

网膜素能降低糖尿病动脉硬化大鼠主动脉胶原Ⅲ含量

郑辉^{1,2}, 常宝成¹, 葛焕琦², 张春风², 李雪粉²

(1. 国家卫生健康委员会激素与发育重点实验室 天津市代谢性疾病重点实验室 天津医科大学代谢病医院内分泌研究所, 天津市, 300070; 2. 泰达国际心血管病医院内分泌科, 天津市 300457)

[关键词] 网膜素; 糖尿病; 动脉硬化; 胶原; 基质金属蛋白酶; 氧化应激; 大鼠

[摘要] **目的** 探讨过表达网膜素对糖尿病动脉硬化大鼠主动脉胶原含量的影响。**方法** 选用60只1月龄雄性Wistar大鼠,按随机数字表法分为正常对照组(NC组; $n=8$)和实验组($n=52$)。实验组采用高脂高糖饲料喂养联合尾静脉注射2%链脲佐菌素(30 mg/kg),建立糖尿病大鼠模型;成模的糖尿病大鼠再灌胃给予维生素D3(70万 IU/kg),继续喂养16周,建立糖尿病合并动脉硬化大鼠模型。将最终24只糖尿病动脉硬化大鼠,依随机数字表法分为糖尿病动脉硬化组(DAC组; $n=8$)、糖尿病动脉硬化+空病毒组(DAC+E组; $n=8$)和糖尿病动脉硬化+网膜素组(DAC+O组; $n=8$)。将150 μ L携带人网膜素基因ITLN1-AAV9的腺相关病毒和携带空质粒的病毒经尾静脉分别注射至DAC+O组和DAC+E组,等量生理盐水注射至NC组和DAC组。继续高脂饲料喂养4周,处死大鼠,测定血清及肝脏网膜素、血脂水平;取主动脉进行HE染色;应用定量实时聚合酶链反应测定胶原I、III、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9 mRNA含量;Western blot测定主动脉胶原I、III、MMP-2、MMP-9蛋白含量;黄嘌呤氧化酶法测定主动脉超氧化物歧化酶(SOD)含量,硫代巴比妥酸缩合法测定主动脉丙二醛(MDA)水平。**结果** (1)与NC组相比,糖尿病动脉硬化大鼠血清中大鼠网膜素水平显著下降。给予携带人网膜素基因的腺相关病毒静脉注射后,在DAC+O组的大鼠血清中测定人网膜素为(101.0 \pm 0.2) μ g/L,肝脏中测得人网膜素为(98.3 \pm 1.9) μ g/L,在其他组别的相应组织中未测出人网膜素。(2)与DAC组相比,DAC+E组和DAC+O组血清血脂谱和主动脉MDA均显著下降,SOD升高,但后2组间差异无统计学意义。(3)DAC组主动脉内膜部分脱落,平滑肌增生,局部透明变性并钙化。DAC+O组内膜完整,局部管壁增厚,平滑肌增生和钙化程度较DAC组明显改善。(4)与DAC+E组相比,DAC+O组胶原I、III mRNA表达显著下降,胶原III蛋白表达显著下降。与DAC+E组相比,DAC+O组MMP-2、MMP-9的mRNA和蛋白表达差异均无统计学意义。**结论** 在糖尿病动脉硬化大鼠体内,过表达人网膜素能减少主动脉胶原III的表达量,减轻动脉硬化,对氧化应激水平无明显影响。

[中图分类号] R543;R363

[文献标识码] A

Omentin can reduce the content of collagen III in aorta of diabetic atherosclerosis rats

ZHENG Hui^{1,2}, CHANG Baocheng¹, GE Huanqi², ZHANG Chunfeng², LI Xuefen²

(1. Key Laboratory of Hormone and Development, National Health and Wellness Committee & Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases & Institute of Endocrinology, Metabolism Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Endocrinology, Teda International Cardiovascular Hospital, Tianjin 300457, China)

[KEY WORDS] omentin; diabetes; arteriosclerosis; collagen; matrix metalloproteinase; oxidative stress; rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of overexpression of omentin on collagen content in aorta of diabetic atherosclerosis rats. **Methods** 60 one-month-old male Wistar rats were randomly divided into normal control group (NC group; $n=8$) and experimental group ($n=52$). The experimental group was fed with high-fat and high-sugar diet and injected 2% streptozotocin (30 mg/kg) into tail vein to establish diabetic rat model. The diabetic rats were fed with vitamin D3 (700,000 IU/kg) for 16 weeks to establish a diabetic rat model with arteriosclerosis. 24 diabetic atherosclerosis rats were randomly divided into diabetic atherosclerosis group (DAC group; $n=8$), diabetic atherosclerosis plus empty

