

本文引用: 陈微, 王新程, 陈远, 等. 腹腔注射富氢生理盐水促进高脂血症金黄地鼠胆固醇逆向转运和血脂水平降低[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(12): 1041-1050. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.12.004.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-12-1041-10

· 实验研究 ·

## 腹腔注射富氢生理盐水促进高脂血症金黄地鼠胆固醇逆向转运和血脂水平降低

陈微<sup>1,2,3</sup>, 王新程<sup>2,3</sup>, 陈远<sup>2,3</sup>, 秦树存<sup>1,2,3</sup>

1. 山东第一医科大学第二附属医院, 2. 山东第一医科大学临床与基础医学院,

3. 山东第一医科大学泰山氢生物医学研究院, 山东省泰安市 271000

**[摘要]** **[目的]** 观察腹腔注射富氢生理盐水(HRS)对高脂饲料饲喂金黄地鼠胆固醇逆向转运的影响。**[方法]** 将雄性金黄地鼠分为三组:正常饮食组、高脂饮食组和高脂饮食+HRS组。高脂饲料饲喂和HRS同时持续干预12周后,将<sup>3</sup>H-胆固醇标记的巨噬细胞注射到金黄地鼠体内,检测血液、肝脏、胆汁和粪便中的放射性;通过RT-qPCR和Western blot检测肝脏组织中胆固醇逆向转运相关基因转录水平和蛋白表达水平。**[结果]** 长期的高脂饲料饲喂诱导金黄地鼠出现明显的高脂血症和肝脏脂质蓄积。与高脂饮食组相比,高脂饮食+HRS组金黄地鼠体质量下降( $P<0.01$ ),血浆总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)显著降低( $P<0.05$ ),甘油三酯(TG)略有降低( $P=0.11$ ),高密度脂蛋白胆固醇(HDLC)显著升高( $P<0.01$ ),血浆和肝脏中氧化应激指标丙二醛(MDA)显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),抗氧化指标谷胱甘肽(GSH)显著升高( $P<0.01$ ),肝体比略下降( $P=0.05$ ),肝脏中TC和TG分别下降10.8%( $P=0.05$ )和20.1%( $P<0.01$ ),肝脏脂肪变性明显缓解,但是炎症因子水平没有明显变化。同位素示踪结果显示,与高脂饮食组相比,HRS组金黄地鼠血浆<sup>3</sup>H放射性在24h和48h分别下降16.5%( $P<0.01$ )和8.9%( $P<0.05$ ),肝脏、胆汁和粪便中的<sup>3</sup>H放射性分别升高了1.2倍( $P<0.05$ )、1.2倍( $P=0.08$ )和1.1倍( $P=0.08$ )。RT-qPCR和Western blot结果显示,HRS干预使高脂饲料饲喂金黄地鼠肝脏CD36、清道夫受体B1(SR-B1)和低密度脂蛋白受体(LDLR)蛋白水平分别降低39.5%( $P<0.05$ )、40.5%( $P<0.01$ )和28.0%( $P<0.01$ ),ATP结合盒转运体G5(ABCG5)和固醇调节元件结合蛋白2(SREBP2)蛋白水平分别升高1.5倍( $P<0.05$ )和1.3倍( $P<0.01$ ),同时ATP结合盒转运体A1和G8的mRNA水平分别升高2.9倍( $P<0.05$ )和3.2倍( $P<0.01$ )。**[结论]** 腹腔注射HRS可促进高脂饲料饲喂金黄地鼠胆固醇逆向转运,并发挥降血脂效应;此外,腹腔注射HRS也可能通过抑制肝脏对脂质的摄取和促进肝脏胆固醇外排来缓解肝脏脂质蓄积。

**[关键词]** 富氢生理盐水; 高脂血症; 金黄地鼠; 胆固醇逆向转运; 血脂

**[中图分类号]** R5;R363

**[文献标识码]** A

### Intraperitoneal injection of hydrogen-rich saline promotes reverse cholesterol transport and decreases plasma lipid levels in golden hamster with hyperlipidemia

CHEN Wei<sup>1,2,3</sup>, WANG Xincheng<sup>2,3</sup>, CHEN Yuan<sup>2,3</sup>, QIN Shucun<sup>1,2,3</sup>

1. The Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, 2. School of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University, 3. Taishan Institute of Hydrogen Biomedical Research, Shandong First Medical University, Tai'an, Shandong 271000, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To observe the effect of intraperitoneal injection of hydrogen-rich saline (HRS) on reverse cholesterol transport in golden hamsters with high fat diet. **Methods** The male golden hamsters were divided into three

[收稿日期] 2023-12-24

[修回日期] 2024-05-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(NSFC 81929002);山东第一医科大学学术提升计划项目(2019QL010);山东省高校重大疾病与氢医学转化应用重点实验室(鲁教科字[2022]7号);山东省医药卫生氢分子生物医学研究重点实验室(鲁卫科教字[2022]3号)

[作者简介] 陈微,博士,讲师,主要研究方向为氢分子在脂代谢性疾病中的作用及机制,E-mail:13181815068@163.com。通信作者秦树存,教授,主要研究方向为胆固醇代谢与心脑血管疾病的基础和临床研究,E-mail:scqin@sdfmu.edu.cn。

groups: chow diet group, high-fat diet group, and high-fat diet+HRS group. After 12 weeks of high-fat diet feeding and HRS administration, macrophages labeled with  $^3\text{H}$ -cholesterol were injected into hypercholesterolemic golden hamsters, and then radioactivity in blood, liver, bile, and feces was measured. RT-qPCR and Western blot were used to assess the transcription and protein expression levels of cholesterol reverse transport-related genes in liver tissue. **Results** Long-term feeding with a high-fat diet induced significant hyperlipidemia and liver lipid accumulation in golden hamsters. Compared with the high-fat diet group, after HRS intervention, the body mass of golden hamsters decreased ( $P<0.01$ ), plasma TC and LDLC significantly decreased ( $P<0.05$ ), TG slightly decreased ( $P=0.11$ ), HDLC significantly increased ( $P<0.01$ ), oxidative stress index MDA in plasma and liver significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), antioxidant index glutathione (GSH) significantly increased ( $P<0.01$ ), liver weight/body weight ratio slightly decreased ( $P=0.05$ ), TC and TG in liver decreased by 10.8% ( $P=0.05$ ) and 20.1% ( $P<0.01$ ), respectively. Liver steatosis was significantly relieved, but there was no significant change in inflammatory factor levels. In isotopic tracing, high-fat diet fed golden hamsters treated with HRS showed decreased  $^3\text{H}$  radioactivity in plasma at 24 and 48 hours by 16.5% ( $P<0.01$ ) and 8.9% ( $P<0.05$ ) respectively, while increased  $^3\text{H}$  radioactivity was observed in liver, bile, and feces by 1.2-fold ( $P<0.05$ ), 1.2-fold ( $P=0.08$ ), and 1.1-fold ( $P=0.08$ ) respectively, compared to those fed a high-fat diet alone. Furthermore, RT-qPCR and Western blot analyses of liver tissue demonstrated that HRS intervention resulted in a decrease of CD36, scavenger receptor-B1 (SR-B1), and low density lipoprotein receptor (LDLR) protein levels by 39.5% ( $P<0.05$ ), 40.5% ( $P<0.01$ ), and 28.0% ( $P<0.01$ ) respectively, an increase of ATP-binding cassette transporter G5 (ABCG5) and sterol regulatory element-binding protein (SREBP2) protein levels by 1.5-fold ( $P<0.05$ ) and 1.3-fold ( $P<0.01$ ), and an increase of mRNA levels of ATP-binding cassette transporter A1 and G8 by 2.9-fold ( $P<0.05$ ) and 3.2-fold ( $P<0.01$ ) respectively in high-fat diet-fed hamsters. **Conclusions** Intraperitoneal injection of HRS promotes reverse cholesterol transport in high-fat diet-fed golden hamsters and exerts lipid-lowering effects. Additionally, intraperitoneal injection of HRS may alleviate hepatic lipid accumulation by inhibiting hepatic lipid uptake and promoting cholesterol excretion from liver.

