

· 基础论著 ·

非诺贝特和阿托伐他汀对 ApoE 基因敲除小鼠外周血单核细胞 TLR4 表达的影响

耿小勇 韩俊燕 朱柳园 刘舒 秦明照 曾辉

【摘要】 目的 探讨非诺贝特和阿托伐他汀对动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)模型小鼠单核细胞 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)表达的影响。方法 apoE 基因缺陷(apoE deficient, apoE^{-/-})小鼠被随机分为 3 组,分别为阿托伐他汀干预组、非诺贝特干预组、模型组,每组 10 只。前两组分别给予阿托伐他汀 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹和非诺贝特 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,对照组给予等量蒸馏水灌胃。8 周后,测定血清低密度脂蛋白(LDL)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)水平,并应用流式细胞仪检测各组小鼠外周血单核细胞表面 TLR4 的表达。结果 各组小鼠血脂水平无统计学差异。与单纯高脂餐喂养组相比,非诺贝特干预组小鼠 TLR4 表达明显降低($P = 0.02$);阿托伐他汀干预组 TLR4 表达轻度升高,但无统计学意义。结论 非诺贝特可降低 TLR4 表达,可能参与 AS 进程中介导的天然免疫反应。

【关键词】 Toll 样受体; 动脉粥样硬化; 非诺贝特; 阿托伐他汀

Effects of fenofibrate and atorvastatin on Toll-like receptor (TLR) 4 expression in ApoE-deficient mice GENG Xiao-yong, HAN Jun-yan, ZHU Liu-yuan, LIU Shu, QIN Ming-zhao, ZENG Hui. Department of Cadre Care, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

Corresponding author: QIN Ming-zhao, Email: qinmingzhao@gmail.com; ZENG Hui, Email: hzeng98@yahoo.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of fenofibrate and atorvastatin on Toll-like receptor (TLR) 4 expression in ApoE-deficient mice. **Methods** ApoE-deficient mice were divided into 3 groups which received high-fat diet (HF) alone and were treated with fenofibrate (HF + F) or atorvastatin (HF + A) for eight weeks, respectively. Serum level of total low-density lipoprotein, cholesterol, triglyceride, total cholesterol was detected after 8 weeks, respectively. **Results** No significant difference of serum level of total low-density lipoprotein, cholesterol, triglyceride, total cholesterol were detected among three groups. Fenofibrate, but not atorvastatin

作者单位:100730 北京市,首都医科大学附属北京同仁医院干部医疗科(耿小勇、秦明照);北京地坛医院传染病研究所(韩俊燕、曾辉);首都医科大学附属安贞医院(刘舒)

通讯作者:秦明照 Email: qinmingzhao@gmail.com

曾辉 Email: hzeng98@yahoo.com

showed significant down-regulation effect on TLR4 expression on CD14⁺ monocytes.

Conclusions Fenofibrate could down-regulate TLR4 expression on monocytes in a lipids-lowing-independent manner, which may be involved in its anti-inflammatory mechanisms in atherosclerosis.

【Key words】 Toll-like receptors; Atherosclerosis; Fenofibrate; Atorvastatin

动脉粥样硬化是一个多病因、多因素协同作用的复杂进程。现在认为由升高的低密度脂蛋白、自由基、感染性微生物、高血压等引起的复杂的血管内皮功能不全以及代偿性炎症反应贯穿了动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的始终。近年来研究显示,免疫反应尤其是 Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)介导的天然和获得性免疫反应参与了 AS 的起始和进展^[1-3]。因此,TLRs 已成为 AS 治疗的新靶点。

目前,越来越多的证据支持他汀、贝特类药物具有调脂之外的抗炎作用,后者在 AS 治疗中发挥了重要作用。已有研究显示阿托伐他汀可通过干预 TLR4 信号途径影响机体炎症反应,具有免疫抑制作用^[4-7]。但是,现有的研究数据源于健康人群,或为高脂血症患者单核细胞的体外研究,具有一定局限性。为了研究高脂血症状态下,他汀、贝特类药物在体内对 TLR4 表达的调节作用,本研究应用 apoE 基因缺陷(apoE-deficient, apoE^{-/-})小鼠,观察阿托伐他汀、非诺贝特对在体情况下 AS 小鼠单核细胞表面 TLR4 表达及血脂水平影响,进一步探讨上述两种药物的抗炎机理。

材料和方法

一、材料

1. 动物模型复制与分组:8 周龄雄性 apoE^{-/-}小鼠购于北京大学动物实验中心。适应喂养 1 周后,随机分为 3 组,每组 10 只,各组均给予高脂餐喂养(含胆固醇 0.15%,脂肪 21%),8 周形成 AS 模型。药物干预组在高脂餐喂养同时,分别给予阿托伐他汀(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)或非诺贝特(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹),对照组给予等量蒸馏水灌胃。每周 1 次记录体重,调整药物剂量。

