

郁晨,刘志华,潘永明,等. 高脂环境下五指山小型猪和西藏小型猪冠心病相关血脂和炎症易感基因的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 1-10.

Yu C, Liu ZH, Pan YM, et al. Expression of coronary artery disease-related blood lipid and inflammatory susceptibility genes in Wuzhishan minipigs and Tibetan minipigs under a high-fat diet environment [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 1-10.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.05.001

高脂环境下五指山小型猪和西藏小型猪冠心病 相关血脂和炎症易感基因的表达

郁晨,刘志华,潘永明,徐孝平,徐剑钦,杨钦钦,蔡兆伟,陈民利*

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究所,杭州 310053)

【摘要】 目的 观察在高脂环境下五指山小型猪、西藏小型猪血脂和炎症细胞的变化,分析冠心病相关血脂和炎症易感基因的表达。方法 取雄性五指山小型猪、西藏小型猪各5只,高脂饲喂连续6个月,每月检测血脂和血常规,并检测饲喂前和饲喂6个月时外周白细胞中LDLR、LPL、PCSK9、ApoAⅤ、5-LO、FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1基因和蛋白的表达,及血清中CRP、TNF-α水平;并在饲喂6个月时取腹主动脉组织进行HE染色病理学检查。结果 高脂饲喂后,两种小型猪TC、HDL-C、LDL-C水平均显著升高($P<0.01$),西藏小型猪WBC、NEUT%、MONO%和五指山小型猪MONO%亦呈升高趋势($P>0.05$);五指山小型猪TC、LDL-C水平高于西藏小型猪,而西藏小型猪的WBC、NEUT%和MONO%显著高于五指山小型猪($P<0.05$, $P<0.01$),且西藏小型猪血清CRP和TNF-α水平显著升高($P<0.05$),而五指山小型猪未见显著差异($P>0.05$)。高脂饲喂6个月后,两种小型猪均出现明显的AS斑块,五指山小型猪LDLR、ApoAⅤ mRNA和蛋白表达均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),PCSK9、LPL mRNA表达显著升高($P<0.05$, $P<0.01$);西藏小型猪LPL mRNA和蛋白表达均显著升高($P<0.01$);五指山小型猪5-LO、FLAP、ICAM-1、VCAM-1 mRNA表达和5-LO蛋白表达均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),西藏小型猪FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 mRNA和蛋白表达均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),且西藏小型猪MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 mRNA和蛋白表达均高于五指山小型猪,而5-LO mRNA和蛋白表达则五指山小型猪高于西藏小型猪。结论 高脂环境下五指山小型猪、西藏小型猪均出现不同程度的血脂异常和炎症反应,两种小型猪的冠心病相关血脂和炎症易感基因存在明显异质性,其中,高脂诱导下五指山小型猪外周血白细胞对LDLR、PCSK9、5-LO表达较敏感,而西藏小型猪外周血白细胞中对LPL、ICAM-1、VCAM-1和MMP-9表达较敏感。

【关键词】 高脂环境;五指山小型猪;西藏小型猪;血脂;炎症;易感基因

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 05-0001-10

Expression of coronary artery disease-related blood lipid and inflammatory susceptibility genes in Wuzhishan minipigs and Tibetan minipigs under a high-fat diet environment

YU Chen, LIU Zhihua, PAN Yongming, XU Xiaoping, XU Jianqin, YANG Qinqin, CAI Zhaowei, CHEN Minli*
(Laboratory Animal Research Center/Comparative Medical Research Institute,
Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the changes in blood lipid and inflammatory cells in Wuzhishan (WZS)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31572346)。

[作者简介] 郁晨(1995—),男,在读硕士,研究方向:实验动物与比较药理。E-mail: yc1306492306@126.com

[通信作者] 陈民利(1963—),女,教授,博士生导师,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: cml1991@zcmu.edu.cn

minipigs and Tibetan minipigs exposed to a high-fat diet environment, and to analyze the expressions of coronary artery disease-related blood lipid and inflammatory susceptibility genes. **Methods** Five male WZS minipigs and five Tibetan minipigs were selected for feeding with a high-fat diet for six consecutive months. Blood lipids and blood routine examination were performed monthly, and venous blood was taken before and 6 months after high-fat feeding to determine the gene and protein expression levels of LDLR, LPL, PCSK9, ApoAV, 5-LO, FLAP, MMP-9, ICAM-1 and VCAM-1 in peripheral leukocytes, as well as the levels of CRP and TNF- α . Thoracic aorta samples were taken for pathological examination after high-fat feeding for 6 consecutive months. **Results** After high-fat diet feeding, the levels of TC, HDL-C, and LDL-C in the two minipigs were significantly increased ($P < 0.01$), and WBC, NEUT% and MONO% in the Tibetan minipigs as well as MONO% in the WZS minipigs tended to be increased ($P > 0.05$). TC and LDL-C levels in the WZS minipigs were higher than those in the Tibetan minipigs, whereas WBC, NEUT% and MONO% in the Tibetan minipigs were much higher than those in the WZS minipigs ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After high-fat feeding for 6 months, there were obvious atherosclerotic (AS) plaques in the two minipigs, but the degree of AS lesions in the Tibetan minipigs was more serious. The mRNA and protein expressions of LDLR and ApoAV in the WZS minipigs were markedly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), whereas the mRNA expressions of PCSK9 and LPL were markedly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The mRNA and protein expressions of LPL in the Tibetan minipigs were obviously increased ($P < 0.01$). Moreover, the mRNA expressions of 5-LO, FLAP, ICAM-1 and VCAM-1, and protein expression of 5-LO in the WZS minipigs were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). mRNA and protein expressions of FLAP, MMP-9, ICAM-1, and VCAM-1 in the Tibetan minipigs were markedly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Moreover, mRNA and protein expressions of MMP-9, ICAM-1, and VCAM-1 in Tibetan minipigs were higher than those in the WZS minipigs, whereas mRNA and protein expressions of 5-LO were lower. **Conclusions** WZS and Tibetan minipigs have various degrees of dyslipidemia and inflammation under a high-fat diet environment. Significant heterogeneity exists in CAD-related blood lipids and inflammatory susceptibility genes. The expressions of LDLR, PCSK9, and 5-LO in the peripheral leukocytes are more affected in WZS minipigs, while LPL, ICAM-1, VCAM-1, and MMP-9 in the peripheral leukocytes are more affected in Tibetan minipigs.

