

烟酸对实验性动脉粥样硬化兔脂肪组织和细胞 Caveolin-1 表达的影响

文伟明¹, 陈秀林³, 黄琛², 徐戈¹, 李志乐¹, 雷敏¹, 欧婷¹, 王利兵¹

(广西医科大学第一附属医院 1. 心内科, 2. 干部保健科, 广西南宁市 530021;

3. 广西百色市人民医院内分泌科, 广西百色市 533000)

[关键词] 烟酸; 动脉粥样硬化; 小凹蛋白 1; 脂肪组织

[摘要] 目的 探讨烟酸对实验性动脉粥样硬化兔脂肪组织和细胞小凹蛋白 1 (Caveolin-1) 表达的影响。方法

16 只健康雄性新西兰大白兔给予高脂饮食 8 周, 随机分为高脂组(继续饲以高脂饲料 6 周, $n=8$)和烟酸组[在高脂饮食基础上给予烟酸 200 mg/(kg·d), 共 6 周, $n=8$], 另选 8 只兔给予普通饮食 14 周作为正常对照组。实验前后测定血脂和体重, 14 周末处死动物, 取腹股沟皮下脂肪组织采用实时荧光定量 PCR 检测 Caveolin-1 mRNA 表达。体外观察不同浓度烟酸(0、0.2、1.0 和 5.0 mmol/L)对兔脂肪细胞 Caveolin-1 mRNA 表达的影响。结果 与正常对照组相比, 高脂组总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇水平均明显升高, 主动脉内膜厚度和斑块面积均显著增加, 而脂肪组织 Caveolin-1 mRNA 表达明显降低; 与高脂组相比, 烟酸组总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇水平均明显降低, 高密度脂蛋白胆固醇水平升高, 且主动脉内膜厚度和斑块面积均显著缩小, 脂肪组织 Caveolin-1 mRNA 表达升高。体外实验显示, 烟酸可呈浓度依赖性地刺激脂肪细胞 Caveolin-1 mRNA 表达。结论 烟酸可明显改善血脂谱及稳定动脉粥样斑块, 可能与上调脂肪组织或细胞 Caveolin-1 mRNA 表达水平有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Niacin on Caveolin-1 Expression in Adipocytes and Adipose tissue of Experimental Atherosclerosis Rabbits

WEN Wei-Ming¹, CHEN Xiu-Lin³, HUANG Shen², XU Ge¹, LI Zhi-Le¹, LEI Min¹, OU Ting¹, and WANG Li-Bing¹

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Cadres Health, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Department of Endocrinology, The People's Hospital of Baise City, Baise, Guangxi 533000, China)

[KEY WORDS] Niacin; Atherosclerosis; Caveolin-1; Adipose Tissue

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of niacin on expression of Caveolin-1 in adipocytes and adipose tissue from experimental atherosclerosis rabbits. **Methods** 16 New Zealand white rabbits were fed with high fat diet for 8 weeks, and then randomly divided into two groups: hyperlipidemia group (maintained on high fat diet for 6 weeks, $n=8$) and niacin treatment group (the same fat diet plus 200 mg/(kg·d) niacin for 6 weeks, $n=8$). Rabbits in control group ($n=8$) were fed with normal diet for 14 weeks. At the end of the study, all rabbits were sacrificed to detect the blood lipid changes and Caveolin-1 expression in adipose tissue by real-time quantitative PCR. The direct effect of niacin on Caveolin-1 mRNA expression in primary rabbit adipocytes was assayed. **Results** Compared with control group, rabbits fed with high fat diet showed higher serum levels of total cholesterol, triglyceride and low density lipoprotein cholesterol, more aorta endometrial thickness and plaque area, less Caveolin-1 expression. Compared with hyperlipidemia group, rabbits treated with niacin showed less serum levels of total cholesterol, triglyceride and low density lipoprotein cholesterol, less aorta endometrial thickness and plaque area and more Caveolin-1 expression. In vitro study, niacin dose-dependently stimulated Caveolin-1 expression in cultured adipocytes. **Conclusions** Niacin could improve the lipid pro-

