

阿托伐他汀对高胆固醇血症兔脂肪细胞分泌 C 反应蛋白的影响及其机制

张大庆¹, 赵水平², 孙志军¹, 孙英贤¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院心内科, 辽宁省沈阳市 110001; 2. 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理学与病理生理学; 他汀类; 高胆固醇血症; 脂肪细胞; C 反应蛋白; 过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ ; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨阿托伐他汀对高胆固醇血症兔脂肪细胞分泌 C 反应蛋白的影响及其机制。方法 采用高胆固醇饮食法建立高胆固醇血症兔模型后, 随机给予阿托伐他汀或淀粉 1.5 mg/(kg·d)。2 周后取皮下脂肪组织进行脂肪细胞培养。采用乳胶颗粒增强免疫透射比浊法检测血清和脂肪细胞培养上清液中 C 反应蛋白的水平。并采用半定量逆转录聚合酶链反应检测脂肪细胞过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达。结果 阿托伐他汀显著降低高胆固醇血症兔血清 C 反应蛋白水平。血清 C 反应蛋白水平与血低密度脂蛋白胆固醇水平 ($r = 0.890$, $P < 0.001$) 和脂肪细胞上清液中 C 反应蛋白水平相关 ($r = 0.688$, $P = 0.007$)。脂肪细胞培养上清液中 C 反应蛋白水平与其过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达负相关 ($r = -0.857$, $P < 0.001$), 与血低密度脂蛋白胆固醇水平呈正相关 ($r = 0.869$, $P < 0.001$)。结论 高胆固醇血症可诱发脂肪细胞炎症反应、分泌 C 反应蛋白。阿托伐他汀可降低血清 C 反应蛋白和脂肪细胞分泌 C 反应蛋白水平, 该效应与其降低胆固醇和上调脂肪细胞过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ 表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Influence and Potential Mechanism of Atorvastatin on C-Reactive Protein Secretions in Hypercholesterolemic Rabbit's Adipocytes

ZHANG Da-Qing¹, ZHAO Shui-Ping², SUN Zhi-Jun¹, and SUN Ying-Xian¹

(1. Department of Cardiology, Shengjing Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Cardiology, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Hypercholesterolemia; Adipocytes; C-Reactive Protein; Peroxisome proliferator activated receptor γ ; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect and potential mechanism of atorvastatin on C-reactive protein (CRP) secretions in adipocytes from hypercholesterolemic rabbits. **Methods** Fourteen male New Zealand rabbits (3 months old) were randomly fed with normal diet ($n = 4$), high cholesterol diet ($n = 10$) for 8 weeks, and then high cholesterol diet rabbits were assigned to either atorvastatin 1.5 mg/kg·d ($n = 5$) or starch ($n = 5$). Two weeks later, subcutaneous adipose was collected for culture. CRP concentrations in serum and adipocytes culture supernatant were measured by latex particle enhanced immunoturbidometric method. With semi-quantity reverse transcription polymerase chain reaction, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ mRNA expression was determined. **Results** Serum CRP levels were obviously reduced by two weeks atorvastatin treatment in hypercholesterolemic rabbits. Serum CRP concentrations were correlated with low density lipoprotein cholesterol (LDLC) levels ($r = 0.890$, $P < 0.001$) and CRP secretions from adipocytes ($r = 0.688$, $P = 0.007$). The CRP secretions in adipocytes were intimately associated with LDLC levels ($r = 0.869$, $P < 0.001$) and PPAR γ mRNA expressions in adipocytes ($r = -0.857$, $P < 0.001$). **Conclusions** Hypercholesterolemia might induce CRP secretions in adipocytes. Atorvastatin reduces CRP serum concentrations and adipocyte secretions in hypercholesterolemic rabbits, which are possibly dependent on its cholesterol-lowering effects and upregulating PPAR γ mRNA expressions in adipocytes.

