

ApoE 基因缺失幼龄小鼠动脉粥样硬化 相关基因的时序表达研究*

荆文¹⁾ 尹苗¹⁾ 社会芹¹⁾ 叶红燕¹⁾ 张圣强¹⁾ 商允菊¹⁾
戴学栋¹⁾ 曲志萍²⁾ 张暉¹⁾ 潘杰^{1)**}

¹⁾山东师范大学生命科学学院, 山东省“动物抗性生物学”重点实验室, 济南 250014;

²⁾济南市中心医院医学实验室诊断中心, 济南 250013)

摘要 利用 RT-PCR 技术检测 apoE 基因缺失(apoE^{-/-})小鼠在 1、2 和 3 月龄 3 个年龄段主动脉以及 14 天、1、2 和 3 月龄 4 个年龄段肝脏中动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)重要相关基因的时序表达特点, 并通过血清生化检测结合主动脉根部病理形态学特征的分析, 探讨 AS 重要相关基因时序表达特点与 AS 早期病变的关系. 在主动脉检测的 9 条 AS 相关基因中, apoE^{-/-}与野生型(WT)小鼠相比, 1、2 和 3 月龄时 IL-1 β 的 mRNA 表达水平均显著上调. 1 月龄时 VCAM-1、I κ B 和 TGF- β , 2 月龄时 PDGF- α 和 CD36, 3 月龄时 TNF- α 和 MMP2 的 mRNA 表达水平均显著上调, 其他年龄段无显著变化. 在肝脏检测的 2 条 AS 相关基因中, C 反应蛋白(CRP)的 mRNA 表达水平在 14 天到 2 月龄时无显著变化, 3 月龄时显著上调. NF- κ B 在各年龄段 apoE^{-/-}小鼠主动脉和肝脏中的基因表达量与同龄 WT 小鼠相比均无显著差异. 不同年龄段的 apoE^{-/-}小鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 水平均明显高于同龄 WT 小鼠. 2 月龄 apoE^{-/-}小鼠主动脉内膜出现散在的脂质沉积, 并随年龄增长逐渐加重. 上述结果显示, 时序表达上调的 AS 重要相关基因构成了以 NF- κ B 为核心的复杂调控网络, 它们之间相互作用, 共同参与慢性炎症过程, 在 apoE^{-/-}小鼠 AS 的早期发生发展中发挥重要作用.

关键词 动脉粥样硬化, RT-PCR, apoE 基因, 动脉粥样硬化相关基因, 主动脉, 肝脏

学科分类号 Q786

心脑血管疾病严重威胁着人类的健康, 其死亡率呈上升趋势, 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是其病理基础. 关于 AS 的发病机制存在多种学说, 主要是由多种因素引起的慢性炎症反应学说以及脂代谢紊乱学说^[1~4], 而慢性炎症反应和脂代谢紊乱相互影响、共同参与并促进了 AS 发生发展. 在 AS 的发生发展直至粥样斑块破裂的整个过程中都伴随着炎症反应. ApoE^{-/-}小鼠是目前常用的 AS 模型, 可自发产生 AS, 且其病理特征与人 AS 非常相似, 是研究 AS 发生机制的优良动物模型. 然而在 apoE^{-/-}小鼠 AS 发生早期, 较系统地检测 AS 重要相关基因的表达时序以及各基因之间相互作用的报道尚不多见. 为此, 本实验利用 apoE^{-/-}小鼠为模型, 检测主动脉和肝脏中多种 AS 相关基因的时序表达, 旨在揭示在 AS 发生早期起关键作用的危险因子, 并初步探讨其作用机理, 为进一步深入开展其分子生物学研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠及分组. 选取 apoE^{-/-}及相同遗传背景(C57BL/6J)的野生型(wild type, WT)雄性小鼠. ApoE^{-/-}小鼠购于美国 Jackson 实验室, WT 小鼠购于上海斯莱克生物公司, 于山东师范大学生命科学学院 SPF 级小鼠实验室饲养、繁殖. 饲养条件为 (22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 40%~60%相对湿度, 12 h 明暗循环照明. 小鼠出生后第 22 天停止哺乳, 喂以普通饲料(含 3%脂肪和 0.07%胆固醇等), 自由摄水食. 于 14 天、1、2 和 3 月龄分别解剖 2 组小鼠, 每个年

* 国家自然科学基金资助项目(30571024)和山东省教育厅科技计划项目(J06L11).

