

烟酸对高脂血症兔主动脉壁脂蛋白脂肪酶与三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的影响

范文娟, 赵水平, 阳 军

(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; 烟酸; 动脉粥样硬化; 脂蛋白脂肪酶; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1; 高脂血症兔

[摘要] 目的 观察烟酸对高脂血症兔主动脉壁脂蛋白脂肪酶和三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的影响, 探讨烟酸抗动脉粥样硬化的机制。方法 10 只新西兰大白兔给予高脂饮食 8 周后, 随机分为淀粉组与烟酸组: 淀粉组($n=5$) 饲以高脂饲料及淀粉; 烟酸组($n=5$) 在高脂饮食基础上给予烟酸[400 mg/(kg·d)]; 另 5 只兔给予普通饮食 14 周作为正常对照组。14 周末结束实验, 采用免疫组织化学染色和半定量分析法观察烟酸对主动脉壁脂蛋白脂肪酶和三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的影响。结果 烟酸组 14 周后总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯较淀粉组分别下降 43.9%、47.0% 和 44.3%, 高密度脂蛋白胆固醇明显上升(P 均 <0.001); 与淀粉组相比, 烟酸组斑块面积减小约 1.97 倍, 内膜厚度及内膜/中膜厚度比值分别减小约 2.87 倍和 3.70 倍; 烟酸可显著下调主动脉壁脂蛋白脂肪酶的表达和上调三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的表达。结论 烟酸抗动脉粥样硬化的机制可能与下调动脉壁脂蛋白脂肪酶的表达和上调三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的表达有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Niacin on Expression of Lipoprotein Lipase and Adenosine Triphosphate-Binding Cassette Transporter A1 in Aorta of Hypercholesterolemic Rabbits

FAN Wen Juan, ZHAO Shui Ping, and YANG Jun

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

[KEY WORDS] Niacin; Atherosclerosis; Lipoprotein Lipase; Adenosine Triphosphate-Binding Cassette Transporter A1; Hypercholesterolemic Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of niacin on expression of lipoprotein lipase (LPL) and adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in the aorta of hypercholesterolemic rabbits and its possible antiatherogenic mechanisms.

Methods Ten male New Zealand white rabbits were fed with 1% cholesterol, 7.5% protein, 8% lard diet for 8 weeks, and then were randomly divided into starch group maintained cholesterol diet and starch for 6 weeks, niacin group fed with the same cholesterol diet supplemented with niacin [400 mg/(kg·d)] for 6 weeks. And control group was fed with normal diet for 14 weeks. LPL and ABCA1 expression in aorta were measured by immunohistochemistry and evaluated by semiquantitative analysis.

Results After 6-week niacin treatment, the levels of total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, triglycerides were decreased by 43.9%, 47.0% and 44.3% respectively, high density lipoprotein cholesterol was markedly increased (all $P < 0.001$); compared with starch group, the surface area of atherosclerotic lesions reduced 1.97-fold, intimal thickness and intima/media thickness reduced 2.87-fold and 3.70-fold respectively in niacin group; niacin downregulated LPL and upregulated ABCA1 expression in the aorta. **Conclusion** The antiatherogenic mechanisms of niacin may be related to the downregulation of LPL and upregulation of ABCA1 in the aorta.

脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL) 是水解血清乳糜微粒和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL) 中甘油三酯(triglyceride, TG) 的关键酶, 通过酶的催化活性调节脂蛋白代谢, 发挥抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 作用^[1]; 而动脉壁的

LPL 通过促进泡沫细胞形成和氧化的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) 沉积等作用, 促进 As 形成^[2]。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1, ABCA1) 作为一种膜转运蛋白, 在胆固醇逆转运中发挥重要作用, 可促进高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL) 形成^[3]。烟酸抗 As 作用是否与动脉壁中 LPL 和 ABCA1 的表达有关尚不清楚。本实验通过建立高脂血症兔模型来观察烟酸对主动脉壁 LPL 和 ABCA1 表达的影响, 并进一步探讨烟酸抗 As 的机制。

[收稿日期] 2007-01-15 [修回日期] 2007-07-28

[作者简介] 范文娟, 硕士研究生, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, E-mail 为 fwj3105@126.com。赵水平, 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。阳军, 博士研究生, 副教授, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, E-mail 为 yangj523@163.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

