

高剂量阿托伐他汀对肝损伤小鼠胆汁酸代谢的影响及其机制

夏斐斐^{1,2} 宋冰雪¹ 宋雨晴¹ 田嘉伟³ 闫慧⁴ 黄玉晓⁵ 辛辉¹ 梁惠⁶

(1 青岛大学附属医院心内科, 山东青岛 266003; 2 青岛大学附属威海市中心医院电生理检查科; 3 青岛大学附属医院急诊内科;
4 青岛大学附属医院心内科门诊; 5 青岛市海慈医疗集团手术室; 6 青岛大学公共卫生学院)

[摘要] 目的 探讨高剂量阿托伐他汀对肝损伤小鼠胆汁酸代谢的影响及其机制。方法 选取 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 40 只, 随机分为生理盐水组(A 组)及阿托伐他汀低、中、高剂量组(B、C、D 组), 每组 10 只。分别用生理盐水及 10、20、30 mg/kg 阿托伐他汀灌胃 30 d 后, 取各组小鼠眼眶血, 比较各组小鼠血清总胆汁酸(TBA)、内毒素(ET)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)表达水平; 取各组小鼠部分肝脏组织, HE 染色后观察肝脏组织病理变化情况, 并采用 PCR 方法检测肝组织中胆汁酸代谢相关基因尼酯衍生物 X 受体(FXR)基因及多药耐药相关蛋白 2(MRP2)基因的表达。结果 D 组小鼠肝组织可见轻微肿大样改变、散在炎症细胞浸润和羽毛样变性情况。与其他组相比, D 组小鼠血清 TBA、ET、AST、ALT 水平均显著升高($P < 0.05$); 与 A 组相比, C、D 组小鼠肝组织中 FXR、MRP2 基因相对表达量显著降低($P < 0.05$); 与 B 组相比, D 组小鼠肝组织中 FXR、MRP2 基因相对表达量显著降低($P < 0.05$)。结论 阿托伐他汀可诱导小鼠血清 TBA 水平升高, 并且导致肝组织中胆汁酸代谢下游相关基因 FXR、MRP2 表达改变, 大剂量给药导致的肝组织胆汁酸代谢异常可能是阿托伐他汀肝脏毒性的主要原因之一。

[关键词] 阿托伐他汀; 化学性与药物性肝损伤; 胆汁酸类; 代谢; 基因表达

[中图分类号] R575 **[文献标志码]** A

INFLUENCE OF HIGH-DOSE ATORVASTATIN ON BILE ACID METABOLISM IN MICE WITH LIVER INJURY AND RELATED MECHANISM XIA Feifei, SONG Bingxue, SONG Yuqing, TIAN Jiawei, YAN Hui, HUANG Yuxiao, XIN Hui, LIANG Hui (Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the influence of high-dose atorvastatin on bile acid metabolism in mice with liver injury and its mechanism. **Methods** A total of 40 specific pathogen-free male C57BL/6 mice were randomly divided into normal saline group (group A) and low-, middle-, and high-dose atorvastatin groups (groups B, C, and D, respectively), with 10 mice in each group. After 30 days of intragastric administration of normal saline and atorvastatin at a dose of 10, 20, and 30 mg/kg, respectively, orbital blood was collected from the mice in each group, and these groups were compared in terms of the serum levels of total bile acid (TBA), endotoxin (ET), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT); after liver tissue samples were collected, HE staining was performed to observe the pathological changes of liver tissue, and PCR was used to measure the mRNA expression levels of the bile acid metabolism-related genes farnesoid X receptor (FXR) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in liver tissue. **Results** The mice in group D had slight swelling, sporadic inflammatory cell infiltration, and feather-like degeneration in liver tissue. Compared with the other groups, group D had significant increases in the serum levels of TBA, ET, AST, and ALT ($P < 0.05$). Compared with group A, groups C and D had significant reductions in the relative mRNA expression levels of FXR and MRP2 in liver tissue ($P < 0.05$), and compared with group B, group D had significant reductions in the relative mRNA expression levels of FXR and MRP2 in liver tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** Atorvastatin can induce the increase in serum TBA level in mice and lead to changes in the expression of the downstream FXR and MRP2 genes associated with bile acid metabolism in liver tissue, and abnormal bile acid metabolism in liver tissue caused by high-dose administration may be one of the main causes of atorvastatin hepatotoxicity.