【Keywords】 high-fat diet environment; Wuzhishan minipig; Tibetan minipig; blood lipid; inflammation; susceptibility genes

冠心病(coronary artery disease, CAD)是一类严重的心血管系统疾病,发病率和死亡率居心血管疾病之首。其主要的病理基础是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS),AS为多因素影响的复杂病变过程,是遗传因素和环境因素相互作用的结果^[1]。大量证据表明血脂异常与炎症反应在AS的发生过程中起重要作用^[2-3],因此CAD血脂和炎症相关的易感基因的发现和探讨成为近年研究的重点。

猪在心血管系统、脂蛋白代谢及消化系统与人类极为相似,其AS病变部位与人类AS病变的分布特点也相一致,并具有人类成熟斑块的特点,是研究心血管疾病的一个重要模型动物。我国小型猪的品种丰富,且长期以来,由于各个猪种遗传背景、生长环境以及所接受的饲养、选育方式等的不同,形成了特有的种质特性。本课题组前期研究发现,五指山小型猪与西藏小型猪对高脂饲喂后的血脂代谢和炎症反应存在不同的敏感性^[4-5],但都易形成AS和发生CAD^[6-8]。故脂质和炎症是诱发AS的关键因素,随着近年来基因筛查和治疗技术研究的不断发展,外周血相关标记物的研究对疾病的筛查、预防和治疗具有

重要的指导意义。本研究对高脂环境下五指山小型猪和西藏小型猪的血脂和炎症细胞变化进行观察,并比较分析外周血白细胞中CAD相关血脂和炎症易感基因的表达差异,以期能筛选出这两种小型猪CAD易感基因,为五指山小型猪和西藏小型猪在代谢性心血管病中的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级雄性五指山小型猪、西藏小型猪各5只,4月龄,体重10~15 kg,其中,西藏小型猪购自南方医科大学实验动物中心[SCXK(粤)2011-0015],五指山小型猪购自海南省农业科学院畜牧兽医研究所提供[SCXK(琼)2014-0006],均饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心普通级小型猪实验室[SYXK(浙)2013-0184],环境温度为(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为45%~65%,一日二次饲喂,自由饮水,12 h/12 h明暗交替。本实验所有饲养、操作和护理均按照“实验动物饲养管理和使用指南”进行,实验过程中按实验动物使用的3R原则给予人

道的关怀,并经浙江中医药大学实验动物福利伦理委员会批准(ZSLL-2016-0031)。

1.2 主要试剂与仪器

全自动生化分析仪(7020,日立公司,日本),分类血自动血液分析仪(2120 型,拜耳公司,美国),PCR 仪(PTC-200, Bio-Rad 公司,美国),实时荧光定量 PCR 仪(iQ5, BIO-Rad 公司,美国),垂直电泳仪(SE260, GE 公司,美国),红外荧光扫描系统(Odyssey, LI-COR 公司,美国)。Total RNA 提取试剂盒(RNAiso Plus)、逆转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit)及荧光定量试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™ II)购自大连 TAKARA 公司;RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究;低密度脂蛋白受体(LDLR)、前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9)、5 脂氧合酶(5-LO)、5 脂氧合酶激活蛋白(FLAP)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)等抗体均购自 Santa Cruz 公司;总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)购自上海申能德赛诊断技术有限公司;五分类血常规试剂包购自拜耳公司;C 反应蛋白(CRP)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELIAS 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验方法

取五指山小型猪、西藏小型猪各 5 只,饲喂高脂饲料(配方:10%蛋黄粉、15%起酥油、1.5%胆固醇、73.5%基础饲料),每日饲料量为体重的 2.5%,分成等量的 2 次饲喂,每 2 周称量体重后调整饲料量,连续饲喂 6 个月^[5]。每月检测血脂和血常规指标,并取饲喂前和饲喂 6 月后的静脉血,一份取 1 mL 全血分离血清,采用 ELISA 法检测 CRP、TNF- α 水平;另一份取 8 mL 全血分离白细胞,检测 LDLR、LPL、PCSK9、ApoA、5-LO、FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 的 mRNA 和蛋白表达。并在饲喂 6 个月后将小型猪处死,剖腹取腹主动脉组织,进行 HE 染色,观察病理形态学变化。

1.3.1 血脂和血常规指标测定

取高脂饲喂前和饲喂后每月一次检测,检测前禁食 8 h 后,从小型猪前腔静脉取血 4 mL,3000 r/min 离心 10 min,分离血清,在 7020 全自动生化分析仪测定 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平,同时,取 1 mL 血置于 EDTA-K₃ 抗凝管中,测定血常规指标,观察白细胞(WBC)、中性粒细胞(NEUT)和单核细胞(MONO)的变化,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.3.2 腹主动脉 HE 染色

将固定后的腹主动脉组织,经脱水、透明、浸蜡、包埋后制成 4 μ m 厚的切片,行 HE 染色,光镜下观察组织病变情况,并拍照记录。

1.3.3 Real-time PCR 法检测外周血白细胞中血脂和炎症相关 mRNA 的表达

分别取造模前和高脂饲喂 6 个月后的静脉血 8 mL,无菌条件下分离白细胞,用裂解液处理后放置 -70℃ 保存,备用。采用 TRIzol 法提取白细胞中总 RNA,并按反转录试剂盒的操作步骤反转录为 cDNA。选取 GAPDH 为内参基因,以 Primer 5.0 软件设计猪相关基因的引物(见表 1)。根据荧光定量试剂盒说明书进行 Real-time PCR 反应,根据 Ct 值,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各个基因的相对表达量。

1.3.4 Western blot 法检测外周血白细胞中血脂和炎症相关蛋白的表达

在白细胞样本中加入 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min 得到蛋白样品,用 BCA 蛋白浓度试剂盒检测总蛋白浓度,于 100℃ 加热 5 min 使蛋白变性。取等量样品于 5% SDS-PAGE 胶中电泳(80 V, 40 min; 120 V, 2 h)后,通过转膜仪将蛋白转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶于 37℃ 封闭 2 h。按说明书比例加入一抗,4℃ 过夜。洗膜后加入二抗,室温孵育 1 h,用 TBST 洗涤。结果用 Odyssey 红外荧光扫描仪检测,计算各条带的灰度值,以 GAPDH 作为内参计算各蛋白的表达量。

1.4 统计学方法

所有结果用平均数 $\pm$ 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,应用 SPSS 19.0 软件进行统计,采用 ANOVA 进行方差分析,用 LSD 检验进行组间比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清脂质代谢的变化

