

[文章编号] 1007-3949(2010)18-06-0453-04

• 实验研究 •

普罗布考对动脉粥样硬化兔肝脏 PPAR α 表达的影响

杨文军, 费书柯, 贺红杰

(南华大学附属第二医院普外科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 普罗布考; 过氧化体增殖物激活型受体 α ; 肝脏; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨普罗布考对动脉粥样硬化模型兔肝脏的保护作用及其对过氧化体增殖物激活型受体 α 表达的影响。方法 16只新西兰大白兔给予高脂饲养 8周后, 随机平分为 2组: 高脂组饲以高脂饲料及 1% 淀粉; 普罗布考组在饲以高脂饮食基础上每天给予 0.25 g 普罗布考; 另选 8只兔为正常对照组给予普通饮食。14周末, 处死所有动物, 检测血脂、主动脉斑块面积、肝组织病理学等指标, 并用 RT-PCR 和 western blot 检测各组肝脏过氧化体增殖物激活型受体 α mRNA 和蛋白的表达量。结果 与高脂组相比, 普罗布考组动脉粥样斑块减少, 肝脏脂肪病变明显减轻, 血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇显著降低。高脂组肝脏过氧化体增殖物激活型受体 α mRNA 和蛋白的表达量明显低于对照组, 而普罗布考可上调过氧化体增殖物激活型受体 α mRNA 和蛋白的表达量。结论 普罗布考降低动脉粥样硬化模型兔血浆胆固醇水平, 上调其肝细胞过氧化体增殖物激活型受体 α 表达水平, 对动脉粥样硬化模型兔脂肪肝具有治疗作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Probucol on PPAR α Expression in Liver of Atherosclerosis Rabbits

YANG Wen-Jun, FEI Shu-Ke and HE Hong-Jie

(Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Probucol; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR); Liver; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of probucol on liver protection and PPAR α expression of atherosclerosis rabbits model. **Methods** 16 male New Zealand white rabbits were fed with 1% cholesterol 5% lard diet for 8 weeks and then were randomly divided into two groups: high-fat group maintained cholesterol diet for 6 weeks; probucol group the same cholesterol diet mixed with 0.25 g/d probucol for 6 weeks. Control group was fed with normal diet for 14 weeks. This study detected the change of serum lipid profile, atherosclerotic plaque areas of aorta, histopathology and PPAR α mRNA and protein expression of the livers at the end of the study. **Results** After 6 weeks treatment of probucol, the levels of total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL), and low density lipoprotein cholesterol (LDL) were reduced significantly compared with the high-fat group ($P < 0.05$). The atherosclerotic plaque area of aorta and the histopathology of fatty liver were ameliorated in probucol group compared with high-fat group. The PPAR α mRNA and protein expressions in the fatty livers of high-fat group were downregulated compared with control group, and probucol upregulated PPAR α mRNA and protein expressions. **Conclusion** Probucol decreased the serum cholesterol and upregulated PPAR α mRNA and protein expressions, which may inhibit the formation of plaques of aorta and fatty liver in atherosclerosis rabbits model.

高脂血症性脂肪肝是一种常见病、多发病, 随着人们生活水平的提高, 脂肪肝患者数量在逐年增加。目前对高脂血症性脂肪肝缺乏有效的治疗手段, 因此, 研发出一种既能抗高脂诱发的动脉粥样硬化, 又有保肝护肝作用的药物具有重要临床意义。普罗布考是一种降脂、抗氧化药物, 有研究发现, 普罗布考可降低脂肪肝患者的转氨酶^[1-4]活性, 提示其具有良好的护肝作用, 但机制不明。过氧化体增殖

物激活型受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 是一类能被过氧化体增殖物激活的核内受体, 包括 PPAR α 、PPAR β 及 PPAR γ 三种亚型。其中 PPAR α 主要在肝细胞表达, 在肝脏脂质转运与脂肪酸氧化中起重要作用^[5]。本实验以高胆固醇饮食建立兔动脉粥样硬化模型, 研究普罗布考对 PPAR α 表达的影响, 并探讨其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3月龄的清洁级雄性健康新西兰兔 24只, 由中南大学湘雅二医院实验动物中心提供。体重 $2.6 \pm$

