

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.17.012

阿托伐他汀联合 L-4F 对 apoE 缺失小鼠 HDL 功能及水平的影响

李鹏^{1,2},程诚¹,毕明辉¹,王月刚^{1△},吴平生¹

(1. 南方医科大学南方医院心内科, 广州 510515; 2. 中山大学附属第五医院内科, 广东珠海 519000)

[摘要] **目的** 通过采用高脂饮食喂养 apoE 缺失 (apoE^{-/-}) 小鼠建立动脉粥样硬化 (AS) 模型, 比较阿托伐他汀联合载脂蛋白 A-I (apoA-I) 模拟肽 (L-4F) 对 AS 小鼠血清氧化磷酸酶 (PON1)、髓过氧化物酶 (MPO) 活性及血清低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平的影响。**方法** 雄性 apoE^{-/-} 小鼠 50 只, 高脂饲料喂养作为模型组, 另外取同龄 C57BL/6J 小鼠 20 只给予普通饲料喂养作为正常对照组, 实验 4 周后, 处死 2 组小鼠各 10 只, 检测相应血清指标, 作为基线参考。其余 apoE^{-/-} 小鼠分为模型对照组 (单纯高脂饮食)、阿托伐他汀组 (高脂饮食基础上给予阿托伐他汀治疗)、L-4F 组 (高脂饮食基础上给予 L-4F 治疗)、阿托伐他汀联合 L-4F 组 (高脂饮食基础上给予阿托伐他汀 + L-4F 治疗), 每组 10 只。实验第 8 周末处死 5 组小鼠, 并取小鼠血清检测各血清指标。**结果** 实验第 8 周末, 与模型对照组比较, 各药物组血清 PON1 活性显著升高 (均 $P < 0.05$), MPO 活性显著下降 (均 $P < 0.05$); 与模型对照组比较, 阿托伐他汀组、阿托伐他汀联合 L-4F 组 LDL-C 水平显著减低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), L-4F 组 LDL-C、HDL-C 水平差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。实验第 8 周末, 阿托伐他汀联合 L-4F 组较阿托伐他汀组及 L-4F 组 PON1 活性、HDL-C 水平显著升高 (均 $P < 0.05$); MPO 活性、LDL-C 水平显著降低 (均 $P < 0.01$)。**结论** 阿托伐他汀、L-4F 均可通过升高血清 PON1 活性, 降低 MPO 活性, 从而改善 HDL 抗氧化、抗炎功能, 延缓 AS 进展。L-4F 对 LDL-C、HDL-C 水平无影响。阿托伐他汀联合 L-4F 不仅降低 LDL-C, 升高 HDL-C, 而且更有效的改善 HDL 抗氧化、抗炎功能, 从而延缓 AS 进展, 优于单药使用。

[关键词] 阿托伐他汀; 动脉粥样硬化; L-4F; 脂蛋白类, 脂蛋白, HDL**[中图分类号]** R514**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)17-2338-03

The combination of atorvastatin and L-4F improve the anti-oxidant and anti-inflammatory properties of HDL to reduce atherosclerosis in ApoE knockout mice

Li Peng^{1,2}, Cheng Cheng¹, Bi Minghui¹, Wang Yuegang^{1△}, Wu Pingsheng¹

(1. Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China;

