

# 冠心病心外膜脂肪组织中 KLF7 促进炎症反应及脂肪分化成熟

薛亚军<sup>1,2</sup>, 黄文华<sup>1</sup>, 杜雅彦<sup>1,3</sup>, 周奕君<sup>1</sup>, 董星星<sup>1</sup>, 魏育涛<sup>1,4</sup>

**摘要** 目的 探讨冠心病心外膜脂肪组织(EAT)中 Kruppel 样因子 7(KLF7)通过核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)刺激巨噬细胞分泌炎症因子,促进脂肪细胞分化成熟,阐明 KLF7 在冠心病(CAD)发生发展过程中的作用机制。方法 选取冠心病患者(CAD组)及非冠心病患者(non-CAD组)各30例,收集一般资料。使用 qRT-PCR 检测 EAT 中 KLF7、脂联素(APN)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) mRNA 表达水平。体外培养 3T3-L1 前脂肪细胞及人 THP-1 细胞并诱导为 M1 型巨噬细胞,将细胞分为 3 组:KLF7 上调组(转染 KLF7 模拟物),KLF7 下调组(转染 siRNA 敲低 KLF7),NC 组(转染寡核苷酸序列),转染两种细胞。使用 qRT-PCR 检测 M1 型巨噬细胞中 APN、MCP-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达,使用 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 信号通路关键因子表达水平。采用 qRT-PCR 法检测转染 24 h 后 3T3-L1 前脂肪细胞中 APN、KLF4、IL-6、MCP-1 mRNA 及脂肪细胞分化标志物 mRNA 表达水平。结果 与 non-CAD 组比较,CAD 组 APN 表达降低,IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。KLF7 在炎症刺激(脂多糖 LPS)诱导 M1 型巨噬细胞中高度表达,敲低 KLF7 可抑制炎症因子的释放。用 KLF7-siRNA 转染可抑制 LPS 诱导的 JNK-MAPKs 磷酸化,并抑制 p-p65 的水平并抑制 p-I $\kappa$ Ba 的活化( $P < 0.05$ )。在 3T3-L1 前脂肪细胞中,上调 KLF7 使 PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、FABP4 mRNA 表达升高,促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞( $P < 0.05$ )。结论 CAD 患者 EAT 中 KLF7 表达增加,KLF7 激活 EAT 中 JNK-NF- $\kappa$ B 信号通路介导的巨噬细胞活化,促进 CAD 患者 EAT 中炎症的发生,并且能促进脂肪细胞分化成熟,从而促进 CAD 的发展。表明 KLF7 可能是心血管疾病(如 CAD)的潜在治疗靶标。

**关键词** 冠心病;心外膜脂肪组织;KLF7;巨噬细胞;炎症  
**中图分类号** R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)02-0197-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.007

心脏周围脂肪堆积是公认的易引起冠心病(coronary artery disease, CAD)、心房纤颤和心力衰竭等心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的危险因素<sup>[1-2]</sup>。心外膜脂肪组织(epicardial adipose tissue, EAT)与心肌组织共享冠脉血供<sup>[3-4]</sup>。巨噬细胞在 CAD 患者 EAT 组织中表现出 M1 极化和分泌大量炎症因子。EAT 能促进 CAD 发生发展,EAT 有望作为诊断和治疗 CAD 的靶标<sup>[1,5-6]</sup>。

Kruppel 样因子(Kruppel-like factors, KLFs)属于锌指转录因子家族<sup>[7]</sup>,其在基因表达和调控中发挥着不同作用<sup>[8]</sup>。其中 KLF7 可调节脂肪细胞的分化和脂肪细胞因子分泌<sup>[9-10]</sup>。但是,KLF7 在 CAD 患者 EAT 炎症中的作用尚未见报道。该研究通过体内及体外细胞实验观察 KLF7 对脂肪细胞分化的作用,旨在探讨 KLF7 在 CAD 的发生发展中的作用,为阐明 CAD 发生发展的分子机制提供初步理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 本研究纳入 2018 年 1 月-2019 年 10 月在石河子大学医学院第一附属医院心胸外科行非体外循环冠状动脉搭桥术(coronary artery bypass grafting, CABG)的 30 例 CAD 患者。其余 30 例行房间隔缺损修复或瓣膜置换手术而无冠状动脉狭窄的患者作为对照组,患者资料列于表 1。

