·基础研究·

运动对Apo E基因敲除小鼠冠状动脉超氧化物阴离子和NF-κB的调控作用*

吴继全[1,2] 程文立[1,5] 陈 莉[1] 黎 娜[1] 韩呈武[3] 孔 晶[4] 李 鸿[4] 潘 琳[4] 姜国臣[1] 彭靖嫔[1]

摘要

目的:探讨长期中等负荷耐力运动对载脂蛋白E(Apo E)基因敲除小鼠冠状动脉粥样硬化的影响和对冠状动脉超氧化物阴离子、CD40L的调控作用。

方法:40只6周龄Apo E基因敲除小鼠随机分为运动干预组和对照组。运动干预组给予长期中等负荷耐力跑台运动干预32周;一般对照组未予以特殊干预。实验结束后评估两组小鼠冠状动脉主干的动脉粥样硬化病理形态学改变程度,采用荧光免疫组化法测定冠状动脉主干的超氧化物阴离子、CD40L的表达、实时PCR的方法测定NF-κB、MCP-1mRNA的表达。

结果:一般对照组冠状动脉粥样硬化进展显著;长期中等负荷耐力运动组冠状动脉粥样硬化程度显著下降、冠状动脉主干狭窄率较对照组显著下降(33.3±5.66 % vs 48.3±5.91%,P<0.01)、冠状动脉主干超氧化物阴离子显著低于对照组(2.17±0.69 vs 3.70±0.51, P<0.01),CD40L的表达均显著低于对照组(1.97±0.41 vs 2.47±0.35,P<0.01),并且NF-κB、ICAM-1、MCP-1mRNA的表达也显著低于对照组。

结论:长期中等负荷耐力运动可显著下调Apo E基因敲除小鼠冠状动脉超氧化物阴离子与CD40L的表达,减轻炎症浸润并延缓冠状动脉粥样硬化的进展。

关键词 耐力运动;载脂蛋白E基因敲除小鼠;动脉粥样硬化;超氧化物阴离子;核因子-κB

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2013)-08-0694-05

Regulatory effect of exercise on the expressions of superoxide anion and nuclear factor in coronary artery of apolipoprotein E-deficient mice/WU JiQuan, CHENG Wenli, CHEN Li,et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(8): 694—698

Abstract

Objective: To investigate the regulatory effect of exercise on the expressions of superoxide anion and inflammatory reaction changes in coronary artery of apolipoprotein E(Apo E) deficient mice and the atherosclerotic progression of main coronary artery by treating with long-term medium load endurance exercise.

Method: Forty 6-week-age Apo E deficient mice were randomly divided into two groups: the exercise group and the control group (n=20, each). The mice in the exercise group were kept on a long-term of 32 weeks treadmill exercise. At the end of study, the morphology changes of main coronary artery were evaluated, the expressions of superoxide anion and leukocytel differentiation antigen 40 ligands (CD40L) on the coronary artery were measured by fluoroimmanohistochemical technique, and the expressions of inter cellular adhesion molecule(ICAM)-1, monocyte chemoattractant protein(MCP)-1 and NF-κB were also measured by real-time fluorescence quantitative PCR technique.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.08.003

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173420)

1 中日友好医院心内科,北京,100029;2 中日友好医院干部保健科; 3 中日友好医院检验科;4 中日友好医院临床医学研究所;
5 通讯作者

作者简介:吴继全,男,硕士,主任医师;收稿日期:2013-05-21

Result: The atherosclerotic stenosis severity of main coronary artery in the control group was more seriously than that of the exercise group (48.3±5.91% vs 33.3±5.66, $P<0.01$). The expressions of superoxide anion and CD40L on coronary artery were significantly lower in the exercise group than that of the control group(2.17±0.69 vs 3.70±0.51, $P<0.01$; 1.97±0.41 vs 2.47±0.35, $P<0.01$). The mRNA expressions of ICAM-1, MCP-1 and NF-κB were also significantly lower in the exercise group than that of the control group.

Conclusion: Long-term medium load endurance exercise can inhibit the superoxide anion expression, reduce the inflammation reaction on coronary artery and slow down the progression of coronary artery atherosclerosis of Apo E deficient mice.

