

研究论文

花生四烯酸Alox15/12-HETE代谢通路抑制血管钙化的发生

韩迎春, 张继超, 张聪聪, 杜杰*

首都医科大学附属北京安贞医院血管生物研究室, 北京市心肺血管疾病研究所, 北京 100029

摘要: 本研究旨在探索血管钙化中花生四烯酸脂氧酶代谢产物的变化及作用。采用5/6肾切除及高磷饲喂的方法建立小鼠血管钙化的模型。在造模6周后, 检测主动脉全长血管钙含量, 主动脉弓部进行茜素红染色和Von Kossa染色检测钙沉积情况。收集对照血管和钙化血管组织进行花生四烯酸代谢产物的质谱检测, 分析脂氧酶通路代谢小分子的变化。通过实时定量PCR方法检测钙化血管脂氧酶的表达改变。使用脂氧酶抑制剂明确脂氧酶代谢通路对血管钙化的影响。结果显示, 造模6周后, 肾切除组小鼠血管钙含量比假手术组显著升高($P < 0.05$), 茜素红染色和Von Kossa染色显示肾切除小鼠主动脉弓部有明显的钙沉积, 表明小鼠血管钙化造模成功。收取造模6周的钙化血管和对照血管, 通过液相色谱-质谱(LC-MS)方法检测到9种花生四烯酸脂氧酶代谢产物, 多种代谢产物(12-HETE、11-HETE、15-HETE等)的含量在钙化血管中显著升高, 其中12-HETE含量最高并且升高最显著。进一步检测钙化血管中产生12-HETE的代谢酶的mRNA水平, 发现花生四烯酸脂氧酶15(arachidonate 15-lipoxygenase, Alox15)表达增加。Alox15特异性抑制剂PD146176可显著降低血浆12-HETE水平, 促进主动脉弓部的钙沉积、增加血管钙含量。这些结果显示花生四烯酸脂氧酶代谢在钙化血管中活化, Alox15/12-HETE通路可能对血管钙化发挥保护作用。

关键词: 血管钙化; 花生四烯酸; 脂氧酶-15; 12-HETE

中图分类号: R339.4

Arachidonic acid Alox15/12-HETE signaling inhibits vascular calcification

HAN Ying-Chun, ZHANG Ji-Chao, ZHANG Cong-Cong, DU Jie*

Vascular Biology Department of Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing Institute of Heart, Lung and Vascular Diseases, Beijing 100029, China

Abstract: This study aims to explore the effects of arachidonic acid lipoxygenase metabolism in vascular calcification. We used 5/6 nephrectomy and high-phosphorus feeding to establish a model of vascular calcification in mice. Six weeks after nephrectomy surgery, vascular calcium content was measured, and Alizarin Red S and Von Kossa staining were applied to detect calcium deposition in aortic arch. Control aortas and calcified aortas were collected for mass spectrometry detection of arachidonic acid metabolites, and active molecules in lipoxygenase pathway were analyzed. Real-time quantitative PCR was used to detect changes in the expression of lipoxygenase in calcified aortas. Lipoxygenase inhibitor was used to clarify the effect of lipoxygenase metabolic pathways on vascular calcification. The results showed that 6 weeks after nephrectomy surgery, the aortic calcium content of the surgery group was significantly higher than that of the sham group ($P < 0.05$). Alizarin Red S staining and Von Kossa staining showed obvious calcium deposition in aortic arch from surgery group, indicating formation of vascular calcification. Nine arachidonic acid lipoxygenase metabolites were quantitated using liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) analysis. The content of multiple metabolites (12-HETE, 11-HETE, 15-HETE, etc.) was significantly increased in calcified aortas, and the most abundant and up-regulated metabolite was 12-HETE. Furthermore, we examined the mRNA levels of metabolic enzymes that produce 12-HETE in calcified blood vessels and found the expression of arachidonate lipoxygenase-15 (Alox15) was increased. Blocking Alox15/12-HETE by Alox15 specific inhibitor

Received 2021-01-04 Accepted 2021-03-11

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81790622) and the International (Regional) Cooperation and Exchange Project (No. 81861128025).

