

脂联素在高血压致炎症和心肌纤维化中的作用

尚冬升, 边云飞, 杨慧宇, 杨慧月, 李小雷

(山西医科大学附属第二医院心内科, 山西省太原市 030000)

[关键词] APN; 血管紧张素 II; 高血压; 炎症; 纤维化

[摘要] **目的** 探讨脂联素在高血压致炎症和心肌纤维化中的作用。**方法** 选取纯合脂联素敲除鼠 12 只 ($APN^{-/-}$) 和野生型小鼠 (WT) 12 只, 采用微量泵持续灌注血管紧张素 II (Ang II) [$1500 \text{ ng}/(\text{kg} \cdot \text{min})$, 7 天] 建立高血压模型, 对照组给予乙酸溶液微量泵灌注, 连续灌注 7 天, 实验随机分成 4 组, 每组 6 只: 野生型小鼠对照组 (WT), 野生型小鼠 + 血管紧张素 II 组 (WT + Ang II), $APN^{-/-}$ 对照组 ($APN^{-/-}$), $APN^{-/-}$ + 血管紧张素 II 组 ($APN^{-/-}$ + Ang II), 采用小鼠无创血压计测定小鼠尾动脉血压, 运用 ELISA 法检测血清中 sICAM-1、sVCAM-1、vWF 的含量, 心肌组织 Masson 染色观察心脏纤维化, α -SMA 免疫组化法观察肌成纤维细胞的形成, HE 染色观察炎症细胞浸润, Western blot 法测定 TGF- β 、TNF- α 蛋白表达。**结果** 与 WT 组相比, WT + Ang II 组第二天血压开始升高, 连续监测 7 天, 血压均明显升高 ($P < 0.05$), 造模成功。与 WT + Ang II 组相比, $APN^{-/-}$ + Ang II 组血压显著升高 ($P < 0.05$), 炎症细胞浸润明显增多 ($P < 0.05$), sICAM-1、sVCAM-1、vWF 含量明显增加, TGF- β 、TNF- α 表达显著上调, α -SMA + 肌成纤维细胞数量增多 ($P < 0.05$)。**结论** 在高血压致心脏纤维化过程中, 脂联素可能有保护血管内皮损伤, 抑制炎症反应, 进而抑制心脏纤维化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Role of Adiponectin (APN) in Hypertension II Infusion-induced Cardiac Inflammation and Fibrosis

SHANG Dong-Sheng, BIAN Yun-Fei, YANG Hui-Yu, YANG Hui-Yue, and LI Xiao-Lei

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Adiponectin (APN); Angiotensin II; Hypertension; Inflammation; Fibrosis

[ABSTRACT] **Aim** To research the role of adiponectin (APN) in hypertension-induced cardiac inflammation and fibrosis. **Methods** Select 12 homozygous adiponectin knockout mice ($APN^{-/-}$) and 12 wild-type mice (WT) to establish the hypertension model by using the trace of continuous infusion pump angiotensin II (AngII) ($1500 \text{ ng} \cdot \text{min}$, 7 d), and the control group was given the trace of pump infusion acetic acid solution and for 7 days. The experiment is divided into four groups at random: the control group of wild-type mice (WT, 6), + angiotensin II group of wild type mice (WT + AngII, 6), $APN^{-/-}$ in the control group ($APN^{-/-}$, 6), $APN^{-/-}$ + angiotensin II ($APN^{-/-}$ + AngII, 6), using noninvasive blood to pressure mice tail artery blood pressure, detecting the content of sICAM 1, sVCAM 1 and vWF in serum by using the method of ELISA. Myocardial tissue masson staining was used to observe cardiac fibrosis, α -SMA immunohistochemical method to observe the formation of muscle fibroblasts, HE staining to observe the inflammatory cells infiltration, western blot method to measure TGF- β , TNF- α protein expression. **Results** Compared with WT group, the blood pressure of WT + AngII group begins to rise at the next day, and the blood pressure increases obviously ($P < 0.05$) for seven consecutive days, which explains that the building is successful. Compared with WT + AngII group, the blood pressure of $APN^{-/-}$ + AngII group increases obviously ($P < 0.05$), inflammatory cells infiltration increases obviously ($P < 0.05$), the content of sICAM 1, sVCAM 1, vWF increases obviously, the expression of TGF- β and TNF- α is upregulated obviously, α -SMA + muscle fibroblast populations increase ($P < 0.05$).

