

# 依泽替米贝通过上调甾醇调控元件结合蛋白 2、低密度脂蛋白受体促进肝细胞摄取低密度脂蛋白胆固醇

方敏<sup>1</sup>, 李亚梅<sup>1</sup>, 向德标<sup>1</sup>, 龚勇珍<sup>1</sup>, 廖端芳<sup>1</sup>, 张彩平<sup>2</sup>, 郑熙隆<sup>1</sup>

(1.湖南中医药大学干细胞中药调控与应用实验室,湖南省长沙市 410208;

2.南华大学药学与生物科学学院生物化学与分子生物学教研室,湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 依泽替米贝; 甾醇调控元件结合蛋白 2; 低密度脂蛋白受体; 低密度脂蛋白胆固醇

[摘要] **目的** 探讨依泽替米贝对肝脏低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)摄取的影响及其机制。**方法** 使用 5 mg/(kg·d)依泽替米贝灌胃高脂模型小鼠,4 个月后测定其血液中总胆固醇(TC)、LDL-C 和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的含量;HE 染色观察肝脏组织形态。依泽替米贝(30 μmol/L)与低密度脂蛋白(25 mg/L)共同孵育肝脏 HepG2 细胞 24 h,油红 O 染色观察细胞的脂滴分布情况;酶学方法检测细胞内 TC、游离胆固醇(FC)和胆固醇酯(CE)的含量;采用 DiI-LDL 检测细胞对 LDL-C 的摄取情况;实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测甾醇调控元件结合蛋白 2(SREBP-2)和低密度脂蛋白受体(LDLR)在 mRNA 及蛋白水平的表达;流式细胞术检测肝细胞膜上 LDLR 含量。**结果** 依泽替米贝降低小鼠血浆中 TC 和 LDL-C 的含量,升高 HDL-C 含量,减少肝脏脂质沉积;提升 HepG2 细胞摄取 LDL-C 的能力,促进 FC 向 CE 转化;上调 HepG2 细胞中 SREBP-2 和 LDLR 的表达水平,并增加 LDLR 在细胞膜上的分布。**结论** 依泽替米贝通过上调 SREBP-2、LDLR 促进肝细胞摄取 LDL-C。

[中图分类号] R966

[文献标识码] A

## Ezetimibe promotes hepatic uptake of low density lipoprotein cholesterol by up-regulating the expressions of sterol regulatory element binding protein-2 and low density lipoprotein receptor

FANG Min<sup>1</sup>, LI Ya-Mei<sup>1</sup>, XIANG De-Biao<sup>1</sup>, GONG Yong-Zhen<sup>1</sup>, LIAO Duan-Fang<sup>1</sup>, ZHANG Cai-Ping<sup>2</sup>, ZHENG Xi-Long<sup>1</sup>

(1.Division of Stem Cell Regulation and Application, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2.Department of Biochemistry & Molecular Biology, Pharmacy & Biological Science School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Ezetimibe; Sterol regulatory element binding protein-2; Low density lipoprotein receptor; Low density lipoprotein cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of ezetimibe on hepatic low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) uptake and its mechanism. **Methods** The hyperlipidemia model mice had intragastric administration of 5 mg/(kg·d) ezetimibe. After four months, the contents of total cholesterol (TC), LDL-C and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were measured in the blood of mice, and liver tissue morphology was observed by HE staining. HepG2 cells were incubated with ezetimibe (30 μmol/L) and low density lipoprotein (25 mg/L) for 24 hours. The distribution of lipid droplets in cells was observed by oil red O staining. Enzymatic method was used to detect the contents of intracellular TC, free cholesterol (FC) and cholesteryl ester (CE). The uptake of LDL-C in cells was detected by DiI-LDL. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were used to detect sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) and low density lipoprotein receptor (LDLR) expressions at mRNA and protein level, respectively. LDLR

[收稿日期] 2017-11-21

[修回日期] 2018-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81600291、81773736)

[作者简介] 方敏,硕士研究生,研究方向为心血管药理学,E-mail 为 15116223247@163.com。通讯作者郑熙隆,教授,博士研究生导师,研究方向为心血管药理学,E-mail 为 xilongtoo@gmail.com。通讯作者张彩平,副教授,硕士研究生导师,研究方向为心血管疾病病因与发病机制,E-mail 为 zhangcpin@163.com。

content in the hepatic cell membrane was detected by flow cytometry. **Results** Ezetimibe reduced the content of TC and LDLC in the plasma of mice, increased the content of HDLC and reduced the lipid deposition in liver. Ezetimibe enhanced the ability of HepG2 cells to take LDLC, and promoted the transformation of FC into CE. Ezetimibe up-regulated the expressions of SREBP-2 and LDLR in HepG2 cells, and increased the distribution of LDLR on the cell membrane.

