

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.03.001

• 基础研究 •

肥胖合并动脉粥样硬化大鼠血管旁脂肪组织中
趋化因子 chemerin 的表达变化*张福庄¹ 陶红² 陈波¹ 王国宏¹ 袁仙仙²

(1 首都医科大学附属北京同仁医院心血管中心 北京 100176; 2 首都医科大学附属北京安贞医院内分泌科 北京 100029)

摘要 目的:通过构建肥胖合并动脉粥样硬化大鼠模型,评估模型血管旁脂肪组织中趋化因子 chemerin 基因及蛋白的表达变化。**方法:**建立肥胖合并动脉粥样硬化大鼠模型;于模型构建不同时期(8周、12周、16周及24周)取胸主动脉旁脂肪组织,应用 real-time-PCR 检测 chemerin 的 mRNA 表达变化;应用免疫组织化学染色的方法检测蛋白表达变化。**结果:**与对照组相比,造模8周时模型组大鼠血管旁脂肪组织中 chemerin 的 mRNA 表达较对照明显增加($P=0.031$),造模12周及16周时无明显差异,造模24周时表达明显增加($P<0.001$);Pearson 直线相关分析显示,血管旁脂肪组织中 chemerin 的 mRNA 表达与其蛋白表达、血管旁脂肪质量、内脏脂肪质量、皮下脂肪质量、低密度脂蛋白胆固醇浓度及主动脉中层厚度呈正相关;与血管旁脂肪组织中脂联素的 mRNA 表达及高密度脂蛋白浓度呈负相关。**结论:**成功建立了肥胖合并动脉粥样硬化大鼠模型;伴随造模时间的延长,模型大鼠血管旁脂肪组织明显增多,动脉粥样硬化逐渐加重,血管旁脂肪组织中 chemerin 的表达升高。血管旁脂肪组织中 chemerin 可能参与了动脉粥样硬化发生发展过程。

关键词:动脉粥样硬化;肥胖;血管旁脂肪;chemerin;脂联素

中图分类号:R-33;R543.5;R589.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)03-401-06

Changes of Chemokine Chemerin Expression in Perivascular Adipose Tissue
of Obese Rats with Atherosclerosis*ZHANG Fu-zhuang¹, TAO Hong², CHEN Bo¹, WANG Guo-hong¹, YUAN Xian-xian²

(1 Department of Cardiovascular Center, Beijing Tongren hospital, Capital medical university, Beijing, 100176, China;

2 Department of Endocrinology, Beijing Anzhen hospital, Capital medical university, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the expression of chemokine chemerin gene and protein in perivascular adipose tissue of obese rats with atherosclerosis. **Methods:** The rat model of obesity and atherosclerosis was established. The paraaortic adipose tissue was taken at different stages (8 weeks, 12 weeks, 16 weeks and 24 weeks), and the expression of chemerin mRNA was detected by real-time PCR and the expression of protein was detected by immunohistochemistry. **Results:** Compared with the control group, the expression of chemerin mRNA in the perivascular adipose tissue of the model group was significantly increased ($P=0.031$) at 8 weeks after the establishment of the model, and there was no significant difference at 12 and 16 weeks after the establishment of the model, but it was significantly increased at 24 weeks after the establishment of the model ($P<0.001$). Pearson linear correlation analysis showed that the expression of chemerin mRNA in perivascular adipose tissue was positively correlated with its protein expression, perivascular adipose mass, visceral adipose mass, subcutaneous adipose mass, low-density lipoprotein cholesterol concentration and aortic middle thickness, and negatively correlated with adiponectin mRNA expression and high-density lipoprotein concentration. **Conclusion:** The rat model of obesity with atherosclerosis was established successfully. With the prolongation of the time of establishing the model, the perivascular adipose tissue increased significantly, the atherosclerosis increased gradually, and the expression of chemerin in the perivascular adipose tissue increased. Chemerin in perivascular adipose tissue may be involved in the development of atherosclerosis.

