

重组腺病毒介导脂联素基因对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的作用机制

王雪梅,魏琴,张春,姜涛,段明军,杨毅宁*

(新疆医学动物模型研究重点实验室,新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院,乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 研究腺病毒介导的脂联素(APN)过表达对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化(AS)的抑制作用和对 NF-κB 信号通路的影响。方法 将12周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠120只分为空载腺病毒对照组和脂联素干预组,每组60只。在3个不同时间点(0天、4周、8周)处死小鼠收集组织。全自动生化仪检测血脂指标;ELISA法测定血清 APN 浓度;油红 O 染色法检测小鼠主动脉血管组织的病理学变化;Masson 染色法检测进展性斑块区的胶原含量和纤维帽厚度变化;免疫荧光法测定小鼠主动脉血管 APN 和 NF-κB p65 蛋白的表达;免疫印迹法检测主动脉血管 APN、NF-κB p65 核蛋白和炎症因子的表达。结果 APN 过表达抑制了 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块形成。与对照组相比,脂联素干预组的动脉粥样硬化病理损伤面积减少($P < 0.01$),动脉粥样硬化损伤程度降低($P < 0.001$),总体油红 O 染色测定血管表面损伤百分比,4周时为(27.78 ± 8.64) vs (33.02 ± 5.18)%;8周时为(31.58 ± 5.87) vs (52.16 ± 5.79)%。脂联素减缓了高脂饮食导致的小鼠血清中 TC($P < 0.001$)、TG($P < 0.001$)、LDL-C($P < 0.001$)的浓度增加,使血脂水平趋向正常化。随着血清脂联素浓度增加,可以阻遏 NF-κB 通路的激活,抑制 NF-κB p65 核蛋白和炎症因子的表达。结论 脂联素通过抑制 NF-κB 通路激活来减轻 AS 的炎症反应。

【关键词】 脂联素;动脉粥样硬化;ApoE^{-/-}小鼠;炎症;NF-κB 信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 02-0175-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.012

Mechanism of the effect of rAd-APN gene on atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice

WANG Xue-mei, WEI Qin, ZHANG Chun, JIANG Tao, DUAN Ming-jun, YANG Yi-ning*

(Xinjiang Key Laboratory of Medical animal Model Research, Clinical Medical Research Institute of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

【Abstract】 Objective Atherosclerosis (AS) is a common pathological basis of cardiovascular diseases. Adiponectin (APN) has been shown to have an anti-AS effect, and the underlying mechanisms, however, are largely unknown. Nuclear transcription factor κB (NF-κB) has also been regarded as a proatherogenic factor, mainly because of its regulation of a variety of the proinflammatory genes linked to AS. It is hypothesized that the inhibitory effects of APN on AS is through the inhibition of NF-κB signaling pathway. The aim of this study was to test the hypothesis via investigation and validation of the inhibitory effect of APN on AS in ApoE^{-/-} mice, and to delineate the roles of NF-κB signaling pathway in modulating the APN effect on AS in vivo. **Methods** APN overexpression in ApoE^{-/-} mice were mediated by transfecting adenovirus bearing a vector encoding for APN and enhanced green fluorescent protein (Ad-APN-eGFP). The AS in ApoE^{-/-} mice was induced by feeding a high-fat diet. To validate the inhibitory effect of the adenovirus mediated APN overexpression on AS in

【基金项目】新疆维吾尔自治区自然科学基金青年基金项目(2015211C095);新疆重大疾病医学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地(2010DS890294)开放课题(SKLIB-XJMDR-2014-16)。

【作者简介】王雪梅(1983-),女,助理研究员,研究方向:心血管病动物疾病模型制作和发病机制。E-mail: wxuemei1983@sina.com

【通讯作者】杨毅宁(1973-),教授,主任医师,研究方向:心血管病学诊疗。E-mail: 65242155@qq.com

the ApoE^{-/-} mice. 120 male ApoE^{-/-} mice aged 12 weeks were randomly and evenly assigned into two groups (60 mice per group), and were fed with a high-fat diet to induce AS. At 0 day, 2, 4, and 6 weeks of high-fat diet feeding. The 2 groups of mice were injected intravenously in the tail with either 100 μ L (3.0×10^8 p. f. u) of Ad-eGFP virus (control group) or the same amount of Ad-APN-eGFP virus (APN group). Blood samples and aortic tissues were taken at 0 day, 4, and 8 weeks of high-fat diet feeding. For the blood samples, FABA was used to analyze the concentrations of blood lipids and ELIZA was used to test the concentrations of serum APN. For the aortic tissues, oil red O staining was used to detect the surface lesion percentage. Masson staining was used to evaluate the collagen content and fibrous cap thickness of the plaque area. Immunofluorescence method was used to detect APN and NF- κ B p65 expression. Western blot was used to detect the expressions of APN, nuclear NF- κ B p65 and the downstream factors of NF- κ B pathway. **Results** APN inhibited the formation of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice. The lesion formation in aortic sinus was significantly inhibited ($P < 0.01$). Compared with the control group, the oil red O staining showed that the surface area ratio of atherosclerotic lesions was decreased significantly in the Ad-APN group ($P < 0.001$); the percentage of surface lesions in the 4 weeks groups was 27.78 ± 8.64 vs. 33.02 ± 5.18 (%); the 8 weeks groups was 31.58 ± 5.87 vs. 52.16 ± 5.79 (%). As the serum APN was increased, the concentration of TC, TG and LDL-C were significantly decreased ($P < 0.001$ for all), and the growth of body weight was slowed down ($P < 0.05$). APN effectively inhibited the expression of NF- κ B nuclear protein p65 and inflammatory factors. **Conclusions** Adiponectin reduces the inflammatory reactions in atherosclerosis through inhibiting the NF- κ B pathway.

