

## 吡格列酮抑制载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 主动脉粥样硬化病变进展及可能机制

达娃次仁<sup>1</sup>, 赵 锋<sup>1</sup>, 齐永芬<sup>2</sup>, 霍 勇<sup>1</sup>

(1. 北京大学第一医院心内科, 北京市 100034; 2. 北京大学医学部心血管研究所, 北京市 100083)

[关键词] 病理学与病理生理学; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 动脉粥样硬化; 脂联素; 吡格列酮

[摘要] 目的 观察吡格列酮对高脂饲料喂养的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化病变及其血浆脂联素水平的影响, 以探讨噻唑烷二酮类药物抗动脉粥样硬化作用及其可能的机制。方法 取 9 只 17 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠普通饲料喂养 4 周为对照组; 另取 31 只同周龄雄性载脂蛋白 E 基因敲除小鼠随机分成三组给予高脂饲料喂养 4 周, 其中模型组 ( $n=10$ ) 单用高脂饲料喂养, 低剂量治疗组 ( $n=10$ ) 经胃管给予吡格列酮  $10 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 高剂量治疗组 ( $n=11$ ) 经胃管给予吡格列酮  $20 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。所有试验小鼠均观察其主动脉粥样硬化病变及血脂、血浆脂联素水平。结果 与对照组比, 所有载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血脂水平显著升高并伴有主动脉内膜明显增厚及内膜下粥样斑块形成; 与对照组 ( $18.96 \pm 4.89 \text{ }\mu\text{g/L}$ ) 比, 模型组血浆脂联素水平 ( $12.41 \pm 3.84 \text{ }\mu\text{g/L}$ ) 显著下降, 而两治疗组脂联素水平 ( $18.78 \pm 7.24$  和  $24.00 \pm 4.71 \text{ }\mu\text{g/L}$ ) 比模型组显著升高, 主动脉粥样硬化病变却减轻, 且这种变化在高剂量治疗组更明显。结论 吡格列酮抑制载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化病变的进展可能与其提高血浆脂联素水平有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Anti-atherosclerotic Effects and Possible Mechanism of Pioglitazone on Apolipoprotein E Knockout Mice

DA Wa Ci Ren<sup>1</sup>, ZHAO Feng<sup>1</sup>, QI Yong-Fen<sup>2</sup>, and HUO Yong<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, First Hospital of Peking University, Beijing 100034; 2. Institute of Cardiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083)

[KEY WORDS] Apolipoprotein E Knockout Mice; Atherosclerosis; Adiponectin; Pioglitazone

[ABSTRACT] Aim To investigate the change of aortic atherosclerosis and plasma adiponectin of apolipoprotein E knockout ( $\text{ApoE}^{-/-}$ ) mouse treated with pioglitazone. Methods 9 male mice of C57BL, 17 weeks aged, were fed with common food for 4 weeks as simple control group. In addition, 31 same age male mice of  $\text{ApoE}^{-/-}$  were fed with high fatty food for setting up atherosclerosis animal models, and these mice were divided into three groups at random including: model group only receiving high fatty food for 4 weeks, low-dose treated group receiving pioglitazone administered via gastric tube at  $10 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  for consecutive 4 weeks, high dose treated group receiving pioglitazone administered via gastric tube at  $20 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  for consecutive 4 weeks. The change of aortic atherosclerosis and levels of plasma adiponectin, plasma lipids of all mice were analyzed. Results The plasma levels of total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol and high density lipoprotein cholesterol in all  $\text{ApoE}^{-/-}$  mice were significantly increased than those in control group ( $P < 0.01$ ); The plasma adiponectin level in model group was significantly decreased than that of control group, but the plasma adiponectin was elevated and the lesions of aortic atherosclerosis were inhibited in two treated groups, moreover, these change were more significant in high dose treated group ( $P < 0.05$ ). Conclusions Pioglitazone inhibits aortic atherosclerosis in  $\text{ApoE}^{-/-}$  mice, and these effects may be related to plasma adiponectin level increasing.