** 通讯联系人. Tel: 0531-86182572, E-mail: jiepan@sdu.edu.cn

收稿日期: 2007-07-04, 接受日期: 2007-08-26

龄段小鼠 10 只, 采血前禁食 10 h.

1.1.2 主要试剂. Trizol (BioFlux 公司)、DEPC (Amresco 公司)、M-MLV (Promega 公司)、Oligo(dT)₁₈ (MBI 公司)、RNase Inhibitor(TOYOBO 公司)、DNase I (Tiangen 公司)、Taq DNA 聚合酶 (TAKARA 公司)、dNTPs (TAKARA 公司)、Marker D2000(Tiangen 公司)、引物(上海博亚生物技术有限责任公司合成)、琼脂糖(BIOWEST 公司)、苏丹IV、氯仿、异丙醇、乙醇及亮绿等试剂均为国产分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 RT-PCR 分析. 分别取 1、2 和 3 月龄 2 种

基因型小鼠主动脉 ($n=10$) 以及 14 天及 1、2 和 3 月龄 2 种基因型小鼠肝脏($n=10$), Trizol 法抽提总 RNA, DNase I 处理后, 采用紫外分光光度计测定其浓度. 取 1 μ g 总 RNA, 以 Oligo(dT)₁₈ 为引物、M-MLV 为逆转录酶进行逆转录反应. 参照 GenBank 中靶基因 mRNA 的序列设计引物 (表 1). 靶基因和内参分别在最佳条件下及 PCR 循环的线性期内扩增, 琼脂糖凝胶电泳分析. 应用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析电泳条带灰度值, 以靶基因与 β -actin 电泳条带吸光度的比值计算靶基因 mRNA 相对表达量, 然后比较 apoE^{-/-}小鼠与同龄 WT 小鼠相对表达量.

Table 1 Primers sequence for RT-PCR analysis

GenBank No.	Genes	Primers Sequence
NM_007768.3	C-reactive protein (CRP)	F: 5' agg act cgt atg gcg gtg a 3' R: 5' tgc tgg ggg taa aag gtt c 3'
NM_009045.3	Nuclear factor-Kappa B (NF- κ B)	F: 5' ggt ccc ttc ctc agc cat gg 3' R: 5' gag cag ggt cgc tgt cag cac 3'
NM_030612.1	Inhibitor Kappa B (I κ B)	F: 5' gaa gcc cga tga ata cca ccc a 3' R: 5' cgc att gtg agc cac gac c 3'
NM_011577.1	Transforming growth factor- β (TGF- β)	F: 5' tga cgt cac tgg agt tgt acg g 3' R: 5' ggt tca tgt cat gga tgg tgc 3'
NM_008361.2	Interleukin-1 β (IL-1 β)	F: 5' tga cct ggg ctg tcc aga tg 3' R: 5' ctg tcc att gag gtg gag ag 3'
NM_013693.1	Tumor necrosis factor- α (TNF- α)	F: 5' cct gta gcc cac gtc gta gc 3' R: 5' ttg acc tca gcg ctg agt tg 3'
NM_011693.2	Vascular cell adhesion molecular-1 (VCAM-1)	F: 5' ccc aag gat cca gag att ca 3' R: 5' taa ggt gag gat ggc att tc 3'
NM_008808.2	Platelet derived growth factor- α (PDGF- α)	F: 5' cct gtg ccc att cgc agg aa 3' R: 5' ttg gcc acc ttg aca ctg cg 3'
NM_008610.2	Matrix metalloproteinase 2 (MMP2)	F: 5' cta agc tca tcg cag act cc 3' R: 5' ggt tct cca gct tca ggt aat aag ca 3'
NM_007643.2	CD36	F: 5' gagccatctttgagccttca 3' R: 5' tcagatccgaacacagcgta 3'
NM_007393.1	β -actin	F: 5' tgc tgt ccc tgt atg cct ct 3' R: 5' agg tct tta cgg atg tca acg 3'

1.2.2 血清生化指标检测. 分别采集上述 4 个年龄段的 2 种基因型小鼠静脉血($n=10$), 分离血清, 采用 COD-PAP、GPO-PAP 酶学法, 应用 BAYER ADVIA-2400 型全自动生化分析仪分别检测血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)以及高密度脂蛋白胆

固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)的浓度.

