

心血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000236

载脂蛋白 B-100 亚单位多聚肽免疫对 ApoE-/- 小鼠
血脂水平和动脉粥样硬化斑块面积影响的研究

李永强, 王丽霞, 王山岭, 钱 鹏

(河南省人民医院心血管六病区, 郑州 450003)

【摘要】目的:探讨载脂蛋白 B-100(apolipoprotein B-100, apoB-100)亚单位多聚肽免疫对载脂蛋白 E 基因缺陷(ApoE-/-)小鼠动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的影响。**方法:**将 ApoE-/-小鼠随机分成 3 组:模型对照组(A 组)、apoB-100 亚单位混合组(B 组)、apoB-100 全肽组(C 组),每组 12 只。B、C 组小鼠给予相应多肽进行皮下免疫注射, A 组小鼠皮下注射等体积的生理盐水。所有小鼠高脂喂养 25 周后全部处死, ELISA 法检测特异性 IgG 抗体滴度, 生化仪检测各组小鼠血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平, 油红 O 染色后检测主动脉 AS 粥样斑块面积及其与管腔面积的比值。**结果:**(1)B 组和 C 组首次免疫后平均抗体滴度均高于免疫前(1:962.5 vs. 1:0.121, $t=9.522$, $P=0.000$; 1:1108.3 vs. 1:0.121, $t=7.531$, $P=0.000$), 差异均有统计学意义; B 组和 C 组二次免疫后平均抗体滴度均高于免疫前(1:3 582.9 vs. 1:0.121, $t=11.972$, $P=0.000$; 1:3 824.8 vs. 1:0.121, $t=8.220$, $P=0.000$), 差异均有统计学意义; B 组和 C 组首次二次免疫后平均抗体滴度均高于首次免疫, 差异均有统计学意义($t=3.522$, $P=0.009$; $t=3.179$, $P=0.007$)。(2)B 组的血清 TC(16.03 ± 1.49)、TG(1.72 ± 0.12)、LDL-C(2.15 ± 0.16)水平均低于 A 组(23.44 ± 1.72 , 3.01 ± 0.26 , 3.04 ± 0.28), HDL-C 水平(2.87 ± 0.17)高于 A 组(1.82 ± 0.11), 差异均有统计学意义($t=3.289$, $P=0.027$; $t=2.766$, $P=0.031$; $t=3.025$, $P=0.029$; $t=4.187$, $P=0.001$); C 组血清 TC(17.94 ± 1.55)、TG(1.88 ± 0.15)、LDL-C(1.97 ± 0.14)水平均低于 A 组, HDL-C 水平(3.01 ± 0.39)高于 A 组, 差异均有统计学意义($t=4.209$, $P=0.001$; $t=5.116$, $P=0.000$; $t=6.025$, $P=0.000$; $t=3.157$, $P=0.026$)。(3)B 组和 C 组动物较 A 组 AS 病变程度轻, 斑块面积与管腔面积比值小于 A 组(4.59 ± 1.41) vs. (17.6 ± 5.36), $t=3.465$, $P=0.021$; (3.87 ± 2.05) vs. (17.6 ± 5.36), $t=2.992$, $P=0.030$), 差异有统计学意义。**结论:**apoB-100 亚单位多聚肽可能通过调节 ApoE-/-小鼠血脂代谢, 影响 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化病变的形成。

【关键词】载脂蛋白 B-100; 动脉粥样硬化; 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠

【中图分类号】R972

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-26

Effect of apolipoprotein B-100 subunit poly peptide immune on levels of lipid
and areas of atherosclerotic plaque in ApoE-/-mice

Li Yongqiang, Wang Lixia, Wang Shanling, Qian Peng

(The sixth Department of Cardiovascular, Henan Provincial People's Hospital)