近年研究表明, 脂肪细胞不仅是能量的储存器

官, 而且具有多种内分泌功能, 并可参与炎症反应, 与动脉粥样硬化性疾病密切相关。急性期蛋白即 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 是动脉粥样硬化性疾病和心血管事件的独立预测因子。既往研究显示, 肝脏是特有的合成 CRP 的器官。最近 Calabro 等^[1]报道, 脂肪细胞可在炎症因子如白细胞介素 6 刺激下合成并分泌 CRP。阿托伐他汀在动脉粥样硬

[收稿日期] 2007-03-12 [修回日期] 2007-06-01

[作者简介] 张大庆, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为血脂、脂肪细胞与动脉粥样硬化, 联系电话为 024-83956367, E-mail 为 zhangdaqing@vip.163.com。赵水平, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, E-mail 为 zhaosp@medmail.com.cn。孙志军, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为高血压及心衰发病机制研究, E-mail 为 sunzj@cnu2h.com。

化性疾病的防治中取得了良好的疗效^[2]。众多研究提示他汀类具有多种效应,可降低冠心病和高胆固醇血症患者血清 CRP 水平^[3-5]。但关于脂肪细胞分泌 CRP 与高胆固醇血症的关系,以及他汀类对脂肪细胞分泌 CRP 的影响尚不清楚。因此,本研究利用高胆固醇饮食兔来观察胆固醇血症对脂肪细胞分泌 CRP 的影响,并探讨阿托伐他汀对血清 CRP 水平和脂肪细胞分泌 CRP 的影响及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 高胆固醇血症兔模型的建立

14 只 3 月龄的健康雄性新西兰兔购自中南大学湘雅二医院实验动物中心(湖南省实验动物管理委员会,合格证:001 号)。单笼饲养 1 周后记录体重并进行基线血脂分析,然后随机给 10 只兔喂食高胆固醇饲料(1% 胆固醇,8% 猪油,7.5% 蛋黄粉,余为粗颗粒饲料),4 只兔进食普通饲料,每只兔每天进食 120 g。第 8 周再次测血脂和体重,第 9 周开始在高胆固醇饮食组在下午 4 时随机经胃管内给予阿托伐他汀 1.5 mg/(kg·d) ($n=5$) 或淀粉 1.5 mg/(kg·d) ($n=5$)。2 周后复测血脂及体重,在深麻醉状态下(苯巴比妥钠 25 mg/kg),取腹股沟处皮下脂肪组织进行脂肪细胞培养。血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)的水平分别采用酶法在日立 7170A 型分析仪上进行测定。

1.2 兔脂肪细胞培养

采用 Agatha 等人的培养方法并作适当修改,取腹股沟处皮下脂肪组织 3~4 g,用数字序号 ①型胶原酶(2 g/L)消化后,经滤过、洗涤离心和裂解红细胞后转入一次性 25 cm² 培养瓶中。放入 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,在脂肪细胞分化加入胰岛素 10 mg/L 和地塞米松 0.05 mg/L 和 20% 的自体血清(灭活后)。采用油红 O 染色法进行脂肪细胞鉴定。

1.3 C 反应蛋白水平测定

采用乳胶颗粒增强免疫透射比浊法测定兔血清和脂肪细胞培养上清液中 CRP 的水平,灵敏度为 0.05 mg/L。测定血清 CRP 的水平采用标准品稀释液来稀释标准品;测定培养上清液中 CRP 的水平,采用细胞培养液来稀释标准品。

