

瑞舒伐他汀对高脂饲养大鼠心肌脂联素及其受体表达的影响

杨丽¹, 田建会², 王霞霞³, 马蕾⁴, 王梦娟⁵, 杨靖⁶

(1. 青岛大学医学院, 山东省青岛市 266021; 2. 青岛大学附属医院心内科, 山东省青岛市 266003;

3. 青岛大学附属医院黄岛心内科, 山东省青岛市 266500; 4. 青岛大学附属医院 PET-CT 室, 山东省青岛市 266101;

5. 青岛市市立医院急诊科, 山东省青岛市 266011; 6. 青岛大学附属医院黄岛甲状腺外科, 山东省青岛市 266500)

[关键词] 瑞舒伐他汀; 脂联素; 脂联素受体

[摘要] **目的** 探讨瑞舒伐他汀对高脂饲养大鼠心肌脂联素及其受体 mRNA 和蛋白表达的影响。**方法** 8 周龄 Wistar 大鼠 48 只, 随机分为对照组、高脂饲养组、高脂饲养 + 瑞舒伐他汀组, 20 周后, 全自动生化分析仪测定血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、血糖, ELISA 测定血清脂联素, RT-qPCR 和 Western blot 测定心肌组织脂联素及其受体 mRNA 和蛋白的表达。**结果** 与对照组相比, 高脂饲养组大鼠血清 TG、TC、LDL、血糖、脂联素升高 ($P < 0.01$), HDL 降低 ($P < 0.01$)。与高脂饲养组相比, 高脂饲养 + 瑞舒伐他汀组血清 TG、TC、LDL、脂联素降低 ($P < 0.05$), HDL 升高 ($P < 0.01$), 血糖无明显差异 ($P > 0.05$)。与对照组相比, 高脂饲养组心肌脂联素 mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 心肌脂联素受体 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。与高脂饲养组相比, 高脂饲养 + 瑞舒伐他汀组心肌脂联素 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 心肌脂联素受体 1 mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 心肌脂联素受体 2 mRNA 和蛋白表达无明显差异 ($P > 0.05$)。**结论** 高脂饲养大鼠过程中, 可出现血清脂联素升高, 心肌脂联素 mRNA 和蛋白表达上调, 心肌脂联素受体 mRNA 和蛋白表达下调, 瑞舒伐他汀可以部分逆转这些作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Rosuvastatin on Cardiac Expression of Adiponectin and Its Receptors in High-fat-fed Rats

YANG Li¹, TIAN Jian-Hui², WANG Xia-Xia³, MA Lei⁴, WANG Meng-Juan⁵, and YANG Jing⁶

(1. Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China; 2. Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China; 3. Department of Huangdao Cardiology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266500, China; 4. Department of PET-CT, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266101, China; 5. Emergency Department, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao, Shandong 266011, China; 6. Department of Huangdao Thyroid Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266500, China)

[KEY WORDS] Rosuvastatin; Adiponectin; Adiponectin Receptor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of rosuvastatin on cardiac expression of adiponectin and its receptors in high-fat-fed rats. **Methods** Male Wistar rats ($n = 48$) were randomly divided into three groups: control group (NC), high fat fed group (HF), high fat fed + rosuvastatin group (HF + RS). After 20 weeks, serum concentrations of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL), high density lipoprotein cholesterol (HDL) and blood glucose (BG) were tested by automatic biochemical analyzer, serum level of adiponectin was measured by ELISA, the expression of adiponectin and its receptors in the myocardium was determined by RT-qPCR and Western blot. **Results** Compared with NC group, HF group showed increased serum TG, TC, LDL, BG and adiponectin ($P < 0.01$), and decreased serum HDL ($P < 0.01$). Compared with HF group, HF + RS group showed decreased serum TG, TC, LDL and adiponectin ($P < 0.05$), increased serum HDL ($P < 0.01$), and with no obvious difference in serum BG ($P > 0.05$). Compared with NC group, myocardial adiponectin expression were higher ($P < 0.01$), myocardi-

[收稿日期] 2013-11-12

[作者简介] 杨丽, 硕士, E-mail 为 375948656@qq.com。田建会, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向为高血压、冠心病基础与临床。王霞霞, 硕士, 主治医师, 研究方向为心电生理基础与临床。

al adiponectin receptors expression were lower ($P < 0.05$) in HF group. Compared with HF group, myocardial adiponectin expression were downregulated ($P < 0.05$), myocardial adiponectin receptor 1 expression were upregulated in HF + RS group ($P < 0.05$), while there was no obvious difference in myocardial adiponectin receptor 2 expression between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** There were elevation of serum adiponectin level and myocardial adiponectin expression, and reduction of myocardial adiponectin receptors expression in the process of feeding rats with high fat food. Rosuvastatin treatment could partly reverse these effects.