*Corresponding author. Tel: +86-10-64456030; E-mail: jiedu@ccmu.edu.cn

PD146176 significantly decreased the plasma 12-HETE content, promoted calcium deposition in aortic arch and increased vascular calcium content. These results suggest that the metabolism of arachidonic acid lipoxigenase is activated in calcified aorta, and the Alox15/12-HETE signaling pathway may play a protective role in vascular calcification.

Key words: vascular calcification; arachidonic acid; lipoxigenase-15; 12-HETE

血管钙化是由羟磷灰石在血管壁上异位沉积而产生的^[1]。血管钙化降低血管顺应性,增加心脏病、卒中、动脉粥样硬化斑块破裂的风险,加速心力衰竭的发生^[1]。血管钙化的中心环节是血管平滑肌细胞成骨样转化,浸润的巨噬细胞或淋巴细胞产生的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等促炎因子可诱导血管平滑肌细胞成骨样转化^[2,3]。血管壁炎症细胞激活及炎症因子释放引起的级联反应,通过启动及促进平滑肌细胞成骨样转化、加剧细胞外基质降解及稳态失衡等,促进血管钙化的发生和进展^[4]。但血管钙化过程中,局部炎症调控的分子机制仍不清楚。花生四烯酸是人体必需的n-6型多不饱和脂肪酸,经环氧酶、脂氧酶和细胞色素P450单氧化酶通路代谢后产生多种活性代谢小分子,具有调控炎症反应强度和持续时间的作用^[5]。有研究显示,晚期钙化性心血管病患者花生四烯酸代谢关键酶磷脂酶A2(phospholipase A2, PLA2)表达升高^[6],而抑制环氧酶通路前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)的产生加速体外血管平滑肌细胞的钙化,提示花生四烯酸代谢异常可能调控血管钙化的发生。但花生四烯酸脂氧酶代谢产物在血管钙化中的变化和作用并不清楚。

本研究通过对钙化血管的花生四烯酸进行质谱分析,使用5/6肾切除及高磷饲喂建立的血管钙化模型结合脂氧酶抑制剂,分析花生四烯酸脂氧酶代谢产物在血管钙化中的变化及作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 野生型C57BL/6J小鼠购买于北京唯尚立德生物科技有限公司,饲养于北京安贞医院SPF级环境动物房。所有实验操作均按照首都医科大学实验动物管理委员会的规定进行,并经伦理委员会批准。

1.2 血管钙化动物模型 雄性8周龄小鼠,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,一侧肾脏全切除。手术一周后再次麻醉,实施第二次手术将对侧肾脏切除2/3。肾脏切除术后给予0.45%盐水和2%高磷饮食饲喂6周,小鼠麻醉处死取材进行后续实验。假手术(Sham)组小鼠皮肤做切口后缝合,不进行

肾脏切除,正常饮食饲喂。花生四烯酸脂氧酶15(arachidonate 15-lipoxygenase, Alox15)抑制剂组在高磷饲喂2周后,1周2次腹腔注射20 mg/kg PD146176,连续注射4周。对照组腹腔注射等体积的DMSO。

1.3 主要试剂 Alox15抑制剂PD146176购于AbMole公司(货号M7104),茜素红染色试剂盒和Von Kossa试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司,总RNA提取试剂TRIzol购于美国Invitrogen公司,反转录试剂盒购于美国Promega公司,real-time PCR试剂购于日本TaKaRa公司,引物由北京诺赛生物工程技术有限公司合成。

1.4 血管钙化染色 小鼠麻醉后通过心脏灌注去除血液,胸部正中切口将主动脉取出,放入10%福尔马林中固定4 h。脱水石蜡包埋后制成切片。使用茜素红或Von Kossa染色试剂盒检测血管钙化情况。

1.5 血管钙含量检测 小鼠麻醉灌流去除血液后,取主动脉根部到膈肌上段,剥离脂肪组织。将血管放入200 μ L 0.5 mol/L盐酸中,4 $^{\circ}$ C振荡过夜。使用钙测定试剂盒(中生北控)检测钙含量。称量血管重量,钙含量以 μ g/mg血管表示。

