

靶向*LOX-1*基因RNAi慢病毒载体的构建及鉴定

李俊¹ 陶贵周^{1*} 黄建华²¹辽宁医学院附属第一医院心内科, 锦州 121001; ²辽宁医学院附属第一医院组织工程重点实验室, 锦州 121001)

摘要 该研究针对*LOX-1*基因(*OLR1*)设计并合成3条siRNA干扰序列, 与双酶切的U6-vshRNA-CMV-GFP慢病毒载体连接得到重组载体, 包装慢病毒并测定滴度。采用最佳MOI值及转染条件, 转染人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), 转染96 h后通过RT-PCR和Western blot检测*LOX-1* mRNA及蛋白的表达, 流式细胞仪检测转染后ox-LDL诱导HUVEC的凋亡情况。测序证实靶向*LOX-1* RNAi慢病毒载体构建成功; RT-PCR和Western blot结果显示转染后*LOX-1* mRNA及蛋白均受到不同程度抑制($P < 0.05$); 流式检测结果显示抑制*LOX-1*表达后ox-LDL诱导HUVEC凋亡显著减少($P < 0.05$)。该研究应用RNAi技术成功构建*LOX-1* RNAi慢病毒载体, 有效抑制了*LOX-1*的表达, 显著减少了ox-LDL诱导的凋亡, 为进一步研究*LOX-1*基因沉默减轻内皮细胞损伤及相应保护机制奠定了基础。

关键词 *LOX-1*; 慢病毒载体; RNA干扰; 人脐静脉内皮细胞; 凋亡

Construction and Identification of RNAi Lentiviral Vector Targeting Human *LOX-1* Gene

Li Jun¹, Tao Guizhou^{1*}, Huang Jianhua²¹Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China; ²Department of Key Laboratory of Tissue Engineering, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract This research designed three target sequences (OLR1-RNAi-1, OLR1-RNAi-2, OLR1-RNAi-3) based on *LOX-1* gene (*OLR1*) sequence and shRNA designed principles. DNA oligos of target sequences were synthesized and cloned into lentiviral vector U6-vshRNA-CMV-GFP. The recombined vector was confirmed by PCR and DNA sequencing. Lentiviral vector shRNA-*LOX-1* was co-transfected into 293T cells with packaging plasmid by Lipofectamine 2000. Virus in the supernatant was collected and the virus titer was measured. Under the best transfection conditions, HUVEC were transfected. The expressions of mRNA and protein of *LOX-1* were respectively detected by RT-PCR and Western blot. The apoptosis of HUVEC which were cultured with ox-LDL was assayed by flow cytometry. PCR and DNA sequencing demonstrated that the inserted sequences were correct. The expression of *LOX-1* of RNAi transfection groups were inhibited by different degree. With the inhibition of *LOX-1*, apoptosis rate of endothelial cells which induced by ox-LDL was significantly lower than the group without transfection. RNAi lentiviral vectors targeting *LOX-1* were constructed successfully. The expression of *LOX-1* can be inhibited effectively in HUVEC, and the inhibition of *LOX-1* can protect endothelial cells against ox-LDL-induced apoptosis, which laid the foundation for the further study on the protection mechanism of endothelial cell injury.

Key words *LOX-1*; lentivirus vector; RNA interference; HUVEC; apoptosis

收稿日期: 2013-03-11 接受日期: 2013-05-03

辽宁省科技厅社会发展攻关计划(批准号: 2011225015)和辽宁医学院校长基金——奥鸿博泽研究生科研创新基金资助的课题

*通讯作者。Tel: 0416-4197399, E-mail: tgz56789@163.com

Received: March 11, 2013 Accepted: May 3, 2013

This work was supported by the Social Development Research Plan of the Liaoning Province Science and Technology Department (Grant No.2011225015) and Graduate Sci-tech Innovation Foundation, the President Fund of Liaoning Medical University

*Corresponding author. Tel: +86-416-4197399, E-mail: tgz56789@163.com

网络出版时间: 2013-06-26 10:34 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130626.1034.004.html>