【Abstract】Objective: To observe the influence of apolipoprotein B-100(apoB-100) subunit poly peptide immune on atherosclerosis (AS) of ApoE-/-mice. **Methods:** ApoE-/-mice were randomly divided into three groups: group A(model control group) and group B (apoB-100 p45, apoB-100 p143 and apoB-100 p210 mixture group), group C (apolipoprotein B-100 intact peptide group), with 12 mice in each group. Mice of groups B and C were given polypeptide subcutaneous immunization while those in group A was given normal saline with same volume. All animals were executed after 25 weeks' high fat diet. Enzyme linked immunosorbent assay was performed to detect specific IgG antibody. Total cholesterol(TC), triglyceride(TG) and low density lipoprotein cholesterol(LDL-C) high-density lipoprotein cholesterol(HDL-C) levels in serum of experimental mice were detected by biochemical analyzer. The ratio of AS plaque area against lumen area was measured by image analysis software after HE staining. **Results:** (1)After the first immunization, group B and group C had significant higher level of antibody than before(1:962.5 vs. 1:0.121, $t=9.522$, $P=0.000$; 1:1108.3 vs. 1:0.121, $t=7.531$, $P=0.000$). After the second immunization, group B and group C got significant higher antibody than before(1:3582.9 vs. 1:0.121, $t=11.972$, $P=0.000$; 1:3824.8 vs. 1:0.121, $t=8.220$, $P=0.000$). After the second immunization, group B and group C got higher level of antibody than first immunization($t=3.522$, $P=0.009$; $t=3.179$, $P=0.007$). (2)Serum TC (16.03 ± 1.49), TG (1.72 ± 0.12) and LDL-C(2.15 ± 0.16) were significantly lower

作者简介: 李永强, Email: liyongqiang618@163.com,

研究方向: 冠心病。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000236.html>

in group B than in group A ($23.44 \pm 1.72, 3.01 \pm 0.26, 3.04 \pm 0.28$) while HDL-C levels (2.87 ± 0.17) was significantly higher in group B than in group A (1.82 ± 0.11) ($t=3.289, P=0.027; t=2.766, P=0.031; t=3.025, P=0.029, t=4.187, P=0.001$). TC (17.94 ± 1.55), TG (1.88 ± 0.15) and LDL-C (1.97 ± 0.14) were significantly lower in group C than in group A while HDL-C levels (3.01 ± 0.39) was significantly higher in group C than in group A ($t=4.209, P=0.001; t=5.116, P=0.000; t=6.025, P=0.000; t=3.157, P=0.026$). (3) AS severity was lighter in group B and group C than in group A and ratio of AS plaque area against lumen area was lower in group B and group C than in group A (4.59 ± 1.41 vs. $17.6 \pm 5.36, t=3.465, P=0.021; 3.87 \pm 2.05$ vs. $17.6 \pm 5.36, t=2.992, P=0.030$). **Conclusion:** apoB-100 subunit poly peptide immune may regulate the formation of AS by adjusting the blood lipid metabolism of ApoE-/- mice. **【Key words】**apolipoprotein B-100; atherosclerosis; ApoE-/- mice

近年来,我国心脑血管疾病发病率逐渐增高,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)已成为我国医学研究领域的重点和热点。临床研究发现,脂质代谢异常是 AS 发生最重要的危险因素^[1-3],但对载脂蛋白的研究较少。载脂蛋白(apolipoprotein, apo)分为 apoA 族、apoB 族、apoC 族、apoE 族和脂蛋白(a)族。各类脂蛋白中除高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)以外,极低密度脂蛋白、中等密度脂蛋白、低密度脂蛋白及 Lp(a) 颗粒中都含有 apoB^[4-6]。研究表明,血清总 apoB 水平与冠心病(coronary heart disease, CHD)的发生及发病严重性之间存在高度相关^[7],在预测心血管疾病的发生发展中也具有重要价值^[8-10]。apoB100 作为 apoB 族中最重要的组成成分,也是 CHD 的危险因素。本研究利用 ApoE-/- 小鼠动脉粥样硬化模型,观察 apoB-100 亚单位及完整片段免疫对 AS 病变形成的影响,为 AS 病变的防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雌性载脂蛋白 E(apolipoprotein E, ApoE)基因敲除(ApoE-/-)小鼠 36 只,8 周龄,体质量(17~20) g,购自北京大学医学部实验动物中心。

