

抑制 Toll 样受体 4 对 apoE^{-/-}小鼠 动脉粥样硬化病变的影响*

顾洪丰^{1,2)} 周 浩¹⁾ 唐朝克¹⁾ 孙 慧¹⁾ 杨永宗^{1)**}

(¹南华大学心血管病研究所, 湖南省动脉粥样硬化重点实验室, 衡阳 421001; ²南华大学生理学教研室, 衡阳 421001)

摘要 通过 Toll 样受体 4(TLR4)抑制剂表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对 TLR4 途径的抑制, 研究 apoE^{-/-}小鼠 TLR4 及多种炎症因子的表达和动脉粥样硬化病变程度的改变, 以探讨 TLR4 途径在动脉粥样硬化病变发生中的作用. 5 周龄雄性 apoE^{-/-}小鼠 50 只, 随机分成 4 组: 基础饮食组对照组($n=12$)、高脂饮食组对照组($n=12$)、基础饮食+EGCG 组($n=13$)、高脂饮食+EGCG 组($n=13$). 给药 14 周后处死动物, 从主动脉根部连续冰冻切片, 油红 O 染色观察主动脉窦处动脉粥样硬化(As)斑块面积, 定量分析主动脉粥样硬化斑块大小及占管腔的面积百分比, 采用 Real time-PCR 检测主动脉 TLR4 mRNA 和 CD14mRNA 的表达, 蛋白质印迹检测 TLR4 和 CD14 蛋白表达, ELISA 检测小鼠血清中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度. 研究结果提示: EGCG 显著减轻 apoE^{-/-}主动脉窦部的动脉粥样硬化病变, 高脂对照组的主动脉窦 AS 斑块面积为(2.37 ± 0.08) mm², 高脂饲料+EGCG 组的主动脉窦 AS 斑块的面积为(1.05 ± 0.13) mm², EGCG 组小鼠主动脉窦粥样斑块面积比相应对照组明显减少($P<0.05$), 高脂饮食+EGCG 组小鼠 TLR4 蛋白表达显著降低($P<0.05$), MCP-1, TNF- α 的含量减少, 与高脂饮食对照组相比差异有显著性($P<0.05$). TLR4 信号转导途径在高脂所致的 AS 发生当中有着重要作用, 该信号途径的激活至少是 AS 发生其中的一个重要环节.

关键词 动脉粥样硬化, Toll 样受体 4, 单核细胞趋化蛋白-1, 肿瘤坏死因子- α

学科分类号 R363

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00118

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种在发病起始和整个过程中都伴有免疫反应的慢性炎症性疾病^[1]. Toll 样受体(TLRs)作为介导天然免疫与炎症反应的主要模式识别受体, 其识别内、外源性的配体后通过激活核因子- κ B 途径诱导炎症因子、细胞间黏附分子以及单核细胞趋化因子等的表达, 参与动脉粥样硬化的发生与发展^[2]. 大量流行病学、临床病理学和动物模型的研究均提示, TLR4 在 AS 的发生、发展中起着重大作用. 最先用于证实 TLRs 与动脉粥样硬化相关的动物是 C3H/HeJ 小鼠, 该鼠编码 TLR4 的基因外显子发生突变, 以致不能表达 TLR4, 高胆固醇喂养 8~14 周后, 与对照组相比, 该鼠 AS 病变显著减少^[3]. 此外, 在人和鼠 AS 斑块当中的内皮细胞、肥大细胞和巨噬细胞 TLR4 表达均显著增加. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是绿茶中的一种黄酮类物质, 现已证实, 其能抑制肿瘤细胞的增殖, 对心血管具有保护作用^[4]. 离体和在体实验证实, EGCG 能抑制

TLR4 激活后信号转导通路中的 MyD88 依赖和非依赖的两条途径中的关键激酶, 进而抑制 TLR4/NF- κ B 的激活, 降低炎症因子、黏附分子以及趋化因子的表达^[5]. 本研究拟通过 TLR4 抑制剂 EGCG 对 TLR4 途径的抑制, 来研究载脂蛋白 E 基因敲除(apoE^{-/-})小鼠 TLR4 及多种炎症因子的表达和动脉粥样硬化病变程度的改变, 从而探讨 TLR4 途径在动脉粥样硬化病变发生中的作用.

1 材料与方法

1.1 实验动物

apoE^{-/-}小鼠 50 只, 5 周龄, 体重 17~18 g, 购自北京大学实验动物部.