正常情况下,凝集素样氧化性低密度脂蛋白受体-1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)在内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞等有少量表达,可被氧化性低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)、血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)等动脉粥样硬化危险因素诱导表达上调^[1]。近年来研究发现,LOX-1是参与动脉粥样硬化发病的一个重要受体,在ox-LDL对内皮细胞的毒性作用中起着重要作用。LOX-1介导内皮细胞对ox-LDL的摄取和降解,诱导氧化应激,引起内皮激活,诱发内皮细胞凋亡,导致内皮功能障碍及损伤,进而导致粥样硬化的发生^[2]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)能特异性地下调细胞内目的基因的表达,被广泛应用于内源性基因功能和信号转导途径等的研究^[3]。本研究通过构建靶向人LOX-1基因RNAi慢病毒载体,转染HUVEC后观察其对LOX-1基因表达的抑制作用,并初步对LOX-1抑制后在ox-LDL诱导内皮细胞凋亡中的影响进行研究,为后续探索LOX-1基因沉默对减轻内皮细胞损伤及相应保护机制提供前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVEC细胞(美国ATCC); 293T细胞, U6-vsh-RNA-CMV-GFP慢病毒载体,慢病毒包装辅助质粒pHeper1.0、pHeper2.0、Polybrene、Enhanced Infection Solution(上海吉凯基因技术有限公司); Lipofectamine2000, TRIzol试剂(Invitrogen公司); 限制性内切酶Age I、EcoR I和T4 DNA连接酶(New England BioLabs公司); 质粒提取试剂盒(荷兰Qiagen公司); 大肠杆菌菌株、DMEM培养基(Gibco公司); 胰蛋白酶、胎牛血清(Hyclone公司); 内皮细胞专用培养基(美国Scien Cell公司)中添加体积分数5%的胎牛血清和1%青霉素和链霉素以及1%内皮生长添加物; RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0(TaKaRa公司); Western及IP细胞裂解液, PMSF(碧云天生物技术研究); LOX-1兔抗人多克隆抗体(ABGENT公司); 鼠抗兔二抗(Santa Cruz Biotechnology); PE Annexin V apoptosis detection kit(BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体构建 根据GenBank提供的LOX-1基因cDNA编码序列(OLRI: NM.002543, NM.

001172632, NM.001172633), 选取3条序列的同源区。参照siRNA设计原则进行设计,使用BLAST将选定的序列进行同源性分析,最后挑选3条长为19个碱基的特异性寡核苷酸序列:序列1(OLRI-1): 5'-GGA AAT GAT AGA AAC CCT T-3', 序列2(OLRI-2): 5'-GCT GAA TGA GAA ATC CAA A-3', 序列3(OLRI-3): 5'-CCA GAA TCT GAA TCT CCA A-3'。根据这3条序列分别设计合成shRNA干扰序列的双链oligo DNA,正义链和反义链间插入6 bp的发夹结构CTCGAG,以TTTTTG作为转录终止子密码,尾部引入Age I和EcoR I酶切位点。同时设计合成无意义序列作为阴性对照。退火形成双链DNA,与经Age I和EcoR I双酶切的线性化慢病毒载体U6-vshRNA-CMV-GFP进行连接反应,转化DH5 α 大肠杆菌。挑选重组阳性克隆,进行测序鉴定。

1.2.2 慢病毒包装 用含10%胎牛血清和100 U/mL双抗的DMEM培养293T细胞,转染前24 h,胰蛋白酶消化对数生长期的293T细胞,用完全培养基调整细胞密度为 $1.2 \times 10^7/20$ mL,重新接种于15 cm细胞培养皿,37 °C、5% CO₂培养箱内培养。24 h待细胞密度达70%~80%时用于转染。转染前2 h将细胞培养基更换为无血清培养基。按Invitrogen公司Lipofectamine2000说明书分别将慢病毒重组质粒与pHeper1.0、pHeper2.0共转染293T细胞,培养8 h后更换培养基。48 h后收集感染后的细胞上清,4 000 r/min离心10 min,取病毒上清液,用0.45 μ m滤膜过滤上清液,使用Plus-20离心超滤装置对病毒进行浓缩,操作按照Millipore的使用说明,浓缩后的病毒分装并置于-80 °C保存。

1.2.3 滴度测定 在96孔板中按 4×10^4 细胞/孔密度接种293T细胞。将病毒原液用培养基稀释成每100 μ L中含 $1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$ μ L浓度梯度的病毒液。取100 μ L稀释后的病毒液感染293T细胞。培养24 h后,更换完全培养基继续培养96 h,用倒置荧光显微镜观察荧光表达情况,用带有荧光的细胞数除以病毒原液量计算病毒的滴度。