[收稿日期] 2018-07-27

[修回日期] 2018-09-21

[基金项目] 国家自然科学基金(81774043);天津市滨海新区重点支持项目(2013BWKZ006)

[作者简介] 郑辉,硕士,副主任医师,研究方向为糖尿病与大血管并发症,E-mail为 zhui0123@163.com。通信作者常宝成,博士,主任医师,研究方向为糖尿病与肾病,E-mail为 16464768@qq.com。

virus group (DAC+E group; $n=8$) and diabetic atherosclerosis plus omentin group (DAC+O group; $n=8$). 150 μL adeno-associated virus carrying human omentin gene ITLN1-AAV9 and 150 μL virus carrying empty plasmid were injected into DAC+O group and DAC+E group via tail vein, respectively, and equivalent physiological saline was injected into NC group and DAC group. The rats were fed with high-fat diet for 4 weeks. The serum and liver omentin and blood lipid levels were measured. The aorta was taken for HE staining. Quantitative real-time polymerase chain reaction was used to determine the contents of collagen I, III, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 mRNA. Protein contents of collagen I, III, MMP-2 and MMP-9 in aorta were determined by Western blot. The content of aortic superoxide dismutase (SOD) was determined by xanthine oxidase method. Aortic malondialdehyde (MDA) levels were measured by thiobarbituric acid condensation method.

Results (1) Compared with NC group, the level of serum omentin in diabetic atherosclerosis rats decreased significantly. After intravenous injection of adeno-associated virus carrying human omentin gene, in DAC+O group, the serum and liver levels of human omentin were 101.0 ± 0.2 and $98.3 \pm 1.9 \mu\text{g/L}$, respectively. Human omentin was not detected in corresponding tissues of other groups. (2) Compared with DAC group, serum lipid profile and aortic MDA in DAC+E group and DAC+O group decreased significantly, while SOD increased, but there was no significant difference between the latter two groups. (3) In DAC group, aortic intima was partially exfoliated, smooth muscle was proliferated, local hyalinization and calcification were observed. In DAC+O group, the intima was intact, the local wall was thickened, the degree of smooth muscle proliferation and calcification was significantly improved compared with DAC group. (4) Compared with DAC+E group, the expressions of collagen I and III mRNA and collagen III protein in DAC+O group decreased significantly. Compared with DAC+E group, there was no significant difference in the expressions of MMP-2, MMP-9 mRNA and protein in DAC+O group.

Conclusion In diabetic atherosclerosis rats, overexpression of human omentin can reduce the expression of collagen III in aorta, alleviate atherosclerosis, and has no significant effect on oxidative stress level.

2 型糖尿病是动脉粥样硬化斑块形成的主要危险因素。斑块破裂是一个损伤与应答的病理过程,炎症反应引起平滑肌细胞迁移至内皮下产生胶原,形成纤维帽,平滑肌细胞凋亡导致纤维帽内胶原生成减少,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)使胶原降解增加,共同导致纤维帽变薄是易损斑块的特点之一。2 型糖尿病合并易损斑块发生率较高,机制不明。网膜素是新发现的脂肪因子。临床研究表明网膜素具有抗动脉粥样硬化的作用,它在急性冠状动脉综合征和 2 型糖尿病患者血清中含量均明显下降。它具有抗炎、舒张血管、抑制血管钙化等作用,而它是否对平滑肌细胞的胶原合成和降解过程产生影响,尚不清楚。本研究评估了在糖尿病动脉硬化大鼠体内过表达网膜素对主动脉胶原和 MMP 表达以及对氧化应激水平的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物造模

健康清洁级 1 月龄雄性 SPF 级近交系 Wistar 大鼠 60 只,购自天津医科大学动物实验中心,体质量约为 80~100 g,适应性喂养 3 天后称重,采用随机数字表法分为正常对照组(normal control group)(NC 组; $n=8$)和 2 型糖尿病造模组(实验组; $n=$

52),NC 组饲以基础饲料,2 型糖尿病造模组喂以高脂高糖饲料(20%蔗糖,10%猪油,5%胆固醇,1%胆酸,64%标准饲料)。饲养环境为多层层流架,每笼 5 只,自由饮水摄食,室温 20~25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~70%,12 h 光照周期。喂养 8 周后,大鼠隔夜空腹 12 h 后腹腔注射,其中 2 型糖尿病造模大鼠尾静脉注射 2%链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 30 mg/kg,应用 pH 4.4 的 0.1 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液配制。未成模者在注射后 1 周再注射 1 次,并在此期间继续喂以高糖高脂饲料。NC 组注射相当剂量的柠檬酸钠缓冲液并喂以普通饲料。2 型糖尿病判定标准为:注射后第 3、7 日尾尖部取血测定血糖,如随机血糖 $\geq 16.9 \text{ mmol/L}$,或出现多饮、多尿、消瘦、乏力、懒动等症状且连续 2 次随机血糖 $> 11.1 \text{ mmol/L}$,即视为 2 型糖尿病大鼠建模成功。52 只大鼠中 46 只建模成功。