Key words: Atherosclerosis; Obesity; Perivascular adipose tissue; Chemerin; Adiponectin

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R543.5; R589.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)03-401-06

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81100600);首都医科大学附属北京同仁医院科研种子基金项目(2016-YJJ-ZZL-020);

北京市自然科学基金项目(7202031)

作者简介:张福庄(1985-),医学硕士,主治医师,主要研究方向:动脉粥样硬化性疾病基础及临床研究,冠心病介入治疗,

E-mail: zfz9698@163.com

(收稿日期:2020-07-07 接受日期:2020-07-31)

前言

随着国民生活水平的提高和生活方式的改变,动脉粥样硬化性疾病的发病率日益增高,已成为严重威胁健康的慢性疾病。肥胖目前被认为动脉粥样硬化性代谢综合征的一个重要危险因素,然而其对动脉硬化影响机制尚未完全明确。血管旁脂肪组织(perivascular adipose tissue, PVAT)尽管在组织学上与血管密切相关,但长期被认为对血管起到单纯支撑、机械及能量储存作用而被忽略。而近年来研究表明 PVAT 实际上是个活跃的内分泌器官,其分泌的脂肪细胞因子可以通过旁分泌或滋养血管分泌由外向内(outside-to-inside)与动脉管壁相互作用,调节血管张力并参与炎症反应及血管重塑,可能直接影响动脉粥样硬化的发生发展,从而架起了研究肥胖与动脉粥样硬化的新桥梁^[1]。已有研究证实肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素 6(interleukin -6, IL-6)、纤溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、脂联素(adiponectin, APN)等脂肪细胞因子与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成过程密切相关;Chemerin 是新近确定的具有趋化作用的脂肪细胞因子,可调节炎症反应、脂肪细胞代谢,并可诱导内皮增殖和新生血管形成,但其与动脉粥样硬化关系尚不明朗。本研究旨在探究 chemerin 在肥胖动脉粥样硬化大鼠模型不同时期血管旁脂肪组织中的表达情况及其与动脉粥样硬化形成过程的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 7-8 周龄成年健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 180 ± 10

g, 动物合格证号: SCXX(京)2006-0009。分笼饲养于 SPF 级实验动物房, 室温控制 $19-23^{\circ}\text{C}$, 人工照明 12 小时采光, 饮用水为纯净水, 自由摄食。

1.2 动物分组

肥胖动脉硬化模型组大鼠给予高脂饲料喂养, 按照造模周期分为模型 8 周组、模型 12 周组、模型 16 周组及模型 24 周组, 每组动物各 5 只; 相对应, 正常对照组大鼠给予普通饲料喂养。同样按照实验周期分为对照 8 周组、对照 12 周组、对照 16 周组及对照 24 周组, 每组动物各 5 只。分别于实验开始 8 周、12 周、16 周及 24 周时处死大鼠, 取材。

1.3 造模方法

参考本课题组前期发表文献方法完成动物模型建立及验证^[1]。

1.4 标本采集

大鼠禁食过夜(至少 12 h), 称量大鼠体重, 以 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉, 将大鼠仰卧位固定于鼠台, 以手术刀沿腹部正中中线切开腹壁皮肤, 逐层分离腹壁肌肉及腹腔内脏器官, 见搏动腹主动脉, 以 5 mL 无菌注射器自腹主动脉取血, 全血标本入抗凝管, 3000 r/min 离心 15 min, 分离血清, -80°C 冰箱保存。夹闭腹主动脉; 正中切口打开胸腔, 解剖显微镜下沿腹主动脉由下及上至升主动脉, 细致分离全部主动脉, 并保留主动脉周围脂肪组织。取部分升主动脉及动脉旁脂肪组织置 4% 多聚甲醛中固定, 待制作冰冻及石蜡切片。剥离全长胸主动脉旁脂肪组织, 生理盐水洗净, 用滤纸吸净表面血液后电子天平称重, 后立即置于液氮中速冻保存, 待提取总 RNA 用。剥离大鼠双侧季肋部皮下脂肪组织称重, 剥离内脏脂肪(大网膜 + 肠系膜 + 附睾及肾周脂肪)称重。

