Original Article

Endothelial Dysfunction through Tumor Necrosis Factor-α Activated Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor-1 Overexpression

Anongnat Painupong*, Kesorn Suwanprasert**

Abstract

Atherosclerosis is an inflammatory disease that cytokines such as tumor necrosis factor-α (TNF-α) plays a critical role in acute phase response and is expressed in the intima of lesion. The activation of TNF-α in endothelial dysfunction leading to an initial step of atherosclerosis is obscure. In this study, we hypothesized that endothelial dysfunction was triggered by an excess of reactive oxygen species (ROS) through TNF-α induced lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) overexpression. Human umbilical artery culture was used as organ model and also, was treated with 40 ng/ml TNF-α for 2, 4, 8, 16 and 24 hrs. Endothelial function was monitored by real time nitric oxide measurement using electrochemistry technique. LOX-1 expression was analyzed by RT-PCR. Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by SOD determination kit. The results shown that vascular nitric oxide levels were decreased significantly throughout 2-24 hrs experiment. Whereas, inducible mRNA LOX-1 was increased significantly after treated with 40 ng/ml TNF-α at 16 and 24 hrs which corresponding with profound declined NO levels. Consistent high SOD activity was evident which indicated the available superoxide anion (O^2.-) in vasculature from, eventually, peroxynitrite formation. These findings suggested that TNF-α activated ROS production that in turn, induced up-regulation of LOX-1 expression and also reduced NO levels leading to endothelial dysfunction.

In conclusiond, overwhelmed ROS caused by TNF-α stimulation led to endothelial dysfunction through overexpression of LOX-1. Endothelial damage was from both an excess ROS and, probably, reactive nitrogen species (RNS), peroxynitrite.

Key Words: Endothelial dysfunction, Tumor necrosis factor-α (TNF-α), Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)

Received: 2 April 2012 Accepted: 27 April 2012

Introduction

The endothelium is a functional barrier between the blood vessel and the blood stream, and also plays a vital role in vascular homeostasis. Endothelial dysfunction or activation, elicited by oxidized LDL (Ox-LDL) has been implicated in the initiation of atherosclerosis. Recently, atherosclerosis is rather gained popularity certainly in an inflammatory disease[1] since oxidized LDL and its own receptor[2]: Lectin-like oxidized LDL receptor-1 or LOX-1 has been identified at atherosclerosis lesion.[3] Cytokines of the acute phase response in inflammation such as TNF-α, IL-1α and IL-1β are expressed in the intima of atherosclerotic lesions[4]. LOX-1 expression can be upregulated by TNF-α in cultured bovine aortic endothelial cells[5] and vascular smooth muscle cells.[6] Recently, human umbilical artery culture is developed and set up in our laboratory and permits long-term maintenance of viable tissue (>4 weeks) which combines the advantages of the natural cell and matrix configuration. Additionally, it provides the inherent advantage of eliminating blood pressure and flow effects. In this study, we hypothesized that endothelial dysfunction was triggered by an excess of reactive oxygen species (ROS) through TNF-α induced LOX1 overexpression.

* Medical Sciences Graduate Program, Faculty of Medicine, Thammasat University
** Division of Physiology, Department of Preclinical science, Faculty of Medicine, Thammasat University
Corresponding author: Kesorn Suwanprasert. Division of Physiology, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus, Klongluang, Pathumthani 12120, Thailand

Materials and Methods

2.1 Materials:

RPMI 1640 and L-glutamine were obtained from Invitrogen (USA). Fetal bovine serum albumin (FBS), 100x Antibiotic (Gibco, Invitrogen), Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), and other chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO). iScript reverse transcriptase, oligo (dT)20 primer and DNA polymerase were purchased from Bio-Rad (USA).

2.2 Methods:

The experiments were divided into two groups : (1) control group was vascular ring only (2) TNF-α treatment group was vascular ring with 40 ng/ml TNF-α at 2, 4, 8, 16 and 24 hrs.

2.3 Organ culture preparation

Human umbilical artery was isolated and cultured in RPMI 1640 media containing 10% FCS, amphotericin B 5 μg/ml and gentamycin 100 μg/ml under 5% CO_2 and 95% air at 37oC. The culture medium was observed and replaced with fresh medium every 2 days. On day 2, the experiment was performed for 2, 4, 8, 16 and 24 hrs treatment.

2.4 Determination of nitric oxide (NO) concentration

NO concentration was measured by electro-chemistry technique (Model inNO-T, amino-700 NO Sensor). The amount of NO concentration was displayed in nanomolar (nM).