46 只 2 型糖尿病大鼠按 70 万 IU/kg 的维生素 D3 灌胃,分 3 天给完,灌胃后死亡 6 只,其余大鼠继续喂高脂饲料,期间每周处死实验组大鼠 1 只,取主动脉,经过固定、脱水包埋、切片、染色。饲养至整个实验的 24 周时,主动脉切片可见内膜细胞增生及内皮下出现淡染的空泡细胞等动脉粥样硬化早期病变,或者可见中膜平滑肌细胞增生、排列紊乱或隆起呈斑块状结构,有些部位中膜有明显的钙化形

成,钙化区周围出现泡沫样细胞,表明动脉硬化大鼠造模成功。46只糖尿病大鼠中24只糖尿病动脉硬化大鼠进入下一阶段实验。NC组同时用等量生理盐水灌胃,继续喂养标准饲料16周。

1.2 携带网膜素基因的腺相关病毒的制备

本实验所用的网膜素-腺相关病毒的制备由汉恒生物公司制作。应用pHBAAV-CMV-ZsGreen作为过表达载体,经过目的基因扩增、载体连接、转化、测序、病毒扩增和纯化等步骤,最终获得ITLN1(人网膜素的基因名称)滴度为 1.5×10^{12} ng/L。可以进行直接的体内注射。

将成模的大鼠24只以随机数字表法分为糖尿病动脉硬化组(diabetic arteriosclerosis control group)(DAC组, $n=8$)、糖尿病动脉硬化+空病毒组(diabetic arteriosclerosis empty-adenovirus associated virus group)(DAC+E组, $n=8$ 只)和糖尿病动脉硬化+网膜素组(diabetic arteriosclerosis omentin-adenovirus associated virus group)(DAC+O组, $n=8$ 只)。DAC+E组和DAC+O组分别经尾静脉注射携带空载体的病毒和携带ITLN1-AAV9的腺相关病毒(150 μ L),DAC组尾静脉注射150 μ L生理盐水,继续高脂饲料喂养4周,整个实验的28周时处死大鼠,取血清、主动脉组织进行下一步实验。

1.3 大鼠血清生物化学指标的测定

于实验的28周末,所有大鼠隔夜空腹,测量体质量、尾尖静脉血糖,以10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉下股动脉取血,离心,留取血清,留取自主动脉根部至肾动脉的动脉组织,部分置于冻存管于 -80 $^{\circ}$ C冰箱保存,部分于福尔马林溶液浸泡。

血清用于检测总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、大鼠网膜素、人网膜素等指标,其中TC、LDLC、TG、HDLC应用全自动生物化学分析仪测定,大鼠和人网膜素应用酶联免疫吸附法(ELISA)测定,批内变异系数(CV) $<5\%$,批间CV $<10\%$,ELISA试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司;留取全血应用高效液相色谱法测定大鼠糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)。

1.4 大鼠主动脉胶原I、III和MMP-2、MMP-9 mRNA和蛋白表达的测定

取冰冻保存的主动脉组织一部分,采用Western blot法测定大鼠主动脉内胶原I、III和MMP-2、MMP-9蛋白表达水平,相关抗体从武汉博士得生物

工程有限公司购买;用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),硫代巴比妥酸缩合法测定血清中的丙二醛(malondialdehyde, MDA),试剂盒购自南京建成科技有限公司。

应用定量实时聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测大鼠主动脉内胶原I、III和MMP-2、MMP-9 mRNA表达量。取冰冻主动脉,用超纯RNA提取试剂(TaKaRa Code D9108B)提取组织样本中总RNA。胶原I:正向:5'-AAGGTTTCACCCGCAACTCA-3',反向:5'-CGTAGCCGTTTCATGCTTGTG-3',扩增片段108 bp;胶原III:正向:5'-TTCCTGGGAGAAATGGCGAC-3',反向:5'-CCAGGATAGCCACCCATTCC-3',扩增片段169 bp;MMP-2:正向:5'-CAATACCTGAACACTTTCTA-3',反向:5'-GGTCAAGGTCACCTGTCTGG-3',扩增片段80 bp;MMP-9:正向:5'-GATCCCCAGAGCGT-TACTCG-3',反向:5'-GTTGTGGAACTCACACGCC-3',扩增片段132 bp;内参GAPDH:正向:5'-CG-TATCGGACGCCTGGTT-3',反向:5'-GTGCCGTTGAACTTGCCG-3',扩增片段140 bp。取5 μ L RNA用1%琼脂糖凝胶进行电泳,以检测RNA的完整性。用反转录试剂盒中的gDNA Eraser(TaKaRa Code DRRO47A)对RNA中残留的基因组DNA进行消化处理。用反转录试剂盒(TaKaRa Code DRRO47A)进行反转录,用ABI 7500型荧光定量PCR仪检测,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据的相对定量分析。