Conclusion In the process of high blood pressure caused by cardiac fibrosis, adiponectin maybe protect vascular endothelium injury, inhibiting inflammatory reaction, thereby inhibiting cardiac fibrosis.

[收稿日期] 2014-12-10

[修回日期] 2015-01-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81170198)

[作者简介] 尚冬升, 硕士研究生, 研究方向为高血压与冠心病基础与临床, E-mail 为 405556252@qq.com。通讯作者边云飞, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为高血压与冠心病基础与临床, E-mail 为 yunfeibian@sina.com。

高血压是多种心脑血管病的危险因素,通过影响机体内皮功能、肾素血管紧张素系统、炎症反应、细胞内钙超载等,造成心血管重构^[1],包括心脏肥厚和心肌纤维化。肾素-血管紧张素系统尤其血管紧张素 II,在炎症与心脏纤维化中起着重要的作用,血管紧张素 II 可以直接或者间接激活不同的信号通路来触发高血压中炎症反应和纤维化过程^[2]。1995 年 Scherer 等^[3]首先发现脂肪细胞分泌的一种分泌型血浆蛋白质,后命名为脂联素,其通过抑制巨噬细胞向泡沫细胞的转化,修复损伤的内皮,增加胰岛素敏感性、调节糖类和脂质代谢,发挥抗炎症、抗动脉粥样硬化形成等多种生物学效应。本实验通过 Ang II 微量泵灌注构建高血压模型,通过定性、定量观察分析 APN 对血管内皮损伤因子、心肌纤维化程度、炎症细胞浸润及肌成纤维细胞形成的影响,探索 APN 对血管内皮损伤、心肌炎症反应与纤维化中可能存在的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8~10 周龄野生型雄性小鼠及 APN 敲除型雄性小鼠,体重为 22~24 g,在山西医科大学第二附属医院临床心血管药理实验室动物房饲养及繁殖。

1.2 主要试剂与仪器

血管紧张素 II (10 mg, sigma 公司),10% 水合氯醛(自配)。10% 重铬酸钾、10% 三氯乙酸(YiLi 公司),磷钼酸、酸性复红、丽春红、靛绿、伊红,盐酸分化液(自配), α -SMA 抗体、TNF- α 、TGF- β 抗体(上海生工),多聚赖氨酸、显色剂 DAB(河北博海生物工程开发有限公司),sICAM-1、sVCAM-1、vWF ELISA 试剂盒(上海丰翔生物科技有限公司),植入式胶囊渗透压微量泵(alzetMICRO-OSMOTIC PUPM MODEL 1007D 美国),小动物无创血压测定仪(BP-2000 美国 Vistech),电泳仪:北京六一仪器厂,透射电镜:JEM-CX100;激光扫描共焦显微镜:日本,Olympus FV1000,多功能真彩色细胞图象分析管理系统:美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus。

1.3 血管紧张素 II 灌注高血压模型的建立

野生小鼠及 APN 敲除小鼠,通过皮下植入血管紧张素 II 微量泵灌注[1500 ng/(kg·min),7 天],建立高血压模型,对照组微量泵内直接注入 0.01% 乙酸溶液,用 10% 水合氯醛溶液以 3 mL/kg 腹腔内注射麻醉,小鼠背部皮肤除毛,75% 酒精棉球消毒,剪开皮肤,钝性分离皮下,埋入预置血管紧张素 II

