

抵抗素样分子 α 对小鼠主动脉内皮细胞形成 新生血管能力的影响及机制探讨*

段淑香 孟海燕 孙萍 张宁 牛洪梅 赵中松 李浩元 马永晖

山东省立第三医院心肺康复科, 济南 250031

[摘要] **目的** 探讨抵抗素样分子 α (又称 FIZZ1) 对小鼠主动脉内皮细胞形成新生血管能力的影响及机制。**方法** 分别使用 10 nmol/L、20 nmol/L 和 40 nmol/L 的 FIZZ1 刺激小鼠主动脉内皮细胞, 使用内皮细胞成管实验和内皮细胞迁移实验体外验证 FIZZ1 在内皮细胞迁移及血管形成中的作用; 采用高通量测序检测 FIZZ1 对小鼠主动脉内皮细胞信号通路的影响, 筛选出表达有显著差异的信号通路。**结果** 在不同浓度的 FIZZ1 刺激下, 小鼠主动脉内皮细胞血管形成的面积逐步增加, 40 nmol/L 的 FIZZ1 促进血管生成的作用最强。随着 FIZZ1 浓度的增加, 内皮细胞迁移数量增多, 迁移能力逐步增强。高通量基因测序检测中发现共有 1 253 个基因出现了差异性表达, 包括 427 个上调基因和 826 个下调基因, 其机制可能与 COL1A1、FLT4、ITGA3 等基因表达显著性差异有关。**结论** FIZZ1 能在体外使小鼠主动脉内皮细胞形成新生血管, 其机制可能与 COL1A1、FLT4、ITGA3 等基因表达显著性差异有关。

[关键词] 抵抗素样分子 α ; 血管新生; 内皮细胞; 主动脉; 小鼠

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2024.01.008

Effects and Mechanism of Resistin-like Molecules α on Endothelial Cell Angiogenesis in Mouse Aorta

Duan Shuxiang, Meng Haiyan, Sun Ping, Zhang Ning, Niu Hongmei, Zhao Zhongsong,
Li Haoyuan, Ma Yonghui

Department of Cardiopulmonary rehabilitation, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan 250031

[Abstract] **Objective** To explore the effects and mechanism of resistin-like molecules α (also known as FIZZ1) on the ability of mouse aortic endothelial cells to form new blood vessels. **Methods** Mouse was stimulated by FIZZ1 at 10 nmol/L, 20 nmol/L and 40 nmol/L. The role of FIZZ1 in endothelial cell migration and blood vessel formation was verified by using endothelial cell tube formation experiments and endothelial cell migration experiments in vitro; The effect of FIZZ1 on signaling in mouse aortic endothelial cells was detected by high-throughput sequencing, and pathways with significant differential expression signaling were selected. **Results** Under different concentrations of FIZZ1, the area of blood vessel formation in mouse aortic endothelial cells gradually increased, and 40 nmol/L FIZZ1/RELM α had the strongest effect in promoting angiogenesis. With the increasing concentration of FIZZ1, the number of endothelial cells migrated increased, and the migration capacity gradually increased. A total of 1 253 genes were found to be differentially expressed, including 427 up-regulated genes and 826 down-regulated genes. The mechanism may be related to the significant expression difference of COL1A1, FLT4 and ITGA3. **Conclusion** FIZZ1 can induce neovascularization of mouse aortic endothelial cells in vitro, and its mechanism may be related to significant differences in gene expression such as COL1A1, FLT4, and ITGA3.

[Key words] Resistin-like molecules α ; Angiogenesis; Endothelial cells; Aorta; Mice

抵抗素样分子 (Resistin-like molecule, RELM) α 又名 FIZZ1 (Found in inflammatory zone 1), 作为新近发现的缺氧诱导的有丝分裂因子, 在血管生成、血管重塑中发挥着重要作用^[1]。RELM

家族是一组由 105~117 个氨基酸残基组成的蛋白质家族, 由啮齿动物中的四个成员 (RELM α 、RELM β 、Resistin 和 RELM γ) 和人类中的两个成员 (RELM α 和 Resistin) 组成^[2-3]。在 FIZZ1 的编码基