1.5 统计分析

应用SPSS 11.0软件进行统计分析,所有资料均进行正态及方差齐性检验,正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布数据以中位数(最小值、最大值)表示,正态分布及方差齐的资料,采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验,不符合正态检验的资料,采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量及生物化学指标

实验结束时,在DAC+O组的大鼠血清中测定人网膜素为(101.0 \pm 0.2) μ g/L,肝脏中测得人网膜素为(98.3 \pm 1.9) μ g/L,在其他组别的相应组织中未测出人网膜素。与DAC组相比,DAC+E组和DAC+O组的体质量、HbA1c、血清网膜素水平差异无统计学意义,血脂和MDA含量均下降,降至对照组水平,SOD升高。与DAC+E组相比,DAC+O组血脂

谱和氧化应激水平差异无统计学意义(表 1)。

表 1. 实验结束时各组大鼠体质量及生物化学指标比较

Table 1. Comparison of body weight and biochemical indexes of rats in each group at the end of the experiment

项 目	NC 组 (n=8)	DAC 组 (n=8)	DAC+E 组 (n=8)	DAC+O 组 (n=8)	F 值	P 值
体质量(g)	611.1±42.7	379.5±36.5 ^a	404.3±48.0 ^a	416.4±98.4 ^c	24.045	0.000
随机血糖 (mmol/L)	5.1±0.6	20.2±2.1 ^a	25.8±3.8 ^{ab}	25.9±8.8 ^{ab}	32.098	0.000
TC (mmol/L)	2.1±0.2	5.5±3.0 ^a	2.1±0.1 ^b	1.9±0.2 ^b	9.690	0.000
TG (mmol/L)	2.6±0.8	5.3±4.0 ^a	1.4±0.1 ^b	1.4±0.1 ^b	4.470	0.011
LDLC (mmol/L)	1.7±0.1	3.2±1.6 ^a	1.7±0.2 ^b	1.6±0.2 ^b	8.554	0.001
HDLc (mmol/L)	0.4±0.0	0.5±0.1 ^a	1.2±0.7 ^b	0.5±0.1 ^b	3.006	0.000
大鼠网膜素 (μg/L)	78.0±12.1	51.5±15.1 ^a	60.7±13.1	69.6±12.9	5.683	0.004
人血清网膜素 (μg/L)	-	-	-	101.0±0.2	-	-
人肝脏网膜素 (μg/L)	-	-	-	98.3±1.9	-	-
SOD (kU/L)	94.3±6.7	94.0±2.5 ^a	98.3±2.9 ^{ab}	98.3±2.6 ^b	3.043	0.045
MDA (μmol/L)	5.0±0.3	8.2±3.8 ^a	4.9±0.5 ^b	5.2±0.5 ^b	5.300	0.005
HbA1c (%)	5.2±0.3	25.3±10.7 ^a	28.0±9.2 ^a	19.91±7.7 ^a	12.858	0.000

a 为 $P<0.05$,与 NC 组比较;b 为 $P<0.05$,与 DAC 组比较;c 为 $P<0.05$,与 DAC+E 组比较。

2.2 各组大鼠主动脉组织病理染色结果

光镜下,NC 组:动脉结构清晰,形态正常,管壁各层结构存在,排列规整。DAC 组:动脉结构清晰,管壁各层广泛变性坏死,伴钙化形成。DAC+E 组:血管壁结构清晰,形态正常,内膜部分脱落,平滑肌增生,局部透明变性并钙化。DAC+O 组:血管壁结构清晰,形态正常,内膜完整,局部管壁增厚,平滑肌排列稍紊乱(图 1)。

2.3 各组大鼠主动脉胶原 I、Ⅲ和 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达

qRT-PCR 结果显示,与 DAC 组相比,DAC+E 组和 DAC+O 组胶原 I、Ⅲ和 MMP-2、MMP-9 的 mRNA

表达均下降,差异有统计学意义;与 DAC+E 组相比,DAC+O 组胶原 I、Ⅲ mRNA 表达量进一步下降,MMP-2、MMP-9 mRNA 表达量差异无统计学意义(表 2)。