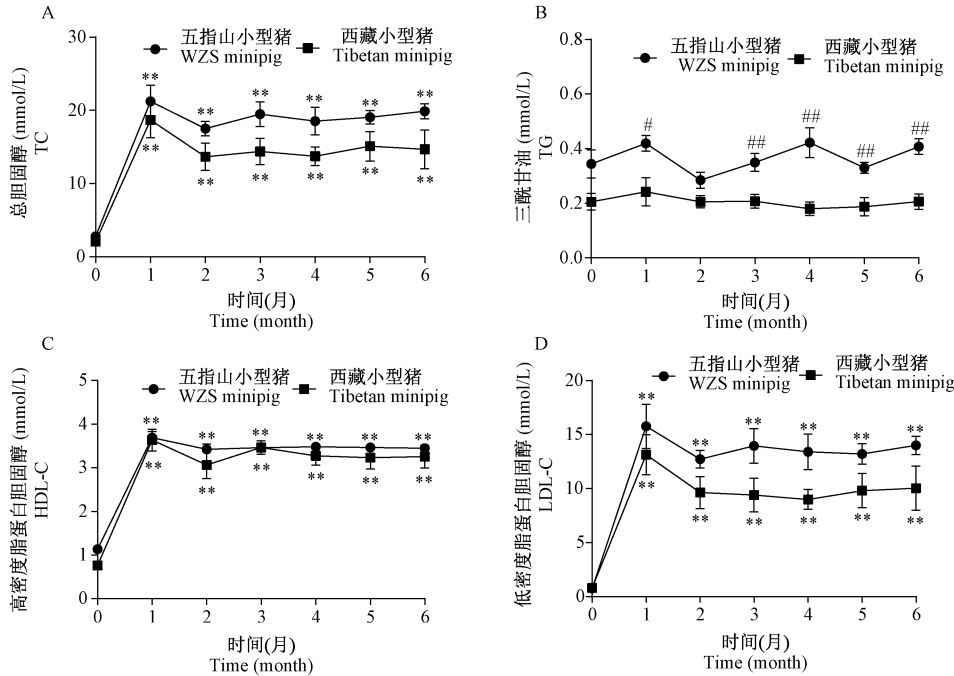
与高脂饲喂前比较,高脂饲喂后五指山小型猪和西藏小型猪的血清 TC、HDL-C、LDL-C 水平均显著升高($P < 0.01$),其中,高脂饲喂 1 个月时 TC、LDL-C 水平达到高峰,2 个月时略有回落,3 个月时回升并保持在高水平状态;高脂饲喂 1 个月后 HDL-C 水平一直稳定在高水平状态;五指山小型猪的 TG 亦有上升趋势,但差异不明显($P > 0.05$),但西藏小型猪的 TG 水平与饲喂前相当。另外,高脂饲喂前五指山小型猪和西藏小型猪的 TC、LDL-C 水平相

当,而在高脂饲喂 1~6 个月期间五指山小型猪的 TC、LDL-C 水平均高于西藏小型猪,但差异不显著 ($P>0.05$),同时五指山小型猪的 TG 水平在高脂饲

喂前后均高于西藏小型猪,并在高脂饲喂后 1 个月和 3~6 个月期间五指山小型猪的血清 TG 显著高于西藏小型猪($P<0.05, P<0.01$)(图 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Real-time PCR primer sequences

基因名称 Gene names	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	片段长度(bp) Product size
<i>GAPDH</i>	F:5'-AGGTCGGAGTGAACGGATTG-3' R:5'-ACCATCTAGTGGAGGTCAATGAAG-3'	125
<i>LDLR</i>	F:5'-CTACAAGTGCCAGTGTGAGGAG-3' R:5'-GGTTGGTGAAGAAGAGGTAGGC-3'	95
<i>LPL</i>	F:5'-GACGCAGATTTTGTAGACG-3' R:5'-CCCTACTGGTTTCTGGATG-3'	81
<i>PCSK9</i>	F:5'-GTCATCTCCCGAGGTCATTAC-3' R:5'-ATCACCTGGGGCAAAGAG-3'	115
<i>ApoAV</i>	F:5'-ACGATTTGTGGGAAGACATCA-3' R:5'-ATGTGGGCAAAGTAGACCCTTA-3'	87
<i>FLAP</i>	F:5'-ATCAGCGTGCTCCAGAACGC-3' R:5'-GCAGGTGTCCCGCTCCTCT-3'	84
<i>5-LO</i>	F:5'-CTCAAGCAGCACAGACGTAAA-3' R:5'-CCCTGTGGCATTGTGGCATCA-3'	115
<i>MMP-9</i>	F:5'-CCTTGAACACACACGACATCTT-3' R:5'-GTAGCCACATAGTCCACCTG-3'	116
<i>ICAM-1</i>	F:5'-AACACCATCATACCCAAAGGAG-3' R:5'-TCAGTCTTGTGCCAGTGACTCT-3'	104
<i>VCAM-1</i>	F:5'-CAACCGGGTAAACGTCAGG-3' R:5'-CTGCGGGAATTTGAAAGGG-3'	118



注:A~D:分别为各组 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平的变化。与高脂饲喂前(0 个月)比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与西藏小型猪比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图 1 高脂饲喂后五指山小型猪和西藏小型猪的血脂代谢的变化

Note. A-D, The changes of TC, TG, HDL-C, and LDL-C levels in each group, respectively. Compared with 0 month, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the Tibetan minipig, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 1 Changes in serum lipid metabolism in the WZS minipigs and Tibetan minipigs after high-fat diet feeding

2.2 白细胞数目、中性粒细胞和单核细胞的变化

与高脂饲喂前比较, 西藏小型猪在高脂饲喂后白细胞(WBC)数目、中性细胞比率(NEUT%)、单核细胞比率(MONO%)均有不同程度的升高, 其中, 高脂饲喂 2 个月时 WBC 数目升高显著并达到高峰, 3 个月时略有回落但仍保持在较高状态; 五指山小型猪 WBC 数目和 NEUT% 无明显变化($P>0.05$), 而 MONO% 在高脂饲喂后有不同程度升高, 其中, 在高脂饲喂后 2、4、5、6 个月时呈显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$)。另外, 高脂饲喂前西藏小型猪的 WBC 数目与五指山小型猪相当, 而在高脂饲喂后西藏小型猪的 WBC 数目持续高于五指山小型猪, 且在高脂饲喂后 2、3、5、6 个月时呈显著性差异($P<0.05$); 同时西藏小型猪的 NEUT% 和 MONO% 在高脂饲喂前

