

FIZZ1 在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化发生发展中的可能作用及机制

高凌云, 李福平, 何作云, 牟 娇

(中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院心血管内科, 重庆市 400037)

[关键词] 病理学与病理生理学; FIZZ1; 动脉粥样硬化; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 炎症; 高敏 C 反应蛋白; 罗格列酮

[摘要] 目的 探讨 FIZZ1 在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化发生发展中的可能作用及机制。方法 20 只 8 周龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠随机分为模型组和罗格列酮组, 另取 10 只 8 周龄野生型 C57/BL 小鼠作为对照组, 3 组均饲喂普通饮食, 罗格列酮组给予罗格列酮 10 mg/(kg·d), 12 周后获取静脉血和主动脉标本。静脉血用于检测血脂和高敏 C 反应蛋白。部分主动脉标本用于病理学检测动脉粥样硬化病变。其余标本用于免疫组织化学和 RT-PCR 检测 FIZZ1 的表达。结果 模型组和罗格列酮组的血脂水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 前二组之间差异无显著性。高敏 C 反应蛋白在前两组水平均较对照组高 ($P < 0.05$), 其中罗格列酮组低于模型组。罗格列酮组和模型组主动脉均形成明显的动脉粥样硬化斑块, 罗格列酮干预组病变较模型组轻。免疫组织化学和 RT-PCR 结果发现, 对照组 FIZZ1 没有表达, 模型组和罗格列酮组均有表达, 且模型组表达量较罗格列酮组显著增高。结论 FIZZ1 在动脉粥样硬化病变中表达增高, 罗格列酮干预后表达可降低, 伴随着动脉粥样硬化斑块面积缩小, 提示罗格列酮具有抗动脉粥样硬化作用, 其机制与调脂无关, 可能与其抑制炎症反应有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects and Mechanisms of FIZZ1 on Atherogenesis in ApoE-knockout Mice

GAO Ling-Yun, LI Fu-Ping, HE Zuo-Yun, and MU Jiao

(Department of Cardiovascular Medicine, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Found in Inflammatory Zone1; Atherosclerosis; Apolipoprotein E knockout Mice; Inflammation; Sensitive CRP; Rosiglitazone

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of found in inflammatory zone1 (FIZZ1) in aortic atherosclerosis lesion and the interventional effect of rosiglitazone in apolipoprotein E-knockout mice. **Methods** Eight-week-old apoE knockout mice were divided into atherosclerosis (As) group ($n = 10$) and rosiglitazone group ($n = 10$). Wildtype C57/BL mice ($n = 10$) were used as normal control group ($n = 10$). All mice were fed with normal chow diet. In addition to normal diet, rosiglitazone group received rosiglitazone 10 mg/(kg·g) of body weight. After 12 weeks, aorta were used for histomorphometric analysis of atherosclerosis lesion, immunohistochemistry and RT-PCR for the expression of FIZZ1. Vessel bloods were collected for plasma lipid and high sensitive CRP (hs-CRP). **Results** There is no significant difference in blood lipid level between As group and rosiglitazone group. The hs-CRP level in As group is significantly higher than that in rosiglitazone group. Histomorphometric analysis showed that the area of atherosclerosis plaque in As group was significantly bigger than that in rosiglitazone group. Immunohistochemistry and RT-PCR showed that the expression of FIZZ1 in As group were higher than that in rosiglitazone group.

Conclusion The expression of FIZZ1 in atherosclerosis lesion was observed. Rosiglitazone can decrease hs-CRP level, reduce the expression of FIZZ1 in aortic atherosclerosis lesion. It is not related to modulation of blood lipid that rosiglitazone inhibits the development of aortic atherosclerosis. Anti-inflammation is a potential mechanism.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种严重危害人类健康的疾病,其形成机制目前尚未完全阐明。然而,Ross 提出的“As 是一种炎症性疾病”备受关注,他指出 As 是动脉壁对各种炎症损伤的炎症

——增殖反应,在此过程中涉及炎症、内膜巨噬细胞聚集、平滑肌细胞的增殖迁移及细胞外基质的聚集等诸多环节。FIZZ1(found in inflammatory zone 1)是 2000 年发现的一个因子^[1],研究表明它在缺氧、炎症等状态下循环单核细胞和激活的巨噬细胞中显著升高,在缺氧引起肺血管重塑的过程中,FIZZ1 可引起肺血管平滑肌细胞的增殖迁移^[2]。在 As 病变中炎症和缺氧同时存在,激活的单核—巨噬细胞明显增多,大量的处于活化状态的巨噬细胞积聚于 As 斑

