

罗格列酮对动脉粥样硬化大鼠血脂及血清炎症因子水平的影响

毛威,陈君柱(浙江大学医学院附属第一医院心内科,杭州 310003)

摘要:目的 探讨罗格列酮对动脉粥样硬化(AS)大鼠血脂及血清炎症因子水平的影响。方法 12周龄雄性 Wistar大鼠 55只,随机分为3组:①正常对照组(N, $n=20$),②模型组(M, $n=20$),③治疗组(罗格列酮组,RSG, $n=15$)。其中N组大鼠喂食基础饲料12周;M组和RSG组大鼠喂食高脂饲料6周后,分别给予生理盐水($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和罗格列酮($3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃治疗6周,且在喂食开始时一次性腹腔注射维生素 D_3 40万 $\text{IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。造模6周后,取N组和M组大鼠各5只处死,检测血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、ELISA法检测血清C反应蛋白(CRP)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、血管内细胞黏附分子-1(ICAM-1)表达;提取大鼠心脏,HE染色观察冠状动脉粥样硬化斑块的病理形态改变。灌胃治疗6周后,各组大鼠处死后按前述方法再次检测各指标变化及冠状动脉病理形态变化。结果 造模6周后,M组大鼠血清TC、TG、LDL-C、CRP、MCP-1、ICAM-1水平均升高($P<0.05$),HDL-C水平的变化没有统计学意义($P>0.05$),光镜下观察可见冠状动脉粥样硬化斑块形成。灌胃治疗6周后,RSG组大鼠血清TC、TG、LDL-C、CRP、MCP-1水平较M组降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但仍略高于N组($P<0.05$),HDL-C、ICAM-1水平未见明显变化($P>0.05$)。光镜下观察见RSG组大鼠AS病变较M组明显减轻。结论 罗格列酮治疗6周能降低大鼠TC、TG、LDL-C水平,抑制血清炎症因子CRP、MCP-1的表达,这可能是其抗AS的机制之一。

关键词:罗格列酮;动脉粥样硬化;血脂;炎症因子

中图分类号:R977.15 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)03-0186-04

Effects of Rosiglitazone on Serum Levels of Lipids and Inflammatory Factors in Atherosclerotic Rats

MAO Wei, CHEN Jun-zhu (Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Zhejiang University College of Medicine, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of rosiglitazone on serum levels of lipids and inflammatory factors in atherosclerotic rats. **METHODS** 55 male Wistar rats were randomly divided into 3 groups, the normal group (N, $n=20$) with ordinary diet for 12 weeks, the model group (M, $n=20$) and the treatment group (RSG, $n=15$) with intra-abdominal injection of a single dose of vitamin D_3 (400,000 $\text{IU}\cdot\text{kg}^{-1}$) and atherogenic diet for 6 weeks, then be administered with normal saline ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and rosiglitazone ($3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), respectively for 6 weeks. Before and after treatment the serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) and pathomorphology in heart tissue were detected. The levels of serum C-reactive protein (CRP), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were determined by ELISA. **RESULTS** 6 weeks later the model group rats showed high serum levels of TC, TG, LDL-C, CRP, MCP-1, ICAM-1 and low serum level of HDL-C than that of the normal group ($P<0.05$). Coronary atherosclerotic plaques had been observed. After treatment for 6 weeks, compared with the model group rats, rosiglitazone could significantly reduce the levels of serum TC, TG, LDL-C, CRP and MCP-1 ($P<0.05$ or $P<0.01$), which were still higher than that of the normal group ($P<0.05$). However, the changes of the serum HDL-C and ICAM-1 levels has no difference ($P>0.05$). The pathomorphology degree of coronary atherosclerosis has decreased significantly. **CONCLUSION** Rosiglitazone can reduce the serum levels of TC, TG, LDL-C and inhibit the production of CRP and MCP-1, which may account for the anti-arteriosclerosis effects.