近年研究发现,心肌细胞可以合成并分泌脂联素,这种心肌细胞自身合成的脂联素可以通过自分泌和旁分泌方式在调节心功能和心肌细胞代谢方面发挥重要作用^[1]。脂联素受体分为脂联素受体 1 和脂联素受体 2,在骨骼肌、心脏和肾脏等组织和器官中均有表达。受体与球状或者全长脂联素结合后,通过 AMPK 和 PPAR 信号通路发挥作用^[2]。

他汀类药物是临床应用最为广泛的降脂药。随着人们对他汀类药物的深入研究,发现其还具有提高一氧化氮生物利用度、修复受损内皮、抗炎、抗氧化、促新生血管生成、稳定动脉粥样硬化斑块等多种作用。因为脂联素和他汀类药物都与糖脂代谢关系密切,所以近年来人们开始关注他汀类药物对脂联素及其受体的表达有无影响以及有何影响。本研究旨在探讨瑞舒伐他汀对高脂饮食饲养大鼠心肌脂联素、脂联素受体 1、脂联素受体 2 mRNA 和蛋白表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

8 周龄清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 48 只,体重 180 ~ 220 g,由青岛市药检所提供,动物合格证号为 0013669,所有动物实验操作在青岛大学医学院附属医院中心实验室内完成。大鼠脂联素 ELISA 试剂盒购自 Cusabio 公司。脂联素、脂联素受体 1、脂联素受体 2 引物购自上海生工生物工程有限公司, RNA 逆转录试剂盒及 qRT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。抗脂联素兔多克隆抗体、抗脂联素受体 1 兔多克隆抗体及抗脂联素受体 2 山羊多克隆抗体购自 Abcam 公司,抗 GAPDH 兔多克隆抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司,辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体、辣根酶标记兔抗山羊 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 模型制备

大鼠分笼适应性喂养 1 周。随后将大鼠随机分为三组,每组 16 只:对照组喂以标准饲料;高脂饲养组喂以高脂饲料;高脂饲养 + 瑞舒伐他汀组喂以高脂饲料

+ 瑞舒伐他汀 10 mg/(kg · d)。持续干预 20 周。药物溶于生理盐水中灌胃,未施加药物组给予生理盐水灌胃。高脂饲料的配制比例为:78.8% 普通饲料 + 10% 猪油 + 10% 蛋黄 + 1% 胆固醇 + 0.2% 猪胆盐。

1.3 取材

20 周末,禁食 12 h,电子称称体重。10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,左心室穿刺取血 5 mL, 4℃、10000 r/min 离心 15 min,分离血清, - 80℃ 保存。处死大鼠,分离左心室心肌组织,冷 PBS 洗净后置于去酶 EP 管中, - 80℃ 保存。

1.4 血清学检测

全酶法全自动生化分析仪测定血清甘油三酯 (triglyceride, TG)、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) 和血糖。ELISA 测定血清脂联素。

1.5 心肌脂联素、脂联素受体 1、脂联素受体 2 mRNA 测定

将 50 mg 采集好的左心室心肌组织置于无菌研磨皿中,加入适量液氮后迅速研磨至粉末状,倒入去酶 EP 管中,用 Trizol 法抽提总 RNA。采用紫外分光光度计测定 RNA 含量, D_{260}/D_{280} 均在 1.8 ~ 2.0 之间。采用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。然后应用 qRT-PCR 试剂盒进行 PCR 反应。各基因引物序列见表 1。PCR 反应条件:95℃ 30 s 一个循环,95℃ 5 s,60℃ 20 s 40 个循环。PCR 结束后确定 Ct 值,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