1.2 动物模型

36 只 8 周龄雌性 ApoE-/- 小鼠随机分为 3 组:A 组为模型对照组、B 组为 apoB-100 亚单位混合组(apoB-100 p45、apoB-100 p143 和 apoB-100 p210)、C 组为 apoB-100 全肽组,每组 12 只。小鼠于清洁级环境中分笼饲养。B、C 组小鼠分别行相应多肽皮下免疫注射,每次免疫注射的抗原量为 75 μ g,首次接种后 2 周进行加强注射。A 组小鼠皮下注射等体积的生理盐水。动物高脂饲料喂养 25 周后处死。高脂饲料脂肪含量 15%,胆固醇含量 1.25%(购自中国北京科澳协力有限公司)。

1.3 apoB-100 亚单位合成肽的设计及疫苗制备

采用 Fmoc 固相肽合成方法和肽疫苗技术,分别合成抗原

成分 apoB-100 p45(IEIGLEGKGFEPTEALFGK, aa661-680)、apoB-100 p143(IALDDAKINFNEKLSQLQTY, aa2131-2150)、apoB-100 p210(KTTKQSFDSLVAQYKKNKH, aa3136-3155)、七聚赖氨酸,通过交联剂 N-琥珀酰亚胺-M-马来酰亚胺基苯甲酸酯(M-maleimidobenzoyl-N-hydroxy succinimide ester, MBS)将 apoB-100 p45、apoB-100 p143、apoB-100 p210 与七聚赖氨酸耦联,再经 HPLC 纯化到 95%以上,进一步经质谱仪分析鉴定其分子量和纯度。apoB-100 亚单位合成肽的疫苗由美国 Cali-Bio 公司制备完成。

1.4 血清抗体检测

采用常规间接 ELISA 法测定小鼠血清中 apoB-100 特异性 IgG 抗体滴度。灭活的 apoB-100 全肽抗原配置成 2 μ g/ml,每孔 100 μ l 包被过夜,封闭 1 h,洗板。加入倍比稀释的待测样品,设置 3 个重复孔,室温孵育 2 h,0.1%Tween-20 PBS 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(中国武汉华美生物公司),室温孵育 2 h,洗涤 3 次,加入新鲜配制的酶标底物反应液,室温显色 30 min,使用 20%十二烷基磺酸钠+50%二甲基甲酰胺溶液终止显色反应,用全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 3550)在 405 nm 波长处读取吸光度(absorbance, A)值。用 3 个阴性对照血清最高稀释度的平均 A 值加 3 倍标准差作为实验小鼠滴度判定的临界值(Cut off 值),A 值大于基值的孔视为抗体阳性反应。

1.5 血清脂质水平检测

各组 ApoE-/- 小鼠摘眼球取血 0.5 ml,12 000 r/min 低速离心 15 min 后取血清。并用全自动生化分析仪(中国北京普朗 PUZS-300)测定小鼠血清中血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平。

1.6 油红 O 染色

实验小鼠处死后从左心室灌流生理盐水,分离取主动脉根部血管,用 4%多聚甲醛固定,连续冰冻切片,厚 8 μ m,进行油红 O 染色,取 7 张切片(100 μ m 间距),使用计算机病理图像分析软件测定动脉斑块大小、斑块面积占管腔面积的比值。

1.7 统计学处理

应用 stata12.0 软件,服从正态分布的连续型数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用单因素方差分

