

本文引用: 王翠婷, 张柏惠, 林萍, 等. 依折麦布长期干预对 LDLR^{+/-} 仓鼠高脂血症的影响及其对肝脏脂代谢基因的调控[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(1): 6-14.

· 代谢与心血管疾病专栏 ·

[文章编号] 1007-3949(2022)30-01-0006-09

依折麦布长期干预对 LDLR^{+/-} 仓鼠高脂血症的影响 及其对肝脏脂代谢基因的调控

王翠婷, 张柏惠, 林萍, 尹凡, 沈诺, 郭守东

(潍坊医学院药学院脂代谢与动脉粥样硬化研究室, 山东省潍坊市 261053)

[关键词] 依折麦布; 基因修饰仓鼠; 脂质稳态; 高脂血症

[摘要] **目的** 探讨依折麦布长期干预调控脂代谢的效果和对肝脏脂代谢基因的调控。**方法** 雄性低密度脂蛋白受体杂合子(LDLR^{+/-})仓鼠随机分为两组:空白对照组和依折麦布组[25 mg/(kg·d)]。动物高脂饮食同时给药20周后,收集血浆、肝脏等组织样本。分析血浆中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、总胆汁酸(TBA)、非酯化脂肪酸(NEFA)和谷草转氨酶(AST)水平;检测肝脏中TC和TG水平;借助ÄKTA快速蛋白液相色谱系统分离脂蛋白组分并检测各组分的TC和TG水平;采用实时荧光定量PCR和Western blot分别检测脂代谢相关基因和蛋白的表达。**结果** 依折麦布长期干预显著下调LDLR^{+/-}仓鼠血浆中的TC、TG、TBA、NEFA和AST水平以及载脂蛋白B(ApoB)蛋白表达水平,但对脂蛋白脂肪酶(LPL)的蛋白表达和活性以及前蛋白转化酶枯草溶菌素9(PCSK9)的蛋白水平无影响;在肝脏中,依折麦布显著降低了TC水平,但对TG无显著影响;在基因水平上,依折麦布显著上调肝脏中甾醇调节元件结合蛋白2(SREBP-2)和PCSK9的表达,同时下调了胆固醇7 α 羟化酶A1(CYP7A1)、三磷酸腺苷结合盒转运体G5(ABCG5)、ABCG8和肝X受体 α (LXR α)的表达。**结论** 在LDLR^{+/-}仓鼠中,依折麦布长期干预可显著降低高脂血症,并展现出对多种肝脏脂代谢相关基因表达调控的复杂性。

[中图分类号] R965;R5

[文献标识码] A

Effects of long-term ezetimibe on hyperlipidemia and genes involved in lipid metabolism in the liver of the LDLR^{+/-} hamster

WANG Cuiting, ZHANG Baihui, LIN Ping, YIN Fan, SHEN Nuo, GUO Shoudong

(Institute of Lipid Metabolism and Atherosclerosis, School of Pharmacy, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China)

[KEY WORDS] ezetimibe; gene-modified hamster; lipid homeostasis; hyperlipidemia

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of long-term ezetimibe on hyperlipidemia and genes involved in lipid metabolism in the liver of the LDLR^{+/-} hamster. **Methods** Male LDLR^{+/-} hamsters were randomly divided into two groups: the vehicle group and the ezetimibe group (25 mg/(kg·d)). Animals were free to access water and high-fat diet. After 20-week administration, hamsters were sampled after overnight fasting. The plasma levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), total bile acid (TBA), non-esterified fatty acid (NEFA) and aspartate aminotransferase (AST) were detected by assay kits. Mixed plasma in each group was further separated via an ÄKTA fast protein liquid chromatography (FPLC) system and the TC and TG levels in each fraction were also detected. The expression of multiple genes in the liver and proteins in the plasma was determined by qRT-PCR and Western blot, respectively. **Results** Long-term ezetimibe intervention significantly decreased plasma TC, TG, TBA, NEFA and AST levels, and apolipoprotein B protein expression in the LDLR^{+/-} hamsters, and had no effect on the protein levels of lipoprotein lipase (LPL) and proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9 (PCSK9) and the activity of LPL. Further ÄKTA-FPLC analysis demonstrated

[收稿日期] 2021-08-25

[修回日期] 2021-11-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82070469,81770463);潍坊医学院科研启动基金

[作者简介] 王翠婷,硕士研究生,药师,主要研究方向为临床药物的降脂新机制,E-mail为1102564524@qq.com。通信作者郭守东,博士,教授,硕士研究生导师,主要研究方向为脂代谢与动脉粥样硬化,特别是活性分子对脂代谢和动脉粥样硬化的调控机制,E-mail为SD-GUO@hotmail.com。

that ezetimibe reduced the TC and TG levels in all the lipoprotein fractions. In the liver, ezetimibe significantly reduced TC, but not TG concentration. Furthermore, ezetimibe significantly increased the mRNA expression of sterol regulatory element binding protein 2 and PCSK9 and dramatically decreased the expression of liver X receptor α , cholesterol 7 α -hydroxylase A1, ATP-binding cassette transporter G5 (ABCG5) and ABCG8 in the liver. **Conclusion** Long-term ezetimibe intervention reduces hyperlipidemia and displays complex modulatory effects on the genes involved in lipid homeostasis in LDLR^{+/-} hamsters.