1.4 逆转录聚合酶链反应

采用逆转录聚合酶链式反应法来分析脂肪细胞

过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ) mRNA 的表达情况。将各组脂肪细胞用 Trizol 0.1 mL/cm²,处理制成细胞匀浆,按常规方法进行 RNA 的抽提。取 5 μ L 的总 RNA,采用逆转录试剂盒由 Promega 公司提供,将 RNA 在逆转录酶的作用下合成 cDNA。PPAR γ 、内对照 β -actin 的特异性引物序列来自 Genbank,由上海生物工程有限公司合成,其上下游引物序列分别为 5'-TGG GGA TGT CTC ATA ATG CCA-3' 和 5'-TTC CTG TCA AGA TCG CCC TCG-3', 5'-GTC ACC CAC ACT GTG CCC ATC T-3' 和 5'-ACA GAG TAC GCG CTC AGG AG-3'。PCR 反应参数为 94℃预变性 4 min 后,94℃变性 1 min \rightarrow 55℃退火 1 min \rightarrow 72℃延伸 1.5 min,34 个循环 72℃再延伸 10 min。最终 PCR 产物经 Bio-Rad Gel Doc 2000 成像系统扫描,利用 Quantity One 4.03 分析软件对琼脂糖凝胶电泳结果进行信号强度峰值测定,对电泳结果进行半定量分析。

1.5 统计方法

实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并利用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计分析,主要统计指标均进行正态性检验,正态分布数据组间比较采用方差分析。相关分析采用 Pearson 相关分析。采用双侧 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组兔的基本情况

在实验开始时,各组兔的血脂、体重差异均无显著性。给予高胆固醇饮食 8 周后,兔血浆 TC 和 LDLC 显著升高,而正常饮食组的 TC 和 LDLC 无显著性变化。阿托伐他汀干预 2 周后,TC 和 LDLC 分别下降 56.6% 和 45.6% ($P < 0.01$; 表 1),实验开始时至 8 周,各组兔体重增加($P < 0.05$),8 周至 10 周,各组鼠体重下降,但差异无显著性($P > 0.05$, 表 2)。

2.2 各组兔外周血和脂肪细胞上清液中 C 反应蛋白水平的变化

正常饮食组、淀粉组、阿托伐他汀组的血清基础 CRP 水平差异无显著性。第 8 周时正常饮食组血浆 CRP 水平较前无显著性变化,而高胆固醇饮食兔的血浆 CRP 水平均较试验前显著升高。阿托伐他汀干预 2 周后,高胆固醇血症兔血清 CRP 的水平下降 44.9% ($P = 0.002$),而淀粉组的血清 CRP 无显著性变化。血清 CRP 水平与血 LDLC 水平显著相关($r = 0.890$, $P < 0.001$)。

表 1. 各组兔血脂和体重情况 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	TC (mmol/L)			TG (mmol/L)			LDLC (mmol/L)		
		0 周	8 周	10 周	0 周	8 周	10 周	0 周	8 周	10 周
正常组	4	1.46 ± 0.35	1.10 ± 0.26 ^a	1.00 ± 0.32	0.75 ± 0.18	0.75 ± 0.17	0.78 ± 0.32	0.58 ± 0.23	0.38 ± 0.19 ^a	0.38 ± 0.19
淀粉组	5	1.71 ± 0.28	18.33 ± 3.26	20.3 ± 1.30 ^b	1.18 ± 0.21	0.69 ± 0.12	1.82 ± 0.51	0.79 ± 0.14	8.01 ± 1.14	8.42 ± 0.47 ^b
阿托伐他汀组	5	1.39 ± 0.22	18.57 ± 1.69	8.06 ± 0.71	1.07 ± 0.13	0.69 ± 0.23	0.97 ± 0.24	0.59 ± 0.11	8.17 ± 0.72	4.44 ± 0.38

a 为 $P < 0.01$, 与高胆固醇饮食兔(淀粉组和阿托伐他汀)相比较; b 为 $P < 0.01$, 与三组相比较。

表 2. 不同实验时间各组兔体重变化情况 ($\bar{x} \pm s$; g)