[收稿日期] 2011-12-29

[基金项目] 广西青年科学基金资助(桂科青 0832049)

[作者简介] 文伟明, 硕士, 主治医师, 研究方向为心脏电生理的诊治。陈秀林, 主治医师, 研究方向为糖尿病与冠心病的诊治。通讯作者黄琛, 硕士, 副主任医师, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, E-mail 为 xuggee@21cn.com。

file and stabilize atheromatous plaque, which may be related to up-regulating the expression of Caveolin-1 in adipose tissue or adipocytes.

胆固醇代谢异常在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和冠心病发生发展中起重要作用。脂肪组织作为机体最大的游离胆固醇储存库,对循环血中胆固醇代谢起着重要的缓冲作用^[1]。小凹蛋白 1 (Caveolin-1)在脂肪细胞高度表达,具有结合与运载胆固醇功能,能通过调节胆固醇外流调节信号转导并促进细胞内游离胆固醇的流出,对维持正常细胞胆固醇的稳态起着重要调节作用^[2,3]。

烟酸作用的主要部位在脂肪组织,具有全面而独特的调脂作用。目前研究发现烟酸还具有降脂外抗炎、改善血管内皮功能等抗 As 的多效性作用^[4]。而烟酸对脂肪组织和细胞 Caveolin-1 表达的影响尚未见报道。为此,本研究通过高脂饮食构建实验性动脉粥样硬化兔模型来观察烟酸对兔血脂与脂肪组织 Caveolin-1 mRNA 表达及体外观察不同浓度烟酸对脂肪细胞 Caveolin-1 mRNA 表达的影响,以探讨烟酸抗 As 的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

新西兰大白兔(广西医科大学实验动物中心),胆固醇(安徽天启化工公司),蛋黄粉(亳州市红日实业公司),烟酸粉(北京嘉康源科技公司),DMEM/F12 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程公司),Ⅱ型胶原酶(Sigma 公司),Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(Fermentas 公司),Real Master Mix 试剂盒(SYBR-Green)(TIANGE 公司),全自动生化分析仪(日立 7170 型),病理图像分析仪(DMR + 550,德国),双光束紫外分光光度计(PE LAMBDA BIO 20,美国),实时荧光定量 PCR 仪(ABI7500,美国)。

1.2 动脉粥样硬化兔模型的建立及烟酸干预

随机取 16 只大白兔予以高脂饲料(1%胆固醇、7.5%蛋黄粉和 8%猪油),饲养 8 周后再随机均分为两组:高脂组继续饲以高脂饲料 6 周,烟酸组在继续高脂饲料喂养的基础上予以烟酸 200 mg/(kg · d)治疗 6 周;另取 8 只兔予以普通饲料喂养 14 周作为正常对照组。

1.3 血脂及体重测定

饲养前及饲养至第 8 周和第 14 周末,称取动物体重,并经兔耳中央动脉取空腹血 2 mL,静置 30

min 后离心取血清,检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、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)的浓度。

1.4 主动脉病理学检测

选取靠近主动脉弓部的主动脉约 1.5 cm,置于 4% 福尔马林溶液内固定 24 h 以上,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,血管横断面作 5 μm 连续切片,常规苏木素-伊红(HE)染色做病理学检测,由有经验的病理科医师采用高清晰度的病理图像分析系统测定主动脉内膜厚度及斑块的最大横截面积,计算其占主动脉横截面积的比例。