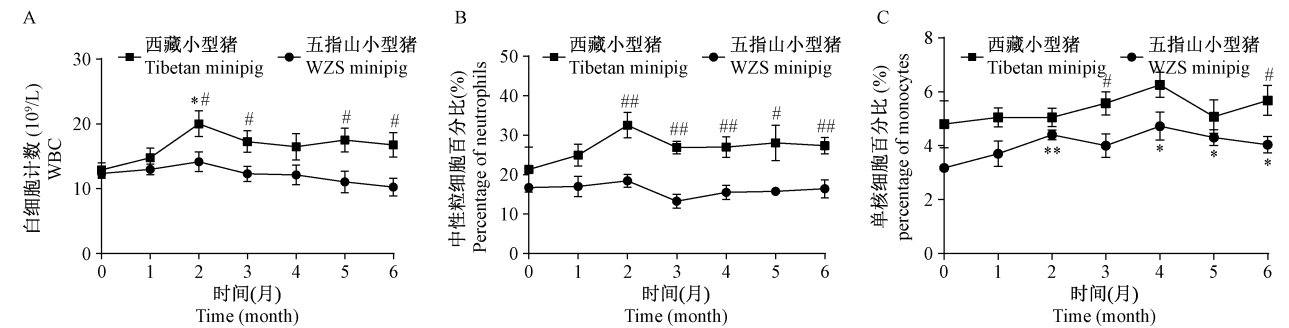
后均高于五指山小型猪, 其中, NEUT% 在高脂饲喂后 1~6 个月时均呈显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$), MONO% 在高脂饲喂后 3、6 个月时呈显著性差异($P<0.05$) (图 2)。

2.3 血清 CRP、TNF- α 水平比较

与高脂饲喂前比较, 西藏小型猪在高脂饲喂 6 个月后血清 CRP 和 TNF- α 水平均显著升高($P<0.05$); 但五指山小型猪血清 CRP 和 TNF- α 虽有上升趋势但无显著性差异($P>0.05$) (图 3)。

2.4 腹主动脉病理形态学观察

HE 染色结果显示, 西藏小型猪和五指山小型猪腹主动脉血管组织均出现内皮增厚、不平整, 平滑肌排列紊乱, 并伴有炎性细胞浸润, 大量脂质、泡沫细胞沉积等, 已形成明显的 AS 斑块(图 4)。

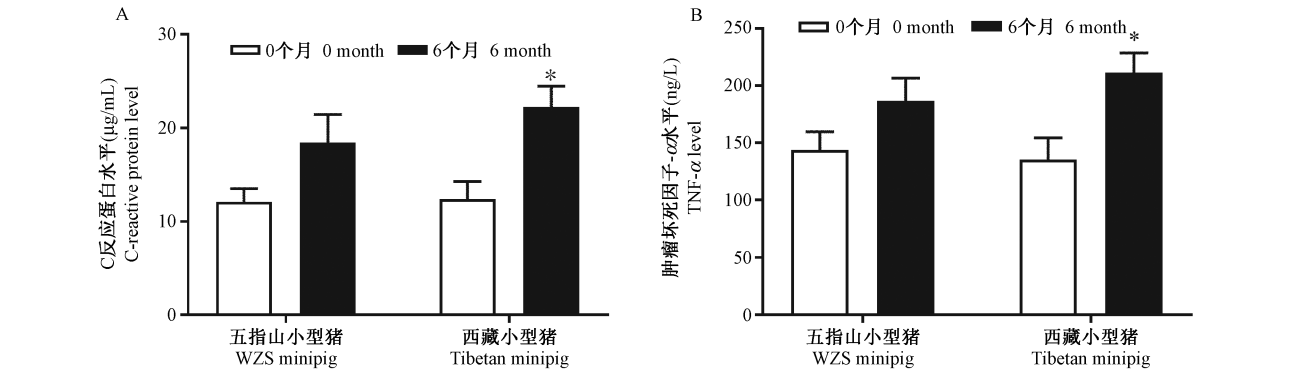


注: A: 白细胞数目; B: 中性粒细胞百分比; C: 单核细胞百分比; 与高脂饲喂前(0 个月)比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与五指山小型猪比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 2 高脂饲喂后五指山小型猪和西藏小型猪的白细胞数目、中性粒细胞和单核细胞的变化

Note. A, Number of white blood cells. B, Percentage of neutrophils. C, Percentage of monocytes. Compared with 0 month, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the WZS minipig, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 2 Changes in WBC, NEUT%, and MONO% of the WZS minipigs and Tibetan minipigs after high-fat diet feeding



注: A: C 反应蛋白水平(CRP); B: 肿瘤坏死因子- α 水平(TNF- α); 与高脂饲喂前(0 个月)比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 3 高脂饲喂后五指山小型猪和西藏小型猪的血清 CRP 和 TNF- α 的变化

Note. A, C-reactive protein level. B, TNF- α level. Compared with 0 month, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Changes in CRP and TNF- α levels of the WZS minipigs and Tibetan minipigs after high-fat diet feeding