KEY WORDS: rosiglitazone; atherosclerosis; serum lipids; inflammatory factors

动脉粥样硬化(AS)被认为是一种慢性炎症性疾病^[1],C反应蛋白(CRP)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、血管内细胞黏附分子-1(ICAM-1)在AS的发生发展中起着重要作用。过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ)活化能抑制炎症反应而影响AS斑块的形成^[2],噻唑烷二酮类(TZDs)药物罗格

列酮是过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ)的人工合成配体激动剂,具有调节糖脂代谢、改善胰岛素抵抗、抗炎等特性^[3]。本研究通过观察罗格列酮对AS大鼠血脂及血清炎症因子水平的影响,探讨其抗AS的可能机制。

1 材料与方法

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金(2005A072)

作者简介:毛威,博士生,现在浙江省中医院心内科, E-mail: maoweiliw@163.com

1.1 材料

1.1.1 动物 12周龄雄性 Wistar大鼠 55只,体重(250 ± 10)g,购自复旦大学实验动物科学部,按纯系动物要求专人饲养于浙江中医药大学动物实验中心清洁级动物房。

1.1.2 主要试剂及仪器 胆固醇(分析纯)(上海伯奥生物科技有限公司)、胆酸钠(上海源聚生物科技有限公司)、丙基硫氧嘧啶(南通制药总厂)、维生素 D₃注射液(上海通用药业股份有限公司)、SSOOPP半自动生化分析仪(法国 Secom-am公司)、Rat MCP-1 ELISA 试剂盒(Bender公司)、Rat ICAM-1 ELISA试剂盒(R&D公司)、Rat CRP ELISA试剂盒(R&D公司)、多聚赖氨酸(北京中杉金桥生物技术有限公司)、石蜡切片机(LeicaH II 210)、脱水机(SAKURA)、高速台式冷冻离心机(德国 Eppendorf公司 CENTRIFUGE5417R)、万能显微镜(日本 OLYMPUS公司 VANOX)。

1.2 方法

1.2.1 造模方法 对照组喂食基础饲料(其中面粉 20%,米粉 2%,玉米 20%,麸皮 25%,豆料 20%,骨粉 2%,鱼粉 2%),模型组和治疗组喂食高脂饲料,即 3%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶、5%白糖、10%猪油、81.3%基础饲料,同时在喂食开始时一次性腹腔注射维生素 D₃ 40万 u·kg⁻¹,对照组给予同等容积的生理盐水。

1.2.2 分组及给药方法 参照随机数字表将 55只 12周龄雄性 Wistar大鼠随机分为 3组:①正常对照组(N, n=20):喂食基础饲料 6周,处死 5只大鼠检测,余 15只继续喂食基础饲料 6周后处死检测。②模型组(M, n=20):喂食高脂饲料 6周后,处死 5只大鼠检测,余 15只继续喂食高脂饲料,并给予生理盐水(10 mL·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃 6周后处死检测。③治疗组(罗格列酮组, RSG, n=15):喂食高脂饲料 6周后,给予罗格列酮片(葛兰素史克公司,批号:H20020475,按 100 mg·mL⁻¹溶解至 CMC-Na溶液,3 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃 6周后处死检测。

1.2.3 大鼠血脂、血清炎症因子检测 大鼠禁食 12 h,3%戊巴比妥钠 0.15 mL·kg⁻¹体重腹腔注射麻醉,腹主动脉取血 10 mL,其中 4 mL血用 SSOOPP半自动生化分析仪测定总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),余 6 mL分装于肝素抗凝试管中,3000 r·min⁻¹离心 20 min,分离血浆,-70℃保存。ELISA法测血清相关炎症因子 CRP、MCP-1 和 ICAM-1,严格按照各自操作说明书进行。

1.2.4 取材、HE染色及病理形态观察 动物处死后,心脏在冠状沟下方和距心尖 0.5 cm处横断,取其间组织块,在 10%甲醛溶液中固定,石蜡包埋,在心脏相同部位连续切片,作 H-E染色,光镜下观察冠状动脉粥样硬化斑块的病理形态改变。

1.2.5 统计学处理 应用 SAS8.1统计软件包分析,本实验所得数据均为计量资料,结果以均数 ±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较选用 ANOVA方差分析或 t检验,各治疗组与正常对照组比较选用 Dunnet t检验。检验标准以 P<0.05为差