* 国家自然科学基金资助项目(30470720).

** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281288, E-mail: yzyanghy@163.com

收稿日期: 2009-04-16, 接受日期: 2009-07-06

1.2 主要试剂

EGCG(上海友思生物技术有限公司); E.Z.N.A Total RNA Kit 购自美国 Omega-biotek 公司; MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 MBI 公司; 所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; 兔抗小鼠 TLR4 抗体(ab47093, Abcam 公司); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)ELISA 试剂(Abcam 公司); 羊抗小鼠 CD14 多克隆抗体 M-20 购自 Santa Cruz Bio 公司; 油红 O 试剂购自 Sigma 公司.

1.3 主要仪器

倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司); ABI7500 荧光定量仪及分析软件(美国 ABI 公司); 图像分析系统(武汉华海公司, HIPAS-1000 型); 酶标仪(美国 BIO-TEK 公司); 凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司, GOS7500 型); 垂直电泳仪与转膜系统(美国 BioRad 公司).

1.4 实验动物分组及其处理

50 只 5 周龄雄性 apoE^{-/-} 小鼠, 随机分成对照组和 EGCG 组. 对照组: 基础饮食组($n = 12$), 高脂高胆固醇饮食组($n = 12$); EGCG 组: 基础饮食 + EGCG 组($n = 13$)、高脂高胆固醇饮食 + EGCG 组($n = 13$). 平衡 2 周后, EGCG 以 PBS 溶解, 浓度为 0.1%. EGCG 组按 10 mg/kg 腹腔注射给药, 隔日一次, 对照组则注射同样体积的 PBS, 给药 14 周后处死动物.

1.5 apoE^{-/-}小鼠血清胆固醇与三酰甘油检测

apoE^{-/-} 小鼠经眼眶采血后, 4℃ 静置 24 h, 常温下 1 500 r/min 离心 2 min, 小心吸取上层血清, -80℃ 保存. 按照相应的检测试剂盒说明书检测血清胆固醇与三酰甘油浓度.

1.6 apoE^{-/-}小鼠 AS 斑块面积的测定

3% 戊巴比妥钠麻醉 apoE^{-/-} 小鼠后, 摘除眼球取血, 随后以 4% 中性多聚甲醛自左心室灌注 1 h, 然后自腹主动脉分叉连同心脏一并剪下. 主动脉窦进行低温冰冻连续 8 μ m 切片, 油红 O 染色, 用 NIH 图象软件分析斑块面积.

1.7 Real-time PCR 检测 TLR4 和 CD14 的 mRNA 表达水平

将主动脉血管外的脂肪组织清除干净后, 每条血管以组织剪剪碎, 按 E.Z.N.A Total RNA Kit 说明书提取总 RNA. 以提取的总 RNA 为模板, 按照逆转录试剂盒(MBI 公司)说明书进行逆转录反应, 合成 cDNA 第一链, -20℃ 保存. 在 NCBI 数

据库中查询 β -actin、TLR4 和 CD14 cDNA 序列, 应用 Perkin-Elmer Applied Biosystems 提供的 PrimerExpress software 设计引物与探针(表 1), 交由上海生物工程有限公司合成. 以制备 cDNA 为模板, 利用表 1 的引物和探针, 分别扩增 β -actin、TLR4 和 CD14. 选取 cDNA 样品进行 10 倍梯度稀释, 分别进行 Real-time PCR 反应, 得出荧光曲线, 通过 cDNA 浓度梯度的对数值对 ΔCT 值作图比较两基因扩增效率. 反应条件: 95℃ 预变性 10 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火及延伸 40 s, 进行 40 个循环. 配好反应体系后, 将各个样品逐一加入 96 孔板中, 每个样品设置 3 个复孔. Real-time PCR 反应在 ABI7500(美国 AB 公司)的实时定量 PCR 系统上进行, 重复 3 次.

Table 1 Primer and probe sequence for Real-time PCR

Name	Sequence(5' ~ 3')	Length of PCR products/bp
TLR4-F	5' actgggtgagaaatgagctggtta 3'	96
TLR4-R	5' tggctacaccaggaataaagtctct 3'	
TLR4-PROBE	FAM-5' aattagaagaagaagtgcgcgt 3'-TAMRA	
CD14-F	5' ctgagttacaacaggctggatagg 3'	103
CD14-R	5' agtgggattcagagtcacaaaag 3'	
CD14- PROBE	FAM-5' ctgcccagatgagctgcccacaa 3'-TAMRA	
β -actin-F	5' ccgggacctgacagactacct 3'	97
β -actin-R	5' ctcttgatgtcacgcacgatt 3'	
β -actin-PROBE	FAM-5' aagatcctgaccgagcgtgcta 3'-TAMRA	

样品设置相同的阈值线, 应用 SPSS12.0 计算重复样品间 CT 均值及标准偏差, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法处理数据, 绘制出转录水平的直方图.