**Conclusion** Ezetimibe can promote the uptake of LDLC in liver cells by up-regulation of SREBP-2 and LDLR.

依泽替米贝 (ezetimibe) 是一种胆固醇吸收抑制剂,通过降低小肠胆固醇的吸收而发挥作用<sup>[1]</sup>。在临床应用中,当高脂血症患者不耐受他汀类药物时,依泽替米贝可单独或和其他降胆固醇药物联合使用<sup>[2-4]</sup>,以降低血液中的低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。血脂主要由血浆中的中性脂肪如甘油三酯和类脂如胆固醇等组成,血液中过多的胆固醇主要经过肝脏摄取,在肝脏中转化代谢后经过胆汁,或者直接经胆管进入肠道以排出体外。有报道<sup>[5]</sup>指出,依泽替米贝可通过调节甾醇调控元件结合蛋白 2 (sterol regulatory element binding protein-2, SREBP-2) 和小凹蛋白 1 (caveolin-1) 影响丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路,进而抑制大鼠血管平滑肌细胞中胆固醇的蓄积;另有研究<sup>[6]</sup>表明,依泽替米贝可通过 caveolin-1/MAPK 信号通路抑制巨噬细胞衍变成泡沫细胞。提示依泽替米贝对血脂所致的动脉粥样硬化过程可能起缓解作用。

循环系统中胆固醇过高是致动脉粥样硬化及心血管疾病发生的重要影响因素之一。血液中胆固醇类物质的含量与肝脏的摄取能力密切相关,肝细胞膜上的低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 能调控肝细胞对胆固醇的摄取<sup>[7-8]</sup>。血液中过多的 LDLC 与肝细胞膜上 LDLR 结合而被摄入入肝脏进行代谢,从而维持循环系统中血脂的平衡<sup>[8-9]</sup>。目前依泽替米贝以抑制小肠对胆固醇吸收的机制用于临床,而本研究旨在探讨依泽替米贝对肝脏摄取 LDLC 的影响及其机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂、仪器及动物

HepG2 细胞购于中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。胎牛血清 (美国 Gibco 公司),兔抗人 LDLR 一抗 (英国 Abcam 公司),山羊抗人 SREBP-2 一抗 (美国 R&D 公司),兔抗人  $\beta$ -actin 一抗 (中国武汉三鹰生物技术有限公司)。PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 及 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex

Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus) 购于日本 TaKaRa 公司。载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E gene knocked-out, ApoE<sup>-/-</sup>) 小鼠 (北京中国科学院动物研究所), C57BL/6 雄性小鼠 (湖南省斯莱克景达实验动物有限公司)。

### 1.2 实验分组及高脂模型建立

取 6 周雄性 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 28 只,随机分成 4 组,每组 7 只。(1) ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠正常饮食 (normal diet) 组:简称 ApoE<sup>-/-</sup> ND 组;(2) ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠高脂饮食 (high fat diet) 组:简称 ApoE<sup>-/-</sup> HFD 组;(3) ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠高脂饮食+依泽替米贝组:简称 ApoE<sup>-/-</sup> HFD+依泽替米贝组;(4) ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠高脂饮食+辛伐他汀 (simvastatin) 组:简称 ApoE<sup>-/-</sup> HFD+SV 组;(5) 另取 C57BL/6 小鼠 7 只,正常饮食,作为阴性对照组 (简称 C57 ND 组)。各组小鼠均正常饮食 1 周后,根据分组采用高脂饲料 [21% (w/w) 猪油+0.15% 胆固醇] 喂养造模,同时用依泽替米贝和辛伐他汀采用灌胃的方法干预相对应的分组小鼠,剂量及给药频率均为 5 mg/(kg·d),干预时间为 4 个月;动物实验严格遵循实验动物伦理委员会的相关规定。

### 1.3 小鼠血浆中血脂含量测定

各组小鼠干预 4 个月后,通过眼眶取血,并用全自动生化分析仪测定血液中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、LDLC 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 的含量。