Author's address China-Japan Friendship Hospital,Beijing,100029

Key word endurance exercise;apolipoprotein E-deficient mice;atherosclerosis;superoxide anion;NF-κB

急性心血管病事件以其高发生率和致死率在疾病中名列前茅,如何减缓冠状动脉粥样硬化的进展,减少急性心血管病事件的发生,是多年来探索的课题。近年有文献报道,适度的运动训练有利于心脏康复,减缓冠状动脉粥样硬化的进展[1],但既往研究所观察时间较短,有关长期运动的研究较少。Pellegrin等[2]发现长期运动有益于稳定动脉粥样硬化斑块,但有关长期运动对冠状动脉粥样硬化的影响尚未见报道,并且其可能的机制仍不明确。为此,我们对中等强度长期运动是否减缓冠状动脉粥样硬化的进展进行了实验研究,并对其可能机制进行了探讨。

动脉粥样硬化与氧化和炎症密不可分,氧自由基对血管局部的损伤是引发和加重动脉粥样硬化的重要原因之一[3],超氧化物阴离子是阴离子自由基中的一个重要组成部分,运动可以降低氧自由基的产生,既往有关氧自由基的研究多测定的是血清、肝脏或心肌组织中的总含量,尚未见有关运动对冠状动脉组织中氧自由基表达影响的直接证据。本研究对冠状动脉组织超氧化物阴离子进行了直接的测定,并观察到中等量长期负荷运动显著降低了冠状动脉组织超氧化物阴离子的表达;同时由于动脉粥样硬化是一个慢性炎症过程,氧自由基与动脉粥样硬化的慢性炎症密不可分,二者相互影响,最终影响动脉粥样硬化的进程,因此,本研究观察了有关炎症的变化,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

DSPT202型小动物跑台(杭州立泰);Hitachi 7600生化自动分析仪(日本),抗鼠白细胞分化抗原40配体(leukocyte differentiation antigen 40 ligands,CD40L)单克隆抗体(Abcam公司,英国)、超氧阴离子(采用超氧化物阴离子荧光探针,Santa Cruz,美国,2μmol/L)、抗鼠核因子-κB P50亚基(nuclear factor κB P50 subunit,NF-κB P50)多克隆抗体、FITC标记的二抗(Abcam公司,英国)。cDNA合成试剂盒和荧光定量RCR试剂盒均购自Santa Cruz公司;NFκB P50、细胞间黏附分子1(请补充英文全称,ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)的上、下游引物均购自美国Invitrogen公司。主要仪器:解剖显微镜(Nikon 90i, Nikon公司,日本);偏振光显微镜(Olympus B, Olympus公司,日本),荧光分光光度计(SpectraMax M2,MDC公司,美国),Amp PCR Systeme9700由美国ABI公司提供,Rotor gene-3000A定量PCR仪(芬兰基因公司)。Image Pro-plus 6.0图像分析软件购自美国Media Cybernetics公司。

1.2 实验动物

6周龄Apo E基因敲除小鼠(品系C57/6J,北京大学试验动物中心自美国Jackson实验室引进并培育)40只,均为雄性,体重19—21g,饲以普通饲料(中国医学科学研究动物研究所提,60Coy灭菌照射处理),饲养条件为清洁级2级,自由饮水进食。进食保证通风条件良好,室温22—24℃,相对湿度50%,光照时间12h/d。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与处理:将40只Apo E基因敲除小鼠环境适应性喂养2周后随机分成2组,运动组(A

组，n=20)和自由运动的对照组(B组)。每天清晨测量体重。运动方案[4]：先进行2周适应性跑台运动，跑台坡度0°，每周运动5d，运动强度和运动时间每天递增，第一周运动时间逐渐由15min达到45min，每次运动为3—5min，每次运动中间休息2min，每天运动1—2次，运动速度由 8m/min到12m/min。第二周运动时间逐渐增至60min，每次运动为5min，每天运动2—3次，每次运动中间休息2min，运动逐渐增至速度15m/min，并且该运动方式最后直至实验结束，共持续32周。

1.3.2 检测项目及检测方法。

1.3.2.1 血清胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)测定：采用酶法测定。

1.3.2.2 免疫荧光及超氧化物阴离子荧光测定：冰冻切片以丙酮固定，在室温下分别与抗鼠CD40L抗体孵育，FITC标记的二抗与一抗结合。以超氧阴离子孵育30min，以PBS漂洗4次。切片用荧光显微镜(Nikon 90i，日本)进行检查，计算平均光密度值对表达量进行定量分析。结果由1名不了解实验方案的人员使用Image Pro.5.1+软件进行资料分析。

1.3.2.3 实时PCR：主动脉弓提取总RNA(每组10例)。反转录后，进行实时荧光定量RT-PCR扩增。实时定量PCR：主动脉根部提取总RNA，反转录后，实时荧光定量RT-PCR扩增测定MCP-1、NF-κB P65亚基的表达。引物采用引物表达程序进行设计并确保引物跨越内含子。引物序列如下：