1.6 心肌脂联素、脂联素受体 1、脂联素受体 2 蛋白表达测定

取大鼠左心室心肌 50 mg,加入蛋白裂解液 250 μ L,超声波打碎后冰上静置 2 h,4℃ 12000 r/min 离心 10 min,吸取上清,按 4:1 的比例加入蛋白加样缓冲液,混匀后于 95℃ 水浴锅中加热 5 min。取 20 μ L 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,利用水浴式电印记法将蛋白转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,抗脂联素兔多克隆抗体 (1:500) 4℃ 封闭过夜,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:8000) 室温孵育 1 h,化学发光显影。再在同样的条件下按同样的方

法完成对脂联素受体 1、脂联素受体 2、GAPDH 蛋白表达的测定。使用 Quantity One 图像分析软件分析

条带灰度值,以脂联素、脂联素受体 1、脂联素受体 2 与相对应的 GAPDH 条带灰度比值作为相对表达量。

表 1. 用于测定基因表达的引物序列

Table 1. Primers sequences used for the determination of gene expression

基 因	上游序列	下游序列
脂联素	5'-AGAATCAAAGAACAGGCGACAG-3'	5'-GGATAACACTCAGAACCCTCAA-3'
脂联素受体 1	5'-GCAGACAAGAGCAGGAGTGT-3'	5'-AGCCCTCAGCGATAGTAAAGTG-3'
脂联素受体 2	5'-TGATGACAACCTCCCAAGAAGAT-3'	5'-TTCCACACCTTACAAACAAAC-3'
GAPDH	5'-TTCTAGAGACAGCCGCATCT-3'	5'-TGTAACCAGGTGTTCCGATA-3'

1.7 统计学方法

符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用两个独立样本的 t 检验,多组间比较用单因素方差分析, LSD 法进行组间分析。不符合正态分布的计量资料用中位数和四分位距表示,两组及多组间比较用两个或者多个样本的非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 体重变化

自干预第一周起,高脂饲养组、高脂饲养 + 瑞

舒伐他汀组大鼠体重增长均较对照组快。实验结束时,高脂饲养组大鼠体重明显高于对照组 (408 ± 22 g 比 328 ± 19 g; $P < 0.01$);高脂饲养组大鼠体重与高脂饲养 + 瑞舒伐他汀组相比差异无统计学意义 (408 ± 22 g 比 414 ± 18 g; $P > 0.05$)。

2.2 血脂、血糖变化

与对照组比较,高脂饲养组血清 TG、TC、LDLC 及血糖水平显著升高,血清 HDLC 水平显著降低 ($P < 0.01$);与高脂饲养组比较,高脂饲养 + 瑞舒伐他汀组血清 TG、TC、LDLC 水平显著降低,血清 HDLC 水平显著升高 ($P < 0.01$),血糖水平无明显变化 ($P > 0.05$;图 1)。

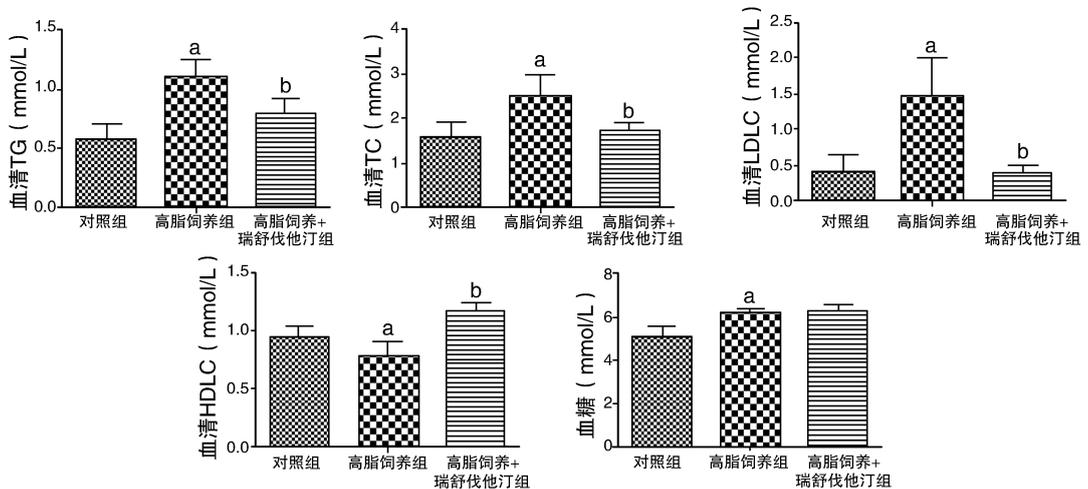


图 1. 三组大鼠血清 TG、TC、LDLC、HDLC 及血糖水平 a 为 $P < 0.01$,与对照组相比; b 为 $P < 0.01$,与高脂饲养组相比。