**1.1.1 诊断标准** 参照我国卫生部发布的《冠状动脉粥样硬化性心脏病的诊断标准》(2010 年版)以及 2011 年美国心脏联合会(American Heart Association, AHA)冠心病诊疗指南。

**1.1.2 纳入标准** 实验组:① 年龄 40~75(63.8 $\pm$ 4.2)岁;② 符合 CAD 的诊断标准需行 CABG 患者;③ 民族为汉族。对照组:① 年龄在 40~75(66.5 $\pm$ 7.3)岁;② 冠状动脉造影阴性且需行瓣膜置换手术(瓣膜为退行性变)患者;③ 民族为汉族。

**1.1.3 排除标准** ① 合并有糖尿病或糖耐量异常

2021-11-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81460059)

作者单位:<sup>1</sup> 石河子大学医学院、新疆民族与地方病教育部重点实验室,石河子 832000

<sup>2</sup> 石河子大学医学院附属第一医院心胸外科,石河子 832008

<sup>3</sup> 荆州市中心医院急诊中心,荆州 434000

<sup>4</sup> 济宁市第一人民医院胸外科,济宁 272000

作者简介:薛亚军,男,硕士研究生;

魏育涛,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:wytfw@126.com

者;②其他类型心脏病,如风湿性心脏病患者;③患有恶性肿瘤者;④近期有创伤、外科手术者;⑤急、慢性感染者;⑥长期肝、肾等脏器疾病及其它内分泌疾病。

**1.2 仪器与试剂** 人单核细胞 THP-1 细胞和 3T3-L1 前脂肪细胞均购自中国科学院细胞库(上海)。RNA 提取试剂和 qRT-PCR 反应试剂盒购自 TaKaRa 公司(日本)。Western blot 试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 临床资料** 包括患者年龄、性别、身高、体质量、病程、大生化、心肌酶、超敏 C 反应蛋白、心脏彩超及颈动脉彩超等。

**1.3.2 样本采集** 麻醉后 1 h,从左心室前壁(与患病段相邻)收集 EAT 双眼样品(平均重量 0.5~1.0 g)。将所有样品立即保存在 RNA 稳定剂中,然后转移至 -80 °C,用于后续实验。本研究符合石河子大学医学院一附院医学伦理委员会程序并通过审批(编号:2014-072-01),所有研究对象均签署知情同意书。

**1.3.3 细胞培养** 在含有 10% FBS(美国 Gibco 公司),青霉素(100 μg/ml)和链霉素(100 μg/ml)的 Roswell Park Memorial Institute-1640(RPMI-1640)培养基(美国 HyClone 公司)中培养 THP-1 细胞及 3T3-L1 前脂肪细胞,在高糖培养基中培养 3T3-L1 前脂肪细胞,培养环境为 37 °C 的含 5% CO<sub>2</sub> 的湿润培养箱。将 THP-1 细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔细胞的密度接种在 12 孔板中,并使用 100 μg/ml phorbol-12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯(美国 Invitrogen 公司)持续培养 24 h。然后将细胞与 20 ng/ml 干扰素-γ(interferon-gamma, IFN-γ)(美国 Gibco 公司)和 10 ng/ml LPS(美国 Sigma-Aldrich 公司)孵育 24 h 以诱导 M1 巨噬细胞。

**1.3.4 qRT-PCR 检测相关因子** 根据制造商的说明书,使用 TRIzol(美国赛默飞世尔科技公司)提取 CAD EAT,非 CAD EAT 和实验细胞组的总 RNA。使用 NanoDrop 1000 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)测量 RNA 的纯度和浓度。使用带有基因组脱氧核糖核酸(gDNA)(美国 TaKaRa Bio 公司)的 PrimeS-cript RT 试剂盒进行逆转录,每个样品分离出 500 ng 总 RNA。使用 7500 实时 PCR 系统(美国 Applied Biosystems 公司)及 QuantiNova SYBR Green PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司)进行定量实时 PCR(qRT-PCR)。EAT 中 KLF7、APN、IL-6、TNF-