### 1.4 小鼠肝组织的 HE 染色

小鼠干预 4 个月后,颈椎脱臼法处死小鼠,于小鼠腹部剖开,取出肝脏,立即置于多聚甲醛溶液中固定,24 h 后进行石蜡切片和 HE 染色。

### 1.5 HepG2 细胞的油红 O 染色

HepG2 细胞用含 10% 血清的 DMEM 培养基培养,取对数生长期细胞,6 孔板内每孔接种  $1 \times 10^5$  个细胞,孵育 24 h 贴壁后,分别用药物干预并进行如下分组:(1) 对照 (control) 组;(2) 模型 (model) 组 (25 mg/L LDL);(3) 溶剂组 [25 mg/L LDL+二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)];(4) 依泽替米贝组 (25 mg/L LDL+30  $\mu$ mol/L 依泽替米贝)。于 37℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 24 h,取出用多聚甲醛固定 30 min,加油红 O 染色 8 min,苏木精染色 4 s,再用甘油封片,用倒置显微镜观察,所看到的

HepG2 细胞颜色为:脂滴呈橘红色,细胞核呈蓝色。  
1.6 HepG2 细胞中总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯含量测定

实验设计分组及药物干预按照“1.5”的方法,于 37℃ 含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h 后,收集 5×10<sup>6</sup> 个细胞于离心管内,加入氯仿、异丙醇、NP-40 混合液,超声波破细胞膜,真空干燥去除有机溶剂,胆固醇测定缓冲液溶解干粉脂质,取 10 μL 提取液用于样品检测,根据荧光定量胆固醇测定试剂盒说明书进行具体操作。BCA 法蛋白质定量标化胆固醇值 (ng/μg);设置 Ex 为 535 nm,Em 为 590 nm,用多功能荧光酶标仪检测细胞内 TC、游离胆固醇 (free cholesterol, FC)、胆固醇酯 (cholesterol ester, CE) 的含量。

1.7 HepG2 细胞中 DiI-LDL 检测

取对数生长期的 HepG2 细胞,6 孔板内每孔接种 1×10<sup>5</sup> 个细胞,培养 24 h 后贴壁,然后分别用药物干预,具体分组如下:(1)对照 (control) 组;(2)模型 (model) 组 (25 mg/L LDL);(3)依泽替米贝组 (25 mg/L LDL+30 μmol/L 依泽替米贝);(4)阳性对照组[0.1%脂蛋白缺乏血清 (lipoprotein deficiency serum, LPDS)];(5)阴性对照组[10 mg/L 25-羟胆固醇 (25-hydroxycholesterol, 25-HC)]。置于细胞培养箱中培养 24 h 后取出,将各组培养液更换为 0.02% 的 LPDS+DMEM,每组加入 10 mg/L 的 DiI-LDL,37℃ 避光孵育 4 h,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗涤 3 次,用含 4% 多聚甲醇的 PBS 溶液固定 10 min, PBS 洗涤 3 次,用 Hoechst33342 染色 20 min, PBS 洗涤 3 次,把 PBS 吸干净,加入抗荧光猝灭液。DiI 染色后的细胞膜呈橙红色荧光, Hoechst33342 染色后的细胞核呈蓝色荧光。

1.8 实时荧光定量 PCR

取各组对数生长期的 HepG2 细胞,用 Trizol 法提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度后,根据逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA 以作为荧光定量 PCR 的模板。根据 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书进行扩增,扩增体系为 25 μL,反应条件如下:95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 延伸 30 s, 反应 40 个循环。实验结果用相对定量 2<sup>-ΔΔCt</sup> 进行分析。LDLR、SREBP-2 及内参 β-actin 的引物序列见表 1。

表 1. 引物序列  
Table 1. Primer sequences

名 称	引物序列
LDLR	F:5'-GACTGGTCAGATGAACCCATCAAAG-3' R:5'-AGGTCATTGCAGACGTGGGAAC-3'
SREBP-2	F:5'-CAGCAGCCTTTGATATACCAGAATG-3' R:5'-AGGATGTCACCAGGCTTTGGAC-3'
β-actin	F:5'-TCTCGGTCTCCATCACAC-3' R:5'-GCCGATCCACACGGAGTAC-3'

