

非诺贝特对高胆固醇喂养兔主动脉斑块面积和肿瘤坏死因子 α 的影响

吴洁¹, 赵水平², 邓平², 吴智鸿²

(1. 南华大学附属第一医院心内科, 湖南省衡阳市 421001; 2. 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 内科学; 非诺贝特具有抗动脉粥样硬化作用; 半定量逆转录聚合酶链反应; 非诺贝特; 肿瘤坏死因子 α ; 斑块面积; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 利用高脂饮食诱发动脉粥样硬化模型, 观察非诺贝特的抗动脉粥样硬化作用, 并探讨其机制。方法 10 只新西兰大白兔给予高胆固醇饮食饲养 8 周后, 随机分为两组: 高胆固醇组继续饲以高胆固醇饲料 4 周; 非诺贝特组在饲以高胆固醇饲料的基础上给予非诺贝特 [30 mg/(kg·d)], 共 4 周。另选择普通饮食 12 周兔 ($n=5$) 作为对照组。测定饲养前后血清肿瘤坏死因子 α 水平和饲养后的主动脉斑块面积。半定量逆转录聚合酶链反应测定脂肪组织肿瘤坏死因子 α mRNA 的表达。结果 非诺贝特组和高胆固醇组血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平均明显高于对照组 ($P < 0.001$), 但两组间差异无显著性。非诺贝特组与高胆固醇组相比主动脉斑块面积 ($52.81\% \pm 6.92\%$ 比 $76.30\% \pm 8.61\%$, $P < 0.01$)、血管内膜厚度 ($28.45 \pm 5.68 \mu\text{m}$ 比 $76.18 \pm 11.25 \mu\text{m}$, $P < 0.05$)、血清肿瘤坏死因子 α 水平 ($2.11 \pm 0.26 \text{ ng/L}$ 比 $3.86 \pm 0.33 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$) 以及脂肪组织肿瘤坏死因子 α mRNA 表达量 (0.31 ± 0.05 比 0.56 ± 0.07 , $P < 0.05$) 均显著降低。结论 非诺贝特具有一定的抗动脉粥样硬化作用, 其降低高胆固醇喂养兔血清肿瘤坏死因子 α 水平可能是其作用机制之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effects of Fenofibrate to Aortic Atherosclerotic Area and Serum Tumor Necrosis Factor- α in the Cholesterol-Fed Rabbits

WU Jie, ZHAO Shui-Ping, DENG Ping, and WU Zhi-Hong

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Fenofibrate; Atherosclerotic Plaque Area; Tumor Necrosis Factor- α ; Atherosclerosis; Intimal thickness; Cholesterol-Fed Rabbits

[ABSTRACT] **Aim** To observe the anti-atheromatous effects of fenofibrate in cholesterol-fed rabbits. **Methods** 10 male New Zealand white rabbits were fed with high cholesterol diet for 8 weeks, and then were randomly divided into two groups: high cholesterol group maintained cholesterol diet for 4 weeks; fenofibrate treatment group maintained the same cholesterol diet besides supplementing with fenofibrate [30 mg/(kg·d)] for 4 weeks. And control group was fed with normal diet for 12 weeks. Before and after feeding, serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels of all rabbits were measured. After feeding, the aortas were harvested for observing the formation of atherosclerotic plaques. TNF- α mRNA expression in adipose tissue was evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** High cholesterol group and fenofibrate treatment group showed higher serum levels of total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol than those of control group ($P < 0.001$), but there were no difference between the two groups ($P > 0.05$). As compared with the high cholesterol group, aortic atherosclerotic area ($52.8\% \pm 6.9\%$ vs $76.3\% \pm 8.6\%$, $P < 0.01$), intimal thickness of the aorta ($28.45 \pm 5.68 \mu\text{m}$ vs $76.18 \pm 11.25 \mu\text{m}$, $P < 0.05$), serum TNF- α levels ($2.11 \pm 0.26 \text{ ng/L}$ vs $3.86 \pm 0.33 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$) and TNF- α mRNA expression in adipose tissue (0.31 ± 0.05 vs 0.56 ± 0.07 , $P < 0.05$) were significantly decreased in fenofibrate treatment group. **Conclusions** The study indicates that fenofibrate manifests an anti-atheromatous effect independent of the hypolipidemic effect in cholesterol-fed rabbits and decreasing serum TNF- α level may be one of its possible mechanisms.