1.2.4 MOI值测定 转染前24 h用胰酶消化对数生长期HUVEC,按每孔 3×10^3 细胞接种96孔板,分为4组:完全培养基组、完全培养基+5 μ g/mL Polybrene组、Eni.S组、Eni.S+5 μ g/mL Polybrene组,每组设置5个不同梯度的MOI值:40、30、20、10、5,待细胞密度达30%左右时加入稀释后的不同梯度的

病毒, 8~12 h以后更换新鲜的完全培养基继续培养。转染72~96 h后, 观察荧光表达情况及细胞生长状态。

1.2.5 慢病毒转染HUVEC HUVEC细胞用ECM培养基培养, 内含FBS、ECGS、P/S, 转染前一天用胰酶消化后接种于6孔板, 每孔 2×10^5 细胞, 分为未转染病毒组(CON组)、病毒阴性对照转染组(NC组)、病毒阳性转染组(OLR1-RNAi-1组、OLR1-RNAi-2组、OLR1-RNAi-3组), 待细胞密度达30%左右时弃培养基, 按照MOI值为20, 转染条件1.8 mL ECM培养基+0.2 mL Polybrene, 根据病毒的不同滴度加入相应体积的病毒液, CON组加入2 mL ECM培养基。10 h后更换2 mL新鲜的完全培养基继续培养。96 h后在倒置显微镜下观察荧光表达。

1.2.6 RT-PCR检测LOX-1 mRNA的表达 转染后96 h收集各处理组细胞, 用TRIzol提取细胞总RNA。提取的总RNA经电泳鉴定未被降解, 测定RNA的浓度及纯度。LOX-1上游引物为5'-CCT TTT A-3', 下游引物为5'-TGC TCT TAG GTT TGC CTT CTT C-3', 扩增产物片段153 bp; GAPDH上游引物为5'-CTT TGG TAT CGT GGA AGG ACT C-3', 下游引物为5'-GTA GAG GCA GGG ATG ATG TTA T-3', 扩增产物片段132 bp。RT-PCR反应按照试剂盒说明进行操作。反应条件为94 °C预变性5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40个循环; 72 °C再延伸7 min。扩增产物行2%琼脂糖凝胶电泳, Quantity One凝胶图像分析系统分析图像。

1.2.7 Western blot检测LOX-1蛋白的表达 将100 μ L预冷的细胞裂解液加入经过漂洗的细胞中, 12 000 r/min、4 °C、5 min, 取蛋白上清液。BCA法测定蛋白浓度。取20 μ L样品, 进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。电泳时浓缩胶恒压80 V、40 min, 分离胶恒压120 V、90 min。聚偏二氟乙烯(PVDF)膜用甲醛活化15 s, 在电转移架上从负极到正极方向依次铺上滤纸-胶-PVDF膜-滤纸, 恒压20 V、20 min, PVDF膜用含1% BSA的TBST于4 °C封闭1 h, 1:400兔抗人LOX-1多克隆抗体4 °C孵育过夜, 洗膜液洗膜, 1:1 000辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔IgG二抗, 室温孵育2 h。化学发光法分别检测PVDF膜上LOX-1与 β -actin的表达。用Gel-Pro analyzer 4凝胶图像分析系统分析, 以 β -actin为内参, 测定各样品的LOX-1蛋白相对表达量。

1.2.8 转染后ox-LDL诱导HUVEC 转染前一天取对数生长期的HUVEC细胞, 胰酶消化后按照 2×10^5 /孔接种于6孔板, 分为正常对照组、ox-LDL处理组、ox-LDL处理+转染组(病毒阴性对照组和最佳沉默靶点组), 待细胞密度达30%左右时转染组加入相应体积病毒, 转染72 h后除正常对照组外, 其余组各加入150 μ g/mL的ox-LDL, 37 °C、5% CO₂继续培养24 h。

1.2.9 流式细胞仪检测HUVEC的凋亡 24 h后胰酶消化各组细胞, 计数制成细胞浓度 1×10^6 /mL, PBS冲洗2遍, 用500 μ L结合缓冲液重悬, 加入PE标记的Annexin V 10 μ L, 室温避光30 min, 再加入7-AAD 5 μ L, 避光5 min, 流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学分析

计量数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示, 应用SPSS 16.0统计分析软件对数据进行处理, 各组间比较采用One-way ANOVA单因素方差分析。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒载体的鉴定