[收稿日期] 2010-02-15 [修回日期] 2010-04-20

[作者简介] 杨文军, 硕士, 副教授, 研究方向为肝胆外科临床, E-mail为 yangwenjun271@sohu.com。费书柯, 硕士, 主治医师, 研究方向为临床普外科, E-mail为 pretender8129@yahoo.com.cn。贺红杰, 硕士, 医师, 研究方向为临床普外科, E-mail为 hehh@163.com。

0.3 kg 恒温空调房中单笼饲养。普罗布考粉剂由诺美(国际)有限公司提供。胆固醇和蛋黄粉由天津化学试剂公司提供。逆转录-多聚酶链反应试剂盒为美国 Promega 公司产品; Taq 酶购自北京天为时代; 所有引物由上海生工公司合成; Blue Ranger 预染蛋白分子量标准购自 Hyclone-Pierce 公司; 羊抗 PPAR α 多克隆抗体、小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体、购自 Santa Cruz 公司; 定量用牛血清白蛋白 (BSA)、蛋白定量试剂盒购自 Bio-Rad 公司。HRP-显色试剂盒购自美国 Pierce 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 动脉粥样硬化模型兔的建立及药物干预

24 只新西兰兔单笼饲养 1 周后, 随机分为 3 组, 每组 8 只。高脂组饲用高脂饲料 (基础饲料 + 5% 猪油 + 1% 胆固醇) 及 1% 淀粉饲养 14 周; 普罗布考组用高脂饲料 (基础饲料 + 5% 猪油 + 1% 胆固醇) 及 1% 淀粉饲养 8 周, 高脂饲料 (基础饲料 + 5% 猪油 + 1% 胆固醇) 及 0.25 g 普罗布考饲养 6 周; 对照组用普通饲料喂养 14 周。每只兔每日总食量约 120 g 饮水不限。

1.3 体重和血脂的测定

分别在 0 周、8 周和 14 周末称取动物体重, 并抽取空腹血 5 mL, 静置 30 min 后离心, 取血清置于 -70℃ 冰箱保存备用。酶法测定血清总胆固醇 (total cholesterol TC) 和甘油三酯 (triglyceride TG), 化学遮蔽法测定低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol LDLC) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol HDLC)。

1.4 主动脉粥样硬化斑块面积的测定

用苏丹 III 染色主动脉标本, 以占内膜总面积的百分比表示动脉粥样硬化斑块面积。

1.5 肝脏组织切片制备

取肝脏正中叶相同部位的组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 观察肝脏组织形态学改变。

1.6 肝脏组织过氧化体增殖物激活型受体 α mRNA 表达量的测定

Trizol 法提取总 RNA, 取总 RNA 2 μ L (约 2 μ g), 用 MBI 公司逆转录试剂盒合成 cDNA, 再取逆转录产物 1 μ L 进行 PCR 循环。PPAR α 上游引物为 5'-ATC GGC CTG GCC TTC TAA AC-3', 下游引物为 5'-GTC TCT GTA GAT CTC TTG G-3', 扩增产物长度为 509 bp。内参照采用 GAPDH, 上游引物 5'-CGG CAA ATT CAA CGG CAC AGT CA-3', 下游引物为 5'-TGG GGG CAT CGG CAG AAG G-3', PCR

扩增产物长度为 231 bp。PCR 反应条件均为: 94℃ 下 5 min 预变性, 94℃ 下 30 s 变性, 60℃ 下 30 s 退火, 70℃ 下 60 s 延伸, 35 个循环, 70℃ 10 min 继续延伸。

