

# 非诺贝特抑制脂肪细胞组织因子表达

李洁琪, 赵水平, 吴洁

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 内科学; 药物影响脂肪细胞组织因子表达; 逆转录聚合酶链反应; 非诺贝特; 脂肪细胞; 组织因子; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨动脉粥样硬化兔脂肪细胞组织因子表达及非诺贝特对其的影响, 将 15 只兔随机分为正常组、动脉粥样硬化组和非诺贝特组, 非诺贝特组在高胆固醇饮食第 9 周起加用非诺贝特(每天 30 mg/kg)干预 4 周, 采用逆转录聚合酶链反应测定脂肪细胞组织因子的表达。结果发现, 高胆固醇饮食可显著升高血清总胆固醇( $P < 0.05$ ), 甘油三酯无明显升高; 加用非诺贝特治疗 4 周, 总胆固醇和甘油三酯均无明显改变。动脉粥样硬化组脂肪细胞组织因子表达明显高于正常组( $1.081 \pm 0.011$  比  $0.939 \pm 0.018$ ,  $P < 0.01$ ), 非诺贝特治疗 4 周后组织因子表达较动脉粥样硬化组显著降低( $0.893 \pm 0.022$  比  $1.081 \pm 0.011$ ,  $P < 0.01$ )。结果提示, 动脉粥样硬化组兔脂肪细胞表达组织因子明显增加, 非诺贝特能抑制其表达, 提示非诺贝特可能具有抗血栓作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Fenofibrate Inhibiting Tissue Factor Expression in Adipocytes

LI Jie-Qi, ZHAO Shui-Ping, and WU Jie

(The Second XiangYa Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Fenofibrate; Adipocyte; Tissue Factor; Atherosclerosis; Expression; High Cholesterol; Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate tissue factor (TF) mRNA expression in adipocytes of atherosclerotic rabbit, and the effects of fenofibrate on the expression of TF in adipocytes. **Methods** Male rabbits ( $n = 15$ ) were randomly separated into three groups. Normal group were fed with normal diet for 12 weeks, and the other two groups were fed with high cholesterol diet for 8 weeks and then assigned to 30 mg/(kg·d) fenofibrate and placebo for 4 weeks. At the end of 12th week from the start of experiment, subcutaneous adipose was collected for adipocytes culture under deep anesthesia. The level of TF mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Results** The atherogenic diet caused a consistent increase in serum levels of total cholesterol (TC) ( $P < 0.05$ ) and did not affect serum triglyceride (TG) levels. Fenofibrate did not change serum levels of TG and TC. In the rabbits fed with a high cholesterol diet, TF mRNA expression in adipocytes was elevated ( $1.081 \pm 0.011$  vs.  $0.939 \pm 0.018$ ,  $P < 0.01$ ). Fenofibrate significantly reduced TF mRNA ( $0.893 \pm 0.022$  vs.  $1.081 \pm 0.011$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** TF mRNA expression increases in adipocytes of atherosclerotic rabbit. Fenofibrate reduces TF expression in adipocytes, which suggests that fenofibrate may have an antithrombotic effect.

肥胖常并发各种代谢综合征如高甘油三酯血症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗和高血压等, 使心血管疾病发生危险增加<sup>[1-3]</sup>。已有研究证明, 肥胖/非胰岛素依赖型糖尿病患者组织因子(tissue factor, TF)表达增加, 血液处于高凝状态, 造成凝血/纤溶异常, 易并发血栓性疾病<sup>[4]</sup>。研究发现肥胖鼠脂肪细胞 TF 表达增加<sup>[5,6]</sup>。那么, 动脉粥样硬化发生过程中是否存在脂肪细胞 TF 表达异常? 调脂药物是否影响脂肪细胞 TF 表达? 我们对此进行了研究。

[收稿日期] 2003-10-22

[修回日期] 2004-03-22

[作者简介] 李洁琪, 博士研究生, 主治医师, 现在贵州省人民医院工作。赵水平, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为血脂与冠心病, E-mail 为 ZhaoSP@public.com。吴洁, 博士研究生, 副主任医师。联系电话为 0731-5524222-2468; E-mail 为 jieqili2003@yahoo.com.cn。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物及分组