1.6 花生四烯酸代谢产物检测 小鼠麻醉灌流去除血液后,取主动脉称重后迅速放至液氮保存。样本由天津医科大学余鹰教授团队采用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)检测花生四烯酸代谢产物含量。

1.7 血浆12-羟基二十碳四烯酸(12-HETE)检测

小鼠麻醉后采血,4 000 r/min离心10 min,上层血浆置于-80 $^{\circ}$ C保存。血浆12-HETE通过ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司)进行检测,操作步骤按照试剂说明书进行。

1.8 RNA提取和real-time PCR实验 血管使用TRIzol法提取总RNA后,使用Nanodrop 2000测量样本浓度。将2 μ g的各样本RNA反转录为cDNA。使用Bio-RAD CFX Connect PCR仪扩增目的基因,反应条件为95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s(40个循环)。以GAPDH作为内参。基因的表达水平以得到的相应的Ct值用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

Alox12 上游引物 5'-ATGAGATGCCTCCCAGGACT-3', Alox12 下游引物 5'-CCACCTGTGCTCACTACCTG-3', Alox15 上游引物 5'-GGCTCCAACAACGAGGTC-TAC-3', Alox15 下游引物 5'-AGGTATTCTGACA-CATCCACCTT-3', GAPDH 上游引物 5'-AATGCATCCT-GCACCACC-3', GAPDH 下游引物 5'-ATGCCAGT-GAGCTTCCCG-3'。

1.9 统计学分析 实验数据用 mean ± SD 表示。采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。符合正态分布的两组之间比较采用非配对 *t* 检验，多组之间的比较采用 one-way ANOVA。对于非正态分布

的数据，两组之间比较使用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性肾衰血管钙化模型的建立

我们采用两步法对小鼠进行 5/6 肾切除手术，并给予高磷喂饲和高盐饮水。术后 6 周对主动脉弓部血管进行茜素红染色和 Von Kossa 染色明确钙沉积情况，与假手术组 (Sham) 相比，肾切除组 (Surgery) 血管有显著的钙沉积 (图 1A)。对主动脉全长进行钙含量测定，肾切除组血管钙含量明显升高 (图 1B)。

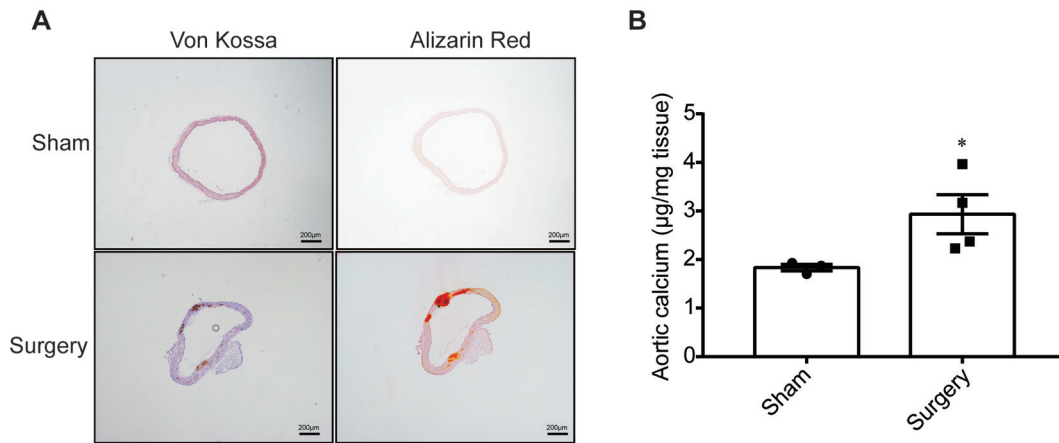


图 1. 5/6肾切除诱导血管钙化形成

Fig. 1. 5/6 nephrectomy induced vascular calcification. A: Representative Alizarin Red S and Von Kossa staining of aortic arch in the sham and surgery groups 6 weeks after induction of calcification. Scale bar, 200 µm. B: Aortic calcium levels after induction of calcification. The calcium content was normalized to the weight of the aorta ($n = 3-4$ per group). Mean ± SD, * $P < 0.05$ vs Sham group.