1.5 脂肪细胞的原代培养

无菌条件下取兔腹股沟皮下脂肪组织,Ⅱ型胶原酶中消化,PBS 液反复吹打洗涤,红细胞裂解液温浴去除红细胞,含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基调细胞密度至 2×10^8 cells/L,定量接种于培养板中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中,每 2 天更换上述培养基 1 次,直至细胞单层融合(5 天),换含有地塞米松(0.25 μmol/L)、胰岛素(10 μg/L)的 DMEM/F12 培养基诱导细胞分化 48 h,此后换含 10% 胎牛血清和胰岛素(10 μg/L)的 DMEM/F12 培养基继续培养,7 天后细胞形态变为圆形,包浆充满脂滴,油红 O 染色鉴定为脂肪细胞。

1.6 烟酸体外干预实验

为检测烟酸对 Caveolin-1 的直接作用,取兔腹股沟皮下脂肪组织行脂肪细胞原代培养,将含不同浓度烟酸 0、0.2、1.0 及 5.0 mmol/L 的 DMEM/F12 培养基与定量(2×10^9 cells/L)的脂肪细胞在 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h,不同浓度烟酸组均设有 12 个标本($n = 12$),收集脂肪细胞抽提总 RNA,检测 Caveolin-1 mRNA 表达。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测脂肪组织和细胞 Caveolin-1 mRNA 表达

应用 Trizol 试剂盒提取兔脂肪组织和细胞总 RNA,紫外分光光度仪测定 RNA 的浓度和纯度。取 1 μg RNA 在 20 μL 逆转录体系中合成 cDNA,再取逆转录产物 cDNA 进行实时荧光定量 PCR。Caveolin-1 引物上游 5'-CGA CGA GGT GAA CGA GAA GC-3',下游 5'-AGA TGG TAG ACA GTA GGC GG-TA-3'(221 bp);内参照(β-actin)引物上游 5'-CGA

GAT TGG CAT GGC TTTA-3',下游 5'-ACC TTC ACC GTT CCA GTT T-3'(108 bp)。实时荧光定量 PCR 反应在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪中进行,根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Caveolin-1 mRNA 的相对表达量。

1.8 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异的显著性检验采用 *t* 检验,多组间差异的显著性检验采用方差分析。

2 结 果

2.1 烟酸对兔血脂和体重的影响

三组兔的体重在实验过程中组间无显著性差异($P > 0.05$)。8 周时高脂组和烟酸组兔血清 TC、

TG 和 LDLC 水平均较正常对照组明显升高($P < 0.01$),高脂组和烟酸组之间无显著性差异($P > 0.05$);烟酸组 14 周时 TC、LDLC 水平分别较其 8 周时下降 41.32%、47.69% ($P < 0.01$),TG 水平下降 30.22% ($P < 0.05$),HDLc 水平升高 27.65% ($P < 0.01$),与高脂组同时期相比差异也具有统计学意义($P < 0.01$;表 1)。

2.2 烟酸对兔动脉粥样硬化斑块的影响

HE 染色显示,正常对照组血管内膜连续、光滑、内皮完整;高脂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,局部聚集成脂质斑块,斑块内纤维成分少,细胞成分多,中膜平滑肌细胞增殖,排列紊乱;烟酸组内膜病变较高脂组明显减轻(图 1 和表 2)。

表 1. 各组兔的血脂水平 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L, $n = 8$)
Table 1. Lipid levels of rabbits in the three groups

分 组	TC	TG	HDLc	LDLC
0 周 正常对照组	3.81 ± 0.62	0.96 ± 0.24	1.52 ± 0.39	1.30 ± 0.33
高脂组	3.72 ± 0.59	0.77 ± 0.28	1.68 ± 0.37	1.39 ± 0.36
烟酸组	4.17 ± 0.80	1.01 ± 0.35	1.76 ± 0.45	1.55 ± 0.41
8 周 正常对照组	3.86 ± 0.52	1.04 ± 0.30	1.45 ± 0.22	1.33 ± 0.31
高脂组	25.94 ± 2.89 ^a	2.12 ± 0.27 ^a	1.73 ± 0.28	1.42 ± 2.03 ^a
烟酸组	27.98 ± 3.50 ^a	2.49 ± 0.19 ^a	1.86 ± 0.47	23.98 ± 2.38 ^a
14 周 正常对照组	3.78 ± 0.46	0.99 ± 0.16	1.48 ± 0.43	1.43 ± 0.24
高脂组	28.99 ± 4.31	2.24 ± 0.49	1.17 ± 0.37	25.36 ± 2.71
烟酸组	16.47 ± 2.42 ^{ab}	1.71 ± 0.33 ^{ac}	2.37 ± 0.30 ^{ac}	12.59 ± 2.14 ^{ac}

