文章编号:1000-5404(2009)16-1589-03

论著

野马追总黄酮对实验性高脂血症大鼠脂代谢的影响

陈万一[1],秦 剑[2],何海霞[1],李 卿[2],王柯静[1],周远大[1] ([1]重庆医科大学附属第一医院临床药理研究室,重庆 400016;[2]重庆市中药研究院,重庆 400065)

摘 要:目的 探讨野马追总黄酮对实验性高脂血症大鼠脂代谢的影响及其降脂机制。**方法** 将60只SD大鼠随机分为空白对照组,高脂模型组,阳性药物(辛伐他汀片)对照组,野马追大、中、小剂量组,除空白对照组外,各组灌服高脂乳剂同时给予相应的药物60 d,观察野马追总黄酮对大鼠血脂水平,游离胆固醇(FCH)、游离脂肪酸(FFA)、脂蛋白脂酶(LPL)、肝脂酶(HL)、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)活性以及肝脏低密度脂蛋白受体(LDLR)基因表达的影响。**结果** 野马追总黄酮能显著降低高脂模型大鼠血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)水平,升高高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)水平,提高LCAT、LPL和HL活性;RT-PCR实验显示高脂模型大鼠肝脏LDLR mRNA表达降低,野马追总黄酮能显著上调高脂血症大鼠肝脏LDLR mRNA水平。**结论** 野马追总黄酮可能通过促进外周组织细胞中的胆固醇向肝脏转运,激活脂代谢相关酶的活性,促进肝脏LDLR mRNA的表达来调节脂质代谢紊乱。

关键词: 野马追;高脂血症;卵磷脂胆固醇酰基转移酶;低密度脂蛋白受体;逆转录聚合酶链反应
中图法分类号: Q591.5;R285.5;R589.2 **文献标识码:** A

Effects of lindley eupatorium herb total flavonoid on blood lipid metabolism in experimental hyperlipidemic rats

CHEN Wan-yi[1], QIN Jian[2], HE Hai-xia[1], LI Qing[2], WANG Ke-jing[1], ZHOU Yuan-da[1] ([1]Department of Clinical Pharmacology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, [2]Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

Abstract: Objective To observe the effects of lindley eupatorium herb on blood lipid metabolism in SD rats and to explore the related mechanisms. **Methods** Sixty normal rats were randomly divided into six groups: control group, high-fatty model group, positive control group, lindley eupatorium herb high-dose, middle-dose and low-dose groups. Apart from the rats in the control group, all the rats in other groups were fed with high fat suspension and drugs respectively for 60 d. The effects of lindley eupatorium herb opuntia on blood lipids, free cholesterol (FCH), free fatty acid (FFA), lipoprotein lipase (LPL), hepatic lipase (HL), lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT) were observed. Meanwhile, the samples in the research were collected and the changes of 1ow density lipoprotein receptor (LDLR) gene expression in liver were analyzed by RT-PCR. **Results** Lindley eupatorium herb could significantly decrease the levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), 1ow density lipoprotein cholesterol (LDL-C), FCH, and FFA in the experimental hyperlipidemic rats and markedly increase the level of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C). The activities of LPL, HL and LCAT in lindley eupatorium herb group were significantly higher than those in the hyperlipidemia group. Lindley eupatorium herb could also markedly enhance LDLR gene expression in the liver. **Conclusion** Lindley eupatorium herb could promote the transfer of cholesterol from peripheral tissue cells to liver cells, activate the activity of lipid metabolism enzyme, and enhance the expression of LDLR mRNA to modulate the lipid metabolic disorders in hyperlipidemic rats.

Key words: lindley eupatorium herb; hyperlipidemia; Lecithin cholesterol acyl transferase; low density lipoprotein receptor; RT-PCR

野马追为菊科植物轮叶泽兰 *Eupatorium lindleyanum DC.* 的地上干燥部分,味苦,性平,有清肺止咳,化痰平喘、降血压之功效。临床上主要用于治疗慢性支气管炎。野马追总黄酮为野马追全草的提取物,其主要成分为黄酮类化合物[1]。本研究室在前期的实验中,发现了其具有降血脂的药理作用[2]。本研究采用

