脉粥样硬化进展。下面我们将从IκBα过表达后对斑块的易损性的影响进行讨论。

### **3.2** 靶向干预**NF-κB**对动脉粥样硬化斑块易损性的影响

#### **3.2.1** 易损斑块的特征

易损斑块（vulnerable plaque）定义为易导致血栓形成或能快速发展为罪犯病变的所有斑块，易损斑块的特征表现为：（1）较薄的纤维帽和较大的脂质核，研究发现当斑块纤维帽厚度＜65μm，脂质核＞斑块体积的40%时，斑块为易损斑块；（2）斑块中活跃的炎性反应：通过检测斑块中巨噬细胞聚集程度可反映斑块的炎症反应；

（3）严重的内皮功能不全；（4）较强的凝血功能；（5）外向性（正性）重构；（6）斑块内新生血管增加等。

#### **3.2.2** IκBα对动脉粥样硬化斑块易损性的影响

在我们的研究中，为明确IκBα过表达对动脉粥样硬化斑块稳定性的影响，我们以高脂喂养的方法建立了ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化的模型，以基因干预的方法使

IκBα在斑块内过表达，并分别检测了斑块内巨噬细胞、脂质、平滑肌细胞及胶原的含量，发现IκBα过表达组较生理盐水对照组或空病毒组巨噬细胞表达显著减少，平滑肌细胞及胶原含量增多，通过计算易损指数发现，IκBα过表达病毒组斑块稳定性较生理盐水对照组或空病毒组明显改善。我们的研究表明IκBα过表达后抑制了NF-κB信号通路的活性有改善ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化斑块稳定性的作用。平滑肌细胞是动脉粥样硬化斑块的重要细胞成分。本研究发现，IκBα过表达病毒组斑块内平滑肌细胞含量较生理盐水对照组和空病毒组明显增加。我们认为，对于处于动脉

69

粥样硬化晚期的斑块来说，巨噬细胞为其主要的细胞成分。我们的实验中动脉粥样硬化斑块晚期病变中基因干预IκBα过表达，NF-κB信号通路的活性是被明显抑制的，减少氧化应，抑制部分细胞因子的释放，减少了平滑肌细胞的增殖和迁移，但斑块中还存在许多其他的炎症因子刺激促进平滑肌细胞增殖迁移，因此，平沿肌细胞的净效益表现为数量增多。此外，斑块内平滑肌含量增多导致I型胶原含量增加，进一步促进了斑块稳定性。脂质沉积是动脉粥样硬化斑块形成的始动因素[179]。但我们的研究发现，IκBα过表达组、空病毒组、生理盐水对照组三组小鼠的血脂水平无明显差异，且粥样斑块的脂质含量也没有明显差异，提示本实验中IκBα过表达未对ApoE-/-小鼠的血脂代谢产生显著影响。巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块内的主要细胞成分，参与动脉粥样硬化发生发展的全过程[180]。本研究发现，IκBα过表达组小鼠动脉粥样硬化斑块内巨噬细胞含量明显降低。我们认为，IκBα表达量增加时，NF-κB信号通路活性被抑制，氧化应激减弱，释放出的炎症因子减少，减少了巨噬细胞在炎症因子的作用下的趋化迁移，巨噬细胞聚集的数量小于调亡数量，故而巨噬细胞在IκBα过表达作用下显著减少。

易损指数（vulnerability index）是动脉粥样硬化斑块内巨噬细胞和脂质成分所占面积与胶原纤维和平滑肌纤维成分所占面积的比值[181]，采用易损指数评判斑块的不稳定性较单一指标更为全面。本研究发现，与生理盐水对照组小鼠和空病毒组小鼠相比，IκBα过表达组小鼠动脉粥样硬化斑块的易损指数明显降低。这就证实了IκBα增加斑块稳定性，降低斑块易损性的推测，实现了稳定动脉粥样硬化斑块的作用。

#### **3.2.3** IκBα通过减少斑块内炎症反应促进斑块稳定性

随着研究的深入，已发现越来越多的炎症介质参与了AS的发生与发展。各种炎症细胞通过相关的细胞因子、黏附分子等炎症介质相互关联、相互作用，从而构成了复杂的网络，级联放大了炎症反应，共同促进了AS的进展。在动脉粥样硬化发生发展及斑块不稳定的过程中，参与的细胞因子种类众多，我们选择IL-6、TNF-α、MCP-1和MMP-2作为代表性因子，在mRNA和蛋白水平检测了这些因子在三组小鼠中的表达情况。研究结果显示，IκBα过表达组小鼠斑块中IL-6、TNF-a、MCP-1、MMP-2等炎性指标表达较生理盐水对照组和空病毒组明显降低。提示IκBα通过抑制斑块内炎症反应而促进斑块稳定性。

IL-6由动脉粥样硬化病变的细胞局部产生的或者由脂肪组织细胞产生释放到血液循环[142, 182-184]，能够发挥促进动脉粥样硬化的几个有害影响。IL-6促进内皮功能障碍，SMC增殖和迁移，以及招募和激活炎症细胞，从而延续血管的炎症反应。此外，有人以前表明IL-6影响局部的清道夫受体SR-A和CD36的表达，影响了巨噬细胞对修饰的LDL的摄取，从而促进巨噬细胞源性泡沫细胞的形成，其作为早期和晚期动脉粥样硬化病变的标志[185-188]。用重组IL-6干预ApoE基因缺陷小鼠促进了炎

70

症因子的释放和巨噬细胞的聚集，加剧动脉粥样硬化水平[189]。与此同时，有实验研究表明敲除IL-6的小鼠，斑块内的炎症细胞与巨噬细胞显著减少，减缓了动脉粥样硬化的进展[190]。我们的实验研究中ApoE基因缺陷小鼠动脉粥样硬化斑块中有大量的IL-6和巨噬细胞聚集，促进了炎症反应，促进了斑块的不稳定性，然而在IκBα过表达后可抑制NF-κB的活性，降低了斑块内的IL-6和巨噬细胞的表达，从而改善了粥样斑块的稳定性。

TNF-α是一种具有多重效应的促炎细胞因子，可影响脂质代谢，长期由TNF-α介导的血脂异常可以导致心血管疾病发病率及死亡率的升高[191]。研究发现，TNF-α可以增加ROS的产生，同时具有促进其他炎性因子如IL-1、IL-8合成的作用，放大机体局部炎症反应。此外，TNF-α在诱导血管平滑肌细胞调亡过程中，与其它炎性因子发挥协同作用。另外有研究发现，TNF-α诱导MMPs表达，导致纤维帽变薄，促进斑块不稳定[192]。

MCP-1通过介导单核细胞的趋化并促使滚动的单核细胞黏附于活化的内皮细胞在单核/巨噬细胞的聚集中起重要作用。在MCP-1基因缺陷或在MCP-1受体CCB2基因缺陷的动脉粥样硬化小鼠中，均证实MCP-1或CCB2表达的缺失明显降低单核细胞浸润及动脉脂质沉积，减少疾病的严重程度。此外，MCP-1还诱导单核细胞和血管平滑肌细胞表达组织因子。因此，MCP-1在动脉粥样硬化的进程中发挥着重要的作用。

MMP-2对于AS的形成和进展发挥着重要的作用。晚期AS斑块主要由脂质核心和纤维帽构成，纤维帽是增生的胶原纤维和平滑肌细胞构成的致密层，纤维帽的厚度、强度及胶原含量是决定斑块稳定性的主要因素。斑块内MMP-2活性增强，降解细胞外基质，使纤维帽变薄，加剧斑块的不稳定，不稳定斑块在多种因素的刺激下发生破裂导致血栓形成，从而引发ACS[193]。

在动脉粥样硬化的发病机制中NF-κB信号通路汇集多个信号通路，新兴的研究表明在特定的细胞类型抑制NF-κB的活性可具有不同的效果。例如抑制平滑肌细胞NF-κB的活性可导致ApoE-/-小鼠病变的形成减少，但在骨髓细胞改变NF-κB活化的影响是更复杂的。例如低密度脂蛋白受体缺陷小鼠用IKK2/IKKβ缺陷巨噬细胞移植后，增加了凋亡细胞的数目从而加重动脉粥样硬化。最近的研究表明，特定的骨髓

IKKβ缺乏可降低低密度脂蛋白受体缺陷小鼠的动脉粥样硬化。在另一项研究中，骨髓细胞缺失IκBα通过增强白细胞募集到斑块促进动脉粥样硬化进展。此外，骨髓NF-κB1缺失可导致动脉粥样硬化病灶减少和泡沫细胞形成减少，但造成斑块炎症增加。最后，在动脉粥样硬化小鼠模型中条件性地靶向干预内皮细胞和骨髓细胞TNF受体相关因子6显示了Toll样受体的相反功能。总的来说这些研究表明，特异性地抑制不同细胞类型上游的NF-κB活性，可能对斑块的成分和动脉粥样硬化病变的形

71

成产生不同的影响。我们的研究中，使用AAV9病毒载体使得动脉粥样硬化的ApoE-/-

小鼠斑块内IκBα过表达，发现可抑制NF-κB信号通路中P65蛋白的核转位，抑制

P65的活化，进而靶向抑制NF-κB下游的炎症因子和趋化因子基因的表达。IκBα过表达后改变了斑块的成分，增加了斑块中的胶原成分和平滑肌细胞，减少了巨噬细胞，稳定了斑块，减少了斑块炎症反应，抑制了动脉粥样硬化的进展。

综上所述，我们利用AAV9病毒作为载体使IκBα基因过表达，改变ApoE-/-小鼠AS斑块成分比例，降低斑块内炎症反应，稳定斑块，有延缓AS的病程发展作用。

IκBα基因在形成AS的ApoE-/-小鼠过表达后，靶向抑制小鼠主动脉斑块NF-κB信号通路的激活，抑制P65蛋白的核转位，抑制了NF-κB信号通路下游的炎性靶基因的表达如TNF-α，IL-6及趋化因子MCP-1和金属基质蛋白酶MMP-2的表达，从而抑制动脉粥样硬化的进展，为基因靶向转导防治动脉粥样硬化供了理论依据。

## **4** 小结

### 4.1 IκBα基因过表达，可以改变ApoE-/-小鼠AS斑块成分比例，降低斑块内炎症反应，提示IκBα有稳定斑块，有延缓AS的病程发展作用。

### 4.2 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬的疾病进程中NF-κB信号通路过度激活，IκBα基因在形成AS的ApoE-/-小鼠过表达后，靶向抑制小鼠主动脉斑块NF-κB信号通路的激活，抑制P65蛋白的核转位，抑制了NF-κB信号通路下游的炎性靶基因的表达如TNF-α，IL-6及趋化因子MCP-1和金属基质蛋白酶MMP-2的表达，从而抑制动脉粥样硬化的进展，为基因靶向转导防治动脉粥样硬化供了理论依据。

72

# 第三部分 尼可地尔对**ApoE-/-**小鼠动脉粥样硬化内质网应激及**NF-κB**信号通路的作用及机制研究

尼可地尔是一种抗心绞痛的混合药物，结合了ATP敏感性钾通道开放剂和一氧化氮供体的特性。除了其血管舒张活性，尼可地尔对心血管系统有多种有益的效果，如心肌保护[194, 195]，抗血栓形成[196]，改善纤溶能力[197]以及促进血管生成[198]。IONA试验表明，长期接受尼可地尔治疗可改善稳定型心绞痛（SAP）患者的终点事件主要是可显著减少冠脉事件的发生[199]。重要的是，尼可地尔组ACS的发病率显著降低。这些结果表明，尼可地尔对冠状动脉斑块的有益效果。二氮嗪，是一种单纯的钾离子开放剂可显著降低β细胞的内质网应激，改善β细胞的功能[200]。研究报道，动脉粥样硬化是一种代谢性炎症疾病，粥样斑块的破裂与内质网应激存在着密切的关系。据我们所知，尼可地尔对斑块形态和动脉粥样硬化的影响的研究尚属少见。在动脉粥样硬化的动物模型中，我们测试了尼可地尔可减轻内质网应激对粥样斑块的易损性和减轻炎症的有益效果的假设。

越来越多的证据表明，内质网（ER）应激和UPR活化可在许多功能紊乱和疾病状态中检测到。这些包括神经退行性疾病（阿尔茨海默，帕金森），糖尿病，肥胖症，肝脏疾病和癌症[201-204]. ER应激和UPR激活在这些疾病的病理中的确切作用并不清楚。血脂异常的小鼠模型显示加速动脉粥样硬化，但并有直接和间接证据支持内质网应激作用加速脉粥样硬化斑块的进展。高脂喂养的ApoE-/-和LDLR-/-小鼠动脉粥样硬化病灶体积相对于普食的小鼠明显增加。血脂正常的ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化发生、发展的各个阶段的巨噬细胞和巨噬泡沫细胞中内质网应激的标志物显著升高，这或许表明内质网应激在动脉粥样硬化起到一定的作用[205]。这个想法得到了支持，在动脉粥样硬化区域血管分离的内皮细胞UPR是激活的，而非动脉粥样硬化区域血管分离的内皮细胞UPR并未激活[41]。

在易感脉粥样硬化的内皮ER应激的一个早期作用可能是增加了局部炎症反应。内质网应激诱导剂包括葡萄糖和未酯化的胆固醇，使得NF-κB的活性增加，该转录因子调节炎症基因的表达，导致炎症因子TNF和IL-6的表达上调[43, 206, 207]。理论上已经表明，活化的IRE-1相关联的衔接分子TRAF2信号通过下游激酶激活宿主防御蛋白NF-κB和c-Jun[208, 209]。因为这种方式，内质网应激反应机制被认为在引发动脉粥样硬化损伤的促炎反应中起到至关重要的作用。

越来越多的证据表明，UPR和炎症信号途径通过各种机制互相作用。首先，PERK介导的转位减少导致半衰期较短的IκB短缺，从而释放NF-κB易位到细胞核。其次，

73

IRE1α-TRAF2募集和激活JNK和IκB激酶（IKK）。活化的JNK磷酸化转录因子AP1。活化的IKK磷酸化IκB导致其降解以及NF-κB的活化。活化的AP1和NF-κB诱导大量炎症介质的转录。第三，内质网应激增加蛋白折叠负荷可导致ROS的积聚，这可能会引发炎症反应[210]。重要的是，UPR和炎症之间的联系在各种炎症驱动的代谢性疾病日趋明显[211]。鉴于上述内质网应激与炎症存在密切的关系，且与NF-κB也存在着密切的关系，我们在研究药物尼可地尔对动脉粥样硬化中内质网应激作用的同时也关注了NF-κB信号通路的激活情况。

炎症和UPR在动脉粥样硬化尤为重要。例如，游离胆固醇（FC）在巨噬细胞中的积累诱导肿瘤坏死因子α（TNFα），白细胞介素6（IL-6）的分泌，这些是由FC介导诱导IKK/NF-κB信号通路以及MKK3/p38、ERK1/2和JNK1/2促分裂原活化蛋白激酶（MAPK）的活化所致。所有信号通路的激活和这两种细胞因子的释放都需要胆固醇转运到内质网。UPR的分支CHOP是ERK1/2信号的激活和IL-6的生成必须的。与此相反，多个其它的ER相关的途径是负责p38、JNK1/2和IKK/NF-κB的活化和对TNFα的诱导生成[206]。有趣的是，与上述提及的相反，IRE1α介导核苷酸寡聚化结构域受体蛋白3（NLRP3）炎性小体的激活和随后的THP-1单核细胞中促炎细胞因子IL-1β的释放[212]。另一项研究发现，THP-1单核细胞和人巨噬细胞中活化的NLRP3炎性小体是由布雷菲德菌素A（BFA）、衣霉素和毒胡萝卜素造成ER应激引起的，独立于PERK、IRE1α或ATF6信号途径[213]。未来需要进一步研究来描述这种非常规的内质网应激反应。

从内皮细胞（ECs）获得的证据也支持内质网应激和炎症之间的联系。研究使用人主动脉内皮细胞发现的UPR相关基因是由氧化的磷脂氧化1-棕榈酰-2-花生四烯酰

-sn-甘油基-3-磷酸胆碱（oxPAPC）处理诱导的[82, 214]。UPR的分支ATF4和XBP1 是

oxPAPC诱导表达炎性细胞因子IL-8、IL-6、MCP1和趋化因子CXC基序配位体 3

（CXCL3）必不可少的基底和介质[82, 215]。在体研究发现，ATF3和ATF4在人体冠状动脉粥样硬化病变中内皮细胞的表达在炎症反应明显的斑块肩部要明显多于纤维帽区域。斑块肩部区域还呈现较高水平的氧化磷酸化的oxPAPC，这表明oxPAPC 和

UPR之间存在着一定的联系[215]。为我们今后的研究也增加了新的研究方向。

血脂异常相关的内质网应激也可激活异常调节代谢的途径，直接参与动脉粥样硬化病变的发生和发展。现在公认的内质网应激诱导剂脂肪，通过激活胆固醇调节元件结合蛋白（SREBPs）可促进血管和肝细胞的脂质堆积。SREBPs为转录因子控制涉及胆固醇和甘油三酯的生物合成和摄取酶的表达[216, 217]。已有从肥胖小鼠模型获得的证据支持ER应激诱导SREBP失调[218, 219]。有趣的是，SREBPs和ER应激传感器ATF6为相同的蛋白水解机制。尽管ER应激相关SREBP活化的细节尚待充分界定，但已有证据表明，信号通路糖原合酶激酶（GSK）-3，确实在此过程中发挥重要

74

作用[218, 220]。

在病变早期，巨噬细胞凋亡可以限制粥样硬化斑块病变进展；而在病变进展期，细胞凋亡可以促进斑块不稳定和破裂。Tabas和他的同事已经表明，巨噬细胞装载未酯化的胆固醇导致UPR的激活和增加GADD153/CHOP的表达[206]。内质网应激与常见的其他应激因素的联合，包括修饰的LDL、糖化胶原和年龄，可诱导巨噬细胞发生细胞凋亡[82, 221]。这种“多重打击”机制由ApoE-/-和LDLR-/-联合CHOP基因缺陷的小鼠发现，该研究发现上述小鼠除了减少粥样硬化病灶区域，还可显著减少斑块的凋亡和坏死[38]。巨噬细胞形成的泡沫细胞凋亡有助于病灶坏死脂核的形成。这是一个由促血栓形成、胆固醇和氧化应激的细胞碎片构成的脱落细胞区域。

鉴于内质网应激存在于动脉粥样硬化早期、进展期、晚期等整个过程中，我们设想是否可以利用药物尼可地尔干预ApoE-/-小鼠晚期动脉硬化中的内质网应激的关键蛋白GRP78和CHOP的变化，从而改善斑块的稳定性和斑块内细胞凋亡情况，进而延缓动脉粥样硬化的进程，实验中我们还使用了阿托伐他汀作为阳性对照。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 实验材料

#### **1.1.1** 实验动物的选择

ApoE-/-小鼠因其形成的斑块分布与人类动脉粥样硬化高发处相似，是目前研究动脉粥样硬化较为可靠的动物模型。普通饮食下20周龄即可形成动脉粥样硬化斑块，高脂饮食下16周龄即可形成明显的动脉粥样硬化斑块。本实验选择SPF级ApoE-/-小鼠，8周龄，雄性，体重18-22g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司（许可证号：SCXK（京）2012-0001），所有实验过程均按照新疆医科大学伦理委员会的要求进行操作。动物饲养环境温度为22-25℃，相对湿度为60%，光-暗周期12h，所有小鼠自由饮水和摄食。高脂饲料（含0.25%胆固醇，21%脂肪）购自北京科澳协力饲料有限公司（许可证号：SCXK（京）2014-0010）。

#### **1.1.2** 主要仪器设备和试剂配置方法

##### **1.1.2.1** 仪器设备

（1）PCR仪（美国BIO-RAD My Cycler）

（2）电泳仪（中国六一牌DYY-6D）

（3）高速冷冻离心机（美国HC-3018R）

（4）酶标仪（美国Thermo Scientific）

（5）荧光定量PCR仪（美国CFX96）

（6）手术显微镜（德国ZEISS）

75

（7）纯水系统（美国Elix系统）

（8）全自动生化分析仪（美国BECKMAN LX20）

（9）液氮罐（中国新疆贝斯明生物技术发展有限公司）

（10）pH计（美国HACH公司）

（11）恒温金属浴（中国杭州博日科技有限公司）

（12）超低温冰箱（美国Thermo Scientific）

（13）病理切片机（德国LEICA RM2016）

（14）冰冻切片机（德国LERICA 3050S）

（15）全自动荧光倒置显微镜（德国ZEISS 3, 000）

##### **1.1.2.2** 实验试剂

（1）小鼠的高脂饲料（中国北京科澳协力公司）

（2）PCR引物和胰蛋白酶（中国上海生工公司）

（3）尼可地尔粉剂原药由日本药厂赠予，阿托伐他汀药由大连辉瑞生物制药公司生产

（4）小鼠灌胃针由新疆医科大学动物实验中心提供

（5）PCR扩增酶（日本宝生物公司）；琼脂糖（中国武汉博士德生物公司）

（6）反转录试剂盒（Thermofisher公司）

（7）实时荧光定量试剂盒（美国Thermofisher公司）

（8）DNA纯化回收试剂盒（天根生物有限公司）

（9）免疫组化透明剂（中国南京建成生物工程研究所）

（10）油红O染色液（美国AMRESCO公司）

（11）天狼星红（美国Sigma公司）

（12）苏木素染色液（中国北京中杉金桥）

（14）P65，P-P65，P50，Bax，Bcl-2, GAPDH一抗（美国CST公司）

（13）GRP78，CHOP，Caspase-12（中国Proteintech武汉ft鹰公司）

（14）IκBα，JNK，P-JNK一抗（美国SANTA CRUZ公司）

（15）IL-6，MCP-1，TNF-α，MMP-2，α-SMA，（美国ABCAM公司）

（16）巨噬细胞（MOMA-2）单克隆抗体，（美国AbD Serotec公司）

（17）免疫组化二抗，ft羊抗大鼠IgG/HRP聚合物（中国北京中杉金桥）

（18）免疫组化二抗，ft羊抗兔IgG/HRP聚合物（中国北京中杉金桥）

（19）免疫组化二抗，ft羊抗小鼠IgG/HRP聚合物（中国北京中杉金桥）

（20）浓缩型DAB试剂盒（中国北京中杉金桥）

（21）细胞凋亡试剂盒（瑞士Roche公司）其他参照第一部分。

76

### **1.2** 实验方法

#### **1.2.1** 实验动物的分组

ApoE-/-小鼠因其形成的斑块分布与人类动脉粥样硬化高发处相似，是目前研究动脉粥样硬化较为可靠的动物模型。根据我们研究第一部分的实验结果提示：ApoE-/-小鼠高脂饮食下16周龄即可形成明显的动脉粥样硬化斑块。本实验使用8周龄，雄性，体重20-22g的ApoE-/-小鼠。实验分为3组，所有小鼠在SPF级环境中适应性喂养1周后，随机将其分为生理盐水对照组，尼可地尔组和阿托伐他汀组，每组25只小鼠，小鼠自由采食，高脂饲料饲养（小鼠高脂饲料由北京科澳协力公司生产，真空包装：饲料配方是20%的脂肪，40%的碳水化合物，0.25%胆固醇），高脂喂养。三组ApoE-/-小鼠在喂养16周后，分别给予生理盐水，尼可地尔和阿托伐他汀灌胃治疗，每天早晨10: 00灌胃，不间断灌胃治疗8周，期间三组小鼠继续高脂饮食。灌胃治疗8周结束后，将小鼠麻醉处死。小鼠麻醉后，心脏采血取全血约0.8-1.0ml。在ZEISS手术显微镜下小心分离小鼠主动脉，从主动脉弓根部开始向下分离直至髂动脉分叉处，全部离段取出。造模成功的标准是根据血管总体油红染色或者油红病理切片进行判断，剔除没有斑块形成的小鼠。