脂联素是近年发现的一种脂肪细胞特异性分泌的蛋白质<sup>[1]</sup>, 在肥胖、胰岛素抵抗、2 型糖尿病<sup>[2]</sup> 和高血压病等与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 相关疾病的人群中血浆脂联素水平显著降低, 而且低脂

脂血症是冠心病的独立危险因素<sup>[3]</sup>。因此, 脂联素可能是 As 的保护因子<sup>[4]</sup>。提高血浆脂联素水平对 As 可能起到防治作用。噻唑烷二酮类 (Thiazolidinediones, TZD) 药物是过氧化物增殖物激活型受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ ) 激动剂, 用于治疗伴有胰岛素抵抗的 2 型糖尿病患者。但 TZD 抗 As 作用及其机制的研究尚不多见。本研究通过观察载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E knockout,  $\text{ApoE}^{-/-}$ ) 小鼠经吡格列酮处理

[收稿日期] 2007-12-13

[修回日期] 2008-03-06

[作者简介] 达娃次仁, 博士研究生, 从事心血管内科临床与基础研究, e-mail 为 dwcztz@126.com。通讯作者赵锋, 主任医师, 博士研究生导师, 从事心血管内科临床与基础研究。霍勇, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 从事冠心病基础与临床研究及介入治疗。齐永芬, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病预防基础研究。

后其主动脉粥样硬化病变及血浆脂联素水平的变化,以探讨TZD药物的抗As作用及可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

实验所用载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠及C57BL/6J小鼠均购自北京维通利华公司;高脂饲料(1%胆固醇、10%猪油、10%蛋黄粉和0.35%胆盐)由北京维通利华公司配制;血脂测定试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司;放射免疫法脂联素试剂盒购自美国LincoResearch;实验所用药物(盐酸吡格列酮片)由江苏恒瑞医药股份有限公司提供。

### 1.2 动物模型复制与分组

取9只17周龄雄性C57BL/6J小鼠用普通饲料喂养,设为对照组;另取31只同周龄雄性载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠随机分成三组:模型组( $n=10$ )单用高脂饲料喂养,复制As模型;而两个治疗组用高脂饲料喂养的同时参照文献[5]分为高、低两个剂量组,低剂量治疗组( $n=10$ )经灌胃针灌注盐酸吡格列酮10 mg/(kg·d);高剂量治疗组( $n=11$ )经灌胃针灌注盐酸吡格列酮20 mg/(kg·d)。所有实验小鼠均为清洁级别,到达动物室后在同样温度、湿度和光照等环境条件下适应3天,进食进水正常,体重稳定后开始进入试验程序。所有小鼠自由进食饮水,每日测体重一次并记录,实验用药磨成粉状溶于生理盐水配成不同浓度的两瓶混悬液,根据当日动物体重用1 mL注射器抽取药液并用生理盐水统一容至0.5 mL,然后经灌胃针灌胃;模型组与对照组无论体重多少,均给予生理盐水0.5 mL灌胃。所有实验小鼠按上述不同要求喂养4周。

### 1.3 实验取材

小鼠禁食过夜(不禁水),称体重。5%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射后迅速开腹经腹主动脉取动脉血约0.5~0.8 mL,离心分离血清,−20℃冰箱保存用于测定血脂及脂联素水平;剪取主动脉根部靠近主动脉瓣环处约0.5 cm用OCT组织固定液包埋固定,液氮速冻后置于−20℃冰箱保存,行冰冻切片及油红O染色观察主动脉粥样硬化病变情况。

### 1.4 油红O染色观察主动脉根部病理改变

将OCT包埋固定的血管组织行冰冻切片,每个标本在显微镜下观察到完整的血管结构后继续切片10~16张,然后进行油红O染色。显微镜下观察血管壁脂质沉积、内膜增厚及斑块形成等病理改变。

### 1.5 血脂及血清脂联素测定

用比浊法测定血清甘油三酯(triacylglycerol, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)。用Friedewald公式推算低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC) ( $TG < 4.5$  mmol/L时,  $LDLC = TC - HDLC - TG/2.2$ )。用放射免疫法测定血清脂联素,每份标本测两次取平均值。

### 1.6 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据分别进行独立性检验、正态性检验及方差齐性检验。两组间比较用非配对 $t$ 检验,多组间比较用ONE WAY ANOVA方差分析。组间两两比较用LSD- $t$ 检验(方差齐时)或Tamhane's  $T^2$ 检验(方差不齐时)。所有统计学处理均使用SPSS13.0软件处理。

