

急性炎症反应时血清对氧磷酶 1 活性变化及 苯扎贝特的干预作用

骆杨平^{1,2}, 赵水平¹, 聂赛¹

(1. 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011; 2. 湖南省人民医院, 湖南省长沙市 410002)

[关键词] 内科学; 急性炎症反应; 对氧磷酶 1; 苯扎贝特; 高密度脂蛋白胆固醇

[摘要] **目的** 观察急性炎症反应期小鼠血清对氧磷酶 1 活性的变化, 探讨苯扎贝特潜在的抗氧化作用机制。**方法** 8 周龄 C57BL/6 小鼠 32 只, 随机分为四组, 每组 8 只: 普通饲料饲养 8 周 (对照组)、添加 150 mg/(kg·d) 苯扎贝特饲养 8 周 (苯扎贝特组)、普通饲料饲养 8 周+ 腹腔内注入脂多糖 (脂多糖组) 和添加 150 mg/(kg·d) 苯扎贝特饲养 8 周+ 腹腔内注入脂多糖 (苯扎贝特+ 脂多糖组)。取血清, 以苯乙酸作为对氧磷酶 1 的底物, 用分光光度计测定小鼠血清对氧磷酶 1 活性。**结果** 与对照组 [32.71 ± 4.40 μmol/(min·L)] 比较, 脂多糖组血清对氧磷酶 1 活性 [3.23 ± 0.76 μmol/(min·L)] 显著降低 ($P < 0.05$), 苯扎贝特组血清对氧磷酶 1 活性 [120.97 ± 39.83 μmol/(min·L)] 显著升高 ($P < 0.01$); 苯扎贝特+ 脂多糖组血清对氧磷酶 1 活性 [41.4 ± 10.65 μmol/(min·L)] 显著高于脂多糖组 ($P < 0.01$), 但与对照组比较差异无显著性。血清对氧磷酶 1 活性与高密度脂蛋白胆固醇呈正相关 ($r = 0.538, P = 0.001$)。**结论** 急性炎症反应时血清对氧磷酶 1 活性明显降低, 苯扎贝特能有效升高血清对氧磷酶 1 活性, 逆转脂多糖诱导的对氧磷酶 1 活性降低, 提示苯扎贝特具有抗氧化作用。这种作用可能与升高高密度脂蛋白胆固醇有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Bezafibrate Treatment on Serum Paraoxonase-1 Activity in Mice During the Acute Phase Response

LUO Yang-Ping^{1,2}, ZHAO Shui-Ping¹, and NIE Sai¹

(1. Department of Cardiology, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China; 2. Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410002, China)

[KEY WORDS] Acute Phase Response; Paraoxonase-1; Bezafibrate; High Density Lipoprotein Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of bezafibrate on serum paraoxonase-1 (PON-1) activity in mice during the acute phase response and to investigate the mechanism of anti-oxidation effect. **Methods** 32 male C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups: in the control group mice were fed with ordinary dietary for 8 weeks; in the bezafibrate group mice were fed with bezafibrate [150 mg/(kg·d)] for 8 weeks; in the lipopolysaccharide (LPS) group mice received intraperitoneal injection of LPS (25 μg) and serum was collected 24 hours later; in the bezafibrate plus LPS group mice were fed with bezafibrate [150 mg/(kg·d)] for 8 weeks and then received an intraperitoneal injection of LPS (25 μg). Serum PON-1 activity was assessed by use of phenylacetate (arylesterase) as substrate and were determined with spectrophotometer. **Results** Serum PON-1 activity treated with bezafibrate were higher than those in the control group [120.97 ± 39.83 μmol/(min·L) vs 32.71 ± 4.40 μmol/(min·L), $P < 0.01$]. LPS decreased serum PON-1 activity compared with the control group [3.23 ± 0.76 μmol/(min·L) vs 32.71 ± 4.40 μmol/(min·L), $P < 0.01$]. There was no difference between the bezafibrate plus LPS group and the control group. Serum PON-1 activity was positively correlated with high density lipoprotein cholesterol (HDL) levels ($r = 0.538, P = 0.001$). **Conclusions** Serum PON-1 activity decreased during the acute inflammation phase induced by LPS. Bezafibrate can increase the PON-1 activity, which may be related to its anti-oxidation effect. The effect of bezafibrate may be associated with the increment of HDL.