2. Department of Internal Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of atorvastatin combination with L-4F on anti-oxidant and anti-inflammatory properties of high density lipoprotein (HDL) in apoE^{-/-} mice fed with high-fat diet. **Methods** Fifty 8-week old male apoE^{-/-} mice were fed with high-fat diet, while twenty 8-week old male C57BL/6J mice were given normal diet as normal control group. 4 weeks later, 10 mice in each group were sacrificed. The rest apoE^{-/-} mice were randomly divided into 4 groups: atherosclerosis (AS) model group (fat diet), atorvastatin group (atorvastatin treatment with high-fat diet), L-4F group (L-4F treatment with high-fat diet), and atorvastatin combined with L-4F group (received atorvastatin + L-4F treatment with high-fat diet), and each group has 10 mice. At the end of 8th week, 10 mice were sacrificed in each group. The activity of PON1, MPO, LDL-C, and HDL-C in serum were detected. **Results** At the end of the 8th week, we got the following 4 points: Compared with the AS model group, the activity of PON1 in each drug groups increased significantly (all $P < 0.05$), while the activity of MPO decreased significantly (all $P < 0.05$). And the levels of serum LDL-C decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the levels of serum HDL-C increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in both atorvastatin group and atorvastatin combined with L-4F group. No significant difference was found in LDL-C and HDL-C level between AS model group and L-4F group ($P > 0.05$). Compared with the atorvastatin group and L-4F group, the activity of PON1 and the level of serum HDL-C in atorvastatin combined with L-4F group increased significantly (all $P < 0.05$), while the activity of MPO and the level of serum LDL-C decreased significantly (all $P < 0.01$). **Conclusion** Atorvastatin and L-4F can improve the anti-oxidant and anti-inflammatory effects by up-regulating the activity of PON1 and reducing activity of MPO in serum to reduce atherosclerosis. L-4F didn't influence the level of LDL-C and HDL-C in serum. The atorvastatin combined with L-4F not only can be more effectively lower cholesterol levels, but also can increase the PON1 activity and decrease the MPO activity. The effect of anti-atherosclerotic was better than single drug used.

[Key words] atorvastatin; atherosclerosis; L-4F; lipoproteins, lipoproteins, HDL

冠心病严重危害人类健康, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是其主要病理基础。在 AS 发生发展过程中氧化应

激、炎症反应及血脂异常具有重要作用^[1-2], 氧化应激可促进低密度脂蛋白 (LDL) 氧化修饰, 导致血管内皮损伤, 进而激活炎

性因子, 进一步增加炎性反应, 促进斑块形成。所以, 抗氧化、抗炎对于抗 AS 具有积极意义^[3]。氧磷酸酶(PON1)是重要抗氧化酶, 通过抑制低密度脂蛋白胆固醇(LDL-L)氧化修饰等途径达到抗 AS 作用; 髓过氧化物酶(MPO)是强致氧化物酶, 通过破坏高密度脂蛋白胆固醇(HDL-L)逆转运途径, 导致炎性反应。本研究通过采用高脂饮食喂养 apoE^{-/-}小鼠建立 AS 模型, 比较阿托伐他汀联合载脂蛋白 A-I(apoA-I)模拟肽(L-4F)对 AS 小鼠血清 PON1、MPO 活性及 LDL-C、HDL-C 水平的影响, 探讨阿托伐他汀联合 L-4F 抗 AS 机制。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 SPF 级 8 周龄 apoE^{-/-} 小鼠, 雄性, 体质量 18.5~21.5 g, 适龄、健康, 共 50 只, SPF 级 8 周龄 C57BL/6J 小鼠, 体质量 18.5~21.5 g, 适龄、健康, 共 20 只, 均购自北京大学医学部实验动物科学部。两种小鼠均饲养在南方医院实验动物中心, 饲养温度控制在 25℃, 湿度 7%, 自动通风器保持室内通风。普通饲料及高脂饲料均购自广东省医学实验动物中心。