1.2.3 主动脉根部冰冻切片. 分别取出上述 4 个年龄段的 2 种基因型小鼠心脏及主动脉, 用 4%甲醛水溶液冲洗后, 将带有主动脉根部的心脏固定于 4%甲醛中, 30%蔗糖溶液渗透后, 为选择同一部位的主动脉内膜进行脂质沉积病变比较, 制备了主

动脉根部连续冰冻切片(20 μm), 苏丹IV染色、亮绿复染, 光学显微镜观察、拍照.

1.2.4 统计学分析. 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS10.0 软件分析, $P < 0.05$ 为统计学有显著性差异, $P < 0.01$ 为差异极显著.

2 结 果

2.1 RT-PCR 分析结果

在主动脉的 9 条 AS 相关基因中, apoE^{-/-}小鼠与同龄 WT 小鼠相比, 1 月龄时血管细胞粘附分子-1 (vascular cell adhesion molecular-1, VCAM-1)、I κ B 和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) ($P < 0.05$) 的基因表达水平明显升

高, 2 月龄时血小板衍生生长因子- α (platelet derived growth factor- α , PDGF- α) ($P < 0.01$) 和 CD36 ($P < 0.05$) 的基因表达水平较 WT 小鼠明显升高, 3 月龄时肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ($P < 0.05$) 和基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) ($P < 0.01$) 的基因表达水平较 WT 小鼠明显升高, 上述基因在 apoE^{-/-}小鼠其他年龄段基因表达水平与 WT 小鼠相比无显著差异 ($P > 0.05$). 1、2 和 3 月龄时白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ($P < 0.05$) 的基因表达水平均显著上调. 各年龄段 apoE^{-/-}小鼠核转录因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 基因表达水平与同龄 WT 小鼠相比无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 1).

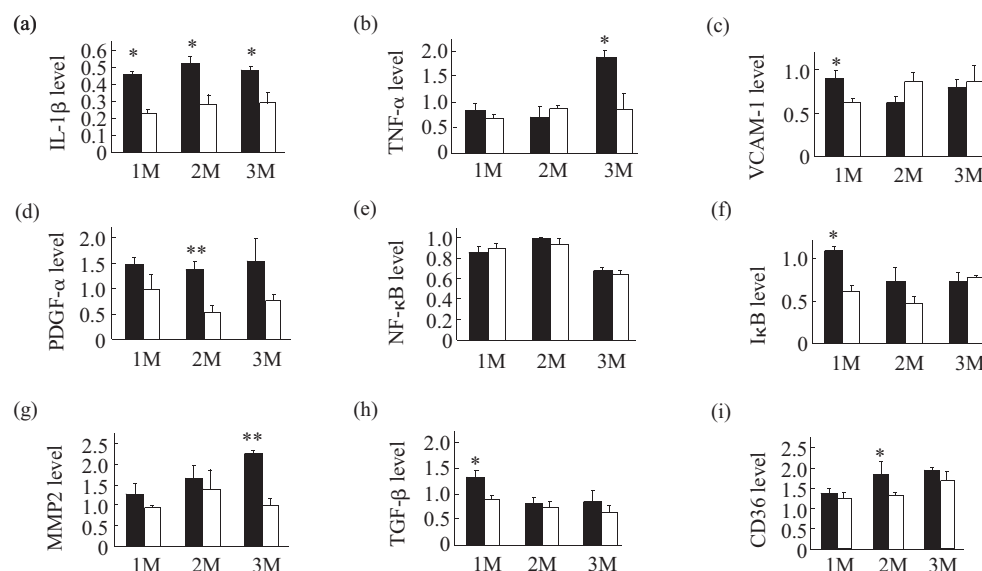


Fig. 1 The mRNA relative expressions of target genes in aortas from the mice at various ages

RT-PCR assays have been used to analyze expression patterns of atherosclerosis related genes in aortas of apoE^{-/-} and WT mice from 1 to 3-month. The relative expression of mRNA was evaluated by the ratio of band density of target gene/ β -actin. (a)~(i) The mRNA relative expressions of IL-1 β , TNF- α , VCAM-1, PDGF- α , NF- κ B, I κ B, MMP2, TGF- β and CD36. Experiments were repeated four times, standard errors calculated and statistical analysis applied as shown ($n=10$, $\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with WT mice. ■ : apoE^{-/-} mice, □ : WT mice.