动脉粥样硬化是一种炎症性疾病^[1]。高脂血症是动脉粥样硬化的重要危险因素, 并可能通过触发炎症反应, 参与动脉粥样硬化的形成。肿瘤坏死

因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种具有多种生物学活性的细胞因子, 参与机体的炎症及免疫病理反应^[2]。高脂血症、冠心病患者血清有较高水平的 TNF- α , 并与动脉粥样硬化的严重性密切相关^[3]。炎症在动脉粥样硬化中起重要作用并已成为临床干预的目标。一些临床试验结果显示贝特类药物调脂同时还能降低冠状动脉事件, 延缓动脉粥样

[收稿日期] 2005-06-09

[修回日期] 2006-04-01

[作者简介] 吴洁, 博士, 副教授, 研究方向为冠心病的防治研究, E-mail 为 wujie702@yahoo.com.cn。赵水平, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血脂代谢异常与动脉粥样硬化研究, E-mail 为 ZhaoSP@medmail.com.cn。邓平, 博士, 副主任医师, 研究方向为血脂代谢。

硬化进程^[4]。贝特类的抗动脉粥样硬化作用尚难完全通过其调脂作用来解释,其中还涉及许多非调脂作用^[5]。为此本研究利用高胆固醇饮食建立兔动脉粥样硬化模型,观察非诺贝特对兔主动脉斑块病变的影响,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

新西兰纯种雄性大白兔(中南大学湘雅二医院实验动物中心提供),胆固醇(天津化学试剂公司),蛋黄粉(大连生物化学制品有限公司),微粒化非诺贝特(法国利博福尼制药公司,商品名力平之,批号73502),TNF- α 酶联免疫试剂盒(TPI公司),Trizol RNA抽提试剂(Gibco-BRL),各种半定量逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂(Promega)。

1.2 兔高脂模型的建立及动物分组

15只新西兰大白兔,体重2.01~2.50 kg,观察7天后随机取10只予以高脂饲料(1%胆固醇、7.5%蛋黄粉和8%猪油),喂养8周后再随机分为两组:高胆固醇组5只,继续饲以高脂饲料4周;非诺贝特组5只,在继续高脂饲料喂养的基础上,予以微粒化非诺贝特[30 mg/(kg·d)]治疗4周;其余5只兔予以普通饲料喂养12周作为对照组。每兔每日总食量约为120 g,单笼饲养,饮水不限。

1.3 血脂测定

饲养前、饲养第8周和第12周时,经兔耳中央动脉取空腹血2 mL,静置30 min后离心取血清,在日立7600-020全自动生化仪上测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和甘油三酯(triglyceride, TG)浓度。

1.4 形态学观察及定量分析

12周后用戊巴比妥钠(25 mg/kg)腹腔麻醉,剖开胸腹腔,剥离主动脉全长,纵行切开,取主动脉远端1.5 cm置入4%多聚甲醛溶液中固定,进行常规苏木素-伊红(HE)染色;其余主动脉用苏丹Ⅳ染色。数字相机照相后由有经验的病理科医生用北航病理图像分析系统定量测定主动脉内膜厚度及斑块面积占主动脉总面积的百分比。

1.5 血清肿瘤坏死因子 α 的检测

采用酶联免疫吸附法检测血清TNF- α 浓度。检测灵敏度1 ng/L,批内及批间变异系数均<10%,每份样品均设复孔。

1.6 脂肪组织肿瘤坏死因子 α mRNA的表达

用Trizol试剂盒抽提脂肪组织总RNA,采用紫外分光光度计测定其浓度。取2 μ g总RNA进行逆转录反应,每一标本取逆转录产物4 μ L进行PCR。TNF- α 引物上游5'-GCT CCT CAC TCA CAC TGT CAG-3',下游5'-GCA ATG ATC CCA AAG TAG AC-3',扩增片段246 bp。内对照GAPDH引物上游5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC-3',下游5'-CCA GTG AGT TTC CCG TTC-3',扩增片段346 bp。反应参数为94℃预变性3 min,94℃变性1 min \rightarrow 62℃退火1 min \rightarrow 72℃延伸80 s,共40个循环,72℃延伸10 min。取PCR产物5 μ L经2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色、照相并经光密度仪扫描分析,以内对照光密度值进行标准校正,计算TNF- α 产物的相对量。