将PCR阳性克隆进行测序, 测序结果与设计的序列一致, 表明慢病毒载体构建成功。

2.2 慢病毒滴度测定

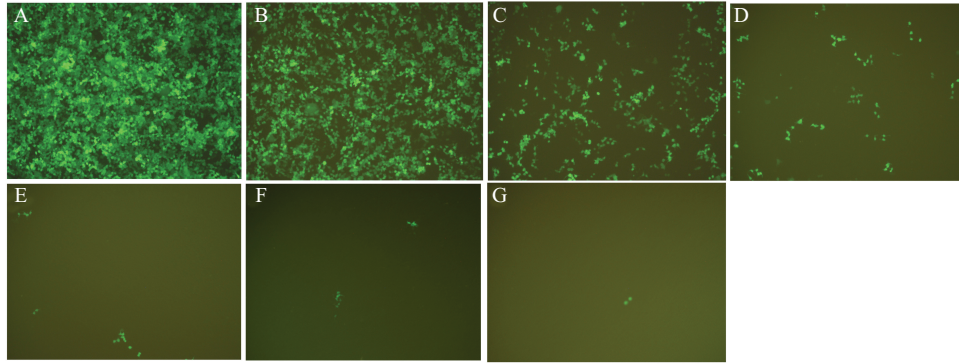
转染96 h后在倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况。随着病毒稀释倍数的增加, 表达GFP的293T细胞数目越来越少(图1A-G依次为加入慢病毒浓缩液几个浓度梯度), 当稀释倍数为 10^6 时视野中有两个细胞表达GFP, 因此滴度测试的结果为 2×10^9 TU/mL, 即每毫升病毒浓缩液中含有 2×10^9 个病毒颗粒。同法测定慢病毒的滴度为 $(4 \sim 6) \times 10^8$ TU/mL。

2.3 慢病毒转染HUVEC

转染HUVEC后, 分别于72, 96, 120 h后通过倒置荧光显微镜观察荧光表达及细胞生长情况。通过荧光视野和明视野的对比可见, 与其他不同梯度组相比, MOI为20时可以达到90%以上的转染效率, 并且在终浓度5 μ g/mL Polybrene条件下细胞容易被感染且生长状态佳; 不同时间点观察发现96 h细胞转染效率达到最高, 并且之后GFP可以持续稳定的表达(图2)。

2.4 基因沉默效率的检测

2.4.1 RT-PCR检测各组的抑制效率 结果显示, CON组LOX-1 mRNA的表达与NC组之间不具

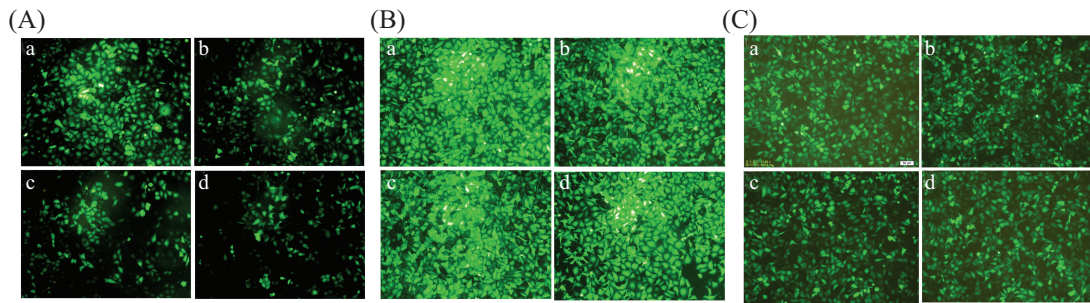


A-G: 慢病毒滴度依次为1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ μL。

A-G: the volume of lentivirus is 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ μL, respectively.

