

鸢尾素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响

谭娟, 刘大男, 何青松, 肖金翠, 钟志雄, 莫显刚

(贵州医科大学附属医院心内科 贵州医科大学医学研究所, 贵州省贵阳市 550004)

[关键词] 鸢尾素; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 研究鸢尾素对载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠动脉粥样硬化的影响。**方法** 将 ApoE^{-/-}小鼠随机分为正常对照组、动脉粥样硬化模型组、鸢尾素组, 每组 10 只, 分别给予普通饮食+生理盐水、高脂饮食+生理盐水、高脂饮食+鸢尾素, 饲养至 12 周后处死, 处死前测体重, 用化学法测定总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量。采用 HE 染色和油红 O 染色分析主动脉粥样斑块面积大小, 实时荧光定量(qRT-PCR)检测主动脉 CD36、NF- κ B p65 的 mRNA 表达, Western blot 检测主动脉 CD36、NF- κ B p65、SOD 的蛋白表达。**结果** 动脉粥样硬化模型组主动脉斑块面积明显高于正常对照组, 内膜明显增厚, 而鸢尾素组较动脉粥样硬化模型组斑块面积减少, 内膜增厚程度下降。与正常对照组比较, 动脉粥样硬化模型组小鼠体重、TC、TG、LDL-C、MDA 水平升高, NF- κ B p65、CD36 mRNA 和蛋白表达增加, 而血清 SOD 活性、HDL-C 水平减低($P<0.05$)。与动脉粥样硬化模型组比较, 鸢尾素组小鼠体重、TC、TG、LDL-C、MDA 水平降低, NF- κ B p65、CD36 mRNA 和蛋白表达下调, 而血清 SOD 活性、HDL-C 水平升高($P<0.05$)。**结论** 鸢尾素能减轻 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的发生发展, 这可能与降低小鼠体重和血脂、抑制炎症反应、抗氧化应激有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The effect of irisin on atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice

TAN Juan, LIU Da-Nan, HE Qing-Song, XIAO Jin-Cui, ZHONG Zhi-Xiong, MO Xian-Gang

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Guizhou Medical University & Institute of Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[KEY WORDS] Irisin; Apolipoprotein E gene knockout mice; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of irisin on the process of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mice. **Methods** ApoE^{-/-} mice were randomly divided into three groups: normol group, atherosclerosis model group and irisin group, each group contained 10 mice. ApoE^{-/-} mice in normol group were fed with normal diet and saline, ApoE^{-/-} mice in atherosclerosis model group were fed with high fat diet and saline, ApoE^{-/-} mice in irisin group were fed with high fat diet and irisin, all mice were fed for 12 weeks. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), the serum levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured by chemical method, HE staining and total oil red O staining were used to analyze the size of aortic atherosclerotic plaque area, the mRNA and protein level of CD36, NF- κ B p65, SOD were detected by real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blot. **Results** The area of aortic plaque in atherosclerosis model group was significantly higher than that in normal group, the area of aorta plaque in irisin group was significantly lower than that in atherosclerosis model group. Compared with normal group, body weight of mice, TC, TG, LDL-C, MDA, the expression of NF- κ B p65 and CD36 mRNA and protein in atherosclerosis model group increased, while the activity of serum SOD and HDL-C levels decreased ($P<0.05$). Compared with atherosclerosis model group, body weight of

[收稿日期] 2017-01-05

[修回日期] 2017-03-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660083);贵州省高层次人才培养计划项目[黔科合人才(2015)4026号];贵州省社会发展攻关项目[黔科合SY(2013)3017号];贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金项目[黔科合人字(2011)26号];贵州省对外合作项目[黔科合省合(2011)7001号]

