

. 实验研究 .

溶血磷脂酸对大鼠颈动脉损伤后血管炎性反应的影响

沈旭辉 邹建军 李付勇

【摘要】目的 探讨溶血磷脂酸(LPA)对大鼠颈动脉内膜损伤后血管炎性反应的影响。方法 将 24 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和 LPA 组,每组 8 只。采用球囊导管法建立大鼠颈动脉内膜损伤模型。LPA 组造模后经导管注射 LPA(100 μl)干预,模型组注射磷酸盐缓冲液。造模后 14 d 处死大鼠,取出损伤部位颈总动脉,行 HE 染色观察内膜的增生情况,Toll 样受体 4 (TLR4)免疫组化染色和免疫印迹法检测 TLR4 蛋白表达,采用 PCR 方法检测 TLR4 mRNA 表达。结果 HE 染色分析,假手术组颈动脉平滑肌细胞排列整齐,中膜内膜无增厚,无明显狭窄;模型组可见颈动脉轻度损伤,部分区域细胞排列紊乱,内膜和中膜亦可见增厚,血管轻度狭窄;LPA 组可见颈动脉损伤区域平滑肌细胞排列紊乱,内膜和中膜有明显的增厚,内膜中膜界限不清,血管狭窄较重。模型组 TLR4 蛋白和 mRNA 表达水平明显高于假手术组($P<0.05$),而 LPA 组均明显高于模型组($P<0.05$)。结论 LPA 促进大鼠颈动脉内膜损伤后炎性反应,其机制可能与促进 TLR4 表达密切相关。

【关键词】 颈动脉;内膜损伤;溶血磷脂酸;Toll 样受体 4;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2017)01-0031-03 【文献标志码】 A 【中国图书资料分类号】 R 743

Effect of lysophosphatidic acid on vascular inflammatory reaction after carotid injury in rats

SHEN Xu-hui, ZOU Jian-jun, LI Fu-yong. The Third Department of Neurosurgery, The People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang110016, China

【Abstract】 Objective To research effect of lysophosphatidic acid (LPSA) on vascular inflammatory reaction in rats with carotid injury. Methods Twenty-four SD rats were randomly divided into three groups of 8 animals each, i.e. sham operation group, model group, and LPSA treatment group. The unilateral carotid artery injury model was built in the model and LPSA treatment groups, in which 100 μl phosphate buffer and LPSA were injected into the injured carotid arteries respectively. The left external carotid artery and its branches were ligated only in the sham operation group, in which the rats did not receive drug treatment. The rats were sacrificed in order to take the injured carotid arteries in all the groups 14 days after the establishment of the model. The histological changes in the injured carotid arteries were observed by microscope after HE staining. The expression level of toll like receptor 4 (TLR4) protein and mRNA in the carotid arteries were determined by immunohistochemical test, Western blot test and RT-PCR test respectively in all the groups. Results The inflammatory reaction was more significant in LPSA group than that in the model group, in which the inflammatory reaction was more significant than that in the sham operation group. The expression levels of TLR4 protein and mRNA were significantly higher in LPSA group than those in the model group ($P<0.05$), in which the expression levels of TLR4 protein and mRNA were significantly higher than those in the sham operation group ($P<0.05$). Conclusion That LPSA can promote inflammatory reaction after the carotid injury may be produced by the upregulation of expression level of TLR4 protein and mRNA in the injured carotid arteries caused by LPSA in the rats.

【Key words】 Carotid injury; Inflammatory reaction; Toll like receptor 4; Lysophosphatidic acid; Expression; Rat

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是各种缺血性脑卒中的主要病理基础,是危害人类健康的常见病。目前认为,AS形成的基本过程是由脂质介导的慢性炎症反应过程,主要特征为脂质沉积在血管壁内,引起炎症细胞的大量聚集。在 AS 的形成过程中,免疫反应始终贯穿整个过程,免疫反应和炎症反

应共同发挥重要作用^[1]。随着 AS 的发病率逐渐增加,人类健康受到的威胁正日益增加。同时,由于 AS 术后局部炎症反应常常会发生血管再次狭窄,因此,找到一个缺血性脑卒中的早期预测指标就变得更加意义重大。溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)具有较强的极性,在水中溶解度较高,在体内的多种生物学过程中发挥重要作用。LPA 在血栓形成初期血小板活化的过程中产生。有研究表明,LPA 增高表明血栓形成的风险增高,可成为血小板活化的指标^[2]。本研究观察 LPA 对颈动脉损伤后血

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2017.01.011
作者单位:110016 沈阳,辽宁省人民医院神经外科(沈旭辉、邹建军、李付勇)