异有统计学意义,P<0.01为差异有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 造模成功后 N组与 M组大鼠各指标变化的比较($\bar{x} \pm s$) 一次性腹腔注射维生素 D₃ 40万 u·kg⁻¹并喂食高脂饲料 6周后,与 N组比,M组大鼠血清 TG、TC、LDL-C、CRP、MCP-1、ICAM-1水平均升高(P<0.05或 P<0.01),以 TC(3.20 ± 0.96 vs 1.60 ± 0.11)和 LDL-C(2.71 ± 1.08 vs 0.83 ± 0.04)变化明显,但血清 HDL-C水平的差异无统计学意义(P>0.05)。见表 1。

表 1 造模成功后 N组与 M组大鼠各指标变化的比较($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 The Comparison of parameter varieties in group N and M rats after model making successfully($\bar{x} \pm s$)

项 目	N组	M组	P
TG/mm ol·L ⁻¹	1.10 ± 0.36	1.95 ± 0.41	0.031
TC/mm ol·L ⁻¹	1.60 ± 0.11	3.20 ± 0.96	0.009
HDL-C/mm ol·L ⁻¹	0.78 ± 0.15	0.69 ± 0.04	0.502
LDL-C/mm ol·L ⁻¹	0.83 ± 0.04	2.71 ± 1.08	0.004
CRP/μg·mL ⁻¹	161.22 ± 21.20	235.65 ± 41.42	0.020
MCP-1/pg·mL ⁻¹	46.25 ± 10.80	75.40 ± 14.25	0.036
ICAM-1/pg·mL ⁻¹	367.06 ± 84.43	541.89 ± 71.44	0.011

2.2 灌胃治疗 6周后各组血脂、血清炎症因子水平的变化 分别予生理盐水和罗格列酮灌胃治疗 6周后,M组大鼠血清 TG、TC、LDL-C、CPR、MCP-1、ICAM-1的水平进一步升高且仍明显高于 N组,差异具有统计学意义(P<0.05或 P<0.01),HDL-C水平略有降低但无统计学意义(P>0.05);RSG组大鼠血清 TC、LDL-C水平均较 M组降低(P<0.01)但仍略高于 N组(P<0.05),TG、CRP、MCP-1水平较 M组降低(P<0.05或 P<0.01)且与 N组比差异没有统计学意义(P>0.05);同时 RSG组大鼠 HDL-C水平仍未见明显变化(P>0.05),ICAM-1水平(502.19 ± 68.42)与 M组(580.58 ± 82.15)相比无统计学意义(P<0.05)且仍略高于 N组(383.47 ± 79.20)(P<0.05)。见表 2。由此可见,罗格列酮可显著降低 AS大鼠血脂 TG、TC、LDL-C水平,以 TG水平降低明显,对 HDL-C水平的影响不大;同时可显著降低血清炎症因子 CRP、MCP-1水平,但未见 ICAM-1水平的降低。

2.3 造模成功后 N组与 M组大鼠冠状动脉的病理形态改变

光镜下观察可见,M组大鼠病变的冠状血管主要位于中等大小的冠状动脉分支,主要表现为内皮细胞排列不完整,内膜增厚,管腔狭窄,内皮下间隙增宽,含有单核细胞源性泡沫细胞,平滑肌层细胞排列紊乱、增生,N组大鼠未见明显病理形态学改变,见图 1,2。

2.4 灌胃治疗 6周后 RSG组和 M组大鼠冠状动脉的病理形态改变

HE染色显示,M组大鼠冠状动脉仍可见 AS斑块病变,并可见钙化;RSG组大鼠 AS病变的程度较 M组明显减轻。见图 3,4。

表 2 灌胃治疗 6 周后各组血脂、血清炎症因子水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The changes of the serum levels of lipids and inflammatory factors of 3 groups after treatment with intra-abdominal injection for 6 weeks($\bar{x} \pm s$)