【Key words】 Adiponectin; Atherosclerosis; ApoE^{-/-} mice; Inflammation; NF- κ B signaling pathways

Corresponding author: YANG Yi-ning, Email: 65242155@qq.com

目前普遍认可的炎症学说,认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发生和发展是一个慢性炎症过程,而 AS 性疾病是一种全身系统性的血管病变,也是多种心血管疾病发生发展的病理生理基础^[1]。炎症是 AS 发生的关键诱因,有多种炎性因子和黏附分子参与 AS 的病理过程,例如炎症因子 CRP、IL-6、IL-8、TNF- α 、黏附分子 ICAM-1、VCAM-1、基质金属蛋白酶 MMP-9^[2]。核转录因子- κ B(NF- κ B) 信号通路广泛存在于机体各种细胞内,通过自身的激活和核易位,由转录活性区调节相关基因的转录,参与机体免疫应答、炎症反应、细胞增殖与凋亡及细胞内信号传递等,调控多种基因的表达和相互作用^[3,4]。短暂而快速的 NF- κ B 激活对机体的正常生理功能很重要,但当各种病理因素持续刺激诱导 NF- κ B 持久活化时则会导致内环境的紊乱,其中发现 NF- κ B 的异常激活与 AS 的发生关系密切^[5]。AS 是一种多种因素作用的慢性炎症过程,而炎症作为介导来研究 NF- κ B 和 AS 之间关系的研究报道较少。

脂联素(adiponectin, APN)是脂肪组织分泌的一种有益细胞因子。脂联素在人体内的血清浓度是 $3 \sim 30 \mu\text{g/mL}$ 。脂联素在体内是以三聚体、六聚体和多聚体的形式存在^[6]。APN 有改善胰岛素抵抗、糖脂代谢,抗炎及抑制动脉粥样硬化的作用^[7]。但是脂联素发挥保护作用的途径还不完全清楚。本研究应用重组腺病毒载体使目的基因脂联素在

ApoE^{-/-}小鼠体内过表达,建立 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型,研究脂联素过表达,对小鼠 AS 病理发展的影响,以及对血脂调节、炎症因子和 NF- κ B 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验选择 SPF 级 ApoE^{-/-}小鼠,12 周龄,雄性,体重 $20 \sim 22 \text{ g}$ 。由上海南方模式生物研究中心[SCXK(沪)2009-0023]赠予 10 只,雌雄各 5 只,在新疆医科大学第一附属医院实验动物部保种繁殖[SYXK(新)2010-0003],在 SPF 级饲养室饲养。所有涉及动物实验操作程序均经过新疆医科大学第一附属医院的动物伦理委员会批准(批准号为 IACUC-20130709010)。12 h:12 h 昼夜循环饲养。

1.2 实验试剂

小鼠的高脂饲料(饲料配方是 35% 的脂肪,45% 的碳水化合物,1.25% 胆固醇。中国江苏美迪森生物公司); pDC316-mCMV-EGFP-mAdipoq 和 pDC316-mCMV-EGFP 腺病毒载体(中国深圳百恩维生物科技有限公司);血脂测定试剂(美国罗氏诊断产品有限公司); APN 酶联免疫反应试剂盒(美国 Biomerica 公司);油红 O 染色液(美国 Amresco 公司);苏木素染色液(中国北京中杉金桥);NF- κ B p65, APN 一抗(美国 Thermo fisher 公司);荧光二抗

Dylight™ 488 和 Dylight™ 594(美国 Thermo Fisher 公司); GAPDH 一抗(美国 CST 公司); VCAM-1, IL-6, TNF- α , Lamin A(美国 Abcam 公司); Western blot 二抗试剂盒(Invitrogen 公司)。

1.3 动脉粥样硬化模型的建立

随机将小鼠分为对照组 60 只和脂联素干预组 60 只,小鼠自由采食,高脂饲料饲养加速 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型建立。实验期间分别在 0 周、2 周、4 周、6 周,尾静脉注射脂联素腺病毒或空载腺病毒 3×10^8 pfu/100 μ L。两组 ApoE^{-/-} 小鼠分别喂养 0、4、8 周后,处死收集标本。