管炎性反应的影响,为 AS 及各种缺血性脑卒中的防治提供一个有利的理论支持。

1 材料和方法

1.1 动物分组 选取清洁级雄性 SD 大鼠 24 只,沈阳万类生物科技有限公司动物实验中心提供,体重 250~300 g,周龄 7~8 周,随机分为假手术组、模型组和 LPA 组,每组 8 只。

1.2 颈动脉损伤模型建立和干预 大鼠 10%水合氯醛(0.35 ml/100 g)腹腔注射麻醉后,将大鼠采取仰卧位固定,于颈部正中部位进行切开,暴露大鼠左侧颈动脉系统(包括颈总动脉末端、颈内动脉起始部和颈外动脉起始部)。结扎暴露的颈外动脉远端和其细小分支。用血管夹临时夹闭颈内动脉和颈总动脉近心端,阻断血流;在颈外动脉近心端形成一个“V”字形切口,将 2F Fogarty 球囊导管(美国 Baxter Edwards)通过颈外动脉切口送至颈总动脉近心端,采用 1.5 标准大气压压力缓慢充盈球囊,采取从内向方式抽拉球囊导管,缓慢进行 3 次,以剥脱内膜;然后退出球囊。LPA 组向颈动脉损伤节段注射 100 μ l LPA(美国 Aladdin 公司),局部作用 30 min 后,撤除颈内动脉、颈总动脉血管夹,恢复血流。然后,用含青霉素的生理盐水冲洗术区,逐层缝合并消毒。假手术组仅结扎左侧颈外动脉及各细小分支,不插入导管;注射磷酸盐缓冲液代替 LPA。造模后 14 d 处死大鼠,取出损伤部位左侧颈总动脉进行后续检测。

1.3 组织形态学分析 将标本制成蜡块后进行切片,并经脱蜡至水、HE 染色、脱水、透明、封片处理后,显微镜下观察。

1.4 免疫组化染色 切片放入烘箱中进行烘烤,使切片脱蜡至水。把切片放于抗原修复液中修复,使内源性过氧化物酶的活性丧失。Toll 样受体 4(Toll like receptor 4, TLR4)抗体(购自沈阳万类生物科技有限公司)一抗、二抗处理,用辣根酶进行标记,显色后,苏木素复染;脱水、透明、封片。显微镜下观察,每张切片在高倍镜下($\times 400$)随机选择 3 个视野,计数视野内 TLR4 阳性细胞。

1.5 免疫印迹法测定 TLR4 蛋白表达 取组织切成碎片置于蛋白提取液中 12 000 转/min、4 $^{\circ}$ C 离心,取上清即为细胞核蛋白。测蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳,转膜。一抗、二抗孵育后进行显色曝光处理。扫描胶片后,采用凝胶图象处理系统进行分析各条带的光密度值。

1.6 荧光定量 PCR 检测 TLR4 mRNA 表达 首先提取总 RNA,再进行 RNA 样本反转录处理。实时荧光定量分析:将引物进行稀释,反应体系为 cDNA 模板 1 μ l,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ l,SYBR GREEN mastermix 10 μ l,用 ddH₂O 补足至 20 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C、10 min;95 $^{\circ}$ C、10 s,60 $^{\circ}$ C、20 s,72 $^{\circ}$ C、30 s,进行 40 次循环,最后 4 $^{\circ}$ C、5 min。RNA 浓度测定采用紫外分光光度计。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行分析量化。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学差异。

2 结果

2.1 HE 染色结果 光镜下可见假手术组颈动脉平滑肌细胞排列整齐,中膜、内膜无增厚,无明显狭窄(图 1A);模型组可见颈动脉轻度损伤,部分区域细胞排列紊乱,内膜和中膜亦可见增厚,血管轻度狭窄(图 1B);LPA 组可见颈动脉损伤区域平滑肌细胞排列紊乱,内膜和中膜有明显的增厚,内膜中膜界限不清,血管狭窄较重(图 1C)。

2.2 TLR4 免疫组化染色结果 假手术组血管内膜

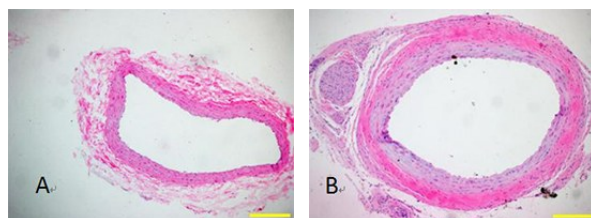
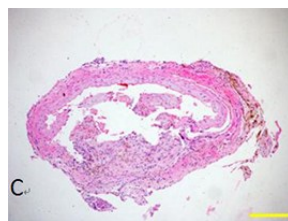