或 0.01% 乙酸的微量泵,缝合皮肤。

1.4 小鼠无创血压测定

采用鼠尾套法测定小鼠尾动脉血压,将小鼠置于加热装置中,加热至 37℃ 3 分钟,接鼠尾套感受器,使小鼠安静。采用测定未经麻醉的、安静状态的小鼠血压,每只小鼠连续测量至少 10 个血压值,取其平均值。

1.5 组织取材、石蜡切片制备

小鼠给予 10% 水合氯醛溶液以 3 mL/kg 腹腔内注射麻醉,待小鼠麻醉后,前胸部开口,暴露心脏,心尖部穿刺,取 2~3 mL 血清(-70℃ 保存,备用)。继续用肝素盐水以 120 mmHg 灌注 5 分钟,取材。组织经 10% 福尔马林固定,酒精脱水、石蜡包埋,垂直于心脏长轴连续切成 5 μ m 的石蜡组织切片。

1.6 Masson 染色

石蜡切片常规脱蜡至水,10% 重铬酸钾与 10% 三氯乙酸 1:1 混合液中,40 min,冲去浮色,洗涤 3 次,0.5% 天晴石兰 5 min,冲去浮色,洗涤 3 次,苏木素溶液 5 min,冲去浮色,洗涤 3 次,0.5% 盐酸酒精分化液中分化数秒,冲洗 5 min,滴染 1% 丽春红:1% 酸性复红(1:2)25 min,1% 磷钼酸 5 min,滴染 2% 靛绿 20 min,1% 磷钼酸数秒,0.5%~1.0% 冰醋酸数秒,脱水、透明、封片,镜检观察心脏纤维化程度,在 Olympus FV1000 显微镜下观察,使用 Image-Pro-Plus 对图像进行分析。

1.7 苏木素-伊红(HE)染色

石蜡切片常规脱蜡至水,苏木素染色 4 min,盐酸酒精分化数秒,水洗返蓝 5 min,伊红染色 3 min,水洗 30 s,脱水、透明、封片、镜检,在 Olympus FV1000 显微镜下观察,使用 Image-Pro-Plus 对图像进行分析。

1.8 免疫组织化学法染色

石蜡切片常规脱蜡至水,1×柠檬酸中抗原高压抗原修复 90 s,自然冷却,1×PBS 洗 3 次,各 3 min,A 液卵白素 15 min,1×PBS 洗 3 次,各 3 min,B 液生物素 15 min,1×PBS 洗 3 次,各 3 min,内源性过氧化物阻断剂 20 min,1×PBS 洗 3 次,各 3 min,血清(此血清不能与一抗抗体同源)封闭,室温 20 min,甩干,加一抗抗体,4℃ 湿盒过夜,次日取出湿盒,室温放置 20 min,1×PBS 洗 3 次,各 3 min,加非生物素二抗抗体 30 min,1×PBS 洗 3 次,各 3 min;DAB 显色;苏木素复染 3 min,自来水洗,盐酸酒精分化数秒,自来水冲洗 5 min;脱水、透明、封片、镜检。采用 Leica 显微镜采集图像,200 倍视野采 10 张图,并使用 NIS-Elements 3.0 进行图像分析。

1.9 应用 ELISA 法测定血清中 sICAM-1、sVCAM-1、vWF 的含量

取出已取好的血清,室温融化,3 000 r/min 离心 20 分钟,仔细收集上清。按 ELISA 操作手册检测 sICAM-1、sVCAM-1、vWF 的含量。

1.10 Western blot 法测定 TGF-β、TNF-α 蛋白表达

提取心肌组织蛋白,测定蛋白浓度。加入蛋白上样缓冲液、加热变性蛋白、聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质、电转膜至硝酸纤维膜、封闭液封闭、依次在一抗及二抗中孵育,化学发光剂显色。Gel ImagingSystem(Bio-Rad) 进行灰度分析。