1.2 实验材料 阿托伐他汀购自辉瑞制药有限公司, L-4F 购自深圳翰宇药业有限公司, L-氨基酸序列如下: ACDWFKAK-YDAKVAEKFKAEAF-NH₂ 由深圳翰宇药业股份有限公司提供。乙酸苯酯购自美国 Sigma 公司; 血清 MPO 活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。AU-5421 型生化自动分析仪为日本 Olympus 公司生产; Universal 16R 型低温冷冻高速离心机为美国 Thermo 公司生产; ND-1000 Spectrophotometer 型分光光度仪为美国生产。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组及给药 C57BL/6J 小鼠 20 只给予常规饮食, 作为正常对照组; apoE^{-/-} 小鼠给予高脂饮食^[4]作为模型组(50 只)。分别给予 4 周饮食后, 选择两种小鼠各 10 只, 检测相应的血清指标, 作为基线值。其余 apoE^{-/-} 小鼠分为 4 组, 模型对照组、阿托伐他汀组、L-4F 组、阿托伐他汀联合 L-4F 组, 每组 10 只。正常对照组: 普通饲料喂养, 并给予灌服和(或)腹腔注射等体积生理盐水。模型对照组: 高脂饲料喂养, 同时给予灌服和(或)腹腔注射等体积生理盐水。阿托伐他汀组: 在高脂饲料喂养基础上, 经灌胃给药阿托伐他汀 1.3 mg·kg⁻¹·d⁻¹。L-4F 组: 在高脂饲料喂养基础上, 腹腔注射给药 L-4F mg·kg⁻¹·d⁻¹。阿托伐他汀联合 L-4F 组: 在高脂饲料喂养基础上, 经灌胃给药阿托伐他汀 1.3 mg/kg 和腹腔注射 L-4F mg·kg⁻¹·d⁻¹。实验第 4 周, 取正常对照组及模型组小鼠各 10 只在空腹 12 h 状态下采用乙醚吸入麻醉后死后, 实验第 8 周同样方法处死剩余小鼠, 心脏采血, 3 000 r/min 离心

15 min, 取上清, 置于 -80℃ 冰箱保存, 统一检测血清各指标。
1.3.2 血清中 PON1、MPO 活性及 LDL-L、HDL-L 水平的测定 血清 PON1 活性测定参考 Tang 等^[5]的检测方法, 以乙酸苯酯为底物, 采用分光光度计法测定血清 PON1 活性。血清 MPO 活性根据南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行测定。血脂测定采用酶法用日本 Au-5421 型全自动生化仪上测定血清 LDL-C、HDL-C 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行分析, 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验分析, 多组间总体均数比较, 在方差齐时采用单向方差分析, 方差不齐时采用 Welch 校正检验。多个样本均数间的多重比较方差齐时采用 LSD 法检验, 方差不齐时采用 Dunnett's *T* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 PON1、MPO 活性的比较

2.1.1 不同时间点组内比较 正常对照组小鼠血清 PON1、MPO 活性第 8 周末与第 4 周末相比差异无统计学意义(均 *P* > 0.05)。模型对照组小鼠血清 PON1 活性第 8 周末较第 4 周末明显降低, 而小鼠血清 MPO 活性第 8 周末较第 4 周末明显升高(均 *P* < 0.01)。见表 1。

2.1.2 同时时间点组间比较 模型对照组与正常对照组同期相比, 小鼠血清 PON1、MPO 活性在第 4 周末时差异无统计学意义(均 *P* > 0.05), 第 8 周末时模型对照组小鼠血清 PON1 活性明显低于正常对照组(*P* < 0.01), 而小鼠血清 MPO 活性则明显高于正常对照组(*P* < 0.01)。阿托伐他汀组、L-4 组小鼠第 8 周末血清 PON1 活性显著高于同期模型对照组(均 *P* < 0.01), MPO 活性显著低于模型对照组, 但血清 PON1 活性显著低于同期正常对照组(*P* < 0.01), 而血清 MPO 活性显著高于同期对照组(*P* < 0.01)。而 L-4F 组与同期阿托伐他汀组比较二者差异无统计学意义(均 *P* > 0.05)。阿托伐他汀联合 L-4F 组小鼠第 8 周末血清 PON1 活性较同期模型对照组、阿托伐他汀组及 L-4F 组均显著增加(*P* < 0.01, *P* < 0.05, *P* < 0.05), 而血清 MPO 活性较同期模型对照组、阿托伐他汀组和 L-4F 组显著降低(*P* < 0.01, *P* < 0.01, *P* < 0.01), 与同期对照组比较差异无统计学意义(均 *P* > 0.05)。