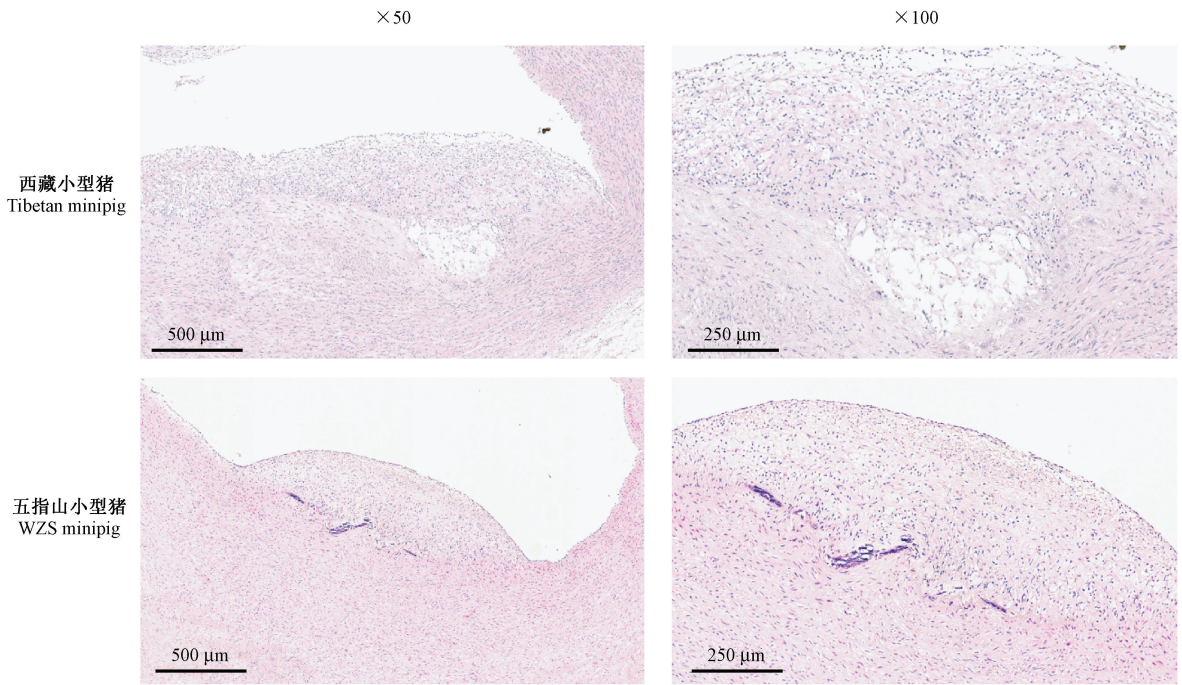


图 4 高脂诱导后两种小型猪主动脉病理形态学变化

Figure 4 Pathological changes of the thoracic aorta in the two miniature pigs after high-fat induction

2.5 外周血白细胞中 AS 相关血脂易感基因的基因和蛋白表达

2.5.1 外周血白细胞中 AS 相关血脂易感基因的基因和蛋白表达

与高脂饲喂前比较,五指山小型高脂饲喂 6 个月后外周血白细胞中 LDLR、ApoAV mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),而 PCSK9、LPL mRNA 表达显著上调 ($P<0.01$, $P<0.05$);西藏小型猪高脂饲喂 6 个月后外周血白细胞中 LPL mRNA 表达显著上调 ($P<0.01$),而 LDLR、PCSK9、ApoAV mRNA 表达无明显变化 ($P>0.05$) (图 5);从图 5 亦可看出,高脂饲喂 6 个月后,五指山小型猪外周血白细胞中 PCSK9 mRNA 表达上调和西藏小型猪外周血白细胞中 LPL mRNA 的表达上调尤为突出。

2.5.2 外周血白细胞中 AS 相关血脂易感基因的蛋白表达

与高脂饲喂前比较,五指山小型高脂饲喂 6 个月后外周血白细胞中 LDLR、ApoAV 蛋白表达均显著下降 ($P<0.05$, $P<0.01$),但 PCSK9、LPL 蛋白表达均无明显差异 ($P>0.05$);西藏小型猪外周血白细胞中 LPL 蛋白表达显著上升 ($P<0.01$),但 LDLR、PCSK9、ApoAV 蛋白表达均无明显差异 ($P>0.05$) (图 6)。

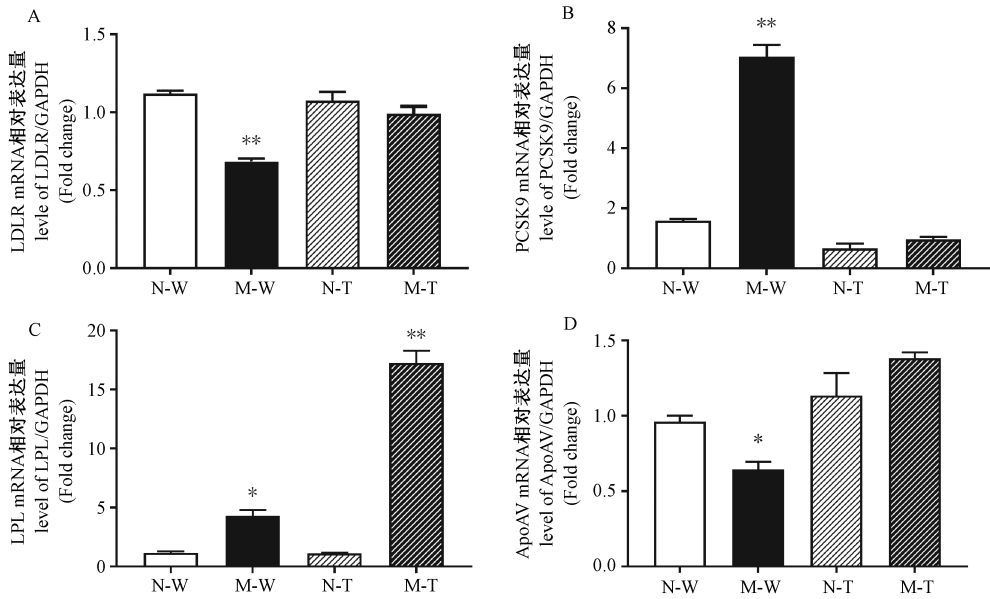
2.6 外周血白细胞中 AS 相关炎症易感基因的基因和蛋白表达

2.6.1 外周血白细胞中 AS 相关炎症易感基因的 mRNA 表达

与高脂饲喂前比较,五指山小型猪高脂饲喂 6 个月后外周血白细胞中 5-LO、FLAP、ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达均显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),MMP-9 的表达有上升趋势 ($P>0.05$);西藏小型猪外周血白细胞中 5-LO、FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达均显著上调 ($P<0.01$)。另外,高脂饲喂 6 个月后,西藏小型猪外周血白细胞中 FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达上调幅度均大于五指山小型猪,而 5-LOmRNA 表达则五指山小型猪高于西藏小型猪 (图 7)。

2.6.2 外周血白细胞中 AS 相关炎症易感基因的蛋白表达

与高脂饲喂前比较,五指山小型猪和西藏小型猪外周血白细胞中 5-LO、FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 蛋白表达均有不同程度的上升,其中,西藏小型猪外周血白细胞中 FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 蛋白表达均显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);而五指山小型猪外周血白细胞中 5-LO 蛋白表达存在显著性差异 ($P<0.05$) (图 8)。