2.4 各组大鼠主动脉胶原 I、Ⅲ和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达

Western blot 结果用 Image J 软件分析灰度值,以样品测定值与内参的比值表示。与 DAC 组比较,DAC+E 组胶原 I、Ⅲ和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达差异无统计学意义。与 DAC+E 组相比,DAC+O 组胶原 I、Ⅲ、MMP-2、MMP-9 蛋白表达量下降,差异有统计学意义;胶原 I 蛋白表达无显著差异(表 3、图 2)。

表 2. 各组大鼠主动脉胶原 I、Ⅲ、MMP-2、MMP-9 mRNA 表达比较

Table 2. Comparison of expressions of collagen I, III, MMP-2 and MMP-9 mRNAs in aorta of rats in each group

分 组	n	胶原 I mRNA	胶原 III mRNA	MMP-2 mRNA	MMP-9 mRNA
NC 组	8	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
DAC 组	8	1.9±0.4 ^a	1.9±0.4 ^a	1.6±0.2 ^a	1.5±0.3 ^a
DAC+E 组	8	1.6±0.1 ^{ab}	1.6±0.1 ^{ab}	1.2±0.1 ^{ab}	1.3±0.1 ^a
DAC+O 组	8	1.1±0.4 ^{bc}	1.2±0.5 ^{bc}	1.2±0.3 ^b	1.1±0.3 ^b
F 值	-	16.708	12.988	12.521	8.916
P 值	-	0.000	0.000	0.000	0.000