	N 组	M 组	RSG 组
TG /mmol• L ⁻¹	1.09 ± 0.62	2.12 ± 0.34 ¹⁾	0.88 ± 0.30 ⁴⁾
TC /mmol• L ⁻¹	1.90 ± 0.26	4.16 ± 1.39 ²⁾	2.85 ± 1.21 ^{1) 4)}
HDL-C /mmol• L ⁻¹	0.88 ± 0.15	0.76 ± 0.06	0.81 ± 0.04
LDL-C /mmol• L ⁻¹	0.91 ± 0.02	3.25 ± 1.36 ²⁾	1.97 ± 1.18 ^{1) 4)}
CRP /μg• mL ⁻¹	182.43 ± 27.16	317.25 ± 46.33 ²⁾	201.65 ± 30.12 ⁴⁾
MCP-1 /pg• mL ⁻¹	45.31 ± 8.92	88.77 ± 15.26 ¹⁾	48.45 ± 10.21 ³⁾
ICAM-1 /pg• mL ⁻¹	383.47 ± 79.20	580.58 ± 82.15 ²⁾	502.19 ± 68.42 ¹⁾

注: 与 N 组比, ¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$; 与 M 组比, ³⁾ $P < 0.05$ ⁴⁾ $P < 0.01$
Note Comparison to group N, ¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$; Comparison to group M, ³⁾ $P < 0.05$ ⁴⁾ $P < 0.01$

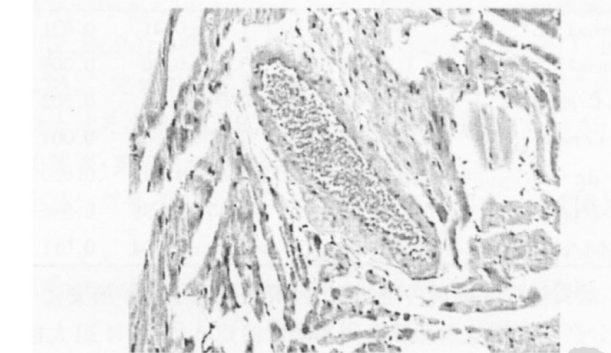


图 1 N 组大鼠冠状动脉 HE 染色 10×40
Fig 1 Coronary artery HE staining of group N rats 10×40

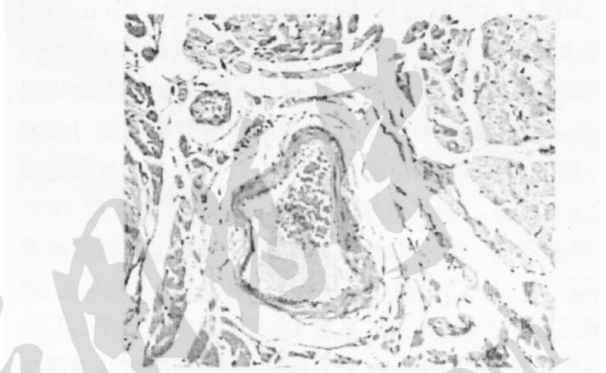


图 2 M 组大鼠冠状动脉 HE 染色 10×40
Fig 2 Coronary artery HE staining of group M rats 10×40

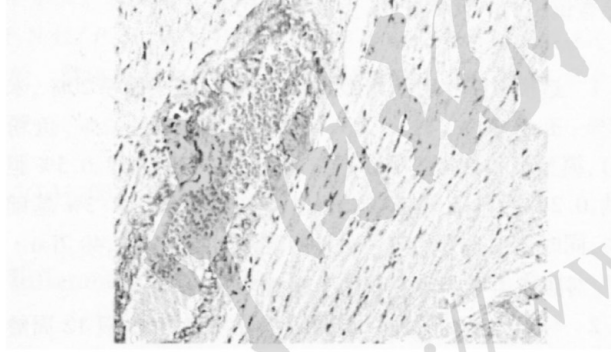


图 3 RSG 组大鼠冠状动脉 HE 染色 10×40
Fig 3 Coronary artery HE staining of group RSG rats 10×40