a 为 $P < 0.01$,与正常对照组同期、同组 0 周时比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与同组 8 周时比较。

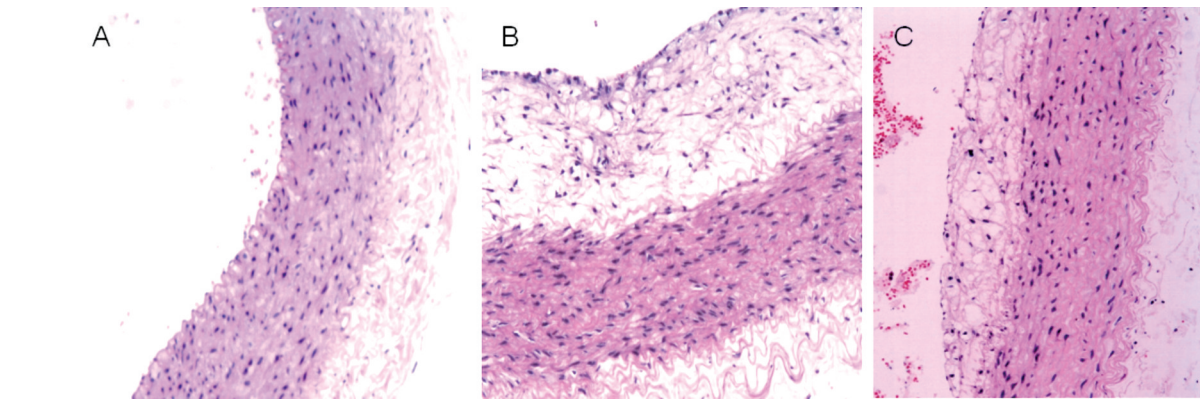


图 1. 兔主动脉 HE 染色(×100) A 为正常对照组,B 为高脂组,C 为烟酸组。

Figure 1. The aorta of rabbits dyed by HE stain in the three groups

2.3 烟酸对兔脂肪组织 Caveolin-1 mRNA 表达的影响

各组标本 Caveolin-1 及内参照 β -actin 的扩增曲线光滑,溶解曲线均为单峰,说明产物单一,无非

特异性扩增(图 2)。高脂组脂肪组织 Caveolin-1 mRNA 的相对表达量为 0.12 ± 0.04 ,显著低于正常对照组的 1.07 ± 0.40 ($P < 0.01$);烟酸组脂肪组织 Caveolin-1 mRNA 的相对表达量为 0.51 ± 0.10 ,较

高脂组明显升高($P < 0.01$;图3)。

2.4 烟酸对兔脂肪细胞 Caveolin-1 mRNA 表达的影响

含不同浓度烟酸(0、0.2、1.0 及 5.0 mmol/L)的 DMEM/F12 培养基与定量(2×10^9 cells/L)的脂肪细胞共同孵育 24 h 后,烟酸呈浓度依赖性刺激 Caveolin-1 mRNA 表达($P < 0.01$;图4)。