2. 标本采集:各组小鼠处死前 4 h 禁食,不禁水。1%戊巴比妥 0.5~1 ml 腹腔注射麻醉后,眼球摘除法取血。其中 0.1 ml 用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝,即送流式细胞仪分析,余非抗凝血,离心后血清冻存同批送检血 TG、LDL、TC。

二、方法

1. 流式细胞仪检测单核细胞及淋巴细胞和粒细胞 TLR4 的表达:取 100 μl EDTA-K2 抗凝全血,加入红细胞裂解液裂解红细胞,应用 FITC 标记的小鼠单核细胞和粒细胞抗小鼠 Gr1(美国 BD Pharmingen)和 PE 标记的抗小鼠 Mac1 抗体(美国 BD Pharmingen),直标法标记。采用生物素标记的抗小鼠 TLR4(美国 eBioscience)和 APC-cy5.5 标记的 Streptavidin(BD Pharmingen),以间接法标记 TLR4。

流式细胞仪(FACS Callibur,美国BD公司)检测。

2. TG、LDL、TC 水平测定:采用 BECKMAN CX4 全自动生化分析仪,日本和光公司试剂,按常规测定各组 TG、LDL、TC 水平。

三、统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

结 果

一、阿托伐他汀、非诺贝特对血脂水平影响

检测了各组小鼠血脂水平,发现与模型组相比,阿托伐他汀及非诺贝特干预组小鼠的 LDL、TCT、TG 水平均无显著统计学差异($P > 0.05$)(表1)。

表1 阿托伐他汀和非诺贝特对血脂水平影响($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

	LDL	TG	TC
阿托伐他汀干预组	22.08 $\pm$ 3.76	0.73 $\pm$ 0.29	29.52 $\pm$ 3.85
非诺贝特干预组	21.88 $\pm$ 3.76	1.00 $\pm$ 0.54	29.65 $\pm$ 5.50
模型组	17.88 $\pm$ 3.65	0.64 $\pm$ 0.65	24.84 $\pm$ 6.02

二、小鼠外周血单核细胞的鉴定

采用两种方法鉴定小鼠外周血单核细胞、粒细胞和淋巴细胞。如图1所示,由于细胞的大小和细胞内颗粒的多少不同,可根据前向角散射(FSC)侧向角散射(SSC)不同细胞进行单核细胞的鉴定。为更准确的鉴定单核细胞,采用 Mac-1 和 Gr-1 抗体组合进行单核细胞鉴定(图2)。

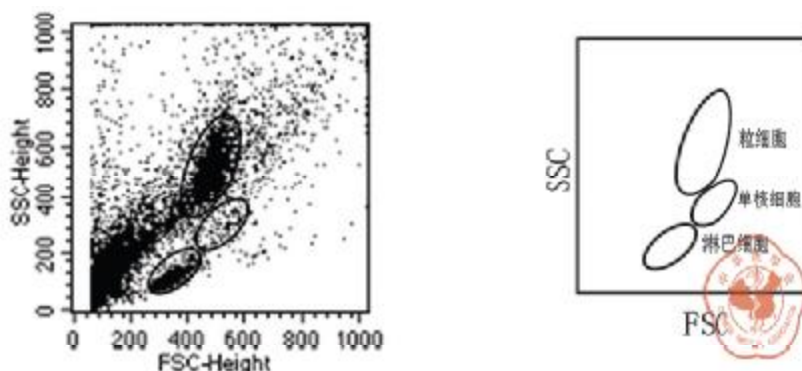


图1 小鼠外周血流式细胞检测图(左)及模式图(右)

三、阿托伐他汀及非诺贝特对小鼠外周血单核细胞 TLR4 表达的影响

非诺贝特干预组与模型组相比 TLR4 表达明显降低(7.90 ± 2.48 vs 11.98 ± 3.75)($P = 0.02$);阿托伐他汀干预组与模型组相比单核细胞 TLR4 表达轻度升高(14.21 ± 4.60 vs 11.98 ± 3.75),但无统计学意义($P = 0.32$)(图3)。