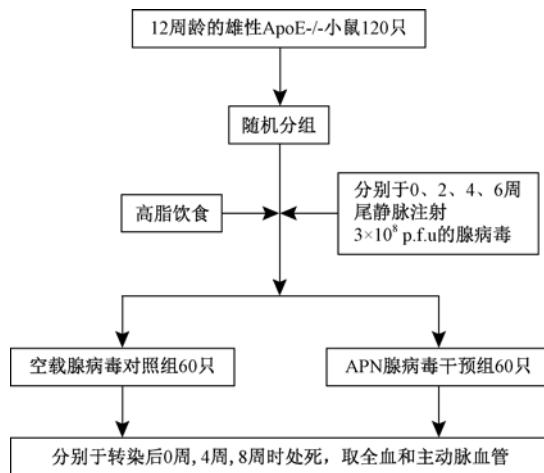


图 1 实验方案示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental protocol

1.4 小鼠主动脉血管组织的病理学检测

1.4.1 主动脉血管总体油红 O 染色检测斑块损伤

手术显微镜下小心分离小鼠主动脉,从主动脉弓根部开始向下分离直至髂动脉分叉处,全部离段取出,将主动脉用剪刀纵向剪开,将整根主动脉浸于油红 O 染色液中 15 min,取出主动脉放到 70% 乙醇中分化 5 min,换一次乙醇,直到正常组织变为乳白色,PBS 清洗 2 遍后拍照。使用 Image J 软件分析计算主动脉斑块面积和斑块损伤区域占管腔的比率。

1.4.2 主动脉弓根部血管 Masson 三色染色

4% 多聚甲醛固定主动脉;清水下冲洗;梯度酒精脱水、二甲苯透明;组织石蜡包埋;切片;切片脱蜡,水化;Masson 三色染色(参见说明书)。应用 Image J 图像分析软件,测量血管动脉粥样硬化进展性斑块中胶原纤维的比例和纤维帽的面积。

1.5 血脂指标检测

心脏采血静置析出血清,4000 r/min 离心 10 min,收集血清在 -80°C 超低温冰箱保存。全自动生

化仪检测小鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 的水平。

1.6 血清脂联素水平检测

采用酶联免疫法,检测血清 APN 浓度(按照试剂盒说明书进行操作)。

1.7 免疫荧光法测定主动脉血管 APN、vWF、p65 蛋白的表达

NF- κ B p65(Thermo, USA) 1:50 倍比稀释, APN(Thermo, USA) 1:200 倍比稀释。二抗 second antibody(Thermo, USA) 1:200 倍比稀释。石蜡切片烤片 60°C , 1 h; 脱蜡,浸水,3% H_2O_2 室温下静置 10 min,微波修复 10 min,滴加一抗, 4°C 过夜,滴加浓度为 1:50 的二抗, DAPI 核染色。在 200 倍光镜下,随机选取 5 个不同视野分别采集图像,应用 Image J 图像分析软件测量荧光表达区域的面积,算出阳性细胞百分比。

1.8 WB 法检测血管组织中炎症因子和抗炎因子蛋白的表达

总蛋白内参 GAPDH 和核蛋白内参 LAMIN A 的表达量用来校正上样可能带来的误差。从组织中提取实验所需的总蛋白和核蛋白;BCA 法蛋白定量;SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

1.9 统计分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数的比较采用两因素方差分析(general linear model-univariate)或单因素方差分析(One-Way ANOVA),选择 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂联素抑制了 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的发生

总体血管油红 O 染色后,与对照组相比,脂联素干预组在 4 周和 8 周时的血管动脉粥样硬化表层的损伤比率降低,差异具有显著性($P < 0.001$),4 周时为 $(27.78 \pm 8.64)\%$ vs $(33.02 \pm 5.18)\%$;8 周时为 $(31.58 \pm 5.87)\%$ vs $(52.16 \pm 5.79)\%$,见图 2。

2.2 脂联素减缓了 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块的进程

在动脉粥样硬化进展性斑块中,随着斑块的发展,弹力纤维占斑块的比率是逐渐下降的,纤维帽趋向变薄,面积下降,由稳定斑块变成不稳定斑块,增加血栓形成的危险。与对照组相比,脂联素干预组在 4 周和 8 周时的胶原纤维占不稳定斑块面积的比率增加,纤维