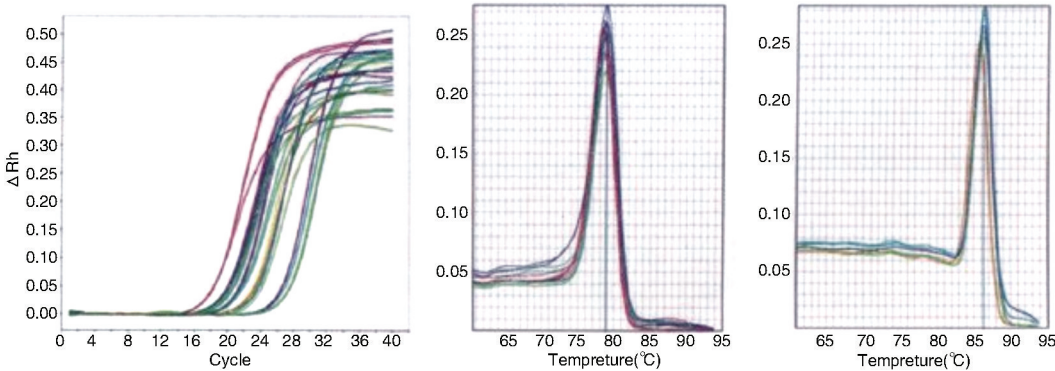


图2. Caveolin-1 和内参照 β -actin 的扩增曲线及溶解曲线 左为 Caveolin-1 和内参照 β -actin 的扩增曲线,中为 Caveolin-1 的溶解曲线,右为内参照 β -actin 的溶解曲线。

Figure 2. Amplification plot and melt curves of caveolin-1 and β -actin

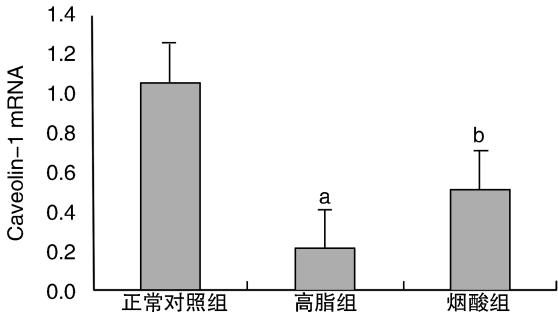


图3. 各组兔脂肪组织 Caveolin-1 mRNA 的相对表达量 a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与高脂组比较。

Figure 3. The expressions of Caveolin-1 mRNA in three groups

3 讨论

血脂异常是目前公认的 As 主要发病机制之一,胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport,RCT)是维持机体胆固醇动态平衡的主要机制,这一机制的破坏,被认为是 As 发生发展的重要病理基础之一^[5],其涉及 Caveolin-1 等多种脂质转运蛋白^[6]。脂肪组织内游离胆固醇与循环脂蛋白胆固醇之间存在动态平衡,在饮食诱导出现高胆固醇血症后可导致胆固醇在脂肪组织内聚积^[7]。本研究观察到高脂饮食 8 周后,血清 TC、TG 和 LDLC 水平均明显升高,且主动脉内膜厚度和斑块面积均显著增加。同时,还观察到高脂

表 2. 各组主动脉内膜厚度和斑块面积变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Changes of area of atherosclerotic plaque and intimal thickness of aorta in the three groups

分 组	内膜厚度(μm)	斑块面积
正常对照组	8.11 \pm 3.86	0
高脂组	85.72 \pm 13.42 ^a	66.81% \pm 16.47% ^a
烟酸组	41.37 \pm 15.69 ^b	28.02% \pm 8.83% ^b

a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与高脂组比较。

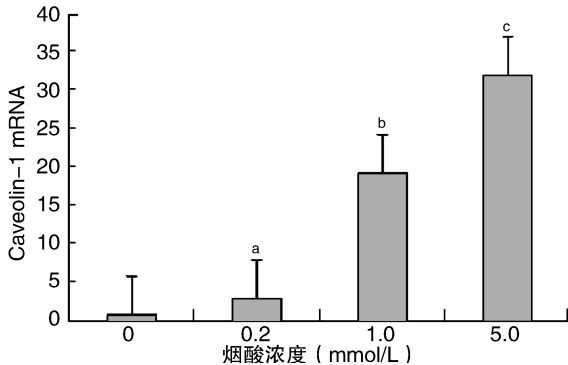


图4. 不同浓度烟酸对兔脂肪细胞 Caveolin-1 mRNA 表达的影响 a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 0.2 mmol/L 烟酸组比较;c 为 $P < 0.01$,与 1.0 mmol/L 烟酸组比较。