[KEY WORDS] Atorvastatin; Chemical and drug induced liver injury; Bile acid; Metabolism; Gene expression

心血管疾病作为全球重大的公共卫生问题, 是全世界 50 岁及以上人口的第一大疾病^[1], 而他汀类药物被广泛用于血脂代谢以及心血管疾病的防治当中^[2-3]。研究表明, 他汀类药物在使用后会出现血清

转氨酶不同程度升高的肝损伤表现^[4-9], 这种药物性肝损伤可能与他汀类药物长时间使用导致的胆汁淤积有关^[10]。胆汁淤积与胆汁酸代谢异常有关, 胆汁酸作为致炎因子, 其大量蓄积后将直接激活炎症递质损害肝细胞, 引起肝损伤^[11]。因此探究他汀类药物对肝脏胆汁酸代谢的影响可为他汀类药物致肝损伤机制的研究提供一定思路。本研究采用阿托伐他

[收稿日期] 2023-07-19; [修订日期] 2023-09-18

[基金项目] 青岛大学附属医院博士基金(编号 2748)

[通讯作者] 辛辉, Email: xinhuiqy@163.com; 梁惠, Email: qdlianghui@126.com

汀建立肝损伤小鼠模型,通过对比不同剂量阿托伐他汀诱导的肝损伤小鼠胆汁酸代谢情况,探讨阿托伐他汀影响胆汁酸代谢的相关机制,以指导他汀类药物的临床应用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 40 只,购买于青岛大任富城畜牧有限公司(动物合格证号 SCXK[鲁]20140007),体质量(22.50 ± 1.50)g。小鼠自由进食和饮水,环境湿度为 42%~52%,环境温度 22~24 °C,12/12 h 交替光照。

1.2 实验材料

阿托伐他汀药物购自于石药集团欧意药业有限公司(国药准字号 H20103151),RNAiso plus Trizol(货号 9109)、反转录试剂盒(货号 RR047A)及聚合酶链反应(PCR)试剂盒(货号 RR820A)购自于日本 TaKaRa 公司,*FXR*、*MRP2* 的上、下游引物购自苏州金唯智生物科技公司,总胆汁酸(TBA)、内毒素(ET)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)等的 ELISA 试剂盒购自上海恪敏生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及处理 C57BL/6 小鼠适应性地喂养 1 周后,随机分为对照组(A 组)及阿托伐他汀低、中、高剂量组(B、C、D 组),每组 10 只。A 组小鼠每日给予 0.5 mL 生理盐水灌胃 1 次,B、C、D 组每日分别给予 10、20、30 mg/kg 阿托伐他汀溶液灌胃 1 次,各组小鼠饲养环境及条件相同^[12-13],连续灌胃给药 30 d。

1.3.2 检测指标 灌胃 30 d 后,4 组小鼠均于麻醉后采集眼眶血 1.2 mL,置于室温下自然凝固 10~20 min,以 2 000~3 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,严格按照 ELISA 试剂盒要求的操作步骤进行血清 TBA、ET、AST、ALT 指标的检测。采血完成后断颈处死所有小鼠,称量每只小鼠的肝组织与体

质量,计算两者比值即肝质量指数。所有小鼠均取部分肝脏组织,固定后送至病理科进行石蜡包埋、切片,并行 HE 染色,光学显微镜下观察组织病理变化情况。取适量各组小鼠肝脏组织加入 Trizol 提取总 RNA,使用紫外分光光度计测定 RNA 浓度,采用逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA;分别取各组小鼠 cDNA 样本以及 *FXR*、*MRP2* 的上游和下游引物(*FXR* 的上游引物为 5'-GCACGCTGATCAG-ACAGCTA-3',下游引物为 5'-CAGGAGGGTCTG-TTGGTCTG-3',*MRP* 的上游引物为 5'-AATAC-ATGACCTTTGGTGTTC-3',下游引物为 5'-ACGAAACCGATCAGCAACTT-3'),按照 PCR 试剂盒说明书要求的步骤进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测,并通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 *FXR*、*MRP2* 的相对表达量,实验重复 3 次,结果取均值。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 SNK-q 法,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