**图 3-1** **实验分组示意图**

**Figure** **3-1** Experimental **groups**

77

#### **1.2.2** 实验主要药物

尼可地尔粉剂原药由日本Tohoku Nipro Pharmaceutical Corporation药物公司赠予；根据药物对病患的治疗剂量和相关基础研究文献，最终确定尼可地尔治疗剂量为15mg·kg -1·d -1。阿托伐他汀由大连辉瑞制药有限公司生产（生产批号：H20051409），用量：60kg成年人每天预防性药量为20mg。

小鼠灌胃剂量：按照国家最新的药典中小鼠按体表面积换算到人的体表面倍数为12倍，考虑到小鼠的胃容0.2ml/10g，最终小鼠尼可地尔剂量灌胃剂量：15mg·kg -1·d -1；阿托伐他汀灌胃剂量浓度为：4mg·kg -1·d -1详细计算如下：阿托伐他汀灌胃剂量：20mg/60kg×12 =4mg·kg -1·d -1。

每周固定时间称体重一次，并记录体重，每周灌胃剂量按照体重指数调整。灌胃时将药物置于温水中搅拌，待全部溶解后再进行灌胃，药物每天都是现配现用，以保证药物有效成分。

#### **1.2.3** 标本的留取

在所有小鼠灌胃治疗8周后，小鼠行尾套法测取血压，随后麻醉小鼠后使小鼠

安乐死，留取标本。每组取7只进行斑块组织病理学检查。余详见第二部分。

#### **1.2.4** 主动脉血管大体油红**O**染色检测脂质斑块损伤

手术显微镜下剥离主动脉周围结缔组织，取主动脉弓至腹主动脉肾动脉分支处，将主动脉用剪刀纵向剪开，平铺整根主动脉于油红O染色液中15min，取出主动脉置于70%酒精中分化5min后，再换一次酒精对组织进行分化，看到正常组织变为乳白色为止，PBS清洗2遍后观察斑块表达情况。计算主动脉斑块面积，使用Image J软件分析计算主动脉斑块面积和斑块损伤区域占管腔的比率（主动脉脂质斑块面积与管腔面积的百分比）。

油红O染色液的配置：

（1）配制油红O染色液原液（浓度为0.5%）：称取0.5g油红O粉剂，量取100mL异丙醇溶解，磁力搅拌器加热搅拌助溶，混匀直至其完全溶解，密封后4℃冰箱保存备用。

（2）配制油红O染色液工作液：组织染色前2h新鲜配制，取油红O原液6mL，加入4mL蒸馏水进行稀释，用滤纸进行过滤待用。

#### **1.2.5** **HE**染色

（1）从冰箱中取出片子室温平衡10至30min。

（2）蒸馏水洗5min。

（3）HE染色：苏木精染色5min，水洗3min，0.5%盐酸酒精分化20sec。自来水洗2min。伊红染色3min。自来水洗1min，洗去多余染液。

（4）脱水：梯度酒精脱水，80%乙醇脱水5sec，95%的乙醇I和95%的乙醇II

78

各2min，无水乙醇I和无水乙醇II各3min。

（5）透明：透明剂I、透明剂II各5min。

（6）封片用中性树胶。用吸水纸吸去组织周围的透明剂。在中央滴一小滴树胶，然后用镊子夹取干净盖玻片，仔细加在封固剂上，慢慢压平。或平置凉干后装盒。

（7）观察主动脉血管和斑块的形态结构。使用Image J软件分析计算主动脉斑块损伤面积。

#### **1.2.6** 油红**O**染色

详见第一部分。

#### **1.2.7** 天狼星红染色

详见第二部分。

#### **1.2.8** 标本的免疫组化染色

##### **1.2.8.1** **α-SMA actin**、**MOMA-2**、TNF-α、**IL-6**、**MCP-1**、**MMP-2**免疫组化步骤：

（1）从-80℃冰箱中取出切片室温放置20min；

（2）蒸馏水浸泡20min；

（3）PBS洗5min×3次；

（4）浸入3%H2O2 10min；

（5）PBS洗5min×3次；

（6）5%ft羊血清封闭，室温孵育20min；

（7）甩去血清，分别滴加a-SMA actin一抗（1: 50），MOMA-2一抗（1: 50），TNF-α一抗（1: 100），IL-6一抗（1: 100），MCP-1一抗（1: 200），MMP-2一抗（1: 100），4℃孵育过夜；

（8）PBS洗5min×3次；

（9）滴加辣根过氧化酶标记的二抗，37℃孵育40min；

（10）PBS洗5min×3次；

（11）避光情况下，DAB显色；

（12）流水冲洗；

（13）Harris苏木素染液3min；

（14）流水冲洗30sec；

（15）1%盐酸酒精分化5-10sec；

（16）流水冲洗5min；

（17）70%乙醇30sec；

（18）80%乙醇1min；

（19）90%乙醇2min；

（20）95%乙醇2min；

79

（21）无水乙醇I 3min；

（22）无水乙醇II 5min；

（23）透明剂I 5min；

（24）透明剂II 5min；

（25）滴加中性树胶，盖玻片封片。阳性细胞抗原存在处着色呈棕褐色。

##### **1.2.8.2** 内质网应激相关蛋白**GRP78**、**CHOP**免疫组化步骤：

（1）从-80℃冰箱中取出切片室温放置20min；

（2）蒸馏水浸泡20min；

（3）PBS洗5min×3次；

（4）浸入3%H2O2 10min；

（5）PBS洗5min×3次；

（6）5%ft羊血清封闭，室温孵育20min；

（7）甩去血清，分别滴加GRP78一抗（1: 100），CHOP一抗（1: 50），4℃孵育过夜；

（8）PBS洗5min×3次；

（9）滴加辣根过氧化酶标记的二抗，37℃孵育40min；

（10）PBS洗5min×3次；

（11）避光情况下，DAB显色；

（12）流水冲洗；

（13）Harris苏木素染液3min；

（14）流水冲洗30sec；

（15）1%盐酸酒精分化5-10sec；

（16）流水冲洗5min；

（17）70%乙醇30sec；

（18）80%乙醇1min；

（19）90%乙醇2min；

（20）95%乙醇2min；

（21）无水乙醇I 3min；

（22）无水乙醇II 5min；

（23）透明剂I 5min；

（24）透明剂II 5min；

（25）滴加中性树胶，盖玻片封片。阳性细胞抗原存在处着色呈棕褐色。

80

#### **1.2.9** 组织病理学测量

详见第二部分。

#### **1.2.10** 血脂指标检测

心脏穿刺采血得到0.8-1.0ml 全血放置半小时后，析出血清，4000 r/min 离心

10min，可以得到300-400µl的血清，将血清用移液枪吸出，放在-80℃超低温冰箱保存。全自动生化仪检测小鼠血清TC、TG、HDL-C、LDL-C的水平。

#### **1.2.11** 实时荧光定量法测定小鼠主动脉血管炎症因子**mRNA**表达

##### **1.2.11.1** 组织总**RNA**提取

实验原理是通过变性剂破碎组织细胞，用氯仿等有机溶剂抽提RNA，再经过沉淀，洗涤，晾干，最后溶解得到提纯的总RNA。实验中需要用到的试剂有无水乙醇

（DEPC水配制成75%乙醇）、氯仿、异丙醇、Trizol、DEPC水；用到的耗材有各种大小的枪头和EP管、研钵。提取高纯度RNA的关键是RNA提取过程中，RNA对于RNAase酶是非常敏感的，所以枪头、EP管、研钵都要做RNAase酶的灭活处理，尽可能地避免RNAase酶污染降解RNA. RNase酶的灭活的操作步骤是先用DEPC水浸泡枪头和EP管，过夜后烘干，高压消毒烘干。研钵的外层用锡箔纸包住，用时打开。也可购买RNase-free的EP管和枪头等耗材。

（1）高温干烤过的研钵加入液氮使其遇冷，取出标本放入研钵中，按顺序做好标记，充分研磨至粉末。

（2）为了避免有毒试剂挥发对环境的危害和保护样品，提取RNA的工作在通风橱中进行操作。取约50mg液氮中冷冻的组织，放在预冷的研钵中，加入1ml Trizol，研磨至水样，使组织细胞充分裂解，吸取全部约1ml Trizol混合液，转移到无RNA酶的EP管中，混匀，室温放置5min。

（3）在1ml Trizol混合液中加入0.2ml的氯仿，盖紧EP管，剧烈摇荡15秒钟，提取RNA，随后室温静置5min。

（4）高速离心机4℃条件下，13, 000 r/min离心10min，取上层水相于一新的EP

管中，洗去蛋白和杂质，提纯RNA。

（5）新离心管中加入0.5ml异丙醇，室温放置10min。4℃，13, 000 r/mon离心

10min，弃去上清液，提纯RNA。

（6）加入1ml 75%的乙醇清洗，4℃条件下13, 000 r/min, 5min离心弃去上清，重复操作一次，洗涤两次RNA。弃去上清液，室温或真空干燥5-10min。

（7）加适量DEPC水溶解EP管底的RNA。

（8）取1μl RNA进行定量及纯度的鉴定，取5μl RNA进行电泳检测是否降解。

（9）在EP管中加入DEPC H2O 20μL，轻轻吹打几次，使RNA完全溶解，获得的RNA溶液保存于-80℃待用。

81

（10）提取的总RNA，取2μL的总RNA溶液，和2×loading buffer磷酸缓冲液混匀，在新制备的RNA溶液中加了核酸染料，随后在1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳检测。正常情况下，28S rRNA和18S rRNA核糖体的条带亮而着色重，而且这两个条带的亮度为2: 1时，提示RNA没有发生降解，有时在溴酚蓝前面还有一条较浅的5S条带。将每管样品取2µl用于微量核酸蛋白检测仪检测RNA浓度，A260/A280吸光度比值在1.8-2.0之间，说明总RNA提取比较成功，RNA的纯度及浓度较好。

##### **1.2.11.2** 逆转录反应合成**cDNA**

按照RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis逆转录试剂盒（Thermo）说明书进行操作，详细步骤见第二部分。

##### **1.2.11.3** 实时荧光定量**PCR**标准品的建立

从上述组织中提取的RNA，并以反转录的cDNA为模板，分别以TNF-α、IL-6、MCP-1、MMP-2、GRP78、CHOP和GAPDH为引物，进行普通PCR，TNF-α、IL-6、MCP-1、MMP-2和GAPDH的引物序列详见第二部分，GRP78和CHOP的引物序列见下表：GRP78扩增DNA片段长度128bp. CHOP扩增DNA片段长度108bp。

**表 3-1** PCR**反应的引物序列**

**Table** **3-1** Sequences of primers for **PCR**

| Genes | Forward | Reverse |
| --- | --- | --- |
| GRP78 | 5′-AGACTCCTGCCTGACTGCTG-3′ | 5′-CCACATCCTCCTTCTTGTCC-3′ |
| CHOP | 5′-CACACGCACATCCCAAAG-3′ | 5′-CCACTCTGTTTCCGTTTCCT-3′ |

扩增标准品DNA，进行普通PCR，反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| Premix Ex Taq | 10.0µl |
| Forward primer | 0.5µl |
| Reverse primer | 0.5µl |
| CDNA Template | 2.0µl |
| ddH2O | 7.0µl |

将以上物质轻轻混匀后加入灭菌去离子水补到总体积为20µl后放入200µl PCR

管中，离心15秒，置于PCR仪中，反应条件为：

94℃预变性3min；94℃变性30 sec，退火温度，72℃延伸1min，共反应35个循环，72℃延伸5min，-20℃保存。

##### **1.2.11.4** 琼脂糖电泳分析

（1）制胶：取0.4克琼脂糖粉，加入20ml干净无菌的1×TBE溶液，微波炉内高温加热至沸腾，摇匀，待凝胶温度降至约60℃左右时加入2µl核酸染料，轻柔、缓慢摇匀玻璃皿避免气泡产生，将凝胶倒入插好加样孔梳子的制胶盒中，如有气泡

82

及时用枪头将其移出。倒好的凝胶水平放在水平台面上，室温下静置30min待其完全凝固后，轻轻抽走齿梳。

（2）上样：将制好的凝胶放在电泳槽中，加样孔端朝向负极，倒入1×TBE电泳缓冲液，液面略淹没、高出凝胶，将各组DNA样品以每孔6µl的量加入到凝胶加样孔中，加入8µl DNA Marker于加样孔中。

（3）电泳：将电压调至120mV，电泳时间约25-30min，当上样缓冲液超过凝胶2/3后关闭电泳槽开关。

（4）拍照并分析结果：关闭电泳仪从电泳槽中取出凝胶，置于凝胶成像仪中黑板上观察结果，以DL 500bp大小的DNA Marker作为参照，判断所扩增片段分子量大，拍照并图像保存至电脑中。将符合实验所需的凝胶条带切胶回收并纯化，用于目的基因标准曲线的制备。

（5）扩增出的DNA回收后的纯化，操作步骤依据DNA纯化回收试剂盒（离心柱型）说明书，进行操作。对从凝胶中回收的DNA样品进行定量。

##### **1.2.11.5** 实时荧光定量**PCR**实验

收集纯化后的DNA样品进行定量，按照8倍梯度稀释的方法，稀释成8管，每管各取2µl DNA作为模板，IL-6、TNF-α、MCP-1、MMP-2、GRP78、CHOP和GAPDH为引物进行实时荧光定量PCR，反应体系和反应条件如下：

反应体系：

2×SYBR Green PCR premix 10µl

Forward prime 0.5µl

Reverse primer 0.5µl

DNA Template 2.0µl

ddH2O 13.0µl

将以上总物质体积20µl放入200µl PCR管中，离心15秒，以上操作均在冰上进行。反应条件：

**表 3-2** **实时定量PCR反应条件**

**Table** **3-2** Real-time fluorescence quantitative PCR reaction **conditions**

|  | 时间和温度/Times and Temperatures | | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 仪器型号  Thermal Cycler | 起始步骤  Initial Steps | 每 35 个循环/Each of 35 cycles | | 熔解曲线步骤 |
|  | 熔解/Melt | 退火/延伸 Anneal/Extend |
| ABI 7500 FAST 型  荧光定量 PCR 仪 | 保持/HOLD | 循环/CYCLE | |
| 3min 94℃ | 30 sec 94℃ | 30 sec 60℃ |  |

完成上述步骤后，将加样好样品的目的基因和管家基因放在荧光定量PCR仪中

83

进行实时定量聚合酶链反应。对同一个样品，同时进行实时荧光定量聚合酶链反应扩增目的基因和管家基因。设定电压80伏特，注意扩增的PCR产物是否单一。如图2-9所示，目的基因的扩增和溶解曲线情况如下，左图显示的是目的基因的扩增曲线，右图显示的是目的基因的熔解峰。在实时定量PCR反应中，质量控制至关重要，其中熔解曲线代表了选择引物的特异性。如果熔解曲线都是单一的峰，并且TM值在80-90之间，就表示扩增基因的引物设计合理，无非特异性扩增和生成引物二聚体。各样品扩增曲线的拐点清楚，扩增曲线相互平行，基线平无上扬现象，低浓度样本指数期明显。标准品的C*t*值的间隔均匀，10倍稀释的两个标准品之间相差3.3个C*t*值，代表各管的扩增效率相近，扩增过程质控良好。

**1.2.10.6 RT-qPCR结果的测量和计算**

通过相对定量公式：2-△△Ct，△C*t*=Ct（目的基因）-Ct（GAPDH），△△C*t*=△

Ct（实验组）-△Ct（对照组），计算目的基因的相对表达量，统计分析。

#### **1.2.12** **Western blot**检测血管组织中**NF-κB**信号通路及内质网应激中相关蛋白表达

本研究应用WB蛋白免疫印迹检测血管组织中，NF-κB信号通路IκBα、P-P65、

P65、P50等相关蛋白，内质网应激相关蛋白GRP78、CHOP、Caspase-12，以及凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2、JNK、P-JNK的表达。同时检测GAPDH的表达量并作为内参对照用来校正上样可能带来的误差，将该方法用于检测对照组和实验组的蛋白表达，从而使得结果更加准确。

（1）从组织中提取实验所需的检测指标总蛋白：取约30mg的组织，用干净的研钵加液氮研磨组织。150µl/30mg细胞裂解液匀浆裂解。裂解30min后，14000 r/min离心5min，取上清液分装-80℃保存。

（2）运用BCA比色法检测样品中的蛋白浓度

蛋白样品稀释液和标准品25µl分别加入每孔，然后加入显色液200μL（A: B=50: 1），放置于37℃温箱中30min。转移过程需轻柔、果断，防止产生气泡。酶标仪测量其光密度值。计算蛋白样品的浓度和上样的体积。

（3）SDS-聚丙烯酸胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

具体步骤见第一章。相关蛋白分子量的大小：IκBα为39kDa, P-P65为65kDa，

P65为65kDa, P50为50kDa, GRP78为78kDa, CHOP为30kDa, Caspase-12为39KD，

Bax为20kDa, Bcl-2为26kDa, JNK为46-54kDa, P-JNK为46-54kDa, GAPDH 为

37kDa。

#### **1.2.13** **TUNEL**检测斑块细胞凋亡

###### （1）从-80度冰箱中取出冰冻切片，室温放置30分钟；

84

###### （2）将切片置于水平湿盒上，疏水笔在样品周围描绘样品分布的轮廓，便于后续处理以便节省染色试剂。

（3）4%多聚甲醛溶液中固定15min; PBS漂洗3次，每次5min。

（4）取出载玻片，吸水纸小心吸干载玻片上组织周围的液体。

（5）加入30ul通透液（0.1%TitonX-100, 0.1%枸橼酸钠的PBS配制），放在置冰上通透2min, PBS漂洗3次，每次5min。

（6）制备TUNEL反应混合液，处理组用50μl TdT+450μl荧光素标记的dUTP液混匀；而阴性对照组仅加50μl荧光素标记的dUTP液，阳性对照组先加入100μl DNase1，室温反应10min，后面步骤同处理组。湿盒中37℃避光孵育60min。

（7）玻片干后，加50μl TUNEL反应混合液（阴性对照组仅加50μl荧光素标记

dUTP液）于标本上，避光、湿盒中37℃反应1h。

（8）PBS漂洗3次，弃除未结合的反应液。

（9）加DAPI染色液，避光室温下作用5min，标记粥样斑块细胞核，PBS漂洗

3次，滴加50ul PBS，在荧光显微镜下计数凋亡细胞。

### **1.3** 统计分析

采用GraphPad Prism 6.0软件进行作图。采用SPSS 22.0统计软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差（*x**s*）表示，多组均数的比较采用两因素方差分析（General Linear Model-Univariate）或单因素方差分析（Oneway ANOVA），两两组间比较视方差齐性检验（以0.05作为检验水准进行误差方差的齐性Levene's检验）结果进行不同的选择，当方差齐时，选择LSD检验，当方差不齐时，选择秩和检验。以*P*＜0.05为差异有统计学意义。

## **2** 结果

### **2.1** 尼可地尔对**ApoE-/-**小鼠的动脉粥样硬化斑块进展的影响

#### **2.1.1** 尼可地尔对**ApoE-/-**小鼠体重、血压及血脂的影响

药物灌胃治疗8周后，分别测定生理盐水对照组小鼠、尼可地尔组小鼠、阿托伐他汀组小鼠的体重、血压及血脂四项水平的变化。结果显示：三组小鼠间的BW、

BP、TC、TG、HDL-C、LDL-C进行比较，均无明显差异（表3-3, *P*＞0.05）结果表明给予尼可地尔和阿托伐他汀药物治疗后未对小鼠的体重和血压造成显著影响，同时对AS小鼠的血脂水平也无明显影响。

85

**表 3-3** **药物灌胃治疗8周后三组小鼠体重、血压和血脂比较（***x**s***）**

| Table 3-3 Transf | Ection of v | Irus after 5 | Weeks of body | Weight and lipi | Ds compariso | N( x  s) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 分组 | BW  （g） | BP  （mmHg） | TC  （mmol/L） | TG  （mmol/L） | HDL-C  （mmol/L） | LDL-C  （mmol/L） |
| 生理盐水对照组 | 32.5±2.7 | 107±9.6 | 26.31±1.78 | 0.76±0.14 | 1.22±0.07 | 8.67±0.12 |
| 尼可地尔组 | 31.8±3.3 | 104±6.8 | 24.64±1.35 | 0.72±0.09 | 1.24±0.05 | 8.38±0.31 |
| 阿托伐他汀组 | 31.9±2.8 | 108±8.7 | 24.97±1.06 | 0.72±0.10 | 1.27±0.07 | 7.92±0.35 |

注：三组小鼠间的体重、血压和血脂四项比较无明显差异，*P*＞0.05

Notes: Compared the three groups of mice with bodyweight, blood pressure and lipids there was no difference, *P*＞0.05

#### **2.1.2** 尼可地尔对**ApoE-/-**小鼠动脉粥样斑块内质网应激的影响

实验结束后，检测生理盐水对照组小鼠、尼可地尔组小鼠、阿托伐他汀组小鼠的斑块内的内质网应激相关蛋白。免疫组化和RT-PCR检测斑块内内质网应激相关蛋白GRP78和CHOP蛋白。免疫组化和RT-PCR结果提示尼可地尔组和阿托伐他汀组的内质网相关蛋白GRP78及CHOP较生理盐水对照组显著降低（*\*P*＜0.05），且阿托伐他汀组的GRP78及CHOP蛋白较尼可地尔组也显著降低（*#P*＜0.05）（见图3-2A, B, C）。免疫组化结果示：GRP78蛋白在生理盐水对照组小鼠、尼可地尔组小鼠、阿托伐他汀组小鼠斑块内的百分率分别为22.31±3.32; 15.33±3.21; 10.64±2.35 ；

CHOP蛋白在生理盐水对照组小鼠、尼可地尔组小鼠、阿托伐他汀组小鼠斑块内的百分率分别为12.40±2.57; 8.80±2.16; 4.90±2.20。RT-PCR检测斑块内GRP78和CHOP

在mRNA水平的表达。GRP78在生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组，三组小鼠的mRNA水平分别为1.02±0.06; 0.46±0.08; 0.35±0.04；CHOP在生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组，三组小鼠的mRNA水平分别为0.998±0.06; 0.45±0.06; 0.33±0.05；上述结果提示尼可地尔和阿托伐他汀均可抑制斑块内的内质网应激且阿托伐他汀效果更优，可能对动脉粥样硬化有抑制作用。

#### **2.1.3** 尼可地尔对**ApoE-/-**小鼠动脉粥样斑块进展的影响

实验结束后，将三组小鼠行大体血管油红O染色后，可见管腔狭窄明显，大量脂质堆积于管壁，脂质在血管内皮沉积，脂质斑块被染为红色。生理盐水对照组、尼可地尔组、阿托伐他汀组三组小鼠，脂质斑块在血管内皮的沉积分别为50.4±4.63 、

43.4±3.41、37.7±3.12（%）（见图3-3, A, B），生理盐水组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较存在显著差异（\**P*＜0.05）；尼可地尔组与阿托伐他汀组比较存在显著差异（#*P*＜0.05）。结果提示尼可地尔组及阿托伐他汀组较生理盐水对照组均可减少主动脉大体脂质斑块面积；但阿托伐他汀组降低斑块面积较尼可地尔组更显著。

86





**图 3-2** **内质网应激相关蛋白GRP78和CHOP在三组小鼠斑块的表达**

A，B，免疫组化检测检测GRP78和CHOP（×400）；C，mRNA水平检测GRP78和CHOP

（*N*=5, *x**s*）。

注：三组间比较，\**P*＜0.05，生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较；#*P*＜0.05，尼可地尔组与阿托伐他汀组比较。

**Figure** **3-2** The ERS related protein GRP78 and CHOP **expression in aorta plaques in 3 groups of mice**

A, B, GRP78 and CHOP were detected by IHC（×400）; C, GRP78 and CHOP mRNA were

detected by RT-PCR. (*n*=5, *x**s* )

Notes: Compared with the three groups, \**P*＜0.05, Con vs Nicorandil group or Atorvastin group;

#*P*＜0.05, Nicorandil group vs Atorvastin group.

