

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.03.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211230.1331.013.html\(2021-12-30\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211230.1331.013.html(2021-12-30))

## 二甲双胍通过调节血管外周脂肪细胞的累积抑制腹主动脉瘤的形成\*

田 丽<sup>1</sup>,张瑾瑾<sup>2</sup>,杨 柳<sup>1</sup>,刘 肖<sup>1</sup>,叶春芳<sup>1</sup>,孟宪杰<sup>1</sup>,李 会<sup>1</sup>,张丽华<sup>1</sup>,赵永波<sup>3</sup>,马 冬<sup>2△</sup>

(1. 河北省唐山市人民医院内分泌科 063001;2. 华北理工大学公共卫生学院, 河北唐山 063210;3. 河北医科大学附属第四医院心外科,石家庄 050000)

**[摘要]** **目的** 探讨二甲双胍抑制腹主动脉瘤(AAA)形成的作用机制。**方法** 对 10 只 8~10 周龄 ApoE<sup>-/-</sup> 雄性小鼠高脂饮食并皮下植入含有血管紧张素Ⅱ的微量泵构建动脉瘤模型,均分为 AAA 组和二甲双胍干预组,4 周后取材评估腹主动脉扩张情况,油红 O 染色观察血管外周脂肪细胞累积情况;免疫荧光染色和 Western blot 分析血管外周脂肪细胞的脂滴形成和缺氧诱导脂滴相关蛋白(HILPDA)的表达,qPCR 检测血管外周脂肪组织中炎症因子的表达。**结果** 与 AAA 组比较,二甲双胍抑制了血管外周脂肪细胞的累积并减少脂肪细胞脂滴的形成;Western blot 和 qPCR 检测结果发现 HILPDA 及相关炎症因子[肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素(IL)-1β、IL-6]表达均降低( $P<0.05$ )。**结论** 二甲双胍可能通过调节 HILPDA 的表达减少血管外周脂肪细胞的累积和血管炎症,并最终抑制 AAA 的形成。

**[关键词]** 二甲双胍;腹主动脉瘤;血管外周脂肪细胞;HILPDA;炎症因子

**[中图法分类号]** R363.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)03-0375-04

## Metformin inhibiting formation of abdominal aortic aneurysm in mice via regulation of accumulating perivascular adipocytes\*

TIAN Li<sup>1</sup>,ZHANG Jinjin<sup>2</sup>,YANG Liu<sup>1</sup>,LIU Xiao<sup>1</sup>,YE Chunfang<sup>1</sup>,MENG Xianjie<sup>1</sup>,  
LI Hui<sup>1</sup>,ZHANG Lihua<sup>1</sup>,ZHAO Yongbo<sup>3</sup>,MA Dong<sup>2△</sup>

(1. Department of Endocrinology, Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei 063001, China;2. School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China;3. Department of Cardiac Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the mechanism of metformin in inhibiting the formation of abdominal aortic aneurysm (AAA). **Methods** A total of ten ApoE<sup>-/-</sup> male mice aged eight to ten weeks were given a high fat diet and subcutaneously implanted with a mini pump containing angiotensin Ⅱ for building AAA model. All mice were averagely divided into the AAA group and the metformin intervention group. After four weeks, the abdominal aorta tissue was taken to evaluate the expansion. Oil red staining was performed to observe the accumulation of perivascular adipocytes(PAs). Subsequently, immunofluorescence staining and western blot were used to analyze the lipid droplet formation and the expression of hypoxia induced lipid droplet associated protein(HILPDA). Quantitative polymerase chain reaction(qPCR) was used to detect the expression of cytokines in PAs. **Results** Compared with the AAA group, the metformin intervention group inhibited the accumulation and reduced the formation of lipid droplets in PAs. Moreover, the results of Western blot and qPCR showed that the expression of HILPDA and cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6) was also decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Metformin may reduce the accumulation of PAs and vascular inflammation by regulating the expression of HILPDA, contributing to inhibit the formation of AAA.