Figure 4. The effect of different concentrations niacin on the expression of caveolin-1 in adipocytes

组兔脂肪组织 Caveolin-1 mRNA 表达较正常对照组显著降低,可能与长期的胆固醇超负荷影响脂肪细胞的胆固醇平衡代谢有关。Frank 等^[8]研究表明 Caveolin-1 可能调节血浆 LDL 水平及通过控制血清脂蛋白水平与组成来调节脂蛋白代谢。因此,我们推测 Caveolin-1 表达减少可能影响胆固醇外流调节信号转导且抑制 RCT 及细胞内游离胆固醇流出,进而引起血脂谱的改变及加速粥样斑块的形成。

烟酸早在 20 世纪 60 年代即作为调脂药物开始应

用于临床,是目前最有效地升高 HDLC 且唯一降低脂蛋白(a)的调脂药物。临床研究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^[9]。Taylor 等^[10]研究发现在他汀治疗的基础上加用烟酸缓释剂能明显减缓冠心病合并低 HDLC 患者的 As 进程。本研究发现烟酸治疗 6 周后血清 TC、TG 和 LDLC 水平均显著降低,而 HDLC 水平升高,主动脉内膜厚度与斑块面积虽较正常对照组增加,但与高脂组比较则明显缩小,而脂肪组织 Caveolin-1 mRNA 表达水平较高脂组明显升高,证明烟酸具有全面的调脂和延缓 As 斑块形成的作用。长期治疗可能使斑块消退,这一作用可能与烟酸降脂和抗炎等作用有关。此外,我们研究发现烟酸亦可呈浓度依赖性地刺激兔脂肪细胞 Caveolin-1 mRNA 表达,提示烟酸(体内)降低胆固醇的效应可能部分是由于其刺激脂肪细胞 Caveolin-1 mRNA 表达,促进细胞内游离胆固醇的流出,增强由 HDL 介导的脂肪细胞 RCT,由此改善血脂谱及动脉粥样斑块,也可部分解释烟酸升高 HDLC 的机制。

烟酸上调 Caveolin-1 mRNA 表达的机制尚不清楚,可能与下列因素有关:①烟酸能通过刺激高脂血症兔脂肪细胞肝 X 受体(LXR α) mRNA 表达并促进脂肪细胞胆固醇流出^[11],同时可活化 SREBP-1c 的表达且导致其靶生脂基因的活化,从而促使脂肪酸(FA)的合成与代谢^[12]。而 Caveolin-1 本身就是一种脂肪酸结合蛋白,参与调控脂肪细胞中 FA 的流出及储存^[13]。烟酸可能通过直接刺激脂肪细胞 Caveolin-1 表达及间接通过 LXR α -SREBP-1c 途径上调 Caveolin-1 mRNA 表达。②高脂血症可导致机体的慢性炎症过程,即可通过 Toll 样受体途径激活 p38 MAPK 等炎症信号通路导致炎症环境^[14]。Caveolin-1 高表达是慢性炎症性疾病如 As 预后较好的指标^[15],可通过 Toll 样受体信号途径、MKK3/p38 MAPK 途径发挥抗炎作用^[16]。烟酸降脂的同时可减轻炎症程度,再加上烟酸自身具有的抗炎作用且可降低亲炎症细胞因子 ICAM-1、VCAM-1、MCP-1、TNF- α 等表达^[17],提示烟酸可能通过促进 Caveolin-1 mRNA 表达来发挥这一效应。