1.9 Western blot 检测

取各组对数生长期的 HepG2 细胞,加 RIPA 裂解液提取总蛋白,用 BCA 法测定总蛋白浓度。总蛋白上样量为 40 μg,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶电压为 70 V,分离胶电压为 100 V。电泳结束后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜,将膜置于 5% 脱脂牛奶中室温下封闭 1 h,用 TBST 洗膜液洗涤 3 次,根据 Marker 条带指示,裁剪出膜上相应的蛋白条带,用相应一抗于 4℃ 孵育过夜 (各一抗稀释浓度比例如下:SREBP-2 为 1:500, LDLR 为 1:1 000, β-actin 为 1:3000)。洗膜 3 次后加入相应二抗于室温孵育 1 h,再洗膜 3 次后采用电化学发光法检测蛋白质条带。

1.10 流式细胞术检测 HepG2 细胞膜上 LDLR 含量

收集进行相应干预处理过的 HepG2 细胞,稀释成每毫升 4×10<sup>5</sup> 个细胞,加 10 μL 异硫氰酸荧光素标记的 LDLR 抗体,混匀后避光于冰上反应 30 min,离心后用 PBS 洗涤 2 遍,采用流式细胞仪检测细胞膜上 LDLR 的含量。

1.11 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间结果分析采用单因素方差分析。所有数据采用 GraphPad Prism 6.01 统计软件进行处理,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 依泽替米贝对小鼠血脂水平的影响

通过采用 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠造高脂模型,药物干预 4 个月后,检测血浆中 TC、LDLC 和 HDLC 的含量变化。结果显示 ApoE<sup>-/-</sup> HFD 组血浆 TC 和 LDLC 含量明显高于 ApoE<sup>-/-</sup> ND 组,说明小鼠高脂模型造模成功;依泽替米贝干预后与 ApoE<sup>-/-</sup> HFD 组相比 TC 和 LDLC 水平均明显降低,甚至还低于 ApoE<sup>-/-</sup> HFD+SV 阳性对照组;而依泽替米贝的干预处理可在一定程度上升高小鼠血浆中 HDLC 含量 (表 2)。



表 2. 各组血脂水平( $n=7$ )  
Table 2. Blood lipid levels in each group( $n=7$ )

分 组	TC( mmol/L)	LDLC( mmol/L)	HDLC( mmol/L)
C57 ND 组	1.87±0.06	0.25±0.01	0.95±0.04
ApoE <sup>-/-</sup> ND 组	9.08±0.21 <sup>a</sup>	1.77±0.12 <sup>a</sup>	0.29±0.02 <sup>a</sup>
ApoE <sup>-/-</sup> HFD 组	31.92±1.30 <sup>b</sup>	9.61±0.42 <sup>b</sup>	0.14±0.01 <sup>b</sup>
ApoE <sup>-/-</sup> HFD+依泽替米贝组	18.16±0.52 <sup>d</sup>	4.61±0.34 <sup>d</sup>	0.28±0.02 <sup>c</sup>
ApoE <sup>-/-</sup> HFD+SV 组	27.16±1.17 <sup>c</sup>	7.28±0.49 <sup>d</sup>	0.16±0.03

a 为  $P<0.01$ ,与 C57 ND 组比较;b 为  $P<0.01$ ,与 ApoE<sup>-/-</sup> ND 组比较;c 为  $P<0.05$ ,d 为  $P<0.01$ ,与 ApoE<sup>-/-</sup> HFD 组比较。

2.2 小鼠肝组织脂质沉积观察

HE 染色结果显示,高脂模型小鼠肝组织有不同程度的脂肪变性及空泡样变,变性的肝细胞体积明显增大,胞浆内出现大量脂肪空泡。ApoE<sup>-/-</sup> HFD+依泽替米贝组、ApoE<sup>-/-</sup> HFD+SV 组与 ApoE<sup>-/-</sup> HFD 组比较,肝脏脂肪变性及空泡样变的程度明显降低(图 1)。