**[Key words]** metformin; abdominal aortic aneurysms; perivascular adipocytes; hypoxia induced lipid droplet associated protein; cytokines

腹主动脉瘤(AAA)导致的主动脉破裂是老年人群中死亡的常见病因<sup>[1]</sup>,其主要病理学特征是血管系统炎症和主动脉结构的病理性重塑,与年龄、性别、遗传、吸烟、肥胖、血脂异常和高血压等因素具有明显的正相关关系<sup>[2]</sup>。目前临床上尚无有效控制 AAA 进展或将其逆转的药物。血管外周脂肪组织具有较强应答高脂饮食带来的脂肪异位沉积,促进血管外周脂肪细胞(PAs)堆积、炎症产生和动脉粥样硬化的发生<sup>[3]</sup>,提示 PAs 的累积在 AAA 发生中具有重要作用。DODERER 等<sup>[4]</sup>研究发现,AAA 外膜存在大量的脂肪细胞蓄积,并且证实了这些 PAs 促使 AAA 形成是一个新颖的病理生理机制。

二甲双胍(Met)作为治疗 2 型糖尿病的一线药物,研究证实其不仅具有降糖作用,还包括减少系统炎症和氧化应激,以及抑制细胞外基质重塑等功能<sup>[5]</sup>。有研究对合并糖尿病的 AAA 患者的用药进行逻辑回归分析发现,只有 Met 的使用与 AAA 的扩张呈负相关,提示 Met 可能对 AAA 的发生、发展有抑制作用,但其具体机制尚不明确<sup>[6-7]</sup>。另外,本课题组前期研究发现,缺氧诱导脂滴相关蛋白(HILPDA)分别在糖尿病和 AAA 患者血管组织中表达明显升高,且有研究报道显示,该蛋白作为过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )的靶点参与脂肪积累、脂滴形成、巨噬细胞浸润和动脉粥样硬化进展<sup>[8-9]</sup>。因此,本课题组拟从 Met 对 AAA 形成影响的角度探讨其具体分子机制,油红 O 染色观察 PAs 的累积,采用免疫荧光染色、Western blot 和实时定量 PCR(qPCR)等实验方法检测脂滴形成、HILPDA 和炎症相关基因的表达,探讨其作用机制,为有效抗炎治疗 AAA 提供分子靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Osmotic Pump 缓释泵购自明阳科华生物技术有限公司;血管紧张素 II(Ang II)购于北京 Solarbio 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、总蛋白提取试剂盒、高脂饲料(含 0.15%胆固醇、21%脂肪)购自江苏美迪森公司;4%多聚甲醛溶液购自北京雷根生物有限公司;10%山羊血清购自上海碧云天公司;anti-HILPDA 抗体购自上海 LSBio 公司;FITC 标记的荧光二抗购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;抗荧光淬灭封片液购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 AAA 模型建立与分组干预

10 只 8~10 周龄 ApoE<sup>-/-</sup> 雄性小鼠购自北京维通利华技术有限公司,饲养于华北理工大学实验动物中心无特定病原体(SPF)级动物房,体重(27.0 $\pm$ 1.2)g。小鼠皮下植入加 Ang II 的缓释泵以 1 000 ng $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ min<sup>-1</sup> 的释放速度持续 28 d 并高脂饲养构建小鼠 AAA 模型,均分为两组:AAA 组和 Met 组,Met

组通过饮水摄入 Met(250 mg/kg),每天 1 次。4 周后水合氯醛麻醉取材,测量腹主动脉扩张尺寸,并采用油红 O 染色观察血管外周脂肪组织累积情况。一部分动脉置于 4%多聚甲醛中固定不少于 24 h,组织脱水透明,石蜡包埋,制作病理切片并进行烤片;另一部分置于液氮中,用于基因的表达分析。

#### 1.2.2 油红 O 脂肪染色法

按照北京 Solarbio 公司油红染色试剂盒说明书操作。将新取下的完整小鼠主动脉组织,采用 0.5%的油红 O 溶液孵育 7~8 min,弃液体,PBS 洗 5 遍,显微镜下观察拍照。

#### 1.2.3 免疫荧光染色

石蜡包埋组织,4  $\mu$ m 切片,脱蜡至水,0.01 mol/L 柠檬酸修复液高压抗原修复,冷却后 PBS 洗 3 遍,10%山羊血清孵育 30 min;倾去血清,滴加适当比例稀释的一抗湿盒中 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,荧光二抗室温孵育,PBS 避光冲洗,抗荧光淬灭剂避光封片,激光共聚焦显微镜观察、照相。

#### 1.2.4 Western blot 检测

取出冻存的血管组织,置冰上充分研磨后加入组织裂解液,4  $^{\circ}$ C 离心提取蛋白;十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),半干转将蛋白转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉中封闭,一抗 4  $^{\circ}$ C 过夜,PBS 洗膜,二抗孵育,再 PBS 洗膜,滴加 ECL 发光液,机器曝光显影。

