

# 苯扎贝特对小鼠体内胆固醇逆转运的影响

骆杨平<sup>1</sup>, 董静<sup>2</sup>, 赵水平<sup>3</sup>

(1. 湖南省人民医院, 湖南省长沙市 410002; 2. 湖南省肿瘤医院 ICU, 湖南省长沙市 410013;  
3. 中南大学湘雅附二医院, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 苯扎贝特; 胆固醇逆转运; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 观察苯扎贝特干预后小鼠血脂浓度变化, 以及血清、肝脏及粪便中<sup>3</sup>H-胆固醇占经腹腔注射<sup>3</sup>H-胆固醇总量的百分比, 探讨苯扎贝特对小鼠体内胆固醇逆转运的影响。**方法** 28 只 C57BL/6 小鼠随机分为四组, 分别给予普通饲料、不同剂量的苯扎贝特(0.1%、0.25%、0.5%) 添加普通饲料喂养 4 周后, 腹腔注射经乙酰化低密度脂蛋白(ac-LDL)及<sup>3</sup>H-胆固醇处理过的小鼠巨噬细胞悬液(每只鼠 0.5 mL, 细胞数达  $5.0 \times 10^6$ ), 单独笼养 24 h 后取血, 酶法测定血脂, 并测定血清、肝脏和粪便中<sup>3</sup>H-胆固醇含量(占注射总量的百分比)。**结果** 不同剂量苯扎贝特(0.1%、0.25%、0.5%) 干预后, 高密度脂蛋白胆固醇(HDL)水平升高, 甘油三酯(TG)水平降低, 呈剂量相关性趋势。不同剂量苯扎贝特(0.1%、0.25%、0.5%) 干预后, 小鼠血清<sup>3</sup>H-胆固醇含量较对照组显著增加, 分别增加 100%、131%、110%; 小鼠肝脏<sup>3</sup>H-胆固醇含量较对照组显著增加, 分别增加 86.4%、52.3%、51.6%; 小鼠粪便<sup>3</sup>H-胆固醇含量较对照组显著增加, 分别增加 110%、140%、160%。**结论** 苯扎贝特剂量依赖性增加 HDL, 降低 TG。苯扎贝特能促进体内胆固醇逆转运, 加速胆固醇由粪便清除, 利于动脉粥样硬化的防治。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

## Effect of Bezafibrate on Reversing Cholesterol Transport in Mice in Vivo

LUO Yang-Ping<sup>1</sup>, DONG Jing<sup>2</sup>, and ZHAO Shui-Ping<sup>3</sup>

(1. Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410002, China; 2. Hunan Provincial Tumor Hospital, Changsha, Hunan 410013, China; 3. Second Xiangya Hospital of Center South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] Bezafibrate; Reverse Cholesterol Transport; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of bezafibrate on reversing cholesterol transport from macrophage to feces in vivo, serum lipid profiles of mice were tested after bezafibrate administration. The <sup>3</sup>H-cholesterol contents in serum, liver and feces in mice were measured to explore the effect of bezafibrate on reversing cholesterol transport from macrophage to feces in vivo. **Methods** 28 male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups and treated with ordinary diet or plus different dosage (0.1%, 0.25% and 0.5%) of bezafibrate for 4 weeks, then these mice were injected intraperitoneally with <sup>3</sup>H-cholesterol-labeled and cholesterol-loaded RAW264.7 macrophages (0.5 mL/mice, the amount of cells achieve  $5.0 \times 10^6$ ). Serum lipid profiles were determined by enzymatic method. Serum and liver tissues were harvested at 24 h, feces were collected. And all samples were analyzed for the appearance of <sup>3</sup>H-tracer (as the percentage of the total injected counts). **Results** Bezafibrate (0.1%, 0.25% and 0.5%) dose-dependently and increased the level of high density lipoprotein cholesterol (HDL) and reduced the level of triglyceride (TG). After 24 hours of being intraperitoneally injected, the serum <sup>3</sup>H-cholesterol levels in the mice treated with different dosage of bezafibrate (0.1%, 0.25% and 0.5%) were significantly higher by 100%, 131% and 110% compared with those in the control ( $P < 0.05$ ), the liver <sup>3</sup>H-cholesterol levels in the mice treated with different dosage of bezafibrate (0.1%, 0.25% and 0.5%) were significantly higher 86.4%, 52.3%, 51.6% compared with those in the control ( $P < 0.05$ ), the feces <sup>3</sup>H-cholesterol levels in the mice treated with different dosage of bezafibrate (0.1%, 0.25% and 0.5%) were significantly higher by 110%, 140% and 160% compared with those in the control ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Bezafibrate significantly and