[**KEY WORDS**] hydrogen-rich saline; gold hamster; hyperlipidemia; reverse cholesterol transport; plasma lipids

心血管疾病仍然是全球范围内死亡的主要原因之一,2021年有2 050万人死于心血管疾病。血浆胆固醇异常升高是导致高脂血症的主要原因之一,而高脂血症则是动脉粥样硬化、冠心病等心血管疾病的关键因素之一。改善血脂是治疗动脉粥样硬化性心脑血管疾病的主要策略<sup>[1]</sup>。

机体通过肠道吸收外源胆固醇、肝脏合成内源胆固醇以及血浆胆固醇代谢和排泄等的相互作用保持胆固醇的动态平衡。由于胆固醇在机体很难被分解代谢,因此胆固醇的外排对于维持体内胆固醇平衡至关重要。机体主要存在两种重要的胆固醇外排途径:经典的胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)途径和肠内胆固醇排泄(transintestinal cholesterol excretion, TICE)途径。RCT也称肝胆途径,是机体排泄胆固醇的最主要途径。外周组织细胞内多余的胆固醇通过ATP结合盒转运体(ATP-binding cassette transporter, ABC) A1和ABCG1外排至血液,经高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)转运至肝脏,在细胞色素P450 7A1(cytochrome P450 7A1, CYP7A1)的作用下转化为胆汁酸,通过ABCB11分泌到胆汁中;肝脏中的胆固醇

也可以通过ABCG5/ABCG8直接转运至胆汁中,而后通过肠道经粪便排出体外。TICE即非胆道途径,肠上皮细胞通过ABCG5/ABCG8直接将胆固醇外排到肠腔,从而清除体内一部分胆固醇<sup>[2]</sup>。因此,促进胆固醇外排是调节脂代谢、有效防治脂代谢性疾病发展的重要手段之一。

氢分子是一种新型有效的抗氧化分子,具有广泛的生物学作用,可以预防或减缓动脉粥样硬化、高脂血症、代谢综合征和非酒精性脂肪肝等脂代谢性疾病的发生和发展<sup>[3-4]</sup>。在高脂血症动物模型和代谢综合征人群中,氢分子干预可以降低血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC),减少氧化应激,改善HDL功能<sup>[5-6]</sup>。体外研究发现,氢分子通过激活巨噬细胞内ABCA1促进泡沫化巨噬细胞内胆固醇流出<sup>[5]</sup>,从而发挥抗动脉粥样硬化的作用。基于此,本研究将 $^3\text{H}$ -胆固醇标记的巨噬细胞注射到高脂血症金黄地鼠这一在脂代谢表型更接近人类的动物模型体内,通过检测血液、肝脏、胆汁和粪便中的放射性,评估氢分子对体内胆固醇外排的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂与材料

6~7 周龄雄性叙利亚金黄地鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司,地鼠生长维持饲料和高脂饲料(21%猪油+0.15%胆固醇)购于北京科奥协力饲料有限公司。L929 细胞(上海安为生物科技有限公司);高脂样本甘油三酯(triglyceride, TG)含量酶法测定试剂盒和组织细胞 TC 含量酶法测定试剂盒(北京普利莱);血浆 TC、TG、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和 LDLC 检测试剂盒(北京中生北控);丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量检测试剂盒(北京索莱宝);DMEM 高糖培养基和胎牛血清(HyClone);血浆卵磷脂胆固醇酰基转移酶(lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT)活性检测试剂盒(Sigma);TransZol Up、TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 和 TransStart® Top Green qPCR SuperMix(北京全式金);ABCG5、ABCG8、固醇调节元件结合蛋白 2(sterol regulatory element-binding protein 2, SREBP2)、清道夫受体 B1(scavenger receptor-B1, SR-B1)和  $\beta$ -actin 抗体(Abcam);CD36 抗体(武汉三鹰);低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)抗体(景杰生物);仓鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)和白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) ELISA 试剂盒(江苏酶免);Omni-ECLTM 超灵敏化学发光检测试剂盒(上海雅酶)。LM 系列氢气发生器购于济南格润实验仪器有限公司,液体闪烁计数器(Tri-Carb 2810TR)购于 Revvity 公司;配有氢分子-50 氢气微电极的微电极系统购于丹麦 Unisense 公司。

### 1.2 富氢生理盐水的制备

参照 Zong 等<sup>[7]</sup>方法制备富氢生理盐水(hydrogen-rich saline, HRS),具体操作:取 1 袋 250 mL 的 0.9% 生理盐水,抽出袋内 200 mL 生理盐水(袋内剩余 50 mL),并排除袋内所有空气,使盐水袋呈干瘪状态。将氢气发生器的排气管末端连接 0.22  $\mu$ m 孔径的除菌过滤器,滤器的另一端接口与 1 mL 注射器针头相连接,待氢气发生输出气量稳定后,将针头插入盐水袋内,待盐水袋处于膨胀状态后拔除针头,停止充氢气。将充满氢气的盐水袋置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中保存。48 h 后,抽出袋内所有气体,用上述方法再次充入氢气,置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱,48 h 后采用氢气微