[收稿日期] 2007-07-13

[修回日期] 2008-03-02

[作者简介] 高凌云,博士,主治医师,讲师,研究方向为动脉粥样硬化的发病机理及防治,联系电话为 023-68774601, E-mail 为 gaolingyun1973@yahoo.com.cn。李福平,博士,主治医师,讲师,研究方向为应激性心律失常发病机制,联系电话为 13228683357, E-mail 为 lifup101@sina.com。通讯作者何作云,教授,博士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及防治。

块及周围动脉组织内。由此推测, As 病变组织中 FIZZ1 表达上调, 并参与 As 的形成和发展。本研究拟建立载脂蛋白 E 基因敲除(载脂蛋白 E^{-/-})小鼠 As 模型, 并测定动脉粥样硬化病变血管组织中 FIZZ1 的表达, 以利于进一步研究 As 发病机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

罗格列酮(商品名文迪雅, 天津葛兰素史克公司提供); 载脂蛋白 E^{-/-}小鼠(遗传背景为 C57/BL, 购于北京大学实验动物中心); 羊抗 FIZZ1 多克隆抗体(Santa Cruz 公司); 即用型 SABC 免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); DAB 显色试剂盒(北京中山生物有限公司); Tripure 及 RT-PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司); 日立 7150 型全自动生物化学分析仪(日本)。

1.2 实验分组及给药方法

20 只 8 周龄, 体重为 20~22 g 雄性载脂蛋白 E^{-/-}小鼠随机分为模型组和罗格列酮组, 每组各 10 只, 两组予普通饮食喂养的同时, 罗格列酮组每天予 10 mg/(kg·d) 罗格列酮(混悬于 5% 羧甲基纤维素钠 0.2 mL 中)灌胃, 模型组仅用 0.2 mL 5% 羧甲基纤维素钠灌胃, 另取 10 只 C57/BL 小鼠作为对照组。共喂养 12 周, 每周记录 1 次体重, 根据体重调整药物剂量。

1.3 标本制备及取材

处死前禁食 12 h。2% 戊巴比妥钠 0.3~0.5 mL 经腹腔麻醉小鼠, 眼球摘除法获得血液标本。然后固定四肢, 剪开胸腹正中皮肤, 分离肌肉及皮下组织, 暴露心脏及主动脉, 一起取出, 将主动脉从心脏(主动脉根部)到髂动脉沿纵轴剖开, 行苏丹Ⅳ染色, 从心脏到主动脉根部标本, 切片进行 HE 染色, 计算每一切面的 As 病变的面积。其余主动脉标本一部分作冰冻切片, 用于免疫组织化学, 一部分标记后锡箔纸包裹放入液氮中。血液标本 1 500 r/min 离心 10 min 后的血清-70℃保存备用。取横切面的小鼠主动脉标本, 常规 HE 染色, Image Pro Plus 5.1 (IPP 5.1 Media Cybernetics, USA) 图像分析计算斑块面积并观察斑块的组织学特点。取纵剖面的小鼠主动脉标本, 常规苏丹Ⅳ染色, 显示病变区域, 然后用数码相机拍照, 输入电脑, 应用 IPP 5.1 图像分析软件分析 As 病变的面积、统计场的面积及病变面积占统计场面积的百分比。

1.4 血管组织 FIZZ1 免疫组织化学检测

用 SABC 法(羊抗小鼠 FIZZ1 多克隆抗体 1:500

稀释)进行, 组织中的棕黄色颗粒为 FIZZ1 的阳性着色, 蓝色为苏木素复染细胞核着色。采用 Image Pro Plus 5.1 图像分析软件半定量分析目的蛋白的表达量, 每张切片随机测定 5 个 400×视野的阳性细胞的积分光密度(I_{OD}), 以均值计算每个标本的 I_{OD} 作为其表达量。

1.5 血管组织 FIZZ1 mRNA 表达的检测

按照《分子克隆》RNA 提取方法提取血管组织总 RNA, 紫外分光光度计检测核酸纯度并定量。利用 Prime 5.0 设计引物并在 NCBI 进行 BLAST 比对, 引物由上海生物工程公司合成, 序列为: 5'端引物为 5'-CAA TCC CAT GGC GTA TAA AAG CAT C-3', 3'端引物为 5'-TCA TTC TTA GGA CAG TTG GCA GCA G-3', 扩增长度 429 bp。β-actin 作为内参照, 扩增长度 205 bp。按照大连 TaKaRa RT-PCR 试剂盒说明书进行操作, PCR 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像仪成像并测定积分光密度(I_{OD})。