* 山东省医药卫生科技发展计划项目 (202103010999)

因的启动子序列中, 具有 NF- κ B、C/EBPA、STAT6、PI3K-Akt 等多个促炎转录因子的结合位点, 说明 FIZZ1 在各类炎症疾病中扮演了关键的角色^[4-5]。当前有关 FIZZ1 在疾病中作用的报道主要集中在肺动脉疾病和肺纤维化疾病^[6]。动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 与肺部血管相关疾病在发病机制上有一定的相似性, FIZZ1 是否在 AS 的发生发展中发挥作用目前仍然未知, 因此需要探究 FIZZ1 在 AS 中的具体作用及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 体外实验及分组

小鼠主动脉血管内皮细胞购自 ATCC 细胞库, 所用细胞经过 STR 鉴定无误。FIZZ1 重组蛋白购自 GLP-BIO (货号 GP20897)。将血管内皮细胞分为对照组 (Control 组)、FIZZ1-1 组 (FIZZ1 浓度为 10 nmol/L)、FIZZ1-2 组 (FIZZ1 浓度为 20 nmol/L)、FIZZ1-3 组 (FIZZ1 浓度为 40 nmol/L)。

1.2 方法

1.2.1 CCK8 实验 对数生长期的小鼠主动脉内皮细胞, 胰酶消化后, 配制成细胞悬液, 接种到 96 孔板上。将 96 孔板在 37℃、5% CO₂ 条件下的培养箱中培养 24 h。Control 组用不含溶剂 (FIZZ1) 的培养基, 其他各实验组用不同浓度的 FIZZ1 刺激。将培养板在培养箱中孵育 24 h 和 48 h, 加入 CCK-8 溶液后, 在培养箱内孵育 1~4 h, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

1.2.2 血管生成实验 ①培养内皮细胞: 将小鼠主动脉内皮细胞接种在培养皿或细胞培养板上, 按照 37℃、5% CO₂ 条件培养细胞至适当的密度和状态。②基质胶铺板: 将融化的基质胶、预冷的枪头、24 孔板移入超净台, 将 24 孔板放置在冰上。用预冷的枪头吸取 250 μ L 至 24 孔板。基质胶加入完毕后, 放入 37℃ 培养箱, 放置 45~60 min。③细胞处理: 小鼠主动脉内皮细胞, 弃掉培养瓶中的培养基, 用磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution, PBS) 清洗两遍, 加入胰酶消化, 细胞消化后, 加入培养基终止消化。将细胞用培养基吹打下来, 移入 15 mL 离心管, 离心速度 3 000 r/min, 离心半径为 10 cm, 离心 5 min。离心后的细胞分别用加含不同浓度的 FIZZ1 培养基进行悬浮。将悬浮的细胞加入 250 μ L 至铺好基质胶的 24 孔板中, 细胞密度为 2.5×10^5 个/mL, 并设置空白对照。加入细胞后放入培养箱中培养, 一段时间后观察到细胞有明显血管形成的趋势。④显微镜下观察, 拍照, 用 ImageJ 软件统计数量。

1.2.3 内皮细胞迁移实验 ①制备单细胞悬液, 调整细胞密度为 2.5×10^5 个/mL。②组装 Transwell 迁移小室, 下层加入含 10% 胎牛血清的培养基,

上层加入含细胞及无血清的培养基。孵箱内孵育 24 h, 4% 多聚甲醛溶液固定。③荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.4 EdU 细胞增殖实验 在 24 孔板中培养适当数量的小鼠主动脉内皮细胞, 各组分别使用不同浓度的 FIZZ1 进行刺激处理。配制 2 倍的 EdU 工作液, 将预热好的 EdU 工作液稀释为终浓度为 1 倍的工作液, 继续孵育 2 h。固定、通透, 将配制好的 Click 反应液向每孔加入 0.5 mL, 室温避光孵育 30 min。洗涤液洗涤 3 次。加 DAPI 染液避光孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次。加入抗荧光猝灭剂, 荧光显微镜下采集图像。