[作者简介] 谭娟, 硕士研究生, 主要研究方向为冠心病的发病机制与防治, E-mail 为 813155919@qq.com。通讯作者刘大男, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病的发病机制与防治, E-mail 为 Liudanan2000@sina.com。

mice, TC, TG, LDLC, MDA, the expression of NF- κ B p65 and CD36 mRNA and protein in irisin group decreased, while the activity of serum SOD and HDLC levels increased ($P<0.05$). **Conclusion** Irisin can reduce the occurrence and development of atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$ mice, which may be related to its decreasing body weight and blood lipid, inhibition of inflammation and anti-oxidative stress.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是最常见的心血管疾病之一,通过药物减轻 As 的形成早已引起全球关注,但是研究鸢尾素对 As 的影响及机制目前较少见。鸢尾素是一种新发现能转化脂肪类型的新激素,可以作用于白色脂肪细胞,诱导其转化为棕色脂肪细胞,是由Ⅲ型纤连蛋白组件包含蛋 5 (FNDC5)经剪切、修饰后形成的一段约 110 个氨基酸、分子量为 12 kDa 的多肽片段,既往研究证实鸢尾素有消耗能量、减轻体重、白色脂肪组织棕色化、调节糖代谢及脂类代谢的作用等^[1-2]。有研究表明血浆鸢尾素水平的变化可以预测心血管疾病,其高低与心血管疾病关系密切^[3]。近期有研究发现鸢尾素可通过促进内皮细胞增殖从而抑制 As 的形成^[4]。另外, Song 等^[5]研究表明鸢尾素可能具有血管保护作用。本研究通过给载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E knockout, ApoE $^{-/-}$) 小鼠高脂饮食建立 As 模型,进一步研究鸢尾素对 As 的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

鸢尾素购自美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司,高脂饲料(辐照)购自上海普路腾实验动物有限责任公司。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和血脂试剂盒购自南京建成生物工程研究所;CD36 抗体购自 Abcam 公司;SOD 和 NF- κ B p65 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;HRP 标记二抗、鼠抗 β -actin 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 As 模型的建立及分组

8 周龄 ApoE $^{-/-}$ 雄性小鼠 30 只,体重 20 ± 2 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号为 SCXK(京)2012-0001。恒温室内饲养,温度为 25℃,湿度为 55%。适应性饲养 1 周后随机分为 3 组,每组 10 只:正常对照组小鼠给予普通饲料饲养;As 模型组小鼠给予高脂饲料饲养;鸢尾素组小鼠在 As 模型组的基础上经尾静脉注射 2 μ g 鸢尾素(生理盐水配制),每周 2 次;饲养至 12 周末,经戊巴比妥钠麻醉小鼠,留取血清和主动脉。

1.3 取材

用戊巴比妥钠麻醉小鼠,经眼球摘除术采血,离心后取血清, -80℃ 保存备用。采完血后迅速剖开小鼠的胸腹部,从左心室缓慢灌流 PBS。游离主动脉弓至腹主动脉分叉处,部分 -80℃ 保存,用于 qRT-PCR 和 Western blot 检测;部分用 4% 多聚甲醛保存,用于 HE 染色和整体油红 O 染色。

1.4 主动脉斑块面积测定

主动脉整体染色:小鼠采血后,在麻醉下用 PBS 进行灌注,分离获得整体主动脉,清除脂肪和结缔组织后,用 PBS 清洗干净,于 4% 多聚甲醛中固定 48 h,再纵向剖开。主动脉经 60% 异丙醇浸泡 10 min 后进行油红 O 染色 2~3 h, 60% 异丙醇漂洗直到斑块为红色,动脉壁为白色为止,经蒸馏水清洗数次后拍照,观察 As 情况。HE 染色:小鼠主动脉以 4% 多聚甲醛固定后,石蜡包埋,每隔 20 μ m 连续取 4 张切片,进行 HE 染色,观察 As 情况。

1.5 观察指标测定

小鼠于取材前禁食禁饮,测定小鼠最终体重,用直接法测定高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC), 用 COD-PAP 法测定总胆固醇 (total cholesterol, TC), 用 GPO-PAP 酶法测定甘油三酯 (triglyceride, TG), 用 TBA 法测定 MDA, 用 WST-1 法测定 SOD。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测

从 -80℃ 冰箱中取出主动脉,分别在冰上匀浆后提取总 RNA,取 2 μ L 总 RNA 经逆转录酶及随机引物等反应物混合配成 20 μ L 体系, 42℃ 60 min、70℃ 5 min 反转录成 cDNA,随后进行实时荧光定量 PCR。反应条件:95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 共 40 个循环。NF- κ B p65 引物上游为 5'-TCAGACACCTCTGCACTTGG-3', 下游为 5'-GCAGGCTATTGCTCATCACA-3'; CD36 引物上游为 5'-GAGCAACTGGTGGATGTTTT-3', 下游为 5'-GCAGAATCAAGG-GAGAGCAC-3'; 以 β -actin 为内参, β -actin 引物上游为 5'-GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG-3', 下游为 5'-ATGCCACAGGATTCCATACC-3'。