1.11 统计学处理

数据资料采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析处理,计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,多重比较采用 LSD-t 检验,血压重复测量数据采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脂联素对血管紧张素 II 诱导的高血压小鼠血压的影响

正常小鼠血压为 95 ~ 125/67 ~ 90 mmHg, Ang II 灌注第 2 天后,采用鼠尾管套法测量小鼠血压,连续监测 7 天,结果显示:与 WT 组相比,WT + Ang II 组第二天血压开始升高,连续监测 7 天,血压均明显升高($P < 0.05$),说明造模成功。与 WT + Ang II 组相比,APN^{-/-} + Ang II 组血压显著升高($P < 0.05$;图 1 和表 1)提示 APN 对缺乏可引起小鼠血压进一步升高。

表 2. APN 对血管紧张素 II 诱导的高血压小鼠血管内皮的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Effect of APN on the vascular endothelium of high blood pressure mice induced by angiotensin II ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	VWF	sICAM-1	sVCAM-1
WT 组	6	33.75 ± 0.79	12.59 ± 0.33	34.87 ± 23.162
APN ^{-/-} 组	6	32.33 ± 1.76	13.98 ± 0.31 ^c	142.56 ± 25.123 ^c
WT + Ang II 组	6	36.88 ± 1.42 ^d	14.98 ± 0.29 ^d	296.41 ± 25.123 ^d
APN ^{-/-} + Ang II 组	6	41.46 ± 2.361 ^{ab}	17.97 ± 0.544 ^{ab}	398.97 ± 39.723 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与 WT + Ang II 组比较;b 为 $P < 0.05$, APN^{-/-} 组比较;c 为 $P < 0.05$,A 与 WT 组比较;d 为 $P < 0.05$,与 WT 组比较。

2.3 心肌纤维化程度的比较

Masson 染色结果显示,与 WT 组相比,WT + Ang II 组心脏血管周围及心脏间质纤维化明显加重,与 WT + Ang II 组相比,APN^{-/-} + Ang II 组较心脏纤维化程度进一步加重(图 2-图 4),同时对 α-

2.2 不同组别血清 sICAM-1、sVCAM-1、vWF 含量的变化

与 WT 组比较,WT + Ang II 组 sICAM-1、sVCAM-1、vWF 含量明显升高($P < 0.05$),与 WT + Ang II 组比较,sICAM-1、sVCAM-1、vWF 含量进一步升高($P < 0.05$),提示 APN 对血管紧张素 II 诱导的高血压小鼠血管内皮具有保护作用(表 2)。

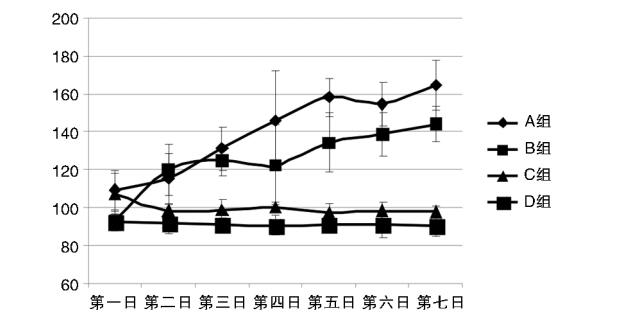


图 1. 各组 7 天血压变化趋势图($\bar{x} \pm s$) A 组为 APN^{-/-} + Ang II 组,B 组为 WT + Ang II 组,C 组为 APN^{-/-} 组,D 组为 WT 组。
Figure 1. Blood pressure change trend chart of each group in 7 days($\bar{x} \pm s$)