87



**图 3-3** **小鼠主动脉大体斑块损伤**

A，大体油红O染色；B，主动脉表面损伤面积比率（*n*=5, *x**s* ）

注：三组间比较，\**P*＜0.05，生理盐水组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较；#*P*＜0.05，尼可地尔组与阿托伐他汀组比较。

**Figure** **3-3** Surface of whole aortas **lesion**

A, Surface of lesion stained by Oil-red O; B, The aortic surface damage area ratio(%)(*n*=5, *x**s* ) Notes: Compared with the three groups, \**P*＜0.05, Con vs Nicorandil group or Atorvastin group;

#*P*＜0.05, Nicorandil group vs Atorvastin group.

主动脉切片HE染色后，可见明显动脉粥样硬化斑块，斑块表层有瓷白色的纤维帽，斑块内部呈黄色粥样，部分形成斑块的血管内膜和中膜区域聚集了大量的泡沫细胞、还存在泡沫细胞和坏死崩解物质混合构成的脂质核心，部分斑块内有胆固醇结晶，在脱水透明的过程中由于胆固醇被溶解所以呈针形空隙。斑块底部及周围肉芽组织呈不同程度增生，周围有少量的泡沫细胞，少量淋巴细胞浸润。斑块底部的中膜平滑肌细胞增生情况不同，在斑块损伤较重的区域平滑肌细胞呈不同程度的萎缩，部分迁移至内膜。生理盐水对照组、尼可地尔组、阿托伐他汀组三组小鼠，粥样斑块病损面积分别为0.17±0.038、0.164±0.043、0.157±0.052（mm2）（见图3-4，A，

B），生理盐水组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较存在显著差异（\**P*＜0.05）；尼可地尔组与阿托伐他汀组比较存在显著差异（#*P*＜0.05）。结果提示尼可地尔组及阿托伐他汀组较生理盐水对照组均可减少主动脉粥样斑块损伤面积；但阿托伐他汀组降低斑块面积较尼可地尔组更显著。

88



**图 3-4** **小鼠粥样斑块损伤面积**

A，头臂动脉HE染色（×200）；B，HE染色定量分析图（*n*=7, *x**s* ）

注：三组间比较，\**P*＜0.05，生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较；#*P*＜0.05，尼可地尔组与阿托伐他汀组比较。

**Figure** **3-4** Mice atheromatous plaque damage **area**

A, HE for brachiocephalic artery staining(×200 ); B, HE stainging quantify(*n*=7, *x**s* ) Notes: Compared with the three groups, \**P*＜0.05, Con vs Nicorandil group or Atorvastin group;

#*P*＜0.05, Nicorandil group vs Atorvastin group.

### **2.2** 尼可地尔对**ApoE-/-**小鼠动脉粥样硬化斑块稳定性的影响

主动脉头臂动脉切片油红O染色后，可见主动脉内膜增厚，脂质沉积于管壁内，脂质斑块被染为红色，生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组，脂质斑块在三组小鼠血管内皮的沉积分别为16.3±2.37、10.8±2.05、8.9±2.10（%）（见图3-5，A，

B），生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较存在显著差异（\**P*＜0.05），且尼可地尔组与阿托伐他汀组间也存在显著差异（#*P*＜0.05）。结果提示尼可地尔组及阿托伐他汀组较生理盐水对照组均可减少主动脉粥样斑块脂质含量；但阿托伐他汀组降低斑块脂质面积较尼可地尔组更显著。

天狼猩红染色检测斑块内胶原成分，生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组，三组胶原含量的百分比分别为7.50±2.21; 12.31±2.64; 16.43±1.79；生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较存在显著差异（\**P*＜0.05），且尼可地尔组

89

与阿托伐他汀组间也存在显著差异（#*P*＜0.05）。结果提示尼可地尔组及阿托伐他汀组较生理盐水对照组均可增加主动脉粥样斑块胶原含量；但阿托伐他汀组增加斑块胶原含量较尼可地尔组更显著（见图3-5A，B）。

MOMA-2免疫组化检测斑块内巨噬细胞，生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组，三组巨噬细胞含量的百分比分别为28.91±3.42; 23.53±3.24; 17.80±3.31；生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较存在显著差异（\**P*＜0.05），且尼可地尔组与阿托伐他汀组间也存在显著差异（#*P*＜0.05）。结果提示尼可地尔组及阿托伐他汀组较生理盐水对照组均可减少主动脉粥样斑块巨噬细胞含量；但阿托伐他汀组降低斑块巨噬细胞含量较尼可地尔组更显著。（见图3-5A，B）。

SMA免疫组化检测斑块内平滑肌细胞，生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组，三组平滑肌细胞含量的百分比分别为8.32±2.16; 13.90±2.39; 17.83±2.46；生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较存在显著差异（\**P*＜0.05），且尼可地尔组与阿托伐他汀组间也存在显著差异（#*P*＜0.05）。结果提示尼可地尔组及阿托伐他汀组较生理盐水对照组均可增加主动脉粥样斑块平滑肌细胞含量；但阿托伐他汀组增加斑块平滑肌细胞含量较尼可地尔组更显著（见图3-5A，B）。

易损指数=（巨噬细胞含量+脂质含量）/（胶原含量+平滑肌细胞含量），生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组三组易损指数分别为：1.44±0.20; 0.77±0.14; 0.52±0.15；尼可地尔组或阿托伐他汀组与生理盐水对照组比较存在显著差异（\**P*＜

0.05），可显著降低斑块易损指数，且尼可地尔组与阿托伐他汀组间也存在显著差异

（#*P*＜0.05），阿托伐他汀组降低斑块易损指数较尼可地尔组更显著。（见图3-5C）。



90



**图 3-5** **药物对小鼠斑块成分和稳定性的影响**

A，3组斑块巨噬细胞、平滑肌细胞、胶原及脂质染色结果（×400）；B，对图A所代表结果的统计分析；C，3组斑块损指数的统计分析结果（*n*=7, *x**s*）。

注：三组间比较，\**P*＜0.05，生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较；#*P*＜0.05，尼可地尔组与阿托伐他汀组比较。

**Figure** **3-5** Effects of medicine on the plaque composition and vulnerability index in 3 **groups of mice**

A, Staining for the carotid plaques in macrophages, lipids, collagen, SMCs (×400 ); B, Quantitative analysis of the carotid plaque composition in A;

C, Vulnerability index in 3 groups of mice (*n*=7, *x**s* ).

Notes: Compared with the three groups, \**P*＜0.05, Con vs Nicorandil group or Atorvastin group;

#*P*＜0.05, Nicorandil group vs Atorvastin group.

### **2.3** 尼可地尔对**ApoE-/-**小鼠动脉粥样硬化斑块炎症因子的影响

免疫组化检测斑块内IL-6、TNF-α、MCP-1和MMP-2阳性面积占斑块总面积的百分比。IL-6在生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组三组含量的百分比分别为24.91±3.22; 16.53±3.21; 8.82±2.32；TNF-α在生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组三组含量的百分比分别为16.20±2.53; 11.80±2.12; 5.90±2.18；MCP-1在生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组三组含量的百分比分别为14.50±2.23; 9.34±2.60; 3.43±1.21；MMP-2在生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组三组含量的百分比分别为12.34±1.35; 8.4±1.42; 3.43±0.70（见图3-6A，B）。

91





**图 3-6** **药物干预对小鼠斑块炎症因子的影响**

A，3组斑块IL-6、TNF-α、MCP-1和MMP-2免疫组化染色结果（×200）；B，对图A所代表结果的统计分析（*n*=7, *x**s*）。

注：三组间比较，\**P*＜0.05，生理盐水组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较；#*P*＜0.05，尼可地尔组与阿托伐他汀组比较。

**Figure** **3-6** Effects of medcine on the plaque in 3 groups of **mice**

A, IHC staining for the carotid plaques, IL-6, TNF-α, MCP-1, and MMP-2(×20 0); B, Quantitative analysis of the carotid plaque composition in A(*n*=7, *x**s* ).

Notes: Compared with the three groups, \**P*＜0.05 Con vs Nicorandil group or Atorvastin group;

#*P*＜0.05, Nicorandil group vs Atorvastin group.

92

RT-PCR检测斑块内IL-6、TNF-α、MCP-1和MMP-2在mRNA水平的表达。IL-6在生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组三组的mRNA分别为0.998±0.03; 0.44±0.04; 0.36±0.03；TNF-α在生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组三组含量的mRNA别为1.01±0.03; 0.48±0.04; 0.33±0.04；MCP-1在生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组三组的mRNA分别为1.02±0.02; 0.47±0.03; 0.39±0.03；MMP-2在生理盐水对照组、尼可地尔组和阿托伐他汀组三组的mRNA分别为1.03±0.03; 0.46±0.02; 0.34±0.02（见图3-7）。

综上所述，尼可地尔和阿托伐他汀从蛋白水平和mRNA水平均可降低斑块内炎症因子（\**P*＜0.05），且阿托伐他汀较尼可地尔可更显著地降低斑块内炎症因子（#*P*

＜0.05）。



**图 3-7** **RT-PCR检测3组小鼠斑块内IL-6、TNF-α、MCP-1和MMP-2mRNA水平的表达（*n*=5，**

*X**s* **)。**

注：三组间比较，\**P*＜0.05，生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较；#*P*＜0.05，尼可地尔组与阿托伐他汀组比较。

**Figure 3-7** **RT-PCR to dectect the TNF-α，MCP-1, and MMP-2 mRNA expression on the plaque in 3 groups of mice(*n*=5,** *x**s* **).**

Notes: Compared with the three groups, \**P*＜0.05 Con vs Nicorandil group or Atorvastin group;

#*P*＜0.05, Nicorandil group vs Atorvastin group.

### **2.4** 尼可地尔对动脉粥样硬化中内质网应激相关蛋白的影响

建立动脉粥样硬化模型的ApoE-/-小鼠，分别给予生理盐水、尼可地尔及阿托伐他汀灌胃治疗8周，药物治疗8周后，麻醉小鼠后将小鼠处死，留取主动脉血管行

93

相关检测。行主动脉血管Western blot定量检测内质网应激相关蛋白GRP78、CHOP、P-JNK、JNK、Caspase-12、Bax、Bcl-2. Western blot结果显示，尼可地尔组和阿托伐他汀组的内质网相关蛋白GRP78及CHOP较生理盐水对照组显著降低（*\*P*＜0.05），且阿托伐他汀组的GRP78及CHOP蛋白较尼可地尔组也显著降低（*#P*＜0.05）

（见图3-8, A, B）。生理盐水对照组、尼可地尔组、阿托伐他汀组三组间内质网应激相关蛋白JNK表达水平无明显差异，而P-JNK蛋白在三组间表达存在显著差异，尼可地尔组小鼠和阿托伐他汀小鼠组较生理盐水对照组小鼠可显著降低P-JNK（\**P*

＜0.05，见图3-8，A，B）；尼可地尔组小鼠和阿托伐他汀小鼠组均可降低内质网应激凋亡相关蛋白Caspase-12水平（\**P*＜0.05, 见图3-8, A, B）。Western blot检测还发现尼可地尔组小鼠和阿托伐他汀组小鼠可通过上调Bcl-2蛋白及抑制促凋亡蛋白Bax的表达而有效减少粥样斑块细胞凋亡（见图3-8, A, B）。提示在AS病变中内质网应激是激活的，内质网应激引起凋亡相关蛋白激活，从而促进动脉粥样硬化进展。当给予小鼠尼可地尔或阿托伐他汀干预后，内质网应激被抑制，其下游的凋亡相关蛋白也被抑制，减少斑块内细胞的坏死，一定程度上延缓AS的病程进展。



**图 3-8** **Western Blot检测内质网应激相关蛋白的表达水平（*n*=5，***x**s* **）**

注：三组间比较，\**P*＜0.05，生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较；#*P*＜0.05，尼可地尔组与阿托伐他汀组比较。

**Figure** **3-8** Western blot detected the ERS related proteins expression(***n*=5,** *x**s* **)**

Notes: Compared with the three groups, \**P*＜0.05 Con vs Nicorandil group or Atorvastin group;

#*P*＜0.05, Nicorandil group vs Atorvastin group.

94

### **2.5** 尼可地尔对动脉粥样硬化斑块内细胞凋亡的影响

我们使用TUNEL染色检测各组小鼠粥样斑块内凋亡率（见图3-9所示），生理盐水对照组、尼可地尔组及阿托伐他汀组粥样斑块细胞凋亡指数分别为8.5±1.7% 、

5.9±1.5%、3.2±1.3%，尼可地尔组和阿托伐他汀组较生理盐水对照组粥样斑块内细胞凋亡指数显著降低（\**P*＜0.05），且阿托伐他汀组较尼可地尔组斑块内细胞凋亡显著降低（*#P*＜0.05），提示抑制内质网应激后可有效抑制粥样斑块内细胞凋亡。



**C o n**

**N ic o r a n d il ** **A t o r v a s t a t in**



**\***

# **\***

**1 0**

**8**

**T U N E L**

**/p la q u e a r e a (% )**

**6**

**4**

**2**

**0**

**图 3-9** **TUNEL检测粥样斑块内细胞凋亡（×1 00）（*n*=5，***x**s* **）**

注：三组间比较，\**P*＜0.05，生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较；#*P*＜0.05，尼可地尔组与阿托伐他汀组比较。

**Figure** **3-9** TUNEL detected atherosclerotic plaque cells apoptosis, (×100)(***n*=5,** *x**s* **)**

Notes: Compared with the three groups, \**P*＜0.05 Con vs Nicorandil group or Atorvastin group;

#*P*＜0.05, Nicorandil group vs Atorvastin group.

95

### **2.6** 尼可地尔对动脉粥样硬化中**NF-κB**通路蛋白的影响

处死小鼠后，行主动脉血管的Western blot检测NF-κB通路相关蛋白。Western blot结果显示，生理盐水对照组、尼可地尔组、阿托伐他汀组三组间P65、P50表达水平无明显差异（见图3-10A, B）；给予尼可地尔或阿托伐他汀治疗的小鼠较生理盐水组可明显上调蛋白IκBα表达水平，从而下调蛋白P-P65表达水平，差异有统计学意义（见图3-10A, B）。提示在AS病变中NF-κB信号通路是激活的，尼可地尔和阿托伐他汀可抑制内质网应激，使IκBα蛋白表达显著上调，干预NF-κB信号通路相关蛋白P-P65的活化，进而起到抑制NF-κB信号通路激活的作用，一定程度上延缓AS的病程进展。



**图 3-10** Western**检测NF-κB通路相关蛋白，（*n*=5，***x**s* **）**

注：三组间比较，\**P*＜0.05，生理盐水对照组与尼可地尔组或阿托伐他汀组比较；#*P*＜0.05，尼可地尔组与阿托伐他汀组比较。

**Figure** **3-10** Westernblot detected NF-κB siginal related protein, (***n*=5,** *x**s* **)**

Notes: Compared with the three groups, \**P*＜0.05 Con vs Nicorandil group or Atorvastin group;

#*P*＜0.05, Nicorandil group vs Atorvastin group.

## **3** 讨论

尼可地尔药物干预组和阿托伐他汀组较生理盐水对照组均可降低动脉粥样斑块内内质网应激标志蛋白GRP78和CHOP，减轻内置应激，同时降低了CHOP蛋白下游的凋亡相关蛋白P-JNK、Caspase-12的比例，升高了Bcl-2/Bax的比例，抑制了斑块内的细胞凋亡情况，稳定了斑块；同时使IκBα蛋白表达显著上调，上调后干预NF-κB信号通路相关蛋白P-P65的活化，进而起到抑制NF-κB信号通路激活的作用，

96

抑制了斑块内的炎症反应，改变了斑块内的成分比例，稳定了斑块。综上所述，尼可地尔和阿托伐他汀均能降低斑块内的内质网应激，减少斑块形成，减少细胞凋亡，稳定斑块，从而达到减缓动脉粥样硬化发展的效果。尼可地尔与阿托伐他汀有相似的抑制内质网应激延缓动脉粥样硬化的作用。我们的研究假说具体如下：



**图 3-11** **研究假说**

**Figure** **3-11** Research **hypothesis**

### **3.1** 靶向干预内质网应激干预动脉粥样硬化

内质网应激和/或（UPR）未折叠蛋白反应在动脉粥样硬化的发生和进展中扮演着重要的角色，不仅是因为它让我们意识到其在疾病过程中的重要作用，更重要的是为我们指明了潜在的靶向干预治疗方向。目前已经有许多干预UPR的策略开始实施，尤其对那些认为与内质网应激有明显相关的疾病或功能紊乱。目前至少有三种常用的方法被用来解决这个问题。

一种方法是直接减少ER应激水平，通过加入外源化学小分子。通常使用的化学伴侣包括牛磺酸共轭熊去氧胆酸（TUDCA）和4-丁酸苯酯（PBA）。这些小分子化合物能够进入细胞并改善ER应激，虽然它们作用的机理不清楚。TUDCA和PBA已证实在体外培养的细胞和啮齿类动物模型可以显著减少ER应激水平[222]。在体实验中已经证实，化学伴侣可以防止内质网应激相关的神经退行性病变的细胞凋亡

[223]，胰腺癌的细胞死亡[224]，瘦素抵抗和胰岛素抵抗[225]。

另一种方法降低ER应激水平是提高UPR具体保护措施更有效地处理未折叠蛋

97

白。通过过表达ER的伴侣包括GRP78和钙网织蛋白[226, 227]。但是外源性基因治疗的技术困难，可能无法使这个策略作为一种实用的治疗，最近的信息关于识别BIX、小分子诱导内源GRP78的表达是很有价值的[228]。BIX通路的激活是通过ATF6途径介导的，从而提高该基因的转录编码蛋白GRP78。在小鼠和细胞培养实验中，BIX已被证明能保护内质网应激相关的神经元细胞、视网膜细胞和成骨细胞的凋亡[82, 229，

230]. 最近，已经表明，AMP激活的蛋白激酶（AMPK）激动剂，包括氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸（AICAR）、二甲双胍和A-769662，可以减轻细胞棕榈酸相关的内质网应激[231]。该保护作用与ER 150kD的伴侣分子增强氧调节蛋白（ORP150）表达相关和并依赖于AMPK调节激活的转录因子FoxO1. AICAR也被证明在高脂饮食喂养小鼠肝脏中能有效地降低ER应激水平[231]。我们的研究中使用的尼可地尔可明显减少内质网应激中的关键蛋白GRP78和CHOP，一定程度上减轻动脉粥样硬化中的内质网应激，减轻了ApoE-/-小鼠的动脉粥样硬化斑块，减缓了动脉粥样硬化进程。

第三种方法是针对特定的因子引起的内质网应激下游一些不利的反应。

Salubrinal是一种化合物，抑制磷酸酶GADD34重新激活eIF2。通过维持诱导翻译的通路PERK, Salubrinal被赋予增加保护内质网错误折叠和未折叠蛋白质的积累的功能[232]。其它可能的干预目标包括炎症和/或促凋亡因子如ASK1、p38MAPK、