MCP-1上游：5'-CTGGATCGGAACCAAATGAG-3'，
下游：5'-AAGGCATCACAGTCCGAGTC-3'，
NF-κB P65亚基：上游:5'-AGCTCAAGATCTGCC G-3'，
下游:5'-TCTCACATCCGATTTTTGATAACC-3'，
β-actin上游：5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3'，
下游：5'-CGCTCAGGAGGAGCAATG-3'。

采用引物表达程序进行设计并确保引物跨越内含子，购自Invitrogen公司。扩增条件95℃ 5min，95℃ 20s，60℃ 1min，共40个循环。标本进行重复试实验结果与对照组比较，并定后者值为1，得出浓度相对值。

1.4 统计学分析

采用盲终点的方法对结果进行评定，组间比较采用方差分析及t检验的方法，全部数据以均数±标准差表示。数据使用SPSS 17.0版处理，$P<0.05$为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 血脂水平

运动组血脂水平较对照组有显著降低见表1。

2.2 运动对冠状动脉主干粥样硬化的影响

运动组冠状动脉主干狭窄率较对照组显著下降。见表2，图1。

2.3 冠状动脉主干超氧阴离子表达

运动组小鼠冠状动脉主干超氧阴离子表达较对照组小鼠有显著降低,见表2，图2。

2.4 冠状动脉血管CD40L表达

运动组小鼠冠状动脉主干CD40L表达较对照组小鼠有显著降低,见表2，图3。

2.5 运动对血管ICAM-1、MCP-1、NF-κB P65亚基基因表达的影响

运动组小鼠主动脉血管ICAM-1、MCP-1、NF-κB P65亚基基因表达均显著低于对照组，图4。将对照组小鼠的基因表达设为1，两组均为20例。

表1 两组间Apo E基因敲除小鼠血脂比较 ($\bar{x}\pm s$，mmol/L)

组别	动物数	胆固醇	甘油三酯
运动组	20	11.89±3.08①	1.33±0.71①
对照组	20	16.01±4.11	3.32±1.02

①与对照组比较$P<0.01$

表2 两组间Apo E基因敲除小鼠冠状动脉主干相关指标的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	狭窄率	超氧阴离子	CD40L
运动组	20	33.3%±5.66%①	2.17±0.69①	1.97±0.41①
对照组	20	48.3%±5.91%	3.70±0.51	2.47±0.35

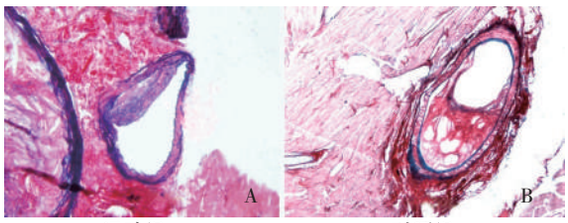
①与对照组比较$P<0.01$。超氧阴离子及CD40L为光密度值。

3 讨论

3.1 长期中等负荷耐力运动对Apo E基因敲除小鼠冠状动脉粥样硬化影响

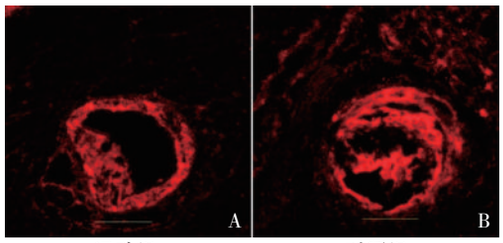
冠状动脉粥样硬化的进展及易损斑块的形成是导致急性冠脉综合征的主要原因，也是导致心血管病事件的主要原因。尽管冠脉内支架等介入治疗技术在不断进步，临床中支架的应用已经非常普遍并且抗血小板和降脂药物等一、二级预防措施已得到

图1 天狼猩红加维多利亚蓝染色显示冠脉主干狭窄程度 (标尺为100μm)



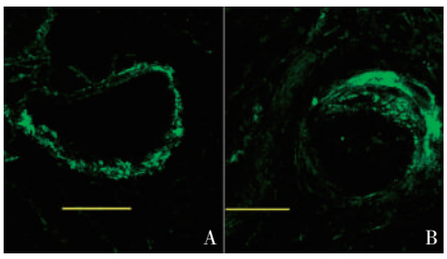
运动组 对照组

图2 两组冠状动脉主干超氧阴离子表达 (标尺为100μm)



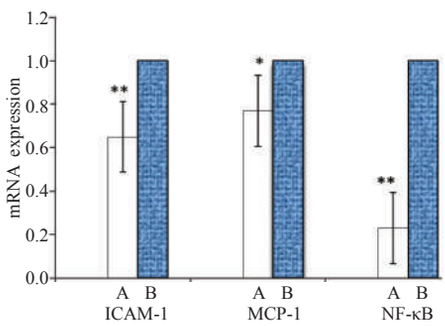
运动组 对照组

图3 两组冠状动脉主干CD40L表达 (标尺为100μm)



