

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0639-04

• 实验研究 •

非诺贝特对兔脂肪细胞摄取及降解氧化型低密度脂蛋白及 CD36 表达的影响

赵水平, 吴洁, 聂赛, 周宏年, 李洁棋, 叶慧俊

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 病理学与病理生理学; 脂肪细胞; 细胞培养; CD36; 过氧化体增殖物激活型受体 γ ; 氧化型低密度脂蛋白; 非诺贝特

[摘要] 为了解非诺贝特对高胆固醇血症兔脂肪细胞摄取及降解氧化型低密度脂蛋白的影响并探讨其可能机制, 将 10 只新西兰大白兔给予高胆固醇饲料饲养 8 周后, 随机分为高胆固醇组和非诺贝特治疗组, 非诺贝特组在饲以高胆固醇饲料的基础上给予非诺贝特 (每天 30 mg/kg), 共 4 周。另设普通饮食对照组 5 只。实验结束后, 取皮下脂肪组织行脂肪细胞培养, 放射配基法测定脂肪细胞对氧化型低密度脂蛋白的摄取及降解, 半定量逆转录-聚合酶链反应测定脂肪细胞 CD36 及过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达。结果发现, 3 组兔脂肪细胞摄取及降解 125 I-氧化型低密度脂蛋白均呈现一浓度依赖性饱和型曲线, 高胆固醇组脂肪细胞摄取及降解 125 I-氧化型低密度脂蛋白明显低于对照组; 非诺贝特组脂肪细胞摄取及降解 125 I-氧化型低密度脂蛋白高于高胆固醇组, 但仍低于对照组, 3 组间比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。逆转录聚合酶链反应发现, 高胆固醇组过氧化体增殖物激活型受体 γ 及 CD36 mRNA 表达降低, 非诺贝特组 CD36 mRNA 表达与对照组相似。以上提示, 非诺贝特能改善高胆固醇血症兔脂肪细胞摄取及降解 125 I-氧化型低密度脂蛋白, 并上调 CD36 mRNA 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effects of Fenofibrate on Endocytic Uptake and Degrade of Oxidized Low Density Lipoprotein in Adipocytes and the Expression of CD36

ZHAO Shui-Ping, WU Jie, NIE Sai, ZHOU Hong-Nian, LI Jie-Qi, and YE Hui-Jun

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Adipocytes; CD36; Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma; Oxidized Low Density Lipoprotein; Fenofibrate; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of fenofibrate on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) uptake in adipocytes from hypercholesterolemia rabbits and the expression of CD36. **Methods** 10 male New Zealand white rabbits were fed with 1% cholesterol, 7.5% protein, 8% lard diet for 8 weeks, and were randomly divided into two groups: high cholesterol group: maintained cholesterol diet for 4 weeks; ④ treatment group: the same cholesterol diet supplemented with fenofibrate (30 mg/kg/day) for 4 weeks. And control group was fed with normal diet for 12 weeks. Subcutaneous adipose tissues were collected for adipocytes culture. CD36 and PPAR γ mRNA expression were evaluated by RT-PCR. **Results** The specific cell association and degradation of 125 I-ox-LDL in adipocytes from the three groups exhibited a dose-dependent saturation pattern. The endocytic uptake and degradation of 125 I-ox-LDL in adipocytes from high-cholesterol groups were inhibited; fenofibrate treatment enhanced the 125 I-ox-LDL uptake and degradation in adipocytes from hypercholesterolemia rabbits. There were obviously difference among the three groups ($P < 0.05$). The expression of PPAR γ and CD36 mRNA in adipocytes were down-regulated in high cholesterol group and the CD36 mRNA expression in adipocytes of treatment group was similar to the control group. **Conclusion** Fenofibrate treatment improved the ox-LDL uptake and degradation in adipocytes from hypercholesterolemia rabbits and up-regulated CD36 mRNA expression in adipocytes.

近年研究发现, 脂肪细胞也像单核/巨噬细胞一样, 通过其细胞表面的清道夫受体 CD36 介导, 吞噬及降解氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density li-

poprotein, ox-LDL), 参与体内 ox-LDL 的代谢^[1,2]。CD36 受体的转录调控受过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 影响。病理状态时脂肪细胞 PPAR γ 和 CD36 表达及其摄取及降解 ox-LDL 有何改变尚不清楚。贝特类调脂药对脂肪细胞摄取 ox-LDL 有否影响亦不清楚。因此我们复制了兔的高脂血症模型, 观察病理状态及非诺贝特干预对兔脂肪细胞吞噬及降解

[收稿日期] 2004-02-09 [修回日期] 2004-10-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39970296)