在人类和啮齿动物体内,大约有 50% 的胆固醇被重新吸收^[1]。尼曼-匹克 C1 样蛋白 1 (niemann-pick C1-like 1, NPC1L1) 通过网格蛋白/接头蛋白介导的胞吞作用促进胆固醇摄取,而依折麦布可抑制上述胞吞过程^[2-4]。近年的临床研究已经证明依折麦布在防治心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 方面的有效性^[5-8]。对于通过其他干预手段无法达到降脂目标的高脂血症患者来说,依折麦布是一种不错的选择。

甾醇调节元件结合蛋白 2 (sterol regulatory element binding protein-2, SREBP-2) 是调控脂代谢特别是胆固醇的合成和摄取过程的重要转录因子,控制着关键基因的表达^[9]。近年的研究发现,依折麦布可作用于除 NPC1L1 以外的脂代谢相关基因和蛋白。例如,短期依折麦布干预 (≤ 7 天) 可上调小鼠和大鼠低密度脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, LDLR)、前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9, PCSK9) 和 SREBP-2 的 mRNA 表达^[10-13]。肝 X 受体 α (liver X receptor α , LXR α) 亦是机体胆固醇代谢途径的重要调控因子,其参与调节包括三磷酸腺苷结合盒转运体 (ATP-binding cassette transporter, ABC) 和胆固醇 7 α 羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase A1, CYP7A1) 在内的多个脂代谢基因的表达^[14]。依折麦布可通过上调 ABCG5 和 ABCG8 的基因表达促进大鼠和小鼠胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT)^[15-16]。但与小鼠不同,人和仓鼠表达胆固醇酯转运蛋白且在小肠分泌载脂蛋白 B (apolipoprotein B, ApoB)^[17-19]。因此,与小鼠相比,仓鼠的脂质谱与人类更为接近^[1, 18-19]。LDLR 在脂代谢中发挥重要作用^[1, 9],与 LDLR^{-/-} 仓鼠相比,LDLR^{+/-} 仓鼠仍保留部分 LDLR,可模拟 LDLR 突变造成的功能衰减,且高脂饮食亦可快速诱导 LDLR^{+/-} 仓鼠形成高脂血症^[18-19]。因此,LDLR^{+/-} 仓鼠较 LDLR^{-/-} 仓鼠在探讨活性分子的脂代谢中更具优势。此外,高脂血症患者一般需要长期的降脂药物治疗。本研究旨在采用血脂谱与人类相近的 LDLR^{+/-} 仓鼠模型^[18-19],探讨依折麦布长期干预对高脂血症的影响以及其对

肝脏脂代谢相关基因的调控作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料

依折麦布购自 Selleck 公司 (上海,中国)。兔抗脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 单克隆抗体和小鼠抗 SREBP-2 抗体购自 Santa Cruz 生物技术有限公司 (Santa Cruz, 美国)。兔抗 PCSK9、兔抗 Albumin 多克隆抗体和 ApoB 多克隆抗体购自 Proteintech 公司 (Rosemont, 美国)。小鼠抗 β -actin 抗体购至 Proteintech 生物技术有限公司 (Chicago, 美国)。增强型化学发光液 (enhanced chemiluminescence, ECL) 购自 Thermo Scientific Pierce 公司 (Rockford, IL, USA)。总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆汁酸 (total bile acid, TBA)、非酯化脂肪酸 (non-esterified fatty acid, NEFA) 和 LPL 活性试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司 (北京,中国)。谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 检测试剂盒购自重庆中元汇吉生物技术有限公司 (重庆,中国)。

1.2 实验动物及分组

10 只雄性成年 LDLR^{+/-} 仓鼠 (平均体质量约 152 g) 由北京大学 George Liu 教授课题组提供。本研究经潍坊医学院实验动物伦理委员会批准 (2020SDL106-1), 并严格遵循动物关怀与使用指南。高脂饲料 (21% 脂肪, 0.15% 胆固醇) 和普通饲料均购自北京华阜康生物科技有限公司 (北京,中国)。经过 1 周的适应阶段后 (普通饲料饲养), 将 LDLR^{+/-} 仓鼠随机分为空白对照组 ($n=5$, 饮用水灌胃) 和依折麦布组 [$n=5$, 依折麦布 25 mg/(kg · d) 灌胃]。本研究中依折麦布的给药剂量延用课题组之前干预 LDLR^{-/-} 仓鼠的给药剂量^[1]。仓鼠采用高脂饲养联合药物干预 20 周。末次给药后, 动物禁食 12 h, 在麻醉状态下收集血液和脏器样本。组织取样前, 通过左心室灌注 50 mL 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS), 冲洗脏器中残留的血液。

1.3 血浆分析

仓鼠血液于 4 ℃、1 100×g 离心 20 min, 收集血浆。使用检测试剂盒测定血浆 TC、TG、TBA、NEFA 和 AST 水平以及 LPL 活性。每组混合血浆 150 μL 上样 Superose™ 6 10/300 凝胶色谱柱, 并采用 ÄKTA 快速蛋白液相色谱 (fast protein liquid chromatography, FPLC) 系统分离脂蛋白。流动相为新鲜配制的生理盐水, 流速为 18 mL/h; 每组分收集 0.5 mL 流出液, 共收集 40 个组分。每组分取 0.1 mL 测定 TC 水平, 取 0.15 mL 采用 96 孔板测定 TG 的浓度^[20]。

1.4 肝脏中脂质的提取与测定

称取肝脏组织 100 mg 加入 1 mL 蛋白裂解缓冲液, 4 ℃ 静置 30 min。所得混合物在 70 ℃ 水浴中加热 10 min 后, 2 000×g 离心 15 min。根据说明, 采用检测试剂盒检测脂质水平^[21-22]。用 SpectraMax i3x 多模微孔板平台 (Molecular Devices, 美国) 记录检测结果。

1.5 Western blot

取各组血浆 10 μL, 加入 90 μL PBS 和 33 μL 4×蛋白上样缓冲液。将等量的血浆样本 (15 μL) 采用 4%~20% 梯度胶进行电泳分离, 并采用印迹法将蛋白电转到 PVDF 膜上。接下来, 采用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 2 h, 并用一抗在 4 ℃ 孵育过夜。次日, 采用 PBS-吐温 (PBS-Tween, PBS-T) 溶液洗涤后, 在室温下用辣根过氧化物酶结合的二抗再次孵育 PVDF 膜 2 h。PBS-T 溶液洗涤后, 采用 ECL 溶液覆盖目的条带区域, 借助勤翔 Clinx ChemiScope 6000 采集图像, 并以 Albumin (血浆样本) 或 β-actin (肝脏样本) 作为内参统计分析实验结果^[21-22]。