1.7 肝脏组织过氧化体增殖物激活型受体 α 蛋白表达量的测定

冰箱中取出各部分组织在液氮中研磨成碎末, 与 5 倍体积 4℃ PBS 混合后混入 5 倍体积 2 \times SDS, 100℃ 加热 5 min, 冰上放置 5 min, 再 100℃ 加热 5 min, 12 kr/min 离心 10 min 取上清, RC-DC 蛋白定量试剂盒定量后分装保存于 -80℃ 冰箱。20~40 μ g 总蛋白经 10%~12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移到硝酸纤维素膜, 用 0.2% 的丽春红染色以确定蛋白上样量是否相同。膜经 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 用抗 PPAR α (1: 1 000)、GAPDH (1: 3 000) 的抗体 40℃ 孵育过夜, 经 PBS 充分漂洗 (洗涤 3 次, 每次 5 min) 后用辣根过氧化物酶标记的相应的二抗 (1: 2 000) 室温孵育 1 h, 再用 PBS 洗涤 3 次。加入蛋白印迹增强化学发光试剂显色, X 光片曝光和洗片。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据统计用单因素方差分析, 两组间比较采用 S-N-K 检验, $P < 0.05$ 表示各组间差异有显著性。

2 结果

2.1 各组兔体重和血脂水平

各组兔的体重在实验过程中差异均无显著性。饲喂高脂高胆固醇饲料后, 高脂组和普罗布考组第 8 周时血 TG、TC、LDLC 和 HDLC 水平较 0 周时水平明显升高 ($P < 0.01$); 14 周时高脂组 TC、LDLC 和 HDLC 水平较 8 周时差异无显著性; 但普罗布考组 14 周时血 TC、LDLC 和 HDLC 较 8 周时显著降低 ($P < 0.01$), 对 TG 无明显影响 (表 1)。

2.2 兔主动脉病理形态学改变

形态学观察发现正常对照组兔动脉内膜完整平滑, 未见动脉粥样硬化斑块; 高脂组兔动脉内膜粗糙、可见较多粥样硬化斑块; 普罗布考组兔主动脉内膜粥样硬化斑块较高脂组明显减少。正常对照组、高脂组和普罗布考组主动脉粥样硬化斑块面积分别为 0.78 3% \pm 10.6% 和 42.9% \pm 11.8%, 各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 图 1)。

表 1 普罗布考对血脂和体重的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	TC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	体重 (kg)
正常对照组					
0周	0.92 ± 0.48	0.35 ± 0.29	0.55 ± 0.26	0.93 ± 0.42	2.62 ± 0.53
8周	0.93 ± 0.38	0.34 ± 0.27	0.57 ± 0.18	0.96 ± 0.37	2.78 ± 0.54
14周	1.04 ± 0.55	0.36 ± 0.39	0.59 ± 0.23	1.10 ± 0.38	2.85 ± 0.46
高脂组					
0周	0.93 ± 0.40	0.33 ± 0.24	0.59 ± 0.30	0.87 ± 0.42	2.73 ± 0.62
8周	29.89 ± 0.74 ^a	24.85 ± 0.05 ^a	2.84 ± 0.88 ^a	1.85 ± 0.92 ^a	3.13 ± 0.43
14周	27.74 ± 0.40 ^a	24.27 ± 0.76 ^a	2.60 ± 0.81 ^a	1.97 ± 0.85 ^a	3.21 ± 0.57
普罗布考组					
0周	0.88 ± 0.43	0.30 ± 0.27	0.55 ± 0.27	0.81 ± 0.37	2.68 ± 0.45
8周	26.74 ± 0.09 ^a	23.29 ± 0.15 ^a	2.68 ± 0.83 ^a	2.82 ± 0.86 ^a	3.14 ± 0.55
14周	20.21 ± 0.44 ^{b,c}	17.85 ± 0.22 ^{b,c}	1.57 ± 0.74 ^{a,c}	2.62 ± 0.82 ^a	2.94 ± 0.62

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与高脂组比较; c为 $P < 0.01$, 与本组 0周时比较。