2.2 花生四烯酸脂氧酶途径代谢产物在钙化血管中显著升高

为了明确花生四烯酸脂氧酶代谢在钙化血管中的变化情况，我们将对照及钙化血管进行花生四烯酸代谢产物的 LC-MS 分析，检测到脂氧酶途径的 9 种代谢产物，包括 12-HETE、11-HETE、15-HETE、9-HETE、5-HETE、8-HETE、6R-LXA4、15-oxo-EETE 和 LTB4 (图 2)。其中，12-HETE 在对照及钙化血管中含量最高。多种脂氧酶代谢产物在钙化血管中升高，包括 12-HETE、11-HETE、15-HETE、9-HETE、5-HETE、8-HETE 和 15-oxo-EETE，其中 12-HETE 是升高最显著的代谢产物 [(15.1 ± 6.5) ng/mg vs (153.1 ± 136.7) ng/mg]。

2.3 Alox15在钙化血管中表达增加

12-HETE 是花生四烯酸的代谢产物，主要由活

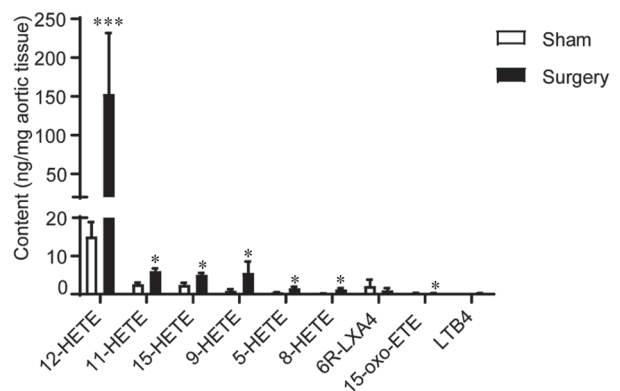


图 2. 钙化血管中花生四烯酸脂氧酶代谢产物的含量

Fig. 2. The contents of arachidonic acid lipxygenase (LOX) metabolites detected by using liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) analysis in calcified aorta. Mean ± SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Sham group.

化的 PLA2 释放花生四烯酸后, 经 Alox12 和 Alox15 催化花生四烯酸代谢生成^[7]。我们通过 real-time PCR 方法检测产生 12-HETE 的关键代谢酶 Alox12 和 Alox15 的表达情况。结果显示, 与对照血管相比, 钙化的血管中 Alox12 mRNA 表达没有变化, Alox15 mRNA 表达显著升高 (图 3)。因此, 我们推测表达升高的 Alox15 是钙化血管中 12-HETE 累积的可能原因。

2.4 抑制 Alox15 活性促进血管钙化的发生

为了明确 Alox15/12-HETE 在血管钙化中的作用, 我们使用 Alox15 特异性抑制剂 PD146176 抑制 Alox15 的活性和 12-HETE 的产生。利用 ELISA 试剂盒检测血浆 12-HETE 的含量, 发现肾切除术后血浆 12-HETE 升高, 使用 Alox15 抑制剂 PD146176

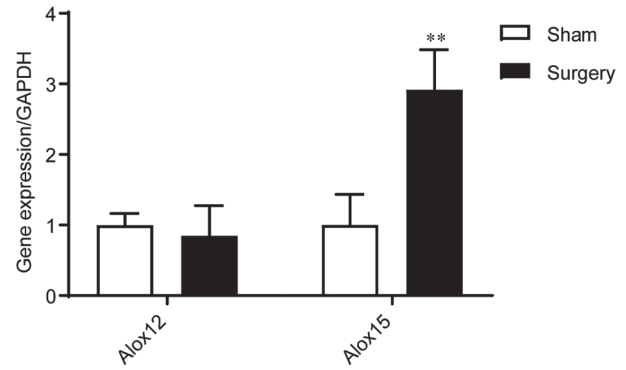


图 3. Alox12和Alox15在钙化血管中的表达
Fig. 3. Alox15 mRNA expression was elevated in calcified aorta. Alox12 and Alox15 in aortas of sham and surgery groups were detected by real-time PCR. Mean \pm SD, $n = 4$, ** $P < 0.01$ vs Sham group.

