

·基础研究·

# 有氧运动对载脂蛋白E基因缺陷小鼠主动脉C反应蛋白表达水平的影响\*

吴卫东<sup>1</sup> 张建军<sup>1</sup> 岳静静<sup>2</sup> 荆西民<sup>2</sup>

## 摘要

**目的:** 本实验以载脂蛋白基因缺陷(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠为研究对象,观察其在动脉粥样硬化(AS)发病过程中有氧运动对脂联素和C反应蛋白(CRP)的影响,以期探讨有氧运动通过脂联素-CRP发挥抗AS作用的机制。

**方法:** 8周龄雄性ApoE<sup>-/-</sup>小鼠20只,随机分为安静组(C)10只和运动组(E)10只。两组小鼠均饲以高脂饲料,C组不训练,E组小鼠进行14周跑台运动。14周末取材比较两组小鼠主动脉管壁及斑块的病理变化,检测比较其脂肪组织脂联素mRNA表达、血清脂联素水平及主动脉CRP表达、血清CRP水平。

**结果:** E组小鼠与C组小鼠相比,主动脉血管壁纤维弹力板和内膜较完整,AS斑块面积相对较小。E组小鼠脂肪组织脂联素mRNA表达及血清水平较C组显著增加,主动脉CRP的表达及血清水平较C组小鼠则有显著降低,且主动脉CRP的表达与脂联素mRNA表达及血清水平呈显著负相关。

**结论:** 有氧运动可以通过提高血清脂联素、脂联素mRNA表达水平的途径,有效降低血清CRP和主动脉CRP的表达,从而发挥延缓AS发展的作用,这可能是运动通过脂联素-CRP发挥抗AS作用的另一机制。

**关键词** 运动;载脂蛋白基因缺陷小鼠;C反应蛋白;动脉粥样硬化

中图分类号:R541.4, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-08-0714-04

**Effects of aerobic exercise on expression of C-reactive protein in apolipoprotein E-deficient mice aortic/**  
**WU Weidong,ZHANG Jianjun,YUE Jingjing,et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29**  
**(8): 714—717**

## Abstract

**Objective:** To approach the effects and mechanism of aerobic exercise on atherosclerosis(AS) and the effect of adiponectin-C-reactive protein (CRP) in apolipoprotein E(ApoE)-deficient mice AS model.

**Method:** Eight-week-old ApoE-deficient mice were randomly assigned to two groups: ApoE-deficient mice control group (C); aerobic exercise-trained group (E). The mice were fed by high fat diet. Mice in aerobic exercise-trained groups ran on a treadmill for a total of 14 weeks. At the end of experiment, AS was observed. Adiponectin mRNA in adipose tissue and serum adiponectin were tested. CRP in aortic and serum CRP were detected.

**Result:** The AS of E group was significantly better than that of C group; Adiponectin-mRNA in adipose tissue and serum adiponectin of E group were significantly higher than that of C group. The CRP and serum CRP were significantly down-regulated in E group. The CRP and adiponectin-mRNA were significant negative correlated.

**Conclusion:** It suggested that 14 weeks aerobic exercise could significantly increase adiponectin-mRNA in adi-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.08.004

\*基金项目:河南省重点科技攻关项目(132102310401);郑州大学体育学院体育教育省级特色专业资助

1 郑州大学体育学院,郑州,450044; 2 河南机电职业学院

作者简介:吴卫东,男,讲师; 收稿日期:2013-09-04

pose tissue and significantly decreased CRP in aortae. Aerobic exercise was likely to one of the factor by the adiponectin-CRP to anti-atherogenesis.

**Author's address** Physical Education College of Zhengzhou University, 450044

**Key word** exercise; apolipoprotein E-deficient mice; C-reactive protein; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的实质是动脉壁的长期慢性炎症,作为炎症标志物的C反应蛋白是AS的一种敏感、可靠指标,其浓度的升高会损伤内皮细胞和平滑肌细胞,导致心血管疾病的发生和发展<sup>[1-2]</sup>。C反应蛋白(C reactive protein, CRP)主要由肝脏分泌产生,在AS斑块区发现CRP后,有学者认为这并非是血管壁组织局部合成的,而是由血液循环中CRP的沉积而来,但Calabró研究发现主动脉内皮细胞可独立分泌产生CRP<sup>[3]</sup>。