帽面积增加,差异均具有显著性。见表 1,图 3。

2.3 血清脂联素过表达降低血脂水平升高

和对照组相比,脂联素干预组的血清脂联素水平升高,TC、TG 和 LDL-C 水平降低,差异均具有显

著性;HDL-C 水平差异无显著性。提示脂联素过表达能够减缓血脂异常的发展进程,

脂联素具有纠正异常血脂水平的生物学功能,减缓了脂质代谢紊乱。(见表 2)。

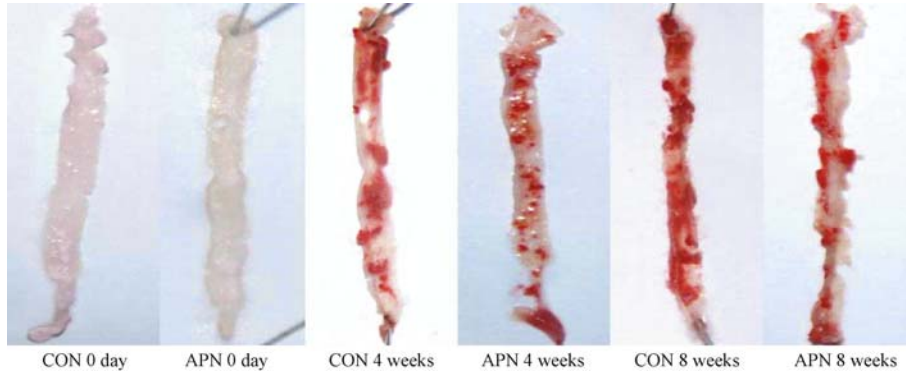


图 2 小鼠主动脉总体斑块损伤总体油红 O 染色 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 The gross appearance of the surface of whole aorta lesions. Oil red staining (n=6, $\bar{x} \pm s$)

表 1 4 周、8 周对照组和脂联素干预组血管损伤面积检测结果 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Mean lesion area and mean lesion rate at 4 weeks and 8 weeks in the control and APN group (n=6, $\bar{x} \pm s$)

分组 Groups	胶原含量/% Collagen content	纤维帽面积/ μm^2 Fibrous cap areas
对照组 4 周/CON 4 weeks	27.30 \pm 2.28	65.63 \pm 20.19
干预组 4 周/APN 4 weeks	28.97 \pm 2.54*	89.59 \pm 4.78**
对照组 8 周/CON 8 weeks	23.15 \pm 1.28	45.83 \pm 5.64
干预组 8 周/APN 8 weeks	26.65 \pm 1.81*	84.18 \pm 9.17**

注:与对照组相比,*P<0.01;**P<0.001。

Note. Compared with the control group, *P<0.01; **P<0.001.

表 2 血清脂联素和血脂水平比较 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of the serum APN and TC, TG, LDL-C, HDL-C levels (n=12, $\bar{x} \pm s$)

分组 Groups	脂联素 APN/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	总胆固醇 TC /mmol/L	甘油三酯 TG /mmol/L	低密度脂蛋白/LDL-C /mmol/L	高密度脂蛋白/HDL-C /mmol/L
对照组 0 天/CON 0 day	23.64 \pm 9.17	7.27 \pm 3.51	0.61 \pm 0.34	0.79 \pm 0.46	0.95 \pm 0.41
干预组 0 天/APN 0 day	23.60 \pm 9.66	8.01 \pm 3.07	0.49 \pm 0.24	0.96 \pm 0.52	1.38 \pm 1.18
对照组 4 周/CON 4 weeks	21.44 \pm 6.91	32.43 \pm 10.77	1.18 \pm 0.31	10.14 \pm 1.48	1.29 \pm 0.55
干预组 4 周/APN 4 weeks	71.13 \pm 21.63**	28.66 \pm 8.11*	1.03 \pm 0.39**	8.06 \pm 1.74**	0.91 \pm 0.33
对照组 8 周/CON 8 weeks	19.30 \pm 6.25	38.12 \pm 6.36	2.01 \pm 0.77	10.95 \pm 3.23	1.86 \pm 1.60
干预组 8 周/APN 8 weeks	80.03 \pm 36.86**	24.54 \pm 8.29*	1.00 \pm 0.30**	7.57 \pm 1.46**	1.07 \pm 0.26

注:与对照组相比,#P<0.05;*P<0.01;**P<0.001。

Note. Compared with the control group, #P<0.05; *P<0.01; **P<0.001.

2.4 主动脉血管 APN 过表达抑制 NF- κ B p65 和炎症因子的蛋白表达

2.4.1 免疫荧光检测 APN 和 NF- κ B p65 在主动脉血管的表达

和对照组相比,脂联素干预组 APN 蛋白表达区域占血管内膜和中膜面积的百分比表达增加,NF- κ B p65 核蛋白表达占内膜和中膜的面积百分比减少,差异均具有显著性。提示随着脂联素在血管内膜和中膜中的表达增加,NF- κ B p65 核蛋白表达降

低,脂联素抑制了 NF- κ B 的激活。见表 3,图 4,5。

2.4.2 APN 降低了 NF- κ B p65 蛋白和炎症因子的表达

和对照组相比,脂联素干预组的 APN 蛋白表达增加,NF- κ B p65 核蛋白表达降低,差异均具有显著性。提示随着脂联素在血管中的表达增加,NF- κ B p65 核蛋白表达降低,脂联素抑制了 NF- κ B 的激活(表 4,5 及图 6)。