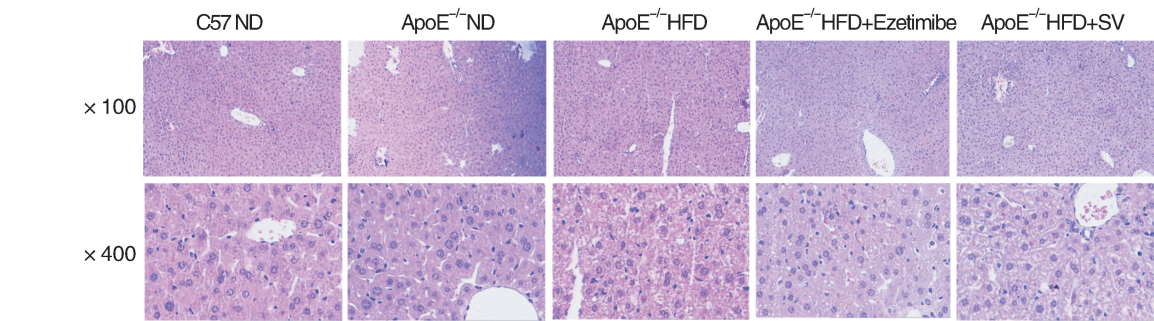


图 1. 各组肝组织脂质沉积情况  
Figure 1. Lipid deposition in liver tissues of each group

2.3 依泽替米贝对 HepG2 细胞摄取 LDLC 的影响

HepG2 细胞油红 O 染色结果显示,与对照组相比,模型组肝细胞内脂滴明显增多;溶剂组(DMSO 组)与模型组有明显差异;与模型组相比,依泽替米贝组细胞内脂滴明显增加。说明依泽替米贝能促进 HepG2 细胞对 LDLC 的摄取(图 2)。

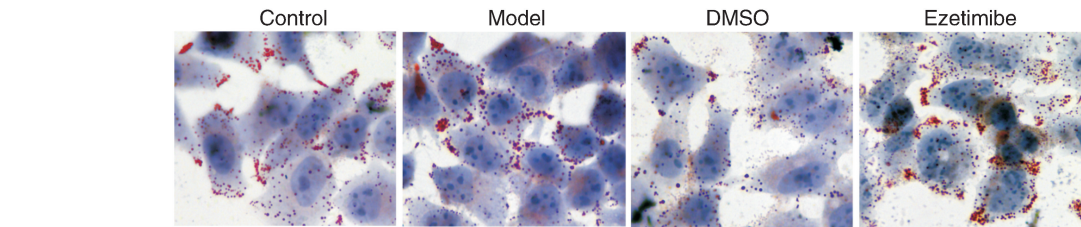


图 2. HepG2 细胞脂滴情况  
Figure 2. Lipid droplets in HepG2 cells

HepG2 细胞 TC 和 FC 含量测定结果显示,模型组与对照组相比,TC、FC、CE 含量均有所增高;依泽替米贝组与模型组相比,TC、CE 含量进一步增高,但 FC 含量无明显改变;溶剂组与模型组相比,CE 有所增加。说明依泽替米贝可以促进 FC 向 CE 转化,并促进肝细胞对胆固醇的摄取(表 3)。

HepG2 细胞的 DiI-LDL 检测实验结果表明:与对照组相比,模型组橙红色荧光强度明显增高;与模型组相比,阳性对照组(LPDS 组)橙红色荧光强度增高,阴性对照组(25-HC 组)橙红色荧光强度明显降

表 3. 各组 HepG2 细胞 TC、FC 和 CE 含量测定结果( $\text{ng}/\mu\text{g}$ ,  $n=3$ )

Table 3. TC, FC and CE contents of HepG2 cells in each group( $\text{ng}/\mu\text{g}$ ,  $n=3$ )

分 组	TC	FC	CE
对照组	47.33±3.44	43.02±3.15	4.30±0.36
模型组	104.70±3.40 <sup>a</sup>	50.89±2.20	53.85±3.44 <sup>a</sup>
溶剂组	116.50±1.38 <sup>b</sup>	66.48±3.06 <sup>b</sup>	50.03±2.04
依泽替米贝组	136.70±4.34 <sup>c</sup>	49.72±6.60	87.03±7.53 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,c 为  $P<0.01$ ,与模型组比较。



