

Asprosin 的表达纯化及其对小鼠在体心脏功能的作用

朱丽雯¹, 谭延振², 罗文平^{1*}, 易蔚^{2*}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 第四军医大学西京医院心血管外科, 西安 710032)

【摘要】 目的 利用大肠埃希菌原核表达并纯化 asprosin 蛋白, 研究其对心功能改善的影响。**方法** 从 GenBank 获取 asprosin 编码序列, 根据大肠埃希菌密码子偏好性进行密码子优化, 全基因合成, 连接于表达载体, 进行 IPTG 诱导表达并纯化。通过对冠脉左前降支结扎再放松, 建立小鼠心功能损伤模型。将 30 只小鼠随机分成 3 组: 假手术组 (sham)、心功能损伤组 (MI/R) 和心功能损伤并注射重组蛋白组 (MI/R + rAsp)。通过心动超声检测左室功能, 对心功能损伤程度进行评价, 进而研究 Asprosin 对心功能改善的影响。**结果** 经过原核表达并纯化, 目标蛋白纯度大于 95%, 内毒素含量小于 $<0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$ 蛋白, 适于进行细胞及动物研究。成功建立了心功能损伤模型, 与单纯损伤组相比, 外源给予重组 asprosin 蛋白后, 小鼠心脏心功能明显改善 ($P < 0.05$)。**结论** Asprosin 蛋白具有抑制心功能损伤, 改善心功能的作用。

【关键词】 Asprosin; 原核表达; 蛋白质纯化; 心脏超声; 心功能

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 04-0368-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.04.005

Expression and purification of asprosin and its effects on cardiac function in mice

ZHU Li-wen¹, TAN Yan-zhen², LUO Wen-ping^{1*}, Yi Wei^{2*}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

【Abstract】 Objective To purify asprosin protein expressed in *Escherichia coli* expression system and to study its effect on cardiac function. **Methods** Coding sequence of asprosin was obtained from GenBank. Codon optimization was performed according to the codon preference of *E. coli*. After gene synthesized, recombinant plasmid was made. Asprosin was then induced and purified by Ni-affinity purification. The mouse model of impaired cardiac function was established by ligating and relaxing the left anterior descending coronary artery. 30 mice were randomly divided into 3 groups: sham operation group (sham), cardiac dysfunction group (MI/R) and cardiac dysfunction plus injection of recombinant asprosin protein group (MI/R + rAsp). The left ventricular function was detected by echocardiography to determine the improving effect of recombinant asprosin protein on cardiac function. **Results** After prokaryotic expression and purification, the purity of the target protein was higher than 95%, and the endotoxin content was less than $<0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$ protein, which was suitable for cell and animal studies. After the recombinant asprosin protein was given, the left ventricular function of the mice was improved significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** Asprosin acts as a myocardial protective molecule to improve cardiac function.

【Key words】 Asprosin; Prokaryotic expression; Protein purification; Echocardiography; Cardiac function; Mice

Corresponding author: Yi Wei. E-mail: yiwei@fmmu.edu.cn; or LUO Wen-ping. E-mail: 18717295093@163.com

【基金项目】 国家自然科学基金 (编号: 81470477; 81422004; 81470480)。

【作者简介】 朱丽雯 (1993 -), 女, 硕士研究生, 研究方向: 心肌损伤与保护。Email: 313028293@qq.com

【通讯作者】 易蔚 (1982 -), 男, 副教授, 研究方向: 心肌损伤与保护。Email: yiwei@fmmu.edu.cn;

罗文平 (1966 -), 男, 主任医师, 研究方向: 冠心病的基础与临床研究。Email: 18717295093@163.com. * 共同通讯作者

Asprosin 是 2016 年首次在 Cell 被报道的新型内源性小分子蛋白质^[1]。Asprosin 是 profibrillin 的 C 端多肽片段。Profibrillin 经过弗林蛋白酶(furin)在靠近 C 末端切割,形成 fibrillin-1 和 asprosin 两种蛋白。即 asprosin 实际是由 FBN1 基因的第 65 和 66 个外显子编码,第 65 个外显子编码 11 个氨基酸残基,第 66 个外显子编码 129 个氨基酸残基,共计 140 个氨基酸残基,实际分子量为约 30×10^3 (可能具有糖基化等翻译后修饰)。它主要是由白色脂肪组织分泌,其循环浓度在纳摩尔水平。在禁食时,可以靶向肝脏,通过激活 G 蛋白-cAMP-PKA 信号通路来增加肝细胞中葡萄糖的释放^[1, 2]。