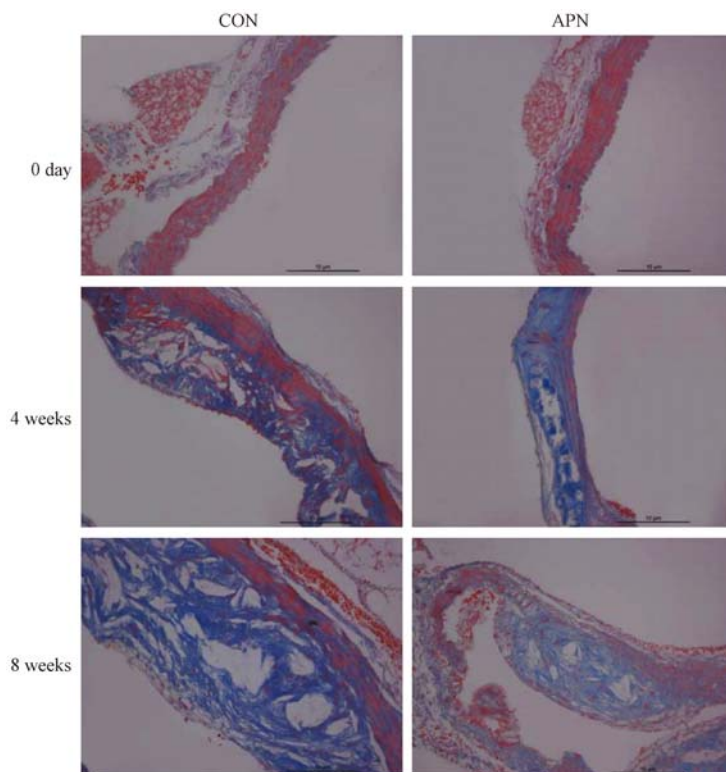


图 3 小鼠主动脉弓根部的 Masson 染色 (苯胺蓝、酸性品红和丽春红三色, $\times 200, n=6, \bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Histology of the aortic arch root. (Masson staining, $\times 200, n=6, \bar{x} \pm s$)

表 3 脂联素和 NF- κ B p65 在血管中的表达 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Expression of adiponectin and NF- κ B p65 in the aortas ($n=6, \bar{x} \pm s$)

分组 Groups	脂联素阳性表达占血管内膜的比率 APN/intimal area/%	p65 阳性表达占血管内膜和中膜的比率 p65 ⁺ (intimal + medial) area/%
对照组 0 天/CON 0day	9.84 \pm 1.97	4.73 \pm 1.20
干预组 0 天/APN 0day	10.81 \pm 2.12	4.44 \pm 1.58
对照组 4 周/CON 4 weeks	18.10 \pm 5.17	7.95 \pm 1.46
干预组 4 周/APN 4 weeks	41.51 \pm 12.67 **	6.05 \pm 1.23 *
对照组 8 周/CON 8 weeks	23.46 \pm 3.05	11.92 \pm 2.18
干预组 8 周/APN 8 weeks	64.79 \pm 7.21 **	7.94 \pm 1.53 *

注:与对照组相比, * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$.

表 4 血管 APN 蛋白和 NF- κ B p65 核蛋白的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Expression of APN and NF- κ B p65 proteins in the aortic wall ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组 Groups	APN 灰度值/Gray value	GAPDH 灰度值/Gray value	NF- κ Bp65 灰度值/Gray value	LAMIN A 灰度值/Gray value
对照组 0 天/CON 0day	6.43 \pm 0.16	12.89 \pm 0.47	5.69 \pm 0.49	11.26 \pm 1.05
干预组 0 天/APN 0day	5.94 \pm 0.13	11.43 \pm 0.75	6.50 \pm 0.25	12.97 \pm 0.54
对照组 4 周/CON 4 weeks	7.38 \pm 0.06	13.21 \pm 0.75	18.32 \pm 1.32	13.10 \pm 0.70
干预组 4 周/APN 4 weeks	16.37 \pm 1.86 **	11.63 \pm 0.92	10.08 \pm 1.99 **	12.12 \pm 0.79
对照组 8 周/CON 8 weeks	7.12 \pm 0.12	11.89 \pm 0.54	19.81 \pm 0.97	12.42 \pm 0.76
干预组 8 周/APN 8 weeks	18.90 \pm 0.94 **	12.37 \pm 1.41	11.87 \pm 2.05 **	13.19 \pm 0.22

注:与对照组相比, ** $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.001$.

