

## 动物动脉粥样硬化的发展中脂质代谢和全身炎症的作用的比较评估

# ROLE OF LIPID METABOLISM AND SYSTEMIC INFLAMMATION IN THE DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROSIS IN ANIMAL MODELS

---

全身性炎症对动脉粥样硬化的发病机理有重要贡献，并且是众多研究的主题。旨在分析动脉粥样硬化发展机制的作品，通常包括动物实验。描述、论证和选择适当的模型是每项此类研究的首要任务。

**目的：**慢性阻塞性肺疾病（COPD）动脉粥样硬化动物模型脂质代谢和全身炎症特征的评价。

**材料和方法。**对小鼠、大鼠和家兔的脂质代谢和免疫应答的物种特异性特征进行了交叉连接分析，并对Toll样受体4（TLR4）与人类的差异进行了生物信息学分析。在国家生物技术信息中心（NCBI）和通用蛋白质资源（UniProt）的GenBank国际数据库中，对人、小鼠、大鼠和兔TLR4受体的氨基酸序列进行了搜索和分析。多受体氨基酸序列比对在Clustal Omega软件1.2.4版中执行。分子系统发育树的重建与可视化使用MEGA7程序根据最近邻居的方法（英语：Neighbor-Joining）和最大经济性的方法（英语：Maximum Parsimony）。

**结果。**研究表明，人类、小鼠和家兔在脂代谢特征上存在种属特异性差异，在分析研究结果时应予以考虑。

**结论。**由固有免疫系统介导的脂质代谢异常和全身性炎症与COPD的动脉粥样硬化的发病机制有关，在分析研究结果时必须考虑到特定物种的特征。

**关键词：**动脉粥样硬化；动脉粥样硬化 全身性炎症；慢性阻塞性肺病（COPD）；脂蛋白 先天免疫系统。

---

Systemic inflammation makes a significant contribution to the pathogenesis of atherosclerosis and has been the subject of numerous studies. Works aiming to analyze the mechanisms of atherosclerosis development often include experiments on animals. A primary task of such research is the characterization, justification, and selection of an adequate model.

**Aim.** To evaluate the peculiarities of lipid metabolism and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the development of atherosclerosis in animal models.

**Materials and Methods.** Analyses of cross-links between species-specific peculiarities of lipid metabolism and the immune response, as well as a bioinformatic analysis of differences in Toll-like receptor 4 (TLR4) in mice, rats, and rabbits in comparison with its human homolog, were carried out. A search for and analysis of the amino acid sequences of human, mouse, rat, and rabbit TLR4 was performed in the International database GenBank of National Center of Biotechnical Information and in The Universal Protein Resource (UniProt) database. Multiple alignments of the TLR4 amino acid sequences were implemented in the Clustal Omega program, version 1.2.4. Reconstruction and visualization of molecular phylogenetic trees were performed using the MEGA7 program according to the Neighbor-Joining and Maximum Parsimony methods.

**Results.** Species-specific differences of the peculiarities of lipid metabolism and the innate immune response in humans, mice, and rabbits were shown that must be taken into account in analyses of study results.

**Conclusion.** Disorders in lipid metabolism and systemic inflammation mediated by the innate immune system participating in the pathogenesis of atherosclerosis in COPD possess species-specific differences that should be taken into account in analyses of study results.

**Keywords:** atherosclerosis; systemic inflammation; COPD; lipoproteins; innate immune system.

---

动脉粥样硬化（AS）是现代人类面临的一个全球性问题，伴随着生命周期和质量的缩短，经济和社会负担的加重[1]。到目前为止，对AS发展机制的研究仍然是紧迫的任务。研究AS的艰难历史中已经形成了几种范式。这些范式决定了有关这种病理过程的现代观念。

血脂代谢紊乱在发展中起着关键作用。主要是通过主要的临床努力加以纠正。此外，大量研究结果表明，免疫状态紊乱在AS发病机制中具有重要作用。巨噬细胞是先天免疫系统的一部分，对疾病的发展和进程做出了重要贡献，而“泡沫”巨噬细胞在动脉内膜中的积累是必不可少的环节。

，引发此过程的原因是众多讨论的主题包括合并症的作用，例如，慢性阻塞性肺疾病（COPD）致力于分析COPD中的全身性炎症及其与AS的发病机理有关。

研究全身炎症和先天免疫系统在AS发病机制中的作用需要选择合适的模型。

近年来，对脂质代谢紊乱与免疫系统的固有联系在AS的发生和发展中的关系的认识得到了改善，目前免疫系统在AS的发病机理中起着主导作用。在COPD和AS的共存过程中也起着连接的作用。