[作者简介] 赵水平, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血脂代谢异常与动脉粥样硬化, 联系电话为 0731-4895989, E-mail 为 ZhaoSP@medmail.com.cn。吴洁, 博士, 副教授, 研究方向为冠心病的防治研究, E-mail 为 wujie702@yahoo.com.cn。聂赛, 大专, 技术员, 研究方向为血脂代谢。

ox-LDL 的影响,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

新西兰纯种雄性大白兔(中南大学湘雅医学院附属第二医院实验动物中心),胆固醇(天津化学试剂公司),蛋黄粉(大连生物化学制品有限公司),微粒化非诺贝特(法国利博福尼制药公司),DMEM/Ham's F₁₂培养基、胎牛血清(GIBCO-BRL)、Ⅲ型胶原酶、牛血清白蛋白、Hank's 液(Sigma),Na¹²⁵iv(Amersham Life Science),TRIzol RNA 抽提试剂(GIBCO-BRL)、各种半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂(Promega)。

1.2 动物饲养与分组

15 只新西兰大白兔(体重 2.01~2.50 kg)观察 7 天后,随机取 10 只饲以高脂饲料(1%胆固醇、7.5%蛋黄粉和 8%猪油),喂养 8 周后再随机分为两组:高胆固醇组(5 只)继续饲以高脂饲料 4 周;非诺贝特治疗组(5 只)在继续高脂饲料喂养的基础上予非诺贝特(每天 30 mg/kg)治疗 4 周;对照组 5 只兔饲以普通饲料喂养 12 周。每兔每日总食量约为 120 g,单笼饲养,饮水不限。

1.3 血脂及体重测定

饲养前及饲养至第 8 周和第 12 周末,称取动物体重(body weight, BW),并经兔耳中央动脉取空腹血 2 mL,静置 30 min 后离心取血清,在日立 7600-020 全自动生物化学仪上测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和甘油三酯(triglyceride, TG)的浓度。

1.4 脂肪细胞的原代培养

参照 Rodbell^[3]方法无菌条件下取兔皮下脂肪组织约 10 g, Hank's 液清洗后将组织剪碎(1~2 mm³大小),置于 0.2% Ⅲ型胶原酶(含 5% 牛血清白蛋白)中消化 2 h(37℃,震荡水浴),继之过滤、离心、弃去悬浮的脂肪细胞,沉淀的基质细胞加入红细胞裂解液再次离心,沉淀的基质细胞即前脂肪细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM/Ham's F₁₂培养基调细胞密度至 2×10^9 个/L,定量接种于 6 孔培养板中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中,每 2 天更换上述培养基一次,直至细胞单层汇合(约 5 天左右)后,再用地塞米松(0.25 μmol/L)、胰岛素(10 mg/L)和 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(0.5 mmol/L)诱导细胞分化 48 h,此后换含 10% 胎牛血清和胰岛素(10 mg/L)的 DMEM/Ham's

F₁₂培养基继续培养,7 天后,细胞形态变为圆形,胞浆充满脂滴,油红 O 染色^[4]鉴定为脂肪细胞。

1.5 低密度脂蛋白的¹²⁵iv标记及氧化修饰

正常人血浆低密度脂蛋白采用超速离心法分离,经聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴定其纯度,测定并调蛋白浓度至 2 g/L。用文献[5]方法对 LDL 进行¹²⁵iv标记,比放射活性为 400~500 cpm/ng LDL 蛋白。¹²⁵iv-LDL 与含 10 μmol/L 硫酸铜的 PBS 溶液在 37℃孵育 20 h,进行氧化修饰。随后置于含 200 μmol/L EDTA 的 PBS 中,4℃透析 24 h,终止氧化。

1.6 放射配基实验

细胞摄取及降解氧化型 LDL 分析即脂肪细胞与给定浓度的¹²⁵iv-ox-LDL(5~75 mg/L)在 37℃孵育 5 h,三氯醋酸沉淀法^[6]测定细胞降解¹²⁵iv-ox-LDL 的量。细胞摄取¹²⁵iv-ox-LDL 分析方法参照文献[7]。