1.8 Western blot 检测 TLR4 和 CD14 蛋白的表达水平

主动脉经 PBS 洗涤 3 次, 剪碎, 加入组织裂解液中裂解后, 4℃, 12 000 g 离心 7 min, 小心吸出上清液, 用 BAC 法进行蛋白质定量. 每条泳道取 50 μ g 蛋白质加入等体积 5 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液, 煮沸使蛋白质变性. 60 V 积层胶, 120 V 分离胶, 电泳分离细胞蛋白, 60~100 mA 1 h 将蛋白质用半干转膜仪转移至 PVDF 膜上. 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 加入一抗, 4℃ 孵育 6~12 h. TBST 洗膜 3 次, 每次 5~10 min. 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 4℃ 孵育 4~8 h, TBST 洗膜 3

次, 每次 5~10 min. 然后用 Western blot 荧光检测试剂激发荧光, 显示于 X 光片, 显影、定影后进行图像分析.

1.9 ELISA 法检测 apoE^{-/-}小鼠血清中 TNF- α 和 MCP-1 的表达

取已制备好的血清, 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 即刻测量标本 A_{450} 值, 根据说明书绘制标准曲线, 并根据标准曲线查找其对应的浓度范围. 每组样品点 3 孔.

1.10 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用方差分析及 t 检验, 以 SPSS12.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结 果

2.1 EGCG 对 apoE^{-/-}小鼠血浆总胆固醇与三酰甘油的影响

14 周后, 高脂高胆固醇饮食对照组 apoE^{-/-}小鼠血清中的 TC、TG、LDL-C 显著升高, HDL-C/LDL-C 的比值显著降低. 结果表明(图 1), 高脂高胆固醇饮食+EGCG 组 apoE^{-/-}小鼠血清中的 TC、TG、LDL-C 的水平显著低于高脂对照组, 而 HDL-C/LDL-C 的比值高于高脂对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$). 这表明 EGCG 具有调节血脂平衡的作用: 降低 TC、TG、LDL-C 的水平, 升高 HDL 的水平, 这可能是 EGCG 具心血管保护作用的机制之一.

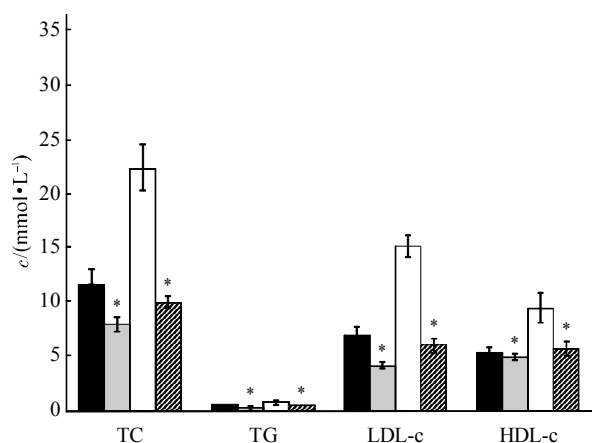


Fig. 1 Effects of EGCG on plasma lipid levels of apoE^{-/-} mice

Plasma lipid profiles in stressed and control mice were detected following 12 h period of food and water deprivation at the week 14 ($n=12$ per group). Data are $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ versus the high-fat diet control group. ■: Basic diet; □: EGCG+basic diet; ▒: High-fat diet; ▨: EGCG+high-fat diet.

2.2 EGCG 对 apoE^{-/-}小鼠主动脉窦 AS 病变的影响

主动脉窦 8 μ m 的连续冰冻切片以油红 O 染色, 观察 EGCG 对 apoE^{-/-} AS 病变的影响. 结果显示(图 2, 3), 经过 14 周的高脂高胆固醇饲料喂养后, 高脂对照组的主动脉窦动脉粥样硬化病变非常显著, 主动脉窦的 AS 斑块面积为 (2.37 ± 0.08) mm². EGCG 组: 基础饮食+EGCG 组, 高脂饮食+EGCG 组的主动脉窦 AS 的面积分别为 (0.46 ± 0.08) mm² 和 (1.05 ± 0.13) mm². 与高脂对照组相比, EGCG 组主动脉窦 AS 病变显著减轻, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$).