## 2 结果

### 2.1 体重变化及血脂水平

各组小鼠在实验结束时体重均有一定增加,但体重增加值在各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。所有载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠TC、LDLC和HDLC均显著高于对照组( $P < 0.01$ ),而TG水平在各组间差异均无显著性( $P > 0.05$ )。而在载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠中从模型组到低剂量治疗组和高剂量治疗组TC、LDLC和HDLC均有逐渐升高的趋势,但差异没有统计学意义( $P > 0.05$ ,表1)。

### 2.2 血清脂联素水平

模型组血清脂联素水平显著低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而两个治疗组血清脂联素水平较模型组显著升高( $P < 0.05$ ),且高剂量治疗组比低剂量治疗组显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表1)。

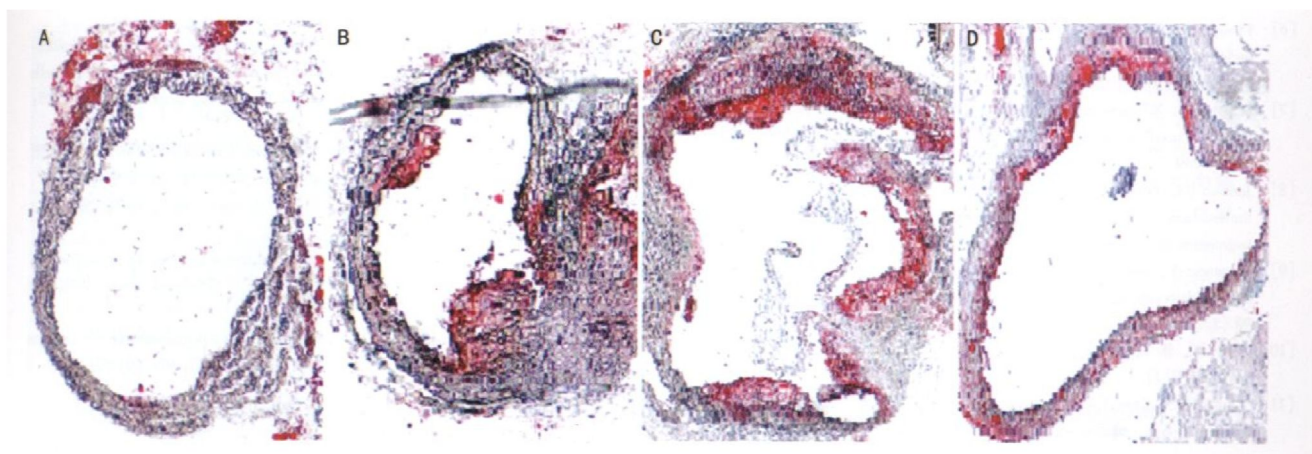
### 2.3 主动脉根部病理改变

油红O染色可见,对照组内膜光滑,仅在血管外膜见到红染脂质浸润;模型组血管切片中不仅可以看到红染脂质浸润,而且可以看到内膜增厚,并在多个血管切片上出现较大斑块形成,该组有5处斑块,个别有血栓形成;低剂量治疗组血管切片可看到明显内膜增厚,但斑块数量较模型组减少,该组可见2处斑块,1处有血栓脱落到管腔中;而高剂量治疗组内膜仍有增厚,但较低剂量治疗组减轻,有1处较小斑块形成(图1)。

表 1. 各组体重变化值及血脂、血清脂联素水平

分 组	体重增加 (g)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLc (mmol/L)	脂联素 ( $\mu\text{g/L}$ )
对照组	2.42 $\pm$ 1.87	2.74 $\pm$ 0.71	1.22 $\pm$ 0.55	0.84 $\pm$ 0.47	1.38 $\pm$ 0.29	18.96 $\pm$ 4.89
模型组	2.32 $\pm$ 1.80	21.98 $\pm$ 4.20 <sup>b</sup>	1.36 $\pm$ 0.62	15.59 $\pm$ 6.64 <sup>b</sup>	3.37 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>	12.41 $\pm$ 3.84 <sup>a</sup>
低剂量治疗组	3.00 $\pm$ 1.52	23.61 $\pm$ 7.18 <sup>b</sup>	1.36 $\pm$ 0.49	16.82 $\pm$ 9.43 <sup>b</sup>	4.15 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	18.78 $\pm$ 7.24 <sup>c</sup>
高剂量治疗组	1.68 $\pm$ 1.42	25.58 $\pm$ 5.70 <sup>b</sup>	1.83 $\pm$ 0.57	20.32 $\pm$ 5.25 <sup>b</sup>	4.33 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	24.00 $\pm$ 4.71 <sup>acd</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比; c 为  $P < 0.05$ , 与模型组比; d 为  $P < 0.05$ , 与低剂量治疗组比。