Figure 1. Levels of serum TG, TC, LDLC, HDLC and blood glucose in the three groups of rats

2.3 血清脂联素水平

与对照组比较,高脂饲养组血清脂联素水平显著升高 ($P < 0.01$);与高脂饲养组相比较,高脂饲养 + 瑞舒伐他汀组血清脂联素水平降低 ($P < 0.05$;图 2)。

2.4 心肌脂联素、脂联素受体 1、脂联素受体 2 mRNA 和蛋白的表达

与对照组比较,高脂饲养组心肌脂联素 mRNA

和蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$),心肌脂联素受体 1、2 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与高脂饲养组比较,高脂饲养 + 瑞舒伐他汀组心肌脂联素 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),心肌脂联素受体 1 mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.05$),而心肌脂联素受体 2 mRNA 和蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$;图 3 和 4)。

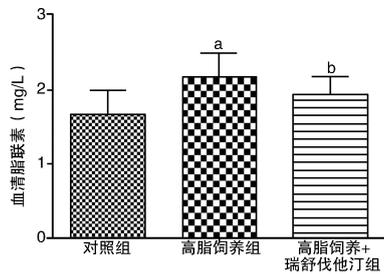


图 2. 三组大鼠血清脂联素水平 a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与高脂饲养组相比。

Figure 2. Levels of serum adiponectin in the three groups of rats

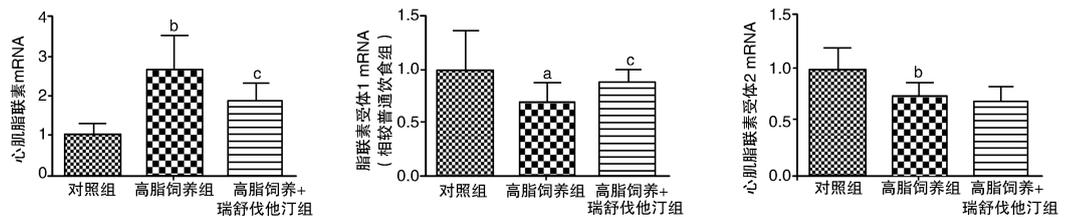


图 3. 三组大鼠心肌脂联素、脂联素受体 1、脂联素受体 2 mRNA 的表达 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.01$, 与高脂饲养组相比。

Figure 3. The mRNA expression of myocardial adiponectin and its receptors in the three groups of rats

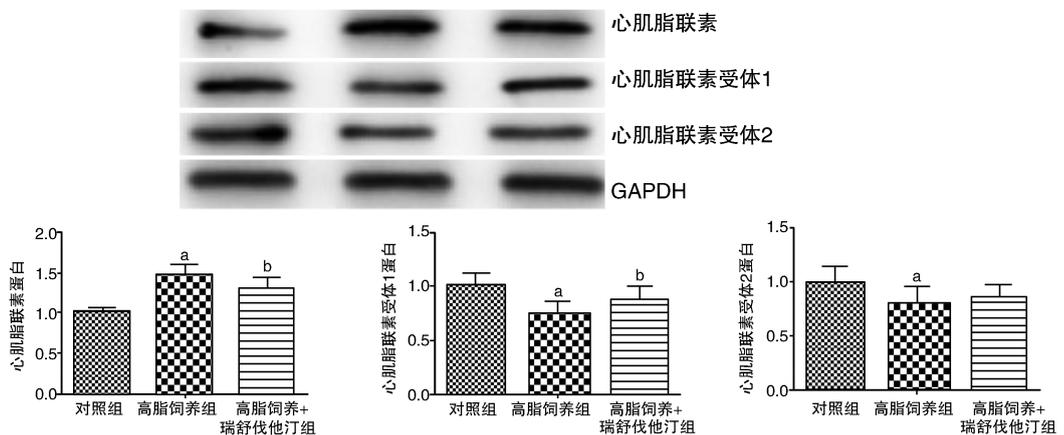


图 4. 三组大鼠心肌脂联素、脂联素受体 1 和脂联素受体 2 蛋白的表达 a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与高脂饲养组相比。