总之,长期高胆固醇饮食能下调脂肪组织 Caveolin-1 mRNA 表达,部分抑制 RCT,从而促进 As 的发生发展。烟酸改善血脂谱及稳定动脉粥样斑块可能与上调脂肪组织或细胞 Caveolin-1 mRNA 表达有关,这一作用可能是烟酸抗 As 的潜在机制,需要进一步研究以有助于明确烟酸抗 As 机制。

[参考文献]

[1] Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation and cardiovas-

cular disease[J]. Circ Res, 2005, 96 (9): 939-949.

- [2] Le Lay S, Hajdouch E, Lindsay MR, et al. Cholesterol induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis[J]. Traffic, 2006, 7 (5): 549-561.
- [3] Hayashi K, Matsuda S, Machida K. Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers[J]. Cancer Res, 2001, 61 (6): 2 361-364.
- [4] Digby JE, McNeill E, Dyar OJ, et al. Anti-inflammatory effects of nicotinic acid in adipocytes demonstrated by suppression of fractalkine, RANTES and MCP-1 and upregulation of adiponectin[J]. Atherosclerosis, 2010, 209 (1): 89-95.
- [5] George HR, Margarita LM, Atger V, et al. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides newinsights[J]. J Lipid Res, 1999, 40: 781-796.
- [6] Chachaj A, Drozd K, Szuba A. Reverse cholesterol transport processes and their role in atherosclerosis regression[J]. Postepy Biochem, 2008, 54 (3): 301- 307.
- [7] Arner P. Is familial combined hyperlipidaemia a genetic disorder of adipose tissue[J]? Curr Opin Lipidol, 1997, 8 (2): 89-94.
- [8] Frank PG, Pavlides S, Cheung MW, et al. Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295 (1): 242-248.
- [9] Meyers CD, Kamanna VS, Kashyap ML. Niacin therapy in artheroscleroti[J]. Curr Opin Lipidol, 2004, 15 (6): 659-665.
- [10] Taylor AJ, Sullenberger LE, Lee HJ, et al. Arterial biology for the investigation of the treatment effects of reducing cholesterol (ARBI-FER2): A double-blind place bo-controlled study of extended- release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins[J]. Circulation, 2004, 110: 3 512-517.
- [11] Zhao SP, Yang J, Li J, et al. Effect of niacin on LXR α and PPAR γ expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits[J]. Int J Cardiol, 2008, 124 (2): 172- 178.
- [12] Repa JJ, Liang G, Ou J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element bindingprotein-1 gene by oxysterol receptors, LXR alpha and LXR beta[J]. Gene Dev, 2000, 14 (22): 2 819-830.
- [13] Meshulam T, Simard JR, Wharton J, et al. Role of caveolin-1 and cholesterol in transmembrane fatty acid movement[J]. Biochemistry, 2006, 45: 2 882-893.
- [14] 廖端芳,覃丽,唐朝克.小凹及小凹蛋白-1介导炎症应答与胆固醇跨膜转运之间的相互作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (3): 233.
- [15] Rodriguez-Feo JA, Hellings WE, Moll FL, et al. Caveolin-1 influences vascular protease activity and is a potential stabilizing factor in humanatherosclerotic disease[J]. PLoS One, 2008, 3: e2612.
- [16] Xiao Mei Wang, Hong Pyo Kim, Ruiping Song, et al. Caveolin-1 confers antiinflammatory effects in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 34 (4): 434-442.
- [17] Digby JE, McNeill E, Dyar O J, et al. Anti-inflammatory effects of nicotinic acid in adipocytes demonstrated by suppression of fractalkine, RANTES, and MCP-1 and upregulation of adiponectin [J]. Atherosclerosis, 2010, 209 (1): 89-95.

(此文编辑 文玉珊)