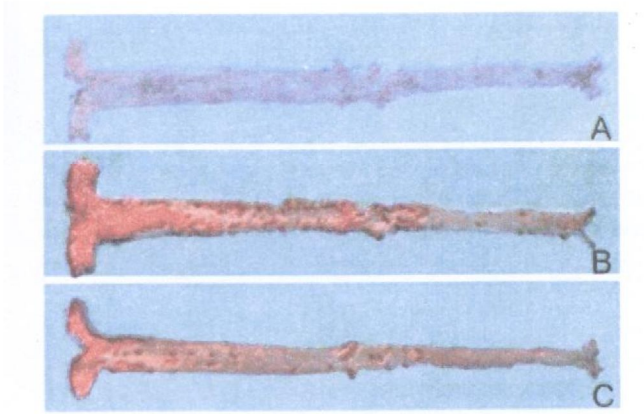


图 1 各组兔主动脉苏丹Ⅲ染色 A 为正常对照组, B 为高脂组, C 为普罗布考组。

2.3 肝脏的病理变化

正常对照组肝细胞核圆规整, 呈条索状排列; 而高脂组的肝细胞肿大, 细胞排列紊乱, 可见大小不等的脂肪空泡; 轻至中度脂肪变性时, 脂肪呈向心性分布, 重度者可呈小叶周围型分布; 普罗布考治疗明显减轻肝脏脂肪病变 (图 2)。

2.4 肝脏过氧化体增殖物激活型受体 α mRNA 表达量的变化

PPAR α 和内参 GAPDH 的 RT-PCR 产物电泳结果显示扩增片段长度分别为 509 bp 和 231 bp 与预期设计的目的片段大小相同。与正常对照组相比, 高脂组肝脏 PPAR α mRNA 的表达显著减少 ($P < 0.05$), 而普罗布考治疗组 PPAR α mRNA 的表达与正常对照组差异无显著性 (图 3)。

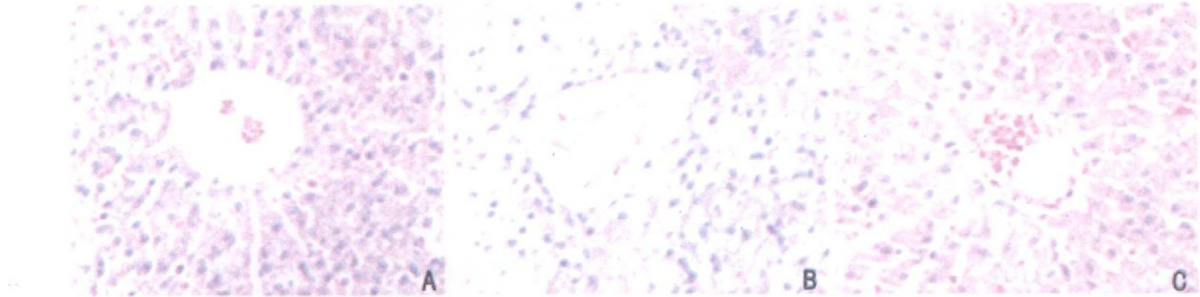


图 2 各组兔肝组织 HE 染色 ($\times 40$) A 为正常对照组, B 为高脂组, C 为普罗布考组。

2.5 肝脏过氧化体增殖物激活型受体 α 蛋白的表达

Western blot 检测肝脏 PPAR α 蛋白表达量, 结

果与 RT-PCR 一致。即与正常对照组相比, 高脂组肝脏 PPAR α 蛋白表达显著减少 ($P < 0.05$), 而普罗布考治疗可使 PPAR α 蛋白表达上调 (图 4)。

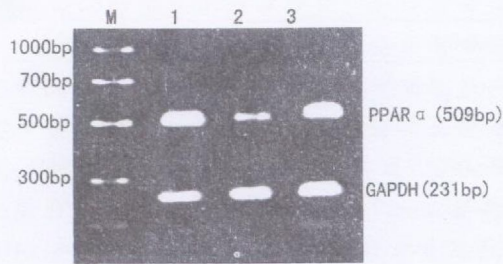


图3. 各组兔肝组织过氧化体增殖物激活型受体 α mRNA表达量的检测 M为Marker,1为正常对照组,2为高脂组,3为普罗布考组。

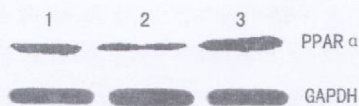


图4. 各组兔肝组织过氧化体增殖物激活型受体 α 蛋白表达量的检测 1为正常对照组,2为高脂组,3为普罗布考组。

3 讨论

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 主要存在于代谢综合征 (metabolic syndrome, MetS) 特征的患者中, 被认为是代谢综合征的肝脏表现。NAFLD 的重要性及其与代谢综合征的关系已逐渐被人们认识, 从而也促进了人们对其在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生发展中及心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 中扮演的可能性角色的探讨。NAFLD 不仅是 As 形成早期的独立标志物, 而且可能是 As 进展中的中介者, 并且可独立预测未来心血管事件的风险^[6]。近年来 NAFLD 与 As 的关系成为人们关注的焦点。因此, 研发一种既能抗高血脂诱发的 As 又有保护肝脏作用的药物具有重要临床意义^[7]。