a 为 $P<0.05$,与 NC 组比较;b 为 $P<0.05$,与 DAC 组比较;c 为 $P<0.05$,与 DAC+E 组比较。

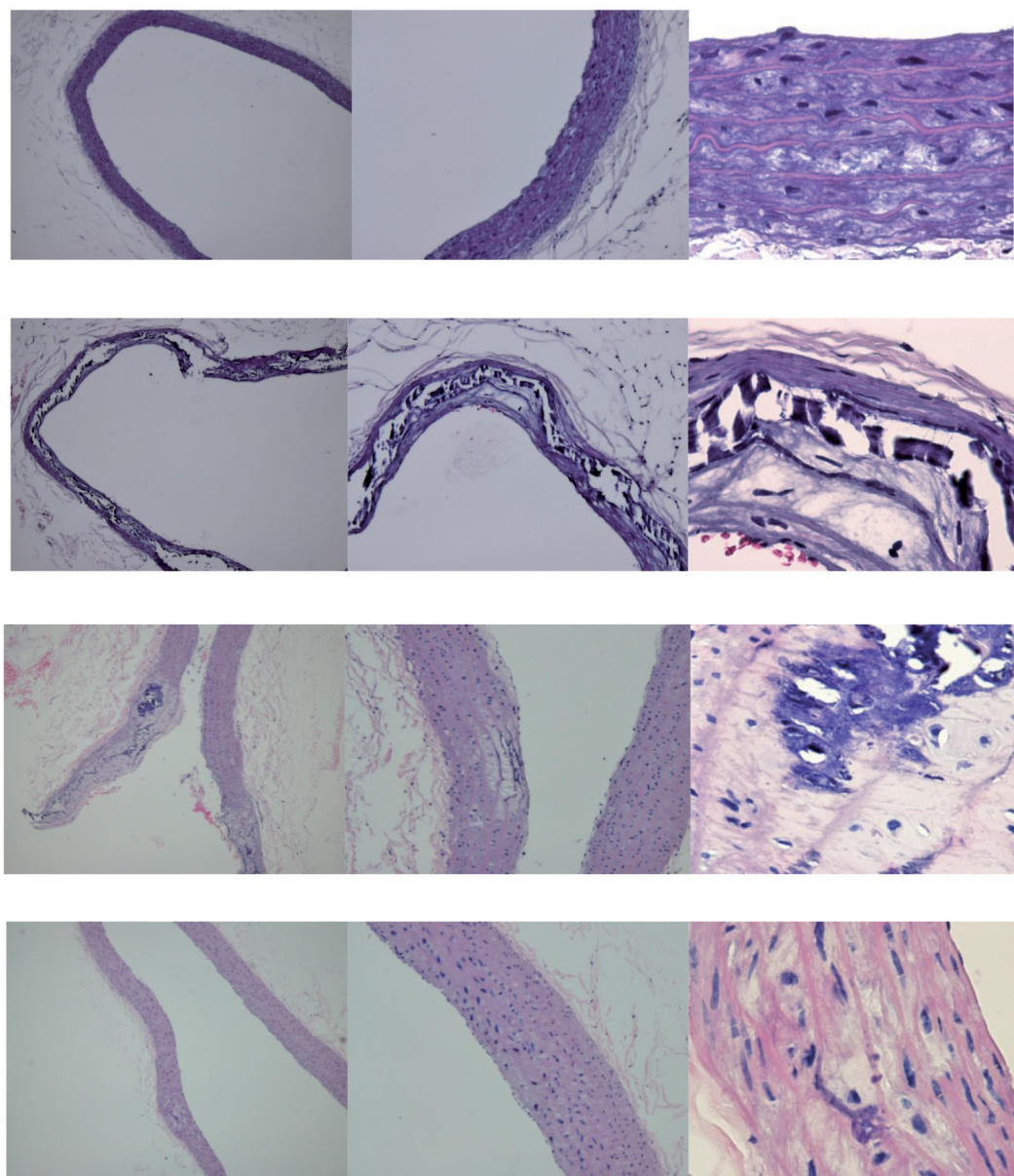


图 1. 糖尿病动脉硬化大鼠主动脉 HE 染色结果 从上到下,第 1 行为 NC 组,第 2 行为 DAC 组,第 3 行为 DAC+E 组,第 4 行为 DAC+O 组。放大倍数,从左到右,第 1 列为 10 倍,第 2 列为 100 倍,第 3 列为 400 倍。

Figure 1. HE staining of aorta in diabetic atherosclerosis rats

表 3. 各组大鼠主动脉胶原 I、III、MMP-2、MMP-9 蛋白表达比较

Table 3. Comparison of expressions of collagen I, III, MMP-2 and MMP-9 proteins in aorta of rats in each group

分 组	<i>n</i>	胶原 I 蛋白	胶原 III 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
NC 组	8	0.8±0.1	0.7±0.1	0.8±0.1	0.74±0.05
DAC 组	8	0.9±0.3	1.1±0.2 ^a	1.2±0.2 ^a	1.1±0.2 ^a
DAC+E 组	8	0.9±0.3	1.0±0.1 ^a	1.1±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a
DAC+O 组	8	1.1±0.2	0.8±0.2 ^{bc}	0.6±0.1 ^{abc}	0.8±0.1 ^{bc}
<i>F</i> 值	—	1.559	12.047	21.591	15.370
<i>P</i> 值	—	0.221	0.000	0.000	0.000

a 为 $P < 0.05$, 与 NC 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 DAC 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 DAC+E 组比较。

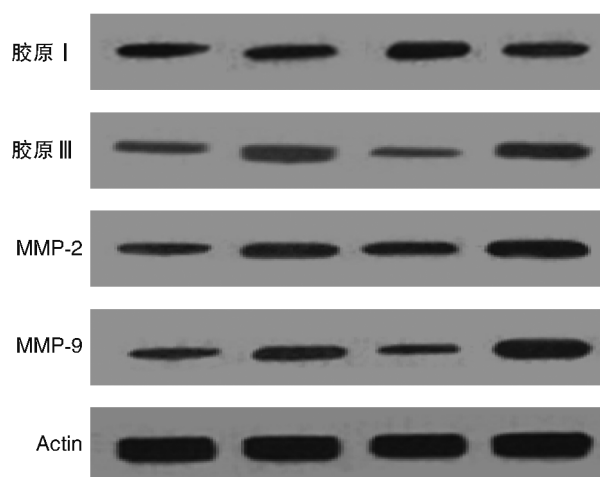


图 2. Western blot 检测各组大鼠主动脉胶原 I、Ⅲ和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达 从左到右,电泳条带依次为 NC 组、DAC+E 组、DAC+O 组、DAC 组。

Figure 2. Expressions of collagen I, III, MMP-2 and MMP-9 proteins in aorta of rats in each group were detected by Western blot

3 讨论

本研究利用高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素以及维生素 D 制备 2 型糖尿病动脉硬化大鼠模型,主动脉结构清晰,管壁各层广泛变性坏死,伴钙化形成。糖尿病动脉硬化大鼠体内过表达网膜素能够降低胶原 III 含量,减轻动脉硬化程度,对主动脉内降解胶原的 MMP-2、MMP-9 表达及氧化应激水平无影响。

网膜素是一种新的亲水蛋白质,分子量为 35 kDa,是在网膜脂肪 cDNA 库中发现的。它是由内脏脂肪组织产生,也在内皮细胞、心脏周围脂肪组织等组织中表达^[1]。网膜素 1 与内皮功能障碍^[2]、动脉硬化^[3]和血管钙化^[4]呈负相关。血清网膜素水平升高是心血管事件独立预测因子,不依赖于影像学的检查结果^[5]。在发生急性冠状动脉综合征的冠状动脉斑块破裂时或者行心脏外科手术时,网膜素 1 血清水平可一过性升高,是机体的保护性反应,用来抵抗炎症反应^[6-7]。因此,网膜素 1 是具有冠状动脉血管保护作用的脂肪因子。