1.7 细胞总 RNA 抽提及逆转录-聚合酶链反应

抽提兔前脂肪细胞及脂肪细胞总的 RNA,逆转录成 cDNA。CD36 引物上游:5'-AAC CTT CCC TGT CTG TTG GA-3';下游:5'-TGG CCA ATA GGA GAG ATT CC-3', 353 bp。Cyclophilin 引物上游:5'-ATG GTC AAC CCC ACC GTG TTC TTC G-3';下游:5'-CGT GTG AAG TCA CCA CCC TGA CAC A-3', 206 bp。磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物上游:5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC -3',下游:5'-CCA GTG AGT TTC CCG TTC -3', 346 bp。PPAR γ 引物上游:5'-TGG GGA TGT CTC ATA ATG CCA-3',下游:5'-TTC CTG TCA AGA TCG CCC TCG-3', 189 bp。扩增条件:94℃预变性 4 min,94℃60 s $\rightarrow$ 55℃60 s $\rightarrow$ 72℃80 s,共 38 个循环,72℃延伸 10 min。取 PCR 产物 8 μL 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯显影照相并经光密度仪扫描分析,以内对照光密度值进行标准校正,计算 CD36 和 PPAR γ 产物的相对量。

1.8 统计学方法

应用 SPSS10.0 统计软件包进行统计分析,所有指标用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较用方差, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血脂和体重的变化

三组新西兰大白兔 0 周时血浆 TC、LDLC 和 TG 浓度及体重差异无显著性($P > 0.05$);高胆固醇饮食 8 周后,高胆固醇组和治疗组 TC、LDLC 浓度均显著高于对照组($P < 0.001$)。而 TG 仅轻度升高,差异无显著性($P > 0.05$)。饲养 8 周时 3 组兔体重均

较实验前有所增加,但组间无统计学差异。非诺贝特治疗 4 周后对血 TC、LDLC 和 TG 的降低作用不明显,但能减轻体重(- 13. 5%, 与第 8 周时比较, $P < 0. 05$) (表 1, Table 1)。

表 1. 三组兔第 0 周、8 周和 12 周时血脂及体重的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 1. Blood lipid and body weight parameters of all experiment rabbits

分 组		TC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	BW (g)
对照组	0 周	1. 07 $\pm$ 0. 43	0. 38 $\pm$ 0. 24	0. 99 $\pm$ 0. 64	2292 $\pm$ 21
	8 周	1. 08 $\pm$ 0. 31	0. 34 $\pm$ 0. 25	0. 96 $\pm$ 0. 48	2590 $\pm$ 22
	12 周	1. 36 $\pm$ 0. 60	0. 54 $\pm$ 0. 35	1. 10 $\pm$ 0. 34	2 625 $\pm$ 20
高胆固醇组	0 周	1. 23 $\pm$ 0. 40	0. 48 $\pm$ 0. 18	0. 83 $\pm$ 0. 30	2322 $\pm$ 18
	8 周	24. 39 $\pm$ 0. 25 ^a	15. 8 $\pm$ 0. 29 ^a	2. 71 $\pm$ 0. 45	2780 $\pm$ 42
	12 周	25. 72 $\pm$ 1. 78 ^a	14. 56 $\pm$ 0. 28 ^a	3. 08 $\pm$ 0. 29	2878 $\pm$ 26
治疗组	0 周	1. 01 $\pm$ 0. 43	0. 44 $\pm$ 0. 27	0. 85 $\pm$ 0. 30	2332 $\pm$ 15
	8 周	24. 43 $\pm$ 0. 19 ^a	14. 82 $\pm$ 0. 56 ^a	2. 33 $\pm$ 0. 37	2692 $\pm$ 13
	12 周	24. 70 $\pm$ 1. 79 ^a	12. 92 $\pm$ 0. 12 ^a	1. 84 $\pm$ 0. 14	2343 $\pm$ 13 ^a

a: $P < 0. 001$, 与对照组比较。

2. 2 兔脂肪细胞对¹²⁵ iν-氧化型低密度脂蛋白的摄取及降解

3 组兔脂肪细胞摄取及降解¹²⁵ iν-ox-LDL 均呈现一浓度依赖性饱和型曲线,高胆固醇组脂肪细胞摄

取及降解¹²⁵ iν-ox-LDL 明显低于对照组;非诺贝特组脂肪细胞摄取及降解¹²⁵ iν-ox-LDL 高于高胆固醇组,但仍低于对照组,3 组间比较差异有显著性($P < 0. 05$) (表 2, Table 2)。

表 2. 三组兔脂肪细胞对¹²⁵ iν-氧化型低密度脂蛋白的摄取和降解($\bar{x} \pm s$, mg/g 细胞蛋白)

Table 2. Association and degradation of ¹²⁵Iν ox-LDL by adipocytes of the three group rabbits