分 组	n	0 周	8 周	10 周
正常组	4	2 472 ± 207	3 220 ± 54	3 220 ± 64
淀粉组	5	2 377 ± 223 ^a	3 239 ± 159 ^a	3 250 ± 90 ^a
阿托伐他汀组	5	2 391 ± 114	3 165 ± 108	3 100 ± 46

a 为 $P < 0.05$, 与正常组体重比较。

表 3. 阿托伐他汀对兔血清和脂肪细胞分泌 C 反应蛋白水平的影响

分 组	n	血清 CRP 水平 (mg/L)			脂肪细胞 CRP (mg/L)
		基础	高胆固醇饮食 8 周	干预 2 周	
正常组	4	1.00 ± 0.31	1.32 ± 0.64 ^a	1.41 ± 0.50 ^b	7.56 ± 1.33 ^b
淀粉组	5	0.93 ± 0.33	7.01 ± 1.64	6.30 ± 2.22	44.53 ± 6.08
阿托伐他汀组	5	0.87 ± 0.40	6.58 ± 1.63	3.47 ± 0.86	27.36 ± 6.46

a 为 $P < 0.01$, 与高胆固醇饮食兔(包括淀粉和阿托伐他汀组)比较; b 为 $P < 0.01$, 3 组间比较。

2.3 过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 在各组兔脂肪细胞的表达情况

过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ)、 β -actin 的 RT-PCR 反应产物分别是 189 bp 和 542 bp, 以 β -actin 作为内参照, 以 OD 比值来表示 PPAR γ mRNA 在脂肪细胞的表达(图 1)。结果发现正常饮食兔的脂肪细胞 PPAR γ mRNA 的表达量最高, 淀粉组的表达量最低(0.70 ± 0.08 比 1.18 ± 0.06, $P < 0.05$)。与淀粉组比较, 阿托伐他汀干预组的脂肪细胞 PPAR γ mRNA 表达量显著增加 31.4% (1.02 ± 0.07 比 0.70 ± 0.08, $P < 0.05$)。脂肪细胞 PPAR γ mRNA 的表达与其培养上清液中 CRP 水平呈显著负相关($r = -0.857$, $P < 0.001$)。

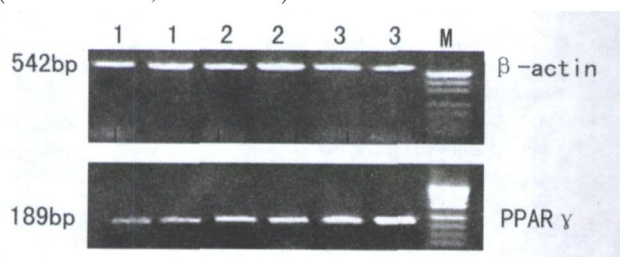


图 1. 阿托伐他汀对兔脂肪细胞 PPAR γ 和 β -actin mRNA 表达的影响 M 为 PCR 的标志物, 1、2、3 分别为高胆固醇饮食淀粉组、高胆固醇饮食阿托伐他汀组及正常饮食组脂肪细胞 mRNA。并以 β -actin 作为内对照。

在实验结束时 10 周, 正常饮食组、淀粉组、阿托伐他汀组的脂肪细胞上清液 CRP 水平分别为: 7.56 ± 1.33、44.53 ± 6.08、27.36 ± 6.46 mg/L, 3 组之间差异具有显著性($P < 0.01$)。脂肪细胞分泌 CRP 水平与血清 CRP 水平($r = 0.688$, $P = 0.007$)和血浆 LDL-C 水平显著相关($r = 0.869$, $P < 0.001$, 表 3)。

3 讨论

血脂异常和炎症反应相互作用在动脉粥样硬化发病过程中起到关键作用^[6,7]。本研究采用单纯高胆固醇饮食, 在无感染和创伤等应激的情况下, 直接观察到循环中 CRP 水平与血浆总胆固醇水平密切相关。然而, 在代谢综合征人群中进行的研究显示, 循环中 CRP 水平与血浆 TG、游离脂肪酸水平呈正相关, 与高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平呈负相关, 但与血浆胆固醇水平无关^[8-10]。研究结果的差异可能是由于研究个体不同以及研究个体的血浆胆固醇水平差异显著所致。本研究进一步支持高胆固醇血症可诱发机体的炎症反应、升高血清 CRP 水平, 这与 Sun 等^[11]研究结果一致。另外, 本研究显示血清 CRP 水平与脂肪细胞分泌 CRP 水平有关, 支持脂肪细胞是血清 CRP 的来源之一, 特别是在高胆固醇血症的情况下。