血清中对氧磷酶 1 (paraoxonase-1, PON-1) 由肝脏合成, 几乎全部存在于高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 颗粒中。PON-1 担负着 HDL 的抗氧

化作用。目前认为 HDL 除了具有参与胆固醇逆转作用外, PON-1 活性可能是 HDL 抗动脉粥样硬化的有效标志物^[1]。氧化、炎症反应在动脉粥样硬化的发生发展中起重要作用。在急、慢性炎症时, PON-1 活性明显降低^[2,3]。研究发现 PON-1 活性降低见于急性心肌梗死、糖尿病及老年瓣膜退行性变等与动脉粥样硬化相关性疾病^[1,4]。本研究用脂多糖腹腔内注入小鼠形成急性炎症反应, 并通过观察

[收稿日期] 2007-12-25 [修回日期] 2008-02-03

[作者简介] 骆杨平, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事心血管临床与动脉粥样硬化研究, E-mail 为 betterluoyyp@yahoo.com.cn。赵水平, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事血脂与动脉粥样硬化研究。聂赛, 主管技师, 主要从事与动脉粥样硬化相关的基础研究实验技术。

苯扎贝特对急性反应期小鼠血清 PON-1 活性的影响, 探讨苯扎贝特抗动脉粥样硬化机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

32 只 8 周龄健康雄性 C57BL/6 小鼠购自北京协和医科大学实验动物中心, 体重 22~25 g, 饲养在中南大学湘雅二医院实验动物中心 SPF 级饲养房中。苯扎贝特药粉由天津天士力药业集团提供。

1.2 动物干预

8 周龄 C57BL/6 小鼠 32 只, 随机分为四组, 每组 8 只: 对照组普通饲料饲养 8 周, 每只小鼠每天平均摄食量 4.2~4.5 g; 苯扎贝特组普通饲料添加苯扎贝特[150 mg/(kg·d)] 饲养 8 周; 脂多糖组普通饲料饲养 8 周, 在处死小鼠前 24 h 每只腹膜内注入脂多糖(25 μg); 苯扎贝特+脂多糖组普通饲料添加苯扎贝特[150 mg/(kg·d)] 饲养 8 周, 在处死小鼠前 24 h 每只腹膜内注入脂多糖(25 μg)。脂多糖、苯扎贝特干预剂量依据文献[5, 6]。

1.3 标本采集及血脂测定

用 1% 戊巴比妥 0.1 mL 腹腔注射麻醉后摘眼球取血置于 EP 管中, 3000 r/min 离心 10 min, 取血清 -70 °C 冷冻待测 PON-1 活性。同时采用常规方法测定血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平, 按 Friedewald 公式计算血清低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 水平。

1.4 血清对氧磷酶 1 活性测定

按 Gan 等^[7]提供的方法, PON-1 活性以苯乙酸作为底物应用 270 nm 分光光度仪测定。苯乙酸混合反应试剂由 1.0 mmol/L 苯乙酸、0.9 mmol/L CaCl₂ 和 20 mmol/L Tris-HCl 组成, pH 为 8.0。血清 PON-1 活性由每分钟水解苯乙酸的最大反应速率决定。其水解速度需减去无血清时的反应速度。270 nm 反应系数为 1310 mmol/(L·cm)。

1.5 统计学分析

主要统计指标均进行正态性检验, 正态分布的统计指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示。正态分布的统计指标组间比较用 Oneway ANOVA 检验, 用 LSD 方法进行两两比较。采用直线相关分析法进行相关性分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清对氧磷酶 1 活性的变化

脂多糖组血清 PON-1 活性显著低于对照组 (P < 0.05), 苯扎贝特组血清 PON-1 活性显著高于对照组 (P < 0.01), 苯扎贝特+脂多糖组血清 PON-1 活性与对照组相比差异无显著性 (表 1)。