GADD153/CHOP。如上所述，GADD153/CHOP基因敲除小鼠表现出抗动脉粥样硬化。同样的，我们的研究也得出了与上述类似的结果。我们的实验中给予尼可地尔和阿托伐他汀药物干预后的ApoE-/-小鼠粥样斑块中的CHOP蛋白显著下调，显著降低了小鼠的粥样斑块。我们还检测其下游的凋亡相关蛋白Caspase-12、P-JNK、Bax也明显下调，两种药物减轻了斑块中的细胞凋亡，有维持斑块稳定，减缓粥样硬化进程的作用。最近发现糖原合成酶激酶（GSK）-3作为另一个参与内质网应激信号通路的因子。GSK-3是多环节处理后的丝氨酸/苏氨酸激酶，其被有丝分裂和生长因子调节，这些因子包括胰岛素、IGF-1、EGF等以及细胞应激反应包括热冲击、明显的氧化应激、内质网应激等[233]。目前已证明，GSK-3的抑制或缺乏可以保护细胞内质网应激相关的细胞凋亡和脂质积累[218, 234]。GSK-3抑制剂也能抑制动物体内的动脉粥样硬化[229]。高脂喂养辅以GSK-3抑制剂（丙戊酸钠或锂）干预的小鼠，具有降低肝脏GSK-3活性和减少主动脉窦粥样硬化病灶的作用[218, 234]。因集中在UPR通路下游的优势使它对有害效应区域具有针对性，从而保护了UPR的完整性。

ER应激已牵涉几种疾病，包括动脉粥样硬化和糖尿病的发生和进展。在许多情况下的具体作用由ER应激发挥，它和疾病的相关性以及对疾病进展的贡献仍需被明确。在不久的将来，通过体外和在体研究，继续测试和验证ER应激对加速动脉粥样硬化的贡献是非常重要的。对这一途径认识的增加可能会导致新的干预策略的建立，以及未来抗动脉粥样硬化药物的开发。我们的研究是基于和尼可地尔药理学相似的

98

药物的提示和我们在临床研究中观察到尼可地尔有改善心绞痛患者急性心血管事件的功能，进一步探索尼可地尔在动脉粥样硬化斑块中是否有改善内质网应激，稳定粥样斑块的作用，进而抑制动脉粥样硬化。

### **3.2** 尼可地尔抑制动脉粥样硬化内质网应激

在临床工作中，尼可地尔最大血药浓度为152.3±29.1ng/mL，且既往的研究报道提示给予尼可地尔干预7天后血药浓度即可达较高血药浓度即0.9mol/L（15mg/kg/d）

[196]. 我们根据上述临床研究和既往的基础实验使用了15mg/kg/d的相同剂量在本研究的ApoE-/-小鼠中，我们实验中发现尼可地尔并不影响小鼠的血流动力学参数如血压和心率。因此，在本研究中所用尼可地尔的剂量被认为是等同于临床使用的剂量。

我们的研究中发现给予形成动脉粥样硬化的ApoE-/-小鼠尼可地尔和阿托伐他汀组灌胃治疗8周的小鼠较生理盐水组小鼠在血脂和体重上，三组小鼠并无明显差异，这提示尼可地尔或阿托伐他汀在我们的实验中并未对小鼠的脂质代谢造成影响，上述药物并不是从脂质代谢来干预小鼠动脉粥样硬化。我们发现尼可地尔组小鼠和阿托伐他汀组小鼠可明显减少主动脉的动脉粥样斑块面积。我们进一步检测了小鼠动脉粥样硬化斑块中内质网应激的标志性蛋白GRP78和CHOP，我们发现无论是从蛋白水平还是从基因水平尼可地尔组较生理盐水对照组可显著降低GRP78和CHOP的水平，提示尼可地尔可能可以抑制内质网应激，从而减少动脉粥样硬化斑块的形成。我们的研究结果与Edward Thorp等人的结果一致。他们的研究表明，在高脂喂养的ApoE-/-和Ldlr-/-老鼠中CHOP促进斑块生长、斑块内细胞凋亡和斑块坏死，将CHOP基因敲除可减少动脉粥样的形成和斑块的坏死[38]。这些数据为CHOP的内质网应激效应和斑块坏死之间的因果关系提供了直接证据，并提出干预减弱这条内质网应激途径可能会减少斑块进展。此外，Miyoshi等人，已经证明CHOP的表达与人类冠状动脉病变细胞凋亡和斑块易损之间有着密切的联系[39]。

我们的研究发现尼可地尔组和阿托伐他汀组较生理盐水组小鼠降低动脉粥样内质网应激CHOP蛋白后，亦可降低其下游的P-JNK和Caspase-12等凋亡蛋白，且可以上调Bcl-2/Bax的比例具有抗凋亡的作用。随后我们继续用TUNEL方法检测了斑块内细胞的凋亡情况，我们发觉尼可地尔组和阿托伐他汀组可显著降低斑块内凋亡细胞的比例，进一步证实了抑制内质网应激，抑制CHOP表达有抑制斑块内细胞凋亡的作用。CHOP诱导的细胞凋亡的一种机制涉及与BCL-2家族蛋白质的成员相互作用。一个这样的相互作用涉及转录下调的BCL-2。这种机制已被在体外实验CHOP转染的鼠成纤维细胞系和神经元细胞中被证明[235-237]。在体动物实验中使巨噬细胞中Bcl-2基因缺失，增加了晚期动脉粥样硬化中巨噬细胞的凋亡，与CHOP介导的下调Bcl-2的凋亡机制一致[238, 239]。CHOP也可在诱导线粒体凋亡中起一定作用的BIM的转录[240]。我们的研究结果尼可地尔通过下调CHOP后上调Bcl-2/Bax的比例，进而

99

抑制细胞凋亡与上述CHOP促凋亡的机制相吻合。CHOP诱导细胞凋亡的第二个主要机制包括钙信号转导通路。CHOP-依赖ER氧化酶的激活，主要通过激活的ER钙通道IP3R1触发ER钙释放[241]。细胞质钙激活钙敏感性激酶CaMKII，这又引发了许多下游的细胞凋亡途径，包括诱导的Fas死亡受体，JNK的激活和线粒体释放凋亡小体，诱发凋亡的激活[242]。我们的研究中尼可地尔干预组小鼠斑块中的p-JNK较生理盐水对照组显著下调，与之再次吻合。综上所述，我们的研究结果与CHOP诱导细胞凋亡的机制相符，我们推测尼可地尔抑制内质网应激后抑制细胞凋亡可能与

CHOP抑制细胞凋亡的机制密切相关。

内质网应激在动脉粥样硬化斑块破裂的发展中起着起重要作用。关于动脉粥样硬化的发生和发展，已有研究证明，ER应激和未折叠蛋白反应活化的标记物存在于ApoE-/-小鼠巨噬细胞形成动脉粥样硬化的各个阶段[205]。另外有报道示，在正常猪内皮细胞长期处于内质网应激的模型，可激活动脉区域未折叠蛋白反应，生理条件下导致疾病损伤区域的易损性[41]。对于易损斑块，Myoishi等人表明内质网伴侣分子在粥样硬化斑块或破裂斑块薄的纤维帽以及不稳定心绞痛患者斑块旋切术的标本上的表达均上调[39]。最近，Thorp等人使用CHOP基因和载脂蛋白E双基因敲除小鼠揭示了内质网应激和动脉粥样硬化之间存在的因果关系[38]。在我们的研究中，8个星期的尼可地尔治疗可显著减弱动脉粥样硬化病变中CHOP和GRP78的表达，减少粥样斑块，更重要的是可改善粥样斑块中的成分比例，如增加内皮细胞和胶原纤维的比例，减少巨噬细胞的聚集和脂质的堆积，从而减少了斑块的易损性，稳定了斑块。这些结果表明，尼可地尔对动脉粥样硬化斑块的有益效果至少部分是通过介导减少内质网应激达到的。在这方面，二氮嗪，一个单纯的ATP敏感性钾通道开放剂，此前被报道可减少β细胞内质网应激和改善β细胞功能[200]。在神经细胞中，钾通道开放剂通过抑制内质网应激途径造成的脑缺血再灌注损伤防止神经元细胞的凋亡[243]。因此上述研究支持，ATP敏感性钾通道开放剂尼可地尔在我们的实验模型中可能有减少ER应激的作用。

巨噬细胞的凋亡在斑块破裂的部位被检测到，并且它是斑块不稳定的一个重要触发点[244]。已有研究报道，氧化型LDL诱导CHOP的上调被牵连到巨噬细胞的凋亡[245]。在我们的研究中，尼可地尔组小鼠斑块较对照组小鼠的斑块中CHOP及CHOP下游的凋亡蛋白P-JNK、Caspase-12及Bax明显下调，斑块内细胞凋亡明显减少。先前的研究报道，尼可地尔能减少LPS诱导的巨噬细胞和淋巴细胞TNFα的产生[246]。我们的研究中，检测了斑块中的巨噬细胞、平滑肌细胞、脂质以及胶原纤维，发现给予尼可地尔组小鼠较对照组小鼠斑块中的的脂质及巨噬细胞比例明显减少而平滑肌细胞及胶原纤维的含量明显增加，尼可地尔组小鼠较对照组小鼠斑块的易损指数显著降低，提示尼可地尔改变粥样斑块成分，稳定斑块。因此，由尼可地尔对内质

100

网应激的抑制可能有助于斑块的稳定性。

许多实验室的证据表明，细胞在粥样硬化病变，尤其是在进展期的动脉粥样硬化，ER应激升高和/或长期处于应激压力的状态。对于巨噬细胞来说，长期内质网应激可能是一个导致进展期斑块内巨噬细胞死亡和随后的斑块坏死的主要原因。长期的ER应激也可能促进斑块内细胞炎症反应[206, 247]。ER应激在平滑肌细胞和内皮细胞的作用还未确定，因此可能是未来研究的重要领域。在机制方面的认识，还有很多工作要做，确定UPR的不同分支如何共同作用的，例如通过Bcl2的蛋白家族和/或JNK，如何共同作用在3种类型细胞中导致细胞死亡、炎症和其他病理影响等。此外，我们对效应分子、死亡信号通路和炎症之间的精确分子联系的理解是不完整的，而填补这些关键空白是未来的一个重要目标。目前，相关动脉粥样硬化的不同阶段需要在动脉粥样硬化的动物模型中使用精确分子遗传学和药理因果关系的策略进行测试。

除了ER应激的衰减，本研究还发现，尼可地尔在ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化病变可以显著减弱促炎细胞因子IL-6、TNFα、MCP-1以及MMP-2的表达。以前的实验和临床研究有报道，尼可地尔可以减少炎症因子的生成。例如，尼可地抑制由巨噬细胞[248]和淋巴细胞[246]通过NF-κB信号通路产生的炎性细胞因子。还有研究证明，尼可地尔衍生的一氧化氮，可抑制细胞因子和粘附分子在转录水平的表达[249]。我们的研究中尼可地尔无论在蛋白水平还是转录水平均可抑制动脉硬化小鼠斑块中的炎症因子和趋化因子，我们进一步探索了尼可地尔抑制内质网应激后是否影响了NF-κB信号通路进而影响了其下游的炎症因子的表达。我们用westernblot检测了动脉硬化小鼠主动脉粥样斑块中关于NF-κB信号通路的相关蛋白，发现尼可地尔组较生理盐水对照组可显著上调IκBα蛋白的表达，抑制了P-P65蛋白的表达，而未对P65和P50蛋白的表达产生明显影响。上述结果提示尼可地尔减少炎症反应对血管的保护作用部分可能与其上调IκBα蛋白的表达，抑制NF-κB信号通路的活性有关。

综上所述，尼可地尔可降低动脉粥样斑块内内质网应激标志蛋白GRP78 和

CHOP，减轻内置网应激，同时降低了CHOP蛋白下游的凋亡相关蛋白P-JNK、Caspase-12的比例，升高了Bcl-2/Bax的比例，抑制了斑块内的细胞凋亡，稳定了斑块；同时使IκBα蛋白表达显著上调，上调后干预NF-κB信号通路相关蛋白P-P65的活化，进而起到抑制NF-κB信号通路激活的作用，抑制了斑块内的炎症反应，改变了斑块内的成分比例，稳定了斑块，从而达到减缓动脉粥样硬化发展效果。从内质网应激和炎症反应两个角度阐述了尼可地尔保护动脉粥样硬化的机制，为靶向干预动脉粥样硬化提供了新的研究思路和理论依据；同时也为临床更好地使用尼可地尔治疗心血管疾病提供了科学的理论依据。

101

## **4** 小结

4.1尼可地尔可以通过降低动脉粥样硬化过程中的内质网应激，减轻动脉粥样硬化斑块，同时还可稳定斑块，减少斑块炎症反应，进而减缓动脉粥样硬化进程。

4.2尼可地尔可降低动脉粥样斑块内内质网应激标志蛋白GRP78和CHOP，减轻内置网应激，同时降低了CHOP蛋白下游的凋亡相关蛋白P-JNK、Caspase-12的比例，升高了Bcl-2/Bax的比例，抑制了斑块内的细胞凋亡，稳定了斑块；同时使IκBα蛋白表达显著上调，上调后干预NF-κB信号通路相关蛋白P-P65的活化，进而起到抑制NF-κB信号通路激活的作用，抑制了斑块内的炎症反应，改变了斑块内的成分比例，稳定了斑块，从而达到减缓动脉粥样硬化发展效果。

4.3通过比较尼可地尔和阿托伐他汀对动脉粥样的作用，发现尼可地尔与阿托伐他汀有相似的作用可抑制内质网应激导致的细胞凋亡，还可抑制炎症信号通路NF-κB激活，进而抑制动脉粥样硬化的进展。

102

结**论**

1.本实验采用AAV9-CMV-GFP病毒尾静脉注射转染ApoE-/-的AS模型小鼠，发现AAV9-CMV-GFP可以稳定地在动脉粥样硬化斑块中表达，转染高峰在35天左右，且可以较长时间在斑块内表达，可作为基因治疗动脉粥样硬化的良好载体。

2.本实验发现较高剂量地转染AAV9病毒后并未对ApoE-/-小鼠的心肌、肝肾功造成明显损害，这表明转染AAV9病毒对心脏、肝脏、肾脏等身体重要的器官无明显损害，证明AAV9病毒作为干预动脉粥样硬化的基因载体是安全、可行的。

3. IκBα基因过表达，可以改变ApoE-/-小鼠AS斑块成分比例，降低斑块内炎症反应，提示IκBα有稳定斑块，有延缓AS的病程发展作用。

4. ApoE-/-小鼠动脉粥样硬的疾病进程中NF-κB信号通路过度激活，IκBα基因在形成AS的ApoE-/-小鼠过表达后，靶向抑制小鼠主动脉斑块NF-κB信号通路的激活，抑制了NF-κB信号通路下游的炎性靶基因的表达如TNF-α，IL-6及趋化因子MCP-1和金属基质蛋白酶MMP-2的表达，从而抑制动脉粥样硬化的进展。

5.尼可地尔可降低动脉粥样斑块内内质网应激标志蛋白GRP78和CHOP，减轻内置网应激，同时降低了CHOP蛋白下游的凋亡相关蛋白P-JNK、Caspase-12的比例，升高了Bcl-2/Bax的比例，抑制了斑块内的细胞凋亡，稳定了斑块；同时使IκBα蛋白表达显著上调，上调后干预NF-κB信号通路相关蛋白P-P65的活化，进而起到抑制NF-κB信号通路激活的作用，抑制了斑块内的炎症反应，改变了斑块内的成分比例，稳定了斑块，从而达到减缓动脉粥样硬化发展效果。

6.通过比较尼可地尔和阿托伐他汀对动脉粥样的作用，发现尼可地尔与阿托伐他汀有相似的作用可抑制内质网应激导致的细胞凋亡，还可抑制炎症信号通路NF-κB激活，进而抑制动脉粥样硬化的进展。

103

致**谢**

感谢我的导师杨毅宁教授，在我读博士三年来对我的悉心教导、关怀和鼓励。从投身杨毅宁教授门下起，时时感受导师高尚的师德、精湛的教学、严谨的治学态度、广博深厚的学识和诚恳正直的做人原则，导师是我终身学习的楷模。在此衷心感谢导师杨毅宁教授对我的谆谆教诲和精心培养！在今后的学习和工作中，我将不断努力，争创佳绩。

感谢心脏中心的马依彤教授、李晓梅老师、谢翔老师、马翔老师、付真彦老师、黄莺老师。感谢冠心病实验室的陈邦党老师、刘芬老师，陈小翠老师，盖敏涛老师，王丽凤老师，正是他们耐心的指导和无私的帮助，才使得课题顺利完成。感谢谢佳、赖红梅、翟慧、贺春晖、王雪梅、罗俊一、高静、徐锐、廖武、赵强等同学的莫大帮助。有了他们的支持、鼓励和帮助，使我在这三年的学习生活中充实的度过。

感谢临床医学研究院郑树涛、杨宁、吕国栋、刘辉、张传ft、李亮、毕晓娟、王慧、张雪等老师我实验的大力帮助。感谢新疆医科大学动物实验中心的全体工作人员，特别是动物实验中心的王忠、连军等老师对我的关心和帮助，我将铭记在心。

感谢新疆医科大学临床医学研究院的客座教授，澳大利亚Baker心脏病研究所高晓明研究员对本实验的精心指导和热忱帮助。

感谢ft东大学心血管研究所的郝盼盼、杨晓燕以及河北医科大学路永刚老师，天津医科大学的张荣信教授，薛振义老师对我的指导。

最后，我要衷心感谢我的家人，我的爸爸妈妈，是他们在生活上给予我的关心、支持和鼓励，才使得我顺利完成学业！

104

参考文献

[1] Yu XH, Zheng XL, Tang CK. Nuclear Factor-kappaB Activation as a Pathological Mechanism of Lipid Metabolism and Atherosclerosis[J]. Advances in clinical chemistry, 2015, 70: 1-30.

[2] Yu XH, Qian K, Jiang N, et al. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis[J]. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2014, 428: 82-88.

[3] Boudreau LH, Duchez AC, Cloutier N, et al. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation[J]. Blood, 2014, 124(14): 2173-2183.

[4] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options[J]. Nature medicine, 2011, 17(11): 1410-1422.

[5] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2012, 32(9): 2045-2051.

[6] Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism[J]. Cell, 1986, 47(6): 921-928.

[7] Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions[J]. Nature reviews Cardiology, 2010, 7(2): 77-86.

[8] Wyss CA, Neidhart M, Altwegg L, et al. Cellular actors, Toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes[J]. European heart journal, 2010, 31(12): 1457-1469.

[9] Yonekawa K, Neidhart M, Altwegg LA, et al. Myeloid related proteins activate Toll-like receptor 4 in human acute coronary syndromes[J]. Atherosclerosis, 2011, 218(2): 486-492.

[10] Niessner A, Shin MS, Pryshchep O, et al. Synergistic proinflammatory effects of the antiviral cytokine interferon-alpha and Toll-like receptor 4 ligands in the atherosclerotic plaque[J]. Circulation, 2007, 116(18): 2043-2052.

[11] Libby P, Ridker PM, Hansson GK, et al. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2009, 54(23): 2129-2138.

[12] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. The New England journal of medicine, 2005, 352(16): 1685-1695.105

[13] Narducciml, Grasselli A, Biasucci LM, et al. High telomerase activity in neutrophils from unstable coronary plaques[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2007, 50(25): 2369-2374.

[14] Biasucci LM, Liuzzo G, Giubilato S, et al. Delayed neutrophil apoptosis in patients with unstable angina: relation to C-reactive protein and recurrence of instability[J]. European heart journal, 2009, 30(18): 2220-2225.

[15] Freedman JE, Larson MG, Tanriverdi K, et al. Relation of platelet and leukocyte inflammatory transcripts to body mass index in the Framingham heart study[J]. Circulation, 2010, 122(2): 119-129.

[16] Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, et al. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes[J]. Circulation, 2000, 101(25): 2883-2888.

[17] De Palma R, Del Galdo F, Abbate G, et al. Patients with acute coronary syndrome show oligoclonal T-cell recruitment within unstable plaque: evidence for a local, intracoronary immunologic mechanism[J]. Circulation, 2006, 113(5): 640-646.

[18] Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease[J]. The Journal of clinical investigation, 1993, 91(4): 1351-1357.

[19] Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis[J]. Nature reviews Cardiology, 2009, 6(6): 399-409.

[20] Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding[J]. The Journal of clinical investigation, 2006, 116(1): 115-24.

[21] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion[J]. The Journal of clinical investigation, 1996, 97(7): 1715-1722.

[22] Plump AS, Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells[J]. Cell, 1992, 71(2): 343-353.

[23] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E[J]. Science, 1992, 258(5081): 468-471.

[24] Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery[J]. The Journal of clinical investigation, 1993, 92(2): 883-893.106

[25] Gareus R, Kotsaki E, Xanthoulea S, et al. Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis[J]. Cell metabolism, 2008, 8(5): 372-383.

[26] Goossens P, Gijbels MJ, Zernecke A, et al. Myeloid type I interferon signaling promotes atherosclerosis by stimulating macrophage recruitment to lesions[J]. Cell metabolism, 2010, 12(2): 142-153.

[27] Kanters E, Gijbels MJ, van der Made I, et al. Hematopoietic NF-kappaB1 deficiency results in small atherosclerotic lesions with an inflammatory phenotype[J]. Blood, 2004, 103(3): 934-940.

[28] Ferreira V, van Dijk KW, Groen AK, et al. Macrophage-specific inhibition of NF-kappaB activation reduces foam-cell formation[J]. Atherosclerosis, 2007, 192(2): 283-290.

[29] Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis[J]. Nature medicine, 2009, 15(12): 1383-1391.

[30] Kanters E, Pasparakis M, Gijbels MJ, et al. Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. The Journal of clinical investigation, 2003, 112(8): 1176-1185.

[31] Wolfrum S, Teupser D, Tan M, et al. The protective effect of A20 on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice is associated with reduced expression of NF-kappaB target genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(47): 18601-18606.

[32] Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced[J]. Current opinion in lipidology, 1998, 9(5): 471-474.

[33] Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis[J]. Nature reviews Immunology, 2010, 10(1): 36-46.

[34] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Cell, 2011, 145(3): 341-355.

[35] Kedi X, Ming Y, Yongping W, et al. Free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death and activated both ER-and mitochondrial-dependent death pathway[J]. Atherosclerosis, 2009, 207(1): 123-130.

