

• 临床基础研究 •

骨形态发生蛋白 4 在肥胖小鼠心肌、动脉和脂肪组织的表达与炎症的相关性研究*

顾秀莲¹ 樊济海¹ 巢胜吾¹ 王玲¹ 李博¹ 宗刚军² 吴婷²

【摘要】 **目的:**探讨肥胖老鼠体内心脏、动脉与脂肪组织中骨形态发生蛋白 4(BMP4)的表达及其与炎症程度的相关性。**方法:**将 ob/ob 小鼠分为实验组与干扰组,以 C57BL/6 小鼠为对照组。每组各 8 只,普通饮食喂养,干扰组尾静脉注射 BMP4 shRNA 腺病毒,每周 1 次,持续 12 周。12 周后心脏采血处死,取心肌组织、腹主动脉及腹部脂肪组织。免疫组织化学染色定位半定量 BMP4 的表达水平。PCR 荧光定量和免疫蛋白印迹法检测 BMP4、白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-9 mRNA 与蛋白的表达水平。**结果:**实验组 BMP4、IL-1 β 和 IL-9 的 mRNA 与蛋白在心肌组织和动脉血管的表达均显著高于干扰组和对照组,实验组和干扰组 BMP4 蛋白在脂肪组织中的表达要显著低于对照组(均 $P < 0.05$)。**结论:**BMP4 在肥胖小鼠体内心肌组织和动脉血管中明显高表达,是促进局部炎症反应发生的独立危险因素。

【关键词】 骨形态发生蛋白 4;肥胖;炎症;心血管疾病

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2016.10.017

【中图分类号】 R541 **【文献标志码】** A

Correlation between BMP4 and inflammation in the myocardial, arteries and adipose tissue of obese mice

GU Xiulian¹ FAN Jihai¹ CHAO Shengwu¹ WANG Ling¹
LI Bo¹ ZONG Gangjun² WU Ting²

(¹Department of Cardiology, 455 Hospital of PLA, Shanghai, 200000, China; ²Department of Cardiology, 101 Hospital of PLA)

Corresponding author: WU Ting, E-mail: wutingdoctor@163.com

Abstract Objective: To investigate the bone morphogenetic protein 4 (BMP4) expression in the myocardial tissue, aortas and adipose tissue of obese mice, and to analyze the correlation between BMP4 and inflammation. **Method:** The ob/ob mice were divided into experimental group and interference group, the C57BL/6 mice were included in control group. There were 8 mice in each group, fed with normal diet, and interference group received tail vein injection of shRNA BMP4 adenovirus, 1 times per week for 12 weeks. The samples of heart, abdominal aorta and abdominal adipose tissue took after 12 weeks, and the expression of BMP4 protein was detected by immunohistochemistry, the expressions of mRNA and protein of BMP4, IL-1 β and IL-9 were tested by quantitative PCR and Western blotting. **Result:** The mRNA and protein levels of BMP4, IL-1 β , and IL-9 were significantly higher in the myocardial tissue and aorta in experimental group than those in interference group and control group, while the levels of BMP4 protein in the adipose tissue in experimental group and interference group were significantly lower than those in control group. **Conclusion:** BMP4 is significantly up-regulated in the myocardial tissue and aorta in obese mice, which is an independent risk factor involved in the local inflammatory response.

Key words bone morphogenetic protein 4; obesity; inflammation; cardiovascular disease

流行病学发现,肥胖是导致心血管疾病的高危因素^[1]。肥胖的特征是局部与全身的慢性氧化应激和炎症反应^[2-3]。增加的氧化应激与炎症信号相互作用,可引起内皮功能紊乱,并最终促进心

血管疾病的发生与发展^[4-6]。脂肪组织增多作为肥胖的一种特征性表现,其与心血管疾病之间的关系,仍缺乏报道。骨形态发生蛋白 4(BMP4)是介导多能干细胞向脂肪细胞分化的重要因子,与体内脂肪组织关系密切^[7-8]。最近有研究发现,BMP4 在消瘦的人体脂肪组织中表达量上升,而在肥胖者脂肪组织中的表达量反而减少^[9]。另有研究发现,BMP4 能刺激血管 NADPH 氧化酶活化,增加过氧化物的发生,降低内皮 NO 利用度,