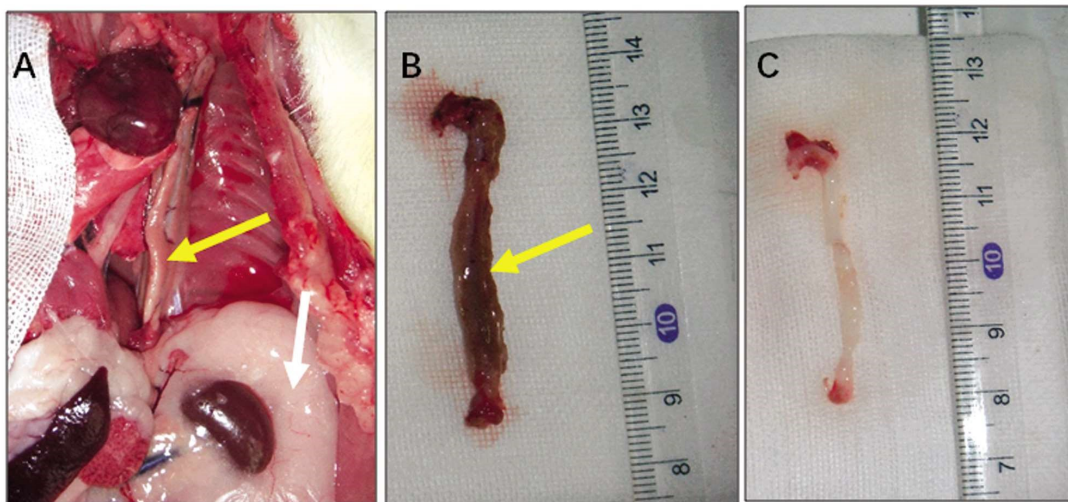


图 1 大鼠血管旁脂肪组织、内脏脂肪、主动脉取材部位

Fig.1 Perivascular adipose tissue, visceral adipose tissue and aorta of rats

A. PVAT (yellow arrow) and perirenal fat (white arrow); B. PVAT (yellow arrow) and the thoracic aorta of rats in vitro;

C. Thoracic aorta of rats after PVAT removal.

1.5 主动脉及主动脉旁脂肪组织 HE 染色

取大鼠胸主动脉并保留血管旁脂肪组织经固定、包埋、切片后进行胸主动脉及其血管旁脂肪组织 HE 染色。

1.6 主动脉及主动脉旁脂肪免疫组织化学染色

切片脱蜡入水, 柠檬酸钠缓冲液热抗原修复, 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶, 10% 正常山羊血清抑制非特异性表达, 分别滴加一抗, 4°C 过夜, 分别滴加二抗, DAB 显色。阴性对照以 PBS 替代一抗。具体步骤如下: 固定、脱水、包埋、切片步骤同

HE。在阴性对照切片中,不加一抗,其余步骤完全相同。应用 Nikon ECLIPSE 90i 光学显微镜进行图像观察及摄片。图像中棕黄色染色为阳性表达。应用 Image-pro plus 专业图像分析软件测定阳性免疫反应物的平均光密度值。定量分析:每张切片用低倍(10× 10)显微摄像头选取区域,观察阳性部位,再转到高倍镜下(10× 40)采集阳性表达部位图像,输入计算机,每一标本随机选取 5 个高倍视野,求其平均光密度值。

1.7 主动脉旁脂肪组织 RNA 提取

Trizol 法提取脂肪组织中总 RNA,按表 1 中反转录体系将总 RNA 反转录为 cDNA,备用。

1.8 实时荧光定量 PCR(real-timePCR)

1.8.1 实时荧光定量 PCR 引物设计 根据 Genebank 中 chemerin、adiponectin 及 GAPDH 的 mRNA 序列,应用 Primer 5.0 软件,跨内含子设计引物,由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。引物序列及反应条件见表 2。

1.8.2 Real-timePCR 扩增反应体系 Real-timePCR 扩增条件为:预变性,95℃ 30 s;95℃ 5s,60℃ 30 s,40 个循环;55℃ 15 s,81

个循环进行熔解曲线分析。

表 1 反转录体系构建方法

Table 1 Reverse transcription system

Component	Final dose
MgCl ₂	4 μL
reverse transcription 10× Buffer	2 μL
dNTP Mixture	2 μL
Recombinant RNA enzyme inhibitor	0.5 μL
AMV reverse transcriptase	0.6 μL(15 U)
Oligo(dT) ₁₅	1 μL(0.5 βg)
Total RNA	1 μg(Calculate the volume according to the measured concentration)
RNase free water	Depending on total RNA volume and total volume
General system	20 μL

表 2 实时荧光定量 PCR 反应引物

Table 2 Real time fluorescent quantitative PCR reaction primer

mRNA	Genebank Number	Primer sequence	Ta	Product
Chemerin	NM_001013427.1	F:5'-CTGCCCAATACTGAAGCAAGG-3'	60℃	104bp
		R:5'-GCCCGAGGAAGAAGTAGATGC-3'		
Adiponectin	NM_144744.2	F: 5'-TAATTCAGAGCAGCCCGTAG-3'	60℃	100bp
		R: 5'-TCAGAACCCTCAAAGTAAGCA-3'		
GAPDH	FQ216837.1	F: 5'-TATGGCTACAGCAACAGGGTG-3'	60℃	74bp
		R: 5'-GGGTGGTCCAGGGTTTCTTA-3'		

表 3 实时荧光定量 PCR 扩增体系构建方法

Table 3 Construction method of real-time fluorescence quantitative PCR amplification system

Component	Dose
SYBR GREEN 2× MIX	10 μL
Sense primer(10 μmol/L)	0.4 μL
Anti-sense primer(10 μmol/L)	0.4 μL
cDNA	1 μL
ddH ₂ O	8.2 μL
General system	20 μL