1.6 生物化学检测

用日立 7150 全自动生物化学分析仪测定血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和高敏 C 反应蛋白(high sensitive-CRP, hs-CRP)。

1.7 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血清生物化学指标结果

与对照组相比, 模型组和罗格列酮组血脂各项指标除 HDLC 降低外, 其余各指标均显著增高, 而罗格列酮组各项血脂指标均较模型组增高, 但无统计学差异。模型组和罗格列酮组的 hs-CRP 均显著高于对照组, 罗格列酮组显著低于模型组(表 1)。

2.2 动脉粥样硬化病变程度的比较

饲养 12 周后, 对照组的内膜完整性较好, 无 As 病变形。模型组可见内膜完整性破坏, 内膜下大量泡沫细胞聚集, 形成明显的 As 斑块, 而罗格列酮组泡沫细胞聚集程度及 As 斑块面积低于模型组(横切面斑块面积百分比平均降低了 8.99% ($P < 0.01$); 纵切面斑块面积百分比平均降低了 44.53% ($P < 0.01$, 表 2、表 3、图 1 和图 2)。

表 1. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠生物化学指标的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分 组	对照组	模型组	罗格列酮组
TC (mmol/L)	1.967 $\pm$ 0.340	8.125 $\pm$ 0.333 ^a	8.410 $\pm$ 0.313 ^a
TG (mmol/L)	0.557 $\pm$ 0.146	0.962 $\pm$ 0.163 ^a	1.107 $\pm$ 0.140 ^a
LDLC (mmol/L)	0.387 $\pm$ 0.094	6.615 $\pm$ 0.980 ^a	7.275 $\pm$ 0.405 ^a
HDLc (mmol/L)	1.237 $\pm$ 0.256	0.873 $\pm$ 0.117 ^a	0.990 $\pm$ 0.194 ^a
hs-CRP (mg/L)	0.628 $\pm$ 0.047	1.108 $\pm$ 0.086 ^a	0.847 $\pm$ 0.029 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 As 模型组比较。表 2. 各组小鼠主动脉横切面动脉粥样硬化的定量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分 组	斑块面积 (μm^2)	斑块面积/ 原管腔面积	原管腔面积 (μm^2)
对照组	0	0	430 417 $\pm$ 69 420
模型组	73 417 $\pm$ 9 004 ^a	14.87% $\pm$ 2.05% ^a	497 692 $\pm$ 54 056
罗格列酮组	26 885 $\pm$ 9 834 ^{ab}	5.88% $\pm$ 1.89% ^{ab}	452 096 $\pm$ 43 036

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。表 3. 各组小鼠主动脉纵切面苏丹Ⅲ染色动脉粥样硬化病变的定量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

分 组	病变面积 (μm^2)	统计场面积 (μm^2)	斑块面积/ 原管腔面积
对照组	0	30 961 $\pm$ 3071	0
模型组	22 050 $\pm$ 5 085 ^a	31 191 $\pm$ 7 537	71.75% $\pm$ 13.02% ^a
罗格列酮组	8 505 $\pm$ 4 388 ^{bc}	30 199 $\pm$ 10 423	27.22% $\pm$ 4.02% ^{bc}

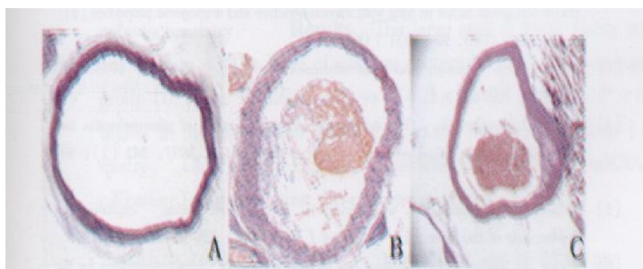
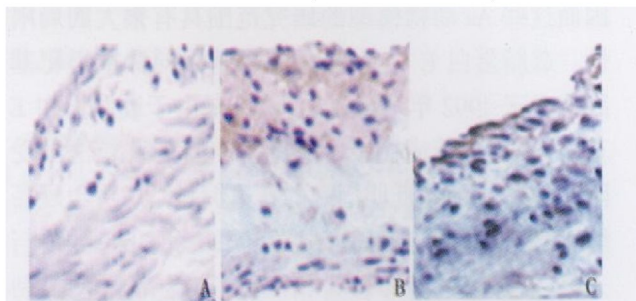
a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。图 1. 各组主动脉横切面观 (HE $\times 100$) A 为对照组横切面: 主动脉内膜完整, 无 As 病变形成; B 为模型组横切面: 形成明显的 As 斑块; C 为罗格列酮组横切面干预: 斑块病变程度较模型组轻。