低,依泽替米贝组橙红色荧光强度明显增高。说明依泽替米贝能促进 HepG2 细胞对 LDLC 的摄取(图 3)。

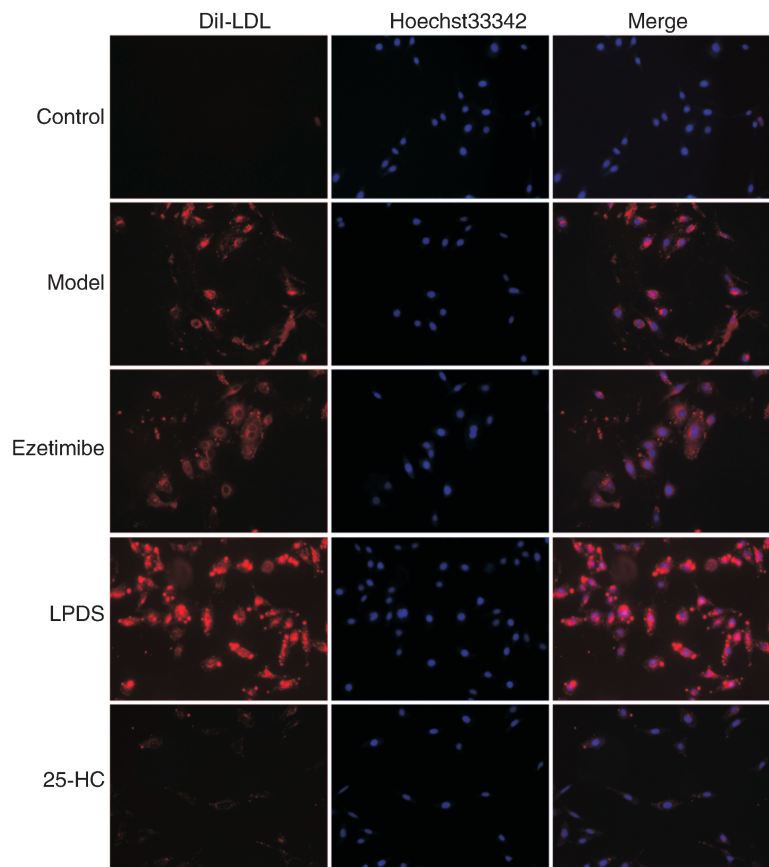


图 3. HepG2 细胞的 DiI-LDL 摄取实验结果  
Figure 3. Experimental results of DiI-LDL uptake in HepG2 cells

2.4 依泽替米贝对 HepG2 细胞 SREBP-2 和 LDLR 表达及细胞膜上 LDLR 分布的影响

实时荧光定量 PCR 实验结果表明,依泽替米贝干预处理后,HepG2 细胞中的 SREBP-2 和 LDLR 的 mRNA 表达明显上调(图 4)。Western blot 实验结果表明,与对照组、模型组、阴性对照组(25-HC 组)相比,依泽替米贝组、阳性对照组(LPDS 组)HepG2

细胞 SREBP-2 和 LDLR 蛋白表达明显上调(图 5)。采用流式细胞术检测 HepG2 细胞膜上 LDLR 蛋白表达发现,与对照组、模型组相比,依泽替米贝干预处理后 HepG2 细胞膜上的 LDLR 表达增多(图 6)。说明依泽替米贝可能通过上调 SREBP-2 而促进 LDLR 的表达。

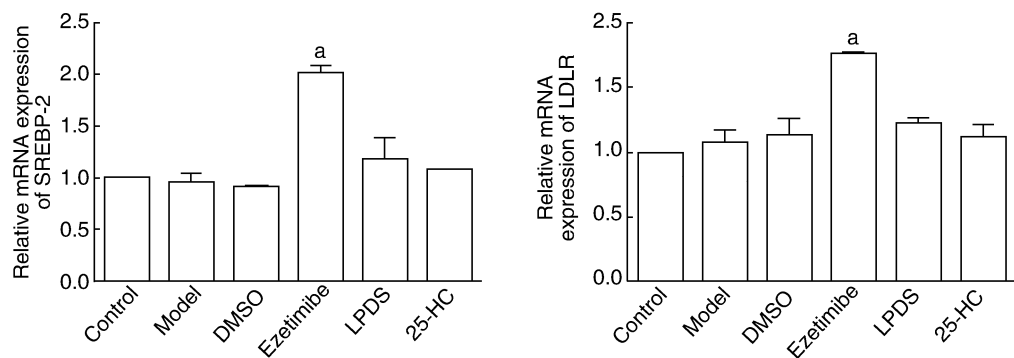


图 4. 各组 HepG2 细胞 SREBP-2 和 LDLR 的 mRNA 表达  
Figure 4. The mRNA expressions of SREBP-2 and LDLR in HepG2 cells in each group