#### 1.2.5 qPCR

取出冻存的血管组织,Trizol 提取总 RNA,反转录 cDNA,采用 StepOnePlus Real-Time PCR System 检测基因肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6 的转录水平, $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算目的基因的表达量,以 GAPDH 为内参。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件处理数据,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组小鼠瘤体直径和 PAs 累积比较

通过对两组小鼠主动脉样本的外径测量统计发现,与 AAA 组比较,Met 组小鼠的瘤体直径减小,差异有统计学意义[(1.98 $\pm$ 0.05)mm vs. (2.37 $\pm$ 0.09)mm, $P<0.01$ ];同时,油红 O 染色发现 Met 组小鼠的瘤体 PAs 累积较 AAA 组明显减少,见图 1。

### 2.2 免疫荧光染色和 Western blot 检测两组 PAs 中脂滴形成和 HILPDA 的表达

免疫荧光染色结果发现,与 AAA 组比较,Met 组 PAs 中脂滴形成减少,Met 组 HILPDA 染色(红色)较浅;Western blot 进一步证实 Met 组 HILPDA 表达较 AAA 组减少,见图 2。

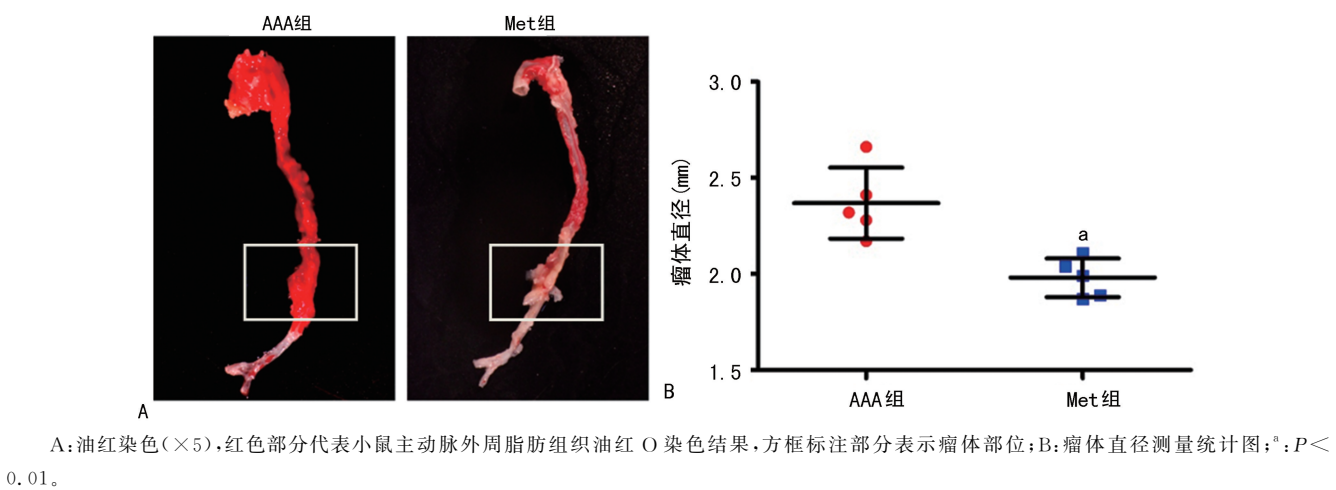


图1 两组小鼠瘤体直径和 PAs 累积结果

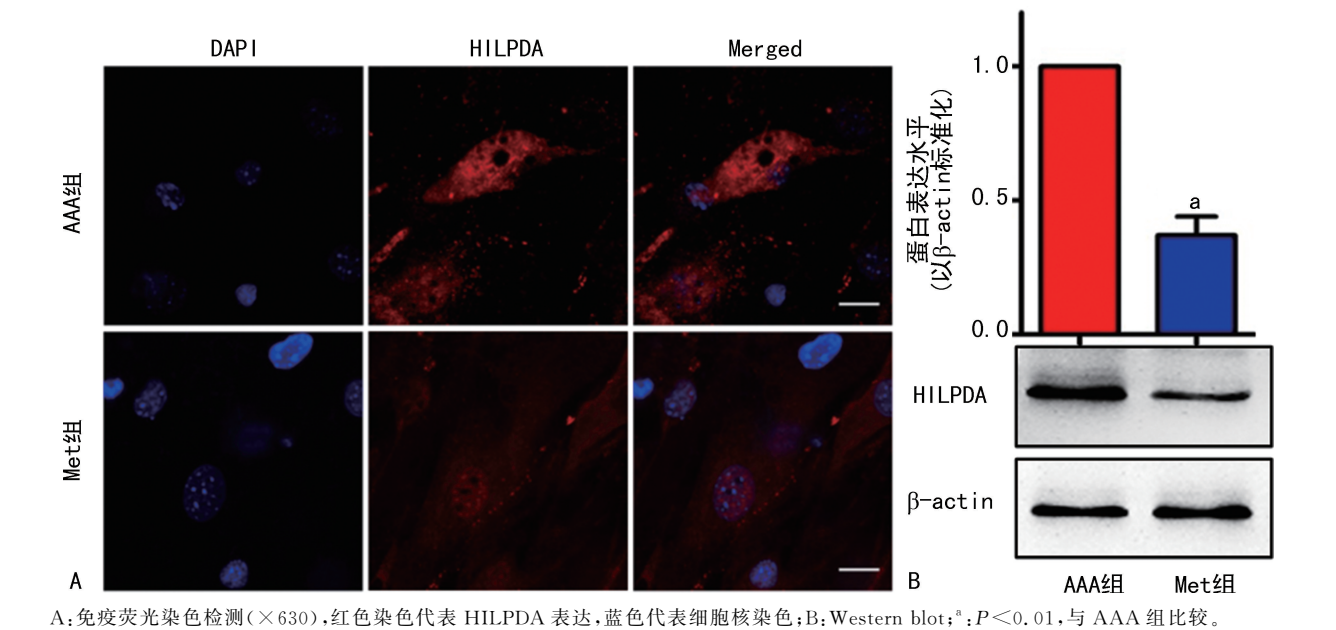


图2 两组小鼠 PAs 脂滴的形成和 HILPDA 的表达