脂联素是脂肪细胞产生的特异性细胞因子,作者以前的研究发现有氧运动能显著提高载脂蛋白E基因缺陷(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠脂肪组织及血清中的脂联素水平,从而有效延缓AS的发生发展<sup>[4-5]</sup>,但有氧运动是否通过脂联素-CRP信号通路发挥抗AS的作用尚不明确。本实验以ApoE<sup>-/-</sup>小鼠为研究对象,观察其在AS发病过程中有氧运动对脂联素和CRP的影响,以期探讨有氧运动通过脂联素-CRP发挥抗AS作用的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

8周龄雄性ApoE<sup>-/-</sup>小鼠20只,购于北京大学医学部实验动物部,适应性饲养后随机分为两组:安静组(C组)10只,运动组(E组)10只。两组均以二级条件饲养,饲以高脂膳食饲料(含21%脂肪,0.15%胆固醇,购于北京大学医学部实验动物部)。

### 1.2 运动方案

E组小鼠每日上午9—10时进行跑台运动,递增运动强度和运动时间,每周5次,共14周。小鼠运动强度、递增运动强度、运动时间参考Fernando等<sup>[6]</sup>的研究确定。前6周由10m/min×30min逐渐递增至13m/min×60min,后8周开始稳定在13m/min×60min,跑台坡度为0°。

### 1.3 取材与指标检测

第14周末,所有小鼠处死取血,4℃ 3000r/min离心10min,制备血清,用DEPC水进行心脏血管在

体灌注,然后取出全心脏和主动脉,取肾周和附睾脂肪垫放入DEPC水中冲洗表层血液,并用滤纸吸干。

主动脉病理形态观察:全心脏标本经4%多聚甲醛固定4h后,OCT包埋,进行冰冻切片,切片厚度10μm,常规HE和油红O染色,显微镜下观察主动脉管壁及斑块的结构变化。

血清脂联素与CRP含量测定:采用双抗夹心酶联免疫(ABC-ELISA)方法。

脂肪组织脂联素 mRNA 测定:RT-PCR法检测。采用Trizol一步法提取总RNA,采用两步法反转录试剂盒进行反转录,进行30个循环次数的PCR。

引物序列检索自NCBI-Nucleotide数据库,

脂联素引物扩增产物长度196bp,

上游引物:5'-AATCATTATGACGGCAGCAC-3',

下游引物:5'-CCAGATGGAGGAGCACAGAG-3';

Beta-Actin扩增产物长度511bp,

上游引物5'-CCATCTACGAGGGCTATGCT-3',

下游引物5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAA-3'。

主动脉CRP测定:采用Western免疫印迹检测。将主动脉匀浆后离心(16000r/min,30min)取上清,标定蛋白浓度上样后,经12%的SDS-PAGE电泳分离。将目的蛋白转移至PVDF膜上,用5%的脱脂奶粉封闭,TBST冲洗后加兔抗鼠C反应蛋白一抗4℃过夜。TBST液冲洗,加碱性磷酸酶标记的二抗孵育,NBT/BCIP显色。以Beta-Actin作为内参照,进行半定量分析,比值表示其相对含量。

### 1.4 统计学分析

采用SPSS11.5数据软件包进行统计学分析,定量数据以平均数±标准差表示,两组间比较采用独立样本t检验,不同指标间采用Pearson相关分析。

## 2 结果

### 2.1 主动脉血管壁染色观察结果

镜下观察发现,C组小鼠主动脉血管壁纤维板分裂成多层状并增厚,内膜下间隙增大,失去原有的

波浪状,泡沫细胞和胆固醇结晶较多,内皮可见炎性细胞浸润、聚集,AS斑块面积大且有脱落现象,血管腔出现狭窄。E组小鼠主动脉血管壁弹力纤维排列致密,偶有断层,内膜较完整,AS斑块面积相对较小且处在病变的早期。见图1—2。

**2.2 脂肪组织脂联素 mRNA 表达及其血清水平**

14周实验后E组小鼠脂肪组织脂联素 mRNA 表达显著高于C组( $P < 0.05$ ),其血清脂联素水平同样显著高于C组( $P < 0.01$ )。见表1。

**2.3 主动脉CRP表达水平及其血清水平**

E组小鼠经过14周有氧运动后主动脉CRP表达显著低于C组( $P < 0.05$ ),其血清CRP水平同样显著低于C组( $P < 0.01$ )。见表2,图3。

**2.4 主动脉CRP的表达与脂联素 mRNA 表达及血清脂联素水平的相关性分析**

相关分析发现,两组小鼠主动脉CRP的表达水平与血清脂联素水平高度负相关( $r = -0.83$ ),与脂肪组织脂联素 mRNA 表达水平中度负相关( $r = -0.68$ )。

图1 两组小鼠主动脉横截面HE染色观察

(LM, ×200)