基金项目:重庆市卫生局中医药科研项目(2006-B-13)
Supported by the Traditional Chinese Medicine Research Project Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (2006-B-13)
作者简介:陈万一,女,四川省成都市人,硕士研究生,主要从事中药药理与新药开发方面的研究。E-mail: chenwanyi1005@163.com
通信作者:周远大,电话:(023)68898185,E-mail:zhouyuanda001@163.com
收稿日期:2008-11-12;修回日期:2008-12-31

大鼠实验性高脂血症动物模型,探讨其对高脂血症大鼠脂代谢的影响,以进一步探明其降脂的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级健康成年SD大鼠60只,雌雄各半,体质量为180~220 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。动物生产许可证号:SCXF(渝)2007-0001。

1.1.2 药物及试剂 野马追总黄酮提取液(每毫升提取液含20 g生药,采用分光光度计测其总黄酮含量为5.2%)由重庆中药研究所药化研究室提供,辛伐他汀片(浙江京新药业股份有限公司,规格:10 mg),胆固醇(广州天马精细化工厂),胆酸钠(北京奥博星生物技术有限责任公司);甘油三酯(triglyceride,TG)、胆固醇(cholesterol,TC)、高密度脂蛋白-胆固醇(density lipoprotein cholesterol,HDL-C)测定试剂盒(浙江东瓯生物工程有限公司),游离胆固醇(free cholesterol,FCH)测定试剂盒(上海名典生物工程有限公司),游离脂肪酸(free fatty acid,FFA)、脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase,LPL)和肝脂酶(hepatic lipase,HL)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司,Prime Script One Step RT-PCR Kit Ver.2。

1.1.3 仪器 2K15型低温离心机(Sigma公司),PX2型PCR仪(Thermo公司),1500型酶标仪(Thermo公司),7020型全自动生化分析仪(HITACHI公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模 大鼠随机分为6组,每组10只,雌雄各半,分别为正常对照组,高脂模型组,阳性药物(辛伐他汀片)对照组,野马追大、中、小剂量组。参照文献[3],自制脂肪乳剂(20%猪油,20%吐温80,20%丙二醇,10%胆固醇,2%胆酸钠,1%丙基硫氧嘧啶)。除正常对照组外,每天上午按0.01 ml/g灌服脂肪乳剂,正常对照组灌服等量乳剂辅料;下午按0.01 ml/g,野马追组按生药25 g/kg(大剂量)、12.5 g/kg(中剂量)、6.25 g/kg(小剂量)[2],辛伐他汀片组按0.001 g/kg灌服,正常对照组及高脂模型组分别灌服等量的羧甲基纤维素钠,自由饮水,连续60 d。

1.2.2 血浆标本的处理 各组大鼠均于给药前,给药30 d后尾静脉取血1 ml,于给药60 d后断头取血3 ml,每次取血前禁食12 h。血样用肝素抗凝,3 500 r/min离心,分离血浆待测。

1.2.3 生化指标测定方法 全自动生化分析仪测定血浆TG、TC、HDL-C含量,LDL-C含量采用Friedeward公式[4]计算:LDL-C = TC - (TG/5 + HDL-C);FCH、FFA、总脂酶按试剂盒说明书操作,用酶标仪显色测定;卵磷脂胆固醇酰基转移酶(lecithin cholesterol acyl transferase,LCAT)活性测定采用改良的Sperry法-自身底物法,方法[5]如下:取2份0.1 ml血浆,分别同时放入56 ℃和37 ℃水浴各1 h和12 h,测定血浆游离胆固醇含量,两者之差值即为游离胆固醇的酯化量,通过下述公式计算LCAT活性:LCAT活性 = [56 ℃灭活管D(500)值 - 37 ℃反应管D(500)值]/标准D(500)值 × 标准FC浓度 ×(总反应液体积/血浆体积× 保温时间) × 10^{-3} nmol · ml^{-1} · h^{-1}。

1.2.4 RT-PCR检测各组大鼠低密度脂蛋白受体(1ow density lipoprotein receptor,LDLR)mRNA的表达 处死大鼠后,迅速取出肝脏适量,液氮速冻后,转存至 - 70 ℃冰箱保存。测定前,从冰箱中取出样品100 mg,液氮中研磨,在液氮未挥发光前将粉末转移到1.5 ml离心管中。用总RNA抽提试剂RNAiso Reagent提取大鼠肝脏总RNA,配制2%琼脂糖凝胶,电压100 V,将提取的总RNA上样电泳验证,紫外