1.7 统计学方法

应用SPSS10.0统计软件。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,主要指标均进行正态分析,采用One-way ANOVA分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血脂水平变化

三组兔0周时血浆TC、LDLC和TG浓度无显著性差异;高胆固醇饮食后第8周,高胆固醇组和非诺贝特组TC和LDLC浓度均显著高于对照组($P < 0.001$),而TG仅轻度升高,差异无显著性。12周时非诺贝特对TC、LDLC和TG的降低作用不明显,且与高胆固醇组比较差异无显著性(表1)。

表1. 血脂水平变化($\bar{x} \pm s$, $n = 5$, mmol/L)

指标		对照组	高胆固醇组	非诺贝特组
TC	0周	1.07 \pm 0.43	1.23 \pm 0.40	1.01 \pm 0.43
	8周	1.08 \pm 0.31	24.39 \pm 0.25 ^a	24.43 \pm 0.19 ^a
	12周	1.36 \pm 0.60	25.72 \pm 1.78 ^a	24.70 \pm 1.79 ^a
LDLC	0周	0.38 \pm 0.24	0.48 \pm 0.18	0.44 \pm 0.27
	8周	0.34 \pm 0.25	15.8 \pm 0.29 ^a	14.82 \pm 0.56 ^a
	12周	0.54 \pm 0.35	14.56 \pm 0.28 ^a	12.92 \pm 0.12 ^a
TG	0周	0.99 \pm 0.64	0.83 \pm 0.30	0.85 \pm 0.30
	8周	0.96 \pm 0.48	2.71 \pm 0.45	2.33 \pm 0.37
	12周	1.10 \pm 0.34	3.08 \pm 0.29	1.84 \pm 0.14

a为 $P < 0.001$,与对照组比较。

2.2 血清肿瘤坏死因子 α 水平

三组兔0周时血清TNF- α 水平无显著性差异;高胆固醇饮食第8周,高胆固醇组和非诺贝特组血

清 TNF- α 水平均显著高于对照组 ($P < 0.01$); 12 周时非诺贝特组血清 TNF- α 水平降低 44.7% ($P < 0.05$, 表 2)。

2.3 动脉粥样斑块面积的比较

肉眼下, 对照组主动脉内膜光滑, 未见粥样硬化斑块; 高胆固醇组主动脉内膜有严重的粥样硬化病变, 黄白色脂样物质突出管腔, 呈点、斑、条状隆起, 边缘清楚, 表面无明显破溃, 较严重者斑块融合成片, 密布内膜面, 以主动脉起始部为重; 非诺贝特组主动脉内膜散在粥样斑块, 多集中在主动脉起始部,

降主动脉病变较高胆固醇组减轻。苏丹 ④ 染色显示, 动脉粥样硬化病变处被染成红色 (图 1)。与高胆固醇组比较, 非诺贝特组主动脉斑块面积减少 30.8% ($P < 0.05$); 各组兔主动脉斑块面积与血清 TNF- α 水平显著正相关 ($r = 0.763$, $P < 0.01$)。HE 染色显示, 正常组血管内膜光滑、连续; 高胆固醇组血管内膜明显增厚, 内膜中有大量巨噬细胞浸润, 内有脂质沉积, 形成泡沫细胞; 非诺贝特组血管内膜也有增厚, 但其厚度及病变程度较高胆固醇组减轻 (表 2 和图 2)。