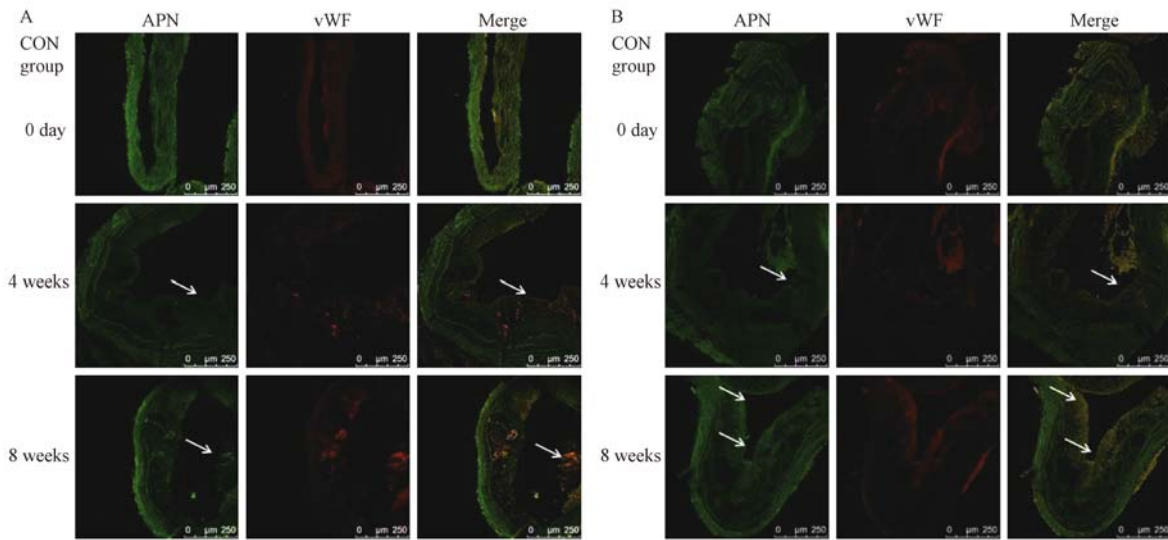


图 4 APN 和 vWF 在主动脉血管的表达

Fig. 4 Expression of APN and vWF in the aortic wall

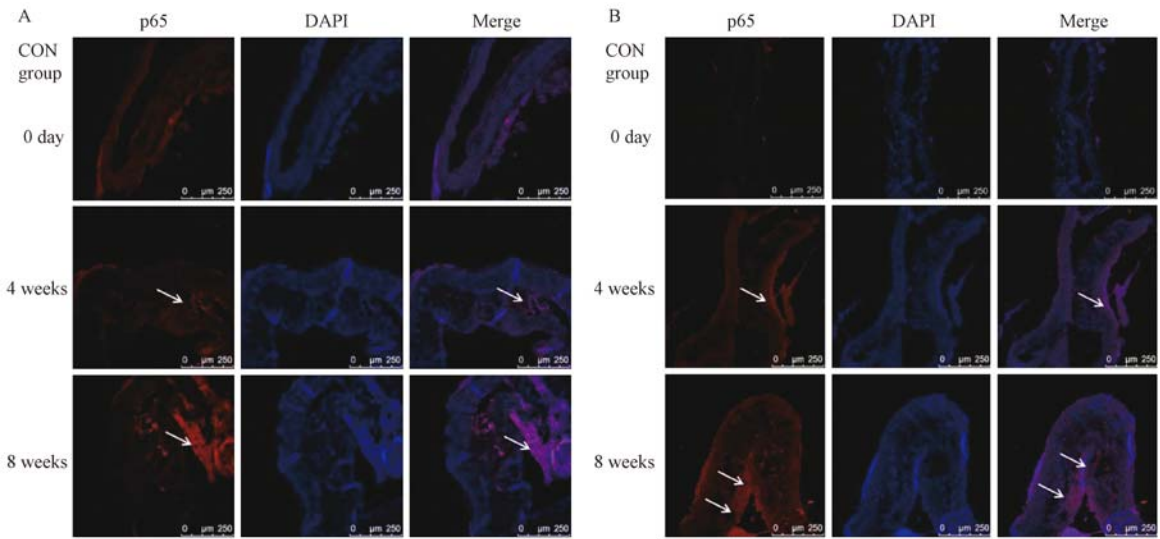


图 5 NF-κB p65 核蛋白在主动脉血管的表达

Fig. 5 Nuclear NF-κB p65 expression in the aortic wall

表 5 动脉血管 VCAM-1、TNF-α、IL-6 蛋白表达 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Expression of the VCAM-1, TNF-α and IL-6 proteins in the aortic wall (n=3, $\bar{x} \pm s$)

分组 Groups	VCAM-1 灰度值 Gray value	TNF-α 灰度值 Gray value	IL-6 灰度值 Gray value
对照组 0 天/CON 0 day	1.94 ± 0.63	3.28 ± 0.53	4.12 ± 0.14
干预组 0 天/APN 0 day	2.48 ± 0.72	3.91 ± 0.54	4.13 ± 0.79
对照组 4 周/CON 4 weeks	4.48 ± 1.18	7.02 ± 1.72	8.10 ± 1.69
干预组 4 周/APN 4 weeks	3.27 ± 0.26	3.41 ± 0.49 *	4.79 ± 0.92 *
对照组 8 周/CON 8 weeks	6.79 ± 0.42	7.88 ± 2.18	10.85 ± 1.54
干预组 8 周/APN 8 weeks	5.64 ± 1.15	4.74 ± 0.76 *	6.27 ± 0.99 *

注:与对照组相比, ** P < 0.001。

Note. Compared with the control group, ** P < 0.001.