### 2.3 qPCR 检测两组小鼠瘤体组织中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 的表达

qPCR 检测两组小鼠瘤体外周脂肪组织中炎症因子的表达结果显示,与 AAA 组比较, Met 组小鼠瘤体组织中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的表达水平降低(分别降低 0.56 倍、0.33 倍和 0.74 倍),差异均有统计学意义( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ),见图 3。

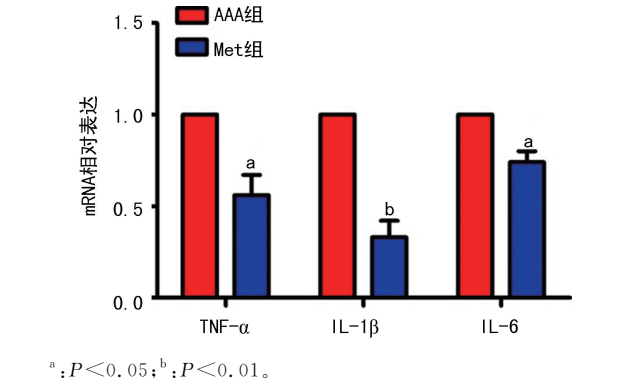


图3 qPCR 检测两组小鼠瘤体组织中炎症因子的相对表达

### 3 讨论

AAA 是血管外科最危险的疾病之一,血管细胞外基质改变、炎性反应、血管平滑肌细胞凋亡、氧化应激等参与其发病机制<sup>[10]</sup>。本研究采用 Ang II 灌注和高脂饮食诱导 AAA 小鼠模型证实了 Met 干预抑制 AAA 的作用,油红 O 染色发现 Met 组小鼠瘤体外周 PAs 累积显著减少;免疫荧光染色和 Western blot 检测发现 Met 处理导致 PAs 脂滴形成减少和 HILPDA 表达水平降低,以及 qPCR 证实 PAs 中炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6)的表达水平同样明显降低,说明 Met 抑制 AAA 的作用与减少 HILPDA 表达及其介导的 PAs 脂滴形成,抑制血管外周脂肪组织增加带来的炎症环境相关。肥胖作为心血管疾病发病的主要因素之一,有研究发现,肥胖期间血管周围脂肪组织表现出活动性局部炎症,会增加主动脉瘤发病风险<sup>[11]</sup>,而 Met 可抑制多种代谢性疾病相关的炎症因子<sup>[12]</sup>,并且可以明显抑制脂肪细胞的成脂分化<sup>[13]</sup>,说