Asprosin 作为一种新发现的蛋白分子,经过检索,作者目前只发现一篇报道,阐述了其作为一种激素的生理功能。但是,在其他方面的研究完全空白。为了对 asprosin 进行深入研究,本研究主要着眼于 asprosin 的原核表达和蛋白纯化并通过在体动物实验,初步探索外源给予重组 asprosin 在病理状态下(小鼠心肌缺血再灌注模型)对心功能改善的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原核宿主与实验动物

原核蛋白表达宿主采用 *Escherichia coli* BL21 (DE3),以感受态细胞形式购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,保存于本研究室。

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 44 只,体重约 20 g,8 周龄,购买于第四军医大学动物中心【SCXK(陕)2014-002】。小鼠手术及组织取材均于第四军医大学心血管外科实验室实验设备内完成。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.1.2 仪器与试剂

表达载体 pET-30a(Novagen,德国),IPTG(Sigma,美国),内毒素去除柱(Pierce,美国),His Trap 镍柱(GE,美国),Amicon Ultra-15 超滤管(Millipore,美国),透析袋(Viskase,美国),0.22 μm PVDF 膜(Millipore,美国),超声破碎仪(新芝,中国),电泳仪(Bio-Rad,美国);回旋式摇床(NBS,美国),酶标仪(Molecular Devices,美国)。DNA 合成、测序及载体构建由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 Asprosin 基因合成及载体构建

根据 FBN1 所编码 mRNA(Nr. 000138),截取 CDS 8194-8616 区域,根据 *E. coli* 密码子偏好性优化后进行全基因合成。待全基因合成后,将 DNA 片段连接在表达载体 pET30a 的 EcoR I 与 Hind III 限制性酶切位点之间,形成表达质粒 pET30a-Asp。

1.2.2 Asprosin 诱导表达

参照 Sambrook 等^[3]采用化学转化法将表达质粒 pET30a-Asp 转化 *E. coli*,涂布于含有卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 平板。待菌落长出后,挑取菌落进行诱导表达。

过夜培养后,按照 1% 进行转接至 LB 培养基,37℃,200 r/min 培养 4~6 h 至 A_{600} 0.9。加入诱导剂 IPTG 使得终浓度达到 0.2 mmol/L,降低温度至 16℃,诱导表达 24 h。8000 r/min 离心,弃去上清,保留沉淀部分。

1.2.3 Asprosin 纯化

菌体采用结合缓冲液(咪唑 20 mmol/L, NaCl 500 mmol/L,磷酸盐 20 mmol/L, pH 7.4)进行重新悬浮并加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 PMSF,置于冰浴超声破碎。破碎条件:工作 3 s,停止 5 s,功率 300 W,总共 20 min。12 000 r/min 离心 20 min,弃去沉淀,保留上清进行纯化。

Asprosin 纯化采用镍柱亲和纯化。采用结合缓冲液进行亲和吸附,清洗缓冲液(咪唑 100 mmol/L, NaCl 500 mmol/L,磷酸盐 20 mmol/L, pH 7.4)洗脱杂蛋白,洗脱缓冲液(咪唑 500 mmol/L, NaCl 500 mmol/L,磷酸盐 20 mmol/L, pH 7.4)洗脱 asprosin 蛋白。过夜透析,将缓冲液置换为 PBS 缓冲液。采用 Pierce 离心式内毒素去除柱,按照说明书步骤,进行毒素去除。采用截留分子量为 3×10^3 的 Amicon Ultra-15 超滤管进行超滤浓缩,得到 asprosin 蛋白。

采用 SDS-PAGE 电泳并用考马斯亮蓝 G-250 进行染色,计算蛋白纯度;利用 Anti-His 抗体对得到的 asprosin 蛋白通过免疫印迹法进行鉴定,采用 LAL 法测定内毒素含量。最终将得到的蛋白分装、保存于 -80℃。

1.2.4 小鼠心功能损伤模型建立

用 6-0 丝线在小鼠冠脉左前降支距根部 2~3 mm 处打一活结造成心肌缺血,30 min 后,将活结打开再灌注。重组蛋白按照 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 体重的剂量,在缺血 10 min 后,通过腹腔注射给予。再灌注 24 h 以