先天免疫系统可用于检测对大量病原体具有特异性的标准分子结构（模式），包括病毒，细菌，真菌，寄生虫和原生动物），依靠大量的模式识别受体家族中（英语：*pattern-recognition receptors, PRR*），其中包括巨噬细胞的Toll样受体*Toll-like receptor, TLR*）。它们是I型跨膜受体家族。并在AS和COPD炎症的发生中起重要作用。根据TLR4的现代概念，一大批Toll样受体的代表负责识别革兰氏阴性细菌

（特别是其细胞壁的脂多糖（LPS）），并且是赋予先天免疫系统特异性的机制。TLR4能被烟草烟雾和饱和脂肪酸的成分刺激，强调了它们在疾病发病机制中的重要作用。

考虑到先天免疫系统在AS和COPD发病机制中的重要作用，人们不能不注意到由于人类和模型动物面临的各种病原体而形成的物种特异性差异。

### 目的

慢性阻塞性肺疾病（COPD）动脉粥样硬化动物模型脂质代谢和全身炎症特征的评价。

### 材料与与方法。

为了实现这一目标，我们对脂类代谢和免疫反应的物种特异性特征进行了交叉连接分析，并对小鼠、大鼠和兔子与人类的天然免疫受体TLR4的差异进行了生物信息学分析。在国家生物技术信息中心（NCBI）和通用蛋白质资源（UniProt）的GenBank国际数据库中，对人、小鼠、大鼠和兔TLR4受体的氨基酸序列进行了搜索和分析。

多受体氨基酸序列比对在Clustal Omega软件1.2.4版中执行。Clustal Omega是一系列广泛使用的计算机程序，用于生物信息学中的多个序列比对。Clustal Omega是该程序的最新版本之一，并允许您比对许多序列，同时具有足够的效率。

分子系统发育树的重建与可视化使用MEGA7程序根据最近邻居的方法（英语：Neighbor-Joining, NJ）和最大经济性的方法（英语：Maximum Parsimony, MP）。MEGA7是一种分子进化遗传分析软件，其中包含许多复杂的方法和工具，用于系统发育组学和系统医学研究。

通过执行1000次重复的bootstrap分析，为树中的每个节点提供了统计支持。为了计算进化距离，使用了泊松校正方法。

### 研究结果与讨论

计算结果表明，该兔具有与人类最相似的TLR4氨基酸序列（图1）。获得的数据表明人类TLR4受体的氨基酸与大鼠，小鼠和兔子受体的身份分别约有67%，68%和73%。这可能是免疫应答的物种特异性特征的基础。这些发现得到了以下数据的支持：人类和小鼠对TLR4激活的反应有一些相似之处，但也有深刻的差异[2, 3]。小鼠和人TLR4序列之间的氨基酸相似性在细胞外结构域中为62%，在跨膜结构域中为70%，在细胞质结构域中为83%，而小鼠和人MD-2蛋白质具有大约57%的氨基酸相似性[3-6]。TLR4的细胞外结构域中，大鼠和人类的总氨基酸相似度为61%[3, 6]。TLR4和MD-2之间的指定差异可能是对配体的物种特异性识别的基础。

小鼠和大鼠相比兔TLR4与人类更相似，显示出约70%的氨基酸相似性，而远端区域在TLR4的胞外域中表现出最大的整体相似性（77%，图1）[4, 5, 7]。由于兔中人胞外域的氨基酸相似性特征比小鼠中更大，因此兔TLR4可以比小鼠TLR4更好地识别人病原体[3, 6]。兔子与人TLR4之间的这种以及更大的普遍相似性表明，由于TLR4的系统进化相似性更高，因此在兔中对

人类对某些病原体的免疫反应可能比在小鼠中更好地建模。通过重建TLR4的进化历史可以证实所描述的假设（图2）。

因此，TLR4的胞质结构域比胞外结构域保守得多，这可能是由于其功能是将信号转导至具有保守结构的分子，

而胞外域则适应人类和啮齿动物不同生态位决定的结构的接收[6]。人类和兔子对低脂多糖浓度表现出强烈的反应，而大多数啮齿动物的抵抗力相对更高[5]。由于已知烟草烟雾的成分能够激活TLR4受体及其下游信号通路，因此应考虑这些差异。

2009年J. Vasl, et al. 报道了识别LPS的CD14 / TLR4 / MD2受体复合物的人和鼠MD-2组分之间的其他功能差异。差异包括人类（而非鼠科动物），但是MD-2的分泌能力在有或没有TLR4的情况下，可作为细胞外内毒素结合蛋白发挥作用[3, 8]。