运动组 对照组

图4 ICAM-1、MCP-1、NF-κB P65亚基基因表达



与对照组比较,*P<0.05,**P<0.01,A:运动组,B:对照组

广泛应用[5—7],但是心血管病事件仍在持续攀升,丝毫没有降低心血管病致死人数的增长速度。究其原因与患者的生活方式不无密切的关系。由于生活节奏的加快、生活方式的改变,能坚持运动的人群在逐渐减少,但是运动对动脉粥样硬化的延缓有不可替代的作用,必须予以高度重视。研究[8—11]表明,运动可以减缓动脉粥样硬化的进展并可显著减缓冠状动脉粥样硬化的进展,但是既往有关运动延缓动脉粥样硬化相关的研究在观察时间上相对较短,本研究观察了中等强度负荷长期运动对Apo E基因敲除小鼠冠状动脉粥样硬化的影响进行了观察,结果发现中等强度负荷长期运动对Apo E基因敲除小鼠的胆固醇、甘油三酯具有显著下降并对冠状动脉粥样硬化具有显著地抑制作用。

3.2 中等强度长期运动对冠状动脉血管氧自由基损伤的影响

氧化应激是指机体内自由基的产生和抗氧化防御之间严重失衡的一种病理状态[12],在动脉粥样硬化的发生发展中起着不可忽视的作用[13],也是动脉粥样硬化的重要病理改变之一,动脉粥样硬化引起的内皮损伤可导致自由基的清除障碍,自由基堆积导致脂质过氧化反应加重,加速动脉粥样硬化的发生发展[14],氧自由基的清除将有利于动脉粥样硬化的减缓。

本研究通过对中等强度长期运动训练的可能机制进行了的探讨,首次在Apo E基因敲除小鼠冠状动脉血管中发现,中等强度长期运动训练后其超氧化物阴离子自由基显著减轻。在既往的多项研究表明运动可以增强超氧化物歧化酶的活性增加氧自由基的清除机制,但未见有关冠状动脉血管中氧自由基的表达变化,本研究首次应用荧光染色法观察到了运动对冠状动脉血管中氧自由基表达的影响,即中等强度长期运动训练对冠状动脉血管的氧化应激具有调控作用。

3.3 中等强度长期运动对冠状动脉慢性炎症状态的影响

依据动脉硬化的炎症假说,动脉粥样硬化是动脉壁对脂质沉积的一种炎症-纤维增生性反应[14]。该病理过程存在于动脉粥样硬化的各期,高脂血症、损伤及感染等因素导致血管内皮损伤、巨噬细胞的激活及分泌炎性细胞因子,介导血流中白细胞在血管壁上滚动,穿越内皮细胞进入动脉的内膜,促进斑块的形成与发展,而炎症反应的激活又是加重动脉粥样硬化导致急性心血管病事件的主要原因[14]。NF-κB的激活是炎症激活的关键步骤之一,NF-κB

激活后可进一步激活靶基因并引发转录，从而上调一些参与炎症反应的分子表达如：ICAM-1、MCP-1等[15—18]，并上调炎症蛋白CD40L的表达调控炎症的进程。

本研究发现中等强度长期运动训练的对Apo E基因敲除小鼠动脉NF-κB、ICAM-1、MCP-1基因表达的具有显著下调的作用，并下调炎症蛋白CD40L的表达，减轻动脉粥样硬化相关的炎症状态。

氧化应激与炎症两者的关系也是密不可分的，氧化应激所产生的氧自由基可以与蛋白、脂质及核酸发生各种各样的氧化反应并产生各种各样的损伤，血管壁在动脉粥样硬化情况下超氧化物阴离子生成增加并在局部堆积，而超氧化物阴离子又可激活NF-κB，从而导致炎性细胞激活与浸润等，炎性细胞、内皮细胞等又可产生超氧化物自由基，导致恶性循环[19—23]，因此，中等强度长期运动训练减轻了Apo E基因敲除小鼠动脉超氧化物阴离子的产生，抑制动脉壁炎症表达，从而有助于打破这一恶性循环，有助于动脉壁的新的平衡状态的形成，从而抑制冠状动脉粥样硬化的进展。

参考文献

[1] 韩呈武，侯来永，孔晶，等.有氧康复运动疗法对冠脉成形术后患者血清超氧化物歧化酶活性及泛素水平影响的临床研究[J].中国康复医学杂志，2013，28(6)：564—568.