*基金项目:中国人民解放军第 455 医院课题(No: YG2014001)

¹中国人民解放军第 455 医院心内科(上海,200000)

²中国人民解放军第 101 医院心内科

通信作者:吴婷,E-mail:wutingdoctor@163.com

从而导致血管内皮功能紊乱^[10-12]。BMP4作为一种促炎因子,在肥胖者体内的表达下降和肥胖的炎症特性相矛盾。这便引发了这样一个假设,是否当脂肪组织增多时,负反馈调节了BMP4介导多能干细胞向脂肪细胞转化的作用,使得多余的BMP4释放入血液,进而作用于血管内皮和心肌,从而促进了心血管疾病的产生。本研究利用腺病毒干扰肥胖小鼠体内BMP4的表达,以探究BMP4是否是肥胖小鼠心肌组织与动脉血管炎症形成的独立危险因素。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF级健康雄性ob/ob小鼠与C57BL/6小鼠,4周龄,体质量18~26g,购于南京青紫兰科技有限公司。兔抗BMP4、抗IL-1 β 、抗IL-9抗体,均购自Abcam公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(Proteintech公司),细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司),ECL放光试剂盒(Millipore公司),TRIzol试剂(Life Technologies公司)。PCR逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒购于TaKaRa公司。小鼠BMP4 shRNA干扰腺病毒购于上海吉玛制药技术有限公司,BMP4 shRNA腺病毒序列:GCCAACACTGTGAGGAGTTTC。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组 将ob/ob小鼠分为腺病毒未干扰组(实验组)和腺病毒干扰组(干扰组),以C57BL/6小鼠为对照组,每组各8只。饲养室温度20~25 $^{\circ}$ C,相对湿度40%~50%,自由饮水,普通饮食喂养12周。干扰组小鼠以浓度为 1×10^9 TU/ml的BMP4 shRNA腺病毒按4 ml/kg尾静脉注射,每周1次,持续12周。

1.2.2 标本制备 取小鼠心脏心尖处5 mm、腹主动脉近心端1 cm及腹部脂肪组织制备石蜡切片,每隔4 μ m连续横切,每个切片上3个组织面。行常规BMP4免疫组织化学染色,其余组织行实时荧光定量检测和蛋白免疫印迹检测。

1.2.3 BMP4的检测 石蜡切片脱蜡、水化。PBS洗5 min。将切片浸入0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中,92~98 $^{\circ}$ C水浴加热15 min,自然冷却,PBS洗切片;30 ml/L过氧化氢温浴10 min;PBS洗切片;将试剂盒中的血清用PBS稀释,滴加在组织上,37 $^{\circ}$ C孵育20 min。滴加兔抗BMP4抗体(1:200),4 $^{\circ}$ C冰箱放置过夜,PBS洗5次。滴加生物素化驴抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C孵育30 min,清洗后DAB显色,苏木素轻度复染。脱水、透明、封片。BMP4阳性表达为胞质内的棕黄色颗粒,显微镜下观察并拍照。

1.2.4 BMP4、IL-1 β 和IL-9 mRNA表达水平的检测 TRIzol法抽提总RNA,逆转录总mRNA为

cDNA,实时荧光定量检测各mRNA的表达量。利用Primer 5软件设计引物,引物序列由上海生工生物工程有限公司合成(表1)。

表1 BMP4、IL-1 β 和IL-9引物序列
Table 1 Primers of BMP4, IL-1 β and IL-9

项目	引物序列	长度/bp
BMP4	F:CGCCAGCCGAGCCAACAC	169
	R:GGTCCACCTGCTCCCGAAAGA	
IL-1 β	F:TGTGATGTTCCATTAGAC	131
	R:AATACCACTTGTGGCTTA	
IL-9	F:CCAGCTTCCAAGTGCCACTGC	125
	R:TGCATGGTGGTATTGGTCATCTG	
β -actin	F:ACACCCGCCACCAGTTTCGC	198
	R:TCTGGGCCTCGTCACCCACAT	