α mRNA 表达水平,M1 型巨噬细胞中 APN、MCP-1、IL-6 和 TNF-α mRNA 的表达,以及 3T3-L1 前脂肪细胞中 APN、KLF4、IL-6、MCP-1 mRNA 及脂肪细胞分化标志物 PPARγ、C/EBPα、FABP4,表 1 列出了引物序列。所有实验均重复 3 次。使用比较循环时间法计算靶基因转录物的相对量。通过比较临界阈值方法计算每个组织和对照样品的相对表达水平。

**1.3.5 Western blot 检测相关因子蛋白表达** 将 30~50 μg 的总蛋白质在 100 °C 下加热 10 min,使用 10% 凝胶上的 SDS-PAGE 分离,然后转移至聚偏二氟乙烯膜上。遵循一抗通过与缀合有 HRP 的适当的二抗孵育并通过使用 Pierce Fast Western Blot Kit(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)检测。该研究中使用的抗体是 β-肌动蛋白(ZSGBIO, CHINA) KLF7(美国 Abcam 公司),检测两组中 KLF7、NF-κB 信号通路关键因子以及脂肪分化细胞标志因子蛋白表达水平。

**1.3.6 KLF7 小干扰 RNA(siRNA)的转染** siRNA 由 Gene-Pharma(上海)设计和合成。按照说明书将 KLF7 siRNA 或阴性对照通过 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)转染。24 h 后通过 qRT-PCR 评估转染的 KLF7 siRNA 的水平来验证转染。表 1 列出了本研究中使用的 siRNA 序列。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 和 GraphPad-Prism 8.0 统计软件进行统计学分析。进行方差齐性检验,正态性检验。计量资料实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。单变量两组资料之间的比较采用 *t* 检验;多组资料之间的比较采用单因素方差分析;方差不齐采用非参数检验,相关性采用 Pearson's rank 分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组一般资料和生化指标** 两组年龄、体质量指数(body mass index, BMI)、收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)以及甘油三酯(triglycerides, TG)等差异无统计学意义,但超敏 C 反应蛋白 CAD 组较 non-CAD 组升高,脂联素(Adiponectin, APN)降低( $P < 0.05$ )(表 2)。

**2.2 KLF7 在 CAD 患者 EAT 中的表达水平** 检测 KLF7 mRNA 在实验组和对照组 EAT 中的表达( $P < 0.001$ ),见图 1A。通过 Western blot 验证 KLF7

表1 实验相关引物序列列表

基因	引物名称	引物序列(5'-3')
KLF7	KLF7-F	GGTGAGCCAGACAGACTGACAA
	KLF7-R	GAAGTAGCCGGTGTCTGCGTGA
IL-6	IL-6-F	CTCTCCGCAAGAGACTTCCAG
	IL-6-R	TGTGGGTGGTATCCTCTGTGA
TNF-α	TNF-α-F	GTGACAAGCCTGTAGCCCAT
	TNF-α-R	TATCTCTCAGCTCCACGCCA
TLR4	TLR4-F	AATGCCAGGATGATGCCTCT
	TLR4-R	AGGAAGTACCTCTATGCAGGG
JNK	JNK-F	ACACCACAGAAATCCCTAGAAG
	JNK-R	CACAGCATCTGATAGAGAAGGT
NF-κB	NF-κB-F	CTGAGTCTGCTCCTTCCA
	NF-κB-R	CTTCGGTGTAGCCCATTTGT
PPARγ	PPARγ-F	GTGCTGAGAGCAGAAGGA
	PPARγ-R	GAGGTGTTGTGTGAAAAGG
C/EBPα	C/EBPα-F	GTGAAAACGACGAAGAGGCA
	C/EBPα-R	TTGGGTACTTTTGGGTTATT
FABP4	FABP4-F	AAATCAGACGACACGACA
	FABP4-R	CACATTGGCGGCCAGCT
β-actin	β-actin-F	AGGCCGGCTTCGCGGGCGAC
	β-actin-R	CAGGGGAGCACACGCAGCTC

表2 两组一般资料和生化指标( $\bar{x} \pm s$ )