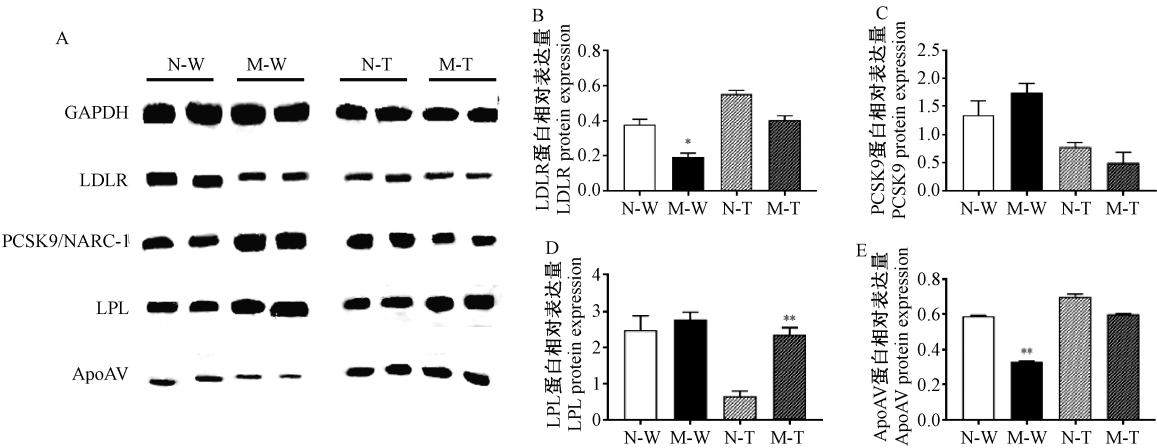


注:A~D:分别为各组 LDLR、PCSK9、LPL 和 ApoAV mRNA 表达。N 和 M 分别表示高脂饲喂前和饲喂 6 个月;W、T 分别表示五指山小型猪、西藏小型猪;下图同。与高脂饲喂前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 5 高脂饲喂后五指山和西藏小型猪外周血白细胞中 LDLR、PCSK9、LPL、ApoAV mRNA 表达变化

Note. A-D, The mRNA expression levels of LDLR, PCSK9, LPL, and ApoAV in each group, respectively. N and M indicate before and 6 months after high-fat diet feeding, respectively; W and T respectively represent WZS minipigs and Tibetan minipigs; the same in the following figures. Compared with that before high-fat diet feeding, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Changes in the expressions of LDLR, PCSK9, LPL, and ApoAV mRNA in the peripheral blood leukocytes of the WZS and Tibetan minipigs after high-fat diet feeding



注:A:蛋白表达代表图;B~E:分别为各组 LDLR、PCSK9、LPL、ApoAV 蛋白相对表达量。与高脂饲喂前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 6 高脂饲喂后五指山和西藏小型猪外周血白细胞中 LDLR、PCSK9、LPL、ApoAV 蛋白表达变化

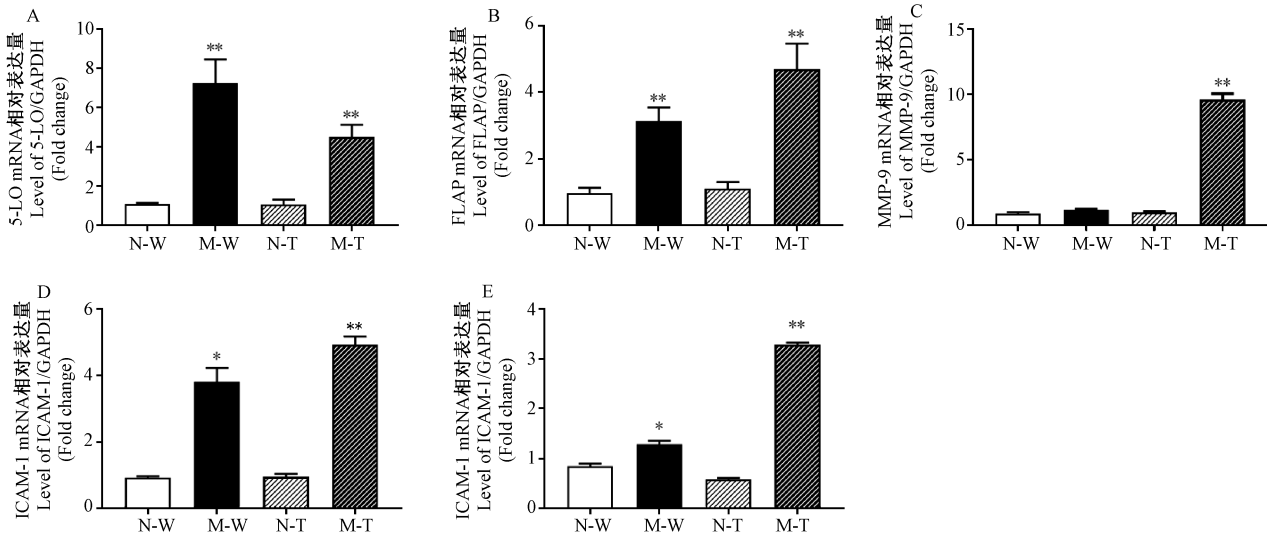
Note. A, A representative presentation of protein expression. B-E, The relative expression levels of LDLR, PCSK9, LPL, and ApoAV protein, respectively. Compared with that before high-fat diet feeding, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 6 Changes in the expressions of LDLR, PCSK9, LPL, and ApoAV protein in the peripheral blood leukocytes of the WZS and Tibetan minipigs after high-fat diet feeding