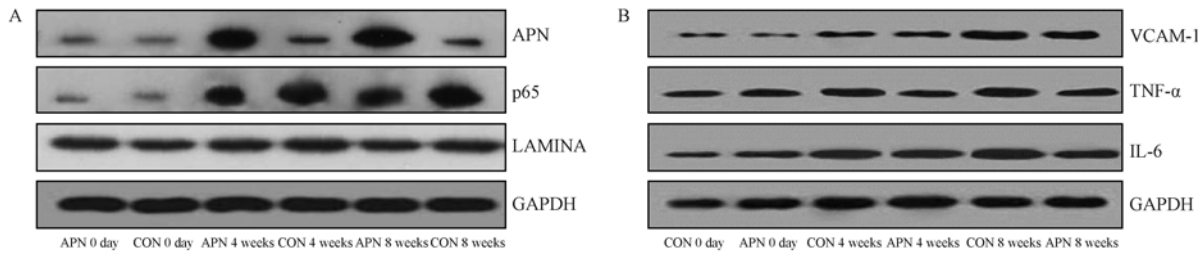


图 6 血管 APN、核 NF- κ B p65 蛋白和炎症因子的表达

Fig. 6 Expression of APN and NF- κ B p65 proteins and inflammatory factors in the aortic wall

3 讨论

脂联素 (APN) 是脂肪组织分泌的一种起正向调节作用的细胞因子^[8]。研究表明 APN 增加脂质分解作用,使得游离脂肪酸 (FFA) 释放量显著下降,诱导血液中的 FFA 进入骨骼肌细胞中氧化分解,进而降低血脂水平^[9]。这和本研究中 APN 显著降低 TC、TG、LDL 使血脂趋于正常化的作用是一致的。APN 加强脂肪代谢过程中各种转运体及酶的基因表达,增加转运体和酶的活性,最终调节血脂趋向正常化^[10]。脂联素没有显著增加 HDL-C 的水平,可能原因是本研究选用的是 ApoE^{-/-}小鼠,而载脂蛋白 E 主要调节的是 LDL,对于 HDL 没有显著的作用。

核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路是一个和炎症密切相关的信号通路。在细胞中, NF- κ B 以二聚体的形式存在,主要有经典途径的异源二聚体 p65/p50 和同源二聚体 p50/p50,以及非经典途径中的 RelB/p50 或 RelB/p52^[11]。NF- κ B 与 I κ B 结合的三聚体复合物在静息状况下存在于细胞质中,当细胞受到应激、细胞因子等的作用时, I κ B 激酶 (IKK) 的构象发生改变,被相关信号通路控件识别并降解, NF- κ B 游离,随后移入核内,启动相关基因的转录,也就是 NF- κ B 信号通路的激活^[12]。本研究中,随着 APN 在血管中的过表达, NF- κ B p65 的核蛋白表达降低,也就是脂联素能够抑制 NF- κ B 的激活,阻滞炎症反应对 AS 的促进作用。动物实验研究发现,尾静脉注射腺病毒载脂联素,造成脂联素的过表达,脂联素的血浆浓度达到对照组的 48 倍, 14 d 后病理切片显示动脉斑块被抑制了 30%, 实时荧光定量反应表明血管细胞粘附分子被抑制了 29%, A 类清道夫受体 (class A scavenger receptor, SR-A) 的蛋白表达减少了 34%,显著降低了 TNF- α 的水平,而主动脉组织巨噬细胞表面的 B 类清道夫受体 CD36 不受影响,说明 APN 缓解改善了 AS 的炎症状

态^[13]。有研究证实, APN 能显著抑制由脂多糖诱导的巨噬细胞里 TNF- α mRNA 的表达, TLR (toll-like receptor, TLR) 介导的 NF- κ B 的激活;这种抑制 TLR 介导的 NF- κ B 的激活作用由补体 C1q 受体介导达成^[14]。APN 促进 NF- κ B 抑制蛋白 (I κ B) 在巨噬细胞中的磷酸化,使得 NF- κ B 处于阻遏状态,降低炎症反应水平^[15]。这与本研究结果是一致的,脂联素干预组 ApoE^{-/-}小鼠主动脉血管中的炎症因子 TNF- α 、IL-6、黏附分子 VCAM-1 的蛋白表达显著降低。综上所述, APN 通过抑制 NF- κ B 信号通路介导的炎症反应,减缓 AS 的发展。开展进一步的研究,就 APN 对 NF- κ B 上游激酶 IKK β 、NIK 的作用研究,或者可能的旁路激酶 PKA、PKC 的作用研究,能够更加全面的认识 APN 对于炎症和 AS 的作用机制。