2.2 各组小鼠血清 LDL-C、HDL-C 水平

2.2.1 不同时间点组内比较 正常对照组小鼠第 8 周末血清 LDL-C、HDL-C 水平与第 4 周末均无明显差异(均 *P* > 0.05)。模型对照组小鼠血清 LDL-C 水平第 8 周末显著高于第 4 周末(*P* < 0.05)。而血清 HDL-C 水平小鼠第 8 周末显著低于第 4 周末(*P* < 0.05)。见表 2。

表 1 对 apoE^{-/-} 小鼠血清 PON1、MPO 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PON1 活性		MPO 活性	
		第 4 周末(U/mL)	第 8 周末(U/mL)	第 4 周末(U/L)	第 8 周末(U/L)
正常对照组	10	120.51 ± 7.46	117.34 ± 8.32	26.54 ± 2.46	29.34 ± 2.32
模型对照组	10	116.75 ± 9.21	96.69 ± 6.26 ^{ac}	32.75 ± 2.21	48.69 ± 3.26 ^{ac}
阿托伐他汀组	10	—	107.12 ± 7.53 ^{ce}	—	39.02 ± 2.53 ^{ce}
L-4F 组	10	—	104.75 ± 6.14 ^{ab}	—	41.75 ± 5.23 ^{ce}
阿托伐他汀联合 L-4F 组	10	—	115.68 ± 8.48 ^{efh}	—	32.68 ± 3.28 ^{efi}

a: *P* < 0.01, 与同组第 4 周末比较; b: *P* < 0.05, c: *P* < 0.01, 与同期正常对照组同期比较; d: *P* < 0.05, e: *P* < 0.01, 与同期 AS 模型组比较; f: *P* < 0.05, g: *P* < 0.01, 与同期阿托伐他汀比较; h: *P* < 0.05, i: *P* < 0.01, 与 L-4F 组比较; —: 此项无数据。

表 2 对 apoE^{-/-}小鼠血清 LDL-C、HDL-C 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	LDL-C		HDL-C	
		第 4 周末(mmol/L)	第 8 周末(mmol/L)	第 4 周末(mmol/L)	第 8 周末(mmol/L)
正常对照组	10	0.47±0.11	0.54±0.12	2.44±0.46	2.54±0.21
模型对照组	10	8.42±1.01	9.78±1.13 ^a	2.85±1.21	2.48±0.32 ^a
阿托伐他汀组	10	—	8.21±1.08 ^{ce}	—	2.84±0.37 ^d
L-4F 组	10	—	9.54±1.05 ^c	—	2.58±0.45
阿托伐他汀联合 L-4F 组	10	—	7.76±1.02 ^{cef}	—	3.08±0.48 ^{cef}

^a: $P < 0.05$, 与同组第 4 周末比较; ^b: $P < 0.05$; ^c: $P < 0.01$, 与同期正常对照组同期比较; ^d: $P < 0.05$; ^e: $P < 0.01$, 与同期模型对照组比较; ^f: $P < 0.01$, 与同期 L-4F 组比较。—: 此项无数据。

2.2.2 同时间点组间比较 阿托伐他汀组第 8 周末小鼠血清 LDL-C 水平显著高于同期正常对照组 ($P < 0.01$), 较同期模型对照组显著降低 ($P < 0.05$)。而小鼠血清 HDL-C 水平较同期模型对照组显著升高 ($P < 0.05$)。L-4F 组第 8 周末小鼠血清 LDL-C、HDL-C 水平与同期模型对照组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。阿托伐他汀联合 L-4F 组小鼠第 8 周末血清 LDL-C 水平较模型对照组、L-4F 组显著降低 (均 $P < 0.01$), 而血清 HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