后,检测心功能。

1.2.5 小鼠心功能测定

将小鼠放入小动物气体麻醉机,给予含有 2% 异氟烷的氧气进行吸入麻醉,使用脱毛膏进行胸前区脱毛。脱毛后,采用 Vevo 高分辨率小动物超声影像系统检测小鼠心功能。使用仪器自带软件通过测量收缩及舒张期时心肌厚度,计算小鼠心脏左室射血分数(LVEF%),左室短轴缩短率(LVFS%),左室收缩末容积(LVESV)。

1.3 统计分析

实验数据,采用 GraphPad Prism 5.0 软件包进行统计分析,以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 t 检验进行组间差异性检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性的标准。

2 结果

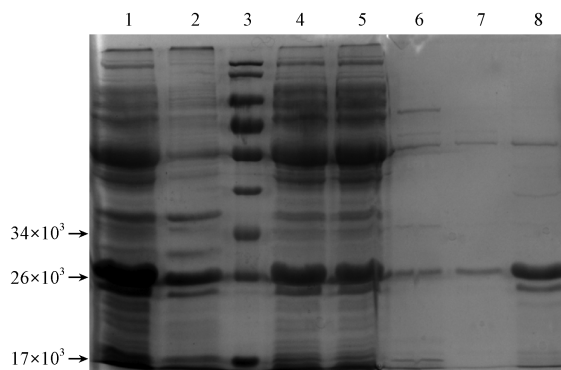
2.1 Asprosin 原核表达及初步纯化

截取 FBN1 (Nr.000138) C 末端 141 个氨基酸残基即为 Asprosin。根据 *E. coli* 密码子偏好性进行密码子优化,避免产生 Hind III 和 EcoR I 两个限制性酶切位点,然后全基因合成,得到 423 bp 的 asprosin 编码 DNA 片段。将 DNA 片段连接到表达载体 pET-30a 的 EcoR I 和 Hind III 之间,形成表达质粒 pET30a-Asp,转化 BL21 (DE3) 菌株以后,形成 asprosin 表达菌株。使用该菌株进行在 asprosin 蛋白表达时,N 端融合了 pET-30a 所含有的 His Tag 及 S Tag,而 C 端由于人为添加了终止密码子,不含有任何冗余氨基酸残基。

对 BL21 (DE3)/pET30a-Asp 进行诱导表达,可以看出有较大量的目的蛋白表达(图 1 Lane 1),经过超声破碎及离心以后,对上清和沉淀进行电泳分析。结果显示,沉淀中大部分是目标蛋白(图 1 Lane 2),上清之中亦存在部分可溶性的目的蛋白(图 1 Lane 4),可以进行后续纯化。

上清液进行镍柱亲和纯化时,对流穿液及梯度洗脱液体进行电泳分析。结果显示,采用含有 40 mmol/L 咪唑的缓冲液进行亲和吸附,在流穿液中,含有较大量的 asprosin 蛋白(图 1 Lane 5);采用咪唑浓度为 100 mmol/L 及 150 mmol/L 的缓冲液进行洗脱时,洗脱的大部分是杂蛋白,目标蛋白也被少量洗脱(图 1 Lane 6 & Lane 7);使用洗脱缓冲液(含咪唑浓度为 500 mmol/L)进行洗脱时,目的蛋白被大量洗脱,但是仍含有少量杂蛋白(图 1 Lane 8)。初

步表达显示,在 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L,诱导表达温度为 16℃ 时,可以得到一定量的可溶性目的蛋白用于后续纯化;初步纯化显示,在前述纯化条件下,可以得到纯度约 75% 的蛋白。



注: Lane 1,细菌全蛋白; Lane 2,破碎沉淀; Lane 3, Marker; Lane 4,破碎上清; Lane 5,镍柱流穿液; Lane 6,清洗缓冲液洗脱; Lane 7,150 mmol/L 咪唑溶液洗脱; Lane 8,洗脱缓冲液洗脱。

图 1 Asprosin 原核表达纯化

Note. Lane 1. Total protein. Lane 2. Precipitate. Lane 3. Marker. Lane 4. Supernatant. Lane 5. Flow-through. Lane 6. Elution by wash buffer. Lane 7. Elution by buffer containing 150 mmol/L midazole. Lane 8. Elution by elution buffer.