电极检测氢气浓度<sup>[8]</sup>。本研究使用的 HRS 中氢气的浓度为 0.7~0.75 mmol/L。

### 1.3 动物分组与处理

金黄地鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 3 组,每组 16 只,其中每组有 8 只地鼠用于后续的同位素示踪实验。正常饮食(chow diet, CD)组:饲喂地鼠生长维持饲料,同时腹腔注射生理盐水;高脂饮食(high-fat diet, HFD)组:饲喂高脂饲料,同时腹腔注射生理盐水;高脂饮食+HRS 组:饲喂高脂饲料,同时腹腔注射 HRS。HRS 或生理盐水的注射剂量为 10 mL/(kg·d)。持续干预 12 周。

### 1.4 体内胆固醇外排效率检测

1.4.1 条件培养基的制备 将 L929 细胞接种于细胞培养瓶中,加入含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 完全培养基,置于 37  $^{\circ}$ C、4% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。培养 5 天后收集培养基,培养基经离心后用 0.22  $\mu$ m 孔径过滤器过滤冻存储用。将收集的 L929 细胞培养基与 DMEM 培养基按 1:4 比例混合,配制成含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素的条件培养基<sup>[9]</sup>。

1.4.2 金黄地鼠骨髓源性巨噬细胞的培养 金黄地鼠经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠,麻醉后分离四肢长骨,剪断长骨两头后用 PBS 冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞。冲洗出来的骨髓细胞悬液经 200 目细胞筛过滤获得单细胞悬液。单细胞悬液经 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 重悬细胞后加入适量体积的红细胞裂解液,颠倒混匀,静置 15 min。静置后经 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入上述条件培养基重悬细胞,调整好细胞浓度后接种于培养皿,置于细胞培养箱培养。每 3 天更换一次条件培养基,骨髓源性巨噬细胞经 5~7 天分化成熟,并且牢牢贴壁。

1.4.3 <sup>3</sup>H-胆固醇标记巨噬细胞 将乙酰化 LDL(50 mg/L)和 <sup>3</sup>H-胆固醇(5 mCi/L)加入到 DMEM 完全培养基中,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。随后用该培养液培养分化好的巨噬细胞,培养 48 h 后,收获细胞,1 000 r/min 离心 10 min,PBS 重悬细胞,调整细胞密度至 5.0 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/mL。每只金黄地鼠腹腔注射 500  $\mu$ L <sup>3</sup>H-胆固醇标记的细胞悬液<sup>[10]</sup>。

1.4.4 不同组织放射活性检测 注射同位素标记的细胞后分别于 24 h 和 48 h 内眦静脉采血,3 000 r/min 离心 15 min,收集血浆。取 80  $\mu$ L 血浆,加入 3 mL 闪烁液,混匀后用液体闪烁计数器检测放射性。

48 h 后安乐处死地鼠,收集肝脏和胆汁。称取 150 mg 肝脏置于 200  $\mu$ L PBS 中匀浆,加入 500  $\mu$ L 正己烷/异丙醇(体积比为 3:2)充分混匀,2 000 r/min 离心 15 min。将上层脂质层溶液转移至新的离心管,氮气吹干,加入 50  $\mu$ L 甲苯溶解脂质,随后用液体闪烁仪检测放射性。20  $\mu$ L 胆汁加入 3 mL 闪烁液中,振荡混匀后检测放射性<sup>[10]</sup>。

收集每只金黄地鼠 48 h 内的粪便,自然干燥 24 h 后研磨。称取 160 mg 粪便粉末,加入 1.4 mL 50% 乙醇充分振荡混匀。吸取 200  $\mu$ L 粪便匀浆,加入 3 mL 闪烁液,振荡混匀后检测放射性<sup>[11]</sup>。

不同组织的<sup>3</sup>H-胆固醇水平以占注射剂量放射性的百分比表示,即(组织放射性/注射放射性) $\times$ 100%。

### 1.5 脂质、氧化应激指标、炎症因子和 LCAT 活性检测

金黄地鼠过夜禁食 12 h 后,从内眦静脉采血,3 000 r/min 离心 15 min,收集血浆。根据试剂盒说明测定血浆脂质(TC、TG、LDLC 和 HDLC)、氧化应激指标(MDA 和 GSH)和 LCAT 活性。

金黄地鼠经安乐处死后取肝脏组织,根据组织细胞脂质含量检测试剂盒说明测定肝脏 TC 和 TG 含量,根据 MDA 和 GSH 试剂盒说明检测肝脏 MDA 和 GSH 含量,根据 ELISA 试剂盒说明检测肝脏中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平。

### 1.6 肝脏组织油红 O 染色

用冰冻切片机将 OCT 包埋的肝脏组织切成 8  $\mu$ m 厚度的切片,4% 多聚甲醛溶液固定 10 min,水洗后滴加油红 O 工作液染色 5 min。切片经水洗后,滴加苏木精染液染色 40 s,水洗返蓝,甘油封片后用显微镜观察和图像采集,Image J 软件对油红 O 染色进行定量分析。

### 1.7 RT-qPCR 检测基因的相对表达

利用 TransZol Up 提取组织总 RNA 后,采用 TransScript<sup>®</sup> One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 将 RNA 反转录为 cDNA,然后使用 TransStart<sup>®</sup> Top Green qPCR SuperMix 检测目的基因的表达。以 GAPDH 基因为内参,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1. RT-qPCR 引物序列  
Table 1. RT-qPCR primer sequences

基因名称	上游引物	下游引物
GAPDH	5'-TGGCCTTCCGTGTTCTACC-3'	5'-TAGCCCAGGATGCCCTTCAG-3'
ABCA1	5'-CGGAGGTGGCTCTAATGACC-3'	5'-CTTCACCCCGCTGATGAACT-3'
ABCG1	5'-CCTGCGGACTTTGTCATGGA-3'	5'-AAACGGGTTACACGTCTGTGT-3'
ABCG5	5'-ATGAGAAACAAGCAGGCGGT-3'	5'-GCTCTCAGCATGGGAAACAGA-3'
ABCG8	5'-AGAACATGTGGACAGTACCCG-3'	5'-AATCTGCATCAGCCCGAAA-3'
SR-B1	5'-AAAGGGCTGCGAGGATAAGG-3'	5'-TGCTTTTGGGACCCTACAGC-3'
HMGCR	5'-GACGGTGACACTTACCATCTGT-3'	5'-GATGCACCGTGTATGGTGA-3'
SREBP1	5'-GCACTTTTTGACACGTTTCTTC-3'	5'-CTGTACAGGCTCTCTGTGG-3'
SREBP2	5'-GAGAGCTGTGAATTTCCAGTG-3'	5'-CTACAGATGATATCCGGACCAA-3'

### 1.8 Western blot 检测肝脏中相关蛋白表达

采用 RIPA 裂解液提取肝脏组织总蛋白,蛋白定量后,加入上样缓冲液,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和转膜,5% 脱脂奶封闭后,将膜与一抗稀释液过夜孵育,二抗孵育后,采用 ECL 超灵敏化学发光液检测蛋白表达量。Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以  $\beta$ -actin 蛋白为内参分析蛋白的相对表达量。