1.8.3 数据处理 利用 Bio-Rad IQ5 optical system software 软件对数据进行分析处理,并导出文件及图像;利用管家基因进行对目的基因的表达进行校正,得到相对定量结果。统计学方法:计算出个基因表达的 Δ Ct 值,进行 Quantity 比较; Δ Ct=Ct(目的基因)-Ct(内参基因),Quantity(相对表达浓度)=Quantity(实验组表达浓度)/Quantity(对照组表达浓度)= $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct$ = ΔCt 实验组- ΔCt 对照组)。

1.9 统计学处理

对于定量资料符合正态分布的用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间均数比较采用两独立样本 t 检验,多组间均数比较采用 ANOVA 方差分析;非正态分布数据采用中位数(第 25 百

分位数;第 75 百分位数)表示,采用非参数检验;计数资料用率表示,采用 χ^2 检验。两因素间的相关性分析采用简单直线相关分析(正态分布数据采用 Pearson 相关分析,非正态分布数据采用 Spearman 秩相关分析)。所有数据应用 SPSS16.0 软件进行统计分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。主要实验数据重复 2 次。

2 结果

2.1 成功构建肥胖动脉粥样硬化大鼠模型

模型组大鼠身体个部位脂肪组织含量随饲养时间的延长逐渐明显增加,而正常对照组大鼠脂肪组织含量变化不明显;造模初始阶段,模型组大鼠与同阶段正常对照组大鼠脂肪含量无明显差距;造模 12 周之后模型组大鼠身体脂肪含量较同阶段对照组大鼠明显增多,模型 16 周组大鼠皮下脂肪、腹腔内脏脂肪、胸主动脉血管旁脂肪质量较对照 16 周组明显增加,模型 24 周组较对照 24 周组也增加明显。支持模型 16 周组、模型 24 周组肥胖模型造模成功。各对照组大鼠主动脉管壁呈圆形,内膜、中膜及外膜分界清楚,管腔面由单层内皮细胞覆盖,内弹力板完整,无斑块形成和内膜增生。血管旁脂肪组织形态清晰,位于主动脉外膜之外,与动脉管壁紧密相连,脂肪细胞排列整齐,脂肪细胞间可见毛细血管走行。各模型组大鼠主动脉均可见不

同程度的动脉粥样硬化病理改变:主动脉管壁增厚,内皮部分脱落,不完整;中层平滑肌细胞增生,细胞排列紊乱,内弹力板断裂,局部管壁向管腔内突出,形成纤维增生性纤维斑块,斑块由增生平滑肌细胞和少量的沉积脂质组成,其中含大量细胞外基质,不等量增生的平滑肌细胞、巨噬细胞、泡沫细胞浸润。斑

块部位管壁外膜处血管旁脂肪组织形态清晰,脂肪细胞排列整齐,细胞较正常对照组较大,脂肪组织明显增厚,有较多的炎症细胞浸润。直接说明大鼠动脉硬化模型建立成功,结果详见已发表文献^[1]。

表 4 不同组大鼠各部位脂肪质量($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Weight of different fat depots in different groups($\bar{x} \pm s$)

Groups(n=5)	Subcutaneous adipose(g)	Visceral adipose(g)	Perivascular adipose(mg)
Model 8weeks	1.53 $\pm$ 0.05 ^a	4.75 $\pm$ 1.21 ^a	79.47 $\pm$ 5.08 ^a
Control 8weeks	1.41 $\pm$ 0.20	6.37 $\pm$ 3.12	81.37 $\pm$ 7.27
Model 12weeks	3.05 $\pm$ 0.81 ^b	9.88 $\pm$ 2.95 ^b	172.70 $\pm$ 19.21 ^b
Control 12weeks	2.93 $\pm$ 0.54	12.26 $\pm$ 3.00	161.23 $\pm$ 27.68
Model 16weeks	5.23 $\pm$ 1.37 ^c	24.89 $\pm$ 7.55 ^c	261.24 $\pm$ 68.72 ^c
Control 16weeks	1.75 $\pm$ 0.33	12.54 $\pm$ 1.99	156.50 $\pm$ 39.34
Model 24weeks	8.64 $\pm$ 1.29 ^d	36.36 $\pm$ 6.99 ^d	411.00 $\pm$ 65.94 ^d
Control 24weeks	3.75 $\pm$ 0.63	15.96 $\pm$ 2.32	244.20 $\pm$ 41.17

Note: ^a $P>0.05$ vs. Control 8weeks; ^b $P>0.05$ vs. Control 12weeks; ^c $P<0.05$ vs. Control 16weeks; ^d $P<0.05$ vs. Control 24weeks.