	实验组(n=30)	对照组(n=30)	t值	P值
年龄(岁)	61.4 ± 6.84	59.87 ± 6.11	4.426	0.512
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	23.22 ± 2.18	22.28 ± 1.76	13.42	0.749
收缩压(kPa)	2.19 ± 1.62	2.16 ± 1.15	2.29	0.584
舒张压(kPa)	9.61 ± 1.06	9.22 ± 1.16	1.79	0.769
LDL(mmol/L)	2.15 ± 0.81	2.13 ± 0.66	1.812	0.645
HDL(mmol/L)	1.17 ± 0.88	1.13 ± 0.3	3.105	0.897
TC(mmol/L)	3.82 ± 1.15	3.96 ± 0.94	8.123	0.589
TG(mmol/L)	1.92 ± 1.32	1.69 ± 1.00	24.24	0.678
hsCRP(mg/ml)	2.84 ± 0.27	1.37 ± 0.21	16.86	<0.05
APN(μg/ml)	8.89 ± 2.56	10.56 ± 2.74	47.42	<0.05

蛋白表达( $P < 0.05$ ),见图1B。

**2.3 EAT 炎症信号通路关键基因 mRNA 表达水平** 在 EAT 中, CAD 组 APN 表达水平低于 non-CAD 组, IL-6、TNF-α、JNK 和 NF-κB mRNA 表达水平高于 non-CAD 组( $P < 0.05$ ),见图2。

**2.4 EAT 中的巨噬细胞的鉴别** 为了确定巨噬细胞类型在 EAT 炎症过程中的重要性,使用炎性细胞标记 CD68 来检测巨噬细胞的存在。CAD 患者 EAT 中 CD68 的 mRNA 水平高于 non-CAD 组(图3)。

**2.5 KLF7 在人类 THP-1 衍生的巨噬细胞中高表达并由炎症刺激诱导** 课题组用特定的 KLF7 siRNA(siRNA 1-2)或 si-NC 瞬时转染 THP-1 衍生的 M1 型巨噬细胞。如图4A所示,与 si-NC 相比,si-KLF7-1 和 si-KLF7-2 能够降低 KLF7 的表达,si-KLF7-2 组最低。为了验证 KLF7 mRNA 的转染效率,测定在转染相同量 si-KLF7 由 THP-1 衍生的 M1 型巨噬细

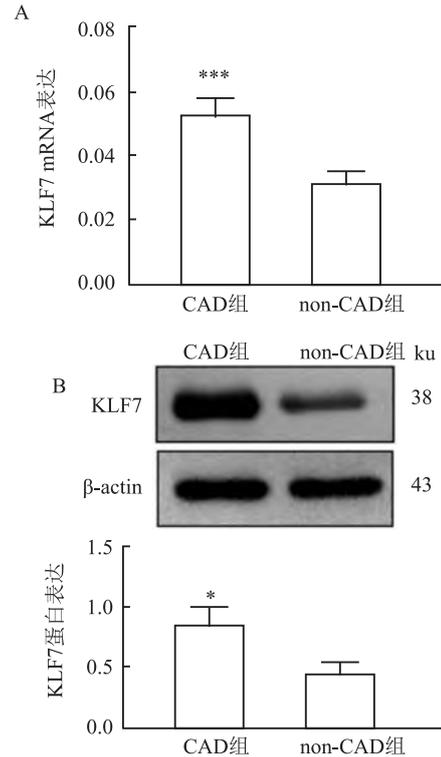


图1 KLF7 在两组 EAT 中的表达

A:KLF7 在 EAT 中 mRNA 表达水平;B:KLF7 在 EAT 中蛋白表达水平;与 non-CAD 组比较;\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$