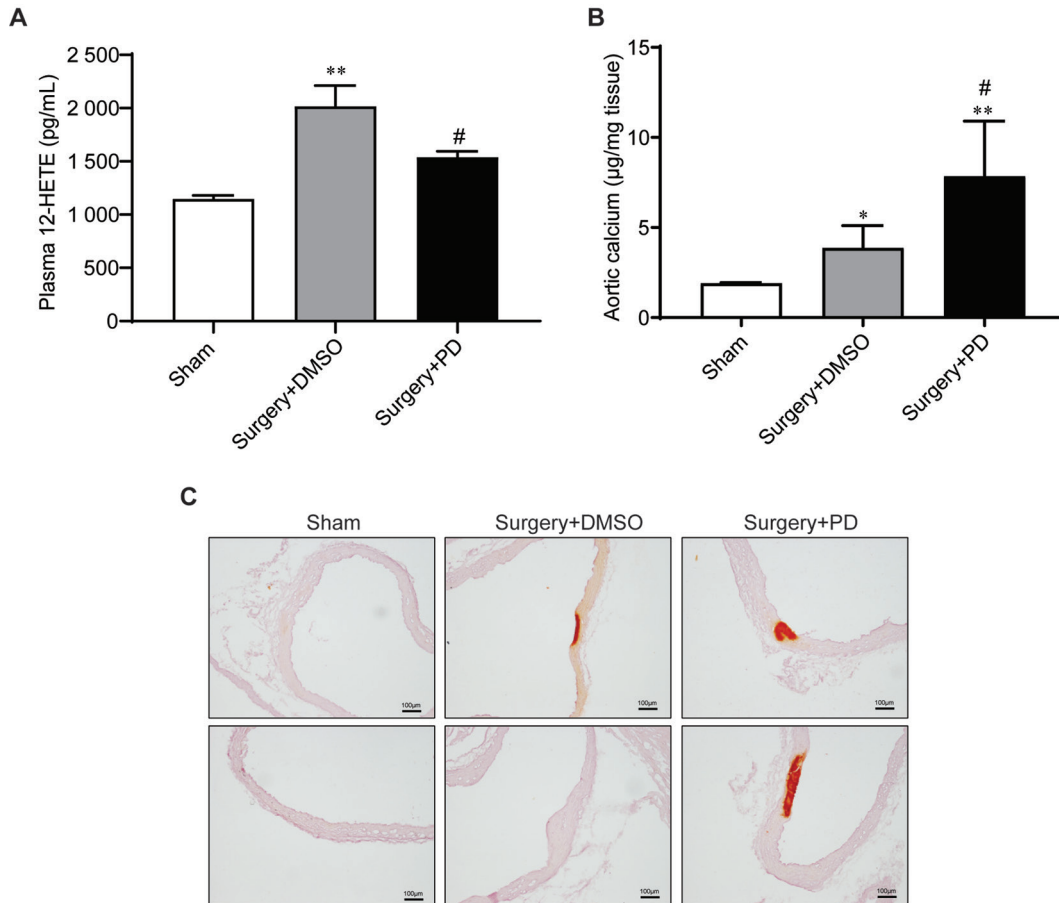


图 4. 给予 Alox15 特异性抑制剂 PD146176 促进血管钙化的发生

Fig. 4. Alox15 specific inhibitor PD146176 (PD) accelerated vascular calcification. *A*: Concentration of plasma 12-HETE in sham, surgery+DMSO and surgery+PD groups was detected by ELISA kit ($n = 3-5$ per group). *B*: Aortic calcium levels in sham, surgery+DMSO and surgery+PD groups after induction of calcification. The calcium content was normalized to the weight of the aorta ($n = 4-6$ per group). *C*: Representative Alizarin Red S staining of aortic arch in the sham, surgery+DMSO and surgery+PD groups 6 weeks after induction of calcification. Scale bar, 100 μm . Mean \pm SD, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham group, # $P < 0.05$ vs Surgery+DMSO group.