Fig. 1 Expression and purification of asprosin

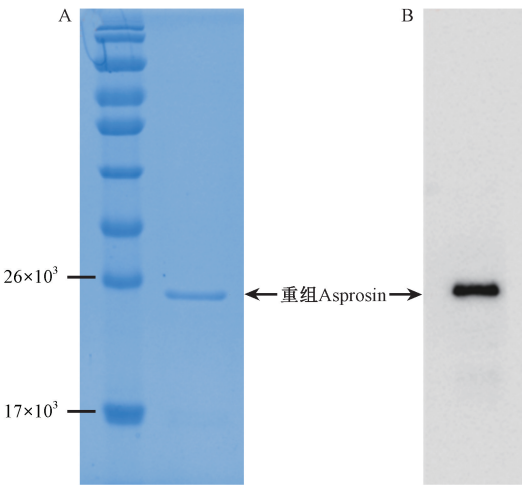
2.2 Asprosin 鉴定

根据初步纯化结果,进行微调优化:降低结合缓冲液中咪唑的浓度(至 20 mmol/L),以使更多的目标蛋白进行亲和吸附;增加清洗缓冲液的清洗时间,最终得到纯度更高的目的蛋白。

对采用洗脱缓冲液洗脱得到的蛋白进行过夜透析,按照说明书进行内毒素去除及超滤浓缩。将得到的蛋白进行过滤除菌,分装保存。SDS-PAGE 后进行考马斯亮蓝染色,纯度鉴定显示,目的蛋白纯度大于 95% (图 2A),采用标签特异性抗体 Anti-His 进行免疫印迹分析,显示只有唯一一条带,且大小与考马斯亮蓝染色位置一致(图 2B),说明纯化得到的是 asprosin 蛋白。最终,所得蛋白纯度大于 95%,内毒素含量小于 <0.1 EU/ μ g 蛋白,产量约 400 μ g/L 菌液,蛋白浓度 0.3 mg/mL,可以用于后续离体细胞及在体动物研究。

2.3 小鼠心功能损伤模型的建立

小鼠心功能损伤模型采用冠脉左前降支结扎并放松,造成缺血再灌注损伤实现。首先,用 6-0 丝线在小鼠冠脉左前降支距根部 2~3 mm 处打一活结造成心肌缺血,30 min 后将活结打开再灌注,即



注:A. 重组 Asprosin 大小及纯度鉴定;B. 采用 Anti-His tag 进行 western blot 鉴定重组蛋白。

图 2 重组 Asprosin 的鉴定

Note. A. Identification of molecular weight and purity of re-combinant asprosin by SDS-PAGE. B. Identification of re-combinant asprosin by Western blot using Anti-His as primary antibody

Fig. 2 Identification of recombinant asprosin

为心功能损伤组(MI/R 组)。Sham 组在相同位置穿过丝线,但不进行结扎。再灌注 24 h 以后,进行心动超声检测,结果显示,心功能损伤组左心室前壁收缩舒张能力明显下降(图 3 A),相比较于对照组,左室射血分数降低显著($P < 0.05$)(图 3 B)。说明,心功能损伤模型成功建立。

2.4 外源给予 Asprosin 能够明显改善心功能

为了研究外源给予重组 Asprosin 对心功能改善的作用,实验组在缺血 10 min 时,腹腔注射 20 μg (约 1 $\mu\text{g/g}$ 体重)前述纯化得到的重组 asprosin (rAsp)。再灌注 24 h 后,进行超声检测。结果显示,单纯缺血再灌注组(MI/R)心功能明显下降(图 4A),在外源给予纯化的重组 asprosin 后,与 MI/R

