

成纤维细胞生长因子 21 对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化病变中内质网应激诱导的凋亡的影响

伍熙, 赵东晖, 范谦, 程姝娟, 张铭, 彭红玉, 柳景华

(首都医科大学附属北京安贞医院 北京市心肺血管疾病研究所, 北京市 100029)

[关键词] 成纤维细胞生长因子 21; 细胞凋亡; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨成纤维细胞生长因子 21(FGF-21)对载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠主动脉中内质网应激诱导的凋亡的影响。方法 将 24 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为动脉粥样硬化模型组(简称模型组)和 FGF-21 组($n=12$),另选 12 只 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组,三组小鼠都给予高胆固醇饮食 4 周,同时 FGF-21 组皮下给予 FGF-21[0.1 mg/(kg·d)]4 周,而模型组和正常对照组给予等量生理盐水。4 周后处死小鼠进行主动脉病理学检测,观察斑块面积,采用放射免疫法检测血浆中 FGF-21 的水平,采用免疫组织化学染色和 Western Blot 检测主动脉成纤维细胞生长因子受体 1(FGFR-1)的表达水平,采用 TUNEL 染色检测主动脉斑块中的细胞凋亡水平,采用 Western Blot 检测主动脉中剪切后 Caspase-12 和 C/EBP 同源蛋白(CHOP)的表达水平。结果 与正常对照组比较,模型组血浆中的 FGF-21 水平及主动脉中 FGFR1 蛋白表达显著升高($P<0.05$),模型组主动脉根部斑块面积、细胞凋亡数量、剪切后 Caspase-12 及 CHOP 蛋白的表达水平增加($P<0.05$);与模型组比较,FGF-21 组主动脉根部斑块面积、细胞凋亡数量、剪切后 Caspase-12 及 CHOP 蛋白的表达水平减少($P<0.05$)。结论 FGF-21 可能通过抑制剪切后 Caspase-12 及 CHOP 相关促凋亡蛋白表达,抑制 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块病变中细胞的凋亡及斑块进展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Fibroblast Growth Factor-21 on Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis in Aorta of Apolipoprotein E-Knockout Mice

WU Xi, ZHAO Dong-Hui, FAN Qian, CHENG Shu-Juan, ZHANG Ming, PENG Hong-Yu, and LIU Jing-Hua

(Department of Cardiology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University & Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Fibroblast Growth Factor-21; Apoptosis; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of fibroblast growth factor-21 (FGF-21) on endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in aorta of ApoE^{-/-} mice. **Methods** Twenty-four male ApoE^{-/-} mice and twelve male C57BL/6J mice were divided into three groups: Control group($n=12$), atherosclerosis group ($n=12$) maintained high fat diet with vehicle administration subcutaneously for 4 weeks, and FGF-21 treatment group($n=12$); the same fat diet with FGF-21 administration subcutaneously[0.1 mg/(kg·d)] for 4 weeks. At the end of the study, all mice were sacrificed to detect the plasma FGF-21 levels, histopathological changes and apoptotic rate in aorta, fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1), cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-12 (Caspase-12) and C/EBP homologous protein (CHOP) expression of the aortas. **Results** Compared with control group, atherosclerosis group fed with a high-fat diet showed upregulated levels of FGF-21 in plasma and FGFR-1 protein expression in aorta, and the plaque area, apoptotic rate, cleaved Caspase-12 and CHOP protein expression in aortas were significantly increased ($P<0.05$). Compared with atherosclerosis group, FGF-21 group showed less plaque area, apoptotic rate, cleaved Caspase-12 and CHOP protein expression in aortas ($P<0.05$). **Conclusion** FGF-21 can inhibit apoptosis and atherosclerosis possibly by inhibiting expression of pro-apoptotic proteins like cleaved Caspase-12 and CHOP in atherosclerotic aorta of ApoE^{-/-} mice.