### 1.9 统计学分析

数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,采用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计分析与作图。组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HRS 对高脂血症金黄地鼠血脂水平的影响

HFD 组金黄地鼠出现明显的高脂血症,血浆 TC、LDLC 和 TG 水平显著升高( $P<0.01$ ),HDLC 略有下降( $P>0.05$ );与 HFD 组相比,HFD+HRS 组金黄地鼠血浆 TC、LDLC 水平显著降低( $P<0.05$ ),TG 水平略有降低( $P=0.11$ ),HDLC 水平显著升高( $P<0.01$ ;表 2)。说明 HRS 连续腹腔注射 12 周可以调节高脂饮食诱导的高脂血症金黄地鼠的血脂水平。

## 2.2 HRS 对高脂血症金黄地鼠氧化应激和 LCAT 活性的影响

与 CD 组相比,HFD 组金黄地鼠血浆 MDA 水平显著升高( $P<0.01$ ),血浆 GSH 水平略有降低( $P=$

0.89),血浆 LCAT 活性显著降低( $P<0.05$ );与 HFD 组相比,HFD+HRS 组金黄地鼠血浆 MDA 水平显著降低( $P<0.01$ ),血浆 GSH 水平显著升高( $P<0.01$ ),血浆 LCAT 活性无明显差异,但有恢复的趋势(图 1)。

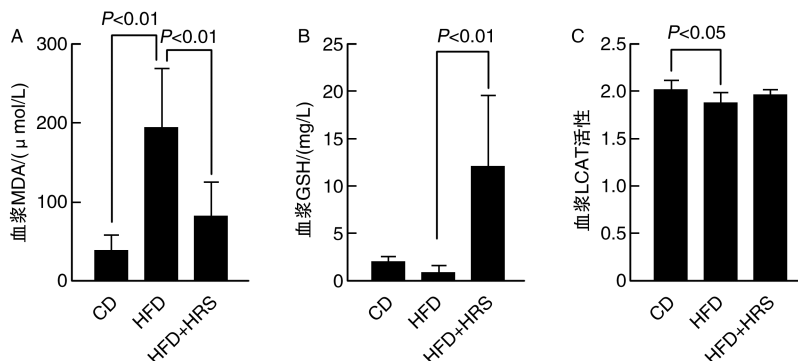


图 1. HRS 对金黄地鼠氧化应激水平和 LCAT 活性的影响( $n=6\sim 8$ )

A 为血浆 MDA 水平,B 为血浆 GSH 水平,C 为血浆 LCAT 活性。

Figure 1. The effect of HRS on oxidative stress levels and LCAT activity in golden hamsters( $n=6\sim 8$ )

## 2.3 HRS 对高脂血症金黄地鼠肝脏脂质蓄积、氧化应激和炎症因子水平的影响

与 CD 组相比,HFD 组金黄地鼠的体质量和肝体比增加( $P<0.01$ );油红 O 染色结果显示肝脏内出现明显脂质蓄积( $P<0.01$ ),其中肝脏 TC 和 TG 含量分别增加 1.8 倍( $P<0.01$ )和 1.9 倍( $P<0.01$ )。与 HFD 组相比,HFD+HRS 组金黄地鼠的体质量降低( $P<0.01$ ),肝体比略有降低( $P=0.05$ );油红 O 染色结果显示肝脏内脂质蓄积明显缓解( $P<0.05$ ),肝脏 TC 和 TG 含量分别降低 10.8%( $P=0.05$ )和 20.1%( $P<0.01$ );表 2 和图 2)。

HFD 组金黄地鼠肝脏 MDA 含量升高 2.8 倍( $P<0.01$ ),GSH 含量降低 26.9%( $P<0.01$ );腹腔注射 HRS 后,MDA 含量降低 22.9%( $P<0.05$ ),GSH 含量升高 1.4 倍( $P<0.01$ )。与 CD 组相比,

HFD 组肝脏 IL-6 含量升高 2.5 倍( $P<0.05$ );与 HFD 组相比,HFD+HRS 组肝脏 IL-6 含量略有降低( $P=0.72$ ),但没有统计学差异(图 2)。

## 2.4 HRS 对体内胆固醇外排效率的影响

各组金黄地鼠血浆 $^3\text{H}$ 放射性在 48 h 内逐渐升高,HRS 干预后血浆 $^3\text{H}$ 放射性在 24 h 和 48 h 较 HFD 组分别下降 16.5%( $P<0.01$ )和 8.9%( $P<0.05$ )。与 CD 组相比,HFD 组肝脏 $^3\text{H}$ 放射性降低 28.7%( $P<0.01$ );HRS 干预后肝脏 $^3\text{H}$ 放射性升高 1.2 倍( $P<0.05$ ),提示 HRS 促进 $^3\text{H}$ -胆固醇向肝脏转运。与 CD 组相比,HFD 组胆汁和粪便中 $^3\text{H}$ 放射性分别增加 1.2 倍( $P=0.10$ )和 1.4 倍( $P<0.01$ );HRS 干预后胆汁和粪便中 $^3\text{H}$ 放射性分别升高 1.2 倍( $P=0.08$ )和 1.1 倍( $P=0.08$ ),说明 HRS 可以促进 $^3\text{H}$ -胆固醇向胆汁和粪便的外排(图 3)。

表 2. 腹腔注射 HRS 对金黄地鼠体质量、肝体比和血脂水平的影响( $n=16$ )

Table 2. The effect of intraperitoneal injection of HRS on body weight, ratio of liver weight and body weight, and plasma lipid levels in golden hamsters( $n=16$ )

分组	体质量/g	肝体比/%	TC/(mmol/L)	HDLC/(mmol/L)	LDLC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)
CD	161 $\pm$ 6	3.3 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.6	2.4 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 1.5
HFD	202 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	7.5 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
HFD+HRS	185 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	5.0 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	3.2 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	3.8 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	4.7 $\pm$ 2.4