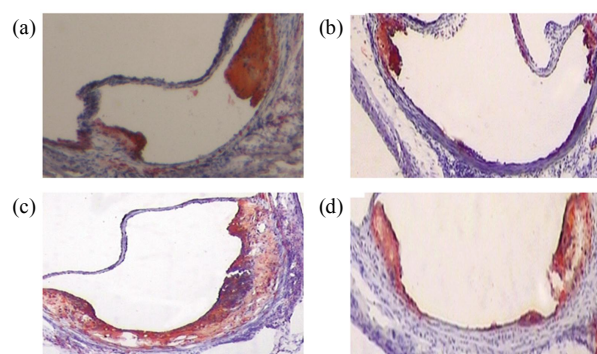


Fig. 2 Effects of EGCG on the development of atherosclerosis in aortic sinus of apoE^{-/-} mice

(a~d) Representative photographs of aortic sinuses of apoE^{-/-} mice from basic diet group, EGCG + basic diet group, high-fat diet group, high-fat diet + EGCG group, respectively. 8 μ m frozen sections of aortic sinuses were stained with oil red O. Original magnification: $\times 40$.

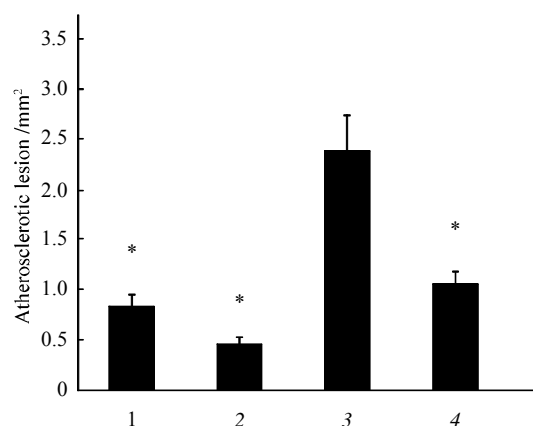


Fig. 3 EGCG markedly decreases the extent of atherosclerosis development in aortic sinus of apoE^{-/-} mice

Quantification of plaque areas in aortic sinuses in apoE^{-/-} mice stained for lipid deposition with oil red O. Each bar represents $\bar{x} \pm s$ ($n=10$ per group). * $P < 0.05$ versus the high-fat diet control group. 1: Basic diet group; 2: EGCG+ basic diet group; 3: High-fat diet group; 4: High-fat diet+ EGCG group.

2.3 EGCG 对 apoE^{-/-}小鼠主动脉 CD14 和 TLR4 mRNA 表达的影响

EGCG 组 apoE^{-/-}小鼠按 10mg/kg 腹腔注射 EGCG, 14 周后, Real time-PCR 方法检测主动脉 CD14 和 TLR4 mRNA 表达水平. 结果表明(图 4), 高脂对照组 apoE^{-/-}小鼠的主动脉 TLR4mRNA 的表达显著增强, 而 EGCG 组的 apoE^{-/-}小鼠主动脉 TLR4mRNA 的表达显著减少($P < 0.05$). 在高脂对照组中, CD14 mRNA 表达水平虽略高, 但与其他各组之间 CD14mRNA 表达水平相比较无统计学意义.

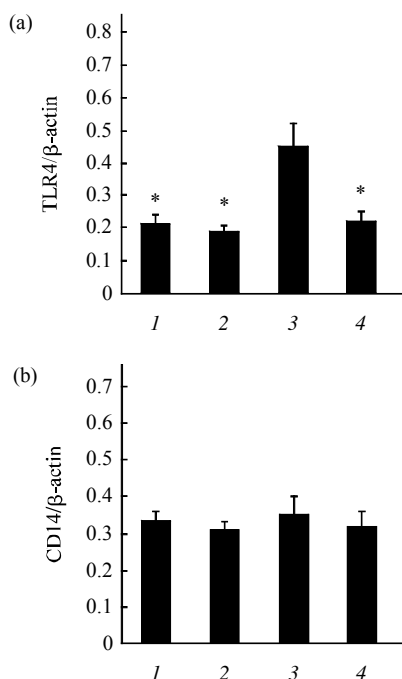


Fig. 4 Effects of EGCG on the expressions of TLR-4 and CD14 mRNA in aortas of apoE^{-/-} mice

(a) mRNA level of TLR4. (b) mRNA level of CD14. γ axis represents expression folds of target gene compared to β -actin. * $P < 0.05$ as compared to high-fat diet control group. 1: Basic diet group; 2: EGCG+ basic diet group; 3: High-fat diet group; 4: High-fat diet+ EGCG group.