2.5 RT-PCR for LOX-1 mRNA expression

Total RNA was extracted from human umbilical artery with a phenol-guanidine thiocyanate; TRIzol® reagent (Invitrogen, USA). The total RNA was isolated and modified as described by Rodrigo[7]. Briefly, the homogenate was centrifuged, then supernatant was aspirated and precipitated by 100% isopropanol. Total RNA was dissolved with RNase-free DEPC-treated water (Promega, Madison, WI) and mixed by pipette. The concentration of total RNA samples was quantitated at OD 260/280 nm by NanoDrop2000. The total RNA sample was kept at –80°C until use. cDNA was generated from 2 μg total RNA using SuperScript II (Invitrogen). In short, RNA template, Oligo-dT_{20}, dNTP and nuclease-free water were mixed with the RT-master mix, which consisted of 10X RT buffer, 25 mM $MgCl_2$, 0.1 M DTT, RNase OUT (40 U/μl) and SuperScript II RT (200 U/μl) and DEPC-treated water (Invitrogen). All components were gently mixed, spun down and aliquoted 10 μl to each RT-reaction, incubated at 50°C for 50 min and 85°C for 5 min, respectively.

cDNA product from RT reaction were subjected to PCR amplification using *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and specific oligonucleotide primers for LOX-1 size 193 basepairs, sense *LOX-1* primer: 5′-TTACTCTCCATG-GTGGTGCC-3′, antisense LOX-1 primer: 5′-AGCTTCTTCT-GCTTGTTGCC-3′, and β-actin size 201 base pairs; sense β-actin primer: 5′-TCGAATTCTGGAGAAGAGCTATGAG-3′, anti-sense β-actin primer: 5′-TCGGATCCGTGCCACCAGA-CAGCACT-3′ by using the PCR condition as follows: initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 30 cycles with 94°C for 1 min, annealing temperature of 60°C for 1 min and 72°C for 2 min. *LOX-1* gene products was 193 base pair and then it was loaded on 2.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide. Quantitative concentration of LOX-1 expression was determined by AlphaVIEW SA program.

2.6 Statistic Analysis

All data are expressed as mean ± SEM. Data were analyzed by ANOVA and significance was taken at $P < 0.05$.

Results

3.1 Effect of TNF-α on NO level and LOX-1 expression

Human umbilical artery ring was treated with 20 and 40 ng/ml TNF-α for 16 hrs and then determined NO level and percentage of LOX-1 expression. NO was decreased significantly whereas percentage of LOX-1 expression was significantly increased (fig. 1) We selected 40 ng/ml TNF-α as dose treatment for next experiment protocol.

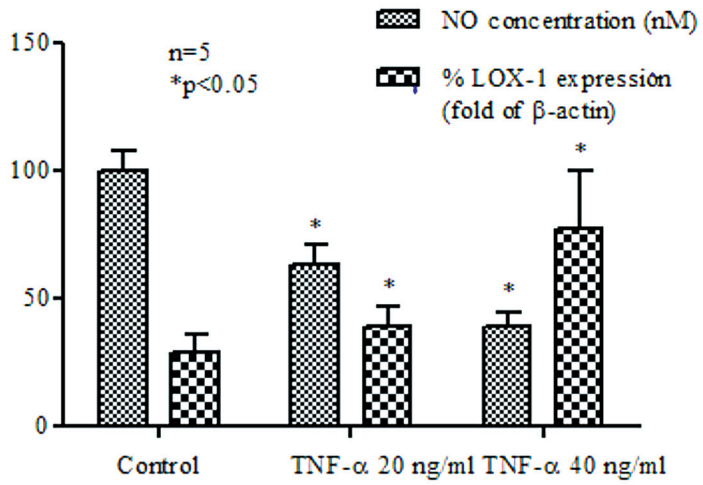

Fig. 1 Dose-response of 20 and 40 ng/ml TNF-α on NO levels and % LOX-1 expression. Data are expressed as mean ± SEM.
* $p < 0.05$ compared with control.

3.2 TNF-α reduces NO concentration

40 ng/ml TNF-α was capable of reducing NO concentration at 2-24 hrs treatment as shown in fig. 2 Significantly decreased NO levels were revealed at 2-24 hrs treatment compared with control and those with among treatment hours.