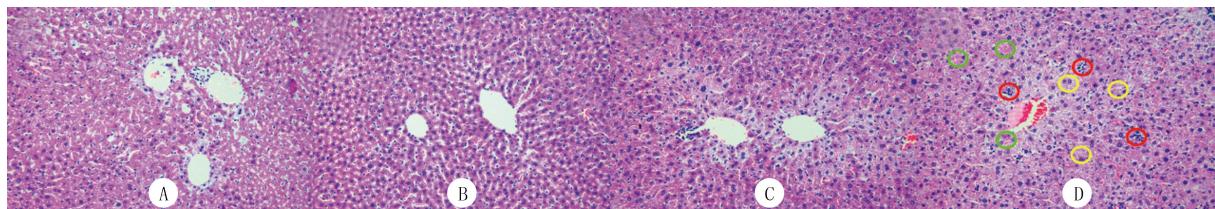
2 结 果

2.1 各组小鼠体质量、肝质量指数以及肝组织 HE 染色结果

A~D 组小鼠的体质量分别为(31.50 ± 1.20)、(31.40 ± 1.10)、(31.20 ± 0.90)和(30.80 ± 1.00)g,肝质量指数分别为 0.45 ± 0.10 、 0.46 ± 0.11 、 0.48 ± 0.10 和 0.47 ± 0.09 ,B、C、D 组小鼠体质量及肝质量指数与 A 组比较差异无显著性($P > 0.05$)。HE 染色结果显示 A、B、C 组小鼠肝脏无明显病理改变,但 D 组小鼠部分肝细胞可见轻微肿大样改变,有散在炎症细胞浸润和羽毛样变性情况(图 1)。

2.2 各组小鼠血清 TBA、ET、AST、ALT 水平比较

4 组小鼠血清 TBA、ET、AST、ALT 水平比较差异有显著性($F = 11.19 \sim 22.84, P < 0.05$);与其他组相比,D 组小鼠血清 TBA、ET、AST、ALT 水平均



A~C: A~C 组小鼠肝脏组织细胞均无明显病理改变,D:D 组小鼠肝组织细胞可见轻微肿大样改变(黄圈内)、散在炎症细胞浸润(红圈内)和羽毛样变性情况(绿圈内)。HE 染色,200 倍

图 1 各组小鼠肝组织 HE 染色结果

显著升高($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠血清 TBA、ET、AST、ALT 比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	血清 TBA ($\text{c}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	血清 ET ($\text{c}/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	血清 AST ($\text{z}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	血清 ALT ($\text{z}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
A 组	6.10±0.22	0.17±0.05	65.96±8.47	50.02±1.02
B 组	6.47±0.35	0.20±0.06	67.46±7.41	52.14±3.23
C 组	6.96±0.41	0.23±0.04	72.01±6.21	54.25±3.13
D 组	8.12±1.02	0.45±0.12	101.01±8.51	63.45±3.45

2.3 各组小鼠肝组织中 FXR、MRP2 基因相对表达量比较

A~D 组小鼠的肝组织中 FXR 基因的相对表达量分别为 0.16 ± 0.03 、 0.15 ± 0.03 、 0.11 ± 0.02 以及 0.09 ± 0.02 , MRP2 基因的相对表达量分别为 0.21 ± 0.05 、 0.20 ± 0.06 、 0.13 ± 0.03 和 0.11 ± 0.02 。4 组小鼠肝组织中 FXR、MRP2 基因相对表达量比较差异有显著性($F = 7.28, 6.69, P < 0.05$)；与 A 组相比, C、D 组小鼠肝组织中 FXR、MRP2 基因相对表达量显著降低($P < 0.05$)；与 B 组相比, D 组小鼠肝组织中 FXR、MRP2 基因相对表达量显著降低($P < 0.05$), C、D 组间小鼠肝组织中 FXR、MRP2 基因相对表达量差异无统计学意义。

3 讨 论

他汀类药物所带来的肝脏毒性是近年来心血管药物领域临床研究的热点, 研究表明长时间使用他汀类药物可能会导致肝细胞膜结构变化, 引起肝酶渗漏及血液中肝酶升高^[14]。但也有相关研究指出阿托伐他汀可显著降低血液中 ALT 和 AST 水平, 减轻肝损伤^[15]。目前关于阿托伐他汀导致血清肝酶变化的机制并无确切定论, 其主要机制包括细胞蛋白损害、氧化应激、炎症反应、免疫反应等^[16], 但关于其肝损伤机制报道却较少, 具体发病机制也尚不明确。有报道称, 他汀类药物导致的血清肝酶升高仅仅表现为短暂的、无症状的升高, 且通常不会超过正常上限的 3 倍^[17]。另有研究指出, 他汀类药物可能通过介导肝细胞的异常代谢导致胆汁淤积性肝损害^[18], 即药物引起肝细胞胆管侧膜或肝细胞窦状隙膜上转运体表达减少、功能障碍, 或者抑制胆汁酸及胆盐排泄相关转运蛋白活性, 导致胆管与转运蛋白损伤^[19-20]。

人体内胆汁酸代谢通常处于平衡状态, 一旦其代谢紊乱, 将导致胆汁形成或流动障碍, 最终导致肝细胞损伤、肝纤维化甚至肝硬化^[21]。有研究表明, 胆汁酸代谢过程中还会引起肝细胞肿大、肝细胞内