2.4 Western blot 检测 EGCG 对 apoE^{-/-}小鼠 TLR4 和 CD14 蛋白表达的影响

14 周后, Western blot 方法检测 apoE^{-/-}小鼠主动脉 TLR4 和 CD14 蛋白表达水平. 结果表明(图 5), 高脂对照组 apoE^{-/-}小鼠的主动脉 TLR4 蛋白表达显著增强, 而 EGCG 组 apoE^{-/-}小鼠的主动脉 TLR4 蛋白的表达较高脂对照组低. 其主动脉 TLR4 蛋白的表达水平与高脂对照组相比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 在高脂对照组, CD14 蛋白表达与其

mRNA 水平一样虽轻微增加, 但与其他各组之间 CD14 蛋白表达水平相比较无统计学意义.

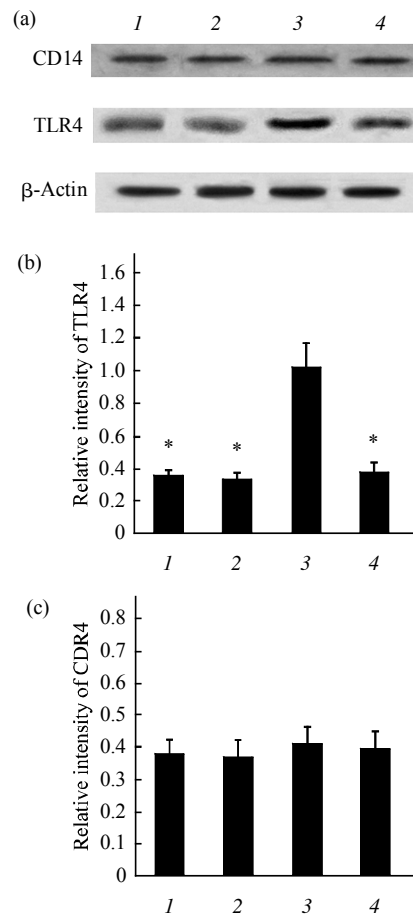


Fig. 5 Effects of EGCG on the expressions of TLR-4 and CD14 protein in aortas of apoE^{-/-} mice

(a) Western blot shows changes in expression levels of TLR4 (73 ku) and CD14 (54 ku) in aortas of apoE^{-/-} mice. (b), (c) Histogram shows the TLR4 and CD14 in aortas of apoE^{-/-} mice determined by densitometric analysis respectively. * $P < 0.05$ as compared to high-fat diet control group. 1: Basic diet group; 2: EGCG+ basic diet group; 3: High-fat diet group; 4: High-fat diet+ EGCG group.

2.5 ELISA 法检测 EGCG 对 apoE^{-/-}小鼠血清中 MCP-1, TNF- α 表达的影响

ELISA 法检测结果表明(图 6), 高脂对照组 apoE^{-/-}小鼠血清中的单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度显著高于 EGCG 组. 高脂对照组中 MCP-1 和 TNF- α 的浓度分别为 (827.33 ± 142.36) $\mu\text{g/L}$ 和 (10.84 ± 1.62) $\mu\text{g/L}$; 而高脂+ EGCG 组 MCP-1 和 TNF- α 的浓度分别为 (374.92 ± 76.11) $\mu\text{g/L}$ 和 (5.14 ± 0.85) $\mu\text{g/L}$. EGCG 组血清中的 MCP-1, TNF- α 水平显著低于高脂对照组($P < 0.05$).