本研究首先测定大鼠血清鼠网膜素水平,显示 DAC 组、DAC+E 组和 DAC+O 组的大鼠网膜素水平均低于对照组,但这 3 组间差异无统计学意义。本研究采用携带人网膜素 1 基因的腺相关病毒 (AAV9),经尾静脉注射并迅速进入肝细胞内,当 AAV9 在体内稳定表达 4 周时,DAC+O 组的血清和

肝细胞中人网膜素 1 表达增加,相当于人血清网膜素含量的 3 倍。

动脉粥样硬化斑块中的胶原 I、Ⅲ由平滑肌细胞合成。胶原 I、Ⅲ是细胞外基质的主要成分,其含量增多导致动脉弹性减低,动脉管壁增厚。网膜素对胶原合成的影响最早是在骨组织中。Tohidi 等^[8]发现在绝经期女性,网膜素与骨矿物质含量呈负相关,但对 I 型胶原 C 端肽的降解产物含量无影响。而在青少年神经性厌食症^[9]、骨质疏松的老年人^[10]和中国绝经后妇女^[11]的研究中发现,网膜素与 I 型胶原骨交联 N 端肽 (bone cross-linked N-telopeptides of type I collagen, NTX) 含量呈负相关。在正常人群筛查中未见网膜素与 NTX 相关^[12]。网膜素对动脉胶原含量的影响研究较少。Watanabe 等^[13]在体外研究发现,500 μg/L 网膜素能抑制人主动脉平滑肌细胞 I 型胶原和 III 型蛋白表达,增加弹性蛋白和纤维连接蛋白的表达;他们给 ApoE^{-/-}小鼠静脉持续注射网膜素 2.5~5 μg/(kg·h),能够减少主动脉根部胶原纤维的含量 (Masson 胶原染色),但没有对胶原分型含量测定。本研究显示 DAC+O 组主动脉内胶原 III mRNA 和蛋白的表达均较 DAC 组和 DAC+E 组下降,胶原 I 蛋白表达差异无统计学意义。体内外研究均显示网膜素对胶原表达有影响,尤其是影响动脉平滑肌细胞胶原 III 的表达,但仍需从转录水平进一步研究其调控机制。

胶原蛋白含量除了与合成有关,还与体内胶原降解系统有关。MMP-2、MMP-9 在动脉硬化斑块内由巨噬细胞分泌,用来降解基质成分,包括胶原,导致动脉硬化纤维帽变薄,斑块不稳定。网膜素对 MMP 表达影响研究较少。在人软骨细胞中,网膜素能够抑制细胞白细胞介素 1β 诱导的 MMP-1、MMP-3 和 MMP-13 的表达^[14]。Watanabe 等^[13]体外研究提示,网膜素不影响主动脉平滑肌 MMP-2、MMP-9 的表达。本研究也未发现体内过表达网膜素对 MMP-2、MMP-9 表达的影响。推测网膜素对 MMP 的作用具有组织特异性,这还需要进一步的研究。因此,网膜素可能通过抑制主动脉胶原合成发挥抗动脉硬化的作用。

网膜素 1 对血脂有影响。在糖尿病患者血清网膜素水平与 TG 呈负相关,与 HDLC 呈正相关^[15]。Watanabe 等^[13]发现,给予 Apo E^{-/-}小鼠输注网膜素能降低胆固醇水平,其机制可能是网膜素降低肠道胆固醇吸收、肝脏极低密度脂蛋白合成以及增加肝脏 LDL 受体的表达。本研究的大鼠肝脏中人网膜素 1 含量为 98.3 μg/L,可能不足以降低胆固醇水

平。关于网膜素与氧化应激的关系研究较少,网膜素能够抑制 2 型糖尿病 db/db 小鼠氧化应激水平,降低 MDA 含量,它具有糖尿病肾脏保护作用^[16]。最新的研究发现,在氧化应激诱导下,网膜素将失去抗炎特性,而转向促炎特性^[17]。Kazama 等^[18]证实网膜素通过抗氧化机制抑制血小板源性生长因子诱导的血管平滑肌细胞的迁移。本课题组前期体外研究发现,网膜素能改善氧化应激对人动脉血管平滑肌细胞 I、IV 型胶原表达的抑制作用^[19]。本研究在体内过表达网膜素对主动脉氧化应激状态没有影响。在病态肥胖的患者,网膜素的水平对体内氧化应激状态无影响^[20]。因此,网膜素对主动脉氧化应激状态的影响尚无定论,可能与网膜素受体组织特异性表达有关,此仍需进一步证实。