2.2 血管旁脂肪组织 Chemerin 组织化学染色结果

Chemerin 在正常对照组及模型组血管旁脂肪组织中均有表达,阳性表达部位呈现棕黄色。对照组中表达较弱,但随着大

鼠饲养时间的延长,血管旁脂肪中 Chemerin 表达有逐渐增强趋势。如图 2 所示,OD 值定量分析结果如图 3 所示。

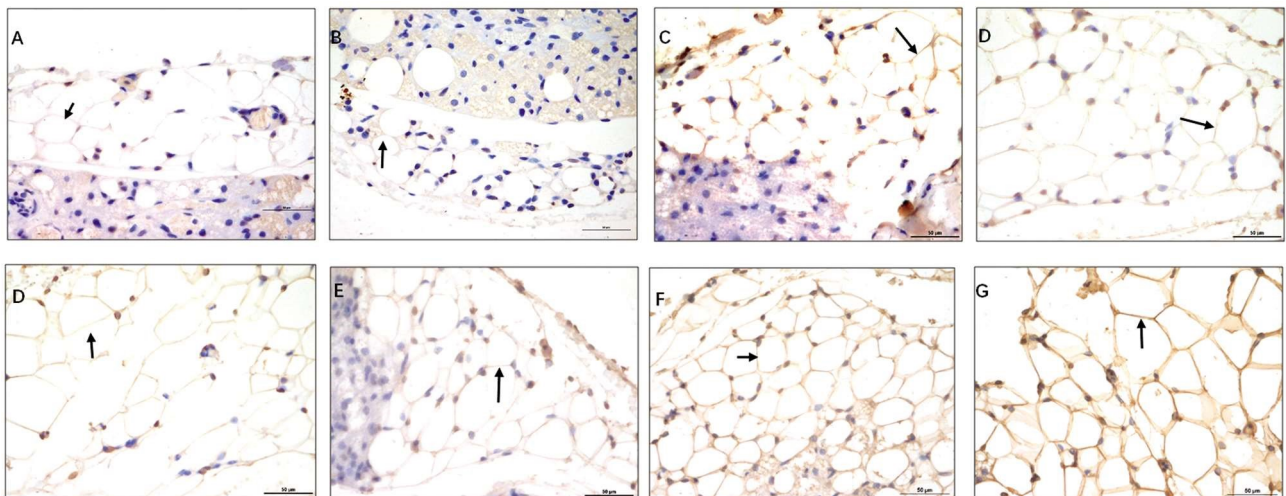


图 2 大鼠 PVAT 中 chemerin 免疫组织化学染色

Fig.2 Immunohistochemical staining of Chemerin in pvat of rats

A. Control 8 weeks 400 $\times$; B. Model 8 weeks 400 $\times$; C. Control 12 weeks 400 $\times$; D. Model 12 weeks 400 $\times$; E. Control 16 weeks 400 $\times$; F. Model 16 weeks 400 $\times$; G. Control 24 weeks 400 $\times$; H. Model 24 weeks 400 $\times$; The positive expression is brown (arrow).

2.3 动脉硬化发展不同阶段 PVAT 中脂肪细胞因子 mRNA 表达变化

模型组于造模 8 周及 24 周时检测 PVAT 中 chemerin mRNA 表达较对照组明显升高;模型组于造模 12 周、16 周及 24 周时检测 PVAT 中 adiponectin mRNA 表达较对照组明显降低,具体结果详见表 5 及图 4。

2.4 血管旁脂肪组织中 chemerin 的 mRNA 表达与各因素的相关性分析

Pearson 直线相关分析显示,PVAT 中 chemerin 的 mRNA 表达与免疫组织化学方法测的组织中蛋白表达呈正相关($r=0.368, P=0.046$),与 adiponectin 的 mRNA 表达呈负相关($r=-0.364, P=0.037$),与血清 LDL-C 浓度呈正相关($r=0.592, P=0.000$),与血清 HDL-C 浓度呈负相关($r=-0.453, P=0.009$),与血管旁脂肪质量呈正相关($r=0.460, P=0.007$),与内脏脂肪质量呈正相关($r=0.482, P=0.005$),与皮下脂肪质量呈正相关($r=0.483, P=0.004$),而与体重无明显相关性($r=0.277, P=0.118$)。主动脉

中层厚度与 PVAT 中 chemerin 的 mRNA 表达呈正相关($r=0.418, P=0.021$), 而与 adiponectin 表达无明显相关($r=-0.305, P=0.101$)。