图 2. 各组主动脉纵剖面观 (苏丹Ⅳ染色) 上图为对照组纵剖面: 内膜光滑, 只见点状橙红色着色; 中图为模型组纵剖面: 内膜不光滑, 可见大片状橙红色着色; 下图为罗格列酮组: 内膜不光滑, 可见橙红色着色但着色面积较模型组小。

2.3 小鼠血管组织 FIZZ1 免疫组织化学结果

对照组 FIZZ1 不表达, 模型组小鼠 As 病变处 FIZZ1 表达明显增强, 其 I_{od} 值为 $129\ 4120 \pm 15\ 868$, 罗格列酮组小鼠 As 病变区 FIZZ1 表达的 I_{od} 值为 $24\ 936 \pm 6\ 233$, 明显降低 ($P < 0.01$, 图 3)。

图 3. 主动脉内膜 FIZZ1 免疫组织化学结果 (IHC, $\times 400$)

A 为对照组: 主动脉内膜光滑, 未见棕黄色阳性颗粒着色; B 为模型组: 棕黄色阳性颗粒呈大片状分布于 As 斑块中; C 为罗格列酮组: 棕黄色阳性颗粒着色程度较模型组明显减轻。

2.4 小鼠血管组织 FIZZ1 mRNA 表达

对照组小鼠主动脉壁没有 FIZZ1 mRNA 表达, 模型组 FIZZ1 mRNA 表达明显增强, 与之相比, 罗格列酮组小鼠主动脉壁 FIZZ1 mRNA 表达较模型组明显减弱, 说明罗格列酮可抑制或下调载脂蛋白 E 基因^{-/-}主动脉壁 FIZZ1 mRNA 的表达 (表 4, 图 4)。

表 4. 各组主动脉 FIZZ1 mRNA/ β -actin mRNA 的影响

分 组	FIZZ1 mRNA/ β -actin mRNA
对照组	0
模型组	2.828 $\pm$ 0.565 ^a
罗格列酮组	1.689 $\pm$ 0.589 ^{ab}

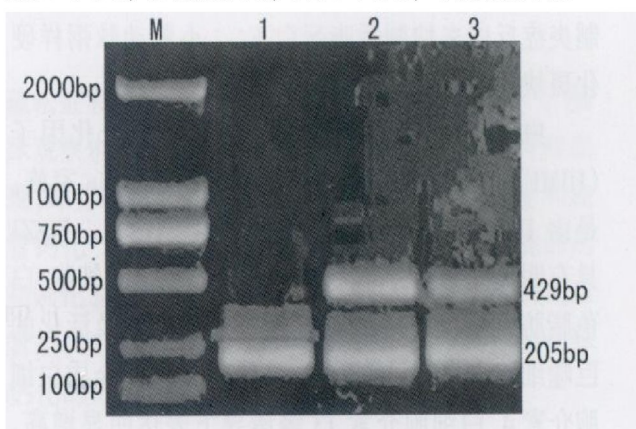
a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

图 4. 主动脉组织 FIZZ1 mRNA 表达 (RT-PCR) M 为 Mark, 1 为对照组, FIZZ1 mRNA 没有表达; 2 为模型组, 表达明显增强; 3 为罗格列酮组, 3 较 2 表达明显减弱。

3 讨论

动脉粥样硬化 (As) 的病因复杂, 其发病与多种

致病因素有关, 脂质代谢紊乱和血管壁的损伤是造成 As 发生的重要因素, 因而, 以往的研究多采用大量脂肪和胆固醇负荷的大、小鼠或品系为 C57/BL 的小鼠制作 As 动物模型。但是这些动物模型在模拟人类 As 发生、发展过程时, 存在着许多不妥之处^[3], 因而这些 As 动物模型的研究范围具有很大的局限性。载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠是应用基因同源重组靶基因技术于 1992 年培育成功, 该小鼠由于载脂蛋白 E 基因敲除后, 造成血浆含胆固醇丰富的残粒清除受阻, 当喂以低脂、低胆固醇的普通饲料时即可出现高胆固醇血症, 并自发地形成纤维斑块和复合斑块, 与人类 As 斑块的分布极为相似, 为进行 As 发病机制和防治的研究提供了有用且可靠的动物模型^[4]。

本实验结果表明, 喂以普通饲料载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠 12 周后, 血清 TC 水平明显升高, 并出现显著的内膜损伤、泡沫细胞形成, 形成显著的 As 斑块。罗格列酮组的血脂水平较 As 模型组有所增高, 但无统计学差异, 但动脉内膜损伤及动脉粥样硬化病变程度较模型组减轻。表明罗格列酮具有抗 As 的作用。