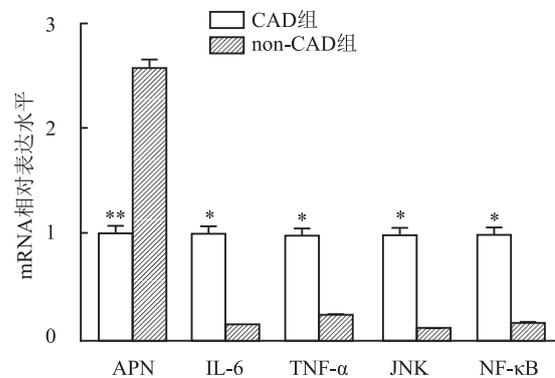


图2 炎症信号通路关键基因 mRNA 表达差异

与 non-CAD 组比较;\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

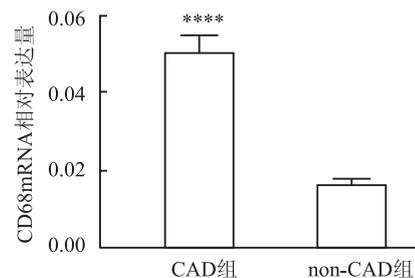


图3 EAT 中巨噬细胞 CD68 的表达

与 non-CAD 组比较;\*\*\*\*  $P < 0.0001$

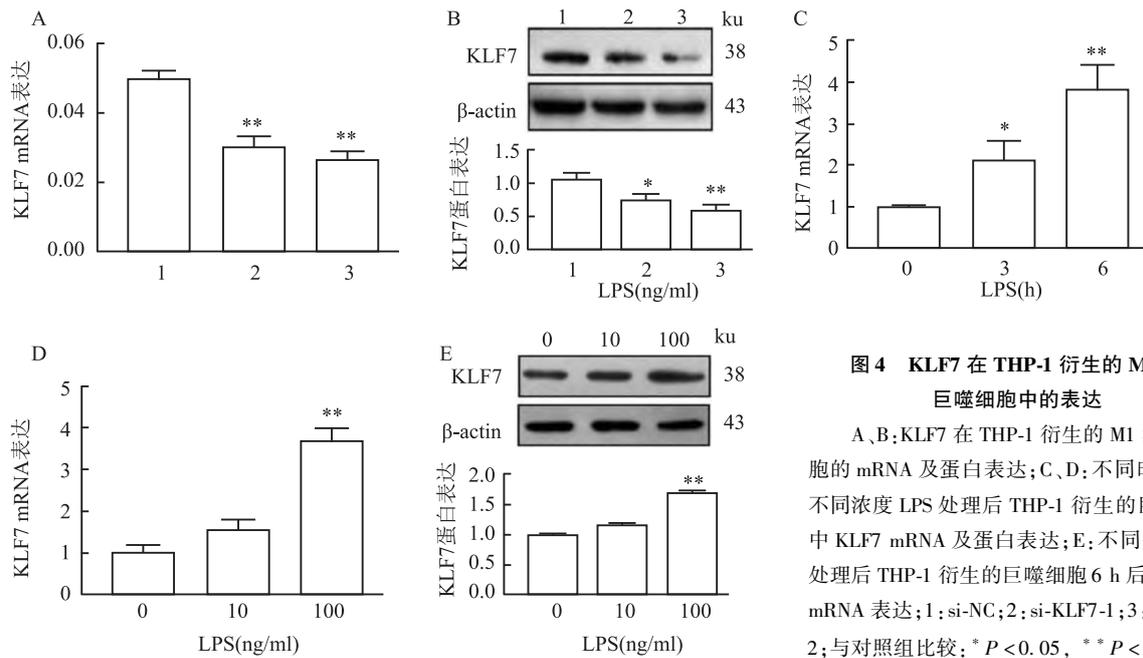


图4 KLF7在THP-1衍生的M1型巨噬细胞中的表达

A、B:KLF7在THP-1衍生的M1型巨噬细胞的mRNA及蛋白表达;C、D:不同时间以及不同浓度LPS处理后THP-1衍生的巨噬细胞中KLF7 mRNA及蛋白表达;E:不同剂量LPS处理后THP-1衍生的巨噬细胞6h后KLF7的mRNA表达;1:si-NC;2:si-KLF7-1;3:si-KLF7-2;与对照组比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

胞裂解物中KLF7的蛋白表达。结果与本研究在mRNA水平上显示的结果相同(图4B)。LPS以时间依赖和剂量依赖的方式影响KLF7 mRNA的表达(图4C、D)。LPS以时间依赖性和剂量依赖性方式进一步诱导KLF7的表达(图4E)。KLF7在人类THP-1衍生的巨噬细胞中高表达,并在体外由炎性刺激诱导,这表明它可能调控这些刺激巨噬细胞激活的相关因子。