在肝脏的 2 条 AS 相关基因中, apoE^{-/-}小鼠与同龄 WT 小鼠相比, C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)基因表达水平在 14 天到 2 月龄时无显著变化 ($P > 0.05$), 到 3 月龄时显著上调 ($P < 0.05$). 各年龄段 apoE^{-/-}小鼠 NF- κ B 基因表达与同龄 WT 小鼠相比无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 2).

2.2 血清生化指标

ApoE^{-/-}小鼠在 14 天、1、2 和 3 月龄的 4 个年龄段血清 TC 及 LDL-C 水平均显著高于同龄 WT 小鼠 ($P < 0.01$) (图 3a, c). 血清 TG 浓度从 14 天至 3 月龄呈现持续上升趋势, 1 月龄时显著上调 ($P < 0.05$), 一直持续至 3 月龄 (图 3b). ApoE^{-/-}小鼠血清 HDL-C 水平在 14 天至 3 月龄期间也显著高于同龄 WT 小鼠 ($P < 0.01$) (图 3d).

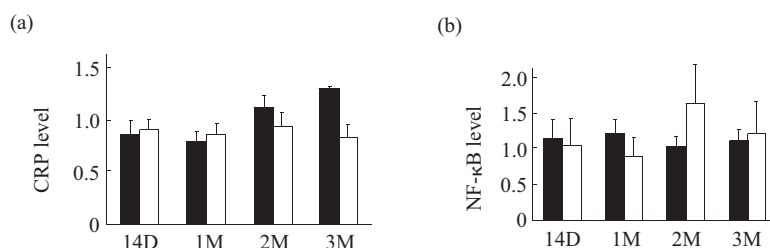


Fig. 2 The mRNA relative expressions of target genes in livers from the mice at various ages

RT-PCR assays have been used to analyze expression patterns of atherosclerosis related genes in livers of apoE^{-/-} and WT mice from 14-day to 3-month. The relative expression of mRNA was evaluated by the ratio of band density of target gene/ β -actin. (a) and (b) The mRNA relative expressions of CRP, and NF- κ B. Experiments were repeated four times, standard errors calculated and statistical analysis applied as shown ($n=10$, $\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with WT mice. ■: apoE^{-/-} mice, □: WT mice.