3 讨论

CAD 由冠状动脉狭窄或闭塞引起,而脂质沉积

是引起冠状动脉狭窄的首要原因,尤其血中 LDL-C 过量是导致脂质在血管壁沉积的危险因素。一旦血脂代谢异常,则会导致血中 LDL-C 升高,血中过

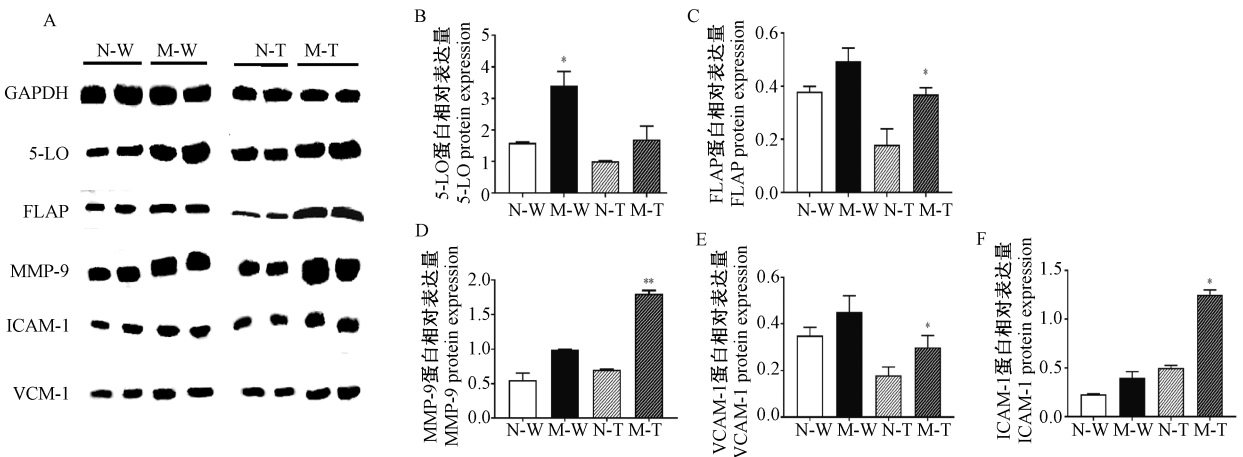


注: A~ E;分别为各组 5-LO、FLAP、MMP-9、ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达。与高脂饲喂前比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 7 高脂饲喂后五指山和西藏小型猪外周血白细胞中 5-LO、FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达变化

Note. A-E, The mRNA expression levels of 5-LO, FLAP, MMP-9, ICAM-1, and VCAM-1 in each group, respectively. Compared with that before high-fat diet feeding, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 7 Changes in the expressions of 5-LO, FLAP, MMP-9, ICAM-1, and VCAM-1 mRNA in the peripheral blood leukocytes of WZS and Tibetan minipigs after high-fat diet feeding



注:图 A 为蛋白表达代表图,图 B-F 分别为各组 5-LO、FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 蛋白相对表达量;与高脂饲喂前比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 8 五指山和西藏小型猪外周血白细胞中 5-LO、FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 蛋白表达

Note. A, A representative presentation of protein expression. B-F, The relative expression levels of 5-LO, FLAP, MMP-9, ICAM-1, and VCAM-1 protein, respectively. Compared with that before high-fat diet feeding, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 8 Changes in the expressions of 5-LO, FLAP, MMP-9, ICAM-1, and VCAM-1 protein in the peripheral blood leukocytes of WZS and Tibetan minipigs after high-fat diet feeding

量的 LDL-C 会滞留于损伤的血管内皮下,并被氧化形成氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL),进而导致泡沫细胞的产生,促进 AS 发生^[9]。本研究结果显示,高脂饲喂后五指山小型猪和西藏小型猪的血清 TC、HDL-C、LDL-C 均显著且成倍上升,持续稳定在高水

平状态,表明高脂饮食的环境下五指山小型猪和西藏小型猪均发生血脂异常,且五指山小型猪的 TC、LDL-C 水平高于西藏小型猪,这与前期对单次静脉注射脂肪乳和单次饲喂高脂饲喂的敏感性研究基本一致^[4],也进一步证实了五指山小型猪对高脂饮

食易感且脂质代谢的清除率相对较慢。另外,五指山小型猪在高脂饲喂后 TG 水平略有升高,而西藏小型猪则基本保持不变,该结果可能与小型猪的品系、饲料成分和造模时间有关,因为高脂饮食早期 TG 主要在肝中沉积,导致外周血中 TG 升高不明显,其具体原因有待进一步探讨。尽管血脂异常所导致的脂质在血管壁沉积是 AS 形成的基础,同样也有大量研究提出单纯的血脂异常并不会引起 CAD,往往伴着不同程度的炎症反应,AS 的形成是一个慢性的病理过程,但血脂异常诱发且加剧炎症反应,进而诱发 CAD^[10]。血中过量的 LDL-C 聚集于血管内皮下,并向 CAD 发展是以炎症因子、单核/巨噬细胞为基础的炎症反应过程^[11-12]。本研究结果显示,高脂饲喂后五指山小型猪和西藏小型猪的 MONO% 均出现上升,表明在高脂环境下诱发了两种小型猪的单核细胞聚集和活化,出现了慢性的低度炎症。高脂诱导后西藏小型猪同时出现 WBC 和 NEUT% 上升,相反五指山小型猪则未见明显变化,且西藏小型猪的 WBC 和 NEUT%、MONO% 均明显高于五指山小型猪,另外高脂饲喂后西藏小型猪血清 CRP 和 TNF- α 水平均显著升高,而五指山小型猪上升幅度较西藏小型猪降低,说明西藏小型猪的炎症程度相对较高,这可解释西藏小型猪的血脂水平虽不如五指山小型猪高,但仍易引发 AS 的形成^[6-8];同时本研究 HE 染色也显示西藏小型猪和五指山小型猪均出现严重 AS 病变,说明高脂环境、氧化应激和慢性炎症是引起 AS 斑块形成的主要原因。

CAD 的主要病理基础是 AS,AS 的发生与发展是多因素、多步骤的,是遗传因素和环境因素共同作用的结果,不同个体在相同环境下,冠心病的易感性存在差异。本研究在相同的高脂饲喂环境下,观察五指山小型猪和西藏小型猪 CAD 相关血脂和炎症易感基因的表达,结果发现,五指山小型猪高脂饲喂 6 个月后外周血白细胞中 LDLR、ApoAV 表达显著降低,而 PCSK9、LPL 表达显著上调;西藏小型猪高脂饲喂 6 个月后 LPL 表达显著上调,而 LDLR、PCSK9、ApoAV 表达无明显变化,结果也显示,五指山小型猪高脂饲喂后 PCSK9 表达升高和 LDLR 表达降低的幅度较大,而西藏小型猪 LPL 表达上升的幅度较大,由此说明,高脂环境下对五指山小型猪外周血 PCSK9 和 LDLR 基因表达较为敏感,而对西藏小型猪则以 LPL 基因表达较为敏感。

另外,LDLR 缺陷或缺失,不仅可导致 LDLR 数目降低或蛋白结构改变,影响与 LDL-C 的结合,而且阻止 LDL-C 进入细胞,导致血中胆固醇升高,使胆固醇在外周组织聚集,促进 AS 的发生^[13]。而 PCSK9 表达升高后从细胞分泌出,降解其它细胞表面的 LDLR,影响 LDL-C 的摄取,从而增加血浆 LDL-C 水平^[14]。本研究结果提示,在相同的高脂环境下两种小型猪 TC、LDL-C 水平的差异可能与外周血白细胞 PCSK9 和 LDLR 基因表达的差异有关。