1.6 实时荧光定量 PCR

将 100 mg 的冷冻样品与液氮在预处理的无 RNA 酶的研钵中研磨。然后, 在研磨成细微颗粒的样品中加入 1.0 mL 的 TRIzol, 按照说明书提取总 RNA, 并采用 RNA 微量测定仪检测 RNA 的纯度和浓度。取 2 μg 总 RNA 借助市售的 cDNA 反转录试剂盒 (Solarbio 公司, 北京) 合成 cDNA, 再利用 SYBR Green qPCR Master Mix 和基因特异性引物, 在 ABI QuantStudio3 PCR 系统 (Thermo, 美国) 中进行 qRT-PCR 实验。本研究中所用引物如表 1 所示。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表达式计算, 以管家基因 GAPDH 作内参^[22]。

1.7 数据统计分析

基于至少 3 次的实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计分析, 采用

SPSS 17.0 软件进行 T-Test 分析。P<0.05 时认为具有统计学差异。

表 1. PCR 引物序列

Table 1. Primer sequences for PCR assay

基因		引物序列 (5'→3')
GAPDH	Forward	CTCCCACTCTTCCACCTTTGATGC
	Reverse	GTCCACCACTCTGTTGCTGTAGC
SREBP-2	Forward	GCTACTTCCTTAATCGTGCCAGAG
	Reverse	TCCTTGCTGCTGACTTGATTGAC
SREBP-1c	Forward	GCGGACGCAGTCTGGG
	Reverse	ATGAGCTGGAGCATGTCTTCAAA
ABCG5	Forward	CCATTCTGACTACGGAGAGTTG
	Reverse	CAGGGGTAACCACAGTTATTGAA
ABCG8	Forward	TGCTGGCCATCATAGGGAG
	Reverse	TCCTGATTTTCATCTTGCCACC
LDLR	Forward	GCCGGGACTGGTCAGATG
	Reverse	ACAGCCACCATTGTTGTCCA
LXRα	Forward	GCAGGACCAGCTCCAAGTAG
	Reverse	GCAGGACCAGCTCCAAGTAG
PCSK9	Forward	TGCTCCAGAGGTCATCACAG
	Reverse	GTCCCACTCTGTGACATGAAG
CYP7A1	Forward	GGTAGTGTGCTGTTGTATATGGGTTA
	Reverse	ACAGCCCAGGTATGGAATCAAC

2 结果

2.1 依折麦布显著降低 LDLR^{+/-} 仓鼠高脂血症

与空白对照组相比, 依折麦布显著下调 LDLR^{+/-} 仓鼠的血浆 TC [(2.8±0.2) mmol/L 比 (10.0±0.7) mmol/L, P<0.001] 和 TG [(1.3±0.2) mmol/L 比 (2.4±0.2) mmol/L, P<0.001] 水平 (图 1A 和图 1B)。基于 ÄKTA-FPLC 分离后, 与空白对照组相比, 依折麦布显著降低了所有脂蛋白, 包括极低密度脂蛋白 (very low-density lipoprotein, VLDL)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 和高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 组分中的胆固醇水平 (图 1C)。与空白对照组相比, 依折麦布显著降低 VLDL 颗粒上的 TG 水平 (图 1D)。上述研究结果说明, 依折麦布长期干预可在 LDLR^{+/-} 仓鼠中显著降低高脂饮食诱导的高脂血症。

2.2 依折麦布显著降低 LDLR^{+/-} 仓鼠血浆 ApoB 水平, 而对 PCSK9 和 LPL 无显著影响

依折麦布对血浆 PCSK9 和 LPL 的蛋白表达无显著影响 (图 2A 和图 2B)。此外, 依折麦布对 LPL

的活性亦无显著影响(图 2C)。值得关注的是,与空白对照组相比,依折麦布显著降低血浆中 ApoB100 和 ApoB48 的蛋白表达约 44% 和 54%,差

异有显著性($P<0.01$;图 2D)。上述结果说明,依折麦布长期干预可在 LDLR^{+/-} 仓鼠中显著降低血浆中 ApoB 的表达水平。

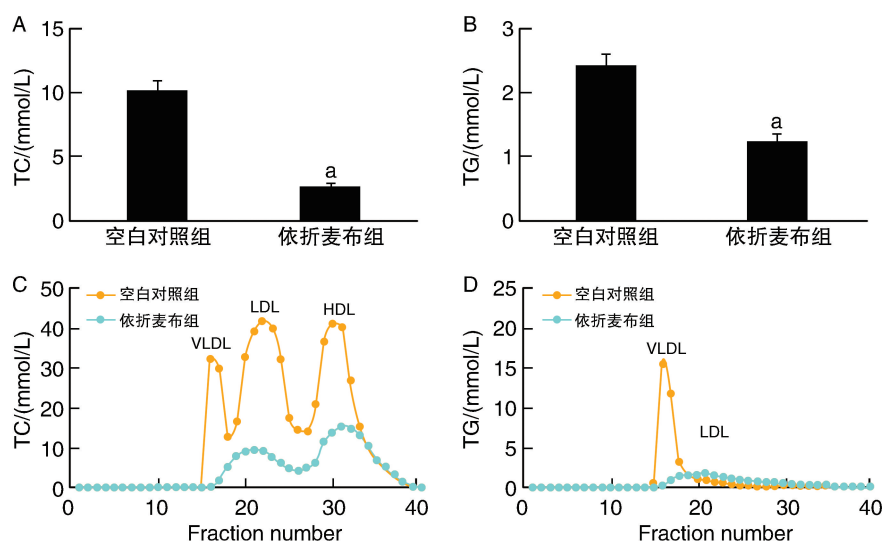


图 1. 依折麦布对 LDLR^{+/-} 仓鼠血脂谱的影响 ($n=5$)

A 为血浆 TC 浓度, B 为血浆 TG 浓度, C 为 ÄKTA-FPLC 分离后的血浆 TC 图谱, D 为 ÄKTA-FPLC 分离后的血浆 TG 图谱。a 为 $P<0.001$, 与空白对照组比较。