1.7 Western blot 检测

从 -80℃ 冰箱中取出主动脉,分别在冰上匀浆

后用 RIPA 裂解组织,提取蛋白,BCA 法蛋白定量后进行 SDS-PAGE,并将蛋白样品由凝胶转至 PVDF 膜,一抗(NF-κB p65 为 1 : 1000 稀释,CD36 为 1 : 1000 稀释,SOD 为 1 : 1000 稀释,洗涤)于 4℃ 孵育过夜,次日二抗(1 : 5000 羊抗兔 IgG,洗涤)于 37℃ 孵育 2 h,加入发光剂后,用 BandScan 分析胶片灰度值,测定目的条带灰度值,计算其与 β-actin 灰度值的比值。

1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较进行方差齐性检验后采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验,方差不齐用 Dunnett T3 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体重、血脂、SOD 及 MDA 水平比较

As 模型组和鸢尾素组 SOD 活性、HDLc 水平较正常对照组减低,体重、TC、TG、LDLC、MDA 水平较正常对照组升高;鸢尾素组 SOD 活性、HDLc 水平较 As 模型组明显升高,体重、TC、TG、LDLC、MDA 水平较 As 模型组减低(*P*<0.05;表 1)。

表 1. 小鼠体重、血脂、SOD 及 MDA 水平比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1. Comparison of body weight, serum lipids, SOD and MDA($\bar{x}\pm s$)

项 目	正常对照组	As 模型组	鸢尾素组
体重(g)	24.10±1.85	31.69±1.24 ^a	29.19±1.19 ^{ab}
TC (mmol/L)	2.40±0.39	22.72±1.67 ^a	6.72±1.01 ^{ab}
TG (mmol/L)	0.19±0.13	3.91±1.14 ^a	1.39±0.46 ^{ab}
LDLC (mmol/L)	1.22±0.22	5.58±0.40 ^a	5.21±0.39 ^{ab}
HDLc (mmol/L)	2.53±0.90	0.33±0.06 ^a	0.68±0.15 ^{ab}
MDA (μmol/L)	3.87±0.80	11.62±1.61 ^a	6.78±0.70 ^{ab}
SOD (kU/L)	237.90±34.36	108.67±14.52 ^a	140.21±22.06 ^{ab}

a 为 *P*<0.05,与正常对照组比较;b 为 *P*<0.05,与 As 模型组比较。

2.2 主动脉斑块形态学变化

整体油红 O 染色显示,与正常对照组比较,As 模型组主动脉斑块面积明显增加,可见多处红染;而鸢尾素组主动脉斑块面积较 As 模型组减低,红染分布减少(图 1)。HE 染色显示,与正常对照组比较,As 模型组主动脉斑块面积明显增加,内膜明显增厚,表面有大量泡沫细胞覆盖,胆固醇结晶明显增多;而鸢尾素组主动脉斑块面积较 As 模型组减少,内膜增厚程度降低,泡沫细胞及胆固醇结晶减少(图 2)。