注:a 为  $P<0.01$ ,与 CD 组比较;b 为  $P<0.05$ ,c 为  $P<0.01$ ,与 HFD 组比较。

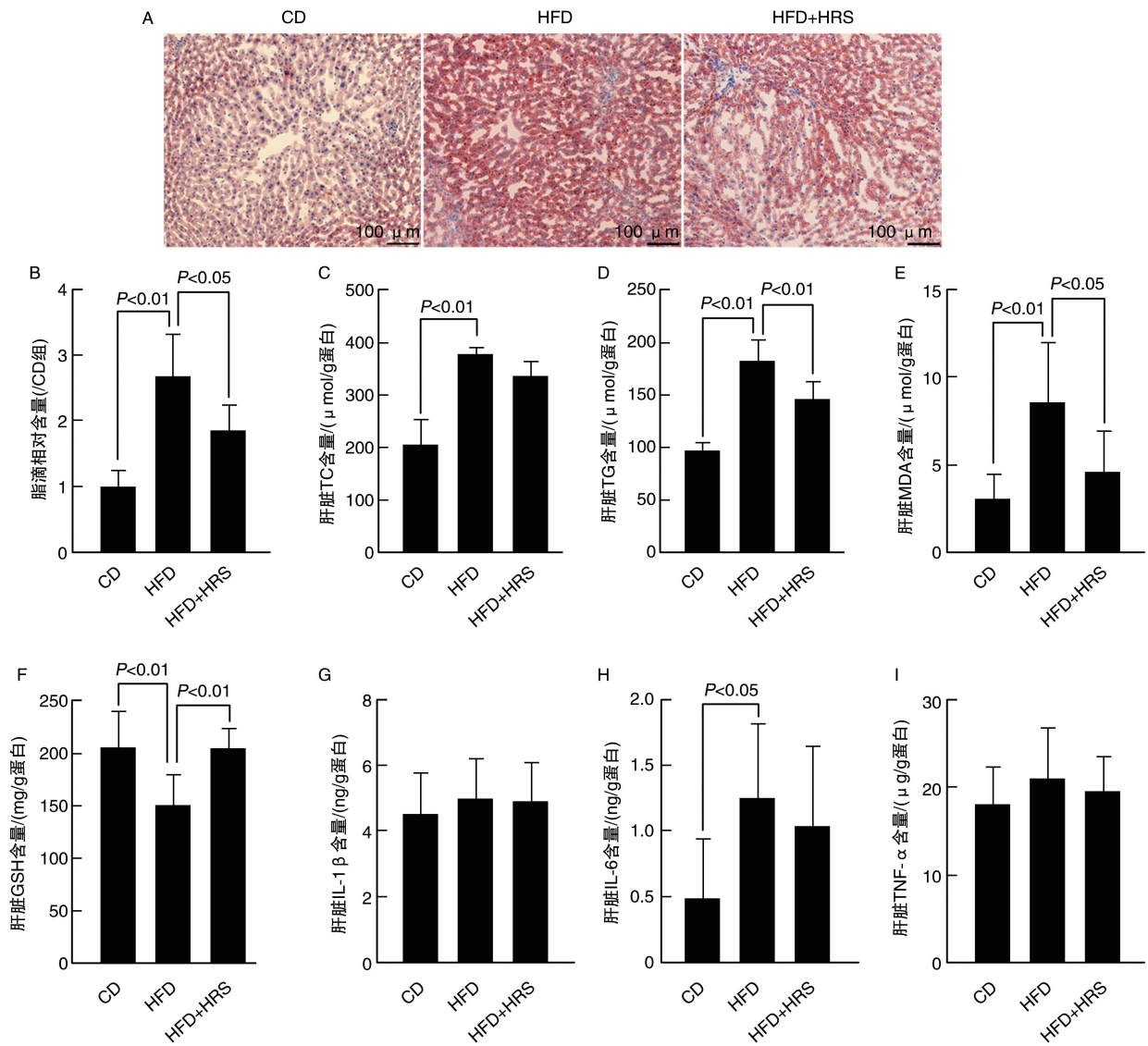


图 2. HRS 对金黄地鼠肝脏脂质、氧化应激和炎症因子水平的影响 (n=7~8)

A 和 B 为肝脏组织油红 O 染色图及其定量分析, C 和 D 分别为肝脏 TC 和 TG 含量, E 和 F 分别为肝脏 MDA 和 GSH 含量, G、H、I 分别为肝脏 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量。

Figure 2. The effect of HRS on the levels of hepatic lipids, oxidative stress and inflammatory factors in golden hamsters (n=7~8)

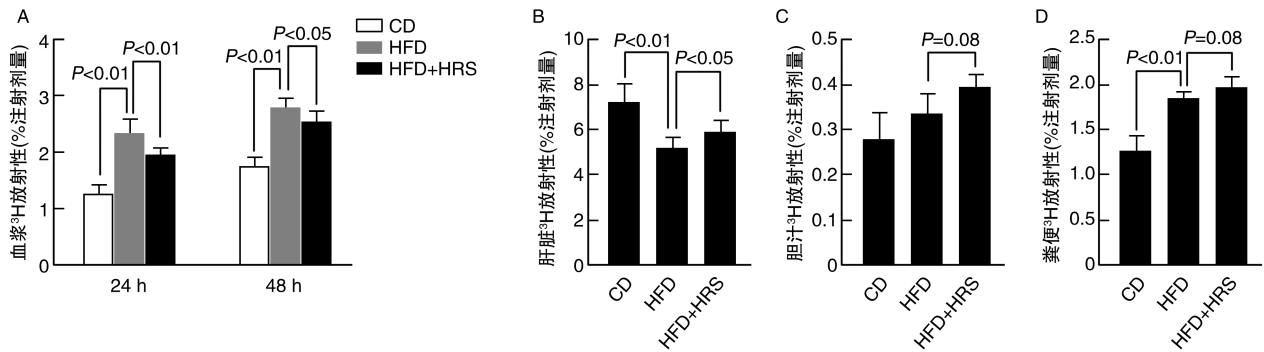


图 3. HRS 对体内胆固醇外排效率的影响 (n=6~8)

A 为不同时间点血浆 <sup>3</sup>H 放射性, B 为肝脏中 <sup>3</sup>H 放射性, C 为胆汁中 <sup>3</sup>H 放射性, D 为粪便中 <sup>3</sup>H 放射性。

Figure 3. The effect of HRS on cholesterol efflux efficiency *in vivo* (n=6~8)

### 2.5 HRS 对 RCT 相关基因转录与翻译的影响

为探索 HRS 影响 RCT 的潜在分子机制,通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测 RCT 以及脂质摄取和合成相关基因的转录与翻译水平。与 HFD 组相比, HRS 干预后肝脏中 ABCA1、ABCG8 和 SREBP2 的 mRNA 水平分别升高 2.9 倍 ( $P<0.05$ )、3.2 倍 ( $P<0.01$ ) 和 2.0 倍 ( $P<0.01$ ), 而 SR-B1 和 SREBP1 的

mRNA 水平分别降低 65.1% ( $P<0.05$ ) 和 69.2% ( $P<0.01$ )。与 HFD 组相比, HRS 干预后肝脏中 SR-B1、LDLR 和 CD36 蛋白水平分别降低 40.5% ( $P<0.01$ )、28.0% ( $P<0.01$ ) 和 39.5% ( $P<0.05$ ), SREBP2 和 ABCG5 蛋白水平分别升高 1.3 倍 ( $P<0.01$ ) 和 1.5 倍 ( $P<0.05$ ), 但 ABCA1 和 ABCG8 蛋白水平无显著改变 (图 4)。