K. Schroder, et al. 描述了LPS刺激后人类和小鼠巨噬细胞基因调控的差异[2, 3]。尽管在人类巨噬细胞中比在小鼠巨噬细胞中更容易诱导TLR4靶基因。暴露于LPS后，TLR4途径的几个负反馈调节因子在小鼠巨噬细胞中被诱导得更快，程度更大。负反馈的这种上调可以进一步降低小鼠巨噬细胞对LPS的主要反应，从而与人类相比，降低了小鼠对内毒素的敏感性。这种现象称为LPS耐受性，主要与TLR4表面表达的丧失有关。用LPS预处理小鼠巨噬细胞可根据时间和剂量抑制炎症细胞因子的产生，并显著降低NF-

$\kappa$  B的活性[3]。LPS增加人巨噬细胞和单核细胞中TLR4的表达，而在腹腔巨噬细胞和小鼠中性粒细胞中，相反，暴露于LPS后TLR4的表达减少，而在小鼠单核细胞中保持不变[3]。

众所周知，AS研究中使用的现有典型动物模型。除了所描述的差异外，还有许多缺点与人类和彼此的脂质代谢的显著差异以及与先天免疫系统的联系有关。例如，由于脂蛋白代谢的物种特异性特征，小鼠对AS具有很强的抵抗力。因此人类中，载脂蛋白B（ApoB）最常见的亚型是ApoB-

100，它仅在肝脏中合成，并且是极低密度脂蛋白（VLDL），中密度脂蛋白（IDL）和低密度脂蛋白（LDL）。异构体ApoB-

48在肠道中合成，并在乳糜微粒中发现，可将脂质从肠道转移到肌肉，脂肪和其他组织。

但是，某些啮齿动物，例如大鼠和小鼠，也可以在肝脏中合成ApoB-

48，因此，与人类中的ApoB-

100不同，在小鼠中，肝脏中产生的所有LDL中的大多数（约70%）可以耐受ApoB-48。ApoB-48，肠道乳糜微粒的主要成分。与ApoB-

100蛋白相比血浆中的交换加快了。这导致肝脏更快清除含有致动脉粥样硬化的ApoB的脂蛋白。

脂质代谢的另一个不同之处在于，在啮齿动物（小鼠和大鼠）中，与人类以及灵长类，兔子和仓鼠不同，血浆中缺乏CETP蛋白（英语：*cholesterol ester transfer protein*），后者可以将HDL中的胆固醇酯转移为含ApoB的LDL和VLDL

[9, 10]。因此，野生型小鼠自然具有低的LDL和高的HDL水平，其中高达90%的胆固醇被转移，并且对AS的发育敏感性较低[11, 12]。表达人CETP的转基因小鼠的胆固醇逆向转运增加，这可能是由于肝脏中ApoB脂蛋白的LDL受体依赖性清除率增加所致。他们还显示餐后甘油三酯血症增加，肝脏对LPS的摄取增加以及内毒素血症的生存期增加[13]。

参与脂质稳态并不是CETP的唯一功能。近年来的研究结果提高了我们对CETP与炎症反应之间联系的认识。实验数据强烈表明，巨噬细胞和肝脏中的CETP可阻止LPS与TLR4的相互作用，从而减少炎症反应[14]。它还通过去除LPS在降低细菌内毒素的炎症反应中发挥了有益的作用。CETP的抗炎作用是由它所属的蛋白质家族介导的，包括脂多糖结合蛋白（英语：*lipopolysaccharide binding protein*, LBP）和杀菌通透性增加蛋白（BPI）[14-17]。CETP与LBP具有结构同源性，LBP通过与LPS结合参与先天性免疫反应，引起TLR4受体介导的炎症反应，并最终导致转录因子NF-

$\kappa$  B的激活[17, 18]。由于CETP，LPS与循环HDL、LDL和VLDL结合，这使得无法刺激先天免疫系统[12, 19-

21]。尽管CETP与LBP或BPI相比，结合LPS的能力较弱，但它与败血症的抵抗力有关[12, 22]。与野生型小鼠相比，LPS注射后人类CETP转基因小鼠的死亡率较低[12, 14]。

有一些证据表明，尽管确切的机制仍不确定，但LPS主要是通过肝脏从血液中排出的。淘汰LPS的机制包括CETP的参与，这有助于将LPS从HDL传输到LDL [12]，和LDL受体介导的肝脏对LPS相关脂蛋白的吸收[12, 17, 23]。SR-B1受体对肝细胞对HDL的摄取也与LPS的清除有关[12]。枯否细胞吸收大部分游离LPS，并通过用酰氨基酰基水解酶进行脱酰作用而使LPS失活[17, 24]。