分 组	ox-LDL (5 mg/L)		ox-LDL (25 mg/L)		ox-LDL (50 mg/L)		ox-LDL (75 mg/L)	
	摄取	降解	摄取	降解	摄取	降解	摄取	降解
对照组	0. 54 $\pm$ 0. 11 ^a	0. 37 $\pm$ 0. 09 ^a	1. 82 $\pm$ 0. 13 ^b	1. 0 $\pm$ 0. 08 ^b	2. 81 $\pm$ 0. 20 ^b	1. 8 $\pm$ 0. 12 ^b	3. 52 $\pm$ 0. 28 ^b	2. 15 $\pm$ 0. 18 ^b
高胆固醇组	0. 38 $\pm$ 0. 09	0. 19 $\pm$ 0. 03	0. 90 $\pm$ 0. 08	0. 54 $\pm$ 0. 12	1. 81 $\pm$ 0. 16	1. 0 $\pm$ 0. 09	2. 10 $\pm$ 0. 19	1. 18 $\pm$ 0. 11
治疗组	0. 49 $\pm$ 0. 08 ^a	0. 22 $\pm$ 0. 03 ^a	1. 21 $\pm$ 0. 10 ^a	0. 73 $\pm$ 0. 06 ^a	2. 3 $\pm$ 0. 11 ^a	1. 51 $\pm$ 0. 10 ^a	2. 70 $\pm$ 0. 15 ^a	1. 70 $\pm$ 0. 15 ^a

a: $P < 0. 05$, b: $P < 0. 01$, 与高胆固醇组比较。

2. 3 过氧化体增殖物激活型受体 γ 及 CD36 mRNA 的表达

高胆固醇组前脂肪细胞 PPARγ mRNA 表达较对照组减低(0. 479 $\pm$ 0. 05 比 0. 711 $\pm$ 0. 06, $P < 0. 05$)。三组兔脂肪细胞 CD36 mRNA 均有表达,高胆固醇组的表达低于对照组(1. 18 $\pm$ 0. 06 比 1. 56 $\pm$ 0. 08, $P < 0. 05$),治疗组 CD36 mRNA 表达与对照组相似(1. 53 $\pm$ 0. 06 比 1. 56 $\pm$ 0. 08, $P > 0. 05$) (图 1, Figure 1)。

3 讨论

CD36 受体的转录调控具有组织特异性,在脂肪细胞主要受 PPARγ 影响。PPARγ 属 ①型核受体超家族成员,在脂肪细胞分化全过程特别在脂肪细胞分化早期起十分重要的作用并促进细胞内脂质集

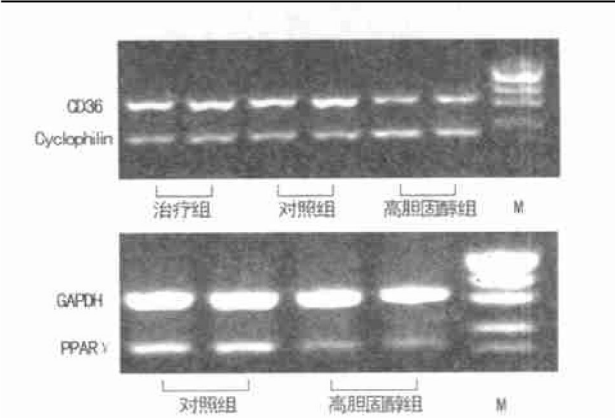


图 1. 前脂肪细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 脂肪细胞和 CD36 mRNA 的表达

Figure 1. The expression of PPARγ in preadipocytes CD36 mRNA in adipocytes

聚^[8,9]。对鼠的 3T3-L1 细胞及我们的前期研究发现 CD36 受体 mRNA 在脂肪细胞分化过程中被诱导表达, CD36 蛋白在脂肪细胞分化的第五天开始表达, 并增加至第八天, 此后表达量有所降低^[1]。提示 CD36 受体表达具有时序性。

动物实验发现给成年大鼠喂饲高胆固醇饮食能使大鼠体重及皮下脂肪量增加^[10]。高胆固醇血症常伴血浆游离脂肪酸及氧化型低密度脂蛋白水平增高^[11], 游离脂肪酸和氧化型低密度脂蛋白中的特异成分能结合并激活 PPAR γ , 活化的 PPAR γ 能诱导大量成脂基因的表达, 促进细胞内脂质集聚^[12] 及肥胖发生。我们的体外研究却发现, 高胆固醇组前脂肪细胞 PPAR γ mRNA 表达低于对照组, 其原因可能为高胆固醇血症时, 机体的一种生理性保护措施即下调前脂肪细胞 PPAR γ 的表达, 以遏止过度肥胖的发生。高胆固醇组前脂肪细胞 PPAR γ 下调从而介导脂肪细胞分化过程中 CD36 表达的下调。由此推测高胆固醇组脂肪细胞摄取及降解氧化型低密度脂蛋白的能力下降是由于 CD36 受体表达减少所致, 同时高胆固醇血症常伴脂肪细胞功能改变如胰岛素抵抗和瘦素抵抗^[13]。推测高胆固醇血症还可能影响脂肪细胞及 CD36 受体功能, 从而影响细胞摄取及降解氧化型低密度脂蛋白。