Figure 4. The protein expression of myocardial adiponectin and its receptors in the three groups of rats

推测应该也是与细胞缺氧和慢性炎症反应有关。但 Frystyk 等^[4]和 Schalkwijk 等^[5]对具有微血管病变,如冠状动脉疾病的 1 型糖尿病患者患者的研究中,观察到了总脂联素水平的升高。Cui 等^[6]在应用连续胰岛素注射诱导的高胰岛素血症大鼠模型中也发现,模型组血清和心肌脂联素均明显升高。与之相似,本研究结果也发现,高脂对照组较正常对照组血清和心肌脂联素水平明显升高。这种升高是贯穿于疾病的全过程还是短暂的代偿反应,尚不清楚,不过推测有可能是疾病早期针对升高的血脂、血糖或者胰岛素的一种短暂代偿反应。

3 讨论

绝大多数的研究结果认为,长期高脂饮食可以导致肥胖和糖脂代谢紊乱,继而引起脂肪组织和心肌组织脂联素表达下降。脂肪体积的增加可引起脂肪组织缺氧,增加内质网应激,同时还可以诱导巨噬细胞迁移到脂肪组织,引起轻度慢性炎症状态以及 TNF- α 、IL-6 及 IL-18 等前炎症因子的表达增加,从而抑制脂肪细胞脂联素 mRNA 的表达^[3]。而关于心肌组织脂联素表达下降的具体机制尚不清楚,

在患有 2 型糖尿病的状态下,心肌脂联素受体 1 的表达是降低的^[7-9]。Cui 等^[6]认为胰岛素可以通过 PI3K/Akt 和 FoxO1 通路下调心肌脂联素受体 1 的表达。Guo 等^[9]在大鼠实验中发现,高脂饮食饲养可以引起心肌脂联素受体 1 表达降低,虽然这种影响是否也是通过胰岛素起作用的,我们尚不清楚。但总体上,在代谢紊乱状态下,心肌脂联素的表达是趋向于降低的。对于心肌脂联素受体 2 表达的影响,多次动物实验结果与我们的结果一样,是降低的^[8-10],但尚未见有关于相关机制的报道。而通常情况下,配体和受体的变化具有方向一致性。

而本研究中血清脂联素水平和心肌脂联素表达升高的同时却出现了心肌脂联素受体表达的降低。对此可能的解释是,在疾病早期,升高的血糖、血脂或者胰岛素引起脂联素表达的代偿性升高,而对脂联素受体的表达却具有直接的抑制作用,随着疾病的进展,明显的细胞缺氧以及慢性炎症反应导致脂联素的表达减少,此时脂联素受体的表达可进一步减少。所以,在疾病的早期阶段,脂联素及其受体的表达变化方向会出现不一致。

他汀类药物作为心血管内科的常用药,近年来关于其对脂联素的表达是否有影响以及具有何种影响的研究越来越多。虽然具体机制尚不清楚,但普伐他汀已被证实可以呈剂量依赖性地促进脂联素及其受体的表达及分泌,且这种促进作用不依赖于或者说不完全依赖于血脂的降低^[11-14]。而目前对于阿托伐他汀和辛伐他汀的研究结果总体来说分三种:促进表达、不影响表达以及抑制表达。瑞舒伐他汀作为一种较新的他汀类药物,正因其强效的降脂作用及确切的升高 HDLC 的作用,而越来越广泛地应用于临床治疗。Koh 等^[15] 在一项随机、单盲、安慰剂平行对照研究中认为,瑞舒伐他汀可以降低高胆固醇患者的血清脂联素水平。Yokoyama 等^[16] 对因冠状动脉疾病开展手术患者的研究显示,瑞舒伐他汀对血清和内脏脂肪组织脂联素的表达无明显影响。Qu 等^[17] 对高胆固醇血症患者的短期研究证实,瑞舒伐他汀可以显著升高血清脂联素水平。总体来说,目前关于瑞舒伐他汀对脂联素表达影响的研究仍较少,且结果缺乏统一性。而关于瑞舒伐他汀对心肌脂联素及其受体表达的影响,缺乏较可靠的相关研究。在本研究中我们发现,在应用高脂饮食饲养大鼠的过程中,瑞舒伐他汀可以使升高的血清脂联素水平和心肌脂联素表达量降低,同时使降低的心肌脂联素受体 1 的表达量升高,但对于心肌脂联素受体 2 的表达量无明显影响。