仓鼠和人CETP转基因小鼠对LPS的反应，CETP均降低[12]。这与一项小型人体研究的结果一致，该研究报道了住院的脓毒症患者死亡率增加与CETP降低幅度相关[12, 14]。CETP缺乏症是一种遗传病，可导致极高的HDL胆固醇水平。但是，这不会导致预期寿命的增加。CETP抑制剂Dalcetrapib可提高HDL水平，但不能降低近期急性冠脉综合征患者心血管事件复发的风险[25]，而Torcetrapib可增加感染和肿瘤发病率[17, 26]。

此外，啮齿动物还具有脂蛋白代谢的其他特征：高水平的循环脂肪酶和特定的磷脂载体蛋白（英语：*specific phospholipid transfer protein, PLTP*），这也解释了它们对AS的抗性。PLTP基因敲除小鼠中，内毒素相关的死亡率增加，脂蛋白对LPS的吸收延迟，LPS清除率降低[12, 27]。

因此，野生型小鼠和大鼠是具有高HDL水平的哺乳动物，而人和兔子是具有高LDL水平的哺乳动物。兔和人在脂蛋白代谢方面也存在一定的差异。

众所周知，兔子的血浆CETP活性大约是人类的两倍[11, 12]，并且对饮食诱导的CETP非常敏感[12, 28]，CETP的抑制降低了其风险[12, 29]。考虑到CETP参与先天性免疫应答，我们有理由认为LPS对家兔的刺激作用与人类不同。兔血浆中不含人类中HDL的重要蛋白质成分ApoA-II [30, 31]，尽管兔基因组中存在类似的基因ApoA-II，但目前尚不清楚它究竟是功能性基因还是假基因[31]。

ApoA-II是人类HDL中第二丰富的蛋白质成分，也广泛存在于啮齿动物中，但在兔子中不存在或以低水平表达[32-34]。人类，小鼠和大鼠中，ApoA-II主要由肝脏合成，在较小程度上由肠道合成[34, 35]。但是，鼠和人ApoA-II的氨基酸序列相差约40%，当在转基因小鼠中表达时，它们对脂蛋白代谢具有相反的作用[34]。一些研究表明，ApoA-II的增加可能是通过降低胆固醇的逆向转运和降低对LDL的氧化修饰的保护而引起的致动脉粥样硬化[34, 36]。然而，在兔中表达人ApoA-II的实验显示出明显的抗动脉粥样硬化作用，其可能的机制可以通过ApoA-II的抗炎活性来解释[37]。些数据与鼠ApoA-II HDL潜在促炎的已知证据相矛盾。这些差异可能是由于鼠和人ApoA-II的结构差异所致[37]。ApoA-II在动脉粥样硬化中的作用可能证明HDL刺激培养的内皮细胞中的内皮型一氧化氮合酶（英语：*endothelial nitric oxide synthase, eNOS*）的事实。此外，仅针对ApoA-I的抗体，而不针对ApoA-II的抗体抑制HDL诱导的eNOS激活。这方面，可以假设，与ApoA-I不同，ApoA-II不参与eNOS的激活[34]。

兔肝脂肪酶的活性比大鼠脂肪酶的活性低约10倍[31, 38]。假定这些差异是兔子对胆固醇饮食快速发展AS的高度敏感性的原因。

除了上述差异外，在人类血浆中还有一种与低密度脂蛋白类似的特殊脂蛋白，称为脂蛋白(a) (Lp(a))。它是通过载脂蛋白b-100和载脂蛋白(a)之间的二硫键形成的。尽管Lp(a)通常不存在于兔子和小鼠的血浆中，但转基因小鼠的研究表明，兔子ApoB-100，而不是小鼠ApoB-100[31, 39]可以与人类Apo(a)结合形成Lp(a)，从而促进AS的发展[31, 40]。

此外，参与泡沫细胞形成的VLDL受体在兔和人的巨噬细胞中高度表达，但在小鼠中不表达[31, 41]。





**注意：**该树是按比例绘制的，其分支长度与用于定义系统发育树的进化距离的单位相同。使用泊松校正方法计算进化距离，并以每个位点的氨基酸取代数表示。分析涉及4个氨基酸序列。排除所有包含空格和缺少数据的条目。MEGA7中进行了进化分析

图 2人，小鼠，大鼠，兔子的TLR4的系统发育树（含蛋白质的TIR结构域）。使用Neighbor-Joining方法完成