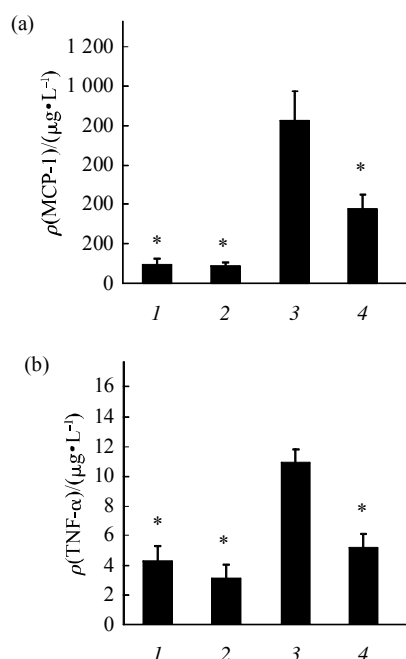


Fig. 6 Effects of EGCG on MCP-1 and TNF-α levels in the serum of apoE^{-/-} mice

MCP-1 (a) and TNF-α (b) levels in the serum of apoE^{-/-} mice were analyzed by ELISA. These cytokines were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions. Data are $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ versus the high-fat diet control group. 1: Basic diet group; 2: EGCG + basic diet group; 3: High-fat diet group; 4: High-fat diet + EGCG group.

3 讨 论

大量的研究资料表明: 血脂水平, 特别是胆固醇和三酰甘油水平与 AS 的发生密切相关。本研究证实, 与基础饲料组相比, 高脂、高胆固醇组 apoE^{-/-}小鼠主动脉的 AS 病变显著增加。高脂血症在 AS 发病中的作用机制除直接引起内皮细胞损伤、使内皮细胞的通透性增加外, 还与低密度脂蛋白(LDL)的氧化修饰成为氧化性低密度脂蛋白(oxLDL)密切相关。有研究表明, oxLDL 等 TLR4 内源性配体与 TLR4 结合后, 致使 TLR4 的表达增加以及 TLR4 信号转导途径激活^[6]。我们的研究发现, 高脂、高胆固醇组 apoE^{-/-}小鼠主动脉 TLR4 的表达显著增加、且这种增加可能与其血浆中 oxLDL 等修饰脂蛋白增加有关。我们先前的研究表明, oxLDL 能上调 THP-1 细胞 TLR4 表达。高脂、高胆固醇动脉粥样硬化 apoE^{-/-}小鼠主动脉 TLR4 表达增加与 AS 加重二者之间究竟是因果还是伴随关系, 目前尚不清楚, 为了阐明 TLR4 在高

脂加速 AS 发生当中的作用, 我们用 TLR4 途径的抑制剂 EGCG 来探讨其在 AS 发生中的作用。

AS 是一种免疫炎症性疾病, 免疫应答在 AS 的发生、发展中起着重要作用。大量流行病学、临床病理学和动物模型研究均提示, TLR4 在 AS 的发生、发展中起着重大作用^[7,8]。Toll 样受体是天然免疫的重要识别成分, 可以识别种类繁多的病原体相关模式分子(PAMPs), 其配体几乎涵盖了人类所能遇到的所有病原体及其产物。研究表明, TLR4 不仅在单核细胞和巨噬细胞上表达, 且在内皮细胞、多形核细胞、淋巴细胞、T 细胞、中性粒细胞、肥大细胞、树突状细胞以及心肌细胞上表达。我们的研究表明, AS 斑块中的巨噬细胞 TLR4 表达显著增加。有研究表明, TLR4 是炎症/免疫、脂质代谢与 AS 形成之间的桥梁^[9]。

Edfeldt 等^[10]在 AS 的斑块中发现 TLR4 的表达显著提高, 并证实正是通过 TLR4 的识别功能导致一系列与 AS 有关的细胞因子的合成与释放。TLR4 激活所生成的炎症因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 等能刺激血管平滑肌细胞的迁移及增殖。有研究报道通过敲除 MyD88 基因, 阻断 TLRs 信号以后, 高脂饲养 apoE^{-/-}小鼠的主动脉粥样硬化病变显著减少^[11]。同样, TLR4 的缺失也促 apoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化病变明显减少^[12]。此外, 流行病学研究发现, Asp299GlyTLR4 基因多态性的志愿者颈总动脉发生斑块的危险性很低, 并且这不依赖于其他传统的心血管疾病危险因素^[13]。