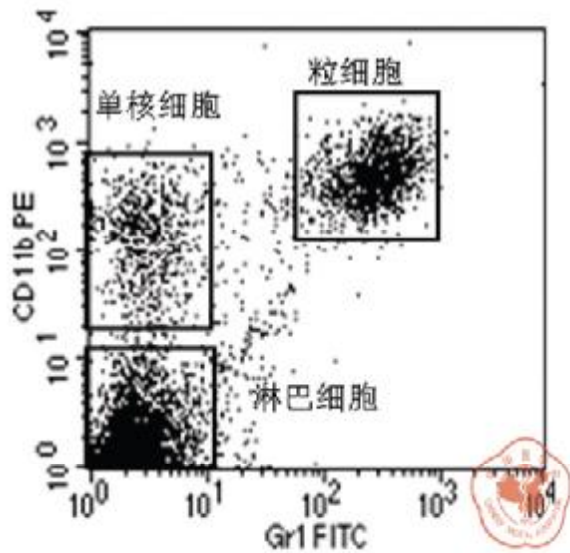


图2 小鼠外周血单核细胞鉴定

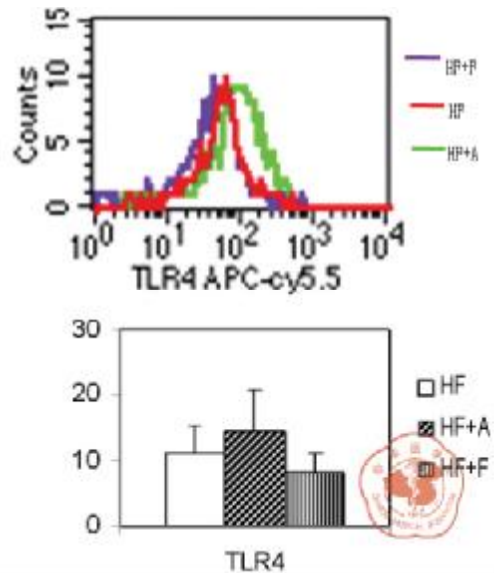


图3 不同处理组小鼠外周血单核细胞 TLR4 的表达

讨 论

AS 是一种炎症性疾病^[7-8]。天然和获得性免疫反应参与了 AS 的形成和发展^[3]。TLRs 尤其是 TLR4 作为一类介导天然免疫反应的跨膜信号转导受体,在动脉粥样硬化进程中的作用亦日益引起关注。越来越多的证据表明 TLRs 参与了动脉粥样硬化的起始、进展以及斑块破裂的各个阶段,可通过多途径影响动脉粥样硬化进程^[9-12]。其激活后可经 MyD88 依赖途径和非 MyD88 依赖途径^[13]引起核转录因子- κ B (NF- κ B)或干扰素调节因子 3 (IRF3)易位进入细胞核内进而诱导炎性细胞因子和趋化因子等表达、分泌,促进 AS 发生和进展。CD14 阳性单核细胞作为 TLR4 主要载体在 AS 发生、发展中亦发挥着重要作用:在 AS 起始阶段单核细胞的在动脉壁的聚集、分化为巨噬细胞,后者通过产生细胞因子、氧自由基、蛋白酶、补体等引发局部炎症促进 AS 进展,并可通过分泌基质金属蛋白酶促进病变重构和斑块的不稳定化。研究表明 TLRs 信号转导通路不仅存在正性激活机制,也存在负性调节机制,如可溶性的 TLRs 竞争相应的配体;下调 TLRs 的表达;通过跨膜负调节分子调节;诱导细胞内的负调控分子;诱导 TLRs 信号过强细胞的凋亡^[18]。因此,研究如何激发 TLRs 的负性调节机制,适时终止 TLRs 信号,避免单核-巨噬细胞过强的免疫反应,有助于抑制高脂血症和 AS 病程中的免疫损伤。

Methe 等^[5]研究发现他汀类药物可抑制人 CD14 阳性单核细胞表面 TLR4 表达,但此项研究具有一定局限性。首先,研究主要采用的是体外孵育单核细胞,在体研究数据来自于健康志愿者,不能准确反映药物对临床高脂血症患者 TLR4 表达的影响;再者,由于药物的调脂作用,在人体内很难区分药物对 TLR4 的影响是否与调脂作用相关。基于上述原因,本研究采用 apoE^{-/-} 小鼠进行研究。

apoE^{-/-}小鼠具有自发AS倾向,5至6周龄电镜下即可发现单核细胞黏附浸润,8周龄左右即可形成由泡沫细胞及浸润的平滑肌细胞组成的脂纹病变并迅速进展,在15周龄左右即形成具有典型斑块特征的复杂病变,而高脂餐喂养可明显加快上述进程^[14,15]。目前 apoE^{-/-}小鼠已作为成熟AS模型广泛应用,可提供可靠AS相关在体数据。更为重要的是,已有研究显示许多调脂药物对该模型血脂水平没有影响^[16,17],本研究结果也显示各组小鼠血脂水平无统计学差异。因此基于此模型的研究可降低血脂因素对免疫系统的影响,从而更加明确地反映降脂药物对免疫系统的直接作用。本研究不仅发现非诺贝特可明显降低 apoE^{-/-}AS模型小鼠单核细胞TLR4表达,提示非诺贝特可通过调节TLRs信号途径影响AS中的免疫反应而发挥其抗炎作用,更为重要的是证实了此作用独立于其调脂作用之外。