表 2. 血清肿瘤坏死因子 α 及主动脉斑块面积和内膜厚度变化 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	TNF- α (ng/L)			斑块面积	内膜厚度 (μm)
		0 周	8 周	12 周		
对照组	5	1.65 \pm 0.16	1.72 \pm 0.11	1.75 \pm 0.18	0	4.12 \pm 0.29
高胆固醇组	5	1.63 \pm 0.11	3.82 \pm 0.32 ^a	3.86 \pm 0.33 ^a	76.30% \pm 8.61% ^a	76.18 \pm 11.25 ^a
非诺贝特组	5	1.64 \pm 0.18	3.81 \pm 0.23 ^a	2.11 \pm 0.26 ^b	52.81% \pm 6.92% ^b	28.45 \pm 5.68 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高胆固醇组比较。



图 1. 主动脉粥样硬化病变情况 上条、中条、下条主动脉分别为非诺贝特组、高胆固醇组和对照组。

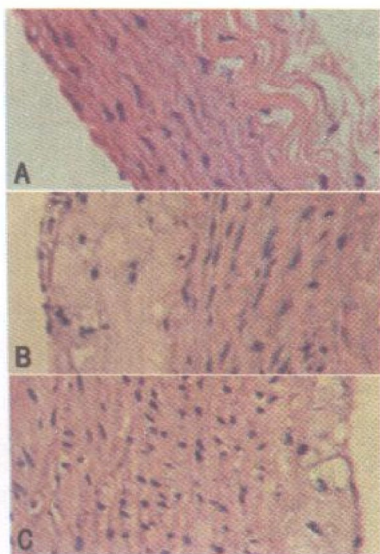


图 2. 主动脉 HE 染色 A 为对照组, B 为高胆固醇组, C 为非诺贝特组。

2.4 脂肪组织肿瘤坏死因子 α mRNA 的表达

高胆固醇组、非诺贝特组和对照组 TNF- α mRNA 的表达分别为 0.56 \pm 0.07、0.31 \pm 0.05 和 0.12 \pm 0.02, 三组间比较差异有显著性 ($P < 0.05$, 图 3)。

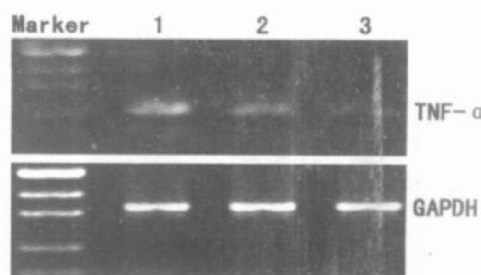


图 3. 脂肪组织肿瘤坏死因子 α mRNA 的表达 1 为高胆固醇组, 2 为非诺贝特组, 3 为对照组。

3 讨论

随着动脉粥样硬化炎症学说的提出, 炎症在动脉粥样硬化的发生发展中的作用已引起人们极大的关注^[6,7]。TNF- α 是一种具有多种生物学活性的炎症因子, 动物实验发现动脉粥样硬化斑块中 TNF- α mRNA 表达增高并对斑块中各种细胞成分都有作用^[8]。TNF- α 可通过刺激内皮细胞和巨噬细胞合成血管细胞粘附分子 1^[9], 促进平滑肌细胞的增殖和迁移^[10], 使凝血与抗凝系统失衡等机制促进动脉粥样硬化的发生与发展, 用 TNF- α 受体拮抗剂阻断

TNF 的生物效应后, 动脉粥样斑块病变减轻^[11]。临床试验也发现高脂血症、冠心病患者血清有较高水平的 TNF- α , 并与冠心病的危险性增加及动脉粥样硬化的严重性密切相关^[3,12], 故认为 TNF- α 是促使动脉粥样硬化发展的主要细胞因子。本研究也观察到喂饲胆固醇饮食后, 高胆固醇组兔血清 TNF- α 水平较对照组明显升高, 且兔主动脉斑块面积与其血清 TNF- α 水平显著正相关。这一结果进一步支持 TNF- α 参与了动脉粥样硬化的发生发展。

近年来脂肪细胞分泌 TNF- α 引起人们极大的关注。脂肪组织是产生内源性 TNF- α 的主要来源, 脂肪组织 TNF- α mRNA 和蛋白表达水平升高, 循环中 TNF- α 的水平就随之增高^[13]。本研究中高胆固醇组脂肪组织 TNF- α 表达水平明显升高, 与血清 TNF- α 水平升高相一致, 提示循环 TNF- α 部分来源于脂肪组织。