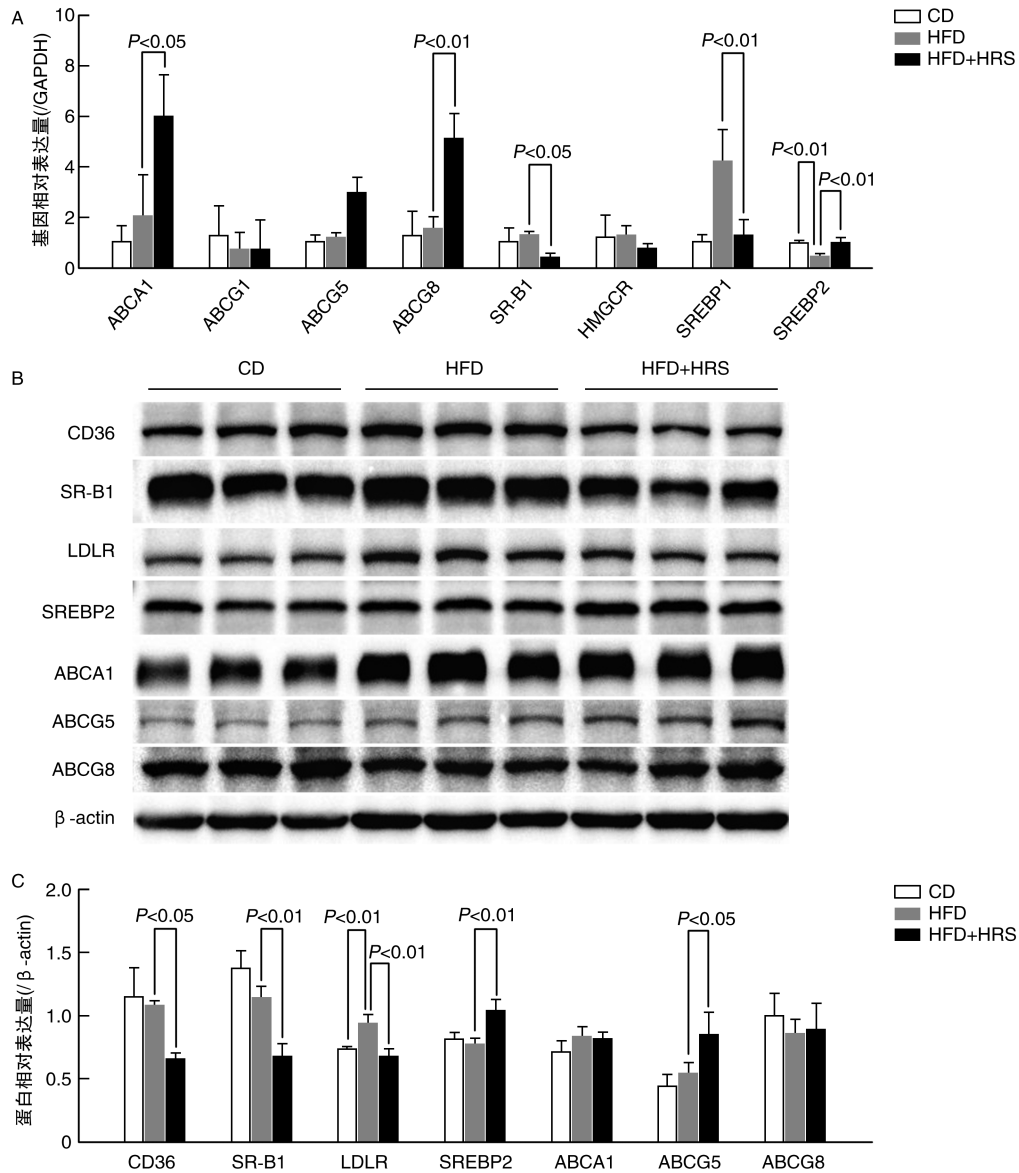


图 4. HRS 对肝脏 RCT 相关基因转录和翻译水平的影响 ( $n=3$ )

A 为肝脏中 RCT 相关基因的相对表达量, B 和 C 为蛋白免疫印迹图及其统计分析。

Figure 4. The effect of HRS on the transcription and translation of genes related to RCT in liver ( $n=3$ )

### 3 讨论

基础研究和临床研究已经证明氢分子可以调节血脂, 改善代谢性疾病的发生和发展<sup>[12]</sup>。大量动

物实验发现, 氢分子可以改善高脂饮食和糖代谢异常引起的脂质代谢紊乱, 降低外周血液中 TC、TG 和 LDL 水平, 升高 HDL 水平<sup>[6,13]</sup>。本研究中, 通过给血脂谱与人相似的金黄地鼠饲喂高脂饲料并进行

HRS 干预,同样发现了氢分子的降血脂作用。人群试验也证明饮用富氢水可以降低代谢综合征患者血清 TC、LDLC 水平<sup>[14-15]</sup>。通过经典的<sup>3</sup>H-胆固醇示踪实验来评估 HRS 对体内 RCT 的影响,结果观察到,HRS 可以促进胆固醇从巨噬细胞到肝脏和粪便的外排,提示氢分子可以通过增强体内 RCT 过程发挥抑制肝脏和外周组织胆固醇蓄积效应以及降低血脂效应。

作为参与 RCT 的关键脂蛋白,HDL 介导的外周组织细胞中过量的胆固醇外排、逆转胆固醇转运至肝脏和抗炎/抗氧化活性都对心血管系统提供有效保护。暴露于高脂饮食、吸烟和氧化应激等会对 HDL 的结构和功能造成损害,从而阻止胆固醇从外周巨噬细胞转移到 HDL 颗粒,以及肝胆固醇通过肝脏 SR-B1 或 LDLR 被肝细胞摄取,导致 HDLC 水平降低,TC 和 LDLC 水平升高<sup>[7,16]</sup>。研究发现,氢分子处理可以改善高脂血症损伤的 HDL 功能,促进由 HDL 介导的泡沫化巨噬细胞的<sup>3</sup>H-胆固醇外流和抑制 LDL 氧化<sup>[17]</sup>。Liu 等<sup>[18]</sup>通过 HDL 的蛋白质组学分析发现,氢分子可以影响高脂饲喂下大鼠 HDL 的构成成分;进一步的酶活性检测发现氢分子可以调控 HDL 上脂蛋白相关磷脂酶 A2 和对氧磷脂酶活性,而这些酶参与了磷脂的氧化。本研究发现,HRS 干预不仅显著改善血浆 HDLC、TC 和 LDLC 水平,还能显著降低金黄地鼠体内的氧化应激水平。推测作为抗氧化剂的氢分子可能通过抑制高脂饮食诱导的 HDL 的氧化和功能损伤来影响 RCT 过程。