本研究揭示了非诺贝特可降低TLR4表达而干预其在AS进程中介导的天然免疫反应。此机制可能参与了非诺贝特在AS治疗中抗炎作用。近年来研究显示过氧化物酶体增生物激活受体(PPARs)受体可通过阻断巨噬细胞和血管平滑肌细胞活化剂蛋白-1(AP-1)、NF-κB、和STAT信号途径而发挥其抗炎作用^[19-22]。而后者尤其是NF-κB信号途径为TLRs信号传导的主要下游通路。从而可以推测PPARs激动剂可通过此途径抑制TLRs尤其是TLR4信号途径在AS发生、发展中的作用。本研究发现PPAR-α受体激动剂非诺贝特可降低 apoE^{-/-}AS模型小鼠单核细胞TLR4表达,提示除可抑制TLR4下游信号途径外,PPAR-α受体激动还可能直接抑制TLR4表达,其具体机制有待于进一步探讨,目前不排除负反馈调节机制的参与。

已有研究显示在人类内毒素血症模型中,他汀预处理可降低单核细胞表面TLR4表达并影响其下游传导通路中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、单核细胞趋化蛋白(MCP-1)信号转导^[6],Methe等^[5]研究发现他汀可抑制高脂血症患者CD14阳性单核细胞表面TLR4表达。但值得注意的是Methe等的研究中,伴随着TLR4降低的是他汀干预前后TC、LDL明显的降低。因此不能排除他汀类药物对TLR4表达的影响可能来源于其调脂作用,即呈血脂依赖性。但本研究未发现阿托伐他汀对TLR4表达显示下调作用。本研究显示:在未改变血脂水平前提下,阿托伐他汀对TLR4表达影响亦无统计学意义,支持阿托伐他汀对TLR4表达的影响可能呈血脂依赖性,不完全是免疫系统直接作用。

参 考 文 献

- 1 Reiss AB, Glass AD. Atherosclerosis: immune and inflammatory aspects. *J Investig Med*, 2006, 54: 123-131.
- 2 Michelsen KS, Arditi M. Toll-like receptor signaling and atherosclerosis. *Current opinion in hematology*, 2006, 13: 163-168.
- 3 Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation research*, 2002, 91: 281-291.
- 4 Mach F. Statins as immunomodulators. *Transplant immunology*, 2002, 9: 197-200.
- 5 Methe H, Kim JO, Kofler S, et al. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14⁺ monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1439-1445.

- 6 Niessner A, Steiner S, Speidl WS, et al. Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo. *Atherosclerosis*, 2006, 189:408-413.
- 7 Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 2006, 1:297-329.
- 8 Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*, 2006, 37: 1923-1932.
- 9 Bjorkbacka H. Multiple roles of Toll-like receptor signaling in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2006, 17:527-533.
- 10 Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*, 2002, 105:1158-1161.
- 11 Xu XH, Shah PK, Faure E, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*, 2001, 104:3103-3108.
- 12 Li H, Sun B. Toll-like receptor 4 in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*, 2007, 11: 88-95.
- 13 McGettrick AF, O'Neill LA. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol Immunol*, 2004, 41:577-582.
- 14 Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14:141-147.
- 15 Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14:133-140.
- 16 Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21:115-121.
- 17 Nachtigal P, Pospisilova N, Pospechova K, et al. MDOC and atorvastatin have potential antiinflammatory effects in vascular endothelium of apoE^{-/-} mouse model of atherosclerosis. *Life sciences*, 2006, 78:1983-1989.
- 18 Liew FY, Xu D, Brint EK, et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5:446-458.
- 19 Gervois P, Chopin-Delanoy S, Fadel A, et al. Fibrates increase human REV-ERBalpha expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol*, 1999, 13:400-409.
- 20 Gervois P, Kleemann R, Pilon A, et al. Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate. *J Biol Chem*, 2004, 279: 16154-16160.
- 21 Ryoo S, Won M, Kim DU, et al. PPARalpha activation abolishes LDL-stimulated IL-8 production via AP-1 deactivation in human aortic smooth muscle cells. 2004, 318:329-334.
- 22 Staels B, Koenig W, Habib A, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature*, 1998, 393:790-793.

(收稿日期:2007-02-29)

(本文编辑:王丹静)

耿小勇, 韩俊燕, 朱柳园, 等. 非诺贝特和阿托伐他汀对 ApoE 基因敲除小鼠外周血单核细胞 TLR4 表达的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(2):27-32.