3 讨论

PVAT 特指在动脉外膜外围绕动脉管壁周围的脂肪组织。PVAT 与血管紧密相连, 无筋膜组织相隔, 脂肪细胞可直接浸润至动脉外膜, 且观察到丰富的滋养血管(vasa vasorum)" 由外到内 " 连接 PVAT、血管外膜、平滑肌层、血管内膜以及动脉粥样硬化斑块^[2]。我们之前的临床研究提示, 冠状动脉周围脂肪组织的体积含量与冠状动脉粥样硬化的严重程度密切相关, 发生冠状动脉粥样硬化者其冠脉周围脂肪组织体积较正常者明显增多, 且冠脉周围脂肪组织含量越多冠状动脉粥样硬化病变程度越重^[3]。基础研究提示 PVAT 还可以活跃合成分泌经典炎症因子在调节机体代谢、心血管功能和免疫方面发挥重要作用^[4]。

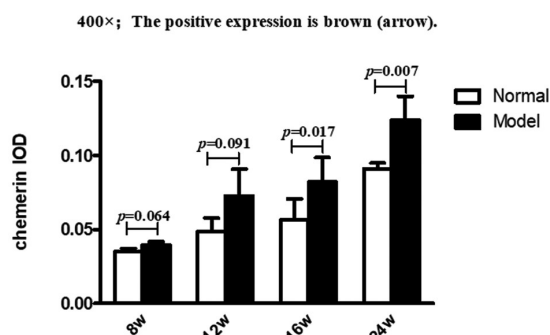


图3 PVAT 中 chemerin 组织化学染色平均 OD 值分析

Fig.3 Analysis of average OD value of chemerin histochemical staining in PVAT

表 5 各组 Quantity 值比较(得到的数值与 mRNA 表达量成正比)($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of quantity values of each group (obtained value is directly proportional to mRNA expression) ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Number of cases	Chemerin	Adiponectin
Model 8 weeks	5	0.4837 $\pm$ 0.1520 ^a	0.7193 $\pm$ 0.0643
Control 8 weeks	5	0.1956 $\pm$ 0.0100	0.7126 $\pm$ 0.0661
Model 12 weeks	5	0.3387 $\pm$ 0.0520	0.7225 $\pm$ 0.0311 ^b
Control 12 weeks	5	0.3956 $\pm$ 0.0260	0.8544 $\pm$ 0.0437
Model 16 weeks	5	0.4044 $\pm$ 0.1174	0.6563 $\pm$ 0.1085 ^c
Control 16 weeks	5	0.3247 $\pm$ 0.0893	1.1034 $\pm$ 0.1796
Model 24 weeks	5	0.5460 $\pm$ 0.0316 ^d	0.6537 $\pm$ 0.1584 ^d
Control 24 weeks	5	0.2881 $\pm$ 0.0614	1.5131 $\pm$ 0.2802

Note: ^a $P<0.05$ vs. Control 8 weeks; ^b $P<0.05$ vs. Control 12 weeks; ^c $P<0.05$ vs. Control 16 weeks; ^d $P<0.05$ vs. Control 24 weeks.

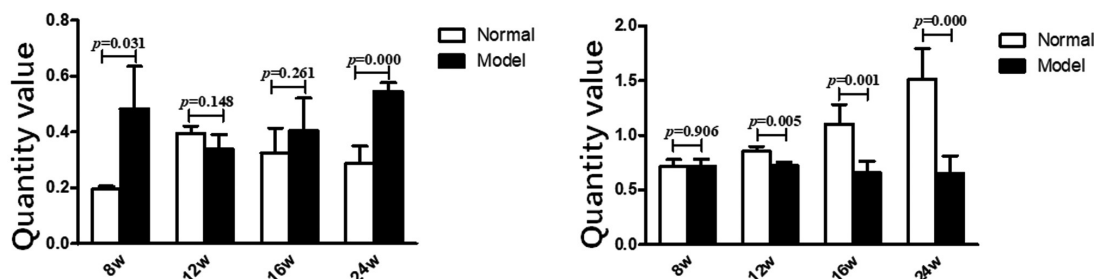


图4 各组血管旁脂肪组织 chemerin 及 adiponectin 的 mRNA 表达变化

Fig.4 mRNA expression changes of chemerin and adiponectin in PVAT

Chemerin 是一种新的脂肪细胞因子, 与炎症和脂肪生成有关。实验和临床数据表明, 在许多代谢性和炎症性疾病中, 局部和循环的 chemerin 表达和激活都会升高, 包括银屑病、肥胖、2 型糖尿病、代谢综合征和心血管疾病^[5-7]。既往研究提示 chemerin 可能是一个冠心病、心力衰竭及颈动脉狭窄的生物标记物, 因为此类患者血清 chemerin 水平升高, 但是 chemerin 的具体生物学特性尚未得到充分的研究^[8-10]。