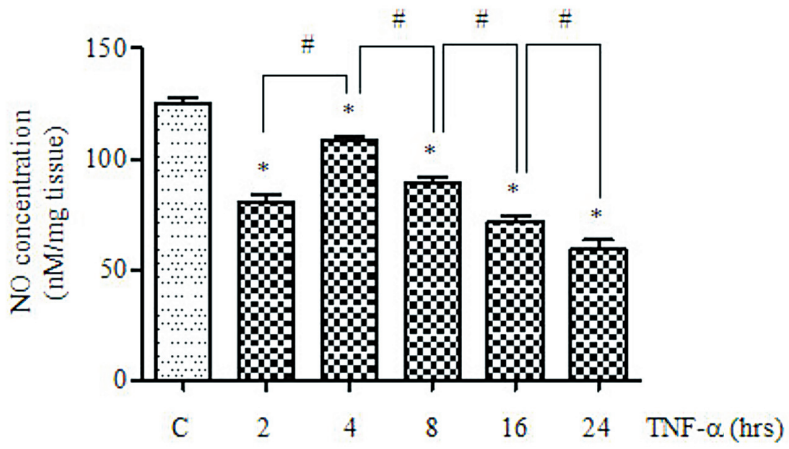

Fig. 2 Significantly decreased No levels with 40 ng/ml TNF-α at 2-24 hours.
* $p < 0.05$ compared with control.
# $p < 0.05$ compared among treatments (n = 9).

3.3 Effect of TNF-α on SOD activity

SOD activity was significantly increased in 4, 8, 16 and 24 hrs treatment of 40 ng/ml TNF-α. (fig. 3) The result indicated that available superoxide anion (O_2.-) produced consistently from TNF-α activation of major vascular ROS source such as NADPH oxidase[8].

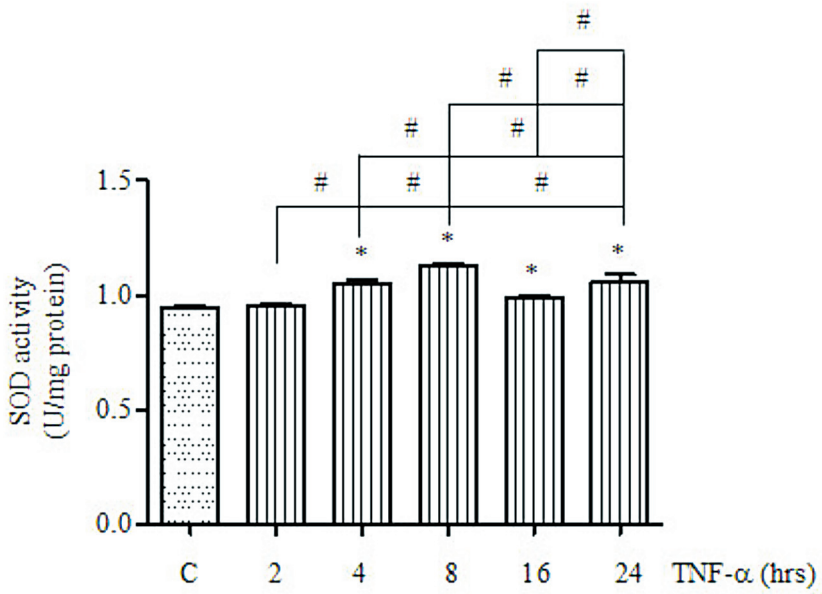

Fig. 3 SOD activity at 2-24th hours after 40 ng/ml TNF-α treatment.

* $p < 0.05$ compared with control.

\# $p < 0.05$ compared among treatment hours (n = 5).

3.4 Overexpression of LOX-1 by TNF-α

Inducible mRNA LOX-1 was significantly upregulated after treated with 40 ng/ ml TNF-α for 16 and 24 hrs (0.24 ± 0.0028 and 0.31 ± 0.0011 respectively) as shown in figure 4 which corresponding with profound decrease in nitric oxide level (fig. 1).