[收稿日期] 2014-03-25

[作者简介] 骆杨平, 博士, 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 betterluoy@ sina.com。董静, 博士, 主治医师, 主要从事血脂与动脉粥样硬化研究。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, E-mail 为 zhaosp@ medmail.com.cn。

dose-dependently reduces the level of TG and increases the level of HDLC, bezafibrate promotes cholesterol reverse transport in vivo, accelerates clearance of cholesterol via feces, so it will be in favor of the prevention of atherosclerosis.

血浆中低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)水平与心血管疾病的发病率呈正相关,而高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平与其呈负相关。然而,在接受他汀类药物治疗的有效降低LDLC水平患者中,仍然有冠状动脉事件发生<sup>[1,2]</sup>。研究证实升高HDLC水平和/或改善高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)功能降低心血管病发病率和死亡率。苯扎贝特是目前临床上常用的调血脂药物,可以明显降低甘油三酯(triglyceride, TG)和升高HDLC。研究表明,该药能有效延缓动脉斑块的形成,降低冠心病患者的临床终点事件发生的危险性,提示苯扎贝特具有抗动脉粥样硬化的作用<sup>[3]</sup>。其机制除了与调节血脂如降低TG和升高HDLC外,可能还具有调脂外的作用。目前,国内外尚无苯扎贝特对体内胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)的影响的研究报道。本研究采用一种替代方法测定胆固醇的逆转运效率,即给苯扎贝特干预的小鼠腹腔注射<sup>3</sup>H-胆固醇标记的巨噬细胞,24 h后检测血清及粪便中氚的放射活性。测定苯扎贝特作用后小鼠体内RCT的效率,从而了解苯扎贝特对小鼠血脂和在体RCT的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物与试剂

28只10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, SPF级,饲养在中南大学湘雅二医院实验动物中心SPF级饲养房中。RAW264.7巨噬细胞株购自中国科学院上海细胞库。苯扎贝特药粉由天津天士力药业集团提供。胎牛血清购自Hyclone公司,DMEM培养基购自Sigma公司,乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein, ac-LDL)购自中国科学院协和生化研究所,其余试剂为国产产品。

### 1.2 动物干预

10周龄C57BL/6小鼠28只,毛细管眶内取血75  $\mu$ L,酶法测定血脂均相近,随机分为四组:对照组予以普通饲料饲养;0.1%苯扎贝特组予以添加0.1%苯扎贝特的普通饲料饲养;0.25%苯扎贝特组予以添加0.25%苯扎贝特的普通饲料饲养;0.5%苯扎贝特组予以添加0.5%苯扎贝特的普通

饲料饲养。每只小鼠每天平均摄食量为4.2~4.5 g,自由饮水。4周后,给小鼠腹腔注射制备好的巨噬细胞悬液(每只鼠0.5 mL),之后单独笼养24 h,24 h后小鼠体重 $27.97 \pm 1.70$  g。用1%戊巴比妥0.1 mL腹腔注射麻醉后摘取眼球取血于EP管中(放置冰上),12000 r/min离心5 min,取20  $\mu$ L血清进行液闪计数,计算血液总的放射活性及占注射总量的百分比。另外,取200  $\mu$ L血清行血脂检测。

### 1.3 细胞培养及干预

RAW264.7小鼠巨噬细胞培养条件:37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、100%湿度培养箱,10%胎牛血清DMEM培养液。制备干预液:取所需ac-LDL(终浓度50 mg/L)于15 mL离心管,加入所需<sup>3</sup>H-胆固醇(干预浓度5 mCi/L),37 $^{\circ}$ C孵育30 min,再加入DMEM培养液,混匀,将制备好的干预液加至培养瓶,细胞置于37 $^{\circ}$ C培养箱培育48 h。收获干预好的细胞,并预备给小鼠腹腔注射:胰酶消化细胞,细胞吹散离心后加入预冷的DMEM冲洗2遍,1000 r/min离心2 min,将细胞悬浮于不含FBS的DMEM,调整细胞数为 $1 \times 10^8$ /L后,细胞悬液转移至1 mL注射器(置于冰上);吸取剩余的细胞悬液80  $\mu$ L 3次,分别放置于3个EP管中,离心后,各吸取10  $\mu$ L上清,用液闪计数器进行计数,吸除剩余上清,加入200  $\mu$ L正己烷/异丙醇(3:2),混匀,离心,吸取有机相于液闪瓶内,真空干燥,加入液闪液进行计数(计算出细胞内和上清液计数的比例,细胞内应>95%),每只鼠0.5 mL,剩余的细胞悬液分别测定细胞及上清的放射活性,保证上清所占比例少于5%,注射悬液的放射活性为 $6.2 \times 10^6$  cpm。