有研究表明, Chemerin 可以在炎症早期趋化巨噬细胞等免疫活性细胞并使之活化释放 TNF- α 、IL-6 等炎症因子, 促进炎症发生发展, 重组人 Chemerin 能显著促进人外周血单核细胞与血管内皮细胞的黏附, 以及跨血管内皮细胞迁移, 提示 Chemerin 可能通过影响单核细胞功能参与了动脉粥样硬化

的发生发展^[11,12]。Lehrke 等^[13]对典型或不典型胸痛的患者进行研究, 通过测定血浆中 chemerin 和一些炎症因子的水平并用多排 CT 评估冠脉狭窄程度, 发现血浆中 chemerin 与炎症标记物及代谢综合征的组分相关。Spiroglou 等^[14]在尸检中用免疫组化定量检测 chemerin 的表达, 表明人的左冠状动脉旁脂肪中 chemerin 的蛋白水平与冠脉粥样硬化的严重性呈正相关。我们课题组之前进行的研究直接表明, 与冠心病患者相比, 冠心病患者的心外膜脂肪组织中 chemerin 的 mRNA 表达水平显著升高而脂联素 mRNA 表达水平显著降低, 我们还首次发现心外膜脂肪组织中 chemerin mRNA 表达与冠脉病变的严重程度呈正相关, 而血清 chemerin 在两组患者间无显著差异并且与冠脉病变的严重程度不相关, 这提示心外膜脂肪组织中

chemerin 的局部水平与冠脉粥样硬化的联系更为密切^[15]。

本研究的结果显示,模型建立 8 周时观察显示大鼠动脉硬化已经形成,但肥胖模型并没有形成,模型组大鼠体重、身体脂肪含量较对照组并无明显变化,但此时测量血管旁脂肪组织中 chemerin 的 mRNA 表达及免疫组织化学检测的蛋白表达较对照组均明显增加,考虑此时 PVAT 中的 chemerin 变化继发于动脉硬化形成过程中急性期动脉管壁的炎症变化,此种表现与 Takaoka M 等^[16]报道的导丝损伤大鼠髂动脉内膜可以上调相关动脉周围脂肪组织表达 TNF- α 、IL-6、PAI-1 和 MCP-1 等炎症因子过程十分相似。从一个侧面反映了 PVAT 与动脉管壁之间存在功能上的交流。

模型建立 12 周 -24 周的过程中,12 周时检测 PVAT 中 chemerin 的 mRNA 表达与蛋白表达结果提示模型组与正常对照组间无明显差异,但此时我们发现模型组大鼠的体重及体内脂肪含量均较正常对照组低,分析可能与此相关。16-24 周是大鼠肥胖模型形成时期,此时期模型组大鼠体重、体内脂肪含量及血管旁脂肪组织含量均较同时期正常对照组大鼠明显增加,我们观察到,此时期模型组 PVAT 中 chemerin 的 mRNA 表达及蛋白表达均呈增强趋势,至 24 周时与同期对照组相比表达明显增强,且直线相关分析显示,chemerin 基因表达水平与免疫组织化学检测的蛋白表达水平呈明显正相关。在此过程中我们还观察到模型组 PVAT 中 adiponectin 的表达逐渐降低。考虑此过程与大鼠肥胖形成,体内脂肪含量的明显堆积相关。Pearson 直线相关分析显示,PVAT 中 chemerin 的 mRNA 表达水平与 adiponectin 基因表达呈明显负相关,这与 Spiroglou 等^[14]在尸检中报道人的腹主动脉旁脂肪中 chemerin 蛋白水平与脂联素蛋白水平呈负相关一致性良好。有研究报道 chemerin 干预分化的 3T3-L1 脂肪细胞能显著降低 PPAR-2 mRNA 表达水平^[17],而脂联素基因的转录主要受 PPAR-2 的调节,故推测 chemerin 可能通过抑制 PPAR-2 表达而使脂联素的基因表达降低,这也可以解释两者的负相关性。但 Goralski 等^[18]报道在小鼠脂肪细胞分化第 4 天沉默 chemerin 基因,将使脂联素的基因表达降低,该报道与以上研究的差异,推测可能与在脂肪细胞分化阶段和成熟阶段 chemerin 对脂联素调控不同有关。脂联素是一种脂肪细胞特异性蛋白,具有促进胰岛素敏感性、调节葡萄糖和脂肪酸分解代谢的作用,而 chemerin 被认为是胰岛素信号传导和葡萄糖分解代谢的抑制剂,最近的研究表明,高 chemerin/低脂联素比值在导致患者血脂异常和代谢综合征中起着至关重要的作用。在各种代谢紊乱中,脂联素与化学物质的比例失调,这使得它在治疗学上的应用非常有价值^[19,20]。但 Chemerin 与脂联素的相互作用及调控具体机制仍有待进一步研究探讨。