1.2.5 高通量基因测序 检测样品纯度、完整性和浓度, 检测合格后进行纯化。向 mRNA 中加入 Fragmentation Buffer, 使其成为短片段。以短片段 RNA 为模板, 随机引物进行逆转录, 完成 cDNA 第一链, 加入 2nd Strand Marking Buffer、2nd Strand/End Repair Enzyme Mix 合成 cDNA 的第二链。通过末端修复、加入碱基 A、测序接头、磁珠筛选回收目的片段, 进行 PCR 扩增, 完成文库的制备。在高通量测序平台对合格的文库进行测序, 进行样品信息汇总及差异比较汇总。

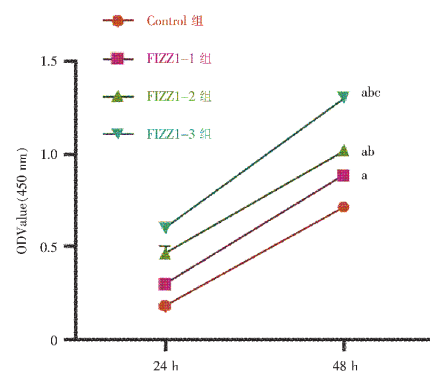
1.3 统计学方法

采用 SPSS29 统计学软件进行数据分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK8 实验结果

随着 FIZZ1 浓度的升高, OD 吸光度随之升高 ($P < 0.05$), 见图 1。



注: 与 Control 组比较^a $P < 0.05$; 与 FIZZ1-1 组比较^b $P < 0.05$; 与 FIZZ1-2 组比较^c $P < 0.05$

图 1 CCK8 实验结果

Fig. 1 CCK8 experiment results

2.2 血管生成实验结果

加入 FIZZ1 重组蛋白后, 促进了小鼠主动脉内

皮细胞的血管生成, 且随着加药浓度的增加, 血管生成逐渐密集, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2、图 3。

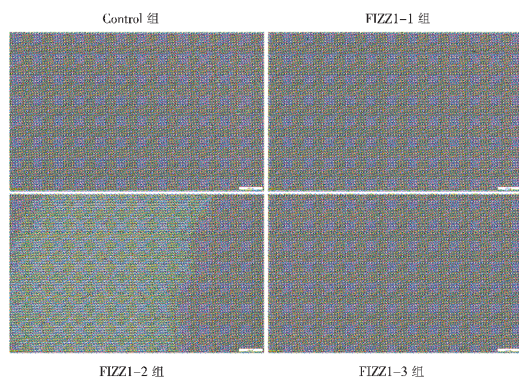
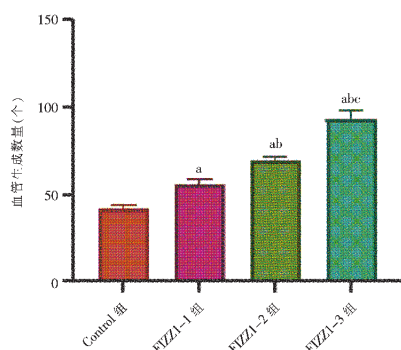


图 2 血管生成图

Fig. 2 Angiogenesis diagram



注: 与 Control 组比较^a $P < 0.05$; 与 FIZZI-1 组比较^b $P < 0.05$;
与 FIZZI-2 组比较^c $P < 0.05$

图 3 血管生成结果

Fig. 3 Angiogenesis results

2.3 内皮细胞迁移实验结果

加入 FIZZI 重组蛋白后, 促进了小鼠主动脉内皮细胞的迁移, 且随着加药浓度的增加, 迁移能力逐渐增强, 各组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4、图 5。

2.4 内皮细胞增殖试验结果

实验结果显示, 加入 FIZZI 重组蛋白后, 促进小鼠主动脉内皮细胞的增殖, 且随着加药浓度的增加, 增殖更加明显, 各组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 6、图 7。

2.5 高通量测序结果

高通量基因测序检测中发现, 共 1 253 个基因出现了差异性表达, 包括 427 个上调的基因和 826 个下调基因, 其机制可能与 COL1A1、FLT4、ITGA3 等基因表达显著性差异有关。GO 条目 q 值富集