**2.6 KLF7促进脂肪细胞分化成熟** 分别将KLF7模拟物和NC(对照组)转染到3T3-L1前脂肪细胞中,于转染后每天检测FLF7表达,其表达趋势见图5A。转染处理24h后检测APN、IL-6、MCP-1 mRNA及脂肪细胞分化标志物过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )、CCAAT/增强子结合蛋白 $\alpha$ (C/EBP $\alpha$ )、脂肪酸结合蛋白4(FABP4)mRNA的相对表达水平,显示KLF7模拟物组中APN表达降低,IL-6、MCP-1、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 和FABP4表达升高( $P < 0.05$ )(图5B)。

### 3 讨论

CAD在世界范围内发病率很高。CAD可导致心肌缺血、心肌梗塞、心力衰竭、并最终导致死亡。CAD是一种严重的慢性疾病,其特征是冠状动脉进行性动脉粥样硬化闭塞,导致心肌供需之间不匹配<sup>[11]</sup>。动脉粥样硬化被描述为中型动脉内膜的低度炎症状态,可因为众所周知的危险因素(例如高血压、糖尿病、肥胖症和血脂异常)而产生。EAT被

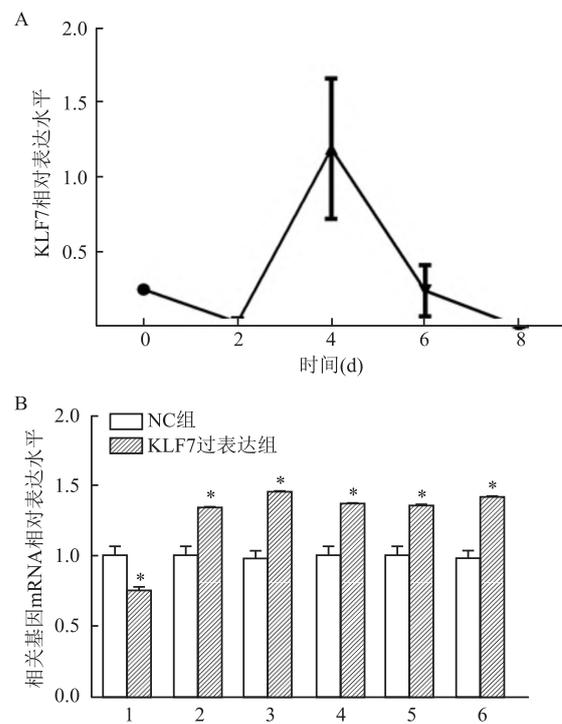


图5 KLF7促进脂肪细胞分化成熟

A:KLF7在脂肪细胞分化每天mRNA的表达;B:上调KLF7后APN表达下降,IL-6、MCP-1、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 和FABP4表达升高;1:APN;2:IL-6;3:MCP-1;4:PPAR $\gamma$ ;5:C/EBP $\alpha$ ;6:FABP4;与NC组比较:\* $P < 0.05$

认为是一种在心包内的异位脂肪<sup>[12]</sup>。EAT分泌的脂肪因子可以直接从血管周围脂肪扩散到血管内膜,引起炎症发生,最终发展为动脉粥样硬化<sup>[13]</sup>。脂肪组织驻留的免疫细胞几乎包括所有类型的免疫细胞,即巨噬细胞、B细胞、T细胞、嗜中性粒细胞、