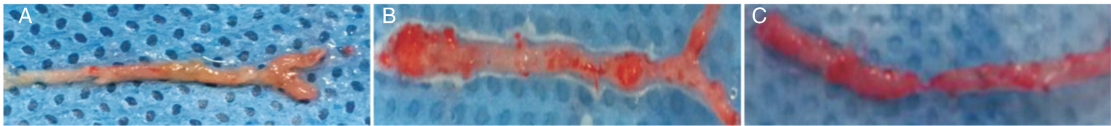


图 1. 小鼠主动脉斑块整体油红 O 染色 A 为正常对照组,B 为 As 模型组,C 为鸢尾素组。

Figure 1. Whole aortas were stained with oil red O

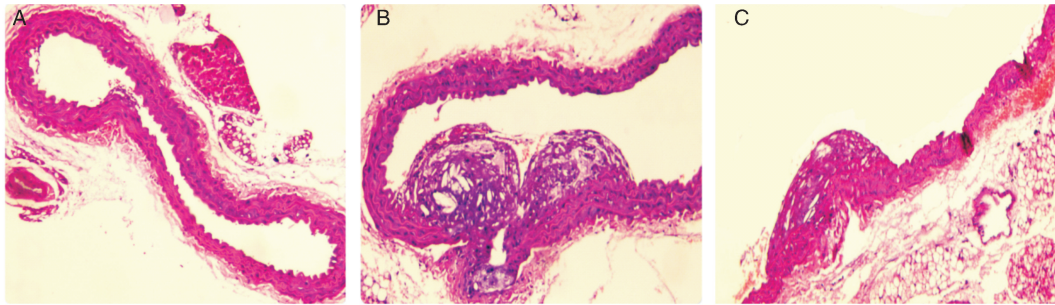


图 2. 小鼠主动脉斑块 HE 染色(100×) A 为正常对照组,B 为 As 模型组,C 为鸢尾素组。

Figure 2. Mice aortic plaques were stained with HE(100×)

2.3 主动脉 NF-κB p65、CD36 mRNA 的表达

与正常对照组比较,As 模型组 NF-κB p65、CD36 mRNA 的表达增加,鸢尾素组 NF-κB p65、CD36 mRNA 的表达较 As 模型组减少(*P*<0.05;图 3)。

2.4 主动脉 NF-κB p65、CD36 及 SOD 的蛋白表达

与正常对照组比较,As 模型组 NF-κB p65、CD36 的蛋白表达增加,SOD 的蛋白表达减低;而鸢尾素组 NF-κB p65、CD36 的蛋白表达较 As 模型组

减少,SOD 的蛋白表达增加($P<0.05$;图 4)。

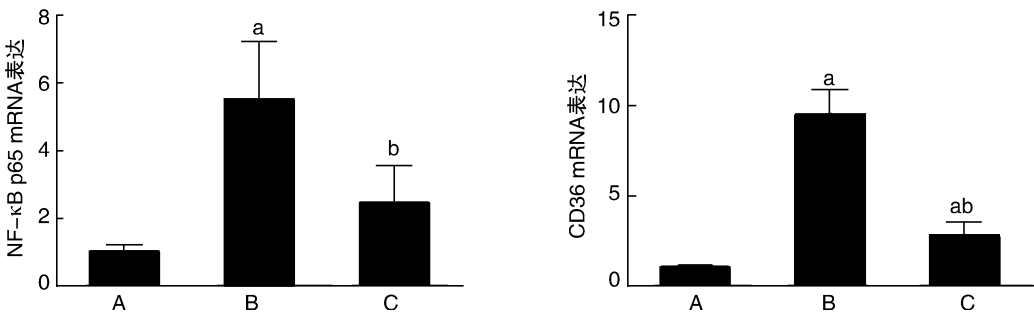


图 3. 主动脉 NF-κB p65、CD36 mRNA 的表达 A 为正常对照组,B 为 As 模型组,C 为 鸢尾素组。a 为 $P<0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 As 模型组比较。