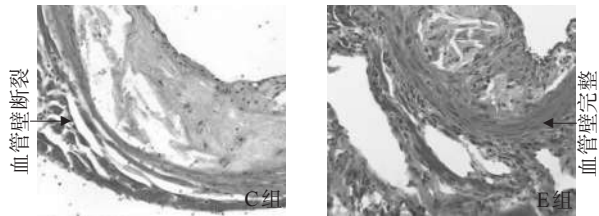


图2 两组小鼠主动脉横截面ORO染色观察

(LM, ×100)

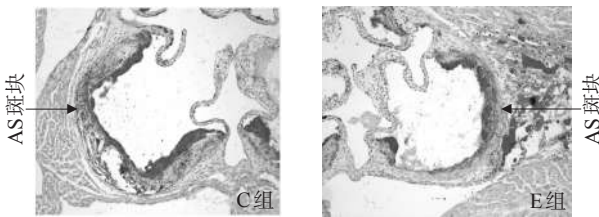


表1 两组小鼠脂肪组织脂联素 mRNA 表达及血清脂联素含量比较

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	脂联素 mRNA	血清脂联素(mg/L)
C组	10	1.89±0.53	0.42±0.12
E组	10	3.26±1.54 <sup>①</sup>	0.60±0.10 <sup>②</sup>

与C组比较:① $P < 0.05$ ;② $P < 0.01$

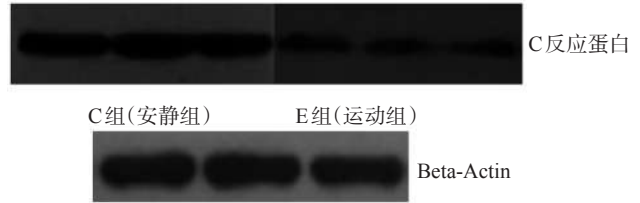
表2 两组小鼠主动脉CRP表达及血清CRP比较

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	CRP	血清CRP(mg/L)
C组	10	0.57±0.07	0.68±0.08
E组	10	0.31±0.02 <sup>①</sup>	0.35±0.05 <sup>②</sup>

与C组比较:① $P < 0.05$ ;② $P < 0.01$

图3 Western Blot检测C反应蛋白的表达



**3 讨论**

AS是一种炎症疾病,是动脉壁内皮细胞和平滑肌受到损伤后的一种炎性纤维组织增生反应。血管壁的炎症反应最初是对血管损伤的保护,通过炎症细胞增生保持机体内环境稳定,但炎症若不能及时消除则会对组织、血管造成破坏,引发血栓、斑块破裂等并发症<sup>[7]</sup>。CRP作为非特异性炎症反应中敏感的炎症因子,参与了AS的发生发展的整个过程,而不仅仅是一个旁观者<sup>[8]</sup>。

经过学者的多年研究,发现CRP可能通过以下途径参与了AS的形成:①直接损伤血管内皮细胞,促使平滑肌细胞迁移和增殖。CRP可促进内皮微粒的产生,促使内皮功能紊乱,对内皮细胞形成直接的致炎症效应,还可通过增加CD4细胞杀伤血管内皮细胞<sup>[9-10]</sup>。同时CRP可以通过增加细胞活性氧促进平滑肌细胞迁移和增殖,胶原蛋白合成,新生内膜形成、增厚<sup>[11]</sup>。②激活补体系统促进AS形成。有研究发现CRP处于表面结合状态时,固化或结合低密度脂蛋白时可激活补体<sup>[12]</sup>。激活的补体成分直接激活静止的血管内皮细胞,从而在内皮细胞内介导白细胞的趋化、黏附和渗出中发挥作用。③减少一氧化氮合成。有学者用重组人CRP诱导培养的内皮细胞,发现其能抑制内皮细胞型一氧化氮合酶的表达,使一氧化氮减少,从而减弱内皮祖细胞寿命、分化和功能<sup>[13]</sup>。