图1 慢病毒滴度测定照片(293T细胞转染96 h)

Fig.1 Fluorescence microscopic images of 293T cells after 96 h of transfection with lentivirus

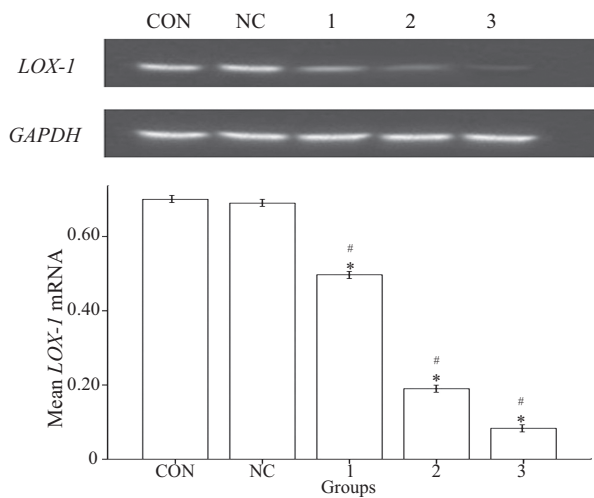


A: 72 h转染效果; B: 96 h转染效果; C: 120 h转染效果; a: 阴性对照转染组; b: OLR1-RNAi-1组; c: OLR1-RNAi-2组; d: OLR1-RNAi-3组。

A: 72 h after transfection; B: 96 h after transfection; C: 120 h after transfection; a: negative control group; b: OLR1-RNAi-1 group; c: OLR1-RNAi-2 group; d: OLR1-RNAi-3 group.

图2 不同时间点慢病毒转染HUVEC结果

Fig.2 Green fluorescent protein expression at different times

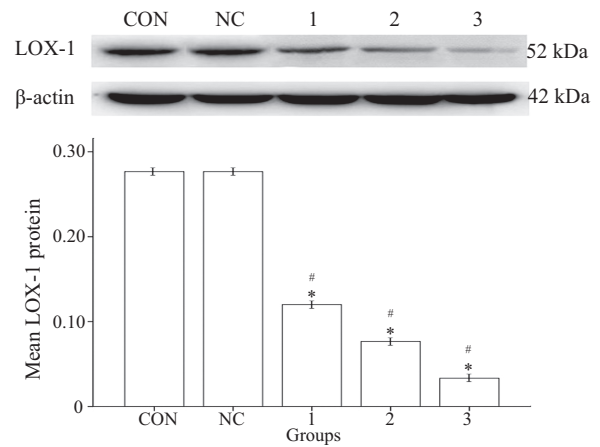


CON: 未转染病毒组; NC: 病毒阴性对照转染组; 1: OLR1-RNAi-1组; 2: OLR1-RNAi-2组; 3: OLR1-RNAi-3组; #P<0.05, 与CON组比较; *P<0.05, 与NC组比较。

CON: group without transfection; NC: negative control group; 1: OLR1-RNAi-1 group; 2: OLR1-RNAi-2 group; 3: OLR1-RNAi-3 group; #P<0.05 compared with CON group; *P<0.05 compared with NC group.

图3 RT-PCR检测LOX-1 mRNA的表达

Fig.3 LOX-1 mRNA expression in different groups analyzed by RT-PCR

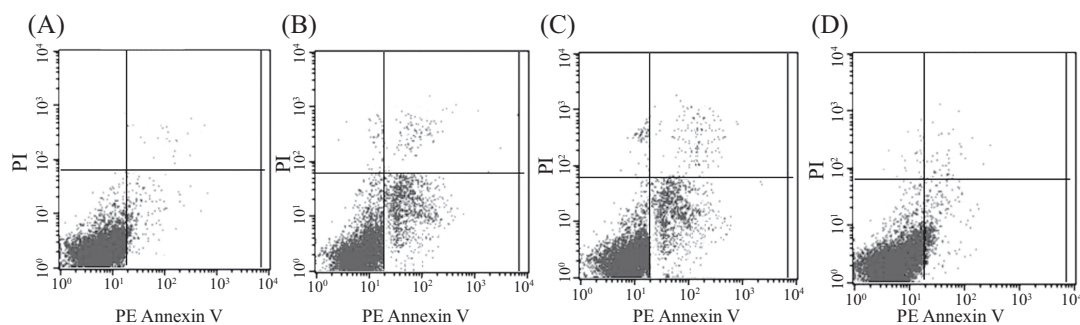


CON: 未转染病毒组; NC: 病毒阴性对照转染组; 1: OLR1-RNAi-1组; 2: OLR1-RNAi-2组; 3: OLR1-RNAi-3组; #P<0.05, 与CON组比较; *P<0.05, 与NC组比较。

CON: group without transfection; NC: negative control group; 1: OLR1-RNAi-1 group; 2: OLR1-RNAi-2 group; 3: OLR1-RNAi-3 group; #P<0.05 compared with CON group; *P<0.05 compared with NC group.