总之,本研究提供了证据,显示网膜素通过降低主动脉平滑肌细胞胶原含量而发挥逆转动脉硬化的作用,这也许开辟了一条动脉硬化及其相关疾病的新的治疗途径。

[参考文献]

- [1] Tan YL, Zheng XL, Tang CK, et al. The protective functions of omentin in cardiovascular diseases[J]. Clin Chim Acta, 2015, 448(25): 98-106.
- [2] Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Castro A, et al. Circulating omentin as a novel biomarker of endothelial dysfunction [J]. Obesity, 2011, 19(8): 1552-1559.
- [3] Yoo HJ, Hwang SY, Hong HC, et al. Association of circulating omentin-1 level with arterial stiffness and carotid plaque in type 2 diabetes[J]. Cardiovasc Diabetol, 2011, 10: 103-111.
- [4] Xie H, Xie PL, Wu XP, et al. Omentin-1 attenuates arterial calcification and bone loss in osteoprotegerin-deficient mice by inhibition of RANKL expression [J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(2): 296-306.
- [5] Kadoglou NP, Tahmatzidis DK, Giannakoulas C, et al. Serum levels of novel adipokines, omentin-1 and chemerin, in patients with acute myocardial infarction: KOZANI STUDY [J]. J Cardiovasc Med, 2015, 16(5): 341-346.
- [6] Saely CH, Leherer A, Muendlein A, et al. High plasma omentin predicts cardiovascular events independently from the presence and extent of angiographically determined atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2016, 244(1): 38-43.
- [7] Matloch Z, Kratochvílová H, Cinkajzlová A, et al. Changes in omentin levels and its mRNA expression in epicardial adipose tissue in patients undergoing elective cardiac surgery: the influence of type 2 diabetes and coronary heart disease[J]. Physiol Res, 2018, 67(6): 881-890.
- [8] Tohidi M, Akbarzadeh S, Larijani B, et al. Omentin-1, visfatin and adiponectin levels in relation to bone mineral density in Iranian postmenopausal women[J]. Bone, 2012, 51(5): 876-881.
- [9] Guo LJ, Jiang TJ, Liao L, et al. Relationship between serum omentin-1 level and bone mineral density in girls with anorexia nervosa [J]. J Endocrinol Invest, 2013, 36(3): 190-194.
- [10] Wang D, Jiang TJ, Liao L, et al. Relationships between serum omentin-1 concentration and bone mineral density, and bone biochemical markers in Chinese women [J]. Clin Chim Acta, 2013, 426(15): 64-67.
- [11] Yang L, Zhao XL, Liao B, et al. Relationships between serum omentin-1 levels and bone mineral density in older men with osteoporosis [J]. Chronic Dis Transl Med, 2016, 2(1): 48-54.
- [12] Li XP, Zeng S, Wang M, et al. Relationships between serum omentin-1, body fat mass and bone mineral density in healthy Chinese male adults in Changsha area [J]. J Endocrinol Invest, 2014, 37(10): 991-1000.
- [13] Watanabe K, Watanabe R, Konii H, et al. Counteractive effects of omentin-1 against atherogenesis [J]. Cardiovasc Res, 2016, 110(1): 118-128.
- [14] Li Z, Liu B, Zhao D, et al. Omentin-1 prevents cartilage matrix destruction by regulating matrix metalloproteinases [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92(8): 265-269.
- [15] Zhang Q, Zhu L, Zheng M, et al. Changes of serum omentin-1 levels in normal subjects, type 2 diabetes and type 2 diabetes with overweight and obesity in Chinese adults [J]. Ann Endocrinol (Paris), 2014, 75(3): 171-175.
- [16] Song J, Zhang H, Sun Y, et al. Omentin-1 protects renal function of mice with type 2 diabetic nephropathy via regulating miR-27a-Nrf2/Keap1 axis [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107(10): 440-446.
- [17] Onat A, Ademoglu E, Karadeniz Y, et al. Population-based serum omentin-1 levels: paradoxical association with cardiometabolic disorders primarily in men [J]. Biomark Med, 2018, 12(2): 141-149.
- [18] Kazama K, Okada M, Yamawaki H. A novel adipocytokine, omentin, inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration through antioxidative mechanism [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 306(12): H1714-H1719.
- [19] 郑辉, 刘慧娟, 葛焕琦, 等. 网膜素改善氧化应激对人动脉血管平滑肌细胞 I、IV 型胶原表达的抑制作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(2): 141-144.
- [20] Cătoi AF, Suciú Ş, Părvu AE, et al. Increased chemerin and decreased omentin-1 levels in morbidly obese patients are correlated with insulin resistance, oxidative stress and chronic inflammation [J]. Clujul Med, 2014, 87(1): 19-26.

(此文编辑 曾学清)