1.2.5 BMP4、IL-1 β 和IL-9蛋白表达的检测 充分研磨组织,加入细胞裂解液裂解细胞。4 $^{\circ}$ C、13 000 \times g,离心30 min,提取蛋白。调整蛋白浓度,加入上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C变性5 min,用SDS-PAGE分离蛋白,转膜后用5%脱脂奶粉室温封闭2 h,依次滴加兔抗BMP4(1:800)、兔抗IL-1 β (1:1 600)及兔抗IL-9(1:400)抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗羊抗兔(1:200)室温孵育2 h。压片显影检测蛋白。

1.3 统计学处理

定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据统计应用SPSS 21软件。两组间均数比较采用 t 检验,方差不齐时,采用Satterthwaite校正检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肥胖小鼠模型的建立

经过12周普通饮食的喂养,C57BL/6小鼠体重由最初的(19.6 \pm 1.47)g增至(25.5 \pm 1.32)g,约增长1.4倍,ob/ob小鼠体重由最初的(22.3 \pm 2.05)g增至(43.6 \pm 2.49)g,约增长2.0倍。增加饮食喂养13周后小鼠增长体重超过原体重的35%即被定义为肥胖模型建立成功。经过12周喂养后,本实验实验组小鼠均符合肥胖标准。

2.2 各组织中BMP4蛋白和mRNA的表达

实验组心肌组织与动脉血管中BMP4表达明显多于对照组与干扰组,特别是在动脉内皮细胞内,BMP4几乎完全浸润。而BMP4在脂肪组织中的表达,实验组和干扰组要明显低于对照组。干扰组BMP4的表达在各组织均明显降低证明腺病毒转染成功。见图1。

实验组心肌组织和腹主动脉的BMP4 mRNA表达显著高于对照组与干扰组(均 $P < 0.05$),而在脂肪组织中,3组无显著差异。见表2。

实验组心肌组织与动脉血管中 BMP4 蛋白表达均显著高于对照组与干扰组(均 $P < 0.05$),而在脂肪组织中,实验组和干扰组要显著低于对照组(均 $P < 0.05$)。见图 2 及表 3。

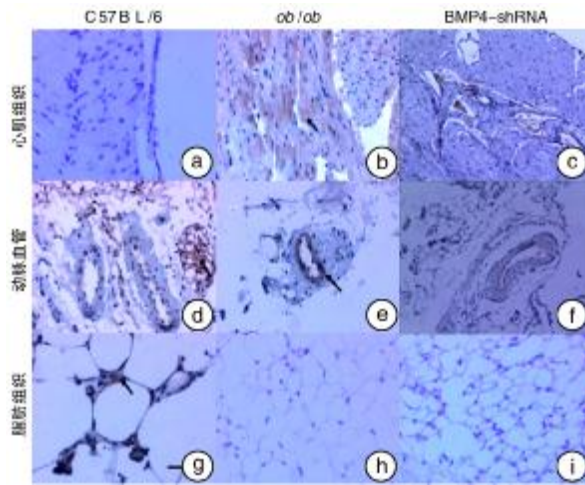


图 1 BMP4 蛋白在心肌、动脉血管和脂肪组织中的表达
Figure 1 Expression of BMP4 in heart, aorta and adipose tissue

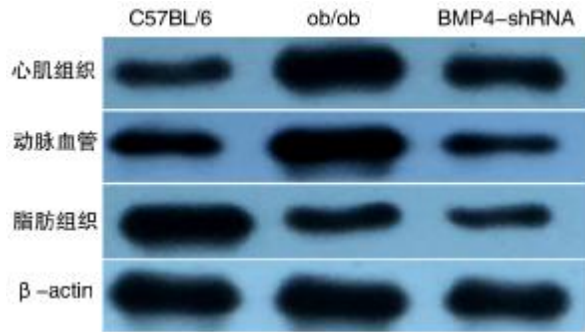


图 2 心肌、动脉血管和脂肪组织中 BMP4 蛋白的表达
Figure 2 Expression of BMP4 in heart, aorta and adipose tissue