[2] Pellegrin M,Miguet-Alfonsi C,Bouzourene K,et al. Long-term exercise stabilizes atherosclerotic plaque in ApoE knockout mice[J].Med Sci Sports Exerc, 2009,41(12):2128—2135.

[3] Hajjar DP, Gotto AM Jr. Biological relevance of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of arterial diseases[J]. Am J Pathol，2013，182(5):1474—1481.

[4] Effects of Exercise Training on the Severity and Composition of Atherosclerotic Plaque in apoE-Deficient[J]. Mice J Vasc Res，2011，48:347—356.

[5] 程文立,王勇,蔡哲,等.清热祛瘀颗粒对稳定性冠心病患者颈动脉易损斑块的影响[J].中国中西医结合杂志，2009，29(12):1085—1088.

[6] Arazi HC, Badimon JJ. Effects of Exercise Training on the Severity and Composition of Atherosclerotic Plaqu Anti-inflammatory effects of anti-platelet treatment in atherosclerosis [J]. Curr Pharm Des，2012，18(28):4311—4325.

[7] Owens CD. Statins and other agents for vascular inflammation[J].J Vasc Surg，2012，56(6):1799—1806.

[8] Nounou HA, Deif MM, Shalaby MA.Effect of flaxseed supplementation and exercise training on lipid profile, oxidative stress and inflammation in rats with myocardial ischemia[J]. Lipids Health Dis，2012，11:129.

[9] Pinto A, Di Raimondo D, Tuttolomondo A,et al.Effects of physical exercise on inflammatory markers of atherosclerosis [J]. Curr Pharm Des，2012，18(28): 4326—4349.

[10] Lee S, Park Y, Zhang C.Exercise Training Prevents Coronary Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetic Mice[J]. Am J Biomed Sci，2011，3(4):241—252.

[11] Gross MD, Bielinski SJ, Suarez-Lopez JR,et al. Circulating soluble intercellular adhesion molecule 1 and subclinical atherosclerosis: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study[J].Clin Chem，2012，58(2):411—420.

[12] Violi F, Pignatelli P, Pignata C,et al. Reduced atherosclerotic burden in subjects with genetically determined low oxidative stress[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2013，33(2):406—412.

[13] Miller JD, Chu Y, Castaneda LE,et al. Heistad DD.Vascular function during prolonged progression and regression of atherosclerosis in mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2013，33(3):459—465.

[14] Purushothaman M, Krishnan P, Purushothaman KR, et al. Genotype-dependent impairment of hemoglobin clearance increases oxidative and inflammatory response in human diabetic atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2012，32(11):2769—2775.

[15] Duivenvoorden R, Fayad ZA.Safety of CETP inhibition[J]. Curr Opin Lipidol，2012，23(6):518—524.

[16] Chen Li，Wenli Cheng，Wangyong，et al. Alprostadil liposome microsphere preparation stabilizes vascular plaques and inhib-its intra-plaque inflammation[J].Chin Med J，2012，25(24)：4380—4385.

[17] Fernández-Pisonero I, Duẽnas AI, Barreiro O, et al. Lipopolysaccharide and sphingosine-1-phosphate cooperate to induce inflammatory molecules and leukocyte adhesion in endothelial cells[J]. J Immunol，2012，189(11): 5402—5410.

[18] 程文立，王勇，陈敏，等. 清热祛瘀颗粒对糖尿病Apo E基因敲除小鼠冠状动脉粥样硬化的影响[J].中华中医药杂志，2012，27(1)：210—212.

[19] 陈莉，程文立，柯元南，等. 不同周龄高血压ApoE基因敲除小鼠主动脉弹力纤维降解、胶原改变与氧化应激、炎症变化的关系[J].中华心血管病杂志，2012，40(6)：505—510.

[20] 程文立，王勇，柯元南，等. 盐酸乐卡地平对高血压ApoE基因敲除小鼠主动脉弹力纤维降解、胶原的影响[J].中华高血压杂志，2013，21(4)：141—147.

[21] Burlet E, Jain SK.Manganese supplementation reduces high glucose-induced monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial dysfunction in Zucker diabetic fatty rats[J]. J Biol Chem，2013，288(9):6409—6416.

[22] Fang G, Song D, Ye X, et al. Chronic intermittent hypoxia exposure induces atherosclerosis in ApoE knockout mice: role of NF-κB p50[J]. Am J Pathol，2012，181(5):1530—1539.

[23] Magnusson LU, Lundqvist A, Karlsson MN, et al. Arachidonate 15-lipoxygenase type B knockdown leads to reduced lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis [J]. PLoS One，2012，7(8):e43142.