[收稿日期] 2013-09-21

[基金项目] 国家自然科学基金(81070227);北京市教育委员会科技计划面上项目(KM201110025019)

[作者简介] 伍熙,硕士研究生,主要从事冠心病的基础和临床研究,E-mail 为 xiwu-CN@hotmail.com。通讯作者柳景华,主任医师,教授,博士研究生导师,主要从事急性冠状动脉综合征的基础和临床研究以及介入治疗,E-mail 为 liujinghua@vip.sina.com。

动脉粥样硬化是冠心病的主要病因,病变进展过程中可并发斑块破裂及血栓形成,导致急性心肌梗死及卒中^[1]。大量证据表明,除了氧化应激和炎症等因素,内质网应激也在动脉粥样硬化及斑块破裂中发挥了重要的作用^[2]。慢性内质网应激通过改变肝脏脂质代谢和胰岛 β 细胞功能,影响动脉粥样硬化系统性危险因素,且这种促动脉粥样硬化作用在合并肥胖、胰岛素抵抗及糖尿病等情况下会更加明显^[3]。因此,针对内质网应激的治疗有可能成为抗动脉粥样硬化治疗手段之一。成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor-21, FGF-21)是近年来新发现的激素样成纤维细胞生长因子19亚家族成员,具有包括调节糖脂代谢紊乱在内等多种生理作用^[4]。研究表明,FGF-21可以抑制胰岛 β 细胞凋亡,还可以减少缺血再灌注时心肌细胞的损伤及凋亡^[5,6]。此外,FGF-21可能通过线粒体及内质网应激相关通路拮抗糖尿病诱导的小鼠睾丸细胞凋亡^[7]。目前,FGF-21对动脉粥样硬化血管壁细胞的凋亡及斑块病变的影响尚不明确。本研究采用动脉粥样硬化小鼠模型,观察FGF-21在ApoE^{-/-}小鼠血浆中的表达及外源性FGF-21对斑块病变处细胞凋亡的影响,进一步探讨其拮抗血管壁细胞凋亡和动脉粥样硬化的机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

16周龄雄性ApoE^{-/-}小鼠及雄性C57BL/6J小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司。电泳仪及转膜系统(北京市六一仪器厂);低温超速离心机(美国Therm公司);恒温水浴箱(北京);倒置荧光显微镜和冰冻切片机(德国徕卡公司);ECL化学发光试剂盒(北京普利莱技术公司);X光胶片(美国Kodak公司);FGF-21(美国Phoenix公司);微容量渗透泵(Alzet model 2006,加拿大DURECT公司);油红O(美国Sigma公司);FGF-21放射免疫试剂盒(北京华英生物技术研究);Tunel细胞凋亡检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);成纤维细胞生长因子受体1(fibroblast growth factor receptor-1, FGFR-1)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase-12)、C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)及兔抗鼠多克隆抗体(英国Abcam公司);鼠抗-actin(美国Santa Cruz公司);羊抗鼠(二抗)和

羊抗兔(二抗)(美国Jackson Immuno Research实验室)。

1.2 动脉粥样硬化小鼠模型的建立和FGF-21干预

16周龄雄性ApoE^{-/-}小鼠及雄性C57BL/6J小鼠给予普通饲料喂养适应1周。1周后将24只ApoE^{-/-}小鼠随机分为动脉粥样硬化模型组(简称模型组)和FGF-21组($n=12$),12只C57BL/6J小鼠作为正常对照组。FGF-21组给予FGF-21[0.1 mg/(kg·d)],采用皮下置入微渗透泵给药,其余两组给予等量生理盐水。所有小鼠同时给予高脂饲料(16%猪油+1.25%胆固醇+0.5%胆酸钠+82.25%普通饲料)喂养4周,饮水不限。4周后处死小鼠,检测血浆中FGF-21水平,解剖分离主动脉,部分用于冰冻切片及油红O染色,部分主动脉置-80℃冰箱冻存待实行Western Blot检测。