表 2 心肌、动脉血管和脂肪组织中 BMP4 mRNA 的表达

Table 2 The mRNA expressions of BMP4 in heart, aorta and adipose tissue

组织	对照组(8只)	实验组(8只)	干扰组(8只)
心肌组织	0.019±0.014	0.057±0.006 ¹⁾	0.018±0.022 ²⁾
动脉血管	0.016±0.037	0.041±0.012 ¹⁾	0.015±0.044 ²⁾
脂肪组织	0.003±0.002	0.002±0.001	0.002±0.001

与对照组同组织比较,¹⁾ $P < 0.05$;与实验组同组织比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

表 3 心肌、动脉血管和脂肪组织中 BMP4 蛋白的表达

Table 3 The protein expressions of BMP4 in heart, aorta and adipose tissue

组织	对照组(8只)	实验组(8只)	干扰组(8只)
心肌组织	0.34±0.03	0.89±0.08 ¹⁾	0.45±0.05
动脉血管	0.51±0.07	0.92±0.12 ¹⁾	0.47±0.03
脂肪组织	0.61±0.09	0.35±0.03 ¹⁾	0.33±0.09

与对照组同组织比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.3 各组织中促炎因子的蛋白和 mRNA 表达

IL-1 β 、IL-9 在实验组心肌组织与动脉血管的表达水平均显著高于对照组与干扰组(均 $P < 0.05$)。见表 4。

实验组心肌组织与动脉血管中 IL-1 β 、IL-9 的蛋白表达均显著高于对照组与干扰组(均 $P < 0.05$)。见图 3 及表 5。

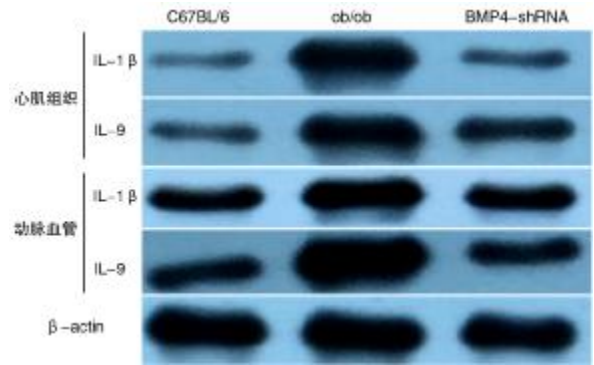


图 3 心肌组织和动脉血管中 IL-1 β 和 IL-9 的蛋白表达
Figure 3 Expression of IL-1 β and IL-9 in heart and aorta tissue

3 讨论

本实验采用 ob/ob 小鼠为实验组,这种瘦素缺乏小鼠即使普通饮食喂养也会导致肥胖,从而排除了营养性致肥胖时,高脂饮食对于心血管系统的影响。实验成功建立了肥胖动物模型,证实 BMP4 在肥胖小鼠体内心肌组织和动脉血管中明显高表达,并介导了局部炎症反应的发生。同时本实验成功干扰了 BMP4 的表达,并证实肥胖小鼠体内心脏组织与动脉血管局部炎症会随着 BMP4 的表达减少而降低。

表4 心肌组织与动脉血管中 IL-1 β 和 IL-9 的 mRNA 表达Table 4 The mRNA expressions of IL-1 β and IL-9 in heart and aorta tissue $\bar{x} \pm s$

指标	对照组(8只)	实验组(8只)	干扰组(8只)
心肌			
IL-1 β mRNA	0.47 \pm 0.08	0.61 \pm 0.05 ¹⁾	0.41 \pm 0.16 ²⁾
IL-9 mRNA	0.67 \pm 0.04	1.42 \pm 0.11 ¹⁾	0.44 \pm 0.07 ²⁾
动脉			
IL-1 β mRNA	0.41 \pm 0.04	0.57 \pm 0.02 ¹⁾	0.38 \pm 0.09 ²⁾
IL-9 mRNA	0.55 \pm 0.06	1.27 \pm 0.08 ¹⁾	0.52 \pm 0.08 ²⁾

与对照组同组织比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与实验组同组织比较,²⁾ $P < 0.05$ 。表5 心肌组织与动脉血管中 IL-1 β 和 IL-9 的蛋白表达Table 5 Expressions of IL-1 β and IL-9 in heart and aorta tissue $\bar{x} \pm s$