取 2~3 月龄新西兰雄性大白兔 15 只, 随机分为 3 组: 正常组、动脉粥样硬化组和非诺贝特组各 5 只, 体重分别为  $2.29 \pm 0.21$  kg、 $2.32 \pm 0.18$  kg 和  $2.33 \pm 0.15$  kg ( $P > 0.05$ )。正常组给予普通饲料喂养, 动脉粥样硬化组兔给予含 1% 胆固醇、8% 猪油和 7.5% 蛋黄粉的高胆固醇饲料喂养, 非诺贝特组在动脉粥样硬化组基础上第 9 周起加用非诺贝特药物饲料(每兔 5~10 g/天, 非诺贝特每天 30 mg/kg)喂养 4 周。每日总饲料量为每兔 120 g。3 组均喂养 12 周。

### 1.2 血清胆固醇和甘油三酯的测定

分别于 0 周、8 周和 12 周采集兔耳动脉血约 5

mL, 测定血清胆固醇和甘油三酯浓度。

### 1.3 兔脂肪细胞的培养

第 12 周末腹腔注射 3% 戊巴比妥液 (25 mg/kg) 麻醉, 取兔腹股沟处皮下脂肪组织于无菌培养皿中, Hank's 液洗涤 2 次, 同时分离去除脂肪组织中肉眼可见的纤维成分及血管, 将组织剪碎成约 2 mm × 2 mm 小块, 加入 0.2% 胶原酶, 置 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱内消化。60~90 min 后, 过滤去除未完全消化的脂肪组织, 将过滤后的组织消化液经 1 000 r/min 离心 15 min, 去除上清, 沉积的细胞用红细胞裂解液再次配成细胞悬液, 室温孵育 8~10 min, Hank's 液洗涤并离心, 沉积的细胞用 DMEM/F12 培养基制成细胞悬液, 接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 每 2 天更换培养基, 待细胞生长汇合达 90% 时消化传代, 取 2~4 代的细胞, 以 1 × 10<sup>9</sup> 个/L 接种于 6 孔培养板, 开始于 DMEM/F12 培养基中加入终浓度为 0.25 μmol/L 的地塞米松和终浓度为 10 mg/L 的胰岛素维持脂肪细胞分化, 8 天后收集脂肪细胞, 用于抽提 RNA。采用油红 O 染色法进行脂肪细胞鉴定, 纯度达 98%, 台盼蓝染色细胞活力大于 97%。

### 1.4 逆转录聚合酶链反应

氯仿-酚抽提脂肪细胞 mRNA, 并进行逆转录, 20 μL 的反应体系包括: 总 RNA 2 μg、25 mmol/L Mg-Cl<sub>2</sub> 4 μL、10 × 逆转录缓冲液 2 μL、10 mmol/L dNTP 混合物 2 μL、Rnasin 0.5 μL、AMV 逆转录酶 0.6 μL 和 OLigo(dT)<sub>15</sub> 1 μL, 再加无 RNA 酶水至总体积 20 μL。反应条件为 42 °C 1 h, 95 °C 5 min 灭活逆转录

酶。取上述 cDNA 产物进行聚合酶链反应扩增。

组织因子(TF)引物根据 Genebank 中兔 TF cDNA 序列, 参考文献 [7] 自行设计: 上游引物 5'-AAGCAGTGATTCCCTCTCG-3' 和下游引物 5'-AACACAGCATTGGCAGCAG-3'; 内对照为兔 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH): 上游引物 5'-GGAGC-CAAAAGGGTCATG-3' 和下游引物 5'-CCAGT-GAGTTTCCCGTTC-3'; 扩增片段长度分别为 254 bp 和 346 bp。聚合酶链反应条件为 94 °C 3 min → 94 °C 50 s → 58 °C 50 s → 72 °C 1 min; 40 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。逆转录聚合酶链反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析, 各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用 *t* 检验或配对 *t* 检验, 多组比较采用方差分析, *P* < 0.05 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 血清胆固醇和甘油三酯变化情况

由表 1 (Table 1) 可见, 3 组兔 0 周时血清 TG 和 TC 差异无显著性。动脉粥样硬化组和非诺贝特组 8 周和 12 周时血清 TC 明显高于正常组和 0 周时 TC (*P* < 0.05), 且两组在 8 周和 12 周时血清 TC 无差异。动脉粥样硬化组和非诺贝特组 8 周及 12 周血清 TG 均无明显升高。非诺贝特组在给予非诺贝特治疗 4 周后, 其血清 TG 与动脉粥样硬化组及治疗前相比亦无明显改变。

表 1. 三组兔 0 周、8 周和 12 周血清总胆固醇和甘油三酯水平的变化 (mmol/L, *n* = 5)