本研究结果同时发现,在相同的高脂环境下,五指山小型猪和西藏小型猪外周血白细胞中 5-LO、FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 表达均出现上调,但西藏小型猪 FLAP、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 的基因表达和 MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 的蛋白表达上调幅度大于五指山小型猪,而五指山小型猪 5-LO 的基因表达和 5-LO、FLAP 的蛋白表达则高于西藏小型猪。由此说明,高脂环境下对西藏小型猪 MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 基因表达较为敏感,而对五指山小型猪是 5-LO 基因表达较为敏感。LO-LTs 炎症通路在 AS 中的扮演重要角色^[15]。5-LO 是催化花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 生成白三烯 (leukotrienes, LTs) 的关键酶。合成的白三烯与其特异性受体结合,激活白细胞和粘着在血管内皮细胞层的单核细胞,增加血管通透性,促进血栓形成,参与 AS 的发生^[16]。MMP-9 与斑块的稳定性密切相关,在各种炎症因子刺激下,斑块局部巨噬、泡沫细胞大量合成分泌 MMP-9,分解斑块内多种胶原和明胶,引起纤维帽变薄甚至破裂,导致心血管事件的发生,且外周血 MMP-9 升高是 AS 斑块不稳定的重要标志^[17]。ICAM-1 和 VCAM-1 属于免疫球蛋白超家族成员,介导白细胞向血管内皮的迁移和粘附,是早期 AS 病变发生的关键因素。血清 ICAM-1、VCAM-1 水平增高与 AS 进展有关,目前已被作为检测冠心病患者内皮功能障碍的生物标志物^[18]。本研究结果提示,在相同的高脂环境下西藏小型猪的炎症程度高于五指山小型猪的主要原因与这些炎症易感基因的表达差异有关。

综上所述,在相同的高脂环境下五指山小型猪、西藏小型猪均出现不同程度的血脂异常和炎症反应,五指山小型猪血脂高于西藏小型猪,而西藏小型猪炎症程度高于五指山小型猪,这些表型与这两种小型猪 CAD 相关血脂和炎症易感基因的表达差异有关,其敏感性存在异质性,其中五指山小型

猪外周血白细胞对 LDLR、PCSK9、5-LO 表达较为敏感,提示五指山小型猪的 AS 形成可能与血脂紊乱和慢性低度炎症有关;相反,西藏小型猪外周血白细胞对 LPL、MMP-9、ICAM-1 及 VCAM-1 表达较为敏感,提示西藏小型猪 AS 发生进程中,血脂紊乱虽作为起始因子,但严重的炎症反应参与并贯穿于发生始末,可能是导致 AS 病变严重的重要原因之一。本研究为这两种小型猪在代谢性心血管疾病中的选择应用提供实验依据。

参考文献:

- [1] Herrington W, Lacey B, Sherliker P, et al. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease [J]. Circ Res, 2016, 118 (4) : 535-546.
- [2] Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13 (6) : 368.
- [3] Wang HH, Garruti G, Liu M, et al. Cholesterol and lipoprotein metabolism and atherosclerosis: Recent advances in reverse cholesterol transport [J]. Ann Hepatol, 2017, 16; s27-s42.
- [4] 陈亮, 潘永明, 朱科燕, 等. 五指山小型猪、西藏小型猪和巴马小型猪对外源性脂肪的敏感性观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27 (6) : 12-16.
- [5] Pan YM, Cai ZW, Ma YC, et al. Involvement of peroxisome proliferator-activated receptors in cardiac and vascular remodeling in a novel minipig model of insulin resistance and atherosclerosis induced by consumption of a high-fat/cholesterol diet [J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14; 6.
- [6] 马毅超, 潘永明, 陈亮, 等. 胰岛素抵抗动脉粥样硬化小型猪模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24 (1) : 12-17.
- [7] 汪晶, 潘永明, 徐孝平, 等. 高脂诱导五指山小型猪动脉粥样硬化模型的建立及 Lp-PLA2 的表达调控 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25 (2) : 194-200.
- [8] 陈民利. 西藏小型猪和五指山小型猪的生理特点及其动脉粥样硬化的发病特征比较研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38 (5) : 325-328.
- [9] Yamashita T. Intestinal immunity and gut microbiota in atherogenesis [J]. J Atheroscler Thromb, 2017, 24 (2) : 110-119.
- [10] Tietge UJ. Hyperlipidemia and cardiovascular disease: inflammation, dyslipidemia, and atherosclerosis [J]. Curr Opin Lipidol, 2014, 25 (1) : 94-95.
- [11] 马雅鑫, 王亚红, 韩俊燕, 等. 祛瘀化痰解毒方药对高脂血症痰瘀互阻证患者单核细胞亚群异常的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31 (1) : 23-27.
- [12] Vasconcelos EM, Degasperi GR, de Oliveira HC, et al. Reactive oxygen species generation in peripheral blood monocytes and oxidized LDL are increased in hyperlipidemic patients [J]. Clin Biochem, 2009, 42 (12) : 1222-1227.
- [13] Burke AC, Telford DE, Sutherland BG, et al. Bempedoic acid lowers low-density lipoprotein cholesterol and attenuates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient (*LDLR*^{+/-} and *LDLR*^{-/-}) Yucatan miniature pigs [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38 (5) : 1178-1190.
- [14] Gong Y, Ma Y, Ye Z, et al. Thyroid stimulating hormone exhibits the impact on LDLR/LDL-c via up-regulating hepatic PCSK9 expression [J]. Metabolism, 2017, 76:32-41.
- [15] Tsai MY, Cao J, Steffen BT, et al. 5-Lipoxygenase gene variants are not associated with atherosclerosis or incident coronary heart disease in the multi-ethnic study of atherosclerosis cohort [J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5 (3) : e002814.
- [16] Khan Z, Tripathi CD. Leukotrienes and atherosclerosis [J]. Indian Heart J, 2010, 57 (2) : 175-180.
- [17] Eilenberg W, Stojkovic S, Kaider A, et al. NGAL and MMP-9/NGAL as biomarkers of plaque vulnerability and targets of statins in patients with varotid atherosclerosis [J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 56 (1) : 147-156.
- [18] Jiang Y, Jiang LL, Maimaitirexiati XM, et al. Irbesartan attenuates TNF- α -induced ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression through suppression of NF- κ B pathway in HUVECs [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19 (17) : 3295-3302.

[收稿日期] 2019-02-19