分析见图 8, 上调及下调变化倍数最大的前 10 个基因及功能见表 1、表 2。

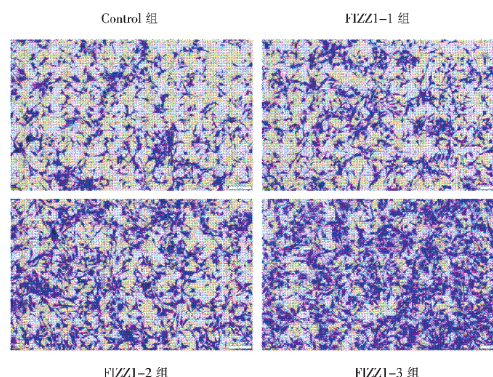
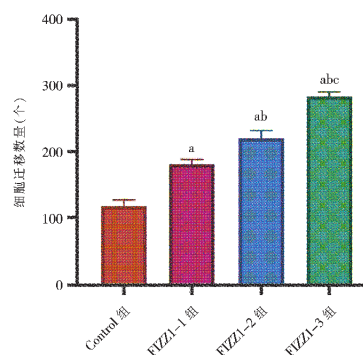


图 4 小鼠主动脉内皮细胞的荧光显微镜表现 ($\times 100$)

Fig. 4 Fluorescence microscopy appearance of mouse aortic endothelial cells ($\times 100$)



注: 与 Control 组比较^a $P < 0.05$; 与 FIZZI-1 组比较^b $P < 0.05$;
与 FIZZI-2 组比较^c $P < 0.05$

图 5 细胞迁移结果

Fig. 5 Cell migration results

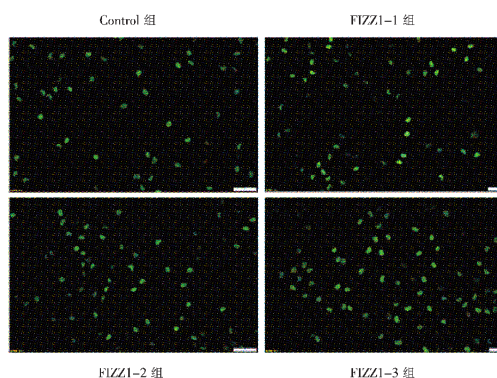
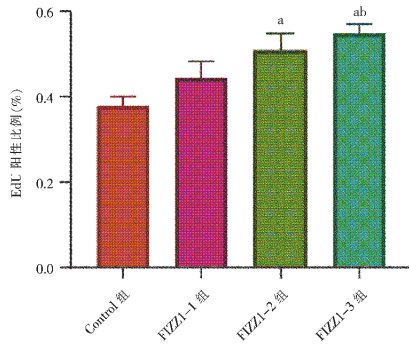


图 6 细胞增殖荧光显微镜下表现 ($\times 200$)

Fig. 6 Fluorescence microscopy of cell proliferation ($\times 200$)



注: 与 Control 组比较^a $P < 0.05$; 与 FIZZ1 - 1 组比较^b $P < 0.05$

图 7 细胞增殖结果

Fig. 7 Cell proliferation results

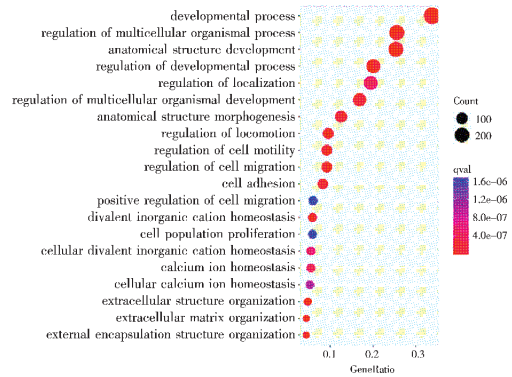


图 8 GO 条目 q 值富集分析图

Fig. 8 Analysis of q - value enrichment in GO entries

表 1 FIZZ1 刺激小鼠主动脉内皮细胞后表达上调倍数最大的前 10 个基因

Tab. 1 Top 10 genes with the highest upregulation fold after FIZZ1 stimulation of mouse aortic endothelial cells