本实验结果表明, 阻断 TLR4 信号途径则能显著抑制高脂喂养 apoE^{-/-}小鼠主动脉粥样硬化斑块的形成。与对照组相比较, EGCG 组主动脉的 TLR4 mRNA、TLR4 蛋白表达显著减少($P < 0.01$), 且 AS 斑块面积显著减小($P < 0.05$)。这提示, TLR4 信号转导途径可能在高脂所致的 AS 发生当中起着重要作用。EGCG 虽也能减少基础饮食 apoE^{-/-}小鼠主动脉 AS 病变, 但对其 TLR4/NF-κB 信号转导途径无影响。推测在基础饮食组, EGCG 抑制 AS 的机制主要在于调脂和抗氧化作用。此外, EGCG 组的 LDL、TC、TG 显著低于相应对照组, 我们的研究结果与 Kuang-Yuh 等^[14]的相一致, 该作者从抗氧化、抑制细胞增殖的角度研究 EGCG 抗 AS 的作用机制, 认为 EGCG 通过降脂、抗氧化、抑制细胞增殖的作用能显著抑制 apoE^{-/-}小鼠球囊损伤颈总动脉 AS 的形成。

CD14 是革兰阴性菌内毒素脂多糖(LPS)高亲和

受体, 属细胞表面糖蛋白家族成员之一, 是一种特异性的单核细胞和巨噬细胞细胞表面标记物, 在各组织的单核细胞和巨噬细胞表达^[15], 并受 LPS 正向调节. 本研究表明, EGCG 不影响 apoE^{-/-}小鼠主动脉 CD14mRNA、蛋白质的表达, 这提示 EGCG 下调 TLR4 的表达并不因 apoE^{-/-}小鼠主动脉单核 / 巨噬细胞的减少所致. 已有研究表明^[16], oxLDL 等能显著上调巨噬细胞 TLR4 的表达, 增加巨噬细胞炎症因子的分泌. 我们认为, EGCG 降低主动脉 TLR4 的表达可能与调脂、抗氧化, 减少脂质的氧化修饰, 减少体内 oxLDL 等修饰脂蛋白, 进而直接下调巨噬细胞、内皮细胞等细胞的 TLR4 表达有关.

本实验结果发现, 抑制 TLR4 后, 其下游信号转导途径中的 NF- κ B(p65)表达显著减少, 且该信号通路激活后 MCP-1 和 TNF- α 的表达也显著降低. 这提示 EGCG 能抑制 TLR4/NF- κ B 途径的激活. 单核巨噬细胞和细胞因子, 特别是 MCP-1 在动脉粥样硬化发展中的作用, 近些年来引起了很多研究者的兴趣. 临床上发现, 冠状动脉粥样硬化的患者其 MCP-1 水平明显升高, 我们此前的研究证实, 用 EGCG 抑制 TLR4 信号途径后, THP-1 单核细胞的这种迁移作用明显减弱. Th1 细胞、巨噬细胞、NK 细胞产生的 TNF- α 具有致炎性和细胞毒作用, TNF- α 基因打靶能减少 AS 的发生. 本研究的结果显示, TLR4 抑制剂 EGCG 能显著降低 apoE^{-/-}小鼠血清中的 MCP-1 和 TNF- α 的表达, 这表明抑制 apoE^{-/-}小鼠 AS 的发生可能与 TLR4/NF- κ B 通路被抑制后所生成的 MCP-1 和 TNF- α 的减少有关. 由于 EGCG 能抑制 TLR4 激活后信号转导通路中的 MyD88 依赖和非依赖的两条途径中的关键激酶, 而包括 TLR4 在内的多数 TLRs 具有相似的信号通路, 因此, EGCG 减少血清中的 MCP-1、TNF- α 的表达还可能与抑制其他 TLRs 通路有关. EGCG 降低这些炎症因子和趋化因子的表达是否唯一通过抑制 TLR4 信号转导途径的激活, 这需要进一步实验证实.

综上所述, TLR4 信号转导途径在高脂所致的 AS 发生当中有着重要作用, 该信号途径的激活至少是 AS 发生其中的一个重要环节. 通过对 TLR4 及其信号转导途径在 AS 发生、发展中所起作用的认识, 有助于人们找到治疗 AS 性疾病新的治疗策略.