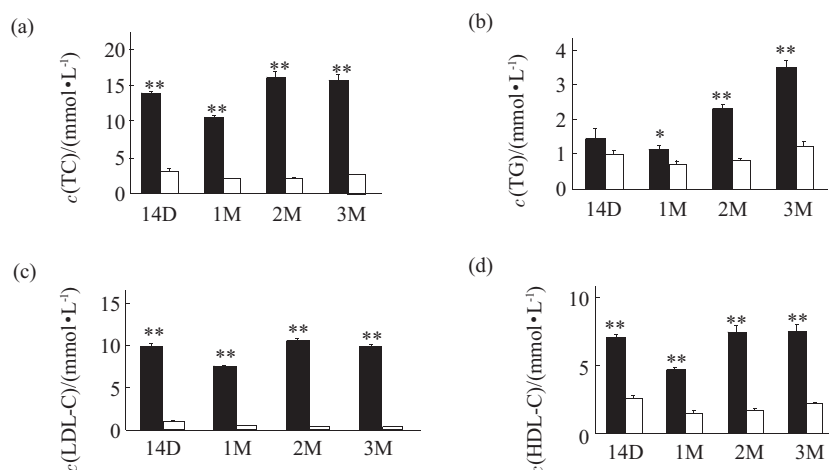


Fig. 3 TC, TG, LDL-C and HDL-C concentration in serum of apoE^{-/-} and WT mice

(a) TC concentration in serum. TC concentration in serum of apoE^{-/-} mice was significantly higher than that of WT mice. TC level was 4 to 8-fold than WT mice. (b) TG concentration in serum. TG concentration in serum of apoE^{-/-} mice was higher than that of WT mice. TG level was 1.6 to 2.4-fold than WT mice. Along with the increase of apoE^{-/-} mice, the TG level gradually rised. (c) LDL-C concentration in serum. LDL-C concentration in serum of apoE^{-/-} mice was significantly higher than that of WT mice. LDL-C level was 9 to 29-fold than WT mice. (d) HDL-C concentration in serum. HDL-C concentration in serum of apoE^{-/-} mice was higher than that of WT mice. HDL-C level was 2.7 to 4.2-fold than WT mice. Experiments were repeated four times, standard errors calculated and statistical analysis applied as shown ($n=10$, $\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with WT mice. ■: apoE^{-/-} mice, □: WT mice.

2.3 主动脉根部冰冻切片

光学显微镜观察表明, apoE^{-/-}小鼠在 14天和 1 月龄时主动脉根部内膜无明显脂质沉积(图 4a, e, b, f); 2 月龄时内膜有轻度局部脂质沉积, 范围较小, 主要分布在瓣膜附近(图 4c, g); 随年龄增长脂质沉积加重, 3 月龄内膜下脂质沉积部位面积变大(图 4d, h). WT 小鼠在实验的 4 个年龄阶段, 主动

脉根部内膜均无明显脂质沉积(图 4i~l).

3 讨论

ApoE是构成乳糜微粒(CM)、极低密度脂蛋白(VLDL)和高密度脂蛋白(HDL)的重要成分, 通过低密度脂蛋白受体(LDLR)途径和非 LDLR 途径发挥清除血脂的作用^[2]. 血脂代谢紊乱, 尤其是 LDL

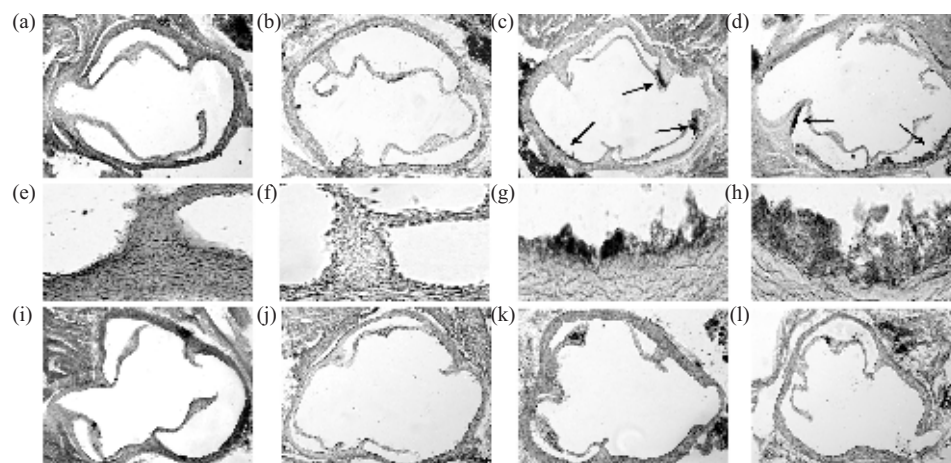


Fig. 4 Light microscopic appearance of cross sections from the root of mice aorta (Sudan IV stained)

(a) to (d) showing the complete aortic valve of apoE^{-/-} mice respectively at 14-day, 1, 2 and 3-month old. The original magnification was 100×. (e) to (h) showing the local aortic valve of apoE^{-/-} mice from 14-day to 3-month old. The original magnification was 400×. At 2-month old, there was lipid deposition in the aortic valve of apoE^{-/-} mice, and more serious at 3-month old. (i) to (l) showing the aortic valve of WT mice from 14-day to 3-month old. The original magnification was 100×. There was no lipid deposition in the aortic valve of WT mice at different ages. (The arrows indicated the lipid deposition).