[36] Nakano T, Watanabe H, Ozeki M, et al. Endoplasmic reticulum Ca2+ depletion induces endothelial cell apoptosis independently of caspase-12[J]. Cardiovascular research, 2006, 69(4): 908-915.107

[37] Tsukano H, Gotoh T, Endo M, et al. The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2010, 30(10): 1925-1932.

[38] Thorp E, Li G, Seimon TA, et al. Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe-/-and Ldlr-/-mice lacking CHOP[J]. Cell metabolism, 2009, 9(5): 474-481.

[39] Myoishi M, Hao H, Minamino T, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome[J]. Circulation, 2007, 116(11): 1226-1233.

[40] Sanson M, Auge N, Vindis C, et al. Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression[J]. Circulation research, 2009, 104(3): 328-336.

[41] Civelek M, Manduchi E, Riley RJ, et al. Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis[J]. Circulation research, 2009, 105(5): 453-461.

[42] Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2002, 22(9): 1370-1380.

[43] Werstuck GH, Khan MI, Femia G, et al. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum dysfunction is associated with accelerated atherosclerosis in a hyperglycemic mouse model[J]. Diabetes, 2006, 55(1): 93-101.

[44] Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, et al. NAD(P) H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells[J]. Molecular and cellular biology, 2004, 24(24): 10703-10717.

[45] Acton RT, Go RC, Roseman JM. Genetics and cardiovascular disease[J]. Ethnicity & disease, 2004, 14(4): S2-8-16.

[46] Ross R. Cell biology of atherosclerosis[J]. Annual review of physiology, 1995, 57: 791-804.

[47] Daugherty A, Rateri DL. Development of experimental designs for atherosclerosis studies in mice[J]. Methods, 2005, 36(2): 129-138.

[48] Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells[J].

108

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(10):4471-4475.

[49] van Ree JH, van den Broek WJ, Dahlmans VE, et al. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice[J]. Atherosclerosis, 1994, 111(1): 25-37.

[50] Seitz A, Gourevitch D, Zhang XM, et al. Sense and antisense transcripts of the apolipoprotein E gene in normal and ApoE knockout mice, their expression after spinal cord injury and corresponding human transcripts[J]. Human molecular genetics, 2005, 14(18): 2661-2670.

[51] Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression[J]. Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology/American Heart Association, 1994, 14(1): 141-147.

[52] Napoli C, Palinski W, Diminno G, et al. Determination of atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice[J]. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD, 2000, 10(4): 209-215.

[53] Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, et al. In vivo angiographic detection of vascular lesions in apolipoprotein E-knockout mice using a synchrotron radiation microangiography system[J]. Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society, 2002, 66(11): 1057-1059.

[54] Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, et al. Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1999, 19(4): 847-853.

[55] Tse J, Martin-McNaulty B, Halks-Miller M, et al. Accelerated atherosclerosis and premature calcified cartilaginous metaplasia in the aorta of diabetic male Apo E knockout mice can be prevented by chronic treatment with 17 beta-estradiol[J]. Atherosclerosis, 1999, 144(2): 303-313.

[56] Smith JD, Breslow JL. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research[J]. Journal of internal medicine, 1997, 242(2): 99-109.

[57] Lin KH, Hsu CY, Huang YP, et al. Chlorophyll-related compounds inhibit cell adhesion and inflammation in human aortic cells[J]. Journal of medicinal food, 2013, 16(10): 886-898.

[58] White K, Buning H, Kritz A, et al. Engineering adeno-associated virus 2 vectors for targeted gene delivery to atherosclerotic lesions[J]. Gene therapy, 2008,

109

15(6):443-451.

[59] Skubis-Zegadlo J, Stachurska A, Malecki M. Vectrology of adeno-associated viruses(AAV)[J]. Medycyna wieku rozwojowego, 2013, 17(3): 202-206.

[60] White SJ, Nicklin SA, Buning H, et al. Targeted gene delivery to vascular tissue in vivo by tropism-modified adeno-associated virus vectors[J]. Circulation, 2004, 109(4): 513-519.

[61] Work LM, Buning H, Hunt E, et al. Vascular bed-targeted in vivo gene delivery using tropism-modified adeno-associated viruses[J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2006, 13(4): 683-693.

[62] Nathwani AC, Davidoff A, Hanawa H, et al. Factors influencing in vivo transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA[J]. Blood, 2001, 97(5): 1258-1265.

[63] Koeberl DD, Alexander IE, Halbert CL, et al. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(4): 1426-1431.

[64] Aikawa R, Huggins GS, Snyder RO. Cardiomyocyte-specific gene expression following recombinant adeno-associated viral vector transduction[J]. The Journal of biological chemistry, 2002, 277(21): 18979-18985.

[65] Prasad KM, Xu Y, Yang Z, et al. Topoisomerase inhibition accelerates gene expression after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the mammalian heart[J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2007, 15(4): 764-771.

[66] Bostick B, Ghosh A, Yue Y, et al. Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration[J]. Gene therapy, 2007, 14(22): 1605-1609.

[67] Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, et al. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors[J]. Nature medicine, 2004, 10(8): 828-834.

[68] Inagaki K, Fuess S, Storm TA, et al. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8[J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2006, 14(1): 45-53.

[69] Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, et al. Recombinant adeno-associated virus

110

Serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo[J]. Circulation research, 2006, 99(4):e3-e9.

[70] Wang Z, Zhu T, Qiao C, et al. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart[J]. Nature biotechnology, 2005, 23(3): 321-328.

[71] Ghosh A, Yue Y, Long C, et al. Efficient whole-body transduction with trans-splicing adeno-associated viral vectors[J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2007, 15(4): 750-755.

[72] Pacak CA, Sakai Y, Thattaliyath BD, et al. Tissue specific promoters improve specificity of AAV9 mediated transgene expression following intra-vascular gene delivery in neonatal mice[J]. Genetic vaccines and therapy, 2008, 6: 13.

[73] Virag T, Cecchini S, Kotin RM. Producing recombinant adeno-associated virus in foster cells: overcoming production limitations using a baculovirus-insect cell expression strategy[J]. Human gene therapy, 2009, 20(8): 807-817.

[74] Chen H. Intron splicing-mediated expression of AAV Rep and Cap genes and production of AAV vectors in insect cells[J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2008, 16(5): 924-930.

[75] Chen H. Exploiting the Intron-splicing Mechanism of Insect Cells to Produce Viral Vectors Harboring Toxic Genes for Suicide Gene Therapy[J]. Molecular therapy Nucleic acids, 2012, 1: e57.

[76] Noda A, Hirai Y, Kodama Y, et al. Easy detection of GFP-positive mutants following forward mutations at specific gene locus in cultured human cells[J]. Mutation research, 2011, 721(1): 101-107.

[77] Gao XM, Kiriazis H, Moore XL, et al. Regression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in mice[J]. American journal of physiology Heart and circulatory physiology, 2005, 288(6): H2702-707.

[78] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. The New England journal of medicine, 1999, 340(2): 115-126.

[79] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead[J]. Cell, 2001, 104(4): 503-16.

[80] Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis[J]. Clinical immunology, 2010, 134(1): 33-46.

[81] Yang X, Peterson L, Thieringer R, et al. Identification and validation of genes affecting aortic lesions in mice[J]. The Journal of clinical investigation, 2010, 120(7): 2414-2422.111

[82] Seimon TA, Obstfeld A, Moore KJ, et al. Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(52): 19794-19799.

[83] Smith JD, James D, Dansky HM, et al. In silico quantitative trait locus map for atherosclerosis susceptibility in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2003, 23(1): 117-122.

[84] Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, et al. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein[J]. Annual review of genetics, 1990, 24: 133-170.

[85] Bentzon JF, Falk E. Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease[J]. Currentopinioninlipidology, 2010, 21(5): 434-440.

[86] Miller NE. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis[J]. American heart journal, 1987, 113(2 Pt 2): 589-597.

[87] Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, et al. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2009, 29(6): 870-876.

[88] Davidson MH. Update on CETP inhibition[J]. Journal of clinical lipidology, 2010, 4(5): 394-398.

[89] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree[J]. Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology/American Heart Association, 1994, 14(1): 133-140.

[90] Dansky HM, Charlton SA, Harper MM, et al. T and B lymphocytes play aminor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(9): 4642-4646.

[91] Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1998, 18(5): 842-851.

[92] Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation[J]. Circulation

112

Research, 1999, 85(2):199-207.

[93] Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, et al. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2000, 20(12): 2587-2592.

[94] Kheradmand M, Niimura H, Kuwabara K, et al. Association of inflammatory gene polymorphisms and conventional risk factors with arterial stiffness by age[J]. Journal of epidemiology/Japan Epidemiological Association, 2013, 23(6): 457-465.

[95] Parahuleva MS, Maj R, Holschermann H, et al. Regulation of monocyte/ macrophage function by factor VII activating protease(FSAP)[J]. Atherosclerosis, 2013, 230(2): 365-372.

[96] Han Y, Zhang P, Chen Y, et al. Co-delivery of plasmid DNA and doxorubicin by solid lipid nanoparticles for lung cancer therapy[J]. International journal of molecular medicine, 2014, 34(1): 191-196.

[97] Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles[J]. Science, 1965, 149(3685): 754-756.

[98] Zinn E, Vandenberghe LH. Adeno-associated virus: fit to serve[J]. Current opinion in virology, 2014, 8: 90-97.

[99] Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, et al. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection[J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2008, 16(6): 1073-1080.

[100] Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, et al. Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors[J]. Journal of virology, 2002, 76(9): 4580-4590.

[101] Clark KR, Sferra TJ, Johnson PR. Recombinant adeno-associated viral vectors mediate long-term transgene expression in muscle[J]. Human gene therapy, 1997, 8(6): 659-669.

[102] Zhang Y, Yue Y, Li L, et al. Dual AAV therapy ameliorates exercise-induced muscle injury and functional ischemia in murine models of Duchenne muscular dystrophy[J]. Human molecular genetics, 2013, 22(18): 3720-3729.

[103] Koo T, Popplewell L, Athanasopoulos T, et al. Triple trans-splicing adeno-associated virus vectors capable of transferring the coding sequence for full-length dystrophin protein into dystrophic mice[J]. Human gene therapy, 2014, 25(2): 98-108.

[104] Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA. Helper virus-free, optically controllable, and

113

Two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6[J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2003, 7(6):839-850.

[105] Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors[J]. Nature protocols, 2006, 1(3): 1412-1428.

[106] Mietzsch M, Grasse S, Zurawski C, et al. OneBac: platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1-12 vectors for gene therapy[J]. Human gene therapy, 2014, 25(3): 212-222.

[107] Baker AH, Kritz A, Work LM, et al. Cell-selective viral gene delivery vectors for the vasculature[J]. Experimental physiology, 2005, 90(1): 27-31.

[108] Chen BD, He CH, Chen XC, et al. Targeting Transgene to the Heart and Liver with AAV9 by Different Promoters[J]. Clinical and experimental pharmacology & physiology, 2015.

[109] Qiao C, Yuan Z, Li J, et al. Liver-specific microRNA-122 target sequences incorporated in AAV vectors efficiently inhibits transgene expression in the liver[J]. Gene therapy, 2011, 18(4): 403-410.

[110] Wang Z, Ma HI, Li J, et al. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo[J]. Gene therapy, 2003, 10(26): 2105-2111.

[111] Pacak CA, Byrne BJ. AAV vectors for cardiac gene transfer: experimental tools and clinical opportunities[J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2011, 19(9): 1582-1590.

[112] Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy[J]. Blood, 2013, 122(1): 23-36.

[113] Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response[J]. Nature medicine, 2006, 12(3): 342-347.

[114] Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B[J]. The New England journal of medicine, 2011, 365(25): 2357-2365.

[115] Jaski BE, Jessupml, Mancini DM, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease(CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial[J]. Journal of cardiac failure, 2009, 15(3): 171-181.

[116] Li C, Diprimio N, Bowles DE, et al. Single amino acid modification of

114

Adeno-associated virus capsid changes transduction and humoral immune profiles[J]. Journal of virology, 2012, 86(15):7752-7759.

[117] Hui DJ, Basner-Tschakarjan E, Chen Y, et al. Modulation of CD8+ T cell responses to AAV vectors with IgG-derived MHC class II epitopes[J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2013, 21(9): 1727-1737.

[118] Martin-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Munoz-Garcia B, et al. Increased CD74 expression in human atherosclerotic plaques: contribution to inflammatory responses in vascular cells[J]. Cardiovascular research, 2009, 83(3): 586-594.

[119] Henne C, Schwenk F, Koch N, et al. Surface expression of the invariant chain(CD74) is independent of concomitant expression of major histocompatibility complex class II antigens[J]. Immunology, 1995, 84(2): 177-182.

[120] Starlets D, Gore Y, Binsky I, et al. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival[J]. Blood, 2006, 107(12): 4807-4816.

[121] Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications[J]. Atherosclerosis, 2008, 196(1): 9-21.

[122] Price CL, Knight SC. Advanced glycation: a novel outlook on atherosclerosis[J]. Current pharmaceutical design, 2007, 13(36): 3681-3687.

[123] Montecucco F, Steffens S, Mach F. Insulin resistance: a proinflammatory state mediated by lipid-induced signaling dysfunction and involved in atherosclerotic plaque instability[J]. Mediators of inflammation, 2008, 2008: 767623.

[124] Rask-Madsen C, King GL. Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2005, 25(3): 487-496.

[125] Mas S, Martinez-Pinna R, Martin-Ventura JL, et al. Local non-esterified fatty acids correlate with inflammation in atheroma plaques of patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2010, 59(6): 1292-1301.

[126] Lopez-Franco O, Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, et al. Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2006, 26(8): 1864-1870.

[127] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways[J]. Physiological reviews, 2006, 86(2): 515-581.

[128] Barlic J, Murphy PM. Chemokine regulation of atherosclerosis[J]. Journal of leukocyte biology, 2007, 82(2): 226-236.115

[129] Zernecke A, Weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis[J]. Cardiovascular research, 2010, 86(2): 192-201.

[130] Calvayrac O, Rodriguez-Calvo R, Alonso J, et al. CCL20 is increased in hypercholesterolemic subjects and is upregulated by LDL in vascular smooth muscle cells: role of NF-kappaB[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2011, 31(11): 2733-2741.

[131] Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6[J]. Cytokine & growth factor reviews, 2003, 14(5): 409-426.

[132] Ghadjar P, Rubie C, Aebersold DM, et al. The chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in human malignancy with focus on colorectal cancer[J]. International journal of cancer Journal international du cancer, 2009, 125(4): 741-745.

[133] Liao YC, Wang YS, Guo YC, et al. BRAP Activates Inflammatory Cascades and Increases the Risk for Carotid Atherosclerosis[J]. Molecular medicine, 2011, 17(9-10): 1065-1074.

[134] Ozaki K, Sato H, Inoue K, et al. SNPs in BRAP associated with risk of myocardial infarction in Asian populations[J]. Nature genetics, 2009, 41(3): 329-333.

[135] de Winther MP, Kanters E, Kraal G, et al. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2005, 25(5): 904-914.

[136] Tilstam PV, Gijbels MJ, Habbeddine M, et al. Bone marrow-specific knock-in of a non-activatable Ikkalpha kinase mutant influences haematopoiesis but not atherosclerosis in Apoe-deficient mice[J]. PloS one, 2014, 9(2): e87452.

[137] Dhar K, Rakesh K, Pankajakshan D, et al. SOCS3 promotor hypermethylation and STAT3-NF-kappaB interaction downregulate SOCS3 expression in human coronary artery smooth muscle cells[J]. American journal of physiology Heart and circulatory physiology, 2013, 304(6): H776-H785.

[138] Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights[J]. Annual review of immunology, 1996, 14: 649-683.

[139] Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses[J]. Annual review of immunology, 1998, 16: 225-260.

[140] Basak S, Kim H, Kearns JD, et al. A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module[J]. Cell, 2007, 128(2): 369-381.

[141] Henkel T, Zabel U, van Zee K, et al. Intramolecular masking of the nuclear location

116

Signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit[J]. Cell, 1992, 68(6):1121-1133.

[142] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis[J]. Circulation, 2002, 105(9): 1135-1143.

[143] Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease[J]. Oncogene, 2006, 25(51): 6831-6843.

[144] Frankenberger M, Pforte A, Sternsdorf T, et al. Constitutive nuclear NF-kappa B in cells of the monocyte lineage[J]. The Biochemical journal, 1994, 304(Pt 1): 87-94.

[145] O'Dea EL, Barken D, Peralta RQ, et al. A homeostatic model of IkappaB metabolism to control constitutive NF-kappaB activity[J]. Molecular systems biology, 2007, 3: 111.

[146] Scottml, Fujita T, Liou HC, et al. The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms[J]. Genes & development, 1993, 7(7A): 1266-1276.

[147] Zandi E, Chen Y, Karin M. Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate[J]. Science, 1998, 281(5381): 1360-1363.

[148] Krappmann D, Wulczyn FG, Scheidereit C. Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappaB inhibitor IkappaB alpha in vivo[J]. The EMBO journal, 1996, 15(23): 6716-6726.

[149] Shishehbor MH, Bhatt DL. Inflammation and atherosclerosis[J]. Current atherosclerosis reports, 2004, 6(2): 131-139.

[150] Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes[J]. Circulation, 1995, 91(11): 2844-2850.

[151] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. Nature, 1993, 362(6423): 801-809.

[152] Gimbrone MA, Jr. Culture of vascular endothelium[J]. Progress in hemostasis and thrombosis, 1976, 3: 1-28.

[153] Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2014, 34(3): 509-515.

[154] Stoneman VE, Bennett MR. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications[J]. Clinical science, 2004, 107(4): 343-354.

[155] Vanepps JS, Vorp DA. Mechano-pathobiology of atherogenesis: a review[J]. The Journal of surgical research, 2007, 142(1): 202-217.117

[156] Penn MS, Rangaswamy S, Saidel GM, et al. Macromolecular transport in the arterial intima: comparison of chronic and acute injuries[J]. The American journal of physiology, 1997, 272(4 Pt 2): H1560-570.

[157] Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, et al. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1(LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders[J]. Cardiovascular research, 2006, 69(1): 36-45.

[158] Leake DS, Rankin SM. The oxidative modification of low-density lipoproteins by macrophages[J]. The Biochemical journal, 1990, 270(3): 741-748.

[159] Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation[J]. Arteriosclerosis, 1984, 4(4): 323-340.

[160] Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, et al. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(1): 333-337.

[161] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update[J]. The New England journal of medicine, 1986, 314(8): 488-500.

[162] Gown AM, Tsukada T, Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions[J]. The American journal of pathology, 1986, 125(1): 191-207.

[163] Jonasson L, Holm J, Skalli O, et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque[J]. Arteriosclerosis, 1986, 6(2): 131-138.

[164] Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, et al. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries[J]. British heart journal, 1988, 60(6): 459-464.

[165] Reape TJ, Groot PH. Chemokines and atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 1999, 147(2): 213-225.

[166] Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis[J]. Acta physiologica Scandinavica, 2001, 173(1): 35-43.

[167] Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines(AIR Study)[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2002, 22(7): 1162-1167.

[168] Huber J, Boechzelt H, Karten B, et al. Oxidized cholesteryl linoleates stimulate

118

Endothelial cells to bind monocytes via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2002,22(4):581-586.

[169] Boring L, Gosling J, Cleary M, et al. Decreased lesion formation in CCR2-/-mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis[J]. Nature, 1998, 394(6696): 894-897.

[170] Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, et al. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system[J]. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 1998, 54(7): 628-640.

[171] Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies[J]. Blood, 1996, 88(9): 3259-3287.

[172] Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, et al. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1[J]. The American journal of pathology, 1994, 144(5): 952-961.

[173] Manka DR, Wiegman P, Din S, et al. Arterial injury increases expression of inflammatory adhesion molecules in the carotid arteries of apolipoprotein-E- deficient mice[J]. Journal of vascular research, 1999, 36(5): 372-378.

[174] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature, 2002, 420(6917): 868-874.

[175] de Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, et al. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization[J]. Cardiovascularresearch, 1999, 41(2): 443-449.

[176] Brogi E, Winkles JA, Underwood R, et al. Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages[J]. The Journal of clinical investigation, 1993, 92(5): 2408-2418.

[177] Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T, et al. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1998, 18(7): 1188-1196.

[178] Jeziorska M, Woolley DE. Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries[J]. The Journal of pathology, 1999, 188(2): 189-196.

[179] Paulson KE, Zhu SN, Chen M, et al. Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis[J]. Circulation research, 2010, 106(2): 383-390.119

[180] Paul A, Chang BH, Li L, et al. Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis[J]. Circulation research, 2008, 102(12): 1492-1501.

[181] Shiomi M, Ito T, Hirouchi Y, et al. Fibromuscular cap composition is important for the stability of established atherosclerotic plaques in mature WHHL rabbits treated with statins[J]. Atherosclerosis, 2001, 157(1): 75-84.

[182] Zhou X, Hansson GK. Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice[J]. Scandinavian journal of immunology, 1999, 50(1): 25-30.

[183] Sukovich DA, Kauser K, Shirley FD, et al. Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17beta- estradiol[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1998, 18(9): 1498- 1505.

[184] Recinos A, 3rd, LeJeune WS, Sun H, et al. Angiotensin II induces IL-6 expression and the Jak-STAT3 pathway in aortic adventitia of LDL receptor-deficient mice[J]. Atherosclerosis, 2007, 194(1): 125-133.

[185] Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, et al. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor[J]. Circulation research, 2004, 94(4): 534-541.

[186] Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, et al. Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2001, 21(9): 1464-1469.

[187] Takeda N, Manabe I, Shindo T, et al. Synthetic retinoid Am80 reduces scavenger receptor expression and atherosclerosis in mice by inhibiting IL-6[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2006, 26(5): 1177-1183.

[188] Grote K, Luchtefeld M, Schieffer B. JANUS under stress--role of JAK/STAT signaling pathway in vascular diseases[J]. Vascular pharmacology, 2005, 43(5): 357- 363.

[189] Huber SA, Sakkinen P, Conze D, et al. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1999, 19(10): 2364-2367.

[190] Luchtefeld M, Schunkert H, Stoll M, et al. Signal transducer of inflammation gp130 modulates atherosclerosis in mice and man[J]. The Journal of experimental

120

Medicine, 2007, 204(8):1935-1944.

[191] Ohta H, Wada H, Niwa T, et al. Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice[J]. Atherosclerosis, 2005, 180(1): 11-17.

[192] Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1996, 16(1): 19-27.

[193] Newby AC. Met al. loproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2008, 28(12): 2108-2114.