表 1. APN 对血管紧张素 II 诱导的高血压小鼠血压的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of APN on blood pressure of high blood pressure mice induced by angiotensin II ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$ (mmHg)
WT 组	6	90.7 ± 5.794
APN ^{-/-} 组	6	97.6 ± 2.951 ^c
WT + Ang II 组	6	144.3 ± 9.499 ^d
APN ^{-/-} + Ang II 组	6	164.6 ± 12.773 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与 WT + Ang II 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 APN^{-/-} 组比较;c 为 $P < 0.05$,与 WT 组比较;d 为 $P < 0.05$,与 WT 组比较。

SMA 阳性区域进行分析,APN^{-/-} + Ang II 组与 WT + Ang II 组比,阳性细胞增多^[4](图 5),表明 APN 在血管紧张素 II 致高血压心肌纤维化中,对心肌纤维化具有保护作用。

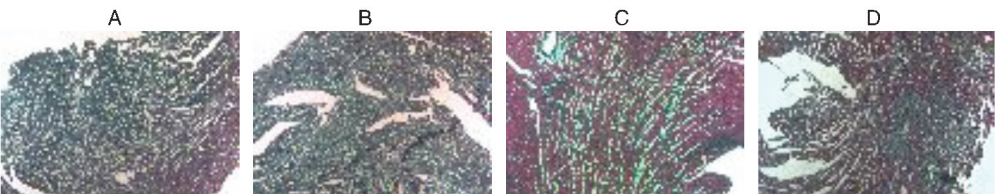


图 2. Masson 染色观察心肌纤维化(×100) A 为 WT 组,B 为 APN^{-/-} 组,C 为 WT + Ang II 组,D 为 APN^{-/-} + Ang II 组。
Figure 2. Masson staining to observe the myocardial fibrosis(×100)

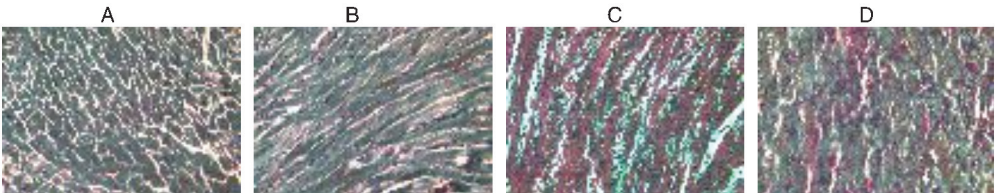


图 3. Masson 染色观察心肌纤维化(×400) A 为 WT 组,B 为 APN^{-/-} 组,C 为 WT + Ang II 组,D 为 APN^{-/-} + Ang II 组。
Figure 3. Masson staining to observe the myocardial fibrosis(×400)

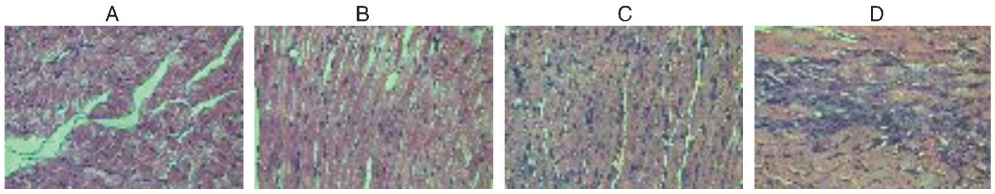


图 4. HE 染色观察炎症细胞浸润(×100) A 为 WT 组,B 为 APN^{-/-} 组,C 为 WT + Ang II 组,D 为 APN^{-/-} + Ang II 组。
Figure 4. HE staining to observe the inflammatory cells infiltration(×100)

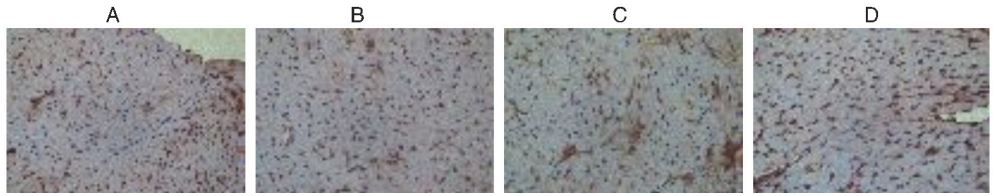


图 5. 免疫组化 α-SMA 染色观察肌成纤维细胞的形成 A 为 WT 组,B 为 APN^{-/-} 组,C 为 WT + Ang II 组,D 为 APN^{-/-} + Ang II 组。
Figure 5. Immunohistochemical α-SMA staining to observe the formation of muscle fibroblasts