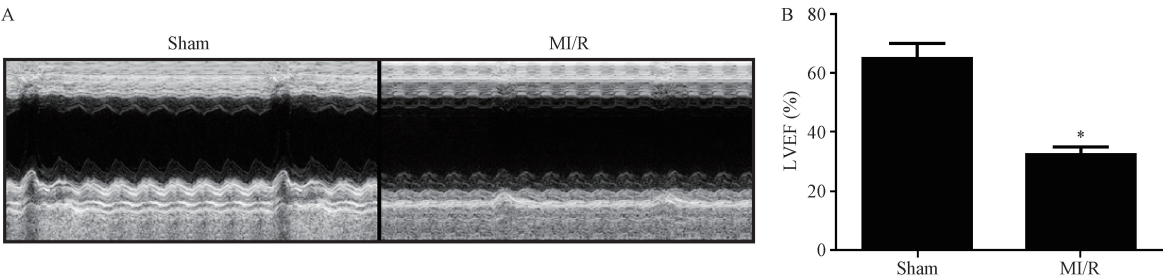
组相比有心功能有明显的改善(图 4A),左室射血分数 LVEF% 上升显著(图 4B),短轴缩短率上升显著(图 4C),收缩末期,左心室容积明显下降(图 4D)。说明重组 asprosin 具有抑制心功能损伤,改善心功能的作用。

3 讨论

缺血性心脏病、高血压、糖尿病及病毒或细菌感染等因素都可以导致心功能损伤。其中,缺血性心脏病是严重危害人类健康的心血管疾病之一,具有很高的发病率和致死率^[4]。缺血性心脏病的治疗核心在于恢复心肌的血液供应,即再灌注。但是,在心脏经历缺血再灌注后,会发生分子不良适应、细胞功能紊乱、基质重组、体积增大和心室壁畸形等一系列病理学转变,继而发生进一步心肌损伤,即缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/R injury),出现心肌舒缩功能降低、再灌注心律失常、心肌能量代谢障碍、超微结构变化及无血流等现象,易导致死亡^[5, 6]。

心肌缺血再灌注损伤机制复杂,与氧化压力、胞内钙离子超载、pH 迅速纠正、能量代谢紊乱和炎症等诸多因素相关^[7, 8]。采用药物刺激或者模仿机体抗损伤能力的内源性心肌保护机制越来越受到重视,热休克蛋白、NF- κB 、 Na^+/H^+ 交换体、NO、CO、褪黑素及脂联素等内源性保护分子均有较为深入的研究,但是结果却并不令人满意^[5, 8-16]。作为一种新发现的内源性分子,本研究已经证实 asprosin 可以改善由于缺血再灌注带来的心功能下降,但是其具体分子机制尚待进一步研究。