嗜酸性粒细胞和肥大细胞。

Kruppel 样因子 (Kruppel-like factors, KLFs) 属于锌指转录因子家族, KLFs 可调节哺乳动物组织中的多种生物过程, 包括细胞增殖、分化、存活以及组织发育<sup>[14]</sup>。KLFs 还控制免疫细胞的功能, 例如巨噬细胞, 它们参与了心血管疾病和代谢疾病的炎症过程。本课题组前期研究发现, CAD 患者 EAT 组织中 miR-455b-3p 通过下调 APN 的表达从而促进 EAT 炎症因子释放。本研究显示, CAD 患者 EAT 组织中 KLF7 mRNA 和蛋白表达水平高于 non-CAD 组, 炎症相关因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、JNK、NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平也高于 non-CAD 组, 而具有抗炎作用的 APN 却低于 non-CAD 组, 以上结果提示炎症状态与 KLF7 的表达水平相关。本研究进一步通过体外培养诱导人类 THP-1 衍生的巨噬细胞, 显示 LPS 以时间依赖性和剂量依赖性方式诱导 KLF7 的表达。通过体外培养 3T3-L1 前脂肪细胞, 发现 KLF7 能促进前脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞。EAT 在炎症状态下, 可能通过影响 KLF7 的表达, 进而引起脂肪组织炎症因子转录激活, 促进脂肪细胞分化成熟, 但其具体作用机制有待进一步研究加以验证。

#### 参考文献

- [1] Akyuz A. Exercise and coronary heart disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1228: 169 - 79.
- [2] Antonopoulos A S, Antoniades C. The role of epicardial adipose tissue in cardiac biology: classic concepts and emerging roles[J]. *J Physiol*, 2017, 595(12): 3907 - 17.
- [3] Benjamin E J, Virani S S, Callaway C W, et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American heart

- association [J]. *Circulation*, 2018, 137(12): e67 - e492.
- [4] 胡成平, 赵迎新. 心外膜脂肪组织与冠心病的关系[J]. *中华心血管病杂志*, 2017, 45(5): 447 - 50.
- [5] Aldiss P, Davies G, Woods R, et al. Browning the cardiac and peri-vascular adipose tissues to modulate cardiovascular risk [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 228: 265 - 74.
- [6] Berg G, Miksztoewicz V, Morales C, et al. Epicardial adipose tissue in cardiovascular disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1127: 131 - 43.
- [7] Garcia-NI? O W R, Zazueta C. New insights of Krüppel-like transcription factors in adipogenesis and the role of their regulatory neighbors [J]. *Life Sci*, 2021, 265:118763.
- [8] Rane M J, Zhao Y, Cai L. Krüppel-like factors (KLFs) in renal physiology and disease[J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 743 - 50.
- [9] Zhang Z, Wang H, Sun Y, et al. Klf7 modulates the differentiation and proliferation of chicken preadipocyte [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45(4): 280 - 8.
- [10] Henning T R, Butler K, Hanson D, et al. Increased susceptibility to vaginal simian/human immunodeficiency virus transmission in pig-tailed macaques coinfecting with chlamydia trachomatis and trichomonas vaginalis [J]. *J Infect Dis*, 2014, 210(8): 1239 - 47.
- [11] Wolf D, Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 315 - 27.
- [12] Shulman G I. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(23): 2237 - 8.
- [13] 周亮亮, 宫剑滨, 李德闽, 等. 心外膜脂肪定量及其炎症状态与冠状动脉粥样硬化斑块易损性的关系[J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(2): 134 - 40.
- [14] 杜雅彦, 刘洋, 卢沐, 等. 冠心病 EAT 中 miR-455b-3p 调控脂肪细胞分化及炎症因子[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(10): 1594 - 600.

## KLF7 in epicardial adipose tissue of coronary heart disease promotes inflammation and adipose differentiation

Xue Yajun<sup>1,2</sup>, Huang Wenhua<sup>1</sup>, Du Yayan<sup>1,3</sup>, Zhou Yijun<sup>1</sup>, Dong Xingxing<sup>1</sup>, Wei Yutao<sup>1,4</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Medicine, Shihezi University, Xinjiang Key Laboratory of Ethnic and Endemic Diseases, Ministry of Education, Shihezi 832000; <sup>2</sup>Dept of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832008; <sup>3</sup>Emergency Center of Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434000; <sup>4</sup>Dept of Thoracic Surgery, Jining First People's Hospital, Jining 272000)

**Abstract Objective** To explore the epicardial adipose tissue (EAT) of patients with coronary heart disease, KLF7 stimulates macrophages to secrete inflammatory factors and promotes the differentiation and maturation of adipocytes through the NF- $\kappa$ B signaling pathway, and to clarify the mechanism of KLF7 in the occurrence and development of CAD. **Methods** 30 patients with coronary heart disease (CAD group) and 30 patients without coronary heart disease (non-CAD group) were collected, and general data and biochemical indicators were collected. qRT-