肝脏 ABCA1 在产生 HDL 中起重要作用。位于细胞膜上的 ABCA1 可以将细胞内游离的胆固醇和磷脂转运到细胞膜外侧,然后与细胞外的 ApoA I 结合,形成前  $\beta$ -HDL 颗粒<sup>[19]</sup>。氢分子干预导致血浆 HDL 水平升高可能与肝脏 ABCA1 的表达升高促进了肝细胞胆固醇外流至 HDL 有关。先前有体外研究报道,氢分子可以激活 ABCA1 依赖性巨噬细胞<sup>3</sup>H-胆固醇外排,本研究也观察到 HRS 显著提高了高脂饲料饲喂金黄地鼠肝脏中 ABCA1 基因的转录水平。本研究中,HRS 组肝脏 ABCA1 蛋白水平无显著变化,这可能是血浆 HDLC 升高对肝脏 ABCA1 的表达产生反馈调节的结果。在人体和金黄地鼠体内,HDLC 可以通过两种途径返回肝脏:肝脏 SR-B1 直接摄取或通过胆固醇酯转移蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)将 HDL 中的胆固醇转移至 LDL,然后再由肝脏 LDLR 摄取。HRS 干预显著降低 SR-B1 和 LDLR 蛋白水平。以上结果提示氢分子干预后血浆 HDLC 水平的升高可能也与

肝脏 SR-B1 对 HDLC 的摄取减少有关。Song 等<sup>[20]</sup>发现,氢分子干预的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏和巨噬细胞中 SR-B1 的 mRNA 和蛋白水平均显著升高。而本研究发现 HRS 干预显著降低金黄地鼠肝脏 SR-B1 的 mRNA 和蛋白水平,这可能与研究对象的不同及氢分子干预时长的不同有关。

本研究发现,HRS 干预后金黄地鼠血浆<sup>3</sup>H 放射性在 24 h 和 48 h 分别下降 16.5% 和 8.9%,肝脏、胆汁和粪便中的<sup>3</sup>H 放射性分别升高 1.2 倍、1.2 倍和 1.1 倍,说明氢分子可以促进巨噬细胞胆固醇向肝脏的转运,肝脏对胆固醇的摄取和代谢增强。但是,Western blot 结果却显示 HRS 干预后肝脏脂质摄取的关键蛋白 SR-B1 和 CD36 蛋白水平明显降低。这似乎无法解释上述的同位素示踪结果所提示的肝脏对胆固醇的摄取增强。在高脂饮食动物实验中,一般氢分子干预 4~8 周就能明显降血脂和缓解非酒精性脂肪肝<sup>[17,21]</sup>。本研究中,长达 12 周的 HRS 干预使血浆和肝脏脂质持续处于较低水平,可能代偿性地引起肝脏 SR-B1、LDLR 和 CD36 蛋白水平下调,从而出现与同位素示踪结果不一致的情况。因此认为 HRS 干预导致的血浆 HDL 水平升高可能是提升动物整体胆固醇外排能力的主要原因。

HRS 干预在改善高脂饲喂金黄地鼠血脂的同时,也显著降低了肝脏中的 TC 和 TG 含量,缓解了肝脏脂肪变性,这与之前在非酒精性脂肪肝小鼠和患者中观察到的结果一致<sup>[21-22]</sup>。肝脏脂质蓄积减少可能与氢分子减少肝脏脂质摄取、抑制脂质合成、增强脂质分解代谢或促进脂质外排有关。本研究中,HRS 干预不仅降低了肝脏 SR-B1 和 LDLR 的蛋白水平,还有效抑制了 CD36。先前有研究证实,氢分子不仅可以下调棕榈酸处理的 HepG2 细胞中 CD36 蛋白水平<sup>[23]</sup>,还以剂量依赖性方式降低急性乙醇中毒小鼠肝脏中 CD36 mRNA 水平<sup>[24]</sup>。本研究中,HRS 干预不影响内源性胆固醇合成关键基因 HMGCR mRNA 水平,但是显著降低了脂质合成重要转录调控因子 SREBP1 mRNA 水平。有研究通过转录组和代谢组发现,氢分子长期干预可以通过调节 NADP/NADPH 氧化还原途径诱导大鼠肝脏代谢重编程,减少肝脏脂肪生成和增强脂肪分解<sup>[25]</sup>。此外有报道,在氢分子干预的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏中胆固醇外排相关基因 ABCG8、ABCB4 和 ABCB11 mRNA 水平显著升高<sup>[20]</sup>。在一项香烟烟雾暴露损害 RCT 的动物实验中,HRS 干预同时显著提高 ABCG5 和 CYP7A1 的 mRNA 水平<sup>[7]</sup>。本研究也发现 HRS 干预后金黄地鼠肝脏中 ABCG8 mRNA 和 ABCG5 蛋白

水平升高。由此可见,氢分子干预也可以调控胆固醇外排相关基因的表达,促进胆固醇从肝胆分泌进入粪便。

本研究也有一些局限性。首先,缺乏在普通饮食条件下探究腹腔注射 HRS 对金黄地鼠血脂和体内 RCT 的影响。尽管早期已经证实腹腔注射 HRS 4 周对普通饮食条件下 CETP 转基因小鼠的血脂和巨噬细胞 RCT 没有任何影响<sup>[7]</sup>,但还是有必要明确更换实验动物和延长 HRS 干预是否对普通饮食条件下的 RCT 产生影响。其次,本研究没有在 HRS 干预的不同时间段去动态检测血浆脂质的变化及肝脏 RCT 相关基因的表达。因为,在本研究中观察到氢分子对 SR-B1 的影响与先前的研究结果相反;另外,HRS 干预后 SR-B1、LDLR 和 CD36 蛋白水平降低与肝脏对<sup>3</sup>H-胆固醇的摄取增强不一致。目前无法确定 HRS 干预后基因或蛋白表达的上调或下调是氢分子的直接作用,还是由于氢分子干预后血脂或肝脏脂质水平变化带来的代偿性调节作用。第三,血浆胆固醇主要来源于两种途径,即肝脏生物合成和肠道胆固醇吸收。减少肠道内胆固醇的吸收也可以降低血浆胆固醇水平以及肝脏胆固醇储量。有研究报道,氢气干预可以缓解高脂饮食诱导的肠道菌群失调和肠道损伤<sup>[26]</sup>,抑制肠道载脂蛋白 E、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)、肠脂肪酸结合蛋白(intestinal fatty acid-binding protein, I-FAPB)和过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )的增加,从而缓解高脂饮食小鼠的脂质代谢紊乱<sup>[6]</sup>。然而氢分子是否可以通过影响肠道胆固醇的吸收和外排来降低血浆胆固醇目前尚不清楚,这是后期本课题组需要进一步使用脂代谢表型不同于小鼠而更接近人类的金黄地鼠作为动物模型去探索的。

总而言之,HRS 干预可以降低高脂饲喂金黄地鼠血浆脂质水平和氧化应激水平,增强胆固醇由外周巨噬细胞向肝脏和粪便的转运,调控 RCT 通路中多种基因和蛋白表达,从而有效缓解肝脏脂质蓄积和发挥降血脂效应。本研究为氢分子作为一种新型的调脂小分子用于脂代谢性相关疾病的预防与治疗提供了更多的实验依据。

#### [参考文献]

[1] 中国血脂管理指南修订联合专家委员会. 中国血脂管理指南(2023 年)[J]. 中国循环杂志, 2023, 38(3): 237-271.