[194] Akao M, Teshima Y, Marban E. Antiapoptotic effect of nicorandil mediated by mitochondrial atp-sensitive potassium channels in cultured cardiac myocytes[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2002, 40(4): 803-810.

[195] Kitakaze M, Asakura M, Kim J, et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials[J]. Lancet, 2007, 370(9597): 1483-1493.

[196] Eguchi Y, Takahari Y, Higashijima N, et al. Nicorandil attenuates FeCl(3) -induced thrombus formation through the inhibition of reactive oxygen species production[J]. Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society, 2009, 73(3): 554-561.

[197] Sakamoto T, Kaikita K, Miyamoto S, et al. Effects of nicorandil on endogenous fibrinolytic capacity in patients with coronary artery disease[J]. Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society, 2004, 68(3): 232-235.

[198] Xu J, Nagata K, Obata K, et al. Nicorandil promotes myocardial capillary and arteriolar growth in the failing heart of Dahl salt-sensitive hypertensive rats[J]. Hypertension, 2005, 46(4): 719-724.

[199] Group IS. Effect of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: the Impact Of Nicorandil in Angina(IONA) randomised trial[J]. Lancet, 2002, 359(9314): 1269-1275.

[200] Sargsyan E, Ortsater H, Thorn K, et al. Diazoxide-induced beta-cell rest reduces endoplasmic reticulum stress in lipotoxic beta-cells[J]. The Journal of endocrinology, 2008, 199(1): 41-50.

[201] Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded

121

Protein Response[J]. Cell death and differentiation, 2006, 13(3):374-384.

[202] Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease[J]. Physiological reviews, 2006, 86(4): 1133-1149.

[203] Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis[J]. Annual review of pathology, 2008, 3: 399-425.

[204] Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders[J]. Annual review of medicine, 2012, 63: 317-328.

[205] Zhou J, Lhotak S, Hilditch BA, et al. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 2005, 111(14): 1814-1821.

[206] Li Y, Schwabe RF, DeVries-Seimon T, et al. Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB-and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis[J]. The Journal of biological chemistry, 2005, 280(23): 21763-21772.

[207] Pahl HL, Baeuerle PA. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B[J]. The EMBO journal, 1995, 14(11): 2580-2588.

[208] Urano F, Wang X, Bertolotti A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1[J]. Science, 2000, 287(5453): 664-666.

[209] Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats[J]. Genes & development, 2002, 16(11): 1345-1355.

[210] Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response[J]. Nature, 2008, 454(7203): 455-462.

[211] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. Cell, 2010, 140(6): 900-917.

[212] Lerner AG, Upton JP, Praveen PV, et al. IRE1alpha induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress[J]. Cell metabolism, 2012, 16(2): 250-264.

[213] Menu P, Mayor A, Zhou R, et al. ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway[J]. Cell death & disease, 2012, 3: e261.

[214] Kim JB, Xia YR, Romanoski CE, et al. Paraoxonase-2 modulates stress response of endothelial cells to oxidized phospholipids and a bacterial quorum-sensing

122

Molecule[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2011,31(11):2624- 2633.

[215] Gargalovic PS, Gharavi NM, Clark MJ, et al. The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2006, 26(11): 2490-2496.

[216] Shank KJ, Su P, Brglez I, et al. Induction of lipid metabolic enzymes during the endoplasmic reticulum stress response in plants[J]. Plant physiology, 2001, 126(1): 267-277.

[217] Lee JN, Ye J. Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1[J]. The Journal of biological chemistry, 2004, 279(43): 45257-45265.

[218] Kim AJ, Shi Y, Austin RC, et al. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3[J]. Journal of cell science, 2005, 118(Pt 1): 89-99.

[219] Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice[J]. The Journal of clinical investigation, 2009, 119(5): 1201-1215.

[220] Bowes AJ, Khan MI, Shi Y, et al. Valproate attenuates accelerated atherosclerosis in hyperglycemic apoE-deficient mice: evidence in support of a role for endoplasmic reticulum stress and glycogen synthase kinase-3 in lesion development and hepatic steatosis[J]. The American journal of pathology, 2009, 174(1): 330-342.

[221] Karaskov E, Scott C, Zhang L, et al. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis[J]. Endocrinology, 2006, 147(7): 3398-3407.

[222] Ozcan L, Ergin AS, Lu A, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance[J]. Cell metabolism, 2009, 9(1): 35-51.

[223] Petri S, Kiaei M, Kipiani K, et al. Additive neuroprotective effects of a histone deacetylase inhibitor and a catalytic antioxidant in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. Neurobiology of disease, 2006, 22(1): 40-49.

[224] Akerfeldt MC, Howes J, Chan JY, et al. Cytokine-induced beta-cell death is independent of endoplasmic reticulum stress signaling[J]. Diabetes, 2008, 57(11): 3034-3044.

[225] Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes[J]. Science, 2006,

123

313(5790):1137-1140.

[226] Liu H, Bowes RC, 3rd, van de Water B, et al. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca2+ disturbances, and cell death in renal epithelial cells[J]. The Journal of biological chemistry, 1997, 272(35): 21751-21759.

[227] Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways[J]. The Journal of clinical investigation, 2001, 107(10): 1263-1273.

[228] Kudo T, Kanemoto S, Hara H, et al. A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress[J]. Cell death and differentiation, 2008, 15(2): 364-375.

[229] Inokuchi Y, Nakajima Y, Shimazawa M, et al. Effect of an inducer of BiP, a molecular chaperone, on endoplasmic reticulum(ER) stress-induced retinal cell death[J]. Investigative ophthalmology & visual science, 2009, 50(1): 334-344.

[230] Hino S, Kondo S, Yoshinaga K, et al. Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis[J]. Journal of bone andmineral metabolism, 2010, 28(2): 131-138.

[231] Wang Y, Wu Z, Li D, et al. Involvement of oxygen-regulated protein 150 in AMP-activated protein kinase-mediated alleviation of lipid-induced endoplasmic reticulum stress[J]. The Journal of biological chemistry, 2011, 286(13): 11119-11131.

[232] Boyce M, Bryant KF, Jousse C, et al. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress[J]. Science, 2005, 307(5711): 935- 939.

[233] Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase[J]. Journal of cell science, 2003, 116(Pt 7): 1175-1186.

[234] McAlpine CS, Bowes AJ, Khan MI, et al. Endoplasmic reticulum stress and glycogen synthase kinase-3beta activation in apolipoprotein E-deficient mouse models of accelerated atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2012, 32(1): 82-91.

[235] McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state[J]. Molecular and cellular biology, 2001, 21(4): 1249-1259.

[236] Halterman MW, De Jesus C, Rempe DA, et al. Loss of c/EBP-beta activity promotes the adaptive to apoptotic switch in hypoxic cortical neurons[J]. Molecular and cellular neurosciences, 2008, 38(2): 125-137.124

[237] Chiribau CB, Gaccioli F, Huang CC, et al. Molecular symbiosis of CHOP and C/EBP beta isoform LIP contributes to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. Molecular and cellular biology, 2010, 30(14): 3722-3731.

[238] Thorp E, Li Y, Bao L, et al. Brief report: increased apoptosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe-/-mice lacking macrophage Bcl-2[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2009, 29(2): 169-172.

[239] Fu HY, Okada K, Liao Y, et al. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload[J]. Circulation, 2010, 122(4): 361-369.

[240] Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim[J]. Cell, 2007, 129(7): 1337-1349.

[241] Li G, Mongillo M, Chin KT, et al. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. The Journal of cell biology, 2009, 186(6): 783-792.

[242] Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways[J]. The Journal of clinical investigation, 2009, 119(10): 2925-2941.

[243] Zhang H, Song LC, Jia CH, et al. Effects of ATP sensitive potassium channel opener on the mRNA and protein expressions of caspase-12 after cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. Neuroscience bulletin, 2008, 24(1): 7-12.

[244] Tabas I, Seimon T, Timmins J, et al. Macrophage apoptosis in advanced atherosclerosis[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009, 1173 Suppl 1: E40-E45.

[245] Devries-Seimon T, Li Y, Yao PM, et al. Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor[J]. The Journal of cell biology, 2005, 171(1): 61-73.

[246] Wei XM, Heywood GJ, Di Girolamo N, et al. Nicorandil inhibits the release of TNFalpha from a lymphocyte cell line and peripheral blood lymphocytes[J]. International immunopharmacology, 2003, 3(12): 1581-1588.

[247] Endo M, Mori M, Akira S, et al. C/EBP homologous protein(CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation[J]. Journal of immunology, 2006, 176(10): 6245-6253.

[248] Kawamura T, Kadosaki M, Nara N, et al. Nicorandil attenuates NF-kappaB activation, adhesion molecule expression, and cytokine production in patients with

125

Coronary artery bypass surgery[J]. Shock, 2005, 24(2):103-108.

[249] De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines[J]. The Journal of clinical investigation, 1995, 96(1): 60-68.

126

**综述**

**炎症和脂质代谢之间的相互作用**

**——有效的抗炎药物治疗动脉硬化**

**陈清杰综述杨毅宁校审**

**摘要：**血脂异常和炎症是众所周知的危险因素在动脉粥样硬化的发展中[1]。脂质代谢和炎症之间的相互作用在代谢活跃的组织从多个水平影响加剧动脉硬化的发展，本文将对血脂紊乱及炎症对动脉硬化的影响进行综述。胆固醇、脂肪酸和修饰后的脂质可直接活化炎症通路。此外循环（修饰）蛋白也可以激活白细胞。反之亦然，促炎信号通路（如细胞因子）在临床前模型可直接影响脂质代谢。然而主流的降脂药大都具有潜在的抗炎作用，通过脂质调节而进行抗炎似乎并不那么简单。降脂抗炎已被大量的临床前模型及慢性炎症病人所验证，随后我们将进行讨论。最近进行的一些评估抗炎药物对心血管疾病的有效性临床试验也许能更好的揭示抗炎药物对存在心血管疾病危险因素人群的脂质代谢存在潜在的治疗作用。

**1背景**

脂质代谢紊乱及炎症是众所周知的危险因素在动脉硬化发展的过程中，同时在动脉硬化斑块的形成中也扮演了一个很重要的角色。在本综述中，我们首先描述了脂质代谢（脂质紊乱）和炎症过程对动脉硬化发展的影响。众所周知降脂药物可以减弱炎症反应通过降低血清中的胆固醇及脂肪酸水平，同时也可通过多种非靶向性影响来影响炎症。由于抗炎药物目前对动脉硬化的治疗受到越来越多的关注，我们总结了抗炎药物对脂质代谢可能的影响对其治疗动脉硬化额外的有效影响。

**2脂质和动脉硬化**

高脂血症和心血管疾病发病率的增加是作为西方社会营养过剩的一个重要结果，西方国家的日常饮食中含很高比例的脂肪和胆固醇。高脂血症是以血清中增加大量的胆固醇和甘油三脂为特点，作为动脉硬化发生发展的一个重要的危险因素。这些脂质被促动脉硬化的载脂蛋白（脂蛋白、极低密度脂蛋白、残余脂粒蛋白、低密度脂蛋白）携带后可进入动脉管壁在管壁上聚集，可导致脂质的沉积引起初始的动脉硬化[2]。氧化性低密度脂蛋白也可与巨噬细胞清道夫受体结合，例如清道夫受体 A

（SRA）和CD36，将巨噬细胞变成泡沫细胞，形成所谓的“泡沫粥样斑块”。高脂血

127

症通常伴随着低水平的血清高密度脂蛋白，随之我们称之为“血脂紊乱”。高密度脂蛋白被认为可预防动脉硬化主要通过其增加胆固醇的逆向转运，该过程是高密度脂蛋白作为胆固醇受体，将胆固醇从粥样硬化斑块病变部位转运至肝脏，通过胆汁分泌到体外[3]。然而高密度脂蛋白亦可作为一个介导炎症相关的反应的关键因素，同样可以额外影响动脉硬化[4]。在心血管疾病患者，高密度脂蛋白功能失调表现为胆固醇逆向转运的能力下降和丢失相关的抗炎功能[5]。因此，降脂治疗是对抗动脉硬化的主要治疗决策，而升高高密度脂蛋白浓度或改善高密度脂蛋白的功能是更进一步的治疗策略。

**3炎症和动脉硬化**

动脉粥样硬化被更加认为是一种炎症性疾病，因为炎症在斑块的发展的众多过程起重要作用。这其中包括内皮细胞的活化，例如细胞间黏附分子（ICAM）-1和血管细胞粘附分子（VCAM）-1在动脉硬化病变的早期可以吸引聚集炎症细胞（例如中性粒细胞，T细胞和单核细胞）。伴随着斑块的生成，平滑肌细胞和内皮细胞分泌促炎介质刺激单核细胞向巨噬细胞分化。巨噬细胞吞噬氧化型低密度脂蛋白后发展成为泡沫细胞局部放大炎症反应，从而聚集大量的免疫细胞并诱导平滑肌细胞向斑块内迁移[6, 7]。细胞内的炎症通路（例如IKK和JNK通路）和不同的转录因子如核转录因子（NF-κB），激活蛋白-1（c-Jun/AP-1）以及早期生长应答因子1（EGR1）等被激活。

这些转录因子在动脉硬化的斑块中不同的细胞中表达和活化，例如内皮细胞、平滑肌细胞和免疫细胞，同时它们还调节细胞中黏附分子（例如细胞间黏附分子-1和血管细胞黏附分子-1），趋化因子（例如单核细胞趋化蛋白（MCP）-1和促炎因子（例如肿瘤坏死因子（TNF）α，干扰素-γ，白介素（IL）-1β和白介素-6）的表达，这些所有的因子在斑块形成的不同阶段扮演者重要的角色。此外，NF-κB和c-Jun N-末端激酶（JNKs）调节凋亡和细胞增殖因子的表达，在斑块内形成泡沫细胞及活化炎症细胞起着很重要的作用[8-11]。

炎症刺激是动脉硬化病变过程中的本质来源，正如以上所描述的，或者是一个非血管性来源的刺激。非血管源性的炎症形成动脉硬化的危险因素包括饮食诱导的炎症、慢性感染、慢性炎症疾病（例如风湿性关节炎（RA）和系统性红斑狼疮（SLE）。

**4脂质对炎症的影响**

尽管血脂紊乱和炎症是动脉硬化发展的独立危险因素，但是脂质代谢和炎症通路之间的交互作用对动脉硬化的发展亦有着直接的影响。饮食或脂质相关因素对炎症的影响，将在下文详细讨论。

128

**4.1饮食导致的“代谢炎症”**

胆固醇饮食可以升高血清炎症循环标记物例如C-反应蛋白和血清淀粉样蛋白A水平[12]。此外，肥胖的人群常有系统性炎症反应表现为循环中C反应蛋白及细胞因子明显增加[13-15]。饮食导致的炎症是一种低级别的炎症反应是由营养过剩导致的，其确切的机制叫做所谓的“代谢炎症”但仍在探索研究中。部分机制可能包含高脂饮食引起的肠道内的脂多糖（脂多糖或者内毒素）易位增加，从而导致“代谢性内毒素血症”[16]。另外，动物在体的机制研究提示给予高脂或高（饱和）脂肪酸饮食在动物脂肪组织[17]、肝脏[18, 19]、脉管系统[20]往往伴随着炎症反应过程。随着脂肪组织的扩张增多，组织的细胞和侵润性巨噬细胞开始吞噬炎症介质（例如细胞因子）从而导致低级别的系统性炎症反应。高脂饮食可增加肝脏中肝细胞NF-κB的活性和增加促炎因子的表达[21]。高脂饮食可更有效的诱导肝脏炎症反应，表现为CD68阳性的巨噬细胞增加和MCP-1表达增加，同时也增加炎症因子的表达如血清淀粉酶样蛋白酶

A和E选择素。高脂饮食或者高胆固醇饮食在多个器官激活炎症反应，直接或者间接干预免疫细胞和/或代谢活跃组织中的脂蛋白和脂质与炎症反应通路。

**4.2脂蛋白和炎症**

高脂血症的老鼠模型研究提示动物血液循环中含高水平乳糜，（极）低密度脂蛋白和他们残余物质导致肝脏炎症通过增强库佛细胞清道夫受体摄取这些（调节）脂蛋白在肝脏发生靶向炎症反应[22]。尤其是氧化修饰的低密度脂蛋白，例如羟固醇、氧化性磷脂和脂肪酸合成酶被肝脏的清道夫受体识别[23]。肝脏的炎症反应可能随后会加剧动脉硬化的发展，很可能是通过增加循环中的促炎介质。最近发现通过转基因激活肝脏细胞NF-κB信号通路可促进动脉硬化病变形成[24]。此外，高胆固醇喂养的动物模型导致的动脉硬化血清中淀粉样蛋白酶A水平的升高并不依赖于血清脂质水平[25]。

除了诱导肝细胞炎症外，循环的（调节）脂蛋白可诱导血管的炎症反应[26]。与肝脏的库佛细胞一样，血管壁上侵润性的单核细胞可摄取修饰的氧化性低密度脂蛋白激活或增强炎症通路例如NF-κB和JNK信号通路。此外，抗炎的M2型巨噬细胞吞噬氧化性低密度脂蛋白后可将这些细胞转化成抗炎的细胞表型[27]。氧化性脂蛋白调控细胞炎症信号的分子学机制是近期的研究主题，近期一些学者已对其进行综述。斑块中聚集特殊的氧化性脂蛋白可能决定了炎症反应，但并非所有的氧化性脂蛋白只表现为促炎作用，例如氧化性磷酸酶表现为抗炎和促炎两方面[28]。此外高胆固醇血症可导致血管壁上的胆固醇结晶，通过激活NLRP3炎症小体靶向分泌巨噬细胞IL-1β诱发炎症反应[29, 30]。

在体研究已经报道，循环中的单核细胞可被富含甘油三酯的脂蛋白激活，主要和富含甘油三酯的脂蛋白和单核细胞的直接交互作用及摄取脂肪酸有关[31]。这可能

129

主要归因于血管内皮细胞的活化和单核细胞的聚集。此外，近期高胆固醇血症的小鼠研究提示血管壁调节性T细胞的结合和存活减少。破坏了T细胞亚群间的平衡，使得血管壁上效应性T细胞相对增加超过了调节性T细胞，从而导致了局部的促炎环境。有趣的是降低血清中胆固醇的含量可恢复斑块中紊乱的T细胞亚型和巨噬细胞成分[32]。降低血清胆固醇同样可降低肝脏和主动脉NF-κB信号的活性及血清淀粉样蛋白A的水平[20]。

高胆固醇喂养的兔子试验研究中，高密度脂蛋白可减轻血管炎性反应，通过其抗炎能力以及减少VCAM-1、ICAM-1在主动脉的表达[33]。高密度脂蛋白通过SR-BI依赖型机制也可减轻脂多糖诱导的促炎信号通路，可影响“代谢性内毒素血症”[34]。高密度脂蛋白抗炎的能力至少部分是通过其脂质成分来实现的。高密度脂蛋白包含特殊的脂质充当抗炎信号分子例如磷酸鞘氨醇（S1P）。磷酸鞘氨醇结合到五个磷酸鞘氨醇受体任意一个即可抑制血管内皮细胞和平滑肌细胞的促炎反应，也可降低血管单核细胞间的相互作用[35]。磷酸鞘氨醇-1类似物FTY720（芬戈莫德）是一种正处于临床试验阶段有前景的免疫抑制剂其可有效地减缓小鼠动脉硬化进展[36]。有趣的是，改善高密度脂蛋白的功能已被认为是一种新型的免疫调节疗法，基于其直接调节先天和后天免疫系统免疫细胞的活性[37]。载脂蛋白AI的类似物L-4F，可增加高密度脂蛋白的抗炎能力有效地减轻系统性红斑狼疮小鼠模型类似狼疮的临床表现[38]。目前认为，高密度脂蛋白可减少免疫细胞的细胞膜脂筏中的胆固醇含量，从而改变其活性。高密度脂蛋白可预防补体系统（过度）激活[37]。这些发现直指（修饰）脂蛋白在调节动脉硬化病变形成的炎症反应过程中很重要。

**4.3脂肪酸和炎症反应信号通路**

脂肪酸不只是提供能源的基础物质，同时也是重要的调节器调节细胞多种功能其中包括炎症反应。饱和脂肪酸被认为是通过活化Toll-like受体（TLRs）可直接增加细胞内NF-κB信号通路活性[39, 40]。体外实验数据表明：饱和脂肪酸在神经酰胺中可靶向增强巨噬细胞对脂多糖的先天免疫反应[41]。正如近期的综述报道一样，脂肪酸调节炎症通路是通过结合在免疫细胞和代谢活跃的组织上表达的几个G蛋白偶联受体（GPR）实现的[42]。这些受体和脂肪酸不同的长链以及不同的饱和度有着密切的关系。例如短链的脂肪酸是被肠道细菌结合到G蛋白偶联受体43上产生的，它被认为参与白细胞募集到炎症反应区域[43, 44]。中链的脂肪酸结合到G蛋白偶联受体84，增加巨噬细胞促炎因子的表达[45]。非常有趣的是n-3脂肪酸结合到G蛋白偶联受体

120在脂肪细胞和巨噬细胞高度表达，抑制TLR介导的炎症通路[46]。这并不是n-3脂肪酸发挥抗炎的作用唯一机制，还因为其可降低血清甘油三酯水平，影响细胞膜的流动性及抑制NF-κB信号通路[47]。不饱和脂肪酸的抗炎作用似乎是妥协于n-3脂肪酸的，因为n-6脂肪酸作为合成花生四烯酸、前列腺素、白介素的前体发挥促炎作

130

用。特别是在调节免疫反应时n-6和n-3脂肪酸的比例比n-3脂肪酸绝对的数量值更重要[48, 49]。因此根据脂肪酸链的长度和饱和度的不同，脂肪酸（例如饱和脂肪酸，n-6脂肪酸）可诱导局部的炎症或（例如n-3脂肪酸，不饱和脂肪酸）可激活抗炎信号通路。

**4.4核脂质感受器和炎症反应**

转录因子可以特定的感知细胞内脂质和调节细胞内脂质代谢（例如过氧化物酶体增殖物激活受体、肝脏X受体、胆汁酸受体）是很重要的炎症调节器，直接调节炎症基因的表达和炎症通路关键转录因子的交互作用。