Figure 1. Effects of ezetimibe on plasma lipid profiles ($n=5$)

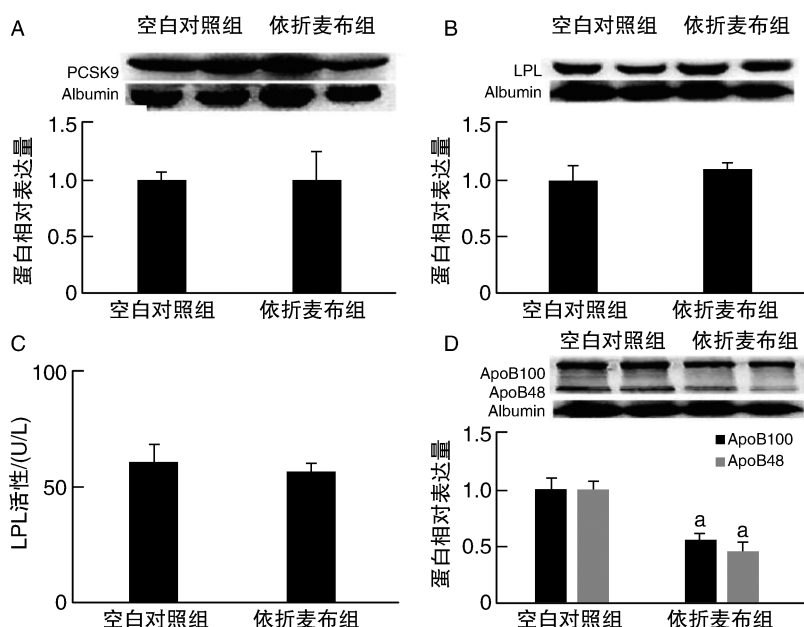


图 2. 依折麦布对 LDLR^{+/-} 仓鼠血浆 PCSK9、LPL 和 ApoB 蛋白表达以及 LPL 活性的影响 ($n=4$)

A 为血浆 PCSK9 蛋白表达及相对表达量, B 为血浆 LPL 蛋白表达及相对表达量, C 为血浆 LPL 活性, D 为血浆 ApoB 蛋白表达及相对表达量。a 为 $P<0.01$, 与空白对照组比较。

Figure 2. Effects of ezetimibe on the protein expression of PCSK9, LPL and ApoB and LPL activity ($n=4$)

2.3 依折麦布降低血浆中 TBA、NEFA 和 AST 含量
与空白对照组相比,依折麦布降低了血浆 TBA 浓度约 67.3% ($P<0.05$),降低了血浆 NEFA 浓度达

42.6% ($P<0.05$),降低血浆 AST 活性达 56.6% (图 3; $P<0.05$)。以上结果说明,依折麦布长期干预可显著降低 LDLR^{+/-} 仓鼠血液中 TBA、NEFA 和 AST

的含量。

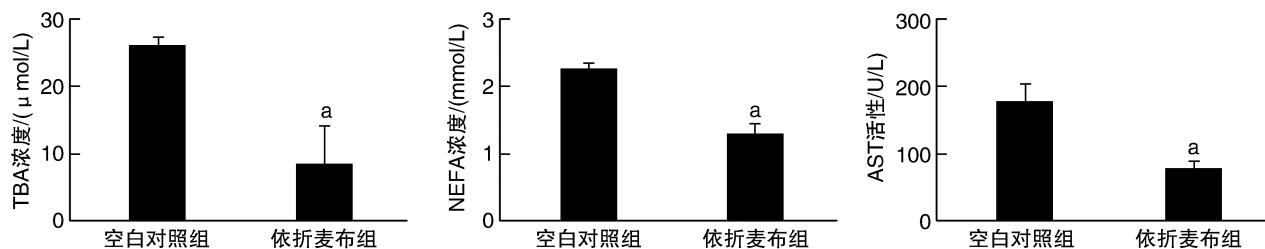


图 3. 依折麦布对 LDLR^{+/-} 仓鼠血浆 TBA 和 NEFA 浓度以及 AST 活性的影响 ($n=3$)

^a 为 $P<0.05$, 与空白对照组比较。

Figure 3. Effects of ezetimibe on the content of TBA and NEFA and the activity of AST ($n=3$)

2.4 依折麦布降低肝脏 TC 含量而对 TG 无显著影响

将 LDLR^{+/-} 仓鼠肝脏组织研磨后提取脂质, 并采用市售试剂盒测定 TC 和 TG 的含量。结果发现, 与空白对照组相比, 依折麦布降低了肝脏 TC 含量

约 55.4% ($P<0.01$; 图 4)。虽然依折麦布也降低了肝脏中 TG 的含量, 但与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$; 图 4)。以上结果说明, 依折麦布长期干预可显著下调 LDLR^{+/-} 仓鼠肝脏中的 TC 含量, 而对 TG 无显著影响。

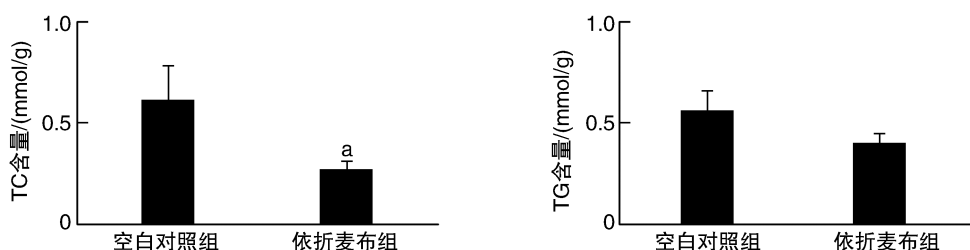


图 4. 依折麦布对 LDLR^{+/-} 仓鼠肝脏 TC 和 TG 含量的影响 ($n=5$)

^a 为 $P<0.01$, 与空白对照组比较。

Figure 4. Effects of ezetimibe on the content of TC and TG in the liver ($n=5$)