3 讨论

目前关于 AS 发病机制研究较多, 但尚未有一致结论^[6-7]。在 AS 发生发展过程中氧化应激、炎症反应及血脂异常具有重要作用, HDL 的抗 AS 作用主要表现在其促进胆固醇逆转运, 但其抗氧化抗炎功能也发挥重要作用^[8-9]。阿托伐他汀为 HMG-CoA 还原酶选择性抑制剂, 通过抑制 HMG-CoA 还原酶和胆固醇在肝脏的合成, 降低血浆胆固醇和脂蛋白水平, 并能不同程度地提高血浆 HDL-C 和载脂蛋白 A1 的水平。L-4F 具有促胆固醇逆转运作用以及改善血管舒张功能、减轻 AS 程度、抑制炎症因子分泌以及内皮保护等作用^[10-11]。PON1 活性及 MPO 活性可反映 HDL 的抗氧化抗炎功能。

PON1 是 HDL 重要的抗氧化酶之一, 可抑制 LDL 被氧化修饰及脂质过氧化物堆积, 从而发挥抗 AS 的作用。动物研究^[12]发现, PON1 敲除鼠易发生 AS, 而且与正常鼠相比, 其 HDL 和 LDL 更容易被氧化。本研究也发现 AS 模型组血清 PON1 活性较正常对照组明显下降, 与以上结论一致。MPO 是一种强氧化酶, 以 H₂O₂ 作为底物, 可产生硝基化等中间产物, 中间产物以 apoA-I 为靶点, 使得结构发生改变, 促进氧化。与 AS 模型对照组比较, 各药物组血清 PON1 活性显著升高, 而 MPO 活性显著降低, 两药联用比单药应用有显著差异, 提示阿托伐他汀和 L-4F 均有助于升高血清 PON1 活性、降低血清 MPO 活性, 从而改善 HDL 的抗氧化功能, 两药联用可以更进一步改善 HDL 抗氧化功能, 优于单药使用。这为临床应用提供了新的思路和方向。

参考文献

[1] Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G. High-density lipoprotein quantity or quality for cardiovascular prevention? [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(13): 1494-1503.

[2] 谭迎, 田迪, 刘挺榕, 等. 高密度脂蛋白亚组分促胆固醇逆转运及抗氧化功能研究[J]. *中国循环杂志*, 2013, 28(1): 25-28.

[3] Filip M, Maciag J, Nosalski R, et al. Endothelial dysfunction

related to oxidative stress and inflammation in perivascular adipose tissue[J]. *Postepy Biochem*, 2012, 58(2): 186-194.

- [4] Beattie JH, Gordon MJ, Duthie SJ, et al. Suboptimal dietary Zinc intake promotes vascular inflammation and atherogenesis in a mouse model of atherosclerosis[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(7): 1097-1105.
- [5] Tang W, Hartiala J, Fan YY, et al. Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(11): 2803-2812.
- [6] Movva R, Rader DJ. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(5): 788-800.
- [7] Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Perry P, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease[J]. *JAMA*, 2009, 302(18): 1993-2000.
- [8] Ford MA, Mcconnell JP, Lavi S, et al. Coronary artery endothelial dysfunction is positively correlated with low density lipoprotein and inversely correlated with high density lipoprotein subclass particles measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 207(1): 111-115.
- [9] Fisher EA, Feig JE, Hewing B, et al. High-Density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(12): 2813-2820.
- [10] Sattler K, Levkau B. Sphingosine1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(2): 201-211.
- [11] Tashiro J, Miyazaki O, Nakamura Y, et al. Plasma pre-beta1-HDL level is elevated in unstable angina pectoris[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 204(2): 595-600.
- [12] Ng DS, Chu T, Esposito B, et al. Paraonase-1 deficiency in mice predisposes to vascular inflammation, oxidative stress, and thrombogenicity in the absence of hyperlipidemia[J]. *Cardiovascular Pathology*, 2008, 17(4): 226-232.