参 考 文 献

- [1] Pateras I, Giaginis C, Tsigris C, et al. NF- κ B signaling at the crossroads of inflammation and atherogenesis: searching for new therapeutic links[J]. Expert Opin Ther Targets, 2014, 18(9): 1089-1101.
- [2] Si Y, Zhang Y, Zhao J, et al. Niacin inhibits vascular inflammation via downregulating nuclear transcription factor- κ B signaling pathway[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 263786.
- [3] Shi J, Sun X, Lin Y, et al. Endothelial cell injury and dysfunction induced by silver nanoparticles through oxidative stress via IKK/NF- κ B pathways[J]. Biomaterials, 2014, 35(24): 6657-6666.
- [4] Sui Y, Park SH, Xu J, et al. IKK β links vascular inflammation to obesity and atherosclerosis[J]. J Exp Med, 2014, 211(5): 869-886.
- [5] Ren S, Fan X, Peng L, et al. Expression of NF- κ B, CD68 and CD105 in carotid atherosclerotic plaque[J]. J Thorac Dis, 2013, 5(6): 771-776.
- [6] 王园园, 龙民慧, 邹民吉, 等. 大鼠动脉粥样硬化动物模型的建立和评价[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(6): 421-423, 489.
- [7] 赵宏宇, 郑强, 张锦. 球状脂联素在波动性高血糖诱导人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 9(5): 448-452.

- [8] Lee, SW, Zhang HR, Zhang CH, et al. Adiponectin abates diabetes-induced endothelial dysfunction by suppressing oxidative stress, adhesion molecules, and inflammation in type 2 diabetic mice[J]. Heart Circ Physiol, 2012, 303: H106 - H115.
- [9] Lee SW, Park YJ, Zhang CH, et al. Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice[J]. Heart Circ Physiol, 2011, 301: H306 - H314.
- [10] Yang CH, Miyahara H, Katayama M, et al. Pollock oil supplementation modulates hyperlipidemia and ameliorates hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet[J]. Lipid Health Dis, 2011, 10: 189 - 198.
- [11] 刘瑞, 李伶, 朱伟, 等. RNAi 介导的脂联素基因沉默对 ApoE 基因敲除小鼠糖脂代谢的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2010, 26(2): 143 - 145.
- [12] Nawrocki AR, Hofmann SM, Scherer PE, et al. Lack of association between adiponectin levels and atherosclerosis in mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010, 30: 1159 - 1165.
- [13] Dagli N, Ozturk U, Balin M, et al. Adiponectin levels in coronary artery ectasia[J]. Heart Vessels, 2009, 24(2): 84 - 89.
- [14] Ekmekci H, Ekmekci OB. The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2006, 12(2): 163 - 168.
- [15] Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Circulation, 2002, 106(22): 2767 - 2770.

[收稿日期] 2015-11-23

科技工作者科学道德规范(四) 学术不端行为

第十八条 学术不端行为是指,在科学研究和学术活动中的各种造假、抄袭、剽窃和其他违背科学共同体惯例的行为。

第十九条 故意做出错误的陈述,捏造数据或结果,破坏原始数据的完整性,篡改实验记录和图片,在项目申请、成果申报、求职和提职申请中做虚假的陈述,提供虚假获奖证书、论文发表证明、文献引用证明等。

第二十条 侵犯或损害他人著作权,故意省略参考他人出版物,抄袭他人作品,篡改他人作品的内容;未经授权,利用被自己审阅的手稿或资助申请中的信息,将他人未公开的作品或研究计划发表或透露给他人或为己所用;把成就归功于对研究没有贡献的人,将对研究工作做出实质性贡献的人排除在作者名单之外,僭越或无理要求著者或合著者身份。

第二十一条 成果发表时一稿多投。

第二十二条 采用不正当手段干扰和妨碍他人研究活动,包括故意毁坏或扣压他人研究活动中必需的仪器设备、文献资料,以及其它与科研有关的财物;故意拖延对他人项目或成果的审查、评价时间,或提出无法证明的论断;对竞争项目或结果的审查设置障碍。

第二十三条 参与或与他人合谋隐匿学术劣迹,包括参与他人的学术造假,与他人合谋隐藏其不端行为,监察失职,以及对投诉人打击报复。

第二十四条 参与与自己专业无关的评审及审稿工作;在各类项目评审、机构评估、出版物或研究报告审阅、奖项评定时,出于直接、间接或潜在的利益冲突而作出违背客观、准确、公正的评价;绕过评审组织机构与评议对象直接接触,收取评审对象的馈赠。

第二十五条 以学术团体、专家的名义参与商业广告宣传。