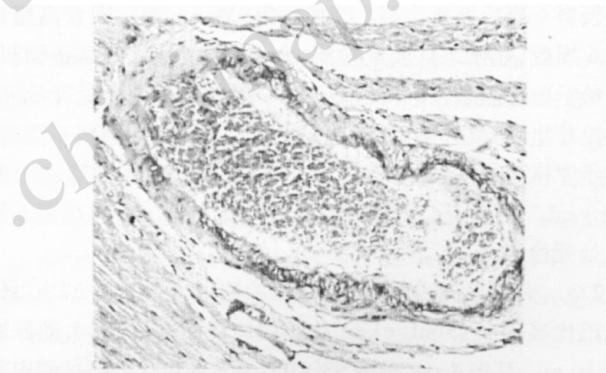


图 4 M 组大鼠冠状动脉 HE 染色 10×40
Fig 4 Coronary artery HE staining of group M rats 10×40

3 讨论

现有资料多支持 AS 是一种慢性炎症性疾病, 多种细胞 (如单核巨噬细胞、内皮细胞等) 分泌了大量炎症因子如单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、血管内皮粘附分子-1(VCAM-1)和血管内细胞黏附分子-1(ICAM-1)等介导了炎症反应, 其中 MCP-1 是炎症过程启动的关键因子之一, 可促进单核细胞聚集, 上调 VCAM-1 等黏附分子的表达^[4]。C-反应蛋白 (CRP) 可直接作用于血管内皮促进早期 AS 的形成^[5], 同时在诱导 ICAM-1 和 MCP-1 表达的过程中也具有致炎作用。

脂质代谢紊乱是动脉粥样硬化发生发展的重要原因之一, 大量临床流行病学和基础研究表明, 血浆中 TC、TG、LDL-C 升高, HDL-C 降低可促进动脉粥样硬化的发生。高脂血症

可引起血管内皮功能障碍, 促进 LDL-C 氧化修饰, 上调内皮细胞 ICAM-1 的表达, 使单核细胞和淋巴细胞黏附、迁移, 诱导单核细胞分化为巨噬细胞, 表达识别 LDL-C 的清道夫受体, 形成泡沫细胞进而促进动脉粥样硬化的发生。

本研究发现, 一次性腹腔注射维生素 D₃ 40 万 u• kg⁻¹ 并喂食高脂饲料 6 周后, 模型组大鼠血脂 (TG、TC、LDL-C) 及血清炎症因子 (CRP、MCP-1、ICAM-1) 水平升高, 以 TC 和 LDL-C 变化明显, 且血清 HDL-C 水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 光镜下观察可见冠状动脉粥样硬化斑块形成。

PPAR γ 是核受体超家族中 PPARs 家族成员, 是配体依赖的核转录因子^[6], 主要存在于脂肪组织中, 调控脂肪细胞的分化成熟, 近年来研究发现 PPAR γ 也存在于血管平滑肌

细胞和内皮细胞,参与了血管壁炎症反应和 AS 发生发展的调控^[7]。罗格列酮是 PPAR γ 的人工合成配体激动剂,目前有一些关于 PPAR γ 激动剂对血脂影响的实验研究,但结论不一。Chen 等^[8]研究发现载脂蛋白 E 缺陷的小鼠喂以高脂饮食,曲格列酮能够明显抑制脂纹的生成,这可能与增加 HDL-C 的水平有关。在动物模型,PPAR γ 激动剂格列酮类在脂肪细胞能诱导脂蛋白脂酶活化的脂肪溶解,降低血清 TG 的水平^[9]。Corti 等^[10]用高胆固醇饮食喂养新西兰大白兔 9 个月并用球囊损伤主动脉两次后血清胆固醇水平明显升高,用 PPAR γ 激动剂干预 6 个月和喂以正常饮食不给药干预,血清胆固醇水平都下降,两者没有显著性差异。

我们研究发现,经罗格列酮灌胃治疗 6 周后, RSG 组大鼠血清 TC, LDL-C, TG 水平均较 M 组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但 TC, LDL-C 水平仍略高于 N 组 ($P < 0.05$), HDL-C 水平则未见明显变化 ($P > 0.05$)。可见,罗格列酮可显著降低 AS 大鼠 TG, TC, LDL-C 水平,以降低 TG 水平明显,对 HDL-C 水平的影响不大。