指标	对照组(8只)	实验组(8只)	干扰组(8只)
心肌			
IL-1 β 蛋白	0.24 \pm 0.06	0.88 \pm 0.03 ¹⁾	0.31 \pm 0.12 ²⁾
IL-9 蛋白	0.33 \pm 0.04	0.92 \pm 0.01 ¹⁾	0.37 \pm 0.41 ²⁾
动脉			
IL-1 β 蛋白	0.40 \pm 0.05	0.84 \pm 0.02 ¹⁾	0.43 \pm 0.11 ²⁾
IL-9 蛋白	0.41 \pm 0.03	0.98 \pm 0.03 ¹⁾	0.47 \pm 0.09 ²⁾

与对照组同组织比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与实验组同组织比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

肥胖人群之所以有着心血管疾病的高发病率,就是因为肥胖促进了心血管组织的局部炎症^[13-14]。目前已有很多实验致力于研究肥胖者体内局部与全身炎症的机制,但是单纯脂肪组织的增多对于心血管系统的影响却缺乏报道。本实验证实,当脂肪组织增多时,脂肪组织内的 BMP4 蛋白表达量降低,但 mRNA 却无较大差异,从而合理推测,当脂肪组织增多时,脂肪组织内的 BMP4 转移入血液,从而致使 BMP4 在脂肪组织内的蛋白含量下降,而在心肌与动脉血管内表达增多,转移的 BMP4 作用于心肌组织和动脉血管,导致其炎症反应,从而促进了心血管疾病发生。本研究还证实,伴随着小鼠脂肪组织的增加,心肌组织和动脉血管内的 BMP4 明显增加,且促炎因子 IL-1 β 与 IL-9 的蛋白与 mRNA 含量也随之显著增加,证实肥胖小鼠心肌组织和动脉血管中存在炎症反应。而心血管疾病的本质就是一种慢性低度炎症性疾病,炎症反应的增加势必会增加高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发病率^[15]。以上证据证实,BMP4 介导心血管组织的炎症,是脂肪组织增多与心血管炎症增加的桥梁。

肥胖是一种多因素多系统的复杂反应,其特征就是局部与系统的炎症反应^[2-3]。肥胖小鼠心肌与动脉血管局部炎症反应的增加不能排除多因素介导。为进一步研究 BMP4 是否是促进肥胖者心肌与动脉血管炎症产生的独立危险因素,本实验用腺病毒成功干扰了小鼠体内 BMP4 的表达,使肥胖小

鼠心肌与动脉血管中 BMP4 表达恢复至正常基线水平。实验证实,当干扰肥胖小鼠体内 BMP4 表达时,肥胖小鼠心肌与动脉血管 IL-1 β 与 IL-9 的蛋白与 mRNA 的表达水平显著下降,并与普通老鼠心肌与动脉血管炎症反应程度相同。说明当干扰肥胖小鼠体内 BMP4 的表达时,心肌与动脉血管炎症并不随着脂肪组织的增加而增多。以上证据证实,BMP4 是介导肥胖小鼠心脏与动脉血管炎症的独立危险因素。

BMP4 是肥胖者体内介导心脏与动脉血管炎症反应的独立危险因素,在肥胖导致心血管疾病方面起了关键性的作用,BMP4 有望成为预防与治疗肥胖患者心血管疾病的新的靶点。但肥胖与心血管病均是复杂的多因素疾病,脂肪组织是否是影响心血管组织中 BMP4 表达的独立危险因素还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] HASSANZADEH J, MOHAMMADBEIGI A, ESH-RATI B, et al. Estimation of the regional burden of non-communicable diseases due to obesity and overweight in Markazi province, Iran, 2006–2007 [J]. J Cardiovasc Dis Res, 2012, 3: 26–31.
- [2] OH S W. Obesity and metabolic syndrome in Korea [J]. Diabetes Metab J, 2011, 35: 561–566.
- [3] LI R, LU W, JIA J, et al. Relationships between indices of obesity and its cardiovascular comorbidities in a Chinese population [J]. Circ J, 2008, 72: 973–978.