Figure 3. The expression of NF-κB p65 and CD36 mRNA in aorta

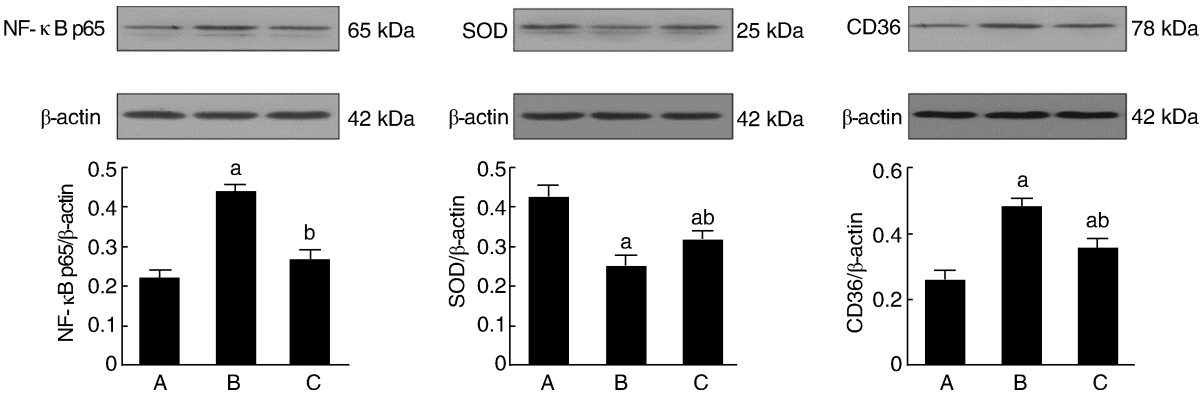


图 4. 主动脉鸢尾素、NF-κB p65、CD36 及 SOD 的蛋白表达 A 为正常对照组,B 为 As 模型组,C 为 鸢尾素组。a 为 $P<0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 As 模型组比较。

Figure 4. The expression of NF-κB p65, CD36 and SOD protein in aorta

3 讨论

本研究在给予 ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食建立 As 模型的基础上,同时给予 鸢尾素作为干预,结果发现,高脂饮食可致 ApoE^{-/-}小鼠形成 As; 鸢尾素对小鼠 As 的产生有抑制作用,鸢尾素组小鼠的主动脉病变程度减轻,斑块面积缩小,内膜增厚明显减轻,可认为 鸢尾素具有抗 As 作用。这与国内卢俊颜等^[6]研究发现 鸢尾素可改善糖尿病 As 结果一致。

脂质代谢紊乱是 As 形成的重要机制之一,血脂异常是导致 As 的主要危险因素^[7-8]。Moreno-Navarrete 等^[9]以高加索人为研究对象,发现循环中 鸢尾素与体质指数、TC 呈负相关。本研究中,高脂饮食可使 ApoE^{-/-}小鼠血脂明显升高,鸢尾素干预后小鼠血清 TC、TG、LDLC 水平降低,血清 HDLC 水平升高,说明 鸢尾素可通过降血脂途径延缓 As 形成。

核因子 κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 对炎性分子转录调控产生重要的影响,血中炎性介质水平升

高对血管内皮功能造成损害,促进 As 的发生和发展。Dichtl 等^[10]发现 VLDL 抑制 NF-κB 激活,能减少内皮细胞黏附分子表达以及单核细胞黏附血管内皮,从而减轻 As 形成。最近 Zhu 等^[11]研究发现腹腔注射 鸢尾素可以抑制高脂膳食 2 型糖尿病小鼠的 NF-κB 形成,从而改善血管内皮功能。Zhang 等^[4]研究发现 鸢尾素可能通过抑制 ox-LDL 诱导细胞凋亡,从而抑制或减轻 As。本研究结果发现,鸢尾素干预可使 As 小鼠主动脉 NF-κB mRNA 和蛋白表达下调,表明 鸢尾素抑制炎症反应,可减轻或延缓 As 进展。

氧化应激在 As 的发生、发展过程中起到重要作用,会引起过量的氧自由基及脂质过氧化物形成,MDA 通常作为氧化应激的一个指标^[12]。在 SOD 抗氧化酶和清除自由基过程中起到关键性作用,通过阻断氧自由基所致的炎性损害,从而保护组织细胞。同时 As 形成中,在高血脂参与下,体内自由基产生和清除失衡,即氧自由基产生增加,而 SOD 活

性下降。朱迪等^[13]研究发现鸢尾素通过抑制氧化应激减轻高糖高脂诱导的内皮细胞损伤。Park 等^[14]等研究表明重组鸢尾素可以减少细胞氧化应激、降低脂类合成与积累。本研究结果发现, 鸢尾素组血清 SOD 活性高于 As 模型组, 而血清 MDA 水平低于 As 模型组, 同时通过 Western blot 检测发现鸢尾素能提高主动脉中 SOD 活性, 表明鸢尾素可能通过清除自由基, 降低高脂所致 As 形成过程中氧化应激反应, 从而抑制或减缓 As 形成。