2.5 依折麦布对肝脏 SREBP-2 信号通路 mRNA 和蛋白表达的影响

与空白对照组相比, 依折麦布干预对肝脏 LDLR 的 mRNA 表达无显著影响 (图 5)。值得关注的是, 依折麦布分别上调了 PCSK9 和 SREBP-2 的 mRNA 表达约 106.3% ($P<0.05$) 和 276.1% (图 5; $P<0.001$)。但是依折麦布干预对 SREBP-2 和 PCSK9 蛋白的表达无显著影响 (图 5)。以上结果说明, 依折麦布可在基因水平上调控 LDLR^{+/-} 仓鼠肝脏中 PCSK9 和 SREBP-2, 但并不影响 SREBP-2 和 PCSK9 的蛋白表达。

2.6 依折麦布显著下调肝脏 LXR α 信号通路的 mRNA 表达

与空白对照组相比, 依折麦布显著降低肝脏中 LXR α 的 mRNA 表达约 71.9% ($P<0.01$), 亦显著降低 CYP7A1 的 mRNA 表达约 96.0% (图 6; $P<$

0.001)。与空白对照组相比, 依折麦布分别降低 ABCG5 和 ABCG8 的 mRNA 表达约 50.0% ($P<0.05$) 和 80.7% ($P<0.01$; 图 6)。此外, 依折麦布亦显著降低 SREBP-1c 的 mRNA 表达 (图 6; $P<0.01$)。以上结果说明, 依折麦布显著下调 LDLR^{+/-} 仓鼠肝脏中 LXR α 信号通路相关基因的表达。

3 讨论

CVD 事件与 LDLC 水平呈负相关^[23]。近年来, TG、富 TG 脂蛋白和脂蛋白(a) 也被列为 CVD 的危险因素^[24]。既往研究中, 依折麦布的使用剂量一般不高于 10 mg/(kg·d) [1, 2, 5 mg/(kg·d)], 干预时间一般不超过 1 个月^[10-16]。由于高脂血症患者一般需要长期治疗, 因此, 在长期干预的基础上研究依折麦布的降脂效果和机制具有重要的临床指

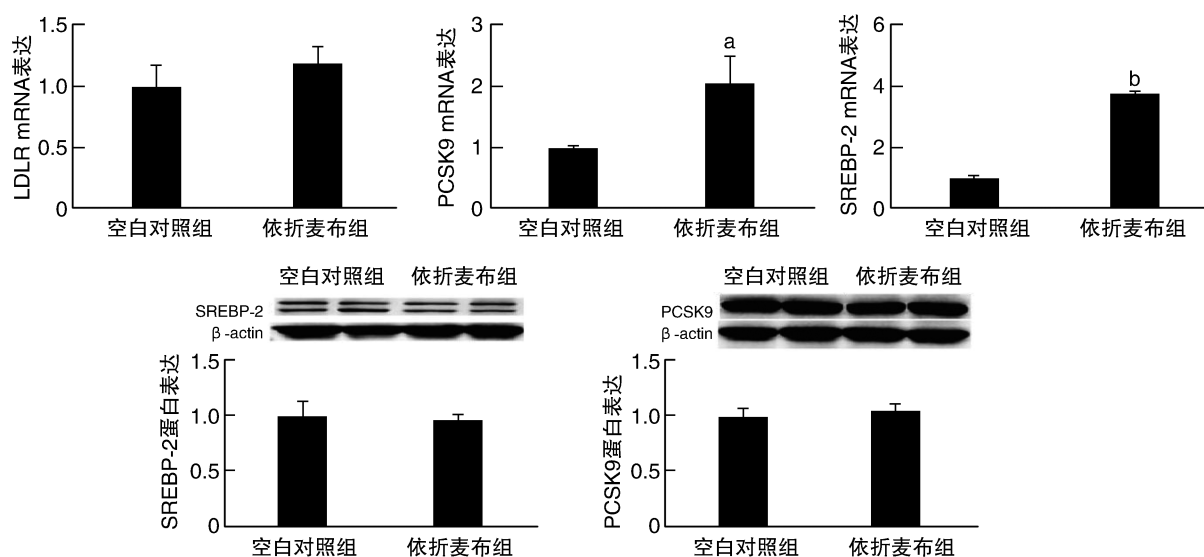


图 5. 依折麦布对 $LDLR^{+/-}$ 仓鼠肝脏 SREBP-2 信号通路 mRNA ($n=3$) 和蛋白表达 ($n=4$) 的影响

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.001$, 与空白对照组比较。

Figure 5. Effects of ezetimibe on the mRNA ($n=3$) and protein ($n=4$) expression of the SREBP-2 signaling pathway

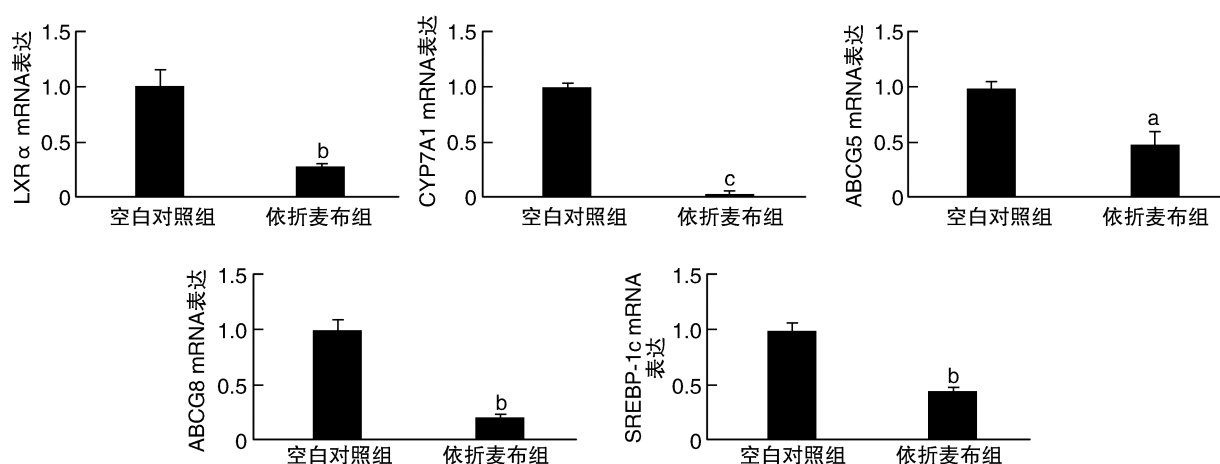


图 6. 依折麦布对 $LDLR^{+/-}$ 仓鼠肝脏 LXRα 信号通路 mRNA 表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, c 为 $P<0.001$, 与空白对照组比较。