1.3 放射免疫法检测FGF-21水平

小鼠麻醉后眶后采血,离心收集血浆,并按照FGF-21放射免疫试剂盒说明书检测血浆中FGF-21,由北京华英生物技术研究检测。

1.4 主动脉油红O染色

将主动脉从主动脉弓到髂主动脉分叉完整游离下来,剖开固定在黑蜡块上,并用4%多聚甲醛固定半小时。0.5 g油红O粉末溶解于100 mL 98%异丙醇中,制成油红O母液储存备用;配制工作液时取油红O母液按6:4比例加入蒸馏水稀释,并用滤纸过滤后使用。血管在固定液中固定以后,用PBS液漂洗,在油红O工作液中浸染半小时,然后血管用70%酒精漂洗干净,在日光灯下观察并用数码相机照相。采用Image-ProPlus 6.0软件分析斑块面积。

1.5 血管组织Tunel染色

取血管组织石蜡切片,Tunel染色原位标记凋亡细胞核。切片常规脱蜡入水。4%甲醛溶液室温固定15 min,20 mg/L蛋白酶K室温下消化15 min。加100 μ L平衡缓冲液室温平衡10 min。加入100 μ L TdT工作液37℃湿盒孵育1 h。2 \times SSC溶液洗涤15 min终止反应。Streptavidin HRP工作液室温孵育30 min。DAB显色。PBS液洗涤3次,苏木素复染。分化,返蓝。切片脱水,二甲苯透明,树脂封片。阳性细胞可见胞核裂解,胞质中充满棕黄色物质,正常细胞核染为蓝色。高倍镜(放大400倍)观察并计数凋亡细胞比例。每组小鼠观察4张切片,观察3个视野,取均值。

1.6 Western Blot法检测FGFR-1及内质网应激促凋亡通路相关蛋白

从-80℃冰箱取出主动脉,放入研钵中,按1

mg 组织加入 10 μ L 裂解液(含终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF)裂解组织,收集裂解后的组织液在 4 $^{\circ}$ C 下,8000 r/min 离心 15 min,使用考马斯亮蓝法检测蛋白浓度。常规电泳、转膜、封闭后结合相应的 FGFR-1、Caspase-12 及 CHOP 抗体,内参 β -actin,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜,结合相应的辣根过氧化物酶标二抗。用化学发光试剂盒(ECL)与 NC 膜共孵育后,将膜与光片放入暗盒内曝光,显影后再定影扫描胶片,用 Image J 软件分析条带光密度值。以目的条带与内参的光密度比值评估蛋白表达水平。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad 5.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠血浆中 FGF-21 及主动脉中 FGFR-1 的表达水平

放射性免疫结果显示,给予高脂饮食喂养 4 周后,与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠血浆中 FGF-21 水平明显升高($P < 0.05$;表 1),表明 FGF-21 可以由组织分泌进入循环中,很有可能参与小鼠动脉粥样硬化病程。与正常对照组小鼠相比,模型组主动脉中 FGFR-1 的蛋白表达明显升高($P < 0.05$;表 1 和图 1),提示 FGFR-1 可能代偿性的被激活,并在动脉粥样硬化中发挥作用。

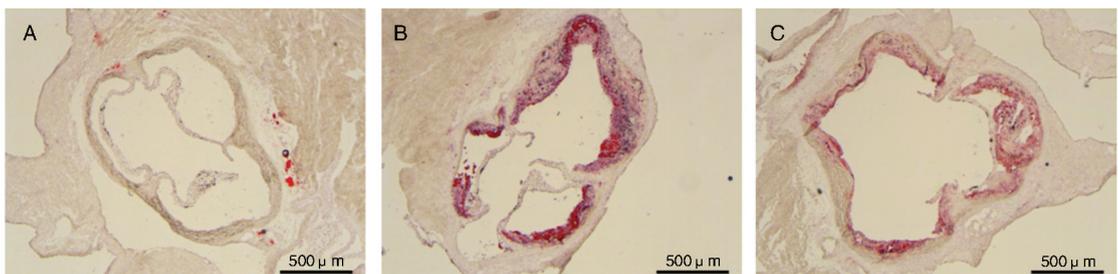


图 2. FGF-21 对脂质斑块形成的影响 A 为正常对照组,B 为模型组,C 为 FGF-21 组。

Figure 2. Effect of FGF-21 on the plaque formation

2.3 FGF-21 对小鼠主动脉细胞凋亡水平的影响

Tunel 染色后,血管壁可见胞核碎裂,呈棕褐色颗粒的细胞即为凋亡细胞。正常对照组血管壁凋亡细胞较少,模型组凋亡率较正常对照组显著增加,FGF-21 组凋亡率则较模型组明显降低($P <$