AT1-Calcineurin 信号通路对肥大乳鼠心房肌细胞 内向整流钾离子通道重构的调控作用*

何炯红¹ 杨龙¹ 杨永曜¹ 李隽¹ 邓娜¹ 田银¹ 杨英¹

[摘要] **目的:**探讨血管紧张素Ⅱ受体1型(AT1)-钙调神经磷酸酶(CaN)信号通路对肥大乳鼠心房肌细胞内向整流钾电流(IK1)离子通道重构和动作电位时程(APD)改变的调控作用。**方法:**酶解法分离获得1 d龄SD乳鼠心房肌细胞,据干预方式不同分为4组:对照组;牵张肥大组:牵张刺激24 h;替米沙坦组:1 μmol/L替米沙坦干预1 h,牵张24 h;环孢素(CsA)组:0.25 μg/ml CsA干预1 h,牵张24 h。免疫印记法检测Kir2.1、CaN A亚基表达。全细胞膜片钳技术检测细胞膜IK1和单细胞APD的变化。**结果:**牵张刺激导致心房肌细胞肥大,促进CaN A亚基和Kir2.1蛋白表达,增大IK1电流密度,缩短动作电位复极50%(APD50)和复极90%(APD90);CsA和替米沙坦干预显著抑制牵张刺激的上述效应。**结论:**AT1-CaN信号通路参与调控肥大乳鼠心房肌细胞IK1离子通道重构和APD改变。

[关键词] 心房肌细胞;钾电流;动作电位;重构;全细胞膜片钳技术

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2016.10.018

[中图分类号] R541.7 **[文献标志码]** A

Regulation of AT1-Calcineurin signaling pathway on inward rectifier potassium ionic channel remodeling of hypertrophic atrial myocytes from neonatal rats

HE Jionghong YANG Long YANG Yongyao LI Jun
DENG Na TIAN Yin YANG Ying

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:81060018、81260040);贵州省科学技术基金(No:黔科合J字[2012]2239号)

¹贵州省人民医院(贵阳,550002)

通信作者:杨龙,E-mail: yanglong1001@163.com

- [4] SAMPER-TERNENT R, AL SNIH S. Obesity in older adults: Epidemiology and implications for disability and disease [J]. Rev Clin Gerontol, 2012, 22: 10-34.
- [5] BONDIA-PONS I, RYAN L, MARTINEZ J A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity [J]. J Physiol Biochem, 2012, 68:701-711.
- [6] HULSMANS M, VAN DOOREN E, HOLVOET P. Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2012, 14:264-276.
- [7] HAMMARSTEDT A, HEDJAZIFAR S, JENNDAHL L, et al. WISP2 regulates preadipocyte commitment and PPAR γ activation by BMP4 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110: 2563-2568.
- [8] JAIN A P, PUNDIR S, SHARMA A. Bone morphogenetic proteins: The anomalous molecules [J]. J Indian Soc Periodontol, 2013, 17: 583-586.
- [9] QIAN S W, TANG Y, LI X, et al. BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110: E798-807.
- [10] BOWERS R R, LANE M D. A role for bone morphogenetic protein-4 in adipocyte development [J]. Cell Cycle, 2007, 6: 385-389.
- [11] WONG W T, TIAN X Y, CHEN Y, et al. Bone morphogenetic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 upregulation implications on hypertension [J]. Circ Res, 2010, 107:984-991.
- [12] KOGA M, YAMAUCHI A, KANAOKA Y, et al. BMP4 is increased in the aortas of diabetic ApoE knockout mice and enhances uptake of oxidized low density lipoprotein into peritoneal macrophages [J]. J Inflamm, 2013, 10:32. doi: 10.1186/1476-9255-10-32.
- [13] MIKIROVA N A, CASCIARI J J, HUNNINGHAKE R E, et al. Effect of weight reduction on cardiovascular risk factors and CD34-positive cells in circulation [J]. Int J Med Sci, 2011, 8: 445-452.
- [14] BONDIA-PONS I, RYAN L, MARTINEZ J A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity [J]. J Physiol Biochem, 2012, 68: 701-711.
- [15] HULSMANS M, HOLVOET P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14: 70-78.

(收稿日期:2016-04-11 修回日期:2016-07-05)