为了研究 asprosin 在改善心功能方面的作用,我们进行原核表达与纯化。与大多数人源蛋白在原核中表达所遇到的问题一样,原核表达 asprosin 时

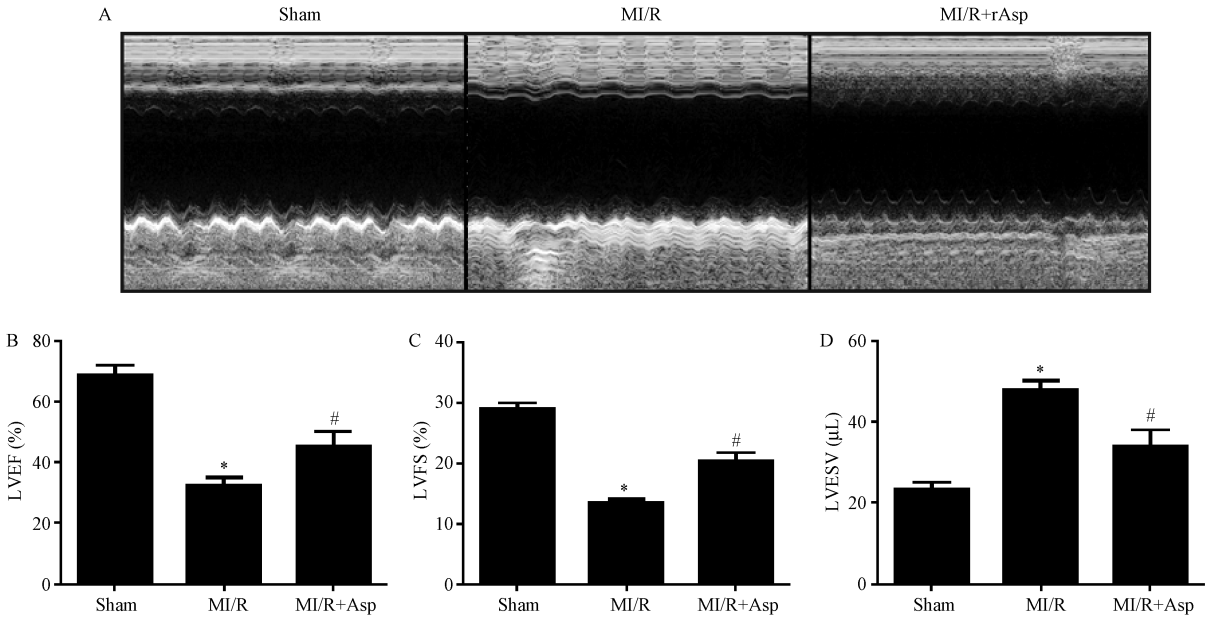


注:A 超声心动图代表图,B 左室射血分数, $P < 0.05$ 与 sham 组相比。

图 3 缺血再灌注对心脏左室功能的影响

Note. A. Representative echocardiographic images. B. LVEF% obtained from echocardiographic analysis, compaired with sham group, $P < 0.05$.

Fig. 3 Effect of myocardial ischemia/reperfusion on left ventricular function analyzed by echocardiography



注:A. 超声心动图代表图,B. 左室射血分数,C. 左室短轴缩短率,D. 左室收缩末容积。* $P < 0.05$ 与 sham 组相比, # $P < 0.05$ 与 MI/R 组相比。

图 4 外源给予重组 asprosin 对心脏左室功能的影响

Note. A. Representative echocardiographic images. B. LVEF% obtained from echocardiographic analysis. C. LVFS% obtained from echocardiographic analysis. D. Left ventricular End-systolic volume. Compared with sham group, * $P < 0.05$. Compared with MI/R group, # $P < 0.05$.

Fig. 4 Effect of rAsp on the left ventricular function analyzed by echocardiography

上清中目的蛋白含量较少,这与人源蛋白在 *E. coli* 中不能正确折叠有关。通常,解决手段包括融合促溶标签、降低诱导剂剂量、降低诱导温度和共表达伴侣蛋白辅助折叠等。在本研究中,我们采用了融合促溶标签 S Tag 辅助折叠,降低诱导剂剂量、降低诱导温度,最终,上清中可溶 asprosin 含量比例仍然较低。如果后续需要进行长期模型或者大鼠等需要大剂量的研究时,还需要共表达伴侣蛋白辅助折叠,以获得更高比例可溶性蛋白,满足研究需求。另外,在进行镍柱纯化时,asprosin 亲和吸附比例较低、易与杂蛋白一起洗脱,这可能与其本身性质有关。后续研究时可以考虑离子交换柱与凝胶排阻柱相组合,提高目标蛋白的回收率。

在本研究中,我们用 *E. coli* 原核表达并纯化了 asprosin,通过在体动物研究证实,Asprosin 具有抑制心肌缺血再灌注损伤,改善心功能的作用。asprosin 有望成为一个新的改善心功能的内源性保护分子,但其具体分子机制尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Romere C, Duerrschmid C, Bournat J, et al. Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone [J]. Cell, 2016. 165 (3): p566 - 579.
[2] Greenhill, C. Liver: Asprosin - new hormone involved in hepatic glucose release [J]. Nat Rev Endocrinol, 2016. 12(6): 312.

[3] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 2001 [M], New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
[4] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association. [J]. Circulation. 2011, 123; p. e18 - e209.
[5] Sun Y, Yi W, Yuan Y, et al. C1q/tumor necrosis factor-related protein - 9, a novel adipocyte-derived cytokine, attenuates adverse remodeling in the ischemic mouse heart via protein kinase A activation [J]. Circulation, 2013. 128(11 Suppl 1): S113 - 120.
[6] Cohn JN, Ferrari R, and Sharpe N, et al. Cardiac remodeling - concepts and clinical implications; a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. [J]. J Am Coll Cardiol, 2000. 35: 569 - 582.
[7] Frank A, Bonney M, Bonney S, et al. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside [J]. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2012. 16(3): 123 - 132.
[8] Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target [J]. J Clin Invest, 2013. 123(1): 92 - 100.
[9] Shibata R, Sato K, Pimentel DR, et al. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX - 2 - dependent mechanisms [J]. Nat Med, 2005. 11 (10): 1096 - 1103.
[10] Oshima Y, Ouchi N, Sato K, et al. Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart [J]. Circulation, 2008. 117(24): 3099 - 3108.