**4.4.1过氧化物酶体增殖物激活受体**

作为细胞内脂质传感器，特别是对脂肪酸，过氧化物酶体增殖物激活受体可作为脂肪酸代谢的控制器。活化的过氧化物酶体增殖物激活受体可抑制炎症反应和巨噬细胞的激活[50]。过氧化物酶体增殖物激活受体α在多种细胞中表达其中也包括动脉硬化过程中的内皮细胞、平滑肌细胞和单核细胞/巨噬细胞[51]，可通过物理的相互作用直接抑制NF-κB信号通路[52]，亦可间接地通过诱导NF-κB通路的抑制剂(IκB)表达[53]。通过这些机制过氧化物酶体增殖物激活受体α的激活可减少VCAM-1和ICAM-1在内皮细胞的表达[54]，从而减少斑块中巨噬细胞的聚集及炎症性侵润[55]。

过氧化物酶体增殖物激活受体α和过氧化物酶体增殖物激活受体β/δ通过控制巨噬细胞的脂质代谢作为调节巨噬细胞表型的一个重要角色。活化的过氧化物酶体增殖物激活受体α可诱导抗炎的M2表型的巨噬细胞[56]。过氧化物酶体增殖物激活受体β/δ似乎是细胞凋亡后负责抑制免疫反应所必须的[57]。通过和转位抑制剂相关联，过氧化物酶体增殖物激活受体β/δ通过细胞内配体控制炎症开关[58]。除了巨噬细胞外，过氧化物酶体增殖物激活受体也可减少其他白细胞炎症反应和活性[59]。根据近期的研究报道，过氧化物酶体增殖物激活受体γ可以调节脂肪组织的调节性T细胞的活化和聚集[60]。

**4.4.2肝脏X受体**

肝脏X受体是另一类细胞内的脂质感受器可被多种细胞中升高的脂质活化的羟固醇所激活。在巨噬细胞中，肝脏X受体通过激活胆固醇的逆向转运而阻止泡沫细胞的形成[61]。此外，肝脏X受体可以通过抑制脂多糖或者细菌感染后刺激引起的促炎基因的表达。这主要通过其间接地结合到转录共抑制剂或沉默子（转录抑制剂）上抑制了关键的转录因子，其中包括促炎基因的活化。其确切的机制曾有多篇综述进行报道，常与基因、基因相关的信号通路及特殊的细胞类型相关[62, 63]。

除了与转录因子有交互作用外，肝脏X受体的激活还可以控制组成细胞膜所必需的胆固醇的成分来抑制T细胞的增殖。作为巨噬细胞很重要的胆固醇排除调节器和抗炎诱导物，肝脏X受体对靶向治疗动脉硬化很有吸引力。合成的肝脏X受体激

131

动剂可抑制小鼠动脉粥样硬化进程。然而，人类和啮齿类动物中肝脏X受体的功能不尽相同，活化的肝细胞肝脏X受体可引起高甘油三脂血症，与肝脏X受体介导活化的脂肪生成转录因子SREBP1c和ChREBP有关[64]。近来的研究关注进一步研究仅对动脉硬化有有益作用而对甘油三酯代谢无害的选择性的肝脏X受体调节器[65]。

**4.4.3法尼酯X受体**

法尼酯X受体是另一个代谢受体，可被内源性胆汁酸活化，在脂质代谢和炎症反应中是个双重角色。激活的法尼酯X受体调节胆汁酸、脂质和葡萄糖代谢，和肝脏X受体很相似通过转录抑制剂抑制炎症通路[65]。可在肝脏和肠道高度表达，激活的法尼酯X受体可防止脂多糖诱导的肝脏炎症及肠道炎症。因此被建议为肝脏和肠道炎症性疾病的靶向治疗措施。法尼酯X受体作为一个有趣的靶向防治动脉的措施有待进一步研究证实。完全缺失法尼酯X受体动脉硬化的试验中存在着数据资料冲突。然而法尼酯X受体激动剂可持续地减缓粥样硬化发展[66-68]，提示治疗剂量上活化的法尼酯X受体可预防粥样硬化。这种导致法尼酯X受体在基因和药理学上的矛盾不是因为血清脂蛋白的不同而可能是因为不同炎症的影响。

核脂质感受器在调节脂质代谢和炎症反应过程中都具有双重角色；总体来说它们的活化更趋向于抗炎和抗粥样硬化。

**5炎症影响脂蛋白代谢**

**5.1急性炎症和脂质代谢**

有很多研究都集中研究脂质对炎症通路的影响，但是仅有少数的研究观察炎症反应对脂质代谢的影响。很有趣的是，在急性炎症病人中观察研究发现患者在细菌或病毒感染的同时伴随着高甘油三脂血症[69]。目前已有的综述报道关于流行的炎症和脂质代谢关系间的机制研究大多来源于啮齿类动物和体外实验研究感染和急性炎症对脂质和脂蛋白的影响。在急性炎症中循环的血清脂蛋白短暂地改变，在宿主防御中扮演者一个很重要的角色，然而在慢性炎症中脂蛋白持续长期改变可能会促进粥样硬化发展。

脂多糖干预大鼠后诱导了高脂血症反应，主要是引起低密度脂蛋白、甘油三酯的升高[70]。类似的，大鼠给予促粥样硬化的细胞因子干预例如TNF-α、IL-1β或者IL-6，亦可增加血清中低密度脂蛋白、甘油三酯的水平[71]，从而诱发粥样硬化脂蛋白的形成。血清中VLDL、TG增加主要是因为其生成增加，同时也因为抑制了脂蛋白脂肪酶的活性减少VLDL、TG的清除。尽管炎症增加血清甘油三酯水平在人类和动物模型中已经很清楚，但是对血清中胆固醇的影响还不是很清楚而且不同物种的情况也不相同。人类注射和感染脂多糖均可减少血清胆固醇的水平，这要归功于低密度脂蛋白水平的降低。然而在小鼠中，注射脂多糖后可增加血清总胆固醇水平，但是在

132

被牙龈卟啉单胞菌感染的小鼠模型中，不影响或增加血清中总胆固醇的水平。除了增加VLDL、TG和减少HDL-C外，感染和炎症也可通过增加氧化性低密度脂蛋白促进粥样硬化的脂质形成[72]。

**5.2慢性炎症疾病和脂质代谢**

目前低级别的系统性“代谢性炎症”是否有和大剂量的脂多糖和细胞因子诱导的高级别急性炎症反应对脂质代谢有相似的影响仍需研究证实。近期证实了基因水平活化NF-κB信号通路特别是在肝脏细胞，这一水平和那些由“代谢性炎症”诱导的反应比较，VLDL、TG的生成增加且加重粥样硬化[73]，都提示“代谢性炎症”和急性炎症反应在脂蛋白代谢上有相似的不良影响。未来啮齿类动物的试验研究中在一种相对温和特殊的组织中增加特殊的炎症分子也许可更好地描述代谢性炎症途径对脂质代谢的直接影响。

调查慢性炎症疾病的病人如类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮的病人血脂水平也许能更好的说明上述观点。类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮的病人常伴随着脂质紊乱[74]，虽然这些病人脂质的定性与定量和那些存在心血管疾病危险因素的患者明显不同。

类风湿性关节炎患者的慢性炎症是一种自相矛盾的关系，其降低总胆固醇和低密度脂蛋白水平但同时也降低高密度脂蛋白水平[75]，潜在的血清脂质变化机制仍然不清楚。这些在类风湿性关节炎患者增加的心血管疾病危险因素认为是由于增加的炎症反应引起的，然而总胆固醇/低密度脂蛋白的比值比增加也被认为是这些病人心血管疾病危险的额外预测因子[76]。

慢性炎症性疾病SLE通常伴随着很强的粥样硬化，伴随着甘油三酯水平的增加和高密度脂蛋白水平的显著降低。细胞因子介导的对脂蛋白脂肪酶活性抑制是导致这种情况的主要原因，这可以很好地解释SLE患者TNF-α活性和血清甘油三酯水平存在很强的关联性[77]。

重要的是，SLE患者和RA患者表现出增加了促炎的紊乱型HDL同时也增加了氧化性低密度脂蛋白的水平，上述可预测动脉粥样硬化的进展[78, 79]。这些慢性炎症在脂质的量上表现出不同的模式，但在脂质的量上都有一个相似的有害变化，这些是促动脉粥样硬化的脂质和心血管疾病的危险因素。

**6炎症反应和脂质代谢在动脉粥样硬化进程中的相互作用**

很明显到目前为止这些研究讨论的脂质，例如（饱和）脂肪酸和胆固醇，可以诱发炎症反应。反之亦然，急性炎症刺激，例如脂多糖和细胞因子以及低级别活化的肝脏NF-κB信号通路，可以促进动脉粥样硬化脂质代谢紊乱。因此，脂质和炎症反应的相互关系是成指数关系的而不是像小鼠模型中血清胆固醇水平和动脉硬化严重

133

程度间的线性关系。正因如此，这可以解释为什么患者使用例如他汀类、贝特类、烟酸类的降脂药抗动脉硬化治疗时获得了额外有益的作用减轻了炎症反应。累计的数据提供证据表明这些降脂药减轻动脉粥样硬化能力超过了它们的降脂能力，至少部分归功于直接减轻炎症反应通路的作用。

**7降脂药物对炎症反应的作用**

降脂药物普遍地可以减轻局部和系统的炎症反应。它们的抗炎作用有一个很重要的部分和它们能降低（极低）低密度脂蛋白和残余脂蛋白有关。此外，它们抗炎的作用和它们直接和炎症反应相互作用有关，已被广泛的综述报道[80-82]。例如他汀类药物，通过抑制甲戊二羟酸途径可干预多种炎症通路，贝特类药物通过直接抑制它们在NF-κB通路中的目标核受体PPARα活性抑制NF-κB炎症信号通路。此外，烟酸类药物直接通过免疫细胞上的G蛋白偶联蛋白受体可减轻炎症反应。这些药物的作用显示了不同细胞类型的炎症反应的相互作用，强调了脂质和炎症通路在多水平和多组织间的相互联系。

**8抗炎药物对脂质代谢影响**

尽管炎症在动脉粥样硬化进程中扮演的角色已经很清楚，但是目前仅有少数的抗动脉硬化实验靶向干预研究炎症反应通路。正如近来Charo等人的综述报道一样，自从过去十年许多的动物实验提示抑制炎症通路对动脉粥样硬化有显著的作用，抗炎治疗在动脉粥样硬化治疗中有所发展[83]。基于炎症反应和脂质代谢间密切的联系，抗炎药物被期望不仅通过直接的抗炎作用减轻粥样硬化程度还可通过其改善致动脉硬化的血脂。然而，目前聚焦于抗炎药物对脂质代谢影响的研究还很有限。

**8.1水杨酸类药物**

阿司匹林（乙酰水杨酸）是属于NSAIDS（非甾体类抗炎药物）的一种水杨酸盐药物常被用来预防和治疗心血管疾病，主要通过其抗血小板聚集及抗炎作用。阿司匹林是一种环氧合酶-1（COX-1）抑制剂，通过减少前列腺素的合成，而前列腺素和其他物质可以一起调节止血、血小板功能和巨噬细胞的分化[84]。小剂量的阿司匹林可减轻动物实验中小鼠的血管炎症，同时亦可降低有心血管危险因素患者血清中促炎细胞因子的水平。阿司匹林的抗炎作用在高剂量中更加显著，而且亦可抑制NF-κB活性[85]。NF-κB在炎症反应中的许多方面是一个很重要的转录因子，在动脉粥样硬化病变中亦被激活[86]。尽管阿司匹林的抗血小板聚集作用可降低心血管疾病，事实上阿司匹林治疗降低心血管疾病，主要是归功于阿司匹林在高度炎症反应状态的病人中的抗炎作用能更好的降低心血管疾病。有假说提出阿司匹林的抗炎作用主要是由水杨酸盐介导的，因为在体内阿司匹林很快就脱去乙酰基，仅剩下水杨酸盐。很

134

重要的是，水杨酸盐不是一种环氧合酶抑制剂，应该关注除了阿司匹林以外的环氧合酶抑制剂，例如非选择性的NSAIDs可同时抑制环氧合酶抑制剂-1和环氧合酶抑制剂-2，还有特殊的环氧合酶抑制剂-2（例如塞来昔布、罗非考西、依托考昔）。环氧合酶抑制剂-2通过直接减少血管壁上PGI2和PGE2，可导致血小板聚集、高血压和血栓形成，从而增加了心血管疾病危险[87]。

尽管大剂量的水杨酸盐或阿司匹林可减轻系统性炎症，但这不是水杨酸盐预防心血管疾病唯一的途径。APOE\*3基因敲除的高脂血症小鼠，给予水杨酸盐治疗，不仅降低了肝脏和主动脉的NF-κB活性，同时还显著地降低了血清胆固醇水平。实际上，长期以来大剂量的阿司匹林和水杨酸盐治疗可以降低血清游离脂肪酸和胆固醇水平[88, 89]，主要是通过抑制脂质的生成，同时水杨酸也可抑制脂肪组织脂肪酸的释放[90]。近期的机制学研究报道在动脉硬化小鼠模型中给予阿司匹林和水杨酸盐治疗可以降低小鼠血清VLDL-TG和VLDL-TC水平，其归功于水杨酸盐可减少VLDL-TG的生成。阿司匹林减少肝脏VLDL-TG生成的机制，是通过其对肝脏NF-κB直接的抑制作用或间接通过降低血浆游离脂肪酸水平，从而减少了脂肪酸成为VLDL-TG[91]。

这些动物的观察研究提示抗炎药水杨酸盐不仅通过减少炎症反应来减轻动脉粥样硬化，而且通过额外的诱导抗动脉硬化的脂质生成。然而，需要引起警惕的是，大剂量的阿司匹林或者水杨酸盐可引起胃肠道副作用。需要进一步探索开发抗炎药物，其减轻炎症反应、降低血清脂质水平，减轻动脉硬化进程，类似于水杨酸盐一样的药，但是要减少它们的不良反应。双水杨酸酯被认为是一种更安全的替代药物，事实上现在已被运用在2型糖尿病患者的临床试验（TINSAL-T2D）和心血管疾病的患者临床试验（TINSAL-CVD）。已有临床试验提示大剂量的双水杨酸酯在糖尿病患者中可以降低血清中总胆固醇的水平[92]，但是类似的临床研究在糖尿病前期病人同样给予双水杨酸酯治疗不能明确证实这些发现[93]。

**8.2甲氨喋林**

大剂量甲氨喋林被用于癌症的治疗和抑制叶酸的代谢，而叶酸是核酸合成和细胞增殖所必需的，低剂量甲氨喋林可有效地用于治疗免疫性疾病例如类风湿性关节炎、银屑病和系统性红斑狼疮。低剂量和大剂量甲氨喋林抗炎的作用被认为是不同的机制所介导的，低剂量认为是抑制了嘌呤代谢酶从而改变了T细胞的活性和黏附因子的表达[94]。此外，体外实验还证实低剂量的甲氨喋林也许可以阻止IL-1β与IL-1受体的结合[95]。

最主要通过其抗炎作用，甲氨喋林可有效地降低类风湿关节炎患者和银屑病患者的心血管疾病风险[96]。此外，甲氨喋林可部分的纠正类风湿关节炎患者极低的HDL水平，而这也许可降低这些患者的心血管疾病风险。很有趣的是去评估低剂量的甲

135

氨喋林是否相似地升高那些存在心血管疾病风险的一般人群中的HDL水平。最近高胆固醇饲养的兔子的临床前研究揭示在不影响血清脂质和脂蛋白的情况下甲氨喋林可显著地减轻动脉粥样硬化。近期正在实施的减少心血管疾病炎症临床试验（CITR）评估低剂量的甲氨喋林在C反应蛋白升高的冠心病患者中心血管事件和血清脂质水平的更多决定性结果被期待[97]。

**8.3细胞因子抑制剂**

以上的数据提示其他的抗炎药物也可有效地预防心血管疾病，不仅仅是通过减少炎症反应，也可通过改善促粥样硬化的脂质来实现。以下我们将讨论的决策是特异地减少促炎的细胞因子TNFα、IL-6和IL-1β的信号通路，它们都是包含在动脉粥样硬化进程中的细胞因子，而且可直接影响脂质代谢。

**8.3.1 TNFα**

TNFα在动脉粥样硬化的发展中作为一个很重要的炎症介质。抗TNFα治疗（例如英夫利昔）被用于治疗有慢性炎症的类风湿性关节炎患者，降低了这些患者的心血管事件[98]。这种降低心血管事件的原因可能最主要归因于减弱的慢性炎症，因为其对类风湿关节炎患者的血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇无影响或者甚至可升高它们。大多数来源于基因模型的实验数据提示破坏TNFα信号通路和动脉粥样硬化的减轻相关而对血清脂质并无影响。一个报道以ApoE基因敲除的小鼠为模型研究TNFα拮抗剂与动脉硬化的相关性发现其对血脂水平无影响，但有减轻动脉硬化进程的趋势。其它的研究评价了抗TNFα治疗在代谢性疾病的效能，例如在肥胖研究中提示抗TNFα治疗在胰岛素抵抗的患者和老鼠中可增加胰岛素的敏感性，尽管这些结果不太一致[99]。TNFα拮抗剂是否在高脂血症患者中可以降低血清脂质水平需在未来的研究中进一步评价。

**8.3.2 IL-6**

IL-6是一种促炎细胞因子成为心血管疾病的危险标志物，近期才收到了其作为致病危险因素的坚实证据，因此在心血管疾病的治疗中才成为可能的靶点[100, 101]。IL-6信号通路可通过单克隆抗体拮抗IL-6受体（IL-6R）（例如塔西单抗）减弱，作为一种较新的治疗措施来治疗类风湿性关节炎[102]。IL-6经典的信号通路是通过膜-结合IL-R/gp130复合体，IL-6亦能通过可溶解的IL-6R诱导反式信号传导。IL-6反式信号通路可通过自然溶解形式的gp30（sgp130）减轻ldlr-/-小鼠动脉粥样硬化进程，但对血脂无影响[103]。事实上抑制IL-6信号通路是否能减轻人类动脉粥样硬化进程目前仍是未知。几项关于类风湿性关节炎患者的研究已提示IL-6抑制剂塔西单抗可轻度地增加脂质水平（例如胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白和甘油三酯），而未影响动脉硬化指数（HDL-C: TC）[104, 105]。这一观点已经被最近的一项meta分析所肯定。是否这是一个特殊的化合物，需要未来研究进一步评估。

136

**8.3.3 IL-1β**

IL-1β是一种促炎的细胞因子可介导炎症反应，可被IL-1受体拮抗剂（IL-1ra）通过竞争性结合到IL-1受体（IL-1R）抵消。遗传研究揭示了IL-β的激活和动脉粥样硬化的联系，研究提示基因的多态性将会增加IL-1β：IL-1ra比值比和心血管疾病发生率的增加相关[106, 107]。在动物模型中，IL-1β活性和动脉粥样硬化的发展成因果联系。IL-1β的表达和活性是通过炎症复合体来实现的，斑块中的炎症复合体是增加的，IL-1β是通过内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞分泌的，降低斑块中IL-1β信号通路也许可减轻动脉粥样硬化。的确，IL-1ra干预后可在不改变血清脂质水平的情况下减轻ApoE基因敲除小鼠动脉硬化程度。然而，IL-1β干预大鼠后可引起高脂血症，提示IL-1ra治疗也许可以降低血清脂质水平。在ApoE基因敲除小鼠中IL-1ra缺陷可增加血清胆固醇水平和降低高密度脂蛋白水平，这种效应可被高胆固醇饮食放大。另外，一项近期增加的研究提示IL-1β基因的多态性和IL-1β活性增加、空腹及餐后血清脂质增加成相关性。IL-1ra干预后改善血清脂质水平的潜力尚未被详细地研究。目前为止，小鼠或者类风湿性关节炎患者再或者代谢综合征患者皮下行IL-1ra干预，未对血清脂质水平有影响[108]。是否特殊的IL-1β单克隆抗体抑制剂（例如康纳单抗）可以降低血清脂质水平目前仍然未知。康纳单抗抗炎、抗栓研究（CANTOS）的结果也许可以回答这个问题，尽管试验中所有的病人都接受了他汀药物治疗，也许会妨碍解释相关的血脂水平[109]。高脂血症小鼠模型的临床前试验是需要的特别是在评价IL-1β抑制剂对血脂水平的影响。近来一项研究评价了康纳单抗在2型糖尿病患者

（28%患者接受他汀类药物治疗）中对炎症和血脂水平的作用，研究并未提示IL-1β抑制剂可影响血脂水平，尽管其可显著地降低循环中的炎症标志物C反应蛋白和IL-6。引人注意的是，最高剂量的康纳单抗甚至增加血清甘油三酯水平[110]。

尽管抗细胞因子治疗脂质代谢和动脉粥样硬化相关的研究数据很稀缺，但目前的研究提示细胞因子抑制剂可有效地减轻炎症，没有明确地影响（例如抗-TNF，抗

-IL-1β）或者甚至能升高（例如IL-6）血清脂质水平。抑制个体炎症反应的介质如细胞因子可能缺乏足够的影响从而未对血脂及脂蛋白途径产生有益的影响。细胞因子抑制剂可减轻类风湿性关节炎患者动脉硬化，而且很大的可能性减少其他处于增强的慢性炎症反应状态（例如系统性红斑狼疮、炎症性肠病、慢性阻塞性肺疾病）患者的动脉粥样硬化。然而，细胞因子抑制剂对高脂血症患者或者2型糖尿病患者的作用仍有待进一步确认，这也许可能受限于这些患者处于低炎症状态。因此，近期只实施了CANTOS的临床试验来评价IL-1β抑制剂在C反应蛋白升高的患者中对心血管疾病的影响[109]。

**9结论**

137

在过去的十年里已经很清楚血脂和血清炎症介质不仅是动脉粥样硬化的独立危险因素而且它们之间存在着多水平的交互作用，从而加剧了动脉粥样硬化的进展。作为一个结论，针对血脂紊乱和炎症都可能对动脉粥样硬化的治疗有益。

有趣的是，要强调不同类型的降脂药无不透漏其抗炎的性能。这可能是继发于简单的降低血脂和脂蛋白可直接影响炎症，但是此外还通过直接干扰炎症反应通路。目前大多数的抗炎治疗对脂质代谢的影响研究数据主要来源于有慢性炎症疾病的患者临床试验或者动物实验研究。正在进行的临床试验希望揭示存在心血管疾病危险因素的大众人群中抗炎治疗对血脂水平的影响，但是这些临床试验中广泛地使用了他汀类药物可能会限制结果的解释。总之，这将有助于理解这些药物在动脉粥样硬化治疗中的效能。

参考文献

[1] Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime[J]. Nature medicine, 2002, 8(11): 1211-1217.