析,多组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验;抗体滴度以比值表示,免疫前后比较采用转换后($Y'=\ln(1/Y)$)数值借助于 Mixed 模型进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ApoE-/-小鼠 apoB-100 亚单位及全肽免疫后 IgG 抗体滴度

apoB-100 p45、apoB-100 p143 及 apoB-100 p210 亚单位多聚肽和 apoB-100 全肽注射免疫 ApoE-/-小鼠后,IgG 抗体滴度均明显升高($P<0.05$),且二次免疫后 IgG 抗体滴度进一步升高($P<0.05$),表明 apoB-100 能够引起较强的免疫应答效应和免疫记忆反应。表 1 中为将抗体滴度数据转换后结果。

表 1 apoB-100 免疫后 ApoE-/-小鼠的 IgG 抗体滴度转化值 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.1 IgG antibody titers of ApoE-/-mice after the immunization of apoB-100 ($\bar{x} \pm s$)

组别	免疫前	首次免疫	二次免疫
B组 ($n=12$)	-2.11 ± 0.31	6.87 ± 1.23^a	8.18 ± 1.09^{ab}
C组 ($n=12$)	-2.11 ± 0.17	7.01 ± 0.71^a	8.25 ± 2.00^{ab}

注:a,与免疫前组比较, $P<0.05$;b,与首次免疫比较, $P<0.05$

2.2 血脂水平变化

与模型对照组相比,apoB-100 亚单位多聚肽混合组和 apoB-100 全肽组血清 TC、TG、LDL-C 水平均明显降低($P<0.05$);而 HDL-C 水平则明显升高($P<0.05$),亚单位多聚肽混合组和全肽组之间无统计学差异($P>0.05$),见表 2。

表 2 各组 apoE-/-小鼠血脂测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.2 Results of lipid level of apoE-/- mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
A组 ($n=12$)	23.44 ± 1.72	3.01 ± 0.26	1.82 ± 0.11	3.04 ± 0.28
B组 ($n=12$)	16.03 ± 1.49^{ab}	1.72 ± 0.12^{ab}	2.87 ± 0.17^{ab}	2.15 ± 0.16^{ab}
C组 ($n=12$)	17.94 ± 1.55^a	1.88 ± 0.15^a	3.01 ± 0.39^a	1.97 ± 0.14^a
F 值	9.234	6.356	7.201	5.227
P 值	0.000	0.001	0.002	0.011

注:a,与 A 组比较, $P<0.05$;与 C 组比较,b, $P>0.05$

2.3 各组 ApoE-/-小鼠主动脉粥样硬化斑块的比较

将各组 ApoE-/-小鼠主动脉根部进行横切,油红 O 染色。模型对照组可见粥样斑块和纤维斑块,内膜明显增厚、纤维化,突向管腔,斑块内含有大量脂质,见图 1A。B 组和 C 组小鼠主动脉管壁层次欠清晰,内膜有明显增厚,但与对照组相比,其病变程度有明显降低,见图 1B 和 1C。从表 3 可见,各免疫治疗组主动脉粥样硬化斑块面积及其与管腔面积比值均小于模型对照组($P<0.05$),B 组和 C 组间无统计学差异($P>0.05$)。

表 3 各组小鼠主动脉根部斑块面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.3 Comparison of aortic plaque size of ApoE-/- mice

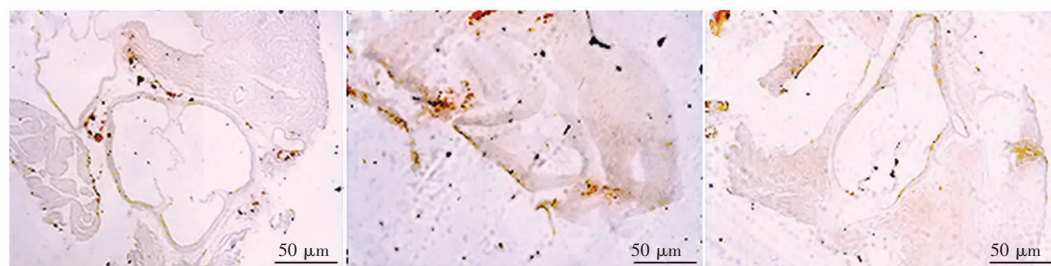
组别	管腔 (mm^2)	斑块 (mm^2)	斑块/管腔 (%)
A组 ($n=12$)	0.46 ± 0.16	0.08 ± 0.04	17.6 ± 5.36
B组 ($n=12$)	0.46 ± 0.13	0.02 ± 0.01^a	4.59 ± 1.41^a
C组 ($n=12$)	0.45 ± 0.09	0.02 ± 0.01^a	3.87 ± 2.05^a
F 值	1.124	4.128	9.200
P 值	0.239	0.021	0.000