水平升高使血管内皮下 LDL 的氧化修饰加强^[3,4]。并且在 LDL 氧化修饰过程中形成的溶血磷脂酸能与细胞膜上相应的 G 蛋白偶联受体结合, 导致内皮细胞骨架纤维收缩, 形成细胞间通道^[5], 增加了内皮的通透性, 使血液中 LDL 易于透过而沉积于内皮下间隙, 增加了氧化型 LDL (oxidized LDL, OxLDL) 的产生。OxLDL 可以刺激内皮细胞分泌单核细胞趋化蛋白 (MCP-1)、VCAM-1 和 ICAM-1, 使单核 / 巨噬细胞聚集到病灶部位, 并且向内皮下迁移。同时 OxLDL 可刺激单核 / 巨噬细胞高表达清道夫受体 CD36, 从而使其大量吞噬 OxLDL, 形成泡沫细胞^[6]。本实验中 apoE^{-/-} 小鼠清除血脂途径受阻, 14 天至 3 月龄时, 其 TC、TG 和 LDL 水平比同龄 WT 小鼠显著升高。在 1 月龄时 apoE^{-/-} 小鼠的 LDL 水平比同龄 WT 小鼠高约 17 倍, 而此时主动脉内膜并无明显脂质沉积。以上结果提示, 幼龄期 apoE^{-/-} 小鼠存在明显升高的 LDL 可作为重要的致 AS 危险因素, 导致内皮细胞损伤。主动脉的 VCAM-1 表达水平明显上调, 使单核 / 巨噬细胞加速募集, 并向受损的内膜迁移, 而 2 月龄时 CD36 水平的显著升高易于泡沫细胞的形成, 加速此时尚处于病变早期的 AS 发生和发展。

NF-κB 是一种具有基因转录调控作用的转录因子, 可被 TNF-α 和 CRP 等激活, 调控细胞因子、化学趋化因子、细胞粘附分子、生长因子及免疫受

体等的表达, 参与了 AS 的全过程^[7]。近来的研究表明, 参与 AS 斑块形成中炎症反应的相关基因多为 NF-κB 的靶基因。在大多数细胞中 NF-κB 与 IκB 结合, 处于无活性状态。当细胞受到刺激后, IκB 降解, 使 NF-κB 激活快速易位入核, 引起靶基因表达。NF-κB 激活后可迅速诱导 IκB 的新合成, 新合成的 IκB 入核与 NF-κB 结合, 实现 NF-κB 活化与失活的循环。NF-κB 活化后, 可增强 TNF-α 和 IL-1β 的基因转录, 进而 TNF-α 和 IL-1β 再次激活 NF-κB, 导致最初的炎症信号进一步放大。此外, IL-1β 刺激巨噬细胞过表达 IκB, IκB 可下调 NF-κB 的活性^[8]。CRP 是由肝细胞产生、分泌的重要防御分子, 是全身炎症反应的敏感性标志物。IL-1 和 TNF-α 等细胞因子表达上调, 刺激肝脏合成 CRP。CRP 可刺激单核细胞产生 MCP-1, 促进炎症反应^[9]。在 apoE^{-/-} 小鼠中转入人 CRP 时, 可加速 AS^[10]。TNF-α 是具有多种生物学功能的细胞因子, 主要由单核 / 巨噬细胞产生。TNF-α 促进 AS 的发生发展, 参与炎症反应的每个阶段^[11]。在动脉壁细胞内 TNF-α 可通过受体介导, 增强血管壁趋化和粘附分子的表达, 促进血管平滑肌细胞 (VSMC) 的增殖和迁移。抑制 TNF-α 活性可降低 apoE^{-/-} 小鼠的 AS 病变^[12]。TNF-α 在 AS 斑块处高水平表达, 通过 p73 介导平滑肌细胞凋亡, 参与斑块形成和破裂^[13]。本实验中各年龄段 apoE^{-/-} 小