Joint Expert Committee on Revision of Chinese Blood Lipid Management Guidelines. Chinese guidelines for lipid management (2023)[J]. Chin Circ J, 2023, 38(3): 237-271.

- [2] LUO J, YANG H, SONG B L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(4): 225-245.
- [3] QIN S. Role of hydrogen in atherosclerotic disease: from bench to bedside[J]. Curr Pharm Des, 2021, 27(5): 713-722.
- [4] 谢云博, 陈军, 刘伯言, 等. 氢分子在心血管病及其危险因素防控中的作用和分子机制[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(12): 2264-2270.
- XIE Y B, CHEN J, LIU B Y, et al. Role and molecular mechanism of hydrogen molecule in prevention and control of cardiovascular diseases and its risk factors[J]. Chin J Pathophysiol, 2021, 37(12): 2264-2270.
- [5] SONG G, LIN Q, ZHAO H, et al. Hydrogen activates ATP-binding cassette transporter a1-dependent efflux *ex vivo* and improves high-density lipoprotein function in patients with hypercholesterolemia: a double-blinded, randomized, and placebo-controlled trial[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(7): 2724-2733.
- [6] QIU X, YE Q, SUN M, et al. Saturated hydrogen improves lipid metabolism disorders and dysbacteriosis induced by a high-fat diet[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020, 245(6): 512-521.
- [7] ZONG C, SONG G, YAO S, et al. Cigarette smoke exposure impairs reverse cholesterol transport which can be minimized by treatment of hydrogen-saturated saline[J]. Lipids Health Dis, 2015, 14: 159.
- [8] 刘伯言, 贾修滨, 薛俊莉, 等. 顶空-气相色谱法与氢气微电极法用于富氢水中氢气含量的检测[J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 352-357.
- LIU B Y, JIA X B, XUE J L, et al. Determination of hydrogen concentration in hydrogen-rich water by headspace gas chromatography and hydrogen microelectrode[J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(2): 352-357.
- [9] RIOS F J, TOUYZ R M, MONTEZANO A C. Isolation and differentiation of murine macrophages[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1527: 297-309.
- [10] TRÉGUIER M, BRIAND F, BOUBACAR A, et al. Diet-induced dyslipidemia impairs reverse cholesterol transport in hamsters[J]. Eur J Clin Invest, 2011, 41(9): 921-928.
- [11] SI Y, ZHANG Y, CHEN X, et al. Phospholipid transfer protein deficiency in mice impairs macrophage reverse cholesterol transport *in vivo*[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2016, 241(13): 1466-1472.
- [12] 温元元, 薛俊莉, 刘伯言, 等. 氢分子增强高密度脂蛋白介导的胆固醇排出功能: 从动物实验到临床试验

- [J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(11): 996-1000.
- WEN Y Y, XUE J L, LIU B Y, et al. Hydrogen molecule enhances high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux; from animal experiments to clinical trials[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(11): 996-1000.
- [13] LIU B, LV P, ZHANG X, et al. Zn-Fe primary battery-enabled controlled hydrogen release in stomach for improving insulin resistance in obesity-associated type 2 diabetes [J]. Bioact Mater, 2024, 33: 242-250.
- [14] LEBARON T W, SINGH R B, FATIMA G, et al. The effects of 24-week, high-concentration hydrogen-rich water on body composition, blood lipid profiles and inflammation biomarkers in men and women with metabolic syndrome: a randomized controlled trial [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 889-896.
- [15] SONG G, LI M, SANG H, et al. Hydrogen-rich water decreases serum LDL-cholesterol levels and improves HDL function in patients with potential metabolic syndrome [J]. J Lipid Res, 2013, 54(7): 1884-1893.
- [16] MORVARIDZADEH M, ZOUBDANE N, HESHMATI J, et al. High-density lipoprotein metabolism and function in cardiovascular diseases: what about aging and diet effects? [J]. Nutrients, 2024, 16(5): 653.
- [17] ZONG C, SONG G, YAO S, et al. Administration of hydrogen-saturated saline decreases plasma low-density lipoprotein cholesterol levels and improves high-density lipoprotein function in high-fat diet-fed hamsters[J]. Metabolism, 2012, 61(6): 794-800.
- [18] LIU B, ZHAO M, XUE J, et al. Hydrogen influences HDL-associated enzymes and reduces oxidized phospholipids levels in rats fed with a high-fat diet[J]. Life Sci, 2021, 267: 118945.
- [19] BEN-AICHA S, BADIMON L, VILAHUR G. Advances in HDL: much more than lipid transporters[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 732.
- [20] SONG G, TIAN H, QIN S, et al. Hydrogen decreases athero-susceptibility in apolipoprotein B-containing lipoproteins and aorta of apolipoprotein E knockout mice[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(1): 55-65.
- [21] TAO G, LIU F, JIN Z, et al. A strategy of local hydrogen capture and catalytic hydrogenation for enhanced therapy of chronic liver diseases [J]. Theranostics, 2023, 13(8): 2455-2470.
- [22] TAO G, ZHANG G, CHEN W, et al. A randomized, placebo-controlled clinical trial of hydrogen/oxygen inhalation for non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(14): 4113-4123.
- [23] IIO A, ITO M, ITOH T, et al. Molecular hydrogen attenuates fatty acid uptake and lipid accumulation through downregulating CD36 expression in HepG2 cells[J]. Med Gas Res, 2013, 3(1): 6.
- [24] XU L, GUO W, DAI J, et al. Hydrogen gas alleviates acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice via modulating TLR4/9 innate immune signaling and pyroptosis[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 127: 111399.
- [25] ADZAVON Y M, XIE F, YI Y, et al. Long-term and daily use of molecular hydrogen induces reprogramming of liver metabolism in rats by modulating NADP/NADPH redox pathways[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 3904.
- [26] TAKAHASHI S, NAKAGAWA K, NAGATA W, et al. A preliminary therapeutic study of the effects of molecular hydrogen on intestinal dysbiosis and small intestinal injury in high-fat diet-loaded senescence-accelerated mice [J]. Nutrition, 2024, 122: 112372.

(此文编辑 文玉珊)