明本研究结果与以往报道一致,证实了以上结论。另外,临床上 AAA 患者 Met 用药队列研究结果同样发现,糖尿病患者采用 Met 治疗可显著降低 AAA 的膨胀速率<sup>[14]</sup>,提示本研究结论可能是其作用机制之一。

近年来有关 Met 抑制动脉瘤相关的机制研究主要是针对血管平滑肌细胞进行的,如 WANG 等<sup>[15]</sup>报道了 Met 抑制 Ang II 诱导的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AAA 是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号途径发挥抗 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞增殖、凋亡、迁移和自噬的作用;LI 等<sup>[16]</sup>研究发现 Met 具有调节血管平滑肌细胞表型转换和炎症因子分泌并抑制脑动脉瘤的作用,其分子机制是通过激活 AMPK/ACC 信号途径实现的。本研究发现 Met 抑制 AAA 瘤体外周 PAs 的累积,进而抑制血管炎症和 AAA 的形成是从另一个角度诠释 AAA 的病理生理学机制,提示 Met 在多类型细胞中发挥抑制 AAA 形成和进展的作用。

值得注意的是,尽管在动物模型中已经证实了炎症和蛋白降解机制的干预可以有效抑制 AAA 的形成和发展,但是目前临床研究结果均以失败告终,甚至某些炎症干预措施会促使 AAA 的发展或者加速血管的破裂<sup>[17]</sup>。新近研究报道巨噬细胞中 HILPDA 表达的抑制能够增强甘油三酯的脂解作用,减少脂滴形成<sup>[18]</sup>,但并没有抑制脂肪组织中的炎症水平,提示 HILPDA 作为分子治疗靶点要考虑其组织细胞特异性,在巨噬细胞中抑制其表达对血管外周脂肪组织炎症减少可能同样没有意义;与此相反,本研究结果表明在血管外周 PAs 中抑制 HILPDA 的表达却能够发挥重要的抗炎作用(减少脂肪组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的表达),提示脂肪组织中 HILPDA 表达的抑制影响血管外周炎症环境的分子机制研究将是重要方向。

综上所述, Met 通过抑制 PAs 中 HILPDA 的表达、减少脂滴的形成、脂肪细胞增殖及相关炎症因子的表达来发挥抑制 AAA 的作用, HILPDA 可能是一个新颖的分子治疗靶点。

参考文献

[1] WANHAINEN A, HULTGREN R, LINNÉ A, et al. Outcome of the Swedish nationwide abdominal aortic aneurysm screening program [J]. *Circulation*, 2016, 134(16):1141-1148.

[2] NORDON I M, HINCHLIFFE R J, LOFTUS I M. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8(2):92-102.

[3] CHATTERJEE T K, STOLL L L, DENNING G M, et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes influence of High-Fat

feeding[J]. *Circ Res*, 2009, 104(4):541-U237.

[4] DODERER S A, GÄBEL G, KOKJE V, et al. Adventitial adipogenic degeneration is an unidentified contributor to aortic wall weakening in the abdominal aortic aneurysm[J]. *J Vasc Surg*, 2018, 67(6):1891-1900. e4.

[5] 金领微, 潘敏, 叶菡洋, 等. 二甲双胍通过调节氧化应激、内质网应激和自噬减轻大鼠肾缺血再灌注损伤的作用研究[J]. *医学研究杂志*, 2020, 49(1):111-117.

[6] FUJIMURA N, XIONG J, KETTLER E B, et al. Metformin treatment status and abdominal aortic aneurysm disease progression[J]. *J Vasc Surg*, 2016, 64(1):46-54. e8.

[7] ITOGA N K, ROTHENBERG K A, SUAREZ P, et al. Metformin prescription status and abdominal aortic aneurysm disease progression in the U. S. veteran population[J]. *J Vasc Surg*, 2019, 69(3):710-716.

[8] MATTIJSEN F, GEORGIADI A, ANDASARIE T, et al. Hypoxia-inducible lipid droplet-associated (HILPDA) is a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target involved in hepatic triglyceride secretion[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(28):19279-19293.

[9] MAIER A, WU H, CORDASIC N, et al. Hypoxia-inducible protein 2 Hig2/Hilpda mediates neutral lipid accumulation in macrophages and contributes to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *FASEB J*, 2017, 31(11):4971-4984.