PCR was used to detect the expression levels of KLF7, APN, IL-6, and TNF- $\alpha$  mRNA in EAT. Human THP-1 cells were cultured in vitro and induced into M1 type macrophages and 3T3-L1 preadipocytes. The cells were divided into 3 groups: KLF7 up-regulated group (transfected with KLF7 mimic), KLF7 down-regulated group (transfected with siRNA knockdown KLF7), NC group (transfected oligopeptide sequence), transfected two kinds of cells. qRT-PCR was used to detect the expression of APN, MCP-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA in M1 type macrophages, and the protein expression levels of key factors in the NF- $\kappa$ B signaling pathway were detected by Westren blot. The qRT-PCR method was used to detect APN, KLF4, IL-6, MCP-1 mRNA and adipocyte differentiation marker peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in 3T3-L1 preadipocytes 24 h after transfection. CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), fatty acid binding protein 4 (FABP4) mRNA relative expression levels, and Westren blot was used to detect protein expression levels. **Results** Compared with the non-CAD group, the expression of CAD group decreased, APN decreased, IL-6 and TNF- $\alpha$  increased significantly, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). KLF7 was highly expressed in human THP-1 derived M1 macrophages induced by inflammatory stimuli (LPS). In M1 macrophages derived from human THP-1, knocking down KLF7 could inhibit the release of inflammatory factors. Transfection with KLF7-siRNA could significantly inhibit LPS-induced phosphorylation of JNK-MAPKs, the level of p-p65 and the activation of p-I $\kappa$ Ba ( $P < 0.05$ ). In 3T3-L1 preadipocytes, upregulation of KLF7 increased the expression of adipocyte differentiation markers PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , FABP4 mRNA, and promoted the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into adipocytes ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of KLF7 in EAT in CAD patients increases. KLF7 activates the activation of macrophages mediated by the JNK-NF-KB signaling pathway in EAT, promotes inflammation in EAT in CAD patients, and promotes the differentiation and maturation of adipocytes, thereby promoting the development of CAD. It indicates that KLF7 may be a potential therapeutic target for cardiovascular diseases (such as CAD).

**Key words** coronary heart disease; epicardial adipose tissue; KLF7; macrophages; inflammation

(上接第 196 页)

## Immune checkpoint VISTA has a role in the modulation of immune response in septic mice

Tao Tianzhu<sup>1,2</sup>, Zhang Guorong<sup>2</sup>, Yang Xiaoming<sup>1</sup>, Guo Qing<sup>3</sup>, Liu Jun<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Anesthesiology, <sup>2</sup>Dept of Pain Medicine, <sup>4</sup>Dept of Research, Air Force Medical Center, Beijing 100142;

<sup>3</sup>Research Dept of Special Medical Center of Armed Police, Beijing 102613)

**Abstract Objective** To determine expression profile of VISTA on lymphocyte and the potential regulatory effects on immune response in a murine model of sepsis. **Methods** Expression profile of VISTA on T lymphocytes in the spleen and peripheral blood was examined. Mice were intravenously injected with an agonistic VISTA mAb (MH5A) or isotype control, and then the survival rate, cytokine expression, bacterial burden and lymphocyte apoptosis were determined. **Results** VISTA was substantially expressed on T cell from the spleen and peripheral blood, septic peritonitis did not induce significant changes in the expression profiles at 24h post surgery ( $P > 0.05$  in each comparison). Treatment with MH5A improved the survival of septic mice (8/12 vs 2/12,  $P = 0.01$ ), accompanied by reduced lymphocyte apoptosis [(30 123  $\pm$  6 400) vs (45 482  $\pm$  8 652),  $P = 0.03$ ], decreased bacterial burden and lessened cytokines expression, such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  ( $P < 0.05$  in each comparison). **Conclusion** The present study identified VISTA as a novel immune checkpoint in the regulation of T cell apoptosis and inflammatory response during sepsis. VISTA agonism might offer a promising approach in the immunotherapy for sepsis.

**Key words** immune checkpoint; sepsis; inflammatory response; apoptosis