15 只 3 个月龄的健康新西兰纯种雄性大白兔购自上海畜牧咨询服务有限公司, 体重 1.44~2.62 kg, 清洁级, 单笼饲养在恒温空调房中。烟酸缓释片及原粉由北京赛科有限责任公司惠赠。兔抗兔 LPL、ABCA1 多克隆抗体和即用型 SABC 试剂盒、DAB 显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 兔高脂血症模型的建立和烟酸干预

15 只兔观察 1 周后入选, 随机给 10 只兔高脂饮食, 其余 5 只预正常饮食(正常对照组)。高脂饮食具体配方^[4]如下: 1% 胆固醇、7.5% 蛋黄粉和 8% 猪油, 余为正常的淀粉颗粒饲料。每只兔每日总食量约为 120 g, 自由饮水。第 9 周始在高脂饮食基础上随机给予烟酸缓释片[400 mg/(kg·d)](烟酸组, $n=5$) 或淀粉(淀粉组, $n=5$)。14 周末在深麻醉状态下处死动物。

1.3 血脂和脂蛋白测定

0 周(饲养前)、8 周和 14 周末经兔耳中央动脉取空腹血 5 mL, 血浆置 -70℃ 冰箱保存。在日立 7600-020 全自动生化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)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和 TG 的浓度, 各指标采用盲法测定。

1.4 主动脉标本的制备及初步处理

14 周末腹腔麻醉动物后, 剖开胸腹腔, 剥离主动脉全长, 纵行剖开主动脉, 取其远端 1.5 cm 置入 4% 多聚甲醛溶液中固定后进行石蜡包埋, 并将石蜡包埋标本切片用于常规 HE 染色和免疫组织化学的测定。石蜡切片 HE 染色后在高倍镜下随机取 5 个视野, 拍照后经图像分析软件 SPOT/ver3.5 测定内膜、中膜厚度, 取平均值, 同时计算内膜与中膜厚度比值。其余主动脉洗净后进行苏丹 III 染色, 再用 80% 乙醇脱去背景色, 用双蒸水充分洗涤后, 再放入 4% 多聚甲醛溶液中固定、拍照。用图像分析软件测

定 As 斑块面积, 用占内膜总面积的百分比表示。

1.5 动脉壁脂蛋白脂肪酶和三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 蛋白的测定

用 SABC 法对石蜡切片进行免疫组织化学染色。LPL 原液按 1:200 稀释, ABCA1 原液按 1:100 稀释。阳性对照参考博士德公司提供的已知阳性切片, 阴性对照以 PBS 液代替一抗。阳性表达染色呈棕黄色或褐色, 定位于内皮表面和斑块内。参照 Mattern 等^[5]提到的方法, 从两方面进行半定量评分。(1) 染色深浅度: 未见染色为 0, 轻度染色为 1, 中度染色为 2, 深度染色为 3; (2) 染色面积的百分比: 未见染色为 0, 染色面积 < 25% 为 1, 染色面积 25%~50% 为 2, 染色面积 50%~75% 为 3, 染色面积 > 75% 为 4。将这两方面评分相乘得出染色分数进行半定量分析。每例的评分均为高倍($\times 400$)镜下观察 5 个视野求得的平均值。

1.6 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较行方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析, 组内不同阶段比较采用配对 t 检验。方差齐性者两两比较采用 LSD 法, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验。

2 结果

2.1 各组血脂比较

三组兔 0、8 及 14 周时血脂的变化见表 1。0 周时血脂各项指标差异无显著性($P > 0.05$)。8 周后淀粉组和烟酸组 TC 和 LDLC 水平显著高于对照组($P < 0.05$) 及 0 周时的水平($P < 0.01$), 而 TG 和 HDLC 虽有升高, 但差异无显著性($P > 0.05$)。至第 14 周时, 烟酸组 TC、LDLC 和 TG 较淀粉组分别下降 43.9%、47.0% 和 44.3% ($P < 0.001$), HDLC 则呈上升趋势, 且显著高于淀粉组($P < 0.001$); 淀粉组 HDLC 较 8 周时有下降趋势。14 周时淀粉组与正常对照组相比, TC、LDLC 和 TG 水平明显上升, 而 HDLC 水平下降(P 均 < 0.001)。