2.4 脂联素敲除后对血管紧张素 II 诱导的 TGF-β、TNF-α 表达的影响

Western blot 法测定各组 TGF-β、TNF-α 蛋白表达水平,结果显示,与 WT 组比较,WT + Ang II 组 TGF-β、TNF-α 表达明显升高($P < 0.05$),与 WT + Ang II 组比较,TGF-β、TNF-α 表达进一步升高($P < 0.05$),提示 APN 缺失能促进炎症因子的释放,进一步加重心肌纤维化程度(表 3,图 6)。

3 讨论

心脏纤维化是心室重构的关键环节,其病理特点是肌成纤维细胞形成,细胞外基质沉积^[5]。研究

外的基质大量沉积,从而启动心脏纤维化的级联反应,造成心室重构,导致心衰、心律失常^[6-7]。

血管内皮细胞有调节血管舒缩、维持血液流变学稳定等生理作用,是循环系统发挥正常生理功能的有效保证。本研究采用 APN^{-/-} 小鼠,微量泵持续灌注血管紧张素 II 建立高血压模型,探索 APN 对高血压小鼠血压的影响,结果显示,血管紧张素 II 强烈收缩血管,引起血压升高,APN^{-/-} 小鼠表明 APN 对维持机体血流动力学稳定有保护作用,对高血压的形成、发生、发展有抑制作用。

高血压可损伤血管内皮,引起血管内皮释放炎症因子、启动炎症信号、诱发心脏纤维化级联反应^[8]。本实验结果显示,与对照组相比,血管紧张

表 3. APN 对血管紧张素 II 诱导 TGF-β 及 TNF-α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Effect of APN on TGF-β and TNF-α expression induced by angiotensin II ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	TGF-β	TNF-α
WT 组	6	0.630 ± 0.079 ^{cd}	0.934 ± 0.067 ^{cd}
APN ^{-/-} 组	6	1.177 ± 0.016 ^c	1.096 ± 0.073 ^c
WT + Ang II 组	6	1.133 ± 0.018 ^d	1.243 ± 0.054 ^d
APN ^{-/-} + Ang II 组	6	1.510 ± 0.050 ^{ab}	1.645 ± 0.033 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 WT + Ang II 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 APN^{-/-} 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 WT 组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 WT 组比较。

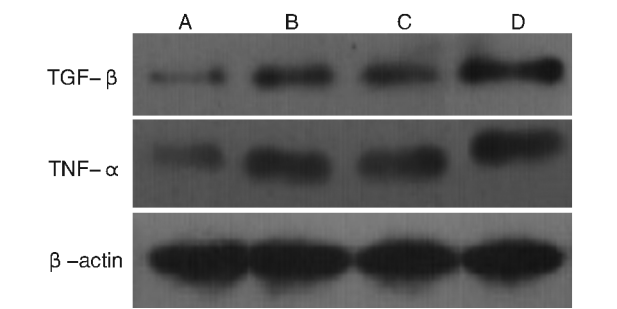


图 6. 脂联素敲除后对血管紧张素 II 诱导的 TGF-β 和 TNF-α 表达的影响 A 为 WT 组, B 为 APN^{-/-} 组, C 为 WT + Ang II 组, D 为 APN^{-/-} + Ang II 组。

Figure 6. Effect of adiponectin knockout on TGF-β and TNF-α expression induced by angiotensin II