基因文库登记号	改变倍数	基因代码	描述
ENSMUSG00000118384	4. 81996542	9030625G05Rik	mCG1033558
ENSMUSG00000037946	4. 613514542	Fgd3	FYVE, RhoGEF and PHdomain - containing protein 3
ENSMUSG00000015053	4. 613514542	Gata2	endothelial transcription factor GATA - 2
ENSMUSG00000086844	4. 556931014	B230206H07Rik	EPS8 - like 2, isoform CRA_c
ENSMUSG00000052613	4. 372506443	Pcdh15	protocadherin - 15 isoform CD3 - 2 precursor
ENSMUSG00000020407	4. 235002919	Upp1	uridine phosphorylase 1
ENSMUSG00000028965	4. 235002919	Tnfrsf9	tumor necrosis factor receptor superfamily member 9 isoform 1 precursor
ENSMUSG00000012819	4. 082999826	Cdh23	PREDICTED: cadherin - 23 isoform X1
ENSMUSG00000003279	4. 082999826	Dlgap1	mKIAA4162 protein
ENSMUSG00000035551	4. 082999826	Igf1pl1	insulin - like growth factor - binding protein - like 1 precursor

表 2 FIZZ1 刺激小鼠主动脉内皮细胞后表达下调倍数最大的前 10 个的基因

Tab. 2 Top 10 genes with the highest downregulation fold after FIZZ1 stimulation of mouse aortic endothelial cells

基因文库登记号	改变倍数	基因代码	描述
ENSMUSG00000037625	-6. 315743866	Cldn11	claudin 11, partial
ENSMUSG00000001773	-5. 513189931	Folh1	glutamate carboxypeptidase 2 isoform 1
ENSMUSG00000089961	-5. 334852689	Gm16567	mCG10138, partial
ENSMUSG00000025431	-4. 993815772	Crisp1	PREDICTED: cysteine - rich secretory protein 1 isoform X1
ENSMUSG00000079293	-4. 894280098	Clec7a	RecName: Full = C - type lectin domain family 7 member A
ENSMUSG00000026564	-4. 787364894	Dusp27	inactive dual specificity phosphatase 27
ENSMUSG00000042894	-4. 730781366	Olf1260	olfactory receptor 1260
ENSMUSG00000006221	-4. 671887677	Hspb7	heat shock protein beta - 7
ENSMUSG00000096950	-4. 671887677	Gm9530	mCG1047615
ENSMUSG00000037206	-4. 631245692	Islr	immunoglobulin superfamily containing leucine - rich repeat, isoform CRA_a, partial

3 讨论

AS 导致的心脑血管疾病引起的死亡人数占全球死亡人数的近 40%，然而目前对于减缓和逆转 AS 进展依然没有很好的治疗方法^[7]。RELM 家族成员广泛参与肺部疾病、心血管疾病和肿瘤中的炎

症反应、细胞增殖、能量和物质代谢等生理病理过程^[8]。有研究报道，通过沉默 RELM α 的表达可以抑制小鼠 AS，而其中的机制目前仍不清楚^[9]。RELM α 通常在发生炎症反应组织中的巨噬细胞、脂肪细胞中高表达^[10-11]。分泌的 RELM α 可以通过

其促有丝分裂、血管平滑肌收缩、趋化炎症因子等特性进一步加重组织局部的损伤^[12]。RELM α 作为缺氧诱导的有丝分裂因子, 在慢性缺氧的条件下也参与肺部血管重塑^[13]。在 AS 的发生发展过程中, 巨噬细胞在斑块形成和内皮细胞、平滑肌细胞炎症中扮演着非常重要的促进作用, 动脉粥样斑块纤维帽的形成、血管内皮细胞出现内皮-间质转化等都是 AS 的重要特征^[14]。因此本研究前期通过提出 FIZZ1 可能是 AS 中血管平滑肌细胞、动脉内皮细胞损伤的关键靶标, 通过使用 FIZZ1 重组蛋白对内皮细胞进行刺激, 明确了 FIZZ1 可以在体外促进小鼠内皮细胞的增殖, 加入 FIZZ1 重组蛋白后, 促进小鼠主动脉内皮细胞的血管生成, 且随着加药浓度的增加, 血管生成逐渐密集。并且加入 FIZZ1 重组蛋白后, 观察到促进了小鼠主动脉内皮细胞的迁移, 且随着加药浓度的增加, 迁移能力逐渐增强。