同时研究显示, HE 染色见 RSG 组大鼠冠状动脉粥样硬化病变程度较 M 组明显减轻,血清 CRP、MCP-1 水平较 M 组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)且与 N 组比差异没有统计学意义 ($P > 0.05$); ICAM-1 水平 (502.19 ± 68.42)与 M 组 (580.58 ± 82.15)相比无统计学意义 ($P < 0.05$)且仍略高于 N 组 (383.47 ± 79.20) ($P < 0.05$)。由此表明,罗格列酮可显著降低 AS 大鼠血清炎症因子 CRP、MCP-1 水平,与 Jagdip^[11]和 Ishibashi^[12]的研究结果相符;但炎症因子 ICAM-1 水平未见明显降低,与 Sidhu^[13]和 Jürgen^[14]所做的临床研究结果一致,同时另有研究表明,PPAR γ 激活剂曲格列酮,在一定剂量范围内可抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的 ICAM-1 等黏附分子的表达^[15];罗格列酮可抑制 NF- κ B 激活,减少 ICAM-1 表达,减轻大鼠溃疡性结肠炎的炎症反应^[16],其机制有待于进一步探讨。

总之,本研究证实罗格列酮治疗 6 周能降低动脉粥样硬化大鼠 TC, TG, LDL-C 水平,抑制血清炎症因子 CRP, MCP-1 的表达,这可能是其抗 AS 的机制之一,同时也为该药防治冠心病的临床应用提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] ROSS R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *New Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [2] PASCERI V, WH H D, WILLERSON J T, *et al.* Modulation of vascular inflammation in vivo and in vitro by peroxisome proliferators activator- γ activators [J]. *Circulation*, 2000, 101: 235-238.
- [3] ST. JOHN M S, DOLE J E, RAPPAPORT E B. Rosiglitazone does not adversely affect cardiac structure or function in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 1999, 48(Suppl): A102.
- [4] PASCERI V, WILLERSON J T, YEH E T. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells

[J]. *Circulation*, 2000, 102: 2165-2168.

- [5] VERMA S, LISH, BADIWADA M V, *et al.* Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C reactive protein [J]. *Circulation*, 2002, 105(16): 1890-1896.
- [6] ISSEMAN I, GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor super family by peroxisome proliferators [J]. *Nature*, 1990; 347: 645-665.
- [7] ISHIBASHI M, EGASHIRA K, HIASA K, *et al.* Anti-inflammatory and anti-arteriosclerotic effects of pioglitazone [J]. *Hypertension*, 2002, 40: 687-693.
- [8] CHEN Z, ISHIBASHI S, PERREY S, *et al.* Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E- knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(3): 372-377.
- [9] BARBIER O, TORRA I P, DUGUAY Y, *et al.* Pleiotropic action of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(5): 717-726.
- [10] CORTI R, OSENDE J L, FALLON J T, *et al.* The selective peroxisomal proliferator-activated receptor- γ agonist has an additive effect on plaque regression in combination with simvastatin in experimental atherosclerosis: in vivo study by high-resolution magnetic resonance imaging [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(3): 464-473.
- [11] JAGDIP S S, DAHLIA C, JUAN-CARLOS K. The effects of rosiglitazone, peroxisome proliferator activated receptor- γ agonist, on marker of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen level in non-2diabetic coronary artery disease patients [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42: 1757.
- [12] ISHIBASHI M, EGASHIRA K, HIASA K, *et al.* Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone [J]. *Hypertension*, 2002, 40: 687-693.
- [13] SIDHU J S, COWAN D, KASKI J C. Effects of rosiglitazone on endothelial function in men with coronary artery disease without diabetes mellitus [J]. *Am J Cardiol*, 2004, 64: 151-156.
- [14] JÜRGEN H, BERND B, KILIAN R, *et al.* Rapid Effects of Rosiglitazone Treatment on Endothelial Function and Inflammatory Biomarkers [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1804-1809.
- [15] SASAKI M, JORDAN P, WELBOURNE T, *et al.* Troglitazone, a PPAR- γ activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF- α [J]. *BMC Physiol*, 2005, 5: 3.
- [16] ZHOU J P, DENG C S. Effects of rosiglitazone on intestinal mucosa expression of NF- κ B and ICAM-1 in rats with ulcerative colitis [J]. *World Chin J Digestol*(世界华人消化杂志), 2006, 14(1): 104-108.

收稿日期: 2006-12-27