参 考 文 献

- 1 Kaperonis E A, Liapis C D, Kakisis J D, *et al.* Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2006, **31**(4): 386~393
- 2 Adam E, Mullick Peter S, Tobias Linda K, *et al.* Toll-like receptors and atherosclerosis. *Immun Res*, 2006, **34**(3): 193~209
- 3 Shi W, Wang N J, Shih D M, *et al.* Determinants of atherosclerosis susceptibility in the C3H and C57BL/6 mouse model: evidence for involvement of endothelial cells but not blood cells or cholesterol metabolism. *Circ Res*, 2000, **86**(10): 1078~1084
- 4 丁晶真, 张蔚. 绿茶成分心血管保护机制研究进展. *药物流行病学杂志*, 2006, **15**(6): 341~343
Ding J Z, Zhang W. *Chin J Pharmacol Epidemiol*, 2006, **15**(6): 341~343
- 5 Youn H S, Lee J Y, Saitoh S I, *et al.* Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharm*, 2006, **72**(7): 850~859
- 6 Pasterkamp G, Van Keulen J K, De Kleijn D P. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *Eur J Clin Invest*, 2004, **34**(5): 297~299
- 7 Vink A, Schoneveld A H, van der Meer J J, *et al.* *In vivo* evidence for a role of Toll-Like Receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation*, 2002, **106**(15): 1985~1990
- 8 Schoneveld A H, Hoefer I, Sluijter J P, *et al.* Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis*, 2008, **197**(1): 95~104
- 9 Xu X H, Shah P K, Faure E, *et al.* Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*, 2001, **104**(25): 3103~3108
- 10 Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson G K, *et al.* Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*, 2002, **105**(10): 1158~1161
- 11 Harry Bjorkbacka, Vidya V Kunjathoor, Kathryn J Moore, *et al.* Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med*, 2004, **10**(4): 416~421
- 12 Kathrin S Michelsen, Michelle H Wong, Prediman K Shah, *et al.* Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(29): 10679~10684
- 13 Lindstedt K A, Kovanen P T. Mast cells in vulnerable coronary plaques: potential mechanisms linking mast cell activation to plaque erosion and rupture. *Cur Opin Lipidology*, 2004, **15**(5): 567~573
- 14 Kuang-Yuh Chyu, Stephanie M, Babbidge, *et al.* Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation*, 2004, **109**(20): 2448~2453
- 15 江海燕. CD14 与 TLR2、TLR4 在天然免疫中的相互作用. 国外

医学免疫学分册, 2004, 27(2): 112~116

Jiang H Y. Foreign Medical Sciences. Section of Immunology, 2004, 27(2): 112~116

16 YMiller Y I, Viriyakosol S, Worrall D S, *et al.* Toll-like receptor

4-dependent and - independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(6): 1213~1219

Effect of Inhibition of Toll-like Receptor 4 on The Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout (apoE^{-/-}) Mice*

GU Hong-Feng^{1,2)}, ZHOU Hao¹⁾, TANG Chao-Ke¹⁾, SUN Hui¹⁾, YANG Yong-Zong¹⁾**

⁽¹⁾ Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China;

⁽²⁾ Department of Physiology, Hengyang 421001, China)

Abstract It is known that (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is the inhibitor of TLR4 signaling pathway activation. To investigate a possible role of TLR4 signaling pathway in the development of atherosclerosis, the effects of EGCG on the development of atherosclerosis, the expression of TLR4 and inflammatory cytokine production in apoE^{-/-} mice was investigated. Fifty male apoE^{-/-} mice (5wk old) were divided into four groups: basic diet group (control group), high-fat diet group (control group), EGCG + basic diet group (EGCG group), and high-fat diet + EGCG group (EGCG group). EGCG (10 mg/kg) was injected intraperitoneally every day. Areas of aortic plaque areas were measured by oil red O staining. Western blot was used to detect the expression of TLR4 and CD14 in mouse aorta. The expression of TLR4 mRNA and CD14 mRNA were detected by Real-time PCR. Serum concentrations of MCP-1 and TNF- α were determined with ELISA. Compared with high-fat diet group, EGCG groups showed marked decreases in aortic atherosclerosis ($P < 0.05$), concomitantly with significant decreases in levels of the expression of TLR4, TNF- α and MCP-1. The mean lesion area was (2.37 ± 0.08) mm² in the high-fat diet + EGCG group, whereas the atherosclerotic lesion was only (1.05 ± 0.13) mm² in the high-fat diet + EGCG group. The TLR4 expression was obviously higher in high-fat diet group than that in other groups ($P < 0.05$). Compared with high-diet group, the serum concentrations of MCP-1 and TNF- α were significantly decreased in EGCG groups ($P < 0.05$). These results suggest that TLR4 signaling pathway may play an important role in the development of atherosclerosis in apoE^{-/-} mice induced by high-fat diet.

Key words atherosclerosis, Toll-like receptor 4, MCP-1, TNF- α

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00118

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30470720).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281288, E-mail: yzyanghy@163.com

Received: April 16, 2009 Accepted: July 6, 2009