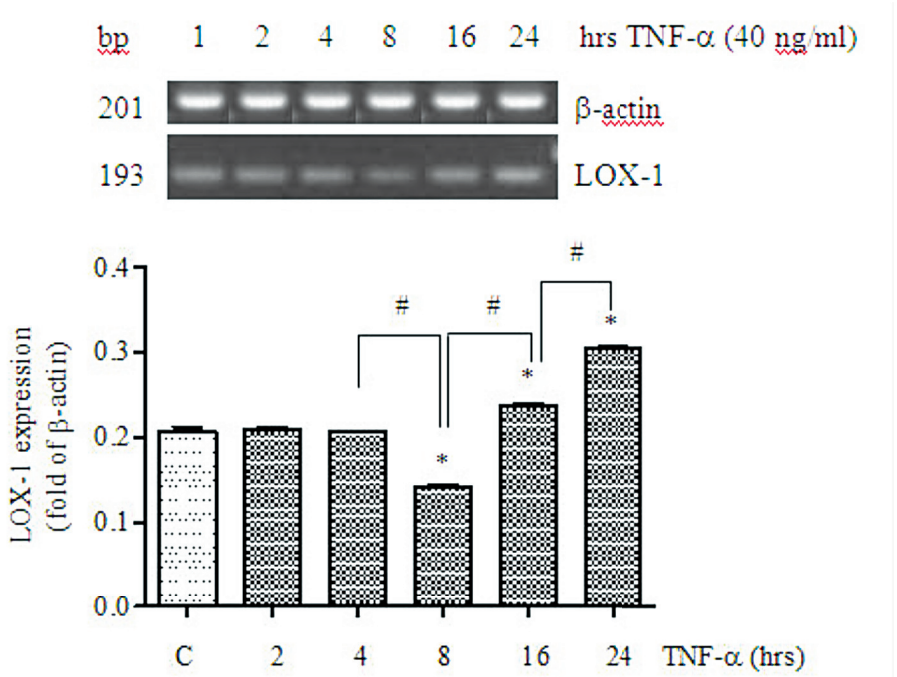

Fig. 4 Overexpression of LOX-1 at 16th and 24th hours of 40 ng/ml TNF-α treatment

* $p < 0.05$ compared with control.

\# $p < 0.05$ compared among treatments (n = 5).

Discussion

TNF-α is one of the most potent pro-inflammatory cytokines in inflammation through stimulating expression of adhesion molecules on endothelium and decreasing endothelial NO generation thereby inducing endothelial dysfunction.[9,10] Previous study demonstrated that TNF-α was important in the disruption of macrovascular and microvascular circulation by activated LOX-1.[11] TNF-α stimulated O_2.- production in endothelial cells through NADPH oxidase.[12] Recently, endothelial dysfunction was determined by low nitric oxide caused by overwhelmed ROS release and activated LOX-1 expression[13] as our results shown in fig. 1 and fig. 4. Nitric oxide levels were reduced significantly during 2-24 hour treatments which indicated low NO production and consequently reacted with superoxide to be peroxynitrite[14] that was confirmed by consistent high SOD activity. The amount of O_2.- converted to peroxynitrite depended on the relative rates of its reaction with SOD and NO, which in turn depended on the relative in concentrations of available SOD and NO.[13] The reaction of NO with O_2.- was rapid and facile ($k = 6.7 \times 10^9$ M/S) resulting in peroxynitrite formation.[14] Clearly, more ROS from activated NADH oxidase by TNF-α were seen in 16th and 24th treatment hours of LOX-1 expression. In summary, overwhelmed ROS caused by TNF-α stimulation led to endothelial dysfunction through overexpression of LOX-1. Endothelial damage was from both an excess ROS and probably, reactive nitrogen species (RNS), peroxynitrite. Study of peroxynitrite formation will be further investigated.

Acknowledgements

This work was supported by the National Research University Project of Thailand Office of Higher Education Commission, Thammasat University, and program of Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral degree.

References

1. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. Am Heart J 1999;138:S419-20.
2. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. Nature 1997;386: 73-7.
3. Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Moriwaki H, Murase T, et al. Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. Circulation 1999;99:3110-7.
4. Lei X, Buja LM. Detection and localization of tumor necrosis factor-alpha in WHHL rabbit arteries. Atherosclerosis 1996;125:81-9.
5. Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, et al. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. Circ Res 1998;83:322-7.
6. Hofnagel O, Luechtenborg B, Stolle K, Lorkowski S, Eschert H, Plenz G et al. Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:1789-95.
7. Rodrigo MC, Martin DS, Redetzke RA, Eyster KM. A method for the extraction of high-quality RNA and protein from single small samples of arteries and veins preserved in RNAlater. J Pharmacol Toxicol Methods 2002;47:87-92.
8. Sorescu D, Griendling KK. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. Congest Heart Fail 2002;8:132-40.
9. Hakoshima T, Tomita K. Crystallization and preliminary X-ray investigation reveals that tumor necrosis factor is a compact trimer furnished with 3-fold symmetry. J Mol Biol 1988;201:455-7.
10. Bruunsgaard H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. J Leukoc Biol 2005;78:819-35.

11. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. Clin Sci (Lond) 2009;116:219-30.
12. Downey JM, Omar B, Ooiwa H, McCord J. Superoxide dismutase therapy for myocardial ischemia. Free Radic Res Commun 1991;12:703-20.
13. Chatchanayeunyong R, Suwanprasert K. Vascular oxidative stress through superoxide dismutase (SOD) and intracellular reactive oxygen species activated by oxLDL mediated LOX-1 receptor expression. Thammasat Med J 2009;9:164-73.
14. Radi R. Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. Chem Res Toxicol 1998;11:720-1.

บทคัดย่อ

ความผิดปรกติการทำงานของเซลล์เอนโดทิเลียม ผ่านทูเมอร์ นิโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟา ที่ไปกระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกของตัวรับเลคติน – คล้ายตัวรับไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำชนิดที่หนึ่ง

อนงนาฏ ไพนุพงศ์*, เกสร สุวรรณประเสริฐ**
* สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ โครงการบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
** สาขาสรีรวิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัวเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่มีไซโตไครน์เช่นทูเมอร์ นิโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟา มีบทบาทสำคัญในระยะตอบโต้แบบเฉียบพลัน และได้พบในส่วนชั้นอินติมาของรอยโรค การกระตุ้นทูเมอร์ นิโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟา ในภาวะผิดปรกติการทำงานของเซลล์เอนโดทิเลียม ซึ่งนำไปสู่ระยะเริ่มต้นของโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัวนั้น ยังคงคลุมเครืออยู่ ในการศึกษานี้ได้ตั้งสมมุติฐานว่า ความผิดปรกติการทำงานของเซลล์เอนโดทิเลียมจะถูกกระตุ้นด้วยสารอนุมูลอิสระที่มีมากผ่านทูเมอร์ นิโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟา ที่ไปกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกของตัวรับล็อก-หนึ่ง การทดลองใช้หลอดเลือดแดงที่เพาะเลี้ยงเป็นรูปแบบอวัยวะและทดลองให้ทูเมอร์ นิโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟาขนาด ๔๐ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา ๒, ๔, ๘, ๑๖ และ ๒๔ ชั่วโมง การทำงานของเซลล์เอนโดทิเลียมศึกษาจากการวัดระดับไนตริกออกไซด์แบบจริงโดยใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้า วิเคราะห์การแสดงออกของตัวรับล็อก-หนึ่ง โดยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ออกซิเดสโดยชุดตรวจวัด

ผลการศึกษาพบว่า ระดับไนตริกออกไซด์ในหลอดเลือดลดลงตลอด ๒-๒๔ ชั่วโมง ขณะที่การเหนี่ยวนำอาร์เอนเอชนิดสื่อข่าวของตัวรับล็อก-หนึ่งเพิ่มขึ้นหลังจากให้ ทูเมอร์ นิโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟาขนาด ๔๐ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับระดับไนตริกออกไซด์ที่ลดลงต่ำมาก พบการทำงานของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ซึ่งบ่งบอกถึงจำนวนของซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนที่มีอยู่ในหลอดเลือดที่เป็นผลสุดท้ายที่มีการสร้างเปอร์ออกซิไนไตรท์แล้ว การพบเหล่านี้แสดงถึงการมีสารอนุมูลอิสระจากการกระตุ้นผ่านของทูเมอร์ นิโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟา ซึ่งจะไปย้อนกลับชักนำการเพิ่มการแสดงออกของตัวรับล็อก-หนึ่ง และไปลดระดับไนตริกออกไซด์เช่นกัน นำไปสู่ความผิดปรกติการทำงานของเซลล์เอนโดทิเลียม

สรุปได้ว่า สารอนุมูลอิสระจำนวนมากที่เกิดจากการกระตุ้นของทูเมอร์ นิโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟา นำไปสู่ความผิดปรกติการทำงานของเซลล์เอนโดทิเลียมโดยผ่านการเพิ่มการแสดงของตัวรับล็อก-หนึ่งการทำลายเซลล์เอนโดทิเลียมเกิดได้จากสารอนุมูลอิสระออกซิเจนที่มีมากและอาจจะมาจากสารอนุมูลอิสระไนโตรเจน, เปอร์ออกซิไนไตรท์ด้วย

คำสำคัญ: ความผิดปรกติการทำงานของเซลล์เอนโดทิเลียม, ทูเมอร์ นิโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟา, ตัวรับเลคติน – คล้ายตัวรับไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำชนิดที่หนึ่ง