普罗布考作为一种抗 As 药物, 具有消退斑块和降胆固醇作用^[1-4], 但因其能降低 HDLC^[8,9] 而在临床应用受到限制。应用普罗布考对兔动脉粥样硬化进行治疗, 发现普罗布考在减小兔主动脉斑块面积的同时, 改善肝脏脂肪样变。

除了降低胆固醇的作用外, 本文考虑 PPAR α 表达量的变化也可能是普罗布考治疗作用的机制之

一。研究表明, PPAR α 是调节能量代谢和脂质氧化的关键因素, 在维持体内脂质代谢的动态平衡中起重要作用。因为 PPAR α 与配体结合而活化, 能影响与脂质代谢有关的酶和基因转录, 如酰基辅酶 A 合成酶、酰基辅酶 A 氧化酶、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶等, 使肝脏氧化脂肪酸能力加强。此外, PPAR α 还通过参与调节编码肝脂肪酸结合蛋白、载脂蛋白 Aiv、A I 等基因的转录、活化, 影响脂肪酸的摄取、结合及脂质转运^[10,11]。肝脏是作为调节脂质代谢的重要器官, 能保持脂质的相对平衡。当某些致病因子使这种调控系统受损, 则会导致代谢紊乱, 引起疾病。如脂肪酸入肝过多会使脂蛋白合成代谢发生障碍, 脂肪酸氧化又不足时, 脂质就会在肝脏沉积, 发生脂肪肝。

在本实验表明, 高脂高胆固醇饮食可降低 PPAR α 的表达; 而经普罗布考治疗后, PPAR α 表达上调。后者可能是普罗布考治疗 As 模型兔脂肪肝的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] 赵水平, 洪绍彩, 邓平, 等. 普罗布考对主动脉粥样斑块形成及血细胞调节蛋白的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (6): 503-507.
- [2] 张梅, 张运, 张园园, 等. 舒降之、普罗布考和开搏通对颈动脉和股动脉内膜中膜厚度的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (1): 61-64.
- [3] Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, et al. Probucol in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: Double blind randomized controlled study [J]. *J Hepatol* 2003, 38 (4): 414-418.
- [4] Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, et al. Probucol in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: An open-label study [J]. *J Clin Gastroenterol* 2003, 36 (3): 266-268.
- [5] Issemann I, Green S, Braissant O, et al. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators [J]. *Nature* 1990, 347 (18): 645-647.
- [6] 张毅, 徐尚华. 非酒精性脂肪肝病与动脉粥样硬化的关系 [J]. 岭南心血管病杂志, 2009, 15 (4): 148-154.
- [7] Lall CG, Aisen AM, Bansal N, et al. Nonalcoholic fatty liver disease [J]. *AJR Am J Roentgenol* 2008, 190 (4): 993-1002.
- [8] Hong SC, Zhao SP, Wu ZH. Effect of probucol on HDL metabolism and class B type I scavenger receptor (SR-BI) expression in the liver of hypercholesterolemic rabbits [J]. *Int J Cardiol* 2007, 115 (1): 29-35.
- [9] Jeon SM, Park YB, Kwon OS, et al. Vitamin E supplementation alters HDL-cholesterol concentration and paraoxonase activity in rabbits fed high-cholesterol diet: comparison with probucol [J]. *J Biochem Mol Toxicol* 2005, 19 (5): 336-346.
- [10] Barbier O, Torra IP, Duguay Y, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22 (5): 717-726.
- [11] Marx N, Duez H, Fruchart JC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells [J]. *Circ Res* 2004, 94 (9): 1168-1178.

(此文编辑 李玲玲)