2.2 FGF-21 对动脉粥样硬化斑块的影响

油红 O 染色结果显示,喂养至 21 周时,正常对照组小鼠主动脉血管内膜光滑,内皮完整,未见动脉粥样硬化斑块形成,模型组主动脉可见明显增厚的内膜中膜,基底膜破坏,脂质沉积明显,可见混合斑块,有坏死区域(图 2)。FGF-21 组内膜病变较模型组明显减轻。正常对照组斑块面积为 0,模型组斑块面积为 $472800 \pm 106245 \mu\text{m}^2$,FGF-21 组斑块面积较模型组显著减少($P < 0.05$;表 2)。

表 1. 小鼠血浆中 FGF-21 及主动脉中 FGFR-1 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Plasma levels of FGF-21 and protein expression of FGFR-1 in aorta of ApoE^{-/-} mice($\bar{x} \pm s$)

分 组	FGF-21 ($\mu\text{g/L}$)($n = 10$)	FGFR-1 蛋白 ($n = 4$)
正常对照组	2.07 ± 0.83	0.30 ± 0.11
模型组	2.73 ± 0.46^a	0.73 ± 0.14^a

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较。

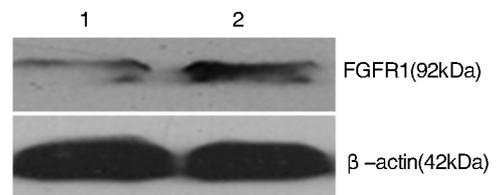


图 1. 小鼠主动脉中 FGFR-1 蛋白表达水平($n = 4$) 1 为正常对照组,2 为模型组。

Figure 1. Expression of FGFR-1 protein in aorta by Western Blot($n = 4$)

0.05 ;图 3 和表 2)。

2.4 FGF-21 对主动脉剪切 Caspase-12 及 CHOP 蛋白表达的影响

与正常对照组相比,模型组主动脉中内质网应激促凋亡相关蛋白剪切后 Caspase-12 及 CHOP 表达

明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组相比, FGF-21 组主动脉中内质网应激促凋亡相关蛋白剪切后 Caspase-

12 及 CHOP 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$; 图 4 和表 3)。

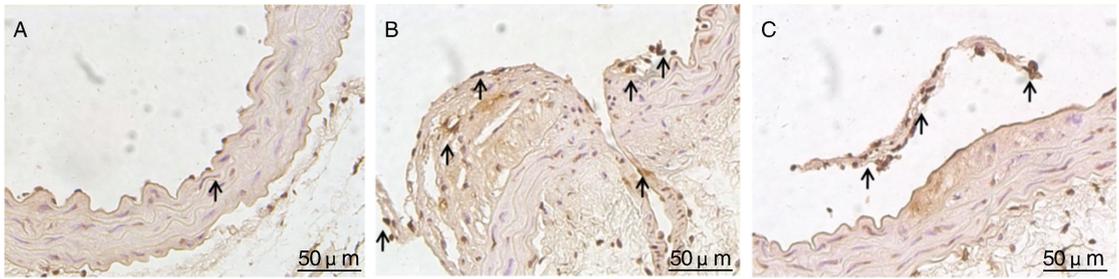


图 3. FGF-21 对小鼠主动脉壁细胞凋亡的影响 A 为正常对照组, B 为模型组, C 为 FGF-21 组。

Figure 3. Effects of FGF-21 on cell apoptosis of aorta

表 2. FGF-21 对斑块面积及主动脉壁细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Effects of FGF-21 on apoptosis rate and plaque area ($\bar{x} \pm s$)

分 组	斑块面积 (μm^2) ($n=9$)	凋亡率 ($n=4$)
正常对照组	0	18.77% \pm 1.31%
模型组	472800 \pm 106245 ^a	58.01% \pm 3.38% ^a
FGF-21 组	303902 \pm 114162 ^b	49.30% \pm 3.15% ^b