### 1.4 粪便处理

收集单独笼养48 h所有粪便,用镊子拣取小鼠粪便至EP管中并称重,将其转移至研钵中,加入50%乙醇溶液溶解粪便使其浓度为114 g/L,充分混匀1~2 min,取200  $\mu$ L混匀液至20 mL液闪瓶内,加入10 mL液闪液,振荡混匀,过夜;第二天再振荡液闪瓶,进行液闪计数。计算粪便总的放射活性,并计算其占注射活性的百分比。

### 1.5 肝脏脂质抽提

处死小鼠,取肝脏组织用冷生理盐水冲洗后,用滤纸吸干,称重,-20 $^{\circ}$ C保存。准确称取10 mg冰冻肝组织放入匀浆器,加入200  $\mu$ L提取剂正己烷/异丙醇(3:2),充分振摇10 min,收集上清液,再重复抽提

2 遍,真空干燥,将干燥脂质溶于 2 mL 闪烁液,振荡混匀,即可作为分析样品进行液闪计数,计算肝脏总的放射活性,并计算其占注射总量的百分比。

### 1.6 血脂测定

采用常规方法测定血脂全套,包括血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、TG 和 HDLC。按 Friedewald 公式计算血清 LDLC 水平。

### 1.7 统计学方法

对主要指标进行正态性检验,正态分布的统计指标以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 One-way ANOVA 分析进行

组间比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 苯扎贝特干预后小鼠的血脂水平变化

不同剂量苯扎贝特干预后 TC、LDLC 无明显变化,随着苯扎贝特剂量的增加 HDLC 呈上升趋势, TG 呈下降趋势。0.5% 苯扎贝特组 HDLC 水平较对照组明显增高,增加 26.4%,同时 TG 水平较对照组明显降低,降低 34% ( $P < 0.01$ ; 表 1)。

表 1. 苯扎贝特干预后小鼠的血脂水平变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ , mmol/L)

Table 1. Effects of bezafibrate on the levels of blood lipids ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ , mmol/L)

分 组	TG	TC	LDLC	HDLC
对照组	1.44 ± 0.05	3.18 ± 0.25	0.82 ± 0.13	1.40 ± 0.03
0.1% 苯扎贝特组	1.29 ± 0.12	3.03 ± 0.49	0.80 ± 0.11	1.59 ± 0.11 <sup>b</sup>
0.25% 苯扎贝特组	1.03 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.96 ± 0.79	0.69 ± 0.15	1.69 ± 0.11 <sup>b</sup>
0.5% 苯扎贝特组	0.95 ± 0.12 <sup>bc</sup>	2.80 ± 0.35	0.67 ± 0.13	1.77 ± 0.10 <sup>bc</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 0.1% 苯扎贝特组比较。

### 2.2 苯扎贝特干预后小鼠的<sup>3</sup>H-胆固醇分布情况

不同剂量苯扎贝特(0.1%、0.25%和0.5%)干预后,小鼠血清<sup>3</sup>H-胆固醇含量较对照组显著增加,分别增加 100%、131%、110%;小鼠肝脏<sup>3</sup>H-胆固醇含量较对照组显著增加,分别增加 86.4%、52.3%、51.6%;小鼠粪便<sup>3</sup>H-胆固醇含量较对照组显著增加,分别增加 110%、140%、160% (表 2)。

表 2. 苯扎贝特干预后小鼠的<sup>3</sup>H-胆固醇分布情况 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ , mmol/L)

Table 2. Effects of bezafibrate on the <sup>3</sup>H-cholesterol contents in serum, liver and feces in mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ , mmol/L)

分 组	血清	肝脏	粪便
对照组	2.07 ± 0.53	4.20 ± 1.00	0.70 ± 0.09
0.1% 苯扎贝特组	4.14 ± 0.75 <sup>b</sup>	7.83 ± 1.49 <sup>b</sup>	1.48 ± 0.67 <sup>a</sup>
0.25% 苯扎贝特组	5.79 ± 0.72 <sup>bc</sup>	6.40 ± 1.37 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.61 <sup>a</sup>
0.5% 苯扎贝特组	5.35 ± 0.83 <sup>bc</sup>	6.37 ± 1.46 <sup>a</sup>	1.82 ± 0.72 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 0.1% 苯扎贝特组比较。