2.2 血脂水平变化

32 只小鼠实验前血脂水平相似。实验后, 苯扎贝特组 TG 较对照组明显降低, 降幅为 34%; HDLC 较对照组明显增高, 增幅为 26.4%; TC 较对照组降低, 降幅为 11.9%, 但与对照组相比差异无显著性; LDLC 较对照组降低, 降幅为 18.5%。脂多糖组 HDLC 较对照组明显降低, 降幅为 17.1%。苯扎贝特+脂多糖组 TC、LDLC 和 HDLC 与对照组相比差异无显著性 (表 1)。

表 1. 对氧磷酶 1 活性和血脂水平变化 ($\bar{x} \pm s$, n = 8)

分 组	PON-1 活性	TC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)
对照组	32.71 ± 4.40	3.18 ± 0.25	0.82 ± 0.13	1.40 ± 0.03	1.44 ± 0.05
苯扎贝特组	120.97 ± 39.83 ^b	2.80 ± 0.35	0.67 ± 0.13	1.78 ± 0.10 ^a	0.95 ± 0.12 ^b
脂多糖组	3.23 ± 0.76 ^b	2.78 ± 0.51	0.60 ± 0.26 ^a	1.16 ± 0.09 ^a	1.53 ± 0.12
苯扎贝特+脂多糖组	41.4 ± 10.65	2.66 ± 0.79	0.51 ± 0.12	1.43 ± 0.36	1.10 ± 0.11 ^b

a 为 P < 0.05, b 为 P < 0.01, 与对照组比较。

2.3 血清对氧磷酶 1 活性与血脂水平的关系

血清 PON-1 活性与 HDLC (r = 0.538, P = 0.001) 呈正相关, 而与其它血脂参数无相关性。

3 讨论

PON-1 是 HDL 的重要组成部分, 通过水解脂质

过氧化物发挥抗 LDL 氧化的作用^[8]。在一项前瞻性的临床研究中显示 PON-1 活性降低是冠心病独立的危险因素^[9]。提示 PON-1 在动脉粥样硬化的发生发展中起重要的作用。近来 PON-1 的抗炎作用引起人们的关注。PON-1 能激活血小板激活因子乙酰水解酶, 后者可水解促炎因子^[10]。PON-1 能抑制巨噬

细胞氧化应激^[11]。研究发现在用病毒接种鼠后 HDL 抑制 LDL 氧化和抑制 LDL 诱导单核细胞趋化活性的能力降低, PON 活性降低, 但载脂蛋白 A_{IV} 无改变, 提示在急性反应期 PON-1 的改变使 HDL 失去抗炎作用^[12]。本研究应用脂多糖干预小鼠产生急性炎症反应, 并观察到血清 PON-1 活性明显降低。研究发现, 具有致炎作用的细胞因子如白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 等可使体外培养的肝细胞 PON-1 表达降低^[5]。提示炎症反应时 PON-1 的活性显著降低。

在本研究中脂多糖干预组 LDLC 和 HDLC 较对照组明显降低。在急性炎症反应期血脂和脂蛋白水平下降可能与炎症细胞因子有关。脂蛋白参与细胞因子水平的调节, 同时一些细胞因子可发挥强有力的负向调节脂蛋白作用。在急性炎症反应期机体产生的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 和 6 等细胞因子可能通过影响 HMG-CoA 还原酶, 使肝细胞载脂蛋白的合成与分泌减少, 从而导致血脂和脂蛋白水平下降^[13]。

苯扎贝特是目前临床上常用的调脂药物。该药能延缓动脉粥样硬化进程, 降低心血管发生率和死亡率及疾病发生的危险性。苯扎贝特抗动脉粥样硬化的机制尚不十分清楚, 除了与其调节血脂如降低 TG 水平和升高 HDLC 水平外, 可能还具有调脂外作用。在研究中, 苯扎贝特干预小鼠 8 周后, TG 水平较对照组明显降低, HDLC 水平明显增高, 血清 PON-1 活性明显增高, 且可逆转在急性炎症状态时的 PON-1 降低, 提示此药具有强大的调节 PON-1 活性的作用。苯扎贝特升高 PON-1 的作用机制尚不清楚。在体外, 用苯扎贝特干预人肝细胞 (HuH7) 后 PON-1 活性和表达均明显增加, 而另两种贝特类药物氯贝酸和吉非贝齐却无此作用。其差异在于对 PON-1 启动子的作用^[14]。苯扎贝特能有效地诱导 PON-1 启动子的活性, 这种作用不被过氧化体增殖物激活型受体 α 调节。