总之,本项研究目前成功探索了一种建立肥胖动脉硬化大鼠模型的方案,并进一步完善了模型的评价指标,并且利用模型探索了血管旁脂肪组织中脂肪细胞因子 chemerin 的基因及蛋白表达在动脉粥样硬化形成过程中的变化,但血管旁脂肪组织分泌的 chemerin 及其他脂肪细胞因子在局部影响动脉粥样硬化发生发展的机制尚待进一步深入研究,进一步阐明血管旁脂肪组织中 chemerin 的调控及其分子机制将可能为动脉粥样硬化的防治提供新的关注靶点。

参考文献(References)

- [1] 张福庄,陶红,王国宏,等.肥胖动脉粥样硬化大鼠模型的建立及验证[J].现代生物医学进展,2017,17(35): 6801-6805, 6827
- [2] Kim H W, Eric J. Belin de Chantemèle, Weintraub N L. Perivascular Adipocytes in Vascular Disease[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2019, 39(11): 2220-2227
- [3] 张福庄,赵怡,陶红,等.心外膜脂肪体积与冠状动脉粥样硬化及左心室舒张功能的相关性研究 [J]. 心肺血管病杂志, 2012, 031(001): 58-63
- [4] Omar A, Chatterjee T K, Tang Y, et al. Proinflammatory Phenotype of Perivascular Adipocytes [J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2014, 34(8): 1631-1636
- [5] Chang S S, Eisenberg D, Zhao L, et al. Chemerin activation in human obesity[J]. Obesity, 2016, 24(7): 1522-1529
- [6] Sinan, İnci, Gökhan, et al. Chemerin as an independent predictor of cardiovascular event risk[J]. Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism, 2016, 7(2): 57-68
- [7] Kostopoulos C G, Spiroglou S G, Varakis J N, et al. Chemerin and CMKLR1 expression in human arteries and periadventitial fat: a possible role for local chemerin in atherosclerosis?[J]. BMC Cardiovascular Disorders, 2014, 14(1): 56
- [8] Leihner A, Muendlein A, Rein P, et al. Plasma Chemerin is a Strong and Independent Predictor of Cardiovascular Event Risk [J]. Circulation, 2014, 130: A11328-A11328
- [9] Zhou X, Tao Y, Chen Y, et al. Serum Chemerin as a Novel Prognostic Indicator in Chronic Heart Failure [J]. Journal of the American Heart Association, 2019, 8(15): e012091
- [10] Kammerer A, Staab H, Herberg M, et al. Increased circulating chemerin in patients with advanced carotid stenosis [J]. BMC Cardiovascular Disorders, 2018, 18(1): 65
- [11] Liu H, Xiong W, Luo Y, et al. Adipokine Chemerin Stimulates Progression of Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice [J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 1-9
- [12] 孟庆冬,陶红.重组人脂肪因子 Chemerin 对巨噬细胞凋亡影响及其机制的研究[J].心肺血管病杂志, 2015, 034(009): 719-722
- [13] Lehrke M, Becker A, Greif M, et al. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis [J]. Eur J Endocrinol, 2009, 161(2): 339-344
- [14] Spiroglou SG, Kostopoulos CG, Varakis JN, et al. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis[J]. Atheroscler Thromb, 2010, 17(2): 115-130
- [15] Xiuying Gao, Shuhua Mi, Fuzhuang Zhang, et al. Association of chemerin mRNA expression in human epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis[J]. Cardiovascular Diabetology, 2011, 10: 87
- [16] Takaoka M, Suzuki H, Shioda S, et al. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(8): 1576-1582
- [17] Roh SG, Song SH, Choi KC, et al. Chemerin-a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 362(4): 1013-1018
- [18] Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism[J]. J Biol Chem, 2007, 282(38): 28175-28188
- [19] Singh A, Choubey M, Bora P, et al. Adiponectin and Chemerin Contrary Adipokines in Regulating Reproduction and Metabolic Disorders[J]. Reproductive Sciences, 2018, 25(10): 1462-1473
- [20] David J. Ferland, Stephanie W. Watts. Chemerin: A comprehensive review elucidating the need for cardiovascular research[J]. Pharmacological Research, 2015, 99: 351-361