本实验研究结果显示14周有氧运动可以有效保护ApoE-/-小鼠血管壁和内膜结构的完整性,延缓AS斑块的生长。同时有氧运动显著提高了ApoE-/-

小鼠脂肪组织和血清脂联素的水平,显著降低了主动脉和血清CRP水平,且主动脉CRP的表达水平与血清脂联素水平、脂肪组织脂联素 mRNA 表达水平呈负相关,这提示有氧运动可能通过脂联素-CRP信号通路发挥了抗炎症作用,从而延缓了AS的发生发展。分析其机制可能有以下两种:①生理条件下,CRP在体内低速率合成,以较高的亲和力与内质网相连,在急性期,在白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 等细胞因子诱导下,CRP基因表达急速上调,内质网结合处CRP的构象发生变化,与内质网的亲和力下降,于是迅速释放,从而CRP急剧上升<sup>[14]</sup>。本研究显示有氧运动显著降低了CRP的水平,这可能与有氧运动提高了血清脂联素水平有关,血清脂联素增多可以及时清除自由基,使氧化低密度脂蛋白生成减少,从而减少单核-巨噬细胞和血管内皮的活化,IL-6、TNF- $\alpha$ 生成减少,从而使AS斑块中的巨噬细胞、血管内皮细胞的CRP表达水平下降<sup>[15-16]</sup>。②有氧运动显著提高了血清脂联素水平,且有氧运动可以增强脂联素与其受体1的结合<sup>[17]</sup>,从而活化腺苷酸活化蛋白激酶发挥生物学作用,AMPK的激活有助于增加葡萄糖输入、脂肪酸氧化,减轻胰岛素抵抗,提高机体胰岛素的抗炎症效应,最终导致炎症标志物CRP水平的降低<sup>[18-19]</sup>。

本研究证实有氧运动可以通过提高ApoE-/-小鼠血清脂联素、脂联素 mRNA 表达水平的途径,有效降低血清CRP和主动脉CRP的表达,从而发挥延缓ApoE-/-小鼠AS发展的作用,这可能是运动通过脂联素-CRP发挥抗AS作用的另一机制。

## 参考文献

- [1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2005, 352(16):1685—1695.
- [2] Yu Q, Li Y, Wang Y, et al. C-reactive protein levels are associated with the progression of atherosclerotic lesions in rabbits[J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(4):529—535.
- [3] Calabró P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells[J]. *Circulation*, 2003, 108(16):1930—1932.
- [4] 吴卫东,娄春善,何玉秀,等.有氧运动对ApoE基因缺陷小鼠脂肪组织脂联素 mRNA 表达的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2010, 29(5):567—569.
- [5] Amira OC, Naicker S, Manga P, et al. Adiponectin and atherosclerosis risk factors in African hemodialysis patients: a population at low risk for atherosclerotic cardiovascular disease[J]. *Hemodial Int*, 2012, 16(1):59—68.
- [6] Fernando P, Bonen A, Hoffman-Goetz L. Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1993, 71(10—11):854—857.
- [7] Burut DF, Karim Y, Ferns GA. The role of immune complexes in atherogenesis[J]. *Angiology*, 2010, 61(7):679—689.
- [8] Yakob M, Meurman JH, Jogstrand T, et al. C-reactive protein in relation to early atherosclerosis and periodontitis[J]. *Clin Oral Investig*, 2012, 16(1):259—265.
- [9] Kettunen T, Eklund C, Kähönen M, et al. Polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene affects CRP levels in plasma and one early marker of atherosclerosis in men: The Health 2000 Survey[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2011, 71(5):353—361.
- [10] Momiyama Y, Ohmori R, Fayad ZA, et al. Associations between plasma C-reactive protein levels and the severities of coronary and aortic atherosclerosis[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17(5):460—467.
- [11] Wang CH, Li SH, Weisel RD, et al. C-reactive protein up-regulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle[J]. *Circulation*, 2003, 107(13):1783—1790.
- [12] Ji SR, Wu Y, Potempa LA, et al. Effect of modified C-reactive protein on complement activation: a possible complement regulatory role of modified or monomeric C-reactive protein in atherosclerotic lesions[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(4):935—941.
- [13] Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis[J]. *Circulation*, 2002, 106(8):913—919.
- [14] Teupser D, Weber O, Rao TN, et al. No reduction of atherosclerosis in C-reactive protein (CRP) - deficient mice[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(8):6272—6279.
- [15] Zhao XQ, Zhang MW, Wang F, et al. CRP enhances soluble LOX-1 release from macrophages by activating TNF- $\alpha$  converting enzyme[J]. *Journal of Lipid Research*, 2011, 52(5):923—933.
- [16] 孙慧,吴永全,严松彪.脂联素与血管内皮细胞功能障碍的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(11):952—956.
- [17] 吴卫东,荆西民,岳静静.有氧运动对ApoE基因缺陷小鼠主动脉脂联素受体1蛋白表达的影响[J]. *中国体育科技*, 2012, 48(3):116—118.
- [18] 周亮,吴佳,刘刚,等.运动对动脉粥样硬化大鼠血管内皮细胞AMPK激活的研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 2013, 29(3):271—274.
- [19] Fullerton MD, Steinberg GR, Schertzer JD. Immunometabolism of AMPK in insulin resistance and atherosclerosis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 366(2):224—234.