素 II 组血清中 sICAM-1、sVCAM-1、vWF 含量明显升高, APN^{-/-} + Ang II 组 sICAM-1、sVCAM-1、vWF 含量进一步升高, 表明 APN 对血管内皮具有保护作用, APN 抑制血压升高的作用可能是通过改善血管内皮功能发挥作用。

研究表明, 血管紧张素 II 可直接激活多种炎症细胞(如巨噬细胞、中性粒细胞等)的浸润, 刺激细胞因子释放及心脏成纤维细胞分泌胶原^[9], 扩大炎症反应, 导致心肌纤维化^[10]。本实验研究结果表明, 与 WT 组相比, WT + Ang II 组心脏血管周围及心脏间质纤维化明显加重, 与以往研究相一致。进一步研究表明, APN^{-/-} + Ang II 组较 WT + Ang II 组心脏纤维化程度明显加重表明 APN 在血管紧张素 II 致高血压心肌纤维化中, 对心肌纤维化具有保护作用。

在心肌病变中, TGF-β1 主要由心肌细胞和成纤维细胞产生, 是与胶原代谢关系最为密切的细胞因子。TGF-β1 通过旁分泌或自分泌的方式刺激成纤维细胞的增生、细胞外基质的沉积(主要是 I 型和

III 型胶原纤维)及心肌细胞的肥大, 从而引发心肌纤维化^[11], TNF-α 可通过活性氧中间体的产生使心肌细胞肥大, 分泌细胞外基质蛋白诱导心肌纤维化; 亦可通过心肌细胞坏死和凋亡的形式导致心肌细胞缺失, 然后纤维组织修复, 导致心肌纤维化^[10]。本研究结果显示, 与 WT + Ang II 组相比, APN^{-/-} + Ang II 组 TGF-β 及 TNF-α 分泌表达显著增加 ($P < 0.05$)。提示 APN 可能是通过减少 TNF-α 及 TGF-β 表达, 进一步抑制心肌纤维化。

本研究采用微量泵灌注血管紧张素 II 简历高血压模型, 发现在高血压致心脏纤维化过程中, 脂联素可能有保护血管内皮损伤, 抑制炎症反应, 进而抑制心脏纤维化, 其具体作用机制仍需进一步研究。

[参考文献]

[1] Cowan BR, Young AA. Left ventricular hypertrophy and enalapril treatment in the angiotensin system blockade[J]. Curr Hypertens Rep, 2009, 11(3): 167-172.

[2] Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation[J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29(7): 367-374.

[3] 黄言瑾, 陈金水. 脂联素国内外研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(2): 234-235.

[4] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors[J]. Cancer, 2000, 89(12): 2637-645.

[5] Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis[J]. J Cell Physiol, 2010, 225(3): 631-637.

[6] 里宏晴, 张志, 焦慧, 等. Apelin-13 对糖尿病大鼠心肌纤维化的影响[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(6): 621-624.

[7] Zhang, Crowley SD. The role of type I angiotensin receptors on T lymphocytes in cardiovascular and renal diseases[J]. Curr hypertension Rep, 2013, 15(1): 39-46.

[8] Kania G, Blyszczuk P, Eriksson U. Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease. Trends Cardiovasc Med. 2009; 19(8): 247-252.

[9] Usha S, Aitk, Rajesh S, et al. Calreticulin transacetylase catalyzed modification of the TNF-α-mediated pathway in the human peripheral blood mononuclear cells by polyphenolic acetates[J]. Chemico-biological Interactions, 2010, 185(3): 263-270.

[10] 杨晓红. 2 型糖尿病大鼠心肌纤维化的炎症机制及阿托伐他汀、罗格列酮及二者联合对心肌的保护作用[J]. 河北医科大学, 博士学位论文[D]2008.

[11] Kania G, Blyszczuk P, Eriksson U. Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease[J]. Trends Cardiovasc Med, 2009, 19: 247-252.

(此文编辑 李小玲)