a 为  $P<0.01$ ,与模型组比较。

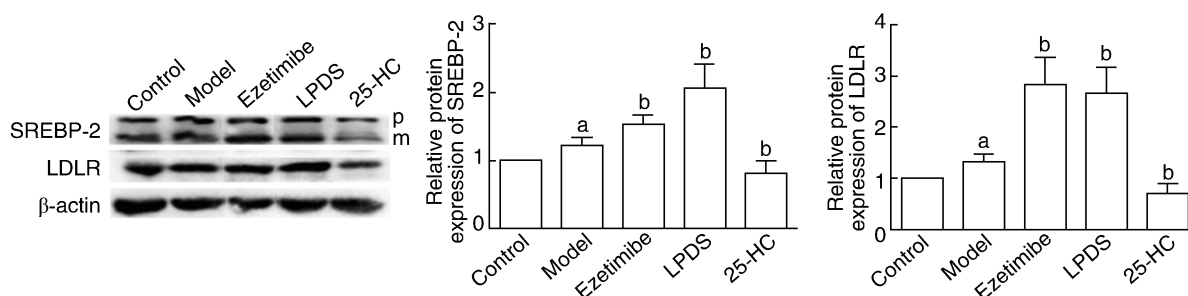


图 5. Western blot 检测 HepG2 细胞 SREBP-2 和 LDLR 蛋白表达 左边电泳图, p 为前体蛋白, m 为成熟蛋白。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

Figure 5. Expressions of SREBP-2 and LDLR protein in HepG2 cells were detected by Western blot

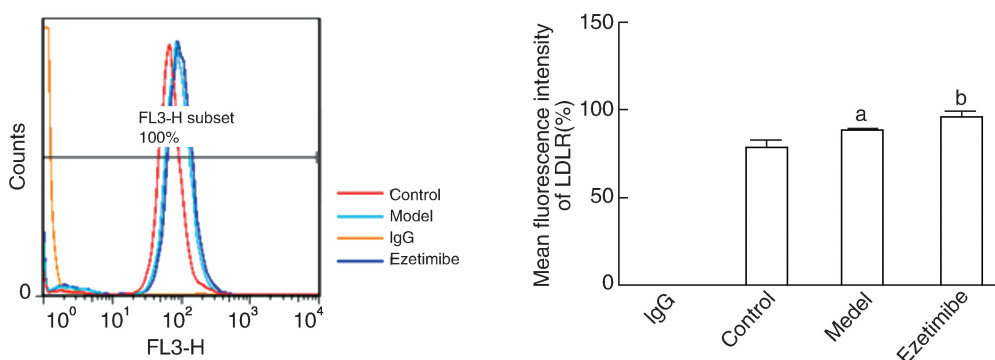


图 6. 流式细胞术检测 HepG2 细胞膜上 LDLR 蛋白表达 a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

Figure 6. Expression of LDLR protein on HepG2 cell membrane was detected by flow cytometry

### 3 讨论

随着人们生活水平提高,血脂增高及脂质代谢异常的人数日趋增多。血脂升高是造成动脉粥样硬化、冠心病和糖尿病等心血管疾病的一个重要原因。人体肝脏在脂类及胆固醇的合成和代谢过程中充当着十分重要的角色,肝脏细胞膜上 LDLR 能调节血脂 LDLC 的平衡,通过受体介导的内吞作用,增加 LDLR 表达可提高血浆中 LDLC 的清除<sup>[10-11]</sup>,进而减缓心血管疾病的发生发展。LDLR 表达水平主要由细胞内胆固醇的负反馈机制来调控,通过作用于 LDLR 启动子的固醇调节元件 1 和 SREBP 的特异性相互作用来调控 LDLR 的表达。当肝细胞内胆固醇含量丰富时, SREBP 锚定在内质网上,当细胞内胆固醇含量下降时, SREBP 会裂解并释放,然后作为核转录因子与 LDLR 的基因操纵子结合,从而增强 LDLR 在肝细胞膜上的表达,促进 LDLC 由血浆向肝细胞内转运,升高肝细胞内胆固醇水平,同时降低血浆 LDLC 含量<sup>[12-13]</sup>,从而降低心血管疾病发生的风险。

本研究发现依泽替米贝干预高脂模型 ApoE<sup>-/-</sup>

小鼠后,能降低其血液中 TC 和 LDLC 的含量,升高 HDLC 含量,并能减轻高脂小鼠肝脏的脂质沉积情况,提示依泽替米贝能够提高肝脏对血脂成分的再摄取功能并能增加脂质在肝脏中的代谢。本研究将依泽替米贝与 LDL 共同孵育肝脏 HepG2 细胞 24 h 后,采用油红 O 染色观察细胞的脂滴分布情况,用酶学方法检测细胞内 TC 和 FC 的含量,用 DiI-LDL 检测细胞对 LDL 的摄取情况,结果表明依泽替米贝能提升 HepG2 细胞摄取 LDLC 的能力。本研究进一步采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测 LDLR 和 SREBP-2 在 mRNA 及蛋白水平的表达情况,并采用流式细胞术检测 HepG2 细胞膜上 LDLR 的含量,结果表明依泽替米贝不仅能上调 HepG2 细胞中 SREBP-2 和 LDLR 的表达水平,而且可增加 LDLR 在其细胞膜上的分布。