PON-1 存在于 HDL 颗粒中, 与 HDL 紧密结合。HDL 颗粒按其密度大小分为 HDL₁、HDL₂ 和 HDL₃ 三种亚型, 其中 HDL₂ 对心血管保护作用较其它类型更为密切。国外学者应用免疫吸附层析技术发现 PON-1 不是分布于所有 HDL 颗粒。通过电子显微

镜观察分离出的包含 PON-1 的 HDL 颗粒更接近于 HDL₂。研究者认为 PON-1 首先存在 HDL₃ 转移到 HDL₂^[15]。本研究结果发现苯扎贝特能逆转脂多糖诱导的血清 PON-1 活性降低, 且与 HDLC 水平变化存在密切相关, 提示苯扎贝特这种作用可能与升高 HDLC 水平有关。苯扎贝特可能是影响 HDL 亚型重新分布发挥抗氧化作用, 通过恢复炎症反应的 PON-1 活性发挥抗动脉粥样硬化作用。

[参考文献]

- [1] Marta Tom^os, Gl^oria Latorre, Mariano Sent^e, et al. The antioxidant function of high density lipoproteins: A new paradigm in atherosclerosis [J]. *Rev Esp Cardiol*, 2004, **57**(6): 557-569.
- [2] Madjid M, Naghavi M, Litovsky S, et al. Influenza and cardiovascular disease: a new opportunity for prevention and the need for further studies [J]. *Circulation*, 2003, **108**: 2 730-736.
- [3] Gur M, Aslan M, Yildiz A, et al. Paraoxonase and arylesterase activities in coronary artery disease [J]. *Eur J Clin Invest*, 2006, **36** (11): 779-787.
- [4] 骆杨平, 赵水平, 李江. 急性冠状动脉综合症患者屏氨酶 1 活性的变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (4): 341-344.
- [5] Chang Yeop Han, Tsuyoshi Chiba, Jean S, et al. Reciprocal and coordinate regulation of serum amyloid A versus apolipoprotein A_I and paraoxonase-1 by inflammation in murine hepatocytes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**: 1 806-813.
- [6] Nagasawa T, Inada Y, Namura T, et al. Effects of bezafibrate, PPAR α agonist, and GW501516, PPAR δ agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine and choline deficient diet [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, **536** (1-2): 182-191.
- [7] Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, et al. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase [J]. *Drug Metab Dispos*, 1991, **19**: 100-106.
- [8] 张慧平, 孙福成, 王抒. 高密度脂蛋白与动脉粥样硬化和冠心病 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (6): 733-736.
- [9] Mackness B, Durrington P, McElduff P, et al. Low paraoxonase activities predicts coronary events in the Caerphilly prospective study [J]. *Circulation*, 2003, **107**: 2 775-779.
- [10] Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, et al. Hydrolysis of plate-activating factor by human serum paraoxonase [J]. *Biochem J*, 2001, **354**: 1-7.
- [11] Orit Rozenberg, Diana M, Michael Aviram, et al. Paraoxonase-1 (PON-1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON-1 transfected cells and in PON-1 transgenic mice [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **181**: 9-18.
- [12] Van Lenten BJ, Wagner AC, Nayak DP, et al. High density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection [J]. *Circulation*, 2001, **103** (18): 2 283-288.
- [13] Tatidis L, Masquelier M, Vitols S. Elevated up take of low density lipoprotein by drug resistant human leukemic cell lines [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, **63** (12): 2 169-180.
- [14] Gouedard C, Kounr-Besson N, Barouki R, et al. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene by fenofibrate and statins [J]. *Mol Pharmacol*, 2003, **63**: 945-956.
- [15] James RW, Deakin SP. The importance of high density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity [J]. *Free Radical Biol Med*, 2004, **37**: 1 986-994.

(此文编辑 文玉珊)