注:a,与 A 组比较, $P<0.05$

3 讨论

血脂异常是 AS 的重要诱因,TG、TC 和 LDL 升高和 HDL 下降是 AS 性心血管疾病的重要危险因素^[11-12]。血液中的脂质与载脂蛋白结合,并以脂蛋白的形式运输。载脂蛋白在人体脂类和胆固醇的运输和代谢过程中发挥重要作用。apoB 作为一个重要的载脂蛋白家族,是 LDL 受体的配体,能够清理体内的 LDL、参与极低密度脂蛋白的合成分泌以及脂类和胆固醇的运输等^[4,13-15]。apoB 主要包括 B100、B48、B74、B26 及少量 B50,其中以 apoB-100 最为重要。apoB100 是其基因的全系列转录产物,相对分子质量约 513 kD,包括 4 536 个氨基酸残基和 27 个氨基端信号肽^[16]。

几乎每一个脂蛋白都包含一个 apoB 分子,因而血液中 apoB 的水平能够反映血液中致 AS 脂蛋



A. A 组小鼠动脉横切面

B. B 组小鼠动脉横切面

C. C 组小鼠动脉横切面

图 1 各组 ApoE-/-小鼠动脉横切面动脉粥样硬化病变的比较 (油红 O 染色,200×)

Fig.1 Comparison of arterial cross-sectional atherosclerotic lesions of ApoE-/-mice in each group (oil red O staining,200×)

白的含量,因此 apoB 水平对 AS 疾病风险的预测具有重要意义。apoB 含有带正电荷的碱性氨基酸集聚区,易于和动脉内皮下细胞外基质成分带负电的硫酸基团结合,使得含 apoB 的脂蛋白易于滞留于动脉内皮下,从而导致 AS 形成^[17]。大量的统计学研究表明,ApoB 在血液中的含量与冠心病、动脉硬化的发病率呈极强的相关性,在肥胖、心血管疾病的研究中尤为重要^[18-20],而 apoB 对 AS 的预防和治疗的意义还不明确。

本研究通过皮下注射 apoB-100 亚单位多聚肽和全肽免疫 ApoE-/-小鼠后,血清特异性 IgG 抗体滴度明显升高,表明 apoB-100 注射免疫能够引起较强的免疫反应。本研究还发现 apoB-100 亚单位及全肽免疫可以降低 ApoE-/-小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平,升高 HDL-C 水平,提示 apoB-100 免疫后有效改善了 ApoE-/-小鼠体内的脂质代谢过程。油红 O 染色结果显示,apoB-100 亚单位多聚肽免疫可有效抑制 AS 的发展,并减小斑块面积与管腔面积的比值,与 Fredrikson 等的研究结果^[21]相一致。结合血脂测定结果,提示 apoB-100 可能通过改善脂代谢而延缓 AS 病变的进程,而 apoB-100 亚单位多聚肽混合组(apoB-100 p45、apoB-100 p143 和 apoB-100 p210)和 apoB-100 全肽组效果相似,无统计学差异。