## 3 讨论

多余的胆固醇经转运体介导从外周细胞流出,转移至 HDL,随血液循环至肝脏,与肝细胞表面 HDL 受体结合,被选择性摄取后转变为胆汁酸盐,继而经由粪便排除体外,此过程称为 RCT<sup>[4]</sup>。巨噬细胞吞噬 LDL 后,大量胆固醇的过度堆积形成泡沫细胞,沉积于血管壁形成早期的粥样硬化病变。巨

噬细胞在内膜下吞噬过多的胆固醇形成泡沫细胞是动脉粥样硬化发生的重要病理基础<sup>[5]</sup>。因此,巨噬细胞 RCT 对动脉粥样硬化的发展起着最为关键的作用。巨噬细胞 RCT 构成了体内过多的胆固醇清除的有效途径,大量的证据表明,巨噬细胞胆固醇流出和 RCT 在预防动脉粥样硬化中起主要的作用<sup>[6]</sup>。长期以来缺少对在体 RCT 不同步骤的整体调节评价方法。本研究在文献<sup>[7,8]</sup>的方法基础上建立了替代方法测定胆固醇的逆转运效率。即给小鼠腹腔注射<sup>3</sup>H-胆固醇标记的巨噬细胞,24 h 后检测血清及粪便中氚的放射活性来反映胆固醇的逆转运效率。通过对苯扎贝特干预后 C57BL/6 小鼠血清、粪便中氚活性的检测,测定苯扎贝特作用后小鼠体内 RCT 的效率,从而了解苯扎贝特对小鼠血脂和在体 RCT 的影响。

苯扎贝特为贝特类药物,是人工合成的过氧化物体增殖物激活型受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ) 配体,为一类常用的调脂药,能显著降低 TG,中度降低 TC 和 LDLC,并能升高 HDLC,能有效地延缓动脉粥样硬化病变发展的进程<sup>[9]</sup>。苯扎贝特抗动脉粥样硬化的机制除了与其调节血脂如降低 TG 和升高 HDLC 外,可能还具有调脂外的作用如抗炎、抗凝作用。对于 RCT 作用的研究,苯扎贝特仅限于对 RCT 中转运蛋白如 ATP 结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 的影响<sup>[10]</sup>。目前国内外尚无苯扎贝特



对体内 RCT 影响的研究报道。

本研究测定了小鼠血清、肝脏和粪便中的<sup>3</sup>H-胆固醇活性。标记的<sup>3</sup>H-胆固醇从巨噬细胞流出至血液循环,再由 HDL 转运到肝脏,以胆汁酸盐的形式分泌,之后随粪便排出。通过此研究方法证实体内多余胆固醇的逆转运过程。我们观察到苯扎贝特作用后,小鼠血清中<sup>3</sup>H-胆固醇含量增加,肝脏和粪便中<sup>3</sup>H-胆固醇含量增多。这些结果表明,苯扎贝特不仅能促进巨噬细胞胆固醇流出,而且可促进体内胆固醇的逆转运。药理学和靶向基因研究证实 PPAR $\alpha$  增加胆固醇流出,调节肝脏胆汁酸的合成和代谢,促进 RCT<sup>[11]</sup>。研究显示苯扎贝特上调体外培养的巨噬细胞 ABCA1 表达,减少巨噬细胞胆固醇堆积<sup>[10]</sup>。研究显示贝特类通过激动 PPAR $\alpha$ ,使之与 SR-BI 的 PPAR $\alpha$  反应元件结合,增加 SR-BI 启动子活性<sup>[12]</sup>。用非诺贝特喂养家兔 3 周能增加循环中 HDLC 和胆固醇酯的浓度,改变 HDL 颗粒的大小,同时非诺贝特喂养家兔血清 HDL 促进胆固醇由富含 SR-BI 受体的 Fu5AH 流出。研究表明贝特类通过 SR-BI 途径可以改变 HDL 质和量<sup>[13]</sup>。苯扎贝特促进小鼠体内 RCT 的机制还有待进一步探索。