图 1 大鼠颈动脉损伤后颈动脉 HE 染色($\times 100$)

A. 假手术组; B. 模型组; C. LPA 组



组

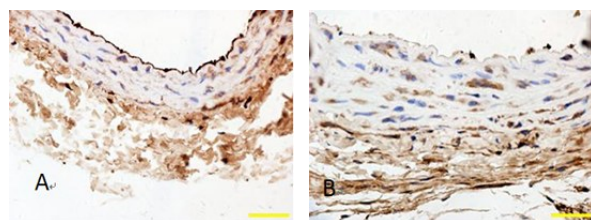


图 2 大鼠颈动脉损伤后颈动脉 TLR-4 免疫组化染色($\times 400$)

A. 假手术组; B. 模型组; C. LPA 组; TLR4: Toll 样受体 4

TLR4 蛋白表达极少(图 2A);模型组 TLR4 蛋白表达有所增加(图 2B);LPA 组 TLR4 蛋白表达明显增强(图 2C)。

2.3 TLR4 蛋白表达变化 颈动脉损伤后,TLR4 蛋白表达升高($P<0.05$),LPA 进一步促进 TLR4 蛋白表达($P<0.05$),见图 3。

2.4 TLR4 mRNA 表达变化 颈动脉损伤后,TLR4 mRNA 表达升高($P<0.05$),LPA 进一步促进 TLR4 mRNA 表达($P<0.05$),见图 4。

3 讨论

LPA 是目前为止发现的具有最简单结构的甘油磷脂,正常存在于血清中,但是血浆的浓度很低,甚至不能够被检测到。这主要是血清与血浆的检测方

法不同,血清是血液经过离心静止后得到的,而在这个过程中,血小板经过活化反应产生 LPA,导致血清中 LPA 浓度升高。人体内有多种细胞可产生 LPA。研究表明,活化的血小板、脂肪细胞、肿瘤细胞和内皮细胞等都可产生 LPA。但 LPA 主要有两个来源,一是通过血小板活化产生,产生的 LPA 通过进入血液循环成为血清中 LPA 的重要来源;二是来源于低密度脂蛋白,AS 斑块中含有的低密度脂蛋白通过氧化作用成为轻度氧化低密度脂蛋白,在这个氧化过程中可生成大量的 LPA。LPA 功能广泛,可促进平滑肌收缩、血小板聚集等。LPA 能使肿瘤细胞发生迁移^[3],还可诱导卵巢癌转移^[4];也是急性冠脉综合征的重要危险信号,是一种功能非常丰富的“磷脂信使”。LPA 在产生过程中具有正反馈的重要特征,聚集的血小板通过活化作用产生 LPA,产生的 LPA 通过正反馈作用促进血小板的进一步聚集,导致血栓斑块的形成,并为凝血形成打下基础。血小板活化因子的相似物溶血磷脂酰胆碱也可被启动乙酰化,可有活化血小板的作用。LPA 有更强的聚集血小板的作用,比血栓素 A2 还要强大,主要是因为血栓素 A2 需要经过磷脂酶 A2 的几步反应才可以生成,而 LPA 只需要一步反应就能得到。本实验通过向大鼠损伤节段颈动脉内注入 LPA,可以观察到颈动脉的炎症反应增强,管腔变的更加狭窄,可见 LPA 在促进 AS 形成中发挥重要作用^[5,6]。

TLR 属于模式识别受体中的一种,为跨膜蛋白 I 型,是获得性免疫与天然免疫之间的桥梁^[7]。迄今为止在人类中已发现 11 种 TLR。TLR4 由 3 部分组成,分别为胞内区、跨膜区、胞外区。TLR4 广泛分布于人体内的多种细胞中^[8],其中表达最丰富的是淋巴细胞和白细胞。TLR4 在炎症反应过程和免疫应答过程中发挥重要的作用,其在 AS 的形成中发挥关键作用^[9]。TLR4 转导信号包括细胞外和细胞内两部分信号转导通路。细胞外通路为外源性脂多糖被 TLR4 识别,使机体产生炎症反应。细胞内信号通路包括两类,根据是否对髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)产生依赖性分为依赖性与非依赖性两条信号通路,通过这两种途径产生炎症因子,其中 MyD88 起关键作用^[10]。MyD88 依赖性信号转导通路可使核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)在细胞核内的水平增高,导致多种促进炎症反应的基因在细胞内表达增高,引起机体的早期免疫反应。

(下转第 57 页)