综上所述,本实验结果显示 apoB-100 皮下注射免疫可以有效改善 ApoE-/-小鼠的脂质代谢,减轻高脂饮食引起的 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化病变程度,为 AS 临床药物的开发提供新的思路和实验依据,但其作用机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Gkretsi V, Simopoulou T, Tsezou A. Lipid metabolism and osteoarthritis; lessons from atherosclerosis[J]. Prog Lipid Res, 2011, 50(2): 133-140.
- [2] Perdomo G, Henry Dong H. Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging[J]. Aging (Albany NY), 2009, 1(1): 17-27.
- [3] Mukhopadhyay R. Mouse models of atherosclerosis: explaining critical roles of lipid metabolism and inflammation[J]. J Appl Genet, 2013, 54(2): 185-192.
- [4] Sniderman AD, De Graaf J, Couture P, et al. Regulation of plasma LDL: the apoB paradigm[J]. Clin Sci (Lond), 2010, 118(5): 333-339.
- [5] Shin MJ, Krauss RM. Apolipoprotein CIII bound to apoB-containing lipoproteins is associated with small, dense LDL independent of plasma triglyceride levels in healthy men[J]. Atherosclerosis, 2010, 211(1): 337-341.
- [6] Stillemark-Billton P, Beck C, Boren J, et al. Relation of the size and intracellular sorting of apoB to the formation of VLDL 1 and VLDL 2[J]. J Lipid Res, 2005, 46(1): 104-114.
- [7] Davidson MH. Is LDL-C passed its prime? the emerging role of non-HDL, LDL-P, and ApoB in CHD risk assessment[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(9): 1582-1583.
- [8] Taleb A, Witztum JL, Tsimikas S. Oxidized phospholipids on apoB-100-containing lipoproteins: a biomarker predicting cardiovascular disease and cardiovascular events[J]. Biomark Med, 2011, 5(5): 673-694.
- [9] Carnevale Schianca GP, Pedrazzoli R, Onolfo S, et al. ApoB/apoA-I ratio is better than LDL-C in detecting cardiovascular risk[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2011, 21(6): 406-411.
- [10] Heneghan HM, Huang H, Kashyap SR, et al. Reduced cardiovascular risk after bariatric surgery is linked to plasma ceramides, apolipoprotein-B100, and ApoB100/A1 ratio[J]. Surg Obes Relat Dis, 2013, 9(1): 100-107.
- [11] Momiyama Y, Ohmori R, Fayad ZA, et al. The LDL-cholesterol to HDL-cholesterol ratio and the severity of coronary and aortic atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2012, 222(2): 577-580.
- [12] Schwartz EA, Reaven PD. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins, vascular inflammation, and atherosclerosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1821(5): 858-866.
- [13] Blasiole DA, Oler AT, Attie AD. Regulation of ApoB secretion by the low density lipoprotein receptor requires exit from the endoplasmic reticulum and interaction with ApoE or ApoB[J]. J Biol Chem, 2008, 283(17): 11374-11381.
- [14] Chen Z, Newberry EP, Norris JY, et al. ApoB100 is required for increased VLDL-triglyceride secretion by microsomal triglyceride transfer protein in ob/ob mice[J]. J Lipid Res, 2008, 49(9): 2013-2022.
- [15] Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, et al. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production[J]. J Clin Invest, 2004, 113(9): 1277-1287.
- [16] Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Nolte RT, et al. The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms[J]. EMBO J, 1986, 5(13): 3495-3507.
- [17] Parasassi T, Bittolo-Bon R, Brunelli, et al. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-)[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(1): 82-89.
- [18] Lu M, Lu Q, Zhang Y, et al. ApoB/apoA1 is an effective predictor of coronary heart disease risk in overweight and obesity[J]. J Biomed Res, 2011, 25(4): 266-273.
- [19] Benn M. Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review[J]. Atherosclerosis, 2009, 206(1): 17-30.
- [20] Fredrikson GN, Hedblad B, Berglund G, et al. Identification of immune responses against aldehyde-modified peptide sequences in apoB associated with cardiovascular disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(5): 872-878.
- [21] Fredrikson GN, Soderberg I, Lindholm M, et al. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(5): 879-884.

(责任编辑:冉明会)