- 碍的复杂性 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2014, 34(4): 450–454.
- [2] Ionescu DF, Niciu MJ, Mathews DC, et al. Neurobiology of anxious depression: a review [J]. *Depress Anxiety*, 2013, 30(4): 374–385.
- [3] Rosa, SG, Quines CB, Stangherlin EC, et al. Diphenyl diselenide ameliorates monosodium glutamate induced anxiety-like behavior in rats by modulating hippocampal BDNF-Akt pathway and uptake of GABA and serotonin neurotransmitters [J]. *Physiol Behav*, 2016, 155: 1–8.
- [4] Wang QS, Tian JS, Cui YL, et al. Genipin is active via modulating monoaminergic transmission and levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat model of depression [J]. *Neuroscience*, 2014, 275(5): 365–373.
- [5] 董宁, 唐启盛, 赵瑞珍, 等. 丹梔逍遥散对广泛性焦虑大鼠 Papez 环路内细胞凋亡的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(2): 100–103.
- [6] Gregus A, Wintink AJ, Alicia C. Davis AC, et al. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 156: 105–114.
- [7] Kokras N, Dalla C. Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(1): 436–445.
- [8] Tejeda HA, O'Donnell P. Amygdala inputs to the prefrontal cortex elicit heterosynaptic suppression of hippocampal inputs [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(43): 14365–14374.
- [9] Albert PR, Fiori LM. Transcriptional Dys-regulation in anxiety and major depression: 5-HT1a gene promoter architecture as a therapeutic opportunity [J]. *Curr Pharm Design*, 2014, 20(23): 3738–3750.
- [10] Mandyam CD. The Interplay between the hippocampus and amygdala in regulating aberrant hippocampal neurogenesis during protracted abstinence from alcohol dependence [J]. *Front Psychiatry*, 2013, 27(4): 61–69.
- [11] Xu J, Xu H, Liu Y, et al. Vanillin-induced amelioration of depression-like behaviors in rats by modulating monoamine neurotransmitters in the brain [J]. *Psychiatry Res*, 2015, 225(3): 509–514.
- [12] Gomez JL, Lewis MJ, Sebastian V, et al. Alcohol administration blocks stress-induced impairments in memory and anxiety, and alters hippocampal neurotransmitter receptor expression in male rats [J]. *Horm Behav*, 2013, 63(4): 659–666.
- [13] Siniscalco D, Giordano C, Rossi F, et al. Role of neurotrophins in neuropathic pain [J]. *Current Neuropharmacol*, 2011, 9(4): 523–529.
- [14] 王建平, 刘聪, 杨直堂, 等. 白藜芦醇对脑缺血小鼠 BDNF 及 NT-3 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(4): 531–535.
- [15] Jiang P, Dang RL, Li HD, etc. The impacts of swimming exercise on hippocampal expression of neurotrophic factors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. *Evidence-based Compl Altern Med*, 2014: 729827.

[收稿日期] 2016–12–21

(上接第 372 页)

- [11] Tao L, Gao E, Jiao X, et al. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress [J]. *Circulation*, 2007, 115(11): 1408–1416.
- [12] Kambara T, Ohashi K, Shibata R, et al. CTRP9 protein protects against myocardial injury following ischemia-reperfusion through AMP-activated protein kinase (AMPK) – dependent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(23): 18965–18973.
- [13] Yu L, Sun Y, Cheng L, et al. Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of SIRT1 [J]. *J Pineal Res*, 2014, 57(2): 228–238.
- [14] Yi W., Sun Y, Yuan Y, et al. C1q/tumor necrosis factor-related protein-3, a newly identified adipokine, is a novel antiapoptotic, proangiogenic, and cardioprotective molecule in the ischemic mouse heart [J]. *Circulation*, 2012, 125(25): 3159–3169.
- [15] Liang H, Hou H, Yi W, et al. Increased expression of pigment epithelium-derived factor in aged mesenchymal stem cells impairs their therapeutic efficacy for attenuating myocardial infarction injury [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(22): 1681–1690.
- [16] Yu L, Liang H, Dong X, et al. Reduced silent information regulator 1 signaling exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetic rats and the protective effect of melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2015, 59(3): 376–390.

[收稿日期] 2017–05–30