总的来说,我们的实验结果揭示,应用高脂饮食饲养大鼠的过程中,可以出现大鼠血清脂联素水平升高,心肌脂联素 mRNA 和蛋白表达上调,心肌脂联素受体 mRNA 和蛋白表达下调,而瑞舒伐他汀干预可以起到部分逆转作用。

[参考文献]

- [1] Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, et al. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes[J]. FEBS Lett, 2005, 579; 5: 163-169.
- [2] 刘利梅, 赵亚莉, 李丽, 等. 脂联素的信号转导通路[J]. 生理

科学进展, 2005, 36 (2): 130-132.

- [3] Su H, Lau WB, Ma XL, et al. Hypoadiponectinemia in diabetes mellitus type 2: molecular mechanisms and clinical significance [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38 (12): 897-904.
- [4] Frystyk J, Tarnow L, Hansen T, et al. Increased serum adiponectin levels in type 1 diabetic patients with microvascular complications [J]. Diabetologia, 2005, 48: 1911-918.
- [5] Schalkwijk CG, Chaturvedi N, Schram MT, et al. Adiponectin is inversely associated with renal function in type 1 diabetic patients [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 91: 129-135.
- [6] Cui XB, Wang C, Li L, et al. Insulin decreases myocardial adiponectin receptor 1 expression via PI3K/Akt and FoxO1 pathway [J]. Cardiovasc Res, 2012, 93 (1): 69-78.
- [7] Guo Z, Zhang R, Li J, et al. Effect of telmisartan on the expression of adiponectin receptors and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the heart and aorta in type 2 diabetic rats [J]. Cardiovasc Diabetol, 2012, 11: 94.
- [8] Guo Z, Qin Z, Zhang R, et al. Effect of rosiglitazone on the expression of cardiac adiponectin receptors and NADPH oxidase in type 2 diabetic rats [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 685 (1-3): 116-125.
- [9] Guo Z, Zheng C, Qin Z, et al. Effect of telmisartan on the expression of cardiac adiponectin and its receptor 1 in type 2 diabetic rats [J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63 (1): 87-94.
- [10] Younan SM, Rashed LA, Abd El Aziz OM, et al. Cardioprotective modulation of cardiac adiponectin and adiponectin receptors by omega-3 in the high-fat fed rats [J]. Chin J Physiol, 2013, 56 (2): 65-76.
- [11] Kai T, Kanamasa K. Effects of increasing the dose of pravastatin on serum adiponectin level in Japanese mild hypercholesterolemic and hypertensive patients [J]. Arzneimittelforschung, 2009, 59 (9): 445-450.
- [12] Saito Y, Fujioka D, Kawabata K, et al. Statin reverses reduction of adiponectin receptor expression in infarcted heart and in TNF-alpha-treated cardiomyocytes in association with improved glucose uptake [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293 (6): H3490-497.
- [13] Takagi T, Matsuda M, Abe M, et al. Effect of pravastatin on the development of diabetes and adiponectin production [J]. Atherosclerosis, 2008, 196 (1): 114-121.
- [14] Chen Y, Ohmori K, Mizukawa M, et al. Differential impact of atorvastatin vs pravastatin on progressive insulin resistance and left ventricular diastolic dysfunction in a rat model of type II diabetes [J]. Circ J, 2007, 71 (1): 144-152.
- [15] Koh KK, Quon MJ, Sakuma I, et al. Differential metabolic effects of rosuvastatin and pravastatin in hypercholesterolemic patients [J]. Int J Cardiol, 2013, 166 (2): 509-515.
- [16] Yokoyama H, Saito S, Daitoku K, et al. Effects of pravastatin and rosuvastatin on the generation of adiponectin in the visceral adipose tissue in patients with coronary artery disease [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2011, 25 (3): 378-387.
- [17] Qu HY, Xiao YW, Jiang GH, et al. Effect of atorvastatin versus rosuvastatin on levels of serum lipids, inflammatory markers and adiponectin in patients with hypercholesterolemia [J]. Pharm Res, 2009, 26 (4): 958-964.

(此文编辑 文玉珊)