目前越来越多的研究证实动脉粥样硬化不是简单的脂质沉积过程, 局部或全身慢性炎症在粥样硬化斑块的发生、发展中也起到重要作用^[5]。有研究表明, hs-CRP 在心血管疾病(心绞痛、心肌梗死等)发生前增高, 甚至其水平在正常范围内的轻微升高亦与心血管疾病危险性的增加有关^[6]。故 hs-CRP 能预测心血管疾病的发病的危险可能性, 其预测能力可能强于胆固醇水平测定^[7]。本文通过用胶乳凝集反应法测定 hs-CRP, 结果表明, 与对照组比较, As 模型组血清 hs-CRP 明显增高, 而罗格列酮组 hs-CRP 水平较模型组显著降低, 说明罗格列酮可能通过抑制炎症反应来抑制载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块的形成和发展。

FIZZ1 是最近发现的一个缺氧诱导分化因子(HIMF)。FIZZ1 属于富含半胱氨酸的 Resistin 家族, 是由 111 个氨基酸残基构成的分泌型蛋白。FIZZ1 具有明显的分布特异性, 主要位于肺泡上皮细胞、白色脂肪组织、心脏、舌, 同时循环单核细胞及活化的巨噬细胞中也有显著表达。FIZZ1 在炎症介质白细胞介素 4、白细胞介素 13 等诱导下表达明显增高, 此效应与炎症相关转录因子核因子 κ B 的激活有关, 提示 FIZZ1 在炎症过程中可能发挥重要作用。尽管目前并未发现 FIZZ1 在血管平滑肌细胞、内皮细胞

中表达, 但它在炎症状态下循环单核细胞和激活巨噬细胞中有显著升高。本文通过用免疫组织化学和 RT-PCR 法测定 FIZZ1 蛋白和 mRNA 在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉中的表达, 结果表明, 正常对照组 FIZZ1 mRNA 和蛋白无表达, As 模型组和罗格列酮干预组血管组织 FIZZ1 mRNA 和蛋白表达均明显增高, 而后者 FIZZ1 表达量较前者明显降低。

FIZZ1 属于抵抗素家族成员, 和抵抗素一样都包括 N 末端信号序列和严格保守的半胱氨酸残基, 众多的文献均表明噻唑烷二酮类药物如罗格列酮可通过活化巨噬细胞 PPAR γ 受体而抑制抵抗素的表达^[8, 9], 而本实验罗格列酮干预组主动脉 FIZZ1 的表达较模型组明显降低, 可能是罗格列酮抑制了动脉粥样硬化病变中激活的巨噬细胞 FIZZ1 的表达。同时还观察到, 罗格列酮组主动脉粥样硬化病变程度及平滑肌细胞增殖程度较模型组轻, 由此可以推测 FIZZ1 可能还参与了动脉粥样硬化的形成和发展。前述文献表明 FIZZ1 可促进肺微动脉平滑肌细胞增殖和迁移, 参与了肺微血管重构, FIZZ1 是否也通过促进主动脉平滑肌细胞增殖和迁移参与动脉粥样硬化过程还有待后续实验进一步证实。

[参考文献]

- [1] Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein Associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family [J]. *EMBO J*, 2000, **19** (15): 4 046-055.
- [2] Teng X, Li D, Champion HC, et al. FIZZ1/RELMalpha, a novel hypoxia-induced mitogenic factor in lung with vasoconstrictive and angiogenic properties [J]. *Circ Res*, 2003, **92** (10): 1 065-067.
- [3] Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis [J]. *Science*, 1996, **272** (5 262): 685-688.
- [4] Smith JD, Breslow JL. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research [J]. *J Intern Med*, 1997, **242** (2): 99-109.
- [5] MASeri A. Inflammation, atherosclerosis, and ischemic events -- exploring the hidden side of the moon [J]. *N Engl J Med*, 1997, **336** (14): 1 014-016.
- [6] Torres JL, Ridker PM. Clinical use of high sensitivity C-reactive protein for the prediction of adverse cardiovascular events [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2003, **18** (6): 471-478.
- [7] Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men [J]. *Am J Cardiol*, 1999, **84** (9): 1 018-022.
- [8] Samaha FF, Szapary PO, Iqbal N, et al. Effects of rosiglitazone on lipids, adipokines, and inflammatory markers in nondiabetic patients with low high-density lipoprotein cholesterol and metabolic syndrome [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol JT-Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2006, **26** (3): 624-630.
- [9] Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **300** (2): 472-476.

(此文编辑 李玲玲)