大量的动物及临床研究已经证实, 非诺贝特具有调脂外的抗动脉粥样硬化作用。非诺贝特能降低高胆固醇血症兔胸主动脉斑块面积的百分数并独立于其降脂作用^[14], 其机制可能与非诺贝特降低循环 TNF- α 水平有关^[15]。本研究也有类似的结论。非诺贝特是 PPAR α 的激动剂, 通过活化 PPAR α 来调节脂质及脂蛋白代谢。近年研究证明, PPAR α 也表达于血管壁及脂肪细胞, 非诺贝特能通过活化 PPAR α , 负性调节核因子 κ B (NF- κ B) 活性而抑制某些炎症及粘附分子表达, 从而产生抗炎和抗动脉粥样硬化作用^[16]。本研究发现非诺贝特组脂肪组织 TNF- α 表达水平较高胆固醇组明显降低, 提示非诺贝特还可能通过降低脂肪组织 TNF- α 的分泌来降低循环 TNF- α 水平。

总之, 高胆固醇饮食能增加循环及脂肪组织 TNF- α 分泌水平, 促进动脉粥样硬化的发生发展。非诺贝特有独立于降脂作用外抗动脉粥样硬化作用, 其机制可能与其抑制脂肪组织 TNF- α 表达从而降低循环 TNF- α 水平有关。非诺贝特这一作用为贝

特类药物抗动脉粥样硬化提供了新的理论依据。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-26
- [2] Garwal BB. Human Cytokines[M]. Edited by Aggarwal BB, Gutterman JU. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1992; 270
- [3] Madej A, Okopien B, Kowalski J, Zielinski M, Wysocki J, Szygula B, et al. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia ③[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1998, **36** (6): 345-349
- [4] Sacks FM. The relative role of LDL-cholesterol and HDL-cholesterol in coronary artery disease: evidence from large-scale statin and fibrate trials[J]. *Am J Cardiol*, 2001, **88** (Suppl): 14N-8N
- [5] Pineda Torra I, Gervois P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging[J]. *Curr Opin Lipidol*, 1999, **10** (2): 151-159
- [6] 徐也鲁. 动脉粥样硬化——一种慢性炎症过程[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 93-95
- [7] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 249-53
- [8] Lei X, Buja LM. Detection and localization of tumor necrosis factor- α in WHHL rabbit arteries[J]. *Atherosclerosis*, 1996, **125** (1): 81-89
- [9] Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW, Parks TP. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells: differential regulation by TNF- α and phorbol myristate acetate[J]. *J Biol Chem*, 1992, **267** (17): 12 030-035
- [10] Jovinge S, Hultgard Nilsson A, Regnström J, Nilsson J. Tumor necrosis factor- α activates smooth muscle cell migration in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (3): 490-497
- [11] Clausell N, Molossi S, Sett S, Rabinovitch M. In vivo blockade of tumor necrosis factor- α in cholesterol-fed rabbits after cardiac transplant inhibits acute coronary artery neointimal formation[J]. *Circulation*, 1994, **89** (6): 2 768-79
- [12] Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sirtori-Crivelles K, et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study[J]. *Circulation*, 2003, **108** (19): 2 317-322
- [13] Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance[J]. *J Clin Invest*, 1995, **95** (5): 2 409-415
- [14] Saitoh K, Mori T, Kasai H, Nagayama T, Tsuchiya A, Ohbayashi S. Anti-atheromatous effects of fenofibrate, a hypolipidemic drug. I: Anti-atheromatous effects are independent of its hypolipidemic effect in cholesterol-fed rabbits[J]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 1995, **106** (1): 41-50
- [15] Koh KK, Ahn JY, Jin DK, Han SH, Kim HS, Choi IS, et al. Comparative effects of statin and fibrate on nitric oxide bioactivity and matrix metalloproteinase in hyperlipidemia[J]. *Int J Cardiol*, 2004, **97** (2): 239-244
- [16] Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutsky J. PPAR α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells[J]. *Circulation*, 1999, **99** (24): 3 125-131

(此文编辑 文玉珊)