表 1. 烟酸对血脂和脂蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

指标	正常对照组			淀粉组			烟酸组		
	0 周	8 周	14 周	0 周	8 周	14 周	0 周	8 周	14 周
TC	3.04 ± 0.41	3.32 ± 0.41	3.16 ± 0.61	3.56 ± 0.83	23.44 ± 1.58 ^a	26.45 ± 2.15 ^b	3.49 ± 0.53	24.52 ± 2.39 ^a	14.84 ± 2.16 ^c
TG	0.74 ± 0.40	0.89 ± 0.07	0.93 ± 0.07	0.50 ± 0.21	1.76 ± 1.20	2.28 ± 0.18 ^b	1.07 ± 0.69	1.52 ± 0.37	1.27 ± 0.28 ^c
LDLC	1.24 ± 0.52	1.18 ± 0.44	1.12 ± 0.36	1.92 ± 0.75	20.58 ± 1.79 ^a	23.38 ± 2.15 ^b	1.24 ± 0.51	21.89 ± 2.41 ^a	12.38 ± 2.10 ^c
HDLC	1.35 ± 0.08	1.40 ± 0.14	1.33 ± 0.25	1.41 ± 0.21	1.58 ± 0.29	1.02 ± 0.08 ^b	1.50 ± 0.24	1.67 ± 0.20	1.74 ± 0.23 ^c

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组 8 周相比; b 为 $P < 0.001$, 与正常对照组 14 周比较; c 为 $P < 0.001$, 与淀粉组 14 周比较。

2.2 主动脉病理形态学的变化

对照组主动脉内膜光滑, 未见斑块; 而淀粉组在内膜显著增厚的基础上发生了典型的As病变, 病灶呈弥漫性, 较严重者斑块融合成片, 以主动脉近段及各分支动脉开口处为重, 内膜表面无明显破溃, 可见脂样物质突出管腔, 边缘清楚; 烟酸组主动脉内膜可见散在粥样斑块, 多集中在主动脉起始部, 但病变的程度及面积较淀粉组显著减轻。苏丹Ⅲ染色显示As病变处被染成红色(图1)。兔主动脉HE染色发现, 正常对照组血管内膜连续、光滑、内皮完整; 淀粉组血管内膜明显增厚, 内皮下见脂质沉积和泡沫细胞形成, 泡沫细胞分布于整个血管壁, 局部聚集成脂斑, 斑块内纤维成分少, 细胞成分多, 未见明显钙质沉积, 中膜平滑肌细胞增生, 排列紊乱; 烟酸组内膜病变较淀粉组明显减轻(图2)。

2.3 各组斑块面积和内膜厚度的比较

斑块面积淀粉组为 $75.8\% \pm 9.5\%$, 烟酸组为 $37.3\% \pm 2.8\%$; 内膜厚度及内膜/中膜厚度比值正常对照组为 $5.64 \pm 1.18 \mu\text{m}$ 和 $5.3\% \pm 1.3\%$, 淀粉组为 $76.43 \pm 14.28 \mu\text{m}$ 和 $54.8\% \pm 11.6\%$, 烟酸组为 $24.80 \pm 1.94 \mu\text{m}$ 和 $15.0\% \pm 1.1\%$ 。与淀粉组相比, 烟酸组斑块面积减小约 1.97 倍, 内膜厚度及内膜/中膜厚度比值分别减小约 2.87 倍和 3.7 倍 (P 均 < 0.05)。

2.4 脂蛋白脂肪酶的表达和半定量分析

正常对照组可见 LPL 主要表达于内皮表面; 淀粉组在内皮表面和As斑块内可见 LPL 明显表达, 其中表达最强的是巨噬细胞和泡沫细胞聚集的区域, LPL 不仅表达于巨噬细胞表面, 还广泛地分布于细胞外基质内; 烟酸组可见 LPL 表达明显下调, 染色变浅, 染色面积明显减小; 阴性对照未见 LPL 的表达(图3)。半定量分析结果发现, 正常对照组 LPL 染色分数为 1.70 ± 0.95 , 淀粉组为 7.60 ± 2.22 , 烟酸组为 5.90 ± 1.92 ; 烟酸治疗组与淀粉组和正常对照组比差异均有显著性 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$); 淀粉组较正常对照组染色分数明显增加 ($P < 0.01$)。

2.5 ATP 结合盒转运体 A1 的表达和半定量分析

正常对照组可见 ABCA1 主要表达于内皮表面; 淀粉组在内皮表面和斑块内可见 ABCA1 的表达, 染色面积较小, 染色较浅; 烟酸组可见 ABCA1 的表达明显上调, 斑块内见 ABCA1 的广泛表达; 阴性对照未见 ABCA1 的表达(图3)。半定量分析结果发现, 正常对照组 ABCA1 染色分数为 1.80 ± 0.86 , 淀粉组为 6.20 ± 1.65 , 烟酸组为 7.90 ± 2.31 ; 其中烟酸组与淀粉组和正常对照组比差异均有显著性 ($P < 0.05$