图4 Western blot检测LOX-1蛋白的表达

Fig.4 LOX-1 protein expression in different groups analyzed by Western blot



A: 正常对照组; B: ox-LDL处理组; C: ox-LDL+阴性对照转染组; D: ox-LDL+最佳沉默靶点转染组; B与D比较, $P < 0.05$ 。

A: control group; B: ox-LDL treatment group; C: negative control group with ox-LDL treatment; D: OLR1-RNAi group with ox-LDL treatment; $P < 0.05$, B group compared with D group.

图5 流式细胞仪检测HUVEC凋亡

Fig.5 ox-LDL-induced apoptosis in HUVEC assayed by flow cytometry

有显著的统计学差异, 阳性转染组(OLR1-RNAi-1组、OLR1-RNAi-2组、OLR1-RNAi-3) *LOX-1* mRNA的表达皆有不同程度的抑制, 抑制率分别为 $50.53\% \pm 8.35\%$ 、 $81.18\% \pm 3.19\%$ 、 $91.72\% \pm 0.94\%$, 其中以OLR1-RNAi-3组的抑制率最高(图3)。

2.4.2 Western blot检测LOX-1蛋白的抑制效率 结果显示, CON组LOX-1蛋白的表达与NC组之间不存在显著的统计学差异, 阳性转染组(OLR1-RNAi-1组、OLR1-RNAi-2组、OLR1-RNAi-3) LOX-1蛋白的表达均受到不同程度的抑制, 抑制率分别为 $87.92\% \pm 1.80\%$ 、 $92.33\% \pm 0.71\%$ 、 $96.61\% \pm 0.15\%$, 其中OLR1-RNAi-3组的抑制率最佳(图4)。

2.5 流式细胞仪检测HUVEC的凋亡

流式细胞仪检测结果表明, ox-LDL处理组和ox-LDL+阴性对照转染组细胞凋亡率明显高于正常对照组[($24.75 \pm 2.57\%$)、($23.11 \pm 2.45\%$) vs ($2.35 \pm 0.23\%$), $P < 0.05$], 而ox-LDL+最佳沉默靶点转染组细胞凋亡率明显小于ox-LDL处理组[($3.76 \pm 0.39\%$) vs ($24.75 \pm 2.57\%$), $P < 0.05$](图5)。

3 讨论

近年来的基础及临床研究结果提示, 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病^[4]。ox-LDL作为AS发病的主要危险因素之一, 可以诱导内皮细胞激活和功能障碍, 继而导致炎症细胞浸润、脂质沉积和斑块形成。因此, ox-LDL诱导的内皮功能障碍被认为是AS形成的始动环节^[5]。研究发现, LOX-1是ox-LDL在内皮细胞上的主要受体, 介导ox-LDL内吞, 二者结合后触发一系列细胞内信号通路,

激活内皮细胞发生炎症反应, 干扰eNO合成, 诱发内皮细胞凋亡, 引起内皮细胞功能紊乱及损伤^[6-7]。因此, 抑制LOX-1表达, 阻断ox-LDL与LOX-1的结合, 将会减轻LOX-1介导的ox-LDL对内皮细胞的损伤, 可能抑制或延缓AS的发生与发展。

目前, 有关抑制LOX-1的相关研究多数采用的是药物干预LOX-1表达以及LOX-1单克隆抗体或拮抗剂的方法来阻断LOX-1的作用。Sugano等^[8]将HUVEC在与ox-LDL共培养前, 先与钙离子通道阻滞剂孵育, 结果能显著抑制LOX-1的表达及细胞凋亡。他汀类药物具有明确的抗AS作用, 在发挥降脂作用前抑制ox-LDL诱导的血小板活化, Puccetti等^[9]研究发现, 其作用机制为抑制LOX-1表达。LOX-1特异性抗体或者其拮抗剂κ角叉菜胶可拮抗LOX-1的作用, 抑制ox-LDL诱导的血管内皮细胞损伤^[10]。这些研究表明, 抑制LOX-1表达, 可以减轻ox-LDL的内皮损伤作用, 然而这些研究都不是在基因水平, 且靶向性不强。近年来, 有学者使用吡咯-咪唑聚酰胺这种有机复合物, 结合包含LOX-1基因启动子的特异序列区域来减少LOX-1的表达, 可以使ox-LDL诱导内皮细胞的凋亡减少, 揭示抑制LOX-1对于改善内皮细胞的损伤是很重要的^[11]。但是这种复合物的设计合成非常复杂并且其转染细胞的效率不高。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是普遍存在于生物体内的调控基因的生物现象, 是在转录后及其下游水平上阻断基因的表达, 从而特异性沉默目的基因^[12]。慢病毒载体介导的RNAi能够将基因整合到宿主细胞基因组中, 在细胞中稳定转染, 这使慢病毒载体被认为是进行RNAi的最佳载体, 能