Table 1. The serum levels of TG and TC in 0 week, 8 weeks and 12 weeks in three groups

分 组	总胆固醇			甘油三酯		
	0 周	8 周	12 周	0 周	8 周	12 周
正常组	1.07 ± 0.43	1.08 ± 0.31	1.36 ± 0.60	0.99 ± 0.64	0.96 ± 0.48	1.10 ± 0.34
动脉粥样硬化组	1.23 ± 0.40	24.36 ± 0.25 <sup>a</sup>	25.72 ± 1.78 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.30	2.71 ± 2.45	3.08 ± 2.79
非诺贝特组	1.01 ± 0.43	24.42 ± 0.19 <sup>a</sup>	24.70 ± 1.79 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.30	2.33 ± 2.07	1.84 ± 1.14

a: *P* < 0.05, 与 0 周或正常组比较。

### 2.2 兔脂肪细胞组织因子 mRNA 水平的变化

如图 1 (Figure 1) 所示, TF 和 GAPDH mRNA 片段分别为 254 bp 和 346 bp。动脉粥样硬化组较正常组 TF mRNA 表达 (mRNA/GAPDH) 增强 (1.081 ± 0.011 比 0.939 ± 0.018, *P* < 0.01), 而非诺贝特组与动脉粥样硬化组相比, 非诺贝特组 TF mRNA 与 GAPDH 的比值显著下降 (0.893 ± 0.022 比 1.081 ± 0.011, *P* < 0.01)。

## 3 讨论

给兔喂高胆固醇饮食 8 周后, 其血清 TC 明显升高, 继续高胆固醇饮食 4 周, TC 持续升高, 但升高的幅度较前 8 周明显减慢; 高胆固醇喂养后血清 TG 虽有所升高, 但无统计学意义。予非诺贝特治疗 4 周,

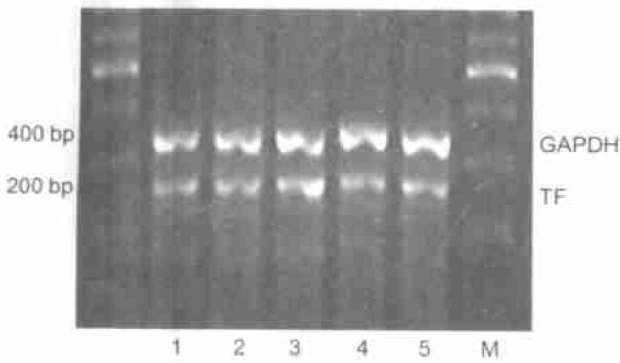


图 1. 组织因子 mRNA 半定量分析 M 为 DNA 分子量标准; 1 和 2 为正常组; 3 为动脉粥样硬化组; 4 和 5 为药物治疗组。 a:  $P < 0.05$ , 与正常组比; b:  $P < 0.05$ , 与动脉粥样硬化组比较。

Figure 1. RT-PCR analysis for TF expression in adipocytes

血清 TC 和 TG 浓度均无明显降低, 与文献[8]报道相一致, 这可能与兔本身基础血脂水平较低有关, 也可能是不同物种对药物的反应不同所致<sup>[9]</sup>。

肥胖是动脉粥样硬化的独立危险因素, 肥胖导致凝血和纤溶系统的变化, 血栓形成危险性升高。研究发现肥胖/NIDDM 患者存在凝血/纤溶系统调节失衡, 从而更易促发心血管疾病<sup>[10]</sup>。脂肪细胞除分泌瘦素外, 还分泌血管紧张素原、酰化刺激蛋白、肿瘤坏死因子、白细胞介素 6、纤溶酶原激活物抑制剂 1 和组织因子等<sup>[11]</sup>, 肥胖患者动脉粥样硬化和血栓形成危险性增加, 可能与脂肪细胞分泌的某些因子如纤溶酶原激活物抑制剂 1、组织因子和瘦素参与了致病过程有关<sup>[10, 11-13]</sup>。Samad 等<sup>[5]</sup>发现脂肪细胞 TF mRNA 表达明显增加, 从而使与肥胖有关的心血管血栓性并发症更易发生。Loskutoff 等<sup>[6]</sup>亦证实肥胖鼠脂肪细胞 TF 基因表达异常, 从而导致其止血异常, 据此推断, 肥胖/NIDDM 患者也可能存在脂肪细胞 TF 基因表达异常。上述研究表明脂肪细胞分泌 TF 在血栓性并发症的发生中有重要作用。本研究观察发现动脉粥样硬化兔脂肪细胞 TF mRNA 表达较正常组明显增加, 进一步支持脂肪细胞 TF 基因表达异常可能参与了动脉粥样硬化及血栓的发生。