和 $P < 0.01$), 淀粉组比正常对照组染色分数明显增加 ($P < 0.01$)。



图1. 各组兔主动脉粥样硬化病变情况 A 为正常对照组, B 为淀粉组, C 为烟酸组。

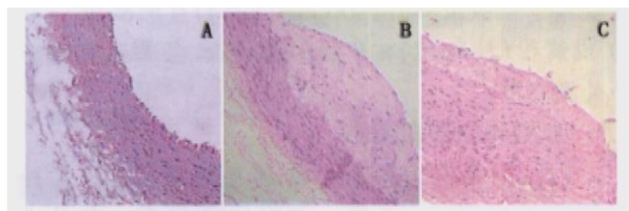


图2. 各组兔主动脉 HE 染色结果(HE × 200) A 为正常对照组, B 为淀粉组, C 为烟酸组。

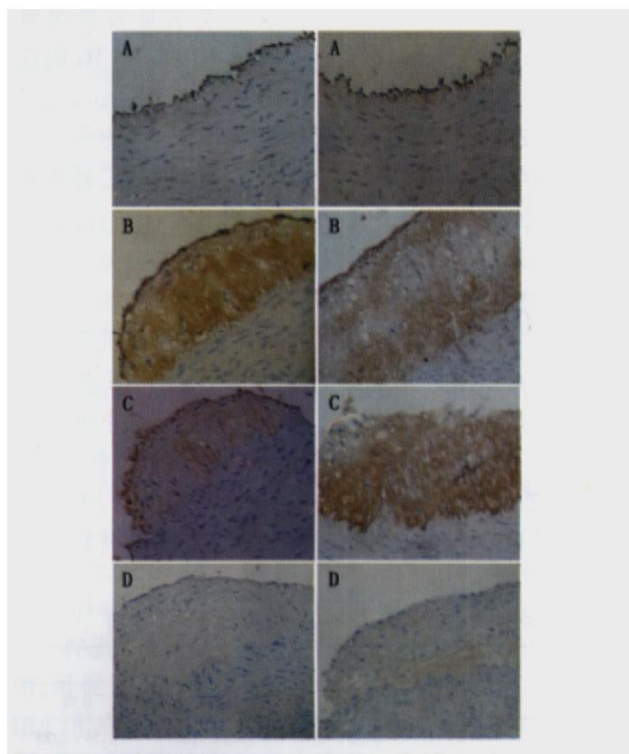


图3. 各组兔主动脉脂蛋白脂肪酶(左)和ATP结合盒转运体A1(右)表达结果(SABC法, ×200) A 为正常对照组, B 为淀粉组, C 为烟酸组, D 为阴性对照。

3 讨论

本实验利用富含胆固醇的饮食成功建立了高脂血症的兔模型,并发生了典型的 As 病变,揭示了血脂异常尤其是高胆固醇血症及低 HDLC 与 As 发生的密切关系。一些临床试验结果表明烟酸不仅能改善血脂异常,还能降低冠心病的发病率和死亡率,延缓或阻止 As 的进程^[6]。烟酸的抗 As 作用不仅与其全面的调脂作用有关,还涉及许多非调脂作用,如抗炎、抗氧化和抗栓作用等^[6]。本实验观察到,烟酸缓释剂短期治疗可显著降低血清 TC、LDLC 及 TG 水平,同时升高 HDLC 水平。进一步观察还发现烟酸治疗后主动脉内膜表面 As 的面积明显减小,内膜厚度及内膜/中膜厚度的比值也明显减小,证实烟酸确有抗 As 的作用。

目前研究表明动脉壁中由巨噬细胞、泡沫细胞及少量平滑肌细胞所分泌的 LPL 具有致 As 的作用。本实验通过免疫组织化学染色的方法观察到,正常对照组兔主动脉壁仅内皮表面有少许 LPL 的表达,可能是由于合成的 LPL 分泌至内皮表面粘附于硫酸乙酰肝素蛋白聚糖上发挥其水解酶活性所致。而高脂血症兔可见 LPL 广泛地分布于内皮表面及富含巨噬细胞的内膜层,这与 Ylä-Herttuala 等^[7]的观察是一致的。