可显著降低血浆 12-HETE 水平 (图 4A)。通过对假手术组 (Sham)、肾切除 +DMSO 组 (Surgery + DMSO) 和肾切除 +PD146176 组 (Surgery + PD) 的主动脉弓部和主动脉全长的检测发现, PD146176 促进了弓部血管的钙沉积 (图 4B) 和主动脉全长的钙含量 (图 4C), 加剧了血管钙化的发生和发展。

3 讨论

血管钙化是增加心血管疾病发病率和死亡率的重要危险因素, 也是慢性肾病发生心血管并发症及死亡的重要预后不良因素^[8]。在本研究中, 我们发现钙化血管中花生四烯酸脂氧酶代谢产物增加, 抑制 Alox15/12-HETE 信号轴加重了血管钙化, 提示其在血管钙化过程中发挥保护作用。

正常情况下花生四烯酸以酯键形式结合在细胞膜上, 当炎症发生时, 经 PLA2 催化细胞膜磷脂释放。随后, 花生四烯酸在环氧酶和脂氧酶的作用下合成类二十烷酸, 调控炎症反应的强度和持续时间^[9]。在多种心血管疾病中, 都存在花生四烯酸代谢的改变。在动脉粥样硬化斑块中, Alox5 代谢产物白三烯^[10]、Alox12 代谢产物 12(S)-HETE 升高^[11]。心肌梗死发生后, 脂氧酶代谢产物增加, 促进心肌梗死后的修复^[12]。钙化培养基刺激血管平滑肌细胞, 显著增加花生四烯酸代谢产物 PGE2 的产生。在本研究中, 我们发现钙化的血管中花生四烯酸脂氧酶代谢产物 12-HETE、11-HETE、15-HETE 等含量增加, 提示脂氧酶通路可能在血管钙化中发挥作用。

在钙化的血管中, 我们发现 12-HETE 是升高最显著的脂氧酶代谢产物。Alox12 和 Alox15 是产生 12-HETE 的主要代谢酶, 活化的单核巨噬细胞^[13]以及内皮细胞^[13]中 Alox12 和 Alox15 代谢产生 12-HETE。在人和兔的动脉粥样硬化斑块中, 检测到 Alox15 与氧化脂质共定位^[14]。在本研究中, 我们发现钙化血管中 Alox15 转录水平显著升高, 提示 Alox15 表达增加可能是钙化血管 12-HETE 含量增加的原因。但 Alox15 在钙化血管中的蛋白水平以及酶活性是否同样增加还需进一步实验验证。

脂氧酶属于氧化还原酶, 是一类含血红素铁的蛋白质, 能催化花生四烯酸发生氧化。氧化的脂质随后发生生物反应, 通过特定细胞表面受体激活细胞信号转导通路或者进一步代谢成有效的脂质介质而发挥生物学作用。血管钙化通常伴随着血管炎症反应升高, 管壁浸润的炎症细胞及血管外脂肪分泌

细胞因子、趋化因子、基质金属蛋白酶等构成了血管的炎症微环境。促炎和抑炎因子共同调控血管炎症微环境。而脂氧酶是合成促炎消退脂质介质 (specialized proresolving mediators, SPMs) 的关键酶。促炎消退脂质通过抑制中性粒细胞募集、诱导炎症细胞凋亡及清除组织细胞碎片等方式促进炎症机体恢复稳态。已有研究报道, 急性心肌梗死后, 单核巨噬细胞通过脂氧代谢合成 SPMs, 促进炎症消退和心肌梗死后的修复^[12]。抑制产生 12-HETE 的代谢酶 Alox12 表达会加剧内皮细胞和血管平滑肌细胞的炎症反应^[15]。12-HETE 可调节脑缺血后过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ) 的活性及缺血诱导的炎症反应^[16]。活化的 PPAR γ 可通过抑制促炎转录因子 NF- κ B 表达从而抑制炎症反应^[17]。我们在小鼠钙化的血管中检测到 12-HETE 是钙化血管中升高最显著的脂氧酶代谢产物, 抑制产生 12-HETE 的关键代谢酶 Alox15 可促进血管钙化。这些结果提示, Alox15/12-HETE 通路对血管钙化有保护作用, 可能通过调控血管炎症反应进而抑制血管钙化的发生。具体调控的分子机制还需要进一步实验验证。