本研究证明, 高胆固醇血症兔脂肪细胞分泌 CRP 的水平明显较正常饮食组升高, 而且与 PPAR γ 表达呈显著负相关。有研究表明脂肪细胞可以吞噬 LDL, 脂肪细胞是体内胆固醇的存储池, 而且脂肪细胞内胆固醇的含量与循环中胆固醇水平密切相关。在 3T3L1 脂肪细胞系研究发现, 细胞内胆固醇的聚

集可显著降低 PPAR γ 的表达。PPAR γ 是重要的核转录调控因子,具有多种特性。PPAR γ 可在多种细胞表达,但以脂肪细胞为主。已有研究显示 PPAR γ 在单核细胞、血管平滑肌细胞具有抗炎作用,抑制细胞因子、金属蛋白酶和急性期反应物的生成。既往研究显示,PPAR γ 抑制脂肪细胞分泌白细胞介素 6,提示 PPAR γ 可能具有调控脂肪细胞炎症反应的作用^[12]。在本研究中,高胆固醇血症可能导致细胞内胆固醇的过度聚集、抑制 PPAR γ 的表达来增加脂肪细胞分泌 CRP。

他汀类在冠心病的一级、二级预防中取得良好的临床效果。他汀类药物具有抗炎作用,而且与其降低心血管疾病的死亡率密切相关^[13]。目前基础研究和临床研究显示,CRP 是重要的致动脉粥样硬化的炎症因子^[14]。人群研究显示他汀类药物可降低血清 CRP 水平^[5,7,15],但其机制尚未阐明。本研究证明 2 周的阿托伐他汀治疗显著降低高胆固醇血症兔血清 CRP 的水平,而且与其降低胆固醇有关。而 Plenge 等^[16]报道显示 2 周的辛伐他汀治疗可显著降低 CRP 水平,但与其降胆固醇作用无关。既往对高胆固醇血症兔和人的研究显示,循环中 CRP 的存在形式是选择性的与包含载脂蛋白 B 的致动脉粥样硬化的脂蛋白如 LDL 结合。可见,血 LDLC 水平升高可结合更多的 CRP,升高循环 CRP 水平。同时,有研究显示高胆固醇血症可通过增加氧化 LDL 来激发炎症反应。本研究显示在血胆固醇水平显著升高的情况下,阿托伐他汀降低血浆胆固醇水平可以减轻炎症反应、降低 CRP 的水平。

本研究进一步显示了脂肪细胞分泌 CRP 水平与血浆胆固醇水平呈正相关,与脂肪细胞 PPAR γ 表达呈负相关。如前所述,高胆固醇血症导致脂肪细胞内胆固醇过度聚集、继而抑制脂肪细胞 PPAR γ 的表达。同时,在 3T3L1 脂肪细胞系研究显示细胞内胆固醇的移出可以上调 PPAR γ 在脂肪细胞表达 9 倍,辛伐他汀可显著上调脂肪细胞 PPAR γ 的表达。本研究进一步显示阿托伐他汀显著降低高胆固醇血症兔脂肪细胞分泌 CRP,与其降低血浆胆固醇水平,减轻了脂肪细胞内胆固醇聚集对 PPAR γ 表达的抑制作用有关。另外,已有研究报道,阿托伐他汀和普伐他汀在单核细胞具有独立上调 PPAR γ 表达和调控炎症反应的作用。因此,在本研究中脂肪细胞 PPAR γ 表达的上调亦可能部分依赖其非降脂效应,