烟酸抗 As 的作用机制尚不十分清楚,可能与核转录因子过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR) 的调节有关。有研究观察到,烟酸可通过烟酸受体激活核内 PPAR γ 的表达^[8]。而细胞培养实验观察到,PPAR γ 的激活降低了人单核/巨噬细胞 LPL 的分泌量及其酶的活性^[9]。在本实验中,采用免疫组织化学染色及半定量分析的方法,发现烟酸组 LPL 的表达明显下调。因此,我们推测烟酸可能通过激活 PPAR γ 来减少动脉壁巨噬细胞 LPL 的分泌,从而减轻动脉壁 LPL 致 As 的作用。

新近发现烟酸也可作用于环磷酸腺苷/蛋白激酶 A 途径,激活内源性 PPAR γ ,促进 ABCA1 的转录^[10]。我们的实验发现烟酸明显上调动脉壁 ABCA1 的表达,因此我们推测烟酸也可能通过激活 PPAR γ 来上调 ABCA1 的表达,促进胆固醇的逆转运,发挥抗 As 的作用。

此外,动脉壁 LPL 可水解 TG 产生游离脂肪酸。有研究发现脂肪酸可直接影响 ABCA1 蛋白的稳定

性,加快 ABCA1 蛋白降解的速率,它还可作为氧化性胆固醇的拮抗剂,与细胞核内的活化肝核因子 X 受体(liver X receptor, LXR) 反应元件结合,干扰胆固醇对 ABCA1 表达的诱导^[11]。那么烟酸还可能通过激活 PPAR γ 减少 LPL 分泌及其酶的活性,降低游离脂肪酸浓度,从而间接上调 ABCA1 的表达。

我们的实验揭示了烟酸抗 As 的作用机制之一,即下调动脉壁 LPL 的表达,同时上调 ABCA1 的表达。LPL 和 ABCA1 的表达以及两者之间的相互关系在 As 的过程中起着重要的作用,它们同时受到 PPAR、LXR 及视黄醛受体(retinoid X receptor, RXR) 等一系列核转录因子的调节^[12,13],烟酸是怎样通过这些核转录因子来影响两者的表达还需进一步研究,这将有助于明确烟酸抗 As 的机制。

[参考文献]

- [1] Tsutsumi K. Lipoprotein lipase and atherosclerosis [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2003, **1** (1): 11-17.
- [2] Ichikawa T, Liang J, Kitajima S, Koike T, Wang X, Sun H, et al. Macrophage-derived lipoprotein lipase increases aortic atherosclerosis in cholesterol-fed TG rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **179** (1): 87-95.
- [3] 许竹梅,赵水平. ATP 结合盒转运子调节细胞内胆固醇流出及对动脉粥样硬化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 449-451.
- [4] 余艳辉,瞿湘萍,李智,郭兆贵. 兔高脂蛋白血症模型建立及动脉粥样斑块形成的方法学[J]. *中国药理学通报*, 1998, **14** (5): 473-474.
- [5] Mattem J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma [J]. *British J Cancer*, 1996, **73** (7): 931-934.
- [6] Meyers CD, Kamanna VS, Kashyap ML. Niacin therapy in atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2004, **15** (6): 659-665.
- [7] Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Goldberg IJ, Steinberg D, Witztum JL. Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (22): 10 143-147.
- [8] Knowles HJ, te Poole RH, Workman P, Harris AL. Niacin induces PPAR γ expression and transcriptional activation in macrophages via HM74 and HM74a-mediated induction of prostaglandin synthesis pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, **71** (5): 646-656.
- [9] Gbaguidi FG, Chinetti G, Milosavljevic D, Teissier E, Chapman J, Olivecrona G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists decrease lipoprotein lipase secretion and glycated LDL uptake by human macrophages [J]. *FEBS Lett*, 2002, **512** (1-3): 85-90.
- [10] Rubie T, Trottmann M, Lorenz RL. Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoid cells by niacin [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, **67** (3): 411-419.
- [11] Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1 [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (7): 5 692-697.
- [12] Stein Y, Stein O. Lipoprotein lipase and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2003, **170** (1): 1-9.
- [13] Santamarina-Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, Brewer HB Jr. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter [J]. *J Lipid Res*, 2001, **42** (9): 1 339-345.

(此文编辑 许雪梅)