脂质堆积及肝脏体积增大等严重肝损害^[22]。本研究为观察阿托伐他汀的肝毒性, 参考阿托伐他汀致其他类型肝损伤的动物实验方法设置了低、中、高三组剂量组^[12-13], 结果显示各组小鼠灌胃 30 d 后的体质量及肝质量指数比较均无明显差异, 但病理组织 HE 染色显示, D 组小鼠肝组织存在散在炎症细胞及轻微羽毛样变性, 此类改变为胆汁淤积导致肝损伤的特征性病理变化, 表明大剂量阿托伐他汀的使用会引起胆汁淤积, 诱发肝损伤。在此基础上, D 组小鼠血清 TBA、ET、ALT、AST 水平与 A、B、C 组比较均显著增高, 这同样提示了大剂量阿托伐他汀带来的胆汁淤积可能造成的肝损伤, 而血清 ALT 及 AST 增高则可能为他汀类药物引起的短暂的、无症状升高^[17]。有研究指出阿托伐他汀可以通过其抗炎及抗氧化作用减少 ET 的产生^[23], 然而本研究中随着阿托伐他汀剂量增加, 血清 ET 水平却表现为增高, 提示阿托伐他汀可能通过不同的途径影响 ET 产生, 但两者之间的影响机制还需要进一步实验探究。

既往有研究表明, 阿托伐他汀及其代谢产物与肝细胞胆管侧膜上胆汁相关转运蛋白之间联系密切^[24]。大剂量使用阿托伐他汀后引发的胆汁淤积可能是由于药物改变或抑制了 FXR 蛋白对肝细胞胆管侧膜上胆汁相关转运蛋白的调节, 从而引起大量胆汁淤积, 诱发肝损伤^[25-26]。本研究比较了各组小鼠的 FXR 基因以及其下游 MRP2 基因的相对表达量, 结果显示与 A 组相比, C、D 组小鼠肝组织中 FXR、MRP2 基因表达量显著减少; 与 B 组相比, D 组小鼠肝组织中 FXR、MRP2 基因表达量显著减少; 说明随着阿托伐他汀的剂量增加, 其对肝组织中 FXR、MRP2 基因表达的抑制效果愈加明显。该结果进一步说明了在阿托伐他汀的使用过程中 FXR 基因及其下游 MRP2 基因的变化趋势是相同的, 且阿托伐他汀对胆汁酸代谢的抑制机制可能是其导致胆汁酸代谢异常、胆汁淤积, 进而引起肝损伤的主要原因之一。但本研究中随着阿托伐他汀剂量的增加, C、D 组小鼠肝组织中 FXR 和 MRP2 基因表达并无差异, 提示我们实验中阿托伐他汀药物浓度梯度设定可能较窄, 后期我们将会通过加大样本量和设置更多浓度梯度进行进一步实验。

总之, 阿托伐他汀可诱导小鼠血清中 TBA 水平升高, 并且导致胆汁酸代谢下游相关基因 FXR、MRP2 表达改变, 大剂量给药导致的胆汁酸代谢异常可能是阿托伐他汀肝脏毒性的主要原因之一。

伦理批准和动物权利声明:本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWZLL-27294)。所有实验过程均遵照动物实验的“3R”原则及《关于善待实验动物的指导性意见》的条例进行。