够持续敲减目的基因,从而实现长期沉默细胞内基因表达的效应^[13]。目前,尚未见报道将RNA干扰技术应用用于*LOX-1*基因沉默来进行内皮细胞损伤的研究。因此,本研究采用慢病毒载体介导的*LOX-1*基因RNAi,成功构建载体并且包装得到有感染能力的慢病毒颗粒。HUVEC转染效率达到90%以上,获得稳定转染的细胞株,并证实RNA干扰序列能够对*LOX-1*的表达起到显著并且稳定的抑制作用,为下一步研究内皮细胞损伤的功能实验提供理想的工具。实验进一步采用流式细胞术观察抑制*LOX-1*对ox-LDL诱导内皮细胞凋亡的影响,结果显示,ox-LDL可以显著诱导内皮细胞的凋亡,而*LOX-1*最佳沉默靶点转染后能显著的抑制内皮细胞的凋亡。提示抑制*LOX-1*表达能减轻ox-LDL诱导的内皮细胞损伤,这为进一步研究内皮细胞损伤的保护机制提供基础。

综上所述,本研究成功构建靶向*LOX-1*基因的RNAi慢病毒载体,并且鉴定其干扰效率。采用RNAi抑制*LOX-1*表达能够显著抑制ox-LDL诱导的内皮细胞凋亡。初步证明*LOX-1*基因沉默可以减轻内皮细胞的损伤,这为进一步研究*LOX-1*基因沉默对内皮细胞损伤的保护机制奠定了基础,为探索动脉粥样硬化的基因治疗提供了实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Mitra S, Goyal T, Mehta JL. Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011; 25(5): 419-29.
- 2 Steinberg D. Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8(11): 1211-7.
- 3 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418(6894): 244-51.
- 4 Li JJ. Inflammation: An important mechanism for different clinical entities of coronary artery disease. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118(21): 1817-26.
- 5 Dayuan L, Mehta JL. Intracellular signaling of LOX-1 in endothelial cell apoptosis. *Circ Res* 2009; 104(5): 566-8.
- 6 Lu J, Yang JH, Burns AR, Chen HH, Tang D, Yang CY, *et al.* Mediation of electronegative low-density lipoprotein signaling by LOX-1: A possible mechanism of endothelial apoptosis. *Circ Res* 2009; 104(5): 619-27.
- 7 Chen XP, Xun KL, Wu Q, Zhang TT, Shi JS, Du GH. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: Role of reactive oxygen species. *Vascuol Pharmacol* 2007; 47(1): 1-9.
- 8 Sugano M, Tsuchida K, Makino N. Nifedipine prevents apoptosis of endothelial cells induce by oxidized low density lipoproteins. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40(1): 146-52.
- 9 Puccetti L, Sawamura T, Pasqui AL, Pastorelli M, Auteri A, Bruni F. Atorvastatin reduce platelet oxidized-LDL receptor expression in hypercholesterolaemic patients. *Eur J Clin Invest* 2005; 35(1): 47-51.
- 10 Thum T, Borlak J. Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular injury: Therapy through LOX-1 receptor antagonism. *Circ Res* 2004; 94(1): e1-13.
- 11 Ueno T, Fukuda N, Tsunemi A, Yao EH, Matsuda H, Tahira K, *et al.* A novel gene silencer, pyrrole-imidazole targeting human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene improves endothelial cell function. *J Hypertension* 2009; 27(3): 508-16.
- 12 Vento TJ, Prakash V, Murry CK, Brosch LC, Tchandja JB, Coghburn C, *et al.* Pneumonia in military trainees: A comparison study based on adenovirus serotype 14 infection. *J Infect Dis* 2011; 203(10): 1388-95.
- 13 Singer O, Verma IM. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Curr Gene Ther* 2008; 8(6): 483-8.