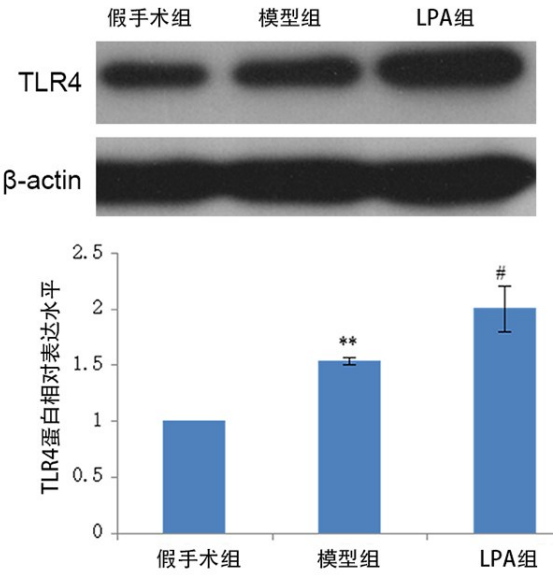


图 3 大鼠颈动脉损伤后颈动脉 TLR-4 蛋白表达与假手术组相比,** $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

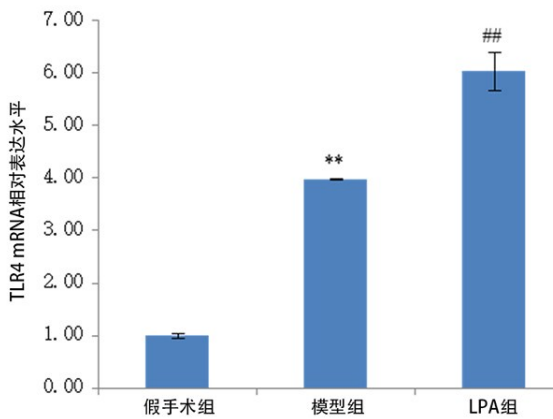


图 4 大鼠颈动脉损伤后颈动脉 TLR-4 mRNA 表达与假手术组相比,** $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

(上接第33页)

MyD88 非依赖性信号转导通路也是通过活化 NF- κ B,引起机体的迟发性免疫反应。有研究将小鼠分为 TLR4/载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 被敲除组和只有 ApoE 被敲除组,结果发现,TLR4/ApoE 被敲除组小鼠动脉硬化发生率小于只有 ApoE 被敲除组,内膜损伤程度小于只有 ApoE 被敲除组,同时发现,在 TLR4/ApoE 被敲除组 AS 斑块中脂质的成分也明显降低,这说明 TLR4 信号转导通路在 AS 的形成过程中发挥重要的作用。本研究发现 LPA 组 TLR4 表达增高,血管内膜增厚,管腔狭窄,说明 LPA 可能通过 TLR4 介导的分子机制促进 AS 的发生,但两者之间的具体机制仍需要我们进一步深入研究。

【参考文献】

[1] Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans [J]. Immunity, 2013, 38(6): 1092–1104.

[2] O'Donnell VB, Murphy RC, Watson SP. Platelet lipidomics: modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets [J]. Circ Res, 2014, 114(7): 1185–1203.

[3] Yang D, Yang W, Zhang Q, *et al.* Migration of gastric cancer

cells in response to lysophosphatidic acid is mediated by LPA receptor 2 [J]. Oncol Lett, 2013, 5(3): 1048–1052.

[4] 余雪琛,张元珍,陈慧君. 溶血磷脂酸通过 Rac 的活化诱导卵巢癌细胞的侵袭转移 [J]. 中华肿瘤杂志, 2015, 37(2):95–100.

[5] Schober A, Siess W. Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases [J]. Br J Pharmacol, 2012, 167(3): 465–482.

[6] Morris AJ, Smyth SS. Lysophosphatidic acid in cardiovascular disease: seeing is believing [J]. J Lipid Res, 2013, 54(5): 1153–1155.

[7] Lin YT, Verma A, Hodgkinson CP. Toll-like receptors and human disease: lessons from single nucleotide polymorphisms [J]. Curr Genomics, 2012, 13(8): 633–645.

[8] Zhao M, Zhou A, Xu L, *et al.* The role of TLR4-mediated PTEN/PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway in neuroinflammation in hippocampal neurons [J]. Neuroscience, 2014, 269: 93–101.

[9] Navi A, Patel H, Shaw S, *et al.* Therapeutic role of Toll-like receptor modification in cardiovascular dysfunction [J]. Vascu Pharmacol, 2013, 58(3): 231–239.

[10] Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors [J]. Yonsei Med J, 2011, 52: 379–392.

(2016-07-27 收稿, 2016-10-26 修回)