[10] 张江锋, 覃晓. 腹主动脉瘤发病机制的研究[J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37(2):309-314.

[11] SAKAUE T, SUZUKI J, HAMAGUCHI M, et al. Perivascular adipose tissue angiotensin II type 1 receptor promotes vascular inflammation and aneurysm formation [J]. *Hypertension*, 2017, 70(4):780-789.

[12] 余丹. 二甲双胍对糖尿病肾病的保护作用及其抗氧化应激机制[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(4):862-867.

[13] 吕欣. 二甲双胍对前脂肪细胞增殖分化的影响[D]. 太原:山西医科大学, 2017.

[14] RAFFORT J, LAREYRE F. Reduced abdominal aortic aneurysm growth rate in diabetic patients treated by metformin: a potential role of chemokines? [J]. *Ann Vasc Surg*, 2021, 70:e1-e2.

- way and inhibits mossy fiber sprouting after pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e38789.
- [25] DUNLEAVY M, PROVENZANO G, HENSHALL D C, et al. Kainic acid-induced seizures modulate Akt (SER473) phosphorylation in the hippocampus of dopamine D2 receptor knockout mice [J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 49(1):202-210.
- [26] WEISS S A, OROSZ I, SALAMON N, et al. Ripples on spikes show increased phase-amplitude coupling in mesial temporal lobe epilepsy seizure-onset zones [J]. *Epilepsia*, 2016, 57(11):1916-1930.
- [27] TRIPATHI P P, SANTORUFO G, BRILLI E, et al. Kainic acid-induced seizures activate GSK-3 $\beta$  in the hippocampus of D2R<sup>-/-</sup> mice [J]. *Neuroreport*, 2010, 21(12):846-850.
- [28] LEWERENZ J, BAXTER P, KASSUBEK R, et al. Phosphoinositide 3-kinases upregulate system xc(-) via eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  and activating transcription factor 4-a pathway active in glioblastomas and epilepsy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(18):2907-2922.
- [29] SUTULA T. Seizure-Induced axonal sprouting: assessing connections between injury, local circuits, and epileptogenesis [J]. *Epilepsy Curr*, 2002, 2(3):86-91.
- [30] NADLER J V. The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain [J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(11):1649-1658.
- [31] FENG L, MOLNÁR P, NADLER J V. Short-term frequency-dependent plasticity at recurrent mossy fiber synapses of the epileptic brain [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(12):5381-5390.
- [32] JACOBS J, LEVAN P, CHANDER R, et al. Interictal high-frequency oscillations (80 — 500 Hz) are an indicator of seizure onset areas Independent of spikes in the human epileptic brain [J]. *Epilepsia*, 2008, 49(11):1893-1907.
- [33] BAJORAT R, WILDE M, SELLMANN T, et al. Seizure frequency in pilocarpine-treated rats is Independent of circadian rhythm [J]. *Epilepsia*, 2011, 52(9):e118-e122.
- [34] KERBER K, LEVAN P, DÜMPPELMANN M, et al. High frequency oscillations Mirror disease activity in patients with focal cortical dysplasia [J]. *Epilepsia*, 2013, 54(8):1428-1436.
- [35] JIRUSKA P, FINNERTY G T, POWELL A D, et al. Epileptic high-frequency network activity in a model of non-lesional temporal lobe epilepsy [J]. *Brain*, 2010, 133(Pt 5):1380-1390.
- (收稿日期:2021-05-08 修回日期:2021-10-10)
- 
- (下转第 378 页)
- [15] WANG Z, GUO J, HAN X, et al. Metformin represses the pathophysiology of AAA by suppressing the activation of PI3K/AKT/mTOR/autophagy pathway in ApoE(-/-) mice [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9:68.
- [16] LI S, SHI Y, LIU P, et al. Metformin inhibits intracranial aneurysm formation and progression by regulating vascular smooth muscle cell phenotype switching via the AMPK/ACC pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):191.
- [17] LINDEMAN J H, MATSUMURA J S. Pharmacologic management of aneurysms [J]. *Circ Res*, 2019, 124(4):631-646.
- [18] VAN DIERENDONCK X, DE LA ROSA R M, GEORGIADI A, et al. HILPDA uncouples lipid droplet accumulation in adipose tissue macrophages from inflammation and metabolic dysregulation [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(6):1811-1822. e6.
- (收稿日期:2021-04-10 修回日期:2021-10-15)