非诺贝特是 PPAR α 受体激动剂, 通过作用于肝脏的 PPAR α 上调肝细胞 CD36 受体表达并增加肝细胞线粒体脂肪酸的 β 氧化, 能防止高脂饮食诱导的鼠体重和脂肪组织量的增加^[10] 并降低动物体重, 从而改善胰岛素敏感性。我们的研究发现, 非诺贝特短期治疗能降低高胆固醇血症兔体重并上调脂肪细胞 CD36 mRNA 表达。Cabrero 等^[14] 研究也发现苯扎贝特有独立于肝脏作用外上调脂肪细胞 CD36 mRNA 表达, 以利于细胞摄取长链脂肪酸并增加脂肪细胞脂肪酸的氧化, 综合结果降低脂肪细胞的脂质库并改善胰岛素的敏感性。因此推测非诺贝特增加高脂血症兔脂肪细胞摄取及降解氧化型低密度脂蛋白, 可能与上调脂肪细胞 CD36 mRNA 表达并增加细胞内脂肪酸的氧化, 减少脂质集聚从而改善细胞功能有关。由于 PPAR α 在脂肪细胞低丰度表达, 非诺贝特上调 CD36 mRNA 是否通过 PPAR α 介导尚需进一步研究。

总之, 我们的研究揭示了脂肪组织作为一活跃的内分泌器官参与了体内氧化型低密度脂蛋白的代

谢, 体外培养的高脂血症兔脂肪细胞代谢氧化型低密度脂蛋白能力降低可能与 CD36 受体表达减少有关。非诺贝特治疗能增加高脂血症兔脂肪细胞摄取及降解氧化型低密度脂蛋白, 其机制之一可能与上调 CD36 mRNA 表达有关。这些发现拓宽了我们对脂肪细胞功能及非诺贝特非降脂作用的认识, 有利于更好的防治动脉粥样硬化。由于氧化型低密度脂蛋白通过 CD36 还能介导细胞内的信号传递, 脂肪细胞吞噬氧化型低密度脂蛋白后对其内分泌功能有何影响, 这些影响与动脉粥样硬化关系如何均需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Kuniyasu A, Hayashi S, Nakayama H. Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36. *Biochem-Biophys Res Commun*, 2002, **295** (2): 319-323
- [2] 杨向东, 李红霞, 王抒, 黎健, 李全忠, 杨和平, 等. CD36 介导氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞泡沫化和凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (4): 315-318
- [3] Rodbell M. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem*, 1964, **239**: 375-380
- [4] Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC. Ceiling culture of mature human adipocytes: use in studies of adipocyte functions. *J Endocrinol*, 2000, **164** (2): 119-128
- [5] Salacinski PR, Mclean C, Sykes JE, Clement-Jones VV, Lowry PJ. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid phase oxidizing agent, 3, 4, 6-tetrachloro-3 alpha, 6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen). *Anal Biochem*, 1981, **117** (1): 136-146
- [6] Van Berkel TJ, De Rijke YB, Kruijff JK. Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. *J Biol Chem*, 1991, **266** (4): 2 282-289
- [7] Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Miyazaki A, Hakamata H, et al. CD36, a member of the class B scavenger receptor family as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 2001, **276** (5): 3 195-202
- [8] Saladin R, Fajas L, Dana S, Halvorsen YD, Auwerx J, Briggs M. Differential regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR gamma 1) and PPAR gamma 2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis. *Cell Growth Differ*, 1999, **10** (1): 43-48
- [9] 叶平. 过氧化体增殖物激活型受体与脂质代谢. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 369-372
- [10] Mancini FP, Lanni A, Sabatino L, Moreno L, Giannino A, Contaldo F, et al. Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. *FEBS Lett*, 2001, **491** (1-2): 154-158
- [11] Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (5): 844-848
- [12] Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell*, 1998, **93** (2): 229-240
- [13] Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet*, 1998, **351** (9104): 737-742
- [14] Cabrero A, Alegret M, Sanchez RM, Adzet T, Laguna JC, Vázquez M. Bezafibrate reduces mRNA levels of adipocyte markers and increases fatty acid oxidation in primary culture of adipocytes. *Diabetes*, 2001, **50** (8): 1 883-890

(此文编辑 朱雯霞)