图 1. 各组小鼠主动脉根部横断面油红 O 染色病理切片 ( $\times 4$ )

A 为对照组, B 为模型组, C 为低剂量治疗组, D 为高剂量治疗组。

### 3 讨论

载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠被认为是研究人类 As 可靠的动物模型<sup>[6]</sup>。本研究发现, 与野生 C57BL/6J 小鼠比较, 所有载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠高脂饲料喂养 4 周后, 主动脉根部病理切片均可见到不同程度的脂质沉积、内膜增厚及斑块形成。载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠通过高脂饲料喂养后可在短期内建立 As 动物模型。

脂联素是近年来发现的一种脂肪细胞特异性分泌的蛋白质, 人体血浆脂联素水平稳定<sup>[7]</sup>。研究发现血浆脂联素水平与颈动脉粥样硬化及冠心病的不同临床类型相关联, 认为低脂联素血症是冠心病的独立危险因素<sup>[3,8,9]</sup>。本研究发现, 模型组小鼠血浆脂联素水平较对照组显著降低 ( $P < 0.05$ ), 进一步证实了低脂联素血症与 As 之间存在相关性。大量研究表明脂联素可能从抑制内皮细胞的炎症反应、抑制单核细胞向血管内皮细胞粘附、抑制巨噬细胞功能、抑制平滑肌细胞的增殖与迁移和改善内皮细胞功能等多个方面来发挥抗 As 作用<sup>[10-16]</sup>。TZD 用于伴有胰岛素抵抗的 2 型糖尿病患者的治疗。近来有文献指出 TZD 具有抗 As 作用<sup>[17]</sup>。本研究中不同剂量吡格列酮治疗组载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠的主动脉根部 As 病变有不同程度的减轻, 并主要表现在斑块

数目及面积的减少, 这种变化在高剂量治疗组更明显。而关于 TZD 对血脂的影响, 文献[18]报道罗格列酮或吡格列酮与安慰剂对比 TG 水平下降、LDLC 及 HDLC 升高, 其中吡格列酮对 LDLC 的升高作用弱于罗格列酮, 而吡格列酮对 HDLC 的升高作用强于罗格列酮, 提示吡格列酮对血脂调节发挥更有利的作用。也有文献报道, 所有 TZD 均有升高 LDLC 的作用<sup>[19]</sup>, 但主要升高致 As 作用较弱的大颗粒 LDL<sup>[20]</sup>。本研究发现与野生 C57BL/6J 小鼠比较, 所有载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠 TC、LDLC 和 HDLC 均有显著升高, 而吡格列酮治疗组与模型组比较 TC、LDLC 和 HDLC 虽有升高的趋势, 但差异没有统计学意义, TG 变化不大。说明 TZD 抑制 As 作用较难用改善血脂代谢来解释。本研究发现, 与模型组比较, 不同剂量吡格列酮治疗可显著提高血浆脂联素水平, 并且大剂量组更明显, 这与 As 病变减轻程度相一致。提示 TZD 抑制载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠 As 病变可能与提高血清脂联素水平相关。

大量研究证实脂联素可通过多种途径发挥抗 As 作用; TZD 作为 PPAR $\gamma$  激动剂除了具有改善胰岛素抵抗及降血糖作用外, 还有抑制 As 的作用, 而这种抗 As 作用可能与其升高血浆脂联素水平相关。