LPDS 是 SREBP-2 的激活剂<sup>[14]</sup>,而 25-HC 是 SREBP-2 的抑制剂<sup>[14]</sup>,且 LDLR 的表达受 SREBP-2 的调控<sup>[15]</sup>。因此,在体外利用依泽替米贝干预 HepG2 细胞的研究过程中,本研究利用 LPDS 作为阳性对照,25-HC 作为阴性对照。HepG2 细胞的 DiI-LDL 摄取实验结果发现,LPDS 和 25-HC 分别干

预细胞后可明显促进和抑制其对 LDL 的摄取,且进一步的 Western blot 实验结果发现 LPDS 可上调 LDLR、SREBP-2 的表达,而 25-HC 可下调 LDLR、SREBP-2 的表达。依泽替米贝干预 HepG2 细胞后,同样明显促进了细胞对 LDL 的摄取,并上调了 LDLR、SREBP-2 的表达,与 LPDS 阳性对照的实验结果类似,说明依泽替米贝可通过上调 SREBP-2 促进 LDLR 的表达进而提升 HepG2 细胞对 LDL 的摄取能力。

综合分析本研究上述分子、细胞和动物 3 个层次的实验结果,我们可以得出如下结论:依泽替米贝通过上调 SREBP-2、LDLR 而对肝脏细胞的 LDLC 摄取能力起促进作用。

#### [参考文献]

- [1] Hammersley D, Signy M. Ezetimibe: an update on its clinical usefulness in specific patient groups[J]. Ther Adv Chronic Dis, 2017, 8(1): 4-11.
- [2] Bove M, Fogacci F, Cicero AFG. Pharmacokinetic drug evaluation of ezetimibe+simvastatin for the treatment of hypercholesterolemia[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2017, 13(10): 1 099-104.
- [3] Ferreira AM, Marques da Silva P. Defining the place of ezetimibe/atorvastatin in the management of hyperlipidemia[J]. Am J Cardiovasc Drugs, 2017, 17(3): 169-181.
- [4] Agarwala A, Kajani Z, Miedema MD, et al. The role of ezetimibe in the treatment of cardiovascular disease[J]. Curr Atheroscler Rep, 2016, 18(2): 8-14.
- [5] Qin L, Yang YB, Yang YX, et al. Ezetimibe suppresses cholesterol accumulation in lipid-loaded vascular smooth muscle cells in vitro via MAPK signaling[J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(9): 1 129-136.
- [6] Qin L, Yang YB, Yang YX, et al. Inhibition of macrophage-derived foam cell formation by ezetimibe via the caveolin-1/MAPK pathway [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016, 43(2): 182-192.
- [7] Kong WJ, Liu J, Jiang JD. Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation[J]. J Mol Med (Berl), 2006, 84(1): 29-36.
- [8] Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism[J]. J Mol Med (Berl), 1999, 77(3): 306-315.
- [9] Zhang Y, Ma KL, Ruan XZ, et al. Dysregulation of the low-density lipoprotein receptor pathway is involved in lipid disorder-mediated organ injury[J]. Int J Biol Sci, 2016, 12(5): 569-579.
- [10] Gong Y, Ma Y, Ye Z, et al. Thyroid stimulating hormone exhibits the impact on LDLR/LDLc via up-regulating hepatic PCSK9 expression[J]. Metabolism, 2017, 76(3): 32-41.
- [11] O'Hare EA, Wang X, Montasser ME, et al. Disruption of LDLR causes increased LDLc and vascular lipid accumulation in a zebrafish model of hypercholesterolemia[J]. J Lipid Res, 2014, 55(11): 2 242-253.
- [12] Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins[J]. Nat Med, 2004, 10(12): 1 344-351.
- [13] Dong B, Wu M, Li H, et al. Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1 alpha and SREBP2: mechanism for the resistance to LDLc lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters[J]. J Lipid Res, 2010, 51(6): 1 486-495.
- [14] Adams CM, Reitz J, De Brabander JK, et al. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs[J]. J Biol Chem, 2004, 279(50): 52 772-780.
- [15] Attie AD, Seidah NG. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions[J]. Cell Metab, 2005, 1(5): 290-292.

(此文编辑 曾学清)