[2] Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis[J]. Science, 1976, 193(4258): 1094-1100.

[3] Chapman MJ. Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease[J]. Pharmacology & therapeutics, 2006, 111(3): 893-908.

[4] Zhu X, Parks JS. New roles of HDL in inflammation and hematopoiesis[J]. Annual review of nutrition, 2012, 32: 161-182.

[5] Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, et al. The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis[J]. Journal of lipid research, 2009, 50 Suppl: S145-49.

[6] Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis[J]. Nature immunology, 2011, 12(3): 204-212.

[7] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature, 2002, 420(6917): 868-874.

[8] de Winther MP, Kanters E, Kraal G, et al. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2005, 25(5): 904-914.

[9] Manning AM, Davis RJ. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold[J]. NaturereviewsDrugdiscovery, 2003, 2(7): 554-565.

[10] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways[J]. Physiological reviews, 2006, 86(2): 515-581.138

[11] Yan SF, Harja E, Andrassy M, et al. Protein kinase C beta/early growth response-1 pathway: a key player in ischemia, atherosclerosis, and restenosis[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2006, 48(9 Suppl 1): A47-A55.

[12] Tannock LR, O'Brien KD, Knopp RH, et al. Cholesterol feeding increases C-reactive protein and serum amyloid A levels in lean insulin-sensitive subjects[J]. Circulation, 2005, 111(23): 3058-3062.

[13] Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance[J]. The Journal of clinical investigation, 1995, 95(5): 2409-2415.

[14] Snel M, van Diepen JA, Stijnen T, et al. Immediate and long-term effects of addition of exercise to a 16-week very low calorie diet on low-grade inflammation in obese, insulin-dependent type 2 diabetic patients[J]. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 2011, 49(12): 3104-3111.

[15] Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, et al. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults[J]. JAMA: the journal of the American Medical Association, 1999, 282(22): 2131-2135.

[16] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance[J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1761-1772.

[17] Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue[J]. The Journal of clinical investigation, 2003, 112(12): 1796-1808.

[18] Kleemann R, Verschuren L, van Erk MJ, et al. Atherosclerosis and liver inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: a combined transcriptomics and metabolomics analysis[J]. Genome biology, 2007, 8(9): R200.

[19] Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Hepatology, 2008, 48(2): 474-486.

[20] de Vries-van der Weij J, Toet K, Zadelaar S, et al. Anti-inflammatory salicylate beneficially modulates pre-existing atherosclerosis through quenching of NF-kappaB activity and lowering of cholesterol[J]. Atherosclerosis, 2010, 213(1): 241-246.

[21] Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB[J]. Nature medicine, 2005,

139

11(2):183-190.

[22] Bieghs V, Wouters K, van Gorp PJ, et al. Role of scavenger receptor A and CD36 in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice[J]. Gastroenterology, 2010, 138(7): 2477-86, 86 e1-e3.

[23] Leonarduzzi G, Gamba P, Gargiulo S, et al. Inflammation-related gene expression by lipid oxidation-derived products in the progression of atherosclerosis[J]. Free radical biology & medicine, 2012, 52(1): 19-34.

[24] Wong MC, van Diepen JA, Hu L, et al. Hepatocyte-specific IKKbeta expression aggravates atherosclerosis development in APOE\*3-Leiden mice[J]. Atherosclerosis, 2012, 220(2): 362-368.

[25] Lewis KE, Kirk EA, McDonald TO, et al. Increase in serum amyloid a evoked by dietary cholesterol is associated with increased atherosclerosis in mice[J]. Circulation, 2004, 110(5): 540-545.

[26] Bieghs V, Rensen PC, Hofker MH, et al. NASH and atherosclerosis are two aspects of a shared disease: central role for macrophages[J]. Atherosclerosis, 2012, 220(2): 287-293.

[27] van Tits LJ, Stienstra R, van Lent PL, et al. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2[J]. Atherosclerosis, 2011, 214(2): 345-349.

[28] Greig FH, Kennedy S, Spickett CM. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation[J]. Free radical biology & medicine, 2012, 52(2): 266-280.

[29] Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals[J]. Nature, 2010, 464(7293): 1357-1361.

[30] Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation[J]. PloS one, 2010, 5(7): e11765.

[31] Alipour A, van Oostrom AJ, Izraeljan A, et al. Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2008, 28(4): 792-797.

[32] Maganto-Garcia E, Tarrioml, Grabie N, et al. Dynamic changes in regulatory T cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia[J]. Circulation, 2011, 124(2): 185-195.140

[33] Patel S, Di Bartolo BA, Nakhla S, et al. Anti-inflammatory effects of apolipoprotein A-I in the rabbit[J]. Atherosclerosis, 2010, 212(2): 392-397.

[34] Cai L, Wang Z, Meyer JM, et al. Macrophage SR-BI regulates LPS-induced pro-inflammatory signaling in mice and isolated macrophages[J]. Journal of lipid research, 2012, 53(8): 1472-1481.

[35] Tolle M, Levkau B, Kleuser B, et al. Sphingosine-1-phosphate and FTY720 as anti-atherosclerotic lipid compounds[J]. European journal of clinical investigation, 2007, 37(3): 171-179.

[36] Nofer JR, Bot M, Brodde M, et al. FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. Circulation, 2007, 115(4): 501-508.

[37] Norata GD, Catapano AL. HDL and adaptive immunity: a tale of lipid rafts[J]. Atherosclerosis, 2012, 225(1): 34-35.

[38] Woo JM, Lin Z, Navab M, et al. Treatment with apolipoprotein A-1 mimetic peptide reduces lupus-like manifestations in a murine lupus model of accelerated atherosclerosis[J]. Arthritis research & therapy, 2010, 12(3): R93.

[39] Shi H, KokoevamV, Inouye K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance[J]. The Journal of clinical investigation, 2006, 116(11): 3015-3025.

[40] Lee JY, Zhao L, Youn HS, et al. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1[J]. The Journal of biological chemistry, 2004, 279(17): 16971-16979.

[41] Schwartz EA, Zhang WY, Karnik SK, et al. Nutrient modification of the innate immune response: a novel mechanism by which saturated fatty acids greatly amplify monocyte inflammation[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2010, 30(4): 802-808.

[42] Oh DY, Lagakos WS. The role of G-protein-coupled receptors in mediating the effect of fatty acids on inflammation and insulin sensitivity[J]. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 2011, 14(4): 322-327.

[43] Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43[J]. Nature, 2009, 461(7268): 1282-1286.

[44] Nilsson NE, Kotarsky K, Owman C, et al. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids[J].

141

Biochemical and biophysical research communications, 2003, 303(4):1047-1052.

[45] Wang J, Wu X, Simonavicius N, et al. Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84[J]. The Journal of biological chemistry, 2006, 281(45): 34457-34464.

[46] Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects[J]. Cell, 2010, 142(5): 687-698.

[47] Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids[J]. The Journal of nutritional biochemistry, 2010, 21(9): 781-792.

[48] Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids[J]. Cancer letters, 2008, 269(2): 363-377.

[49] Margioris AN. Fatty acids and postprandial inflammation[J]. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 2009, 12(2): 129-137.

[50] Chawla A. Control of macrophage activation and function by PPARs[J]. Circulation research, 2010, 106(10): 1559-1569.

[51] Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. PPARs: the vasculature, inflammation and hypertension[J]. Current opinion in nephrology and hypertension, 2009, 18(2): 128- 133.

[52] Staels B, Koenig W, Habib A, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators[J]. Nature, 1998, 393(6687): 790-793.

[53] Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, et al. Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators[J]. The Journal of biological chemistry, 2000, 275(47): 36703-36707.

[54] Marx N, Sukhova GK, Collins T, et al. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells[J]. Circulation, 1999, 99(24): 3125-3131.

[55] Kooistra T, Verschuren L, de Vries-van der Weij J, et al. Fenofibrate reduces atherogenesis in ApoE\*3Leiden mice: evidence for multiple antiatherogenic effects besides lowering plasma cholesterol[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2006, 26(10): 2322-2330.

[56] Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, et al. Macrophage-specific

142

PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance[J]. Nature, 2007, 447(7148):1116-1120.

[57] Mukundan L, Odegaard JI, Morel CR, et al. PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance[J]. Nature medicine, 2009, 15(11): 1266-1272.

[58] Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, et al. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta[J]. Science, 2003, 302(5644): 453-457.

[59] Choi JM, Bothwell AL. The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases[J]. Molecules and cells, 2012, 33(3): 217- 222.

[60] Cipolletta D, Feuerer M, Li A, et al. PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells[J]. Nature, 2012, 486(7404): 549-553.

[61] Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(22): 12097-120102.

[62] Im SS, Osborne TF. Liver x receptors in atherosclerosis and inflammation[J]. Circulation research, 2011, 108(8): 996-1001.

[63] Michael DR, Ashlin TG, Buckleyml, et al. Liver X receptors, atherosclerosis and inflammation[J]. Current atherosclerosis reports, 2012, 14(3): 284-293.

[64] Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor(LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR[J]. The Journal of biological chemistry, 2007, 282(1): 743-751.

[65] Kratzer A, Buchebner M, Pfeifer T, et al. Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE-/-mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia[J]. Journal of lipid research, 2009, 50(2): 312-326.

[66] Hambruch E, Miyazaki-Anzai S, Hahn U, et al. Synthetic farnesoid X receptor agonists induce high-density lipoprotein-mediated transhepatic cholesterol efflux in mice and monkeys and prevent atherosclerosis in cholesteryl ester transfer protein transgenic low-density lipoprotein receptor(-/-) mice[J]. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2012, 343(3): 556-567.

[67] Hartman HB, Gardell SJ, Petucci CJ, et al. Activation of farnesoid X receptor prevents atherosclerotic lesion formation in LDLR-/-and apoE-/-mice[J]. Journal of lipid research, 2009, 50(6): 1090-1100.143

[68] Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, et al. Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor[J]. American journal of physiology Heart and circulatory physiology, 2009, 296(2): H272-H281.

[69] Sammalkorpi K, Valtonen V, Kerttula Y, et al. Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections[J]. Metabolism: clinical and experimental, 1988, 37(9): 859-865.

[70] Feingold KR, Staprans I, Memon RA, et al. Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance[J]. Journal of lipid research, 1992, 33(12): 1765-1776.

[71] Feingold KR, Grunfeld C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia[J]. Diabetes, 1992, 41 Suppl 2: 97-101.

[72] Memon RA, Staprans I, Noor M, et al. Infection and inflammation induce LDL oxidation in vivo[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2000, 20(6): 1536-1542.

[73] van Diepen JA, Wong MC, Guigas B, et al. Hepatocyte-specific IKK-beta activation enhances VLDL-triglyceride production in APOE\*3-Leiden mice[J]. Journal of lipid research, 2011, 52(5): 942-950.

[74] Park YB, Lee SK, Lee WK, et al. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis[J]. The Journal of rheumatology, 1999, 26(8): 1701-1704.

[75] Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, et al. Lipid paradox in rheumatoid arthritis: the impact of serum lipid measures and systemic inflammation on the risk of cardiovascular disease[J]. Annals of the rheumatic diseases, 2011, 70(3): 482-487.

[76] Mirjafari H, Al-Husain A, Bruce IN. Cardiovascular risk factors in inflammatory arthritis[J]. Current opinion in lipidology, 2011, 22(4): 296-301.

[77] Svenungsson E, Gunnarsson I, Fei GZ, et al. Elevated triglycerides and low levels of high-density lipoprotein as markers of disease activity in association with up-regulation of the tumor necrosis factor alpha/tumor necrosis factor receptor system in systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis and rheumatism, 2003, 48(9): 2533-2540.

[78] Charles-Schoeman C, Lee YY, Grijalva V, et al. Cholesterol efflux by high density lipoproteins is impaired in patients with active rheumatoid arthritis[J]. Annals of the rheumatic diseases, 2012, 71(7): 1157-1162.

[79] McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, et al. Proinflammatory high-density

144

Lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis[J]. Arthritis and rheumatism, 2006, 54(8):2541-2549.

[80] Bu DX, Griffin G, Lichtman AH. Mechanisms for the anti-inflammatory effects of statins[J]. Current opinion in lipidology, 2011, 22(3): 165-170.

[81] Florentin M, Liberopoulos EN, Kei A, et al. Pleiotropic effects of nicotinic acid: beyond high density lipoprotein cholesterol elevation[J]. Current vascular pharmacology, 2011, 9(4): 385-400.

[82] Libby P, Plutzky J. Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor- gamma agonists[J]. The American journal of cardiology, 2007, 99(4A): 27B-40B.

[83] Charo IF, Taub R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis[J]. Nature reviews Drug discovery, 2011, 10(5): 365-376.

[84] Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin[J]. Circulation, 2000, 101(10): 1206-18.

[85] Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa) B kinase-beta[J]. Nature, 1998, 396(6706): 77-80.

[86] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion[J]. The Journal of clinical investigation, 1996, 97(7): 1715-1722.

[87] Yu Y, Ricciotti E, Scalia R, et al. Vascular COX-2 modulates blood pressure and thrombosis in mice[J]. Science translational medicine, 2012, 4(132): 132ra54.

[88] Sommariva D, Bonfiglioli D, Zanaboni L, et al. Effects of acetylsalicylic acid on plasma lipids and on post-heparin lipase activities[J]. International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology, 1981, 19(3): 112-116.

[89] Wooles WR, Borzelleca JF, Branham GW, Jr. Effect of acute and prolonged salicylate administration on liver and plasma triglyceride levels and diet-induced hypercholesterolemia[J]. Toxicology and applied pharmacology, 1967, 10(1): 1-7.

[90] Bizzi A, Codegoni AM, Garattini S. Salicylate, a Powerful Inhibitor of Free Fatty Acid Release[J]. Nature, 1964, 204: 1205.

[91] van Diepen JA, Vroegrijk IO, Berbee JF, et al. Aspirin reduces hypertriglyceridemia by lowering VLDL-triglyceride production in mice fed a high-fat diet[J]. American journal of physiology Endocrinology and metabolism, 2011, 301(6): E1099-E1107.

[92] Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA, et al. The effects of salsalate on glycemic

145

Control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial[J]. Annals of internal medicine, 2010, 152(6):346-357.

[93] Faghihimani E, Aminorroaya A, Rezvanian H, et al. Reduction of insulin resistance and plasma glucose level by salsalate treatment in persons with prediabetes[J]. Endocrine practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists, 2012, 18(6): 826-833.

[94] Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, et al. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules[J]. Clinical immunology, 2005, 114(2): 154-163.

[95] Brody M, Bohm I, Bauer R. Mechanism of action of methotrexate: experimental evidence that methotrexate blocks the binding of interleukin 1 beta to the interleukin 1 receptor on target cells[J]. European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies, 1993, 31(10): 667-674.

[96] Prodanovich S, Ma F, Taylor JR, et al. Methotrexate reduces incidence of vascular diseases in veterans with psoriasis or rheumatoid arthritis[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2005, 52(2): 262-267.

[97] Ridker PM. Testing the inflammatory hypothesis of atherothrombosis: scientific rationale for the cardiovascular inflammation reduction trial(CIRT)[J]. Journal of thrombosis and haemostasis: JTH, 2009, 7 Suppl 1: 332-339.

[98] Jacobsson LT, Turesson C, Gulfe A, et al. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis[J]. The Journal of rheumatology, 2005, 32(7): 1213-1218.

[99] Wascher TC, Lindeman JH, Sourij H, et al. Chronic TNF-alpha neutralization does not improve insulin resistance or endothelial function in" healthy" men with metabolic syndrome[J]. Molecular medicine, 2011, 17(3-4): 189-193.

[100] Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis C, Hingorani AD, Casas JP. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis[J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1214-1224.

[101] Collaboration IRGCERF, Sarwar N, Butterworth AS, et al. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies[J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1205-1213.

[102] Senolt L, Vencovsky J, Pavelka K, et al. Prospective new biological therapies for

146

Rheumatoid arthritis[J]. Autoimmunity reviews, 2009, 9(2):102-107.

[103] Schuett H, Oestreich R, Waetzig GH, et al. Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2012, 32(2): 281-290.

[104] Kawashiri SY, Kawakami A, Yamasaki S, et al. Effects of the anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab, on serum lipid levels in patients with rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology international, 2011, 31(4): 451-456.

[105] Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, et al. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate[J]. Arthritis and rheumatism, 2006, 54(9): 2817-2829.

[106] Olofsson PS, Sheikine Y, Jatta K, et al. A functional interleukin-1 receptor antagonist polymorphism influences atherosclerosis development. The interleukin-1beta: interleukin-1 receptor antagonist balance in atherosclerosis[J]. Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society, 2009, 73(8): 1531-1536.

[107] Marculescu R, Endler G, Schillinger M, et al. Interleukin-1 receptor antagonist genotype is associated with coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51(12): 3582-3585.

[108] van Asseldonk EJ, Stienstra R, Koenen TB, et al. Treatment with Anakinra improves disposition index but not insulin sensitivity in nondiabetic subjects with the metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2011, 96(7): 2119-2126.

[109] Ridker PM, Thuren T, Zalewski A, et al. Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study(CANTOS)[J]. American heart journal, 2011, 162(4): 597-605.

[110] Ridker PM, Howard CP, Walter V, et al. Effects of interleukin-1beta inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial[J]. Circulation, 2012, 126(23): 2739-2748.

147

**攻读博士学位期间取得的学术成果**

**1 论 著**

[1] **Chen QJ**, Lai HM, Chen BD, Li XM, Zhai H, He CH, et al. Appropriate LDL-C-to-HDL-C Ratio Cutoffs for Categorization of Cardiovascular Disease Risk Factors among Uygur Adults in Xinjiang, China[J]. International journal of environmental research and public health. 2016,13(2).

[2] **Chen QJ**, Lai HM, Zhao L, Ma YT, Li XM, Zhai H, et al. Association Between the NFKB1-94ins/del ATTG Polymorphism (rs28362491) and Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Genetic testing and molecular biomarkers. 2016.

[3] **Qingjie Chen**, Hui Zhai, Xiaomei Li, Yitong Ma, Bangdang Chen, Fen Liu, Jia Xie, Chunhui He, Junyi Luo, Jing Gao, Yining Yang. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 in a mouse model of atherosclerosis: determination of the optimal expression

time in vivo. Molecular Medicine Reports. （待发表）.

[4] Wang X, **Chen Q**, Pu H, et al. Adiponectin improves NF-kappaB-mediated inflammation and abates atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Lipids in health and disease, 2016,15(1):33.

[5] Zhai H, **Chen QJ**, Gao XM, Ma YT, Chen BD, Yu ZX, et al. Inhibition of the NF-kappaB pathway by R65 ribozyme gene via adeno-associatedvirus serotype 9 ameliorated oxidized LDL induced human umbilical vein endothelial cell injury[J]. International journal of clinical and experimental pathology. 2015,8(9):9912-21.

[6] Lai HM, **Chen QJ**, Yang YN, Ma YT, Li XM, Xu R, et al. Association of mean platelet volume with impaired myocardial reperfusion and short-term mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention[J]. Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis. 2016,27(1):5-12.

[7] Li DZ, **Chen QJ**, Sun HP, et al. Mean platelet volume to platelet count ratio predicts in-hospital complications and long-term mortality in type A acute aortic dissection[J]. Blood coagul Fibrinolysis,2015, Nov 7[Epub ahead of print].

[8] Lai H, **Chen Q**, Li X, et al. Association between genetic polymorphism in NFKB1 and NFKBIA and coronary artery disease in a Chinese Han population[J]. International journal of clinical and experimental medicine, 2015,8(11):21487-96.

148

[9] Hui Zhai, **Qing-Jie Chen**, Bang-Dang Chen, et al. Long noncoding RNA MALAT1 as a putative biomarker of lymph node metastasis: a meta-analysis[J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(5):7648-7654.

149

**个人简历**

陈清杰，男，新疆医科大学第一附属医院心血管内科博士研究生。在攻读博士学位期间参与国家自然科学基金2项，自治区基金科学基金3项，第一作者发表SCI

论文3篇，并列第一作者发表SCI论文6篇。获得2014年自治区级奖学金，被评为新疆医科大学校级优秀学生。

**教育经历**

2013/09-至今新疆医科大学，心血管病内科学专业，博士

2011/09-2013/07新疆医科大学，临床医学院心血管内科学专业，硕士

2006/09-2011/09新疆医科大学，第一临床医学院临床医学专业，学士

**工作经历**

无。

150

**新疆医科大学博士研究生学位论文**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 研究生姓名 | 陈清杰 | 学 号 | 107601130649 |
| 所在学院 | 第一附属医院 | 导师姓名 | 杨毅宁 |
| 专 业 | 内科学（心血管病） | 研究方向 | 动脉粥样硬化基础研究 |
| 论文题目 | 靶向干预 NF-κB 及内质网应激对 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化的作用和机制研究 | | |
| 学术评语：  该生的学位论文立题新颖，设计较为合理，实验方法先进，工作量大，所得数据可靠，数据统计学方法运用正确。虽为基础实验研究，但与临床 AS 病理生理变化密切结合，其结果为认识 AS 的发生发展机制和下一步基因治疗动脉粥样硬化奠定了实验基础。  该生在实验前，查阅了大量的文献，并请教了多名专家及相关专业的老师；进行了质量控制的培训、在相关指标检测上有一定的重复性，保证了技术流程严谨和结果的科学性。论文撰写较规范，分析讨论逻辑性强，综述内容与研究内容相一致。  本研究通过 AAV9-CMV-IκBα 在体动物静脉注射，可使 AS 损伤明显减轻，提示 IκB 基因的过表达可以阻滞 AS 发病进程、对血管有保护作用。同时可降低机体炎性反应，此作用是通过 IκB 阻遏了 NF-кB 通路的激活及下游炎症因子转录表达实现的；此外通过药物尼可地尔、阿托伐他汀干预实验，进一步证实抑制内质网应激与 NF-кB 通路激活有显著减缓动脉粥样硬化进程的作用。结果具有一定的科学性、先进性和创新性。学位论文达到博士研究生毕业的要求。  同意该生提交学位论文，并进行论文答辩！  指导教师签字：  年 月 日 | | | |

**导师评阅表**

151