总之, 本研究结果显示钙化血管中花生四烯酸脂氧酶 Alox15 及其代谢产物增加, 抑制 Alox15/12-HETE 通路加剧血管钙化的发生, 表明花生四烯酸代谢在血管钙化中的重要作用, 可能为血管钙化的治疗提供新思路。

参考文献

- 1 Lacolley P, Regnault V, Segers P, Laurent S. Vascular smooth muscle cells and arterial stiffening: relevance in development, aging, and disease. *Physiol Rev* 2017; 97: 1555–1617.
- 2 Lopez-Mejias R, Gonzalez-Gay MA. IL-6: linking chronic inflammation and vascular calcification. *Nat Rev Rheumatol* 2019; 15: 457–459.
- 3 Bostrom KI. Where do we stand on vascular calcification? *Vascul pharmacol* 2016; 84: 8–14.
- 4 Rogers MA, Aikawa E. Cardiovascular calcification: artificial intelligence and big data accelerate mechanistic discovery. *Nat Rev Cardiol* 2019; 16: 261–274.
- 5 Zhang C, He M, Ni L, He K, Su K, Deng Y, Li Y, Xia H. The role of arachidonic acid metabolism in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Biophys* 2020; 78: 255–265.
- 6 Schanstra JP, Luong TT, Makridakis M, Van Linthout S, Lygirou V, Latosinska A, Alesutan I, Boehme B, Schelski N,

- Von Lewinski D, Mullen W, Nicklin S, Delles C, Feuillet G, Denis C, Lang F, Pieske B, Bascands JL, Mischak H, Saulnier-Blache JS, Voelkl J, Vlahou A, Klein J. Systems biology identifies cytosolic PLA2 as a target in vascular calcification treatment. *JCI Insight* 2019; 4: e125638.
- 7 Elmasry K, Ibrahim AS, Saleh H, Elsherbiny N, Elshafey S, Hussein KA, Al-Shabrawey M. Role of endoplasmic reticulum stress in 12/15-lipoxygenase-induced retinal microvascular dysfunction in a mouse model of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2018; 61: 1220–1232.
- 8 Budoff MJ, Young R, Burke G, Jeffrey Carr J, Detrano RC, Folsom AR, Kronmal R, Lima JAC, Liu KJ, McClelland RL, Michos E, Post WS, Shea S, Watson KE, Wong ND. Ten-year association of coronary artery calcium with atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) events: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Eur Heart J* 2018; 39: 2401–2408.
- 9 Alhouayek M, Muccioli GG. COX-2-derived endocannabinoid metabolites as novel inflammatory mediators. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35: 284–292.
- 10 Gilbert NC, Gerstmeier J, Schexnaydre EE, Börner F, Garscha U, Neau DB, Werz O, Newcomer ME. Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. *Nat Chem Biol* 2020; 16: 783–790.
- 11 Manega CM, Fiorelli S, Porro B, Turnu L, Cavalca V, Bonomi A, Cosentino N, Di Minno A, Marenzi G, Tremoli E, Eligini S. 12(S)-Hydroxyeicosatetraenoic acid downregulates monocyte-derived macrophage efferocytosis: New insights in atherosclerosis. *Pharmacol Res* 2019; 144: 336–342.
- 12 Halade GV, Tourki B. Specialized pro-resolving mediators directs cardiac healing and repair with activation of inflammation and resolution program in heart failure. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1161: 45–64.
- 13 Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, Nakata A, Ishigami M, Miyagawa J, Kameda-Takemura K. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest* 1995; 96: 1859–1865.
- 14 Ylä-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Glass CK, Sigal E, Witztum JL, Steinberg D. Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6959–6963.
- 15 Zheng Z, Li Y, Jin G, Huang T, Zou M, Duan S. The biological role of arachidonic acid 12-lipoxygenase (ALOX12) in various human diseases. *Biomed Pharmacother* 2020; 129: 110354.
- 16 Sun L, Xu YW, Han J, Liang H, Wang N, Cheng Y. 12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPAR γ : a possible neuroprotective effect in ischemic brain. *J Lipid Res* 2015; 56: 502–514.
- 17 Hou Y, Moreau F, Chadee K. PPAR γ is an E3 ligase that induces the degradation of NF κ B/p65. *Nat Commun* 2012; 3: 1300.