鼠主动脉和肝脏中 NF- κ B 表达均无显著变化, 而 apoE^{-/-}小鼠主动脉中 1 月龄 I κ B 以及 1、2 和 3 月龄 IL-1 β 和 3 月龄 TNF- α mRNA 水平均显著升高, 3 月龄肝脏中 CRP mRNA 水平也显著升高. 并且随小鼠年龄增长血脂水平持续升高, 主动脉内膜脂质沉积逐渐加重. 以上结果提示, NF- κ B 在 1 月龄前已经被活化, 其激活可能并不体现在转录水平的升高, 而是由无活性状态转变为活性状态. 1 月龄 apoE^{-/-}小鼠主动脉中 I κ B 的表达升高实现了 NF- κ B 活化与失活的循环. NF- κ B 的活化导致 IL-1 β 和 TNF- α 的先后转录活化, 而活化后的 IL-1 β 和 TNF- α 再次激活 NF- κ B, 使炎症反应进一步放大. 活化的 IL-1 β 使巨噬细胞过表达 I κ B, 对 NF- κ B/I κ B 通路进行调节. 并且 NF- κ B 的活化使其下游基因 VCAM-1 表达升高, 增强了单核/巨噬细胞的募集, 加速了泡沫细胞的生成. 随着血脂代谢紊乱的加重, 炎症反应的发展, apoE^{-/-}小鼠主动脉内膜脂质沉积逐渐加重, AS 斑块面积逐渐变大.

MMPs 可以裂解细胞外基质(ECM)成分并影响其重建, 对维持 ECM 成分的合成与降解发挥重要作用. ECM 合成与降解失衡是 AS 形成过程的一个重要环节. MMPs 过度表达可引发 ECM 过度降解而出现相关疾病如 AS. IL-1 β 、TNF- α 和 TGF- β 等能诱导或刺激 MMPs 在转录水平的表达. IL-1 β 和 TNF- α 也能刺激 VSMC 分泌 MMPs. MMPs 通过降解 ECM, 导致血管中膜 VSMC 侵袭和迁移至内膜, 这与 AS 斑块形成病理过程密切相关. Hiroyasu 等^[14]研究发现, PDGF- α 通过酪氨酸磷酸化作用途径, 促使体外培养 VSMC 中的 MMP2 表达. 本实验中 apoE^{-/-}小鼠主动脉中 IL-1 β , TGF- β , PDGF- α , TNF- α 和 MMP2 以及肝脏中 CRP mRNA 水平随时序而表达升高, 并且 3 月龄 apoE^{-/-}小鼠主动脉内膜 AS 性病变较前加重. 说明 IL-1 β 和 TNF- α 基因表达升高促进了肝脏 CRP 基因的表达, 三者协同作用于机体的炎症反应, 加速 AS 的形成. IL-1 β 、TNF- α 和 CRP 又通过 NF- κ B 通路放大炎症反应, 进而影响到 MMP2 的表达. 而早期 IL-1 β 和 TGF- β 表达升高可刺激 MMP2 在转录水平上的表达增强, 同时, 2 月龄主动脉中 PDGF- α 的表达显著升高也可能导致 3 月龄主动脉中 MMP2 表达升高, 并且在 3 月龄时 TNF- α 的高表达也加速了 MMP2 的产生, 这多方面因素使得斑块周围 ECM 成分合成与降解失衡, 导致血管中

膜 VSMC 侵袭和迁移至内膜, 促进了 AS 的发展.

AS 是一种由多因素引起的, 多基因参与的复杂的病理过程. 本实验在 apoE^{-/-}小鼠 AS 早期过程中, 检测到 AS 相关基因 IL-1 β 、VCAM-1、I κ B、TGF- β 、PDGF- α 、CD36、TNF- α 、MMP2 和 CRP 在基因水平上时序表达上调, 而各年龄段 apoE^{-/-}小鼠主动脉和肝脏中 NF- κ B mRNA 表达均无显著变化. 联系血脂和病理形态变化, 使我们清楚地看到, 这些时序差异表达的基因各自在特定的时间发挥着不同的作用, 然而它们不是孤立的, 而是相互联系、相互调节, 构成了以 NF- κ B 为核心的错综复杂的精密调控网络, 共同完成 AS 发生发展的早期病理过程, 这对 AS 的预防和早期治疗提供了一定的理论基础.