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

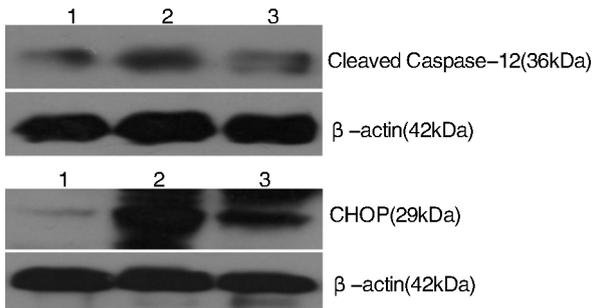


图 4. FGF-21 对小鼠主动脉中剪切 Caspase-12 及 CHOP 蛋白表达的影响 1 为正常对照组, 2 为模型组, 3 为 FGF-21 组。

Figure 4. Effects of FGF-21 on expression of cleaved Caspase-12 and CHOP in aorta

表 3. FGF-21 对主动脉中剪切 Caspase-12 及 CHOP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3. Effect of FGF-21 on expression of cleaved Caspase-12 and CHOP in aorta ($\bar{x} \pm s, n=4$)

分 组	剪切 Caspase-12 蛋白	CHOP 蛋白
正常对照组	0.21 \pm 0.07	0.26 \pm 0.12
模型组	0.42 \pm 0.02 ^a	1.23 \pm 0.13 ^a
FGF-21 组	0.25 \pm 0.07 ^b	0.90 \pm 0.10 ^b

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

3 讨 论

内质网应激在早期是一种保护性反应, 当应激持续存在时, 会转为促凋亡的反应^[3]。大量证据表明, 从动脉粥样硬化的起始病变到斑块晚期, 内质网应激都在其中发挥了重要的作用。内质网应激从多个方面参与动脉粥样硬化进程; 内质网应激可以激活免疫反应; 与炎症介质和活性氧的产生相关; 内质网应激与斑块内细胞凋亡相关, 且不仅局限于巨噬细胞^[2]。动脉粥样硬化进程中, 凋亡调控失常可以引起血管形态、血管壁结构稳定性和代谢的异常。内皮细胞和巨噬细胞等发生内质网应激是其凋亡的重要原因之一。内皮细胞凋亡增加是动脉粥样硬化病变的起始, 而巨噬细胞凋亡促进坏死核的形成^[8]。斑块中细胞大量凋亡不仅直接造成脂质中细胞数量的减少, 而由于巨噬细胞源性泡沫细胞凋亡后形成的凋亡物质难以清除, 将造成继发性坏死和炎症反应^[9]。

FGF-21 由 Nishimura 等在 2000 年从鼠胚胎中分离得到, 主要在肝脏、骨骼肌及胰腺等组织中合成, 而我们实验室在大鼠心肌微血管内皮细胞也发现 FGF-21 的 mRNA 表达^[10]。FGF-21 通过激活 Erk1/2 和 Akt 通路, 改善胰腺细胞功能和生存率^[5]。在心肌组织, FGF-21 能通过激活 FGFR1-P13K-Akt1 通路减少心肌凋亡及梗死范围^[6]。研究表明, 内源性 Akt 和 Erk1/2 的激活在抵抗内质网应激诱导的凋亡中发挥了关键的作用^[11]。我们的前期研究发现, 过氧化体增殖物激活型受体 α 激动剂可以促进 FGF-21 表达并拮抗内皮细胞凋亡^[12]。在脂多糖诱导的脓毒血症小鼠, FGF-21 被刺激产生并可以减弱毒性反应^[13]。本研究中, 与正常对照组小鼠相比, ApoE^{-/-} 小鼠血浆中的 FGF-21 水平明显升

高,在 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉中,FGFR-1 的表达上调,提示 FGF-21 有可能作为一种内源性的保护因子得到上调。此外,外源性给予 FGF-21 减轻动脉粥样硬化病变,提示 FGF-21 可能通过激活其受体及其下游通路发挥抗动脉粥样硬化作用。