Figure 6. Effects of ezetimibe on the mRNA expression of the LXRα signaling pathway ($n=3$)

导意义。此外,在不同的动物模型中,依折麦布可能具有不同的降脂效果和作用机制。本研究表明依折麦布长期干预血脂谱与人类接近的 $LDLR^{+/-}$ 仓鼠可显著降低其血浆 TC 和 TG 水平。相关作用机制推测如下:①依折麦布的降 TC 效果可能与其促进 SREBP-2 信号通路的 mRNA 表达有关;②依折麦布的降 TG 效果可能与抑制 SREBP-1c 和 ApoB 的血浆水平有关;③依折麦布降低血浆 TBA 含量可能与其下调 CYP7A1 的 mRNA 水平有关;④在显著下调血浆 TC 和 TG 的背景下,依折麦布可能通过下调 LXRα/ABC 转运体信号通路,降低脂质外排,以维

持机体脂质稳态。

依折麦布可有效降低小鼠^[13,16,25-26]、大鼠^[15,27]、猪^[28]、仓鼠^[29-34] 和人^[35-38] 等不同动物模型的血浆 TC 水平,本研究实验结果与上述研究一致。此外,本研究观察到依折麦布对 HDLC 和非 HDLC 浓度的影响与之前在仓鼠中的报道一致^[29-30]。在以往的大多数研究中,依折麦布治疗 (≤ 7 天) 促进了不同动物模型中 SREBP-2、LDLR 和 PCSK9 的 mRNA 表达^[11-13,30,32,39]。与上述结果一致,我们的数据表明,依折麦布显著增加了 SREBP-2 和 PCSK9 的 mRNA 表达。尽管 SREBP-2 可以在转录水平上调 LDLR

和 PCSK9 的表达,但我们的数据显示,依折麦布对 LDLR 的 mRNA 表达没有显著影响。该结果与之前某些研究一致^[13,30]。此外,有报道,依折麦布 $[\sim 0.67 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 在干预 LDLR^{+/−}仓鼠 18 周后显著提高血浆中非结合态的 PCSK9 浓度^[34]。然而,我们的数据表明,依折麦布对血浆 PCSK9 的蛋白含量没有显著影响。另一项研究发现,依折麦布 $(10 \text{ mg}/\text{d})$ 治疗 24 周后对高胆固醇血症患者的血浆 PCSK9 浓度没有影响^[40]。本研究结果与该报道一致。上述结果的差异可能与干预时间、动物模型、给药剂量以及检测手段的不同有关。此外,蛋白的表达受 mRNA 转录水平、蛋白质翻译以及翻译后的调控。在本研究中,SREBP-2 和 PCSK9 基因水平的表达与其蛋白的表达并不一致,说明依折麦布可能通过调节基因转录和转录后调控影响上述蛋白的表达,其具体的分子机制有待深入探讨。

RCT 在胆固醇代谢中起重要作用^[41-42]。多项研究表明,依折麦布可通过提高 ABCG5 和 ABCG8 的表达来改善 RCT^[15-16,29]。然而,也有数据表明,依折麦布对 ABCG5 和 ABCG8 没有影响^[13,29]。本研究显示,依折麦布显著下调 LXR α 信号通路相关基因的表达。先前亦有研究表明,依折麦布可显著降低不同动物模型中 ABCG5 和/或 ABCG8 的 mRNA 表达^[12,25,30,43-44]。另有报道,依折麦布虽然降低仓鼠肝脏中 ABCG5 和 ABCG1 的 mRNA 表达,但其通过肝胆途径促进胆固醇 RCT^[30]。依折麦布和阿托伐他汀联合应用在 ABCG5 或 ABCG8 发生突变的高胆固醇血症患者中显示出更好的降低 TC 效果^[36]。这些研究表明,ABC 转运体在改善依折麦布介导的 RCT 中可能不起关键作用。有研究发现,依折麦布可下调 LXR α 的内源性激动剂氧甾醇浓度,从而降低 LXR α 的活性和下游基因的表达^[12,25]。本研究表明,依折麦布显著降低胆汁酸合成的关键限速酶 CYP7A1 的基因表达。后者亦是 LXR α 的下游基因^[21]。与 CYP7A1 变化的结果相一致的是,血浆中的 TBA 浓度亦显著下降。本研究结果与另一项仓鼠研究的数据一致^[28],但与一项小鼠研究的结果不符^[13]。这些数据进一步说明依折麦布可能在不同物种中发挥不同的作用。此外,有研究表明,依折麦布能抑制仓鼠和人的胆汁中胆固醇的积累和胆汁酸的排泄^[30,44]。LXR α 信号通路的下调可能是机体在依折麦布干预背景下的一种补偿机制,不同的研究小组已经报道过类似补偿机制的存在^[1,13,30-31,45]。

依折麦布对 TG 水平的影响报道并不一致。大多数使用低剂量依折麦布 $[<5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 和/或