作者声明:夏斐斐、宋冰雪、宋雨晴、辛辉、梁惠参与了研究设计;夏斐斐、宋冰雪、田嘉伟、闫慧、黄玉晓参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] BELTRÁN ROMERO L M, VALLEJO-VAZ A J, MUNIZ GRIJALVO O. Cerebrovascular disease and statins[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8:778740.
- [2] PRICE J C, TIEN P C. Editorial: Statins and liver disease: Is it time to recommend statins to prevent liver disease progression? [J]. *Am J Gastroenterol*, 2017, 112(10):1506-1507.
- [3] 朱纪斌. 阿托伐他汀所致不良反应及临床合理用药分析[J]. 中国医药科学, 2019, 9(9):71-73.
- [4] YU M L, LIU M X, LUO J, et al. Liver injury induced by statins combined with anti-tuberculosis drugs in rats[J]. *Pearl*, 2019, 19(2):98-110.
- [5] LICATA A, GIAMMANCO A, MINISSALE M G, et al. Liver and statins: A critical appraisal of the evidence[J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(42):5835-5846.
- [6] 付侯萧, 黄旭, 吕童, 等. 阿托伐他汀在致死型约氏疟原虫感染的肝脏病理损伤中的作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(9):1042-1046.
- [7] 王可欣. 阿托伐他汀对阿霉素致大鼠肝脏损伤的保护作用及其机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.
- [8] 苏萍, 陈影, 张广平, 等. 阿托伐他汀的肝毒性机制研究[J]. 药物评价研究, 2019, 42(11):2174-2179.
- [9] 于红红, 高晓燕. 护肝片对药物性肝损伤的防治作用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(18):2271-2274.
- [10] 喻明丽, 陈洁, 陈永刚, 等. 他汀类药物致肝损伤的生化特征[J]. 昆明医科大学学报, 2018, 39(8):13-17.
- [11] 宋佳, 王春霞, 张育才. 肝损伤新型生物学标记物的研究进展[J]. 中国小儿急救医学, 2019, 26(7):523-526.
- [12] FARAG M M, MOHAMED M B, YOUSSEF E A. Assessment of hepatic function, oxidant/antioxidant status, and histopathological changes in rats treated with atorvastatin: Effect of dose and acute intoxication with acetaminophen[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2015, 34(8):828-837.
- [13] MOTAWI T K, TELEB Z A, EL-BOGHDADY N A, et al. Effect of simvastatin and naringenin coadministration on rat liver DNA fragmentation and cytochrome P450 activity: An *in vivo* and *in vitro* study[J]. *J Physiol Biochem*, 2014, 70(1):225-237.
- [14] KARAHALIL B, HARE E, KOÇXE, G, et al. Hepatotoxicity associated with statins[J]. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2017, 68(4):254-260.
- [15] WANG J Q, LI L L, HU A, et al. Inhibition of ASGR1 decreases lipid levels by promoting cholesterol excretion[J]. *Nature*, 2022, 608(7922):413-420.
- [16] 吴军. 他汀类药物临床多效性研究进展[J]. 药品评价, 2020, 17(1):24-25, 53.
- [17] SAHA A, GARG A. Severe liver injury associated with high-dose atorvastatin therapy[J]. *J Investig Med High Impact Case Rep*, 2021, 9:23247096211014050.
- [18] 陈步宽. 他汀类药物致肝损伤临床特点及影响因素分析[J]. 肝脏, 2017, 22(10):885-887, 903.
- [19] TRAUNER M, FUCHS C D, HALILBASIC E, et al. New therapeutic concepts in bile acid transport and signaling for management of cholestasis[J]. *Hepatology*, 2017, 65(4):1393-1404.
- [20] KIM K H, CHOI J M, LI F, et al. Xenobiotic nuclear receptor signaling determines molecular pathogenesis of progressive familial intrahepatic cholestasis[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(6):2435-2446.
- [21] WANG Y Q, AOKI H, YANG J, et al. The role of S1PR2 in bile acid-induced cholangiocyte proliferation and cholestasis-induced liver injury in mice: Bile acids, S1PR2 and cholestasis[J]. *Hepatology*, 2017, 65(6):2005-2018.
- [22] NICOLI E R, HUEBECKER M, SMITH D, et al. Differential response of the liver to bile acid treatment in a mouse model of Niemann-Pick disease type C[J]. *Wellcome Open Res*, 2017, 2:76.
- [23] MELO A C, SANTOS VALENÇA S, GITIRANA L B, et al. Redox markers and inflammation are differentially affected by atorvastatin, pravastatin or simvastatin administered before endotoxin-induced acute lung injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(1):57-64.
- [24] 康雷, 林孝威, 王国栋, 等. 药物性肝损伤药学实践探索[J]. 中国药师, 2017, 20(11):2025-2029.
- [25] 叶晓莉, 王凌, 蒋学华. 茵三硫对利福平致药物性肝损伤的保护作用及机制[J]. 华西药学杂志, 2018, 33(5):501-503.
- [26] 李晓玲, 孙凤霞, 王琮, 等. 多药耐药相关蛋白 2 及其与胆汁淤积的关系研究[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2018, 45(1):48-50.

(本文编辑 范睿心 厉建强)

(上接第 382 页)

- [23] LV L F, LI T Y, LI X L, et al. The lncRNA Plscr4 controls cardiac hypertrophy by regulating miR-214[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 10:387-397.
- [24] HULLMANN J E, GRISANTI L A, MAKAREWICH C A, et al. GRK5-mediated exacerbation of pathological cardiac hypertrophy involves facilitation of nuclear NFAT activity[J]. *Circ Res*, 2014, 115(12):976-985.
- [25] COLEMAN R C, EGUCHI A, LIEU M, et al. A peptide of the N terminus of GRK5 attenuates pressure-overload hypertension and heart failure[J]. *Sci Signal*, 2021, 14(676):eabb5968.

(本文编辑 耿波 厉建强)