## [参考文献]

- [1] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **257**: 79-83.
- [2] 卢慧玲, 王宏伟, 张木勋, 等. 2型糖尿病患者血浆脂联素和抵抗素水平的测定及意义[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 336-338.
- [3] Pischon T, Gimani CJ, Hotamisligil GS, et al. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men [J]. *JAMA*, 2004, **291** (14): 1730.
- [4] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors [J]. *Endocr Rev*, 2005, **26** (3): 439-451.
- [5] Kubota N. Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**: 8748-755.
- [6] Plump SJ, Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E2 deficient mice created by homologous recombination in ES cells [J]. *Cell*, 1992, **71** (10): 343-353.
- [7] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270** (45): 26746-749.
- [8] Jansson PA, Pellme F, Hammarstedt A, et al. A novel cellular marker of insulin resistance and early atherosclerosis in humans is related to impaired fat cell differentiation and low adiponectin [J]. *FASEB J*, 2003, **17** (11): 1434-440.
- [9] Nakamura Y, Shimada K, Fukuda D, et al. Implications of plasma concentration of adiponectin in patients with coronary artery disease [J]. *Heart*, 2004, **90** (5): 528.
- [10] 李长江, 张梅, 孙惠文, 等. 血管局部转染脂联素基因的抗动脉粥样硬化作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (7): 549.
- [11] Ouchi NKS, Arita Y, Okamoto Y, et al. Adiponectin: an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- $\kappa$ B signaling through a cAMP-dependent pathway [J]. *Circulation*, 2000, **102**: 1296-301.
- [12] Ouchi NKS, Arita Y, Maeda K, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin [J]. *Circulation*, 1999, **100**: 2473-476.
- [13] Ouchi NKS, Arita Y, Nishida M, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages [J]. *Circulation*, 2001, **103**: 1057-063.
- [14] Kobayashi HON, Kihara S, Walsh K, et al. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin [J]. *Circ Res*, 2004, **94**: e27-e31.
- [15] Matsuda MSI, Sata M, Arita Y, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis: the missing link of adipovascular axis [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (40): 487-491.
- [16] Motoshima HWX, Mahadev K, Goldstein BJ. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **315**: 264-271.
- [17] 赵全明, 颜东, 宋爱丽, 等. 罗格列酮对ApoE基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2005, **33** (5): 399-404.
- [18] Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones [J]. *N Engl J Med*, 2004, **351** (11): 1106-118.
- [19] Florkowski CM. Management of co-existing diabetes mellitus and dyslipidemia: defining the role of thiazolidinediones [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2002, **2**: 15-21.
- [20] Fonseca VA. Management of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with cardiovascular disease [J]. *Am J Cardiol*, 2003, **92**: 50F-60J.

(此文编辑 许雪梅)

## •读者•作者•编者•

## 我刊报道的疾病和诊治方法

- |                |                 |                 |
|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 肥胖症          | 9.4 动脉硬化性闭塞症    | 15 脑动脉硬化症       |
| 2 小儿肥胖病        | 9.5 动脉硬化性周围动脉缺血 | 16 动脉硬化性精神病     |
| 3 原发性高脂蛋白血症    | 10 高血压病         | 17 其他缺血性脑血管疾病   |
| 4 高脂血症         | 11 周围血管疾病       | 18 粥样栓塞性肾病      |
| 5 原发性肺动脉高压症    | 11.1 血栓闭塞性脉管炎   | 19 肾动脉血栓形成或栓塞   |
| 6 早老症          | 11.2 雷诺综合征      | 20 糖尿病合并心血管疾病   |
| 6.1 弥散性动脉粥样硬化  | 11.3 手足紫绀症      | 20.1 糖尿病并发冠心病   |
| 6.2 冠状动脉栓塞     | 11.4 急性动脉栓塞     | 20.2 糖尿病性心肌梗死   |
| 7 冠状动脉粥样硬化性心脏病 | 11.5 肢端动脉痉挛病    | 20.3 糖尿病并发血管病变  |
| 7.1 原发性心跳骤停    | 12 伯格氏病         | 21 代谢综合征        |
| 7.2 心绞痛        | 13 短暂性脑缺血发作     | 22 血管疾病的影像学诊断   |
| 7.3 心肌梗死       | 13.1 黑矇         | 23 血管疾病的手术疗法    |
| 7.4 冠状动脉性心力衰竭  | 13.2 视野异常       | 23.1 动脉旁路移植术    |
| 7.5 缺血性心律失常    | 14 脑梗死          | 23.2 动脉内膜切除术    |
| 8 急性冠状动脉综合征    | 14.1 脑血栓形成      | 23.3 激光心肌内血管重建术 |
| 9 动脉硬化症        | 14.2 脑血管栓塞      | 23.4 经皮腔内血管成形术  |
| 9.1 颈动脉硬化症     | 14.3 腔隙性脑梗死     | 23.5 其它血管手术     |
| 9.2 肾动脉硬化      | 14.4 多发梗死性痴呆    | 24 血管疾病的基因疗法    |
| 9.3 动脉硬化性主动脉瘤  |                 |                 |

(胡必利编写)