短期治疗 $(\leq 1 \text{ 个月})$ 的研究发现其对血浆 TG 无显著影响^[11,26,28,32-33,38]。然而,在使用高剂量依折麦布 $[>5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 和/或长期治疗 $(>1 \text{ 个月})$ 时,依折麦布可显著降低血浆和/或肝脏 TG 浓度^[10,25,29,31]。此外,van Heek 等^[31-32]进行的两项独立研究表明,采用依折麦布 $[1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 治疗 7 天对 TG 无影响,而采用相同剂量的依折麦布治疗 84 天,则可使仓鼠 TG 水平显著下降。本文的结果进一步证实长期依折麦布干预可显著降低 LDLR^{+/−}仓鼠血浆 TG 浓度,尤其是 VLDL 颗粒中 TG 的水平。本研究提示依折麦布降低 TG 的效果可能并非通过调控血浆 LPL 的活性或蛋白表达^[46],而是通过下调 VLDL 和 LDL 的主要载脂蛋白 ApoB 实现的。该推论与前期报道依折麦布可在体内外下调 ApoB 的合成与分泌相符^[10,28,37,45,47-49]。亦有研究表明,依折麦布可以减少体内乳糜微粒和极低密度脂蛋白颗粒的生成和外排^[26,28,48]。此外,依折麦布显著降低了 SREBP-1c 的 mRNA 表达。该结果与文献报道一致,表明依折麦布可降低 TG 合成相关基因的表达^[25-26,29]。

本研究还发现依折麦布可显著降低高脂血症仓鼠血浆 NEFA 浓度,与肥胖大鼠模型中的一项研究结果一致^[27]。据报道,降低 NEFA 可减少脂肪酸 β 氧化引起的肝损伤^[50-51],本文发现的依折麦布组仓鼠血浆 AST 活性显著降低与之相符。

本研究主要就依折麦布对肝脏中脂代谢相关的基因进行了初步分析,有关依折麦布调控 LDLR^{+/−}仓鼠脂代谢更深入的分子机制有待进一步探索。

[参考文献]

- [1] XIA B, LIN P, JI Y B, et al. Ezetimibe promotes CYP7A1 and modulates PPARs as a compensatory mechanism in LDL receptor-deficient hamster[J]. *Lipids Health Dis*, 2020, 19 (1): 24.
- [2] GARCIA-CALVO M, LISNOCK J, BULL H G, et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(23): 8132-8137.
- [3] GE L, WANG J, QI W, et al. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1 [J]. *Cell Metab*, 2008, 7 (6): 508-519.
- [4] 唐蔚青. 肝脏表达的 NIEMANN-PICK C1-LIKE 1 对小鼠胆汁胆固醇浓度的调节作用以及依折麦布对其功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(7): 597.
- [5] LAMB Y N. Rosuvastatin/ezetimibe: a review in hypercholesterolemia[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2020, 20

- (4): 381-392.
- [6] ARBEL R, HAMMERMAN A, AZURI J. Usefulness of ezetimibe versus evolocumab as add-on therapy for secondary prevention of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Am J Cardiol*, 2019, 123 (8): 1273-1276.
- [7] KOREN M J, JONES P H, ROBINSON J G, et al. A comparison of ezetimibe and evolocumab for atherogenic lipid reduction in four patient populations: a pooled efficacy and safety analysis of three phase 3 studies [J]. *Cardiol Ther*, 2020, 9(2): 447-465.
- [8] LEE J, LEE S H, KIM H, et al. Low-density lipoprotein cholesterol reduction and target achievement after switching from statin monotherapy to statin/ezetimibe combination therapy: real-world evidence [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2021, 46(1): 134-142.
- [9] 耿得珍, 卜亚茹, 焦波. 潜在的代谢性疾病治疗靶点——固醇调节元件结合蛋白 [J]. *中国药理学杂志*, 2019, 54(15): 1205-1210.
- [10] ASON B, TEP S, DAVIS H J, et al. Improved efficacy for ezetimibe and rosuvastatin by attenuating the induction of PCSK9 [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(4): 679-687.
- [11] XU R X, LIU J, LI X L, et al. Impacts of ezetimibe on PCSK9 in rats: study on the expression in different organs and the potential mechanisms [J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 87.
- [12] ENGELKING L J, MCFARLANE M R, LI C K, et al. Blockade of cholesterol absorption by ezetimibe reveals a complex homeostatic network in enterocytes [J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(7): 1359-1368.
- [13] CATRY E, PACHIKIAN B D, SALAZAR N, et al. Ezetimibe and simvastatin modulate gut microbiota and expression of genes related to cholesterol metabolism [J]. *Life Sci*, 2015, 132: 77-84.
- [14] 付育, 李霓. 靶向肝 X 受体的抗动脉粥样硬化药物研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(3): 254-263.
- [15] TANAKA Y, IKEDA T, OGAWA H, et al. Ezetimibe markedly reduces hepatic triglycerides and cholesterol in rats fed on fish oil by increasing the expression of cholesterol efflux transporters [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 374(1): 175-183.
- [16] ALTEMUS J B, PATEL S B, SEHAYEK E. Liver-specific induction of ABCG5 and ABCG8 stimulates reverse cholesterol transport in response to ezetimibe treatment [J]. *Metabolism*, 2014, 63(10): 1334-1341.
- [17] LIU N, SI Y, ZHANG Y, et al. Human cholesteryl ester transport protein transgene promotes macrophage reverse cholesterol transport in C57BL/6 mice and phospholipid transfer protein gene knockout mice [J]. *J Physiol Biochem*, 2021, 8: 679797.
- [18] WANG J, HE K, YANG C, et al. Dietary cholesterol is highly associated with severity of hyperlipidemia and atherosclerotic lesions in heterozygous LDLR-deficient hamsters [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3515.
- [19] GAO S, HE L, DING Y, et al. Mechanisms underlying different responses of plasma triglyceride to high-fat diets in hamsters and mice: roles of hepatic MTP and triglyceride secretion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(4): 619-626.
- [20] GUO S, TIAN H, DONG R, et al. Exogenous supplement of N-acetylneuraminic acid ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 251: 183-191.
- [21] WANG J, WANG Y, YANG X, et al. Purification, structural characterization, and PCSK9 secretion inhibitory effect of the novel alkali-extracted polysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 179: 407-417.
- [22] LI T, HU S M, PANG X Y, et al. The marine-derived furanone reduces intracellular lipid accumulation in vitro by targeting LXR α and PPAR α [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(6): 3384-3398.
- [23] KARAGIANNIS A D, MEHTA A, DHINDSA D S, et al. How low is safe? The frontier of very low (<30 mg/dL) LDL cholesterol [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42 (22): 2154-2169.
- [24] JANG A Y, LIM S, JO S H, et al. New trends in dyslipidemia treatment [J]. *Circ J*, 2021, 85(6): 759-768.
- [25] SUGIZAKI T, WATANABE M, HORAI Y, et al. The Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) inhibitor ezetimibe improves metabolic disease via decreased liver X receptor (LXR) activity in liver of obese male mice [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(8): 2810-2819.
- [26] WANG X, REN Q, WU T, et al. Ezetimibe prevents the development of non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in C57BL/6J mice [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(6): 2917-2923.
- [27] DEUSHI M, NOMURA M, KAWAKAMI A, et al. Ezetimibe improves liver steatosis and insulin resistance in obese rat model of metabolic syndrome [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(29): 5664-5670.
- [28] TELFORD D E, SUTHERLAND B G, EDWARDS J Y, et al. The molecular mechanisms underlying the reduction of LDL apoB-100 by ezetimibe plus simvastatin [J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(3): 699-708.
- [29] KASBI C F, TREGUIER M, BRIAND F, et al. Ezetimibe enhances macrophage-to-feces reverse cholesterol transport