这也可能是其调节脂肪细胞分泌 CRP 的机制之一。

综上所述,本研究表明高胆固醇血症可诱发脂肪细胞炎症反应、分泌 CRP。阿托伐他汀可通过降低血浆胆固醇水平和上调脂肪细胞 PPAR γ 表达来减低血清 CRP 水平和减少脂肪细胞分泌 CRP。

[参考文献]

- [1] Calabro P, Chang DW, Willerson JT, Yeh ET. Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: Linking obesity to vascular inflammation [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **46** (6): 1112-1113.
- [2] Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT. Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education program adult treatment panel III guidelines [J]. *Circulation*, 2004, **110** (2): 227-239.
- [3] Ito MK, Talbert RL, Tsimikas S. Statin associated pleiotropy: possible beneficial effects beyond cholesterol reduction [J]. *Pharmacotherapy*, 2006, **26** (7Pt2): 85S-97S.
- [4] Marz W, Winkler K, Nauck M, Böhm BO, Winkelmann BR. Effects of statins on C-reactive protein and interleukin 6 (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study) [J]. *Am J Cardiol*, 2003, **92** (3): 305-308.
- [5] 周滔,周胜华,祁述善,沈向前,周宏年.阿托伐他汀对急性冠脉综合征患者血清髓过氧化物酶和高敏 C 反应蛋白的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (8): 721-722.
- [6] 张大庆,赵水平,周宏年,李全忠,聂赛.阿托伐他汀对高胆固醇饮食兔动脉粥样硬化病变的影响及其机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (6): 745-748.
- [7] Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime [J]. *Nat Med*, 2002, **8** (11): 211-217.
- [8] Wu DM, Chu NF, Shen MH, Wang SH. Obesity, serum high sensitivity C-reactive protein levels and insulin resistance status among school children in Taiwan [J]. *Clin Biochem*, 2006, **39** (8): 810-815.
- [9] Dvorak•Lorenzov•A, Such•nek P, Havel PJ, St•vek P, Karasov•L, Valenta Z, et al. The decrease in C-reactive protein concentration after diet and physical activity induced weight reduction is associated with changes in plasma lipids, but not interleukin 6 or adiponectin [J]. *Metab Clin and Experi*, 2006, **55** (3): 359-365.
- [10] Rasouli M, Kiasari AM. Interactions of serum hsCRP with apoB, apoB/AI ratio and some components of metabolic syndrome amplify the predictive values for coronary artery disease [J]. *Clin Biochem*, 2006, **39** (10): 971-977.
- [11] Sun HJ, T Koike, Ichikawa T, Hatakeyama K, Shiomi M, Zhang B, et al. C-reactive protein in Atherosclerotic Lesions [J]. *Am J Pathol*, 2005, **167** (4): 139-148.
- [12] Zhao SP, Zhang DQ. Atorvastatin reduces interleukin 6 plasma concentration and adipocyte secretion of hypercholesterolemic rabbits [J]. *Clin Chim Acta*, 2003, **336** (1-2): 103-108.
- [13] Jain MK, Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, **4** (12): 977-987.
- [14] Verma S, Devaraj S, Jialal I. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis [J]. *Circulation*, 2006, **113** (17): 2135-2150.
- [15] Macin SM, Perna ER, Farias EF, Franciosi V, Cialzeta JR, Bizuela M, et al. Atorvastatin has an important acute anti-inflammatory effect in patients with acute coronary syndrome: results of a randomized, double-blind, placebo controlled study [J]. *Am Heart J*, 2005, **149** (3): 451-457.
- [16] Plenge JK, Hernandez TL, Weil KM, Poirier P, Grunwald GK, Marcovina SM, et al. Simvastatin lowers C-reactive protein within 14 days: an effect independent of low-density lipoprotein cholesterol reduction [J]. *Circulation*, 2002, **106** (12): 1447-452.

(此文编辑 李玲玲)