细胞凋亡是机体细胞在正常生理或病理状态下发生的一种主动、高度有序、一系列酶参与的程序化死亡过程,以细胞膜皱缩、细胞膜起泡和染色质凝集为特征。因为凋亡受到一系列细胞内生化反应的严格调控,所以控制处理这一过程有可能治疗包括心血管疾病和神经退化性疾病在内的不少疾病状态。为了探究主动脉壁中细胞凋亡减少的相关机制,我们检测了内质网应激通路相关蛋白表达。本实验结果显示,FGF-21 能够抑制血管中剪切 Caspase-12 和 CHOP 蛋白表达。Caspases 属于半胱氨酸蛋白酶家族,它们是程序性细胞死亡的重要调节因子,而且 Caspase-12 只在内质网应激通路中被激活^[14]。CHOP 在内质网应激诱导的凋亡中发挥关键性的作用,CHOP 基因敲除小鼠发生内质网应激时,凋亡是减少的^[15]。长期上调的 CHOP 蛋白可通过作用于细胞内钙代谢或引起 Bcl 家族成员改变而诱发凋亡^[16]。

综上所述,本实验证实内源性 FGF-21 及其受体在动脉粥样硬化小鼠中表达上调,外源性给予 FGF-21 具有延缓动脉粥样硬化斑块形成的作用。FGF-21 可能通过抑制内质网应激促凋亡反应来改善动脉粥样硬化,但其更进一步的信号机制还需深入研究。

[参考文献]

- [1] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead [J]. Cell, 2001, 104(4): 503-516.
- [2] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis [J]. Nat Med, 2010, 16(4): 396-399.
- [3] Brown MK, Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases [J]. Front Physiol, 2012, 3: 263.
- [4] 吕 昀, 柳景华. 成纤维细胞生长因子 21: 参与代谢调节的细胞因子 [J]. 生理科学进展, 2011, 42(3): 234-237.
- [5] Wente W, Efanov AM, Brenner M, et al. Fibroblast

growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways [J]. Diabetes, 2006, 55(9): 2470-478.

- [6] Liu S, Alexei K, Zhang L, et al. Myocardial ischemia-induced hepatic fibroblast growth factor 21 for cardioprotection [J]. Circulation, 2012, 126(2): A12573.
- [7] Jiang X, Zhang C, Xin Y, et al. Protective effect of FGF21 on type 1 diabetes-induced testicular apoptotic cell death probably via both mitochondrial- and endoplasmic reticulum stress-dependent pathways in the mouse model [J]. Toxicol Lett, 2013, 219(1): 65-76.
- [8] 伍 熙, 柳景华. 内质网应激与动脉粥样硬化治疗 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2013, 15(7): 770-772.
- [9] 张 艳, 林玉璧, 孙 雷. 巨噬细胞凋亡与动脉粥样硬化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(5): 406-408.
- [10] 柳景华, 吕 昀, 张立克, 等. 成纤维细胞生长因子 21 基因在心脏中表达的研究 [J]. 心肺血管病杂志, 2009, 28(6): 415-418.
- [11] Hu P, Han Z, Couvillon AD, et al. Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death [J]. J Biol Chem, 2004, 279(47): 49420-429.
- [12] Lu Y, Liu JH, Zhang LK, et al. Fibroblast growth factor 21 as a possible endogenous factor inhibits apoptosis in cardiac endothelial cells [J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(23): 3417-421.
- [13] Feingold KR, Grunfeld C, Heuer JG, et al. FGF21 is increased by inflammatory stimuli and protects leptin-deficient ob/ob mice from the toxicity of sepsis [J]. Endocrinology, 2012, 153(6): 2689-700.
- [14] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. Nature, 2000, 403(6765): 98-103.
- [15] Thorp E, Li G, Seimon TA, et al. Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-} and LDLR^{-/-} mice lacking CHOP [J]. Cell Metab, 2009, 9(5): 474-481.
- [16] Gorman AM, Healy SJ, Jager R, et al. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis [J]. Pharmacol Ther, 2012, 134(3): 306-316.

(此文编辑 许雪梅)