最近研究报道非诺贝特可减少 TF 表达, 阻止斑块破裂处血栓形成, 从而降低冠状动脉事件发生率和致死率。Neve 等<sup>[14]</sup>研究发现非诺贝特可使培养的人单核 TF 细胞和巨噬细胞 mRNA 表达下调, 从而抑制动脉粥样硬化斑块血栓形成。研究发现贝特类药物均可抑制人单核细胞和巨噬细胞 TF 表达及活性,

调节凝血/纤溶系统。上述研究同时也表明贝特类药物调节 TF mRNA 表达是通过激活 PPAR $\alpha$  实现的。本研究使用非诺贝特治疗动脉粥样硬化兔 4 周, 发现其脂肪细胞 TF mRNA 表达较未治疗者(动脉粥样硬化组)明显降低, 表明非诺贝特能降低动脉粥样硬化兔脂肪细胞 TF mRNA 表达。这些研究结果支持非诺贝特可能有抗血栓作用。

本研究表明, 动脉粥样硬化兔脂肪细胞 TF mRNA 表达明显高于正常组, 提示脂肪细胞分泌 TF 在动脉粥样硬化血栓形成中起一定作用; 非诺贝特除降脂之外, 还能抑制动脉粥样硬化兔脂肪细胞 TF mRNA 表达。

#### [参考文献]

- [1] 付国香, 涂玉林. 脂毒性与肥胖型 2 型糖尿病. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (4): 362-365
- [2] 金惠铭, 陈愉. 肥胖和胰岛素抵抗与肿瘤坏死因子和瘦素的关系. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (03): 268-271
- [3] 肖军, 廖振德. 胰岛素抵抗在脑梗死发病中的作用. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (2): 161-164
- [4] Matsuda T, Morishita E, Jokaji H, Asakura H, Saito M, Yoshida T, et al. Mechanism on disorders of coagulation and fibrinolysis in diabetes. *Diabetes*, 1996, 45 (Suppl 1): S109-S110
- [5] Samad F, Pandey M, Loskutoff DJ. Tissue factor gene expression in the adipose tissues of obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (13): 7591-596
- [6] Loskutoff DJ, Fujisawa K, Samad F. The fat mouse. A powerful genetic model to study hemostatic gene expression in obesity/NIDDM. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 902 (2): 272-281
- [7] Aikawa M, Voglic SJ, Sugiyama S, Rabkin E, Taubman MB, Fallon JT, et al. Dietary lipid lowering reduces tissue factor expression in rabbit atheroma. *Circulation*, 1999, 100 (17): 1215-222
- [8] Saitoh K, Mori T, Kasai H. Anti-atheromatous effects of fenofibrate, a hypolipidemic drug. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 1995, 106: 41-50
- [9] Winegar DA, Brown PJ, Wilkison WO. Effect of fenofibrate on lipid parameters in obese rhesus monkeys. *J Lipid Res*, 2001, 42: 1543-551
- [10] Fujii S, Goto D, Zaman T, Ishimori N, Watano K, Kaneko T, et al. Diminished fibrinolysis and thrombosis: clinical implications for accelerated atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 1998, 5 (2): 76-81
- [11] Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory. *Proc Nutr Soc*, 2001, 60 (3): 329-339
- [12] Richelsen B, Bruun J, Pedersen SB. Fatty tissue as a secretory organ. Significance for obesity-related diseases. *Ugeskr Laeger*, 2001, 163 (21): 2913-917
- [13] Hotta K, Matsuzawa Y. Molecular mechanism in the development of the complications associated with obesity-the physiological and pathological role of adipocytokines. *Nippon Rinsho*, 2001, 59 (3): 481-486
- [14] Neve BP, Corseaux D, Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Duriez P, et al. PPAR $\alpha$  agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation*, 2001, 103 (2): 207-212
- [15] Elisaf M. Effects of fibrates on serum metabolic parameters. *Curr Med Res Opin*, 2002, 18 (5): 269-276
- [16] Schonfeld G. The effects of fibrates on lipoprotein and hemostatic coronary risk factors. *Atherosclerosis*, 1994, 111 (2): 161-174

(此文编辑 朱雯霞)