参考文献

- 1 Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, 1999, **138**(11): S419~S420
- 2 Linda K C. ApoE in atherosclerosis: a protein with multiple hats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**(8): 1852~1853
- 3 Eiji M, Kazuhiro K, Masako T, *et al.* Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res*, 2006, **45**(6): 466~486
- 4 Stocker R, John F, Keaney J. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, 2004, **84**(10): 1381~1478
- 5 Navab M. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res*, 2004, **45**(6): 993~1007
- 6 Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein R. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, 2001, **108**(6): 785~791
- 7 Menno P J De W, Edwin K, Georg K, *et al.* Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**(5): 904~914
- 8 Yamazaki S, Muta T, Takeshige K. A novel I κ B protein, I κ B-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor- κ B in the nuclei. *J Biol Chem*, 2001, **276**(29): 27657~27662
- 9 Edward T H Y. CRP as a mediator of disease. *Circulation*, 2004, **109**(6): 11~14
- 10 Antoni P, Kerry W S Ko, Li L, *et al.* C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2004, **109**(2): 647~655
- 11 Lee A C, Tadayoshi N, Michael E R, *et al.* Tumor necrosis factor alpha plays a role in the acceleration of atherosclerosis by chlamydia pneumoniae in mice. *Infection and Immunity*, 2005, **73**(5): 3164~3165
- 12 Lena B, Lars H, Mihaela N, *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**(11): 2137~2142
- 13 Tang V, Dhirapong A, Yabes A P, *et al.* TNF- α -mediated apoptosis

in vascular smooth muscle cells requires p73. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, **289**(7): C199~C206
14 Hiroyasu U, Jong D L, Hiromasa S, *et al.* The role of

protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, 2000, **149**(8): 51~59

Sequential Expression of Atherosclerosis Related Genes in Young ApoE Gene Deficient Mice*

JING Wen¹⁾, YIN Miao¹⁾, DU Hui-Qin¹⁾, YE Hong-Yan¹⁾, ZHANG Sheng-Qing¹⁾,
SHANG Yun-Ju¹⁾, DAI Xue-Dong¹⁾, QU Zhi-Ping²⁾, ZHANG Liang¹⁾, PAN Jie^{1)**}

¹⁾The Key Laboratory of Animal Resistant Biology of Shandong, College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China;

²⁾Diagnostic Center of The Central Hospital of Jinan, Jinan 250013, China)

Abstract RT-PCR assays have been used to analyze expression patterns of atherosclerosis related genes in aorta from 1 to 3-month and liver from 14-day to 3-month old of atherosclerotic model, young apoE deficient (apoE^{-/-}) mice in normal chow diet. The level of plasma lipids was also analyzed. Combined with the pathomorphological characteristics of the aortic root, the sequential expression characteristics of atherosclerosis related genes in the early stage of the atherosclerosis were studied. ApoE^{-/-} mice compared with WT mice, the genes detected in the aorta, the expressions of VCAM-1, I κ B and TGF- β in 1-month old of the apoE^{-/-} mice were prominently up-regulated; while the expression of PDGF- α and CD36 were significantly up-regulated in 2-month old, the mRNA levels of TNF- α and MMP2 in 3-month old mice were prominently up-regulated, and IL-1 β was significantly up-regulated from 1 to 3-month old. The genes detected in the liver, the mRNA level of CRP was significantly up-regulated at 3-month old of the apoE^{-/-} mice. The mRNA level of NF- κ B had no significant change at different ages in the aorta and liver in the two types of mice. Serum TC, TG and LDL-C levels in different ages of apoE^{-/-} mice were significantly higher than those of WT mice. It appeared lipid deposition in the intima of aortic root in 2-month old apoE^{-/-} mice. With the increasing of age, the lesions became more serious. The results implied that the sequential and differential expression of genes related to atherosclerosis formed a complex regulatory network which NF- κ B is the core, and the genes may interact with each other and play important roles in the early stages of atherosclerosis of young apoE^{-/-} mice.

Key words atherosclerosis, RT-PCR, apoE gene, atherosclerosis related genes, aorta, liver

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundations of China (30571024) and Science and Technology Projects of Shandong Provincial Education Department (J06L11).

**Corresponding author. Tel: 86-531-86182572, E-mail: jiepan@sdsu.edu.cn

Received: July 4, 2007 Accepted: August 26, 2007