血浆中 HDLC 水平与动脉粥样硬化性心血管病的发病危险之间呈独立的负相关。HDL 不仅是接受从巨噬细胞流出的胆固醇,而且能将胆固醇转运到肝脏,因此能促进巨噬细胞 RCT<sup>[4]</sup>。苯扎贝特能使 TC 降低 10%~20%,TG 降低 20%~60%,HDLC 升高 10%~30%。在 BIP 研究中,苯扎贝特使心脏病死亡、非致死性心肌梗死减少 17%,这种临床获益可能与升高 HDLC 有关<sup>[14]</sup>。本研究观察到苯扎贝特干预 4 周后,小鼠血清的脂质谱发生明显变化,苯扎贝特剂量依赖性增加 HDLC,降低 TG。贝特类促进 HDL 主要载脂蛋白 ApoA I 和 ApoA II 的表达,增加 HDL 的合成;抑制胆固醇酯转运蛋白活性,促进并增强 HDL 从富含 TG 的脂蛋白中摄取脂质可能增加 HDLC<sup>[15]</sup>。另一方面,增加三种 HDL 受体即 ABCA1 及 SR-BI 的表达,从而加速肝外细胞胆固醇的流出和被肝细胞所摄取,促进 RCT。结合本研究中苯扎贝特促进了巨噬细胞 RCT,我们认为苯扎贝特升高 HDLC 水平对促进巨噬细胞 RCT 有积极意义,对于预防和延缓动脉粥样硬化的发生发展亦有重要意义。

通过增加 HDLC 浓度、加速巨噬细胞胆固醇流出和 RCT,可能改善动脉粥样硬化,是动脉粥样硬化心血管疾病最具发展前景的治疗靶点,也是评价干预动脉粥样硬化措施的依据。苯扎贝特升高

HDLC 水平,促进巨噬细胞 RCT,加速胆固醇由粪便清除,发挥抗动脉粥样硬化作用。

#### [参考文献]

- [1] Mahdy Ali K, Wonnerth A, Huber K, et al. Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL cholesterol-current therapies and future opportunities [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 167 (6): 177-194.
- [2] 苑聪,吴洁. 高密度脂蛋白胆固醇与心血管剩余风险[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (12): 1 045-050.
- [3] Tenenbaum A, Fisman EZ. Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2012, 11: 125.
- [4] Farmer JA, Liao J. Evolving concepts of the role of high-density lipoprotein in protection from atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2011, 13 (2): 107-114.
- [5] 胡海燕,李跃艳,李春霞. 丹参酮 II A 上调 ABCA1 表达促进泡沫细胞胆固醇流出[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2012, 32 (6): 488-495.
- [6] Marcel YL, Ouimet M, Wang MD. Regulation of cholesterol efflux from macrophages[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2008, 9: 455-461.
- [7] Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, et al. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo[J]. *Circulation*, 2003, 108: 661-663.
- [8] 倪占玲,王丽霞,赵水平. 普罗布考对体内巨噬细胞胆固醇逆转运的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (8): 695-699.
- [9] Goldenberg I, Benderly M, Goldbourt U. Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2008, 4 (1): 131-141.
- [10] Cabrero A, Cubero M, Llaverías G, et al. Differential effects of peroxisome proliferator-activated receptor activators on the mRNA levels of genes involved in lipid metabolism in primary human monocyte-derived macrophages [J]. *Metabolism*, 2003, 52 (5): 652-657.
- [11] Akita N, Tsujita M, Yokota T, et al. High density lipoprotein turnover is dependent on peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$  in mice[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17: 1 149-159.
- [12] Lopez D, McLean MP. Activation of the rat scavenger receptor class B type I gene by PPARalpha [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 251 (1-2): 67-77.
- [13] Fournier N1, Tuloup-Minguez V, Pourci ML. Fibrate treatment induced quantitative and qualitative HDL changes associated with an increase of SR-BI cholesterol efflux capacities in rabbits[J]. *Biochimie*, 2013, 95 (6): 1 278-287.
- [14] Goldenberg I, Boyko V, Tennenbaum A, et al. Long-term benefit of high-density lipoprotein cholesterol-raising therapy with bezafibrate: 16-year mortality follow-up of the bezafibrate infarction prevention trial[J]. *Arch Intern Med*, 2009, 169 (5): 508-514.
- [15] Bandgar BP, Sarangdhar RJ, Fruthous K, et al. Synthesis and biological evaluation of ester prodrugs of Bezafibrate as orally active hypolipidemic agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 57: 217-224.

(此文编辑 文玉珊)