- in golden syrian hamsters fed a high-cholesterol diet[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 375(2): 349-356.
- [30] UTO-KONDO H, AYAORI M, SOTHERDEN G M, et al. Ezetimibe enhances macrophage reverse cholesterol transport in hamsters: contribution of hepato-biliary pathway[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(9): 1247-1255.
- [31] VAN HEEK M, AUSTIN T M, FARLEY C, et al. Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, normalizes combined dyslipidemia in obese hyperinsulinemic hamsters[J]. *Diabetes*, 2001, 50(6): 1330-1335.
- [32] VAN HEEK M, FARLEY C, COMPTON D S, et al. Ezetimibe selectively inhibits intestinal cholesterol absorption in rodents in the presence and absence of exocrine pancreatic function[J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 134(2): 409-417.
- [33] SHINOZAWA E, AMANO Y, YAMAKAWA H, et al. Antidyslipidemic potential of a novel farnesoid X receptor antagonist in a hamster model of dyslipidemia comparative studies of other nonstatin agents[J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2018, 6(2): e00390.
- [34] WU Y, XU M J, CAO Z, et al. Heterozygous LDLR-deficient hamster as a model to evaluate the efficacy of PCSK9 antibody in hyperlipidemia and atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5936.
- [35] DAVIS H R, VELTRI E P. Zetia: inhibition of Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) to reduce intestinal cholesterol absorption and treat hyperlipidemia [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2007, 14(3): 99-108.
- [36] TADA H, OKADA H, NOMURA A, et al. Beneficial effect of ezetimibe-atorvastatin combination therapy in patients with a mutation in ABCG5 or ABCG8 gene[J]. *Lipids Health Dis*, 2020, 19(1): 3.
- [37] HAYASHI H, KAWAMURA M. Lowering LDL cholesterol, but not raising LDL receptor activity, by ezetimibe [J]. *J Clin Lipidol*, 2013, 7(6): 632-636.
- [38] SUDHOP T, LÜTJOHANN D, KODAL A, et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans [J]. *Circulation*, 2002, 106(15): 1943-1948.
- [39] HALLECK M, DAVIS H R, KIRSCHMEIER P, et al. An assessment of the carcinogenic potential of ezetimibe using nonclinical data in a weight-of-evidence approach [J]. *Toxicology*, 2009, 258(2/3): 116-130.
- [40] MIYOSHI T, NAKAMURA K, DOI M, et al. Impact of ezetimibe alone or in addition to a statin on plasma PCSK9 concentrations in patients with type 2 diabetes and hypercholesterolemia: a pilot study [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2015, 15(3): 213-219.
- [41] YU X H, ZHANG D W, ZHENG X L, et al. Cholesterol transport system: an integrated cholesterol transport model involved in atherosclerosis [J]. *Prog Lipid Res*, 2019, 73: 65-91.
- [42] 朱海波. 小分子药物调控胆固醇逆向转运机制的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(2): 93-100.
- [43] WANG H H, PORTINCASA P, MENDEZ-SANCHEZ N, et al. Effect of ezetimibe on the prevention and dissolution of cholesterol gallstones[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(7): 2101-2110.
- [44] VALASEK M A, REPA J J, QUAN G, et al. Inhibiting intestinal NPC1L1 activity prevents diet-induced increase in biliary cholesterol in Golden Syrian hamsters[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(4): G813-G822.
- [45] TREMBLAY A J, LAMARCHE B, COHN J S, et al. Effect of ezetimibe on the in vivo kinetics of apoB-48 and apoB-100 in men with primary hypercholesterolemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(5): 1101-1106.
- [46] BENLIAN P, DE GENNES J L, FOUBERT L, et al. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene[J]. *N Engl J Med*, 1996, 335(12): 848-854.
- [47] NAPLES M, BAKER C, LINO M, et al. Ezetimibe ameliorates intestinal chylomicron overproduction and improves glucose tolerance in a diet-induced hamster model of insulin resistance [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(9): G1043-G1052.
- [48] NAKANO T, INOUE I, TAKENAKA Y, et al. Ezetimibe impairs transcellular lipid trafficking and induces large lipid droplet formation in intestinal absorptive epithelial cells[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(12): 158808.
- [49] COUTURE P, LAMARCHE B. Ezetimibe and bile acid sequestrants: impact on lipoprotein metabolism and beyond [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24(3): 227-232.
- [50] SHEN J, SUN B, YU C, et al. Choline and methionine regulate lipid metabolism via the AMPK signaling pathway in hepatocytes exposed to high concentrations of nonesterified fatty acids[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 121(8-9): 3667-3678.
- [51] LUPACHYK S, WATCHO P, HASANOVA N, et al. Triglyceride, nonesterified fatty acids, and prediabetic neuropathy: role for oxidative-nitrosative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(8): 1255-1263.

(此文编辑 许雪梅)