另外, CD36 作为 B 族清道夫受体, 通过黏附和吞噬 ox-LDL 进入巨噬细胞后形成泡沫细胞, 是 As 形成的基础。许耘红等^[15]研究显示 CD36 能够降低锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 的活性, 而 MnSOD 与动脉硬化密切相关, 故表明小鼠平滑肌细胞动脉硬化的发生可能跟 CD36 抑制 MnSOD 的表达有关。Harb 等^[16]报道 CD36 信号通路介导单核巨噬细胞向 As 病变部位的黏附聚集以及血管壁的炎症反应。Febbraio 等^[17]证实 CD36 的低表达延缓 As 病变形成。本研究结果发现鸢尾素可下调 As 小鼠 CD36 mRNA 和蛋白的表达, 表明鸢尾素可能通过抑制 CD36 的表达, 从而改善 As。

综上所述, 鸢尾素可减轻 As 小鼠的体重, 调节血脂水平, 缩小 As 斑块面积, 抑制 NF- κ B p65、CD36 和 MDA 的生成或表达, 提高保护因子 SOD 活性表达, 从而表明鸢尾素能减轻或延缓 As 的发生发展, 这可能与鸢尾素减轻体重、降脂、抗炎和抗氧化作用相关。另外, 本实验结果发现给予鸢尾素干预后, 鸢尾素组血清 TC、TG、LDLC、MDA 水平及主动脉 NF- κ B p65、CD36 mRNA 和蛋白表达高于正常对照组, 血清 SOD 水平和主动脉 SOD 蛋白表达低于正常对照组。这一结果可能是由于本研究中给予鸢尾素的剂量较小, 尚不足以完全抑制 As 的发生以及相关的血脂、炎症及氧化改变。增加鸢尾素剂量是否能达到更好的抑制效果有待于进一步探讨。目前对鸢尾素药物的影响仍存在较大空缺, 需进一步研究鸢尾素在 As 中的具体机制, 为其在 As 治疗中的应用提供可靠依据。

参考文献

[1] Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis[J]. *Nature*, 2012, 481(7382): 463-468.

[2] Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, et al. Copeptin, adropin and irisin

concentrations in breast milk and plasma of healthy women and those with gestational diabetes mellitus[J]. *Peptides*, 2013, 47: 66-70.

[3] Højlund K, Boström P. Irisin in obesity and type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Complications*, 2013, 27(4): 303-304.

[4] Zhang Y, Song H, Zhang Y, et al. Irisin inhibits atherosclerosis by promoting endothelial proliferation through microRNA126-5p[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(9): e004031.

[5] Song H, Wu F, Zhang Y, et al. Irisin promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation through the ERK signaling pathway and partly suppresses high glucose-induced apoptosis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110273.

[6] 卢俊颜, 向光大, 梅 稳, 等. 鸢尾素改善载脂蛋白 E 基因敲除糖尿病小鼠动脉粥样硬化[J]. *中国循环杂志*, 2015, 30(5): 492-497.

[7] Koschinsky ML, Boffa MB. Lipoprotein(a): an important cardiovascular risk factor and a clinical conundrum[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2014, 43(4): 949-962.

[8] Zurić I, Djurić T, Koncar I, et al. Apolipoprotein E gene polymorphisms as risk factors for carotid atherosclerosis[J]. *Vojnosanit Pregl*, 2014, 71(4): 362-367.

[9] Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, et al. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(4): E 769-778.

[10] Dichl W, Nilsson L, Goncalves I, et al. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor- κ B in endothelial cells[J]. *Circ Res*, 1999, 84(9): 1 085-094.

[11] Zhu D, Wang H, Zhang J, et al. Irisin improves endothelial function in type 2 diabetes through reducing oxidative/nitrosative stresses[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 87: 138-147.

[12] Estrbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes[J]. *Free Radic Biol Med*, 1991, 11(1): 81-128.

[13] 朱 迪, 张小天, 刘 毅, 等. 鸢尾素通过抑制氧化应激减轻高糖高脂诱导的人脐静脉内皮细胞损伤[J]. *心脏杂志*, 2015, 27(5): 506-509.

[14] Park MJ, Kim D I, Choi JH, et al. New role of irisin in hepatocytes: the protective effect of hepatic steatosis in vitro[J]. *Cell Signal*, 2015, 27(9): 1 831-839.

[15] 许耘红, 何穗榕, 李丽青. 小鼠 CD36 在 oxLDL 降低 MnSOD 活性中的相关性研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(4): 312-314.

[16] Harb D, Bujold K, Febbraio M, et al. The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(1): 42-51.

[17] Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, et al. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(27): 19 055-062.

(此文编辑 文玉珊)