为探索 FIZZ1 导致血管新生的机制, 本实验运用高通量测序找到了 FIZZ1 刺激组与对照组比较表达有明显差异的信号通路及基因表达, 结果表明 FIZZ1 刺激的小鼠主动脉内皮细胞基因表达与对照组相比有明显差异。结果提示, 有 427 个上调的基因和 826 个下调基因, COL1A1 基因产生 I 型胶原蛋白的一个组成部分, 称为原 $\alpha 1$ (I) 链, 这条链与另一条原 $\alpha 1$ (I) 链以及原 $\alpha 2$ (I) 链 (由 COL1A2 基因产生) 结合, 形成 I 型原生胶原蛋白分子, 这些三股绳状的原生胶原蛋白分子必须由细胞外的酶进行加工, 一旦这些分子被加工, 它们就会排列成长而细的纤维状, 在细胞周围的空间中相互交联。交联的结果是形成非常强大的成熟 I 型胶原蛋白纤维。ITGA3 基因编码的是一种叫作 $\alpha 3\beta 1$ 整合素的蛋白质, 在细胞外基质与细胞之间起着重要的作用, 参与细胞黏附、细胞迁移、细胞增殖等生物学过程。FLT4 是 Fms 相关的酪氨酸激酶 4, 由 FLT4 基因编码的蛋白质, 该基因编码血管内皮生长因子 C 和 D 的酪氨酸激酶受体。COL1A1、FLT4、ITGA3 信号通路可能参与了血管新生、增殖和迁移过程。

目前对 FIZZ1 的研究依然存在着不足。FIZZ1 作为首先在啮齿类动物中发现的 RELM 家族的新成员, 在人类中的同源基因目前仍然未被鉴别出来^[4]。本研究明确了 FIZZ1 在小鼠细胞中的作用, 而在人类当中是否具有类似作用还需要进一步研究。

参考文献

[1] Lv M, Liu W. Hypoxia-induced mitogenic factor: a

- multifunctional protein involved in health and disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 691774.
- [2] Banerjee RR, Lazar MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (28): 25970-25973.
- [3] Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, et al. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones [J]. *Science*, 2004, 304 (5674): 1154-1158.
- [4] Shi Y, Zhu N, Qiu Y, et al. Resistin-like molecules: a marker, mediator and therapeutic target for multiple diseases [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21 (1): 18.
- [5] Che L, Yu C, Chen G, et al. The inflammatory response induced by RELM β upregulates IL-8 and IL-1 β expression in bronchial epithelial cells in COPD [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16: 2503-2513.
- [6] Vallese D, Ricciardolo FL, Gnemmi I, et al. Phospho-p38 MAPK expression in COPD patients and asthmatics and in challenged bronchial epithelium [J]. *Respiration*, 2015, 89 (4): 329-342.
- [7] Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12 (3): 204-212.
- [8] Lin Q, Johns RA. Resistin family proteins in pulmonary diseases [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 319 (3): L422-L434.
- [9] Tang F, Yang F, Li T, et al. Silence of FIZZ1 by short hairpin RNA inhibits atherosclerosis [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2022, 52 (2): 170-178.
- [10] Sanin DE, Ge Y, Marinkovic E, et al. A common framework of monocyte-derived macrophage activation [J]. *Sci Immunol*, 2022, 7 (70): eabl7482.
- [11] Miner JL. The adipocyte as an endocrine cell [J]. *J Anim Sci*, 2004, 82 (3): 935-941.
- [12] Li X, Duan S, Zhang H, et al. RELM α can cause contraction of rat aortic smooth muscle cells [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8 (5): 7009-7014.
- [13] Li Y, Zhang Q, Li L, et al. LKB1 deficiency upregulates RELM- α to drive airway goblet cell metaplasia [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 79 (1): 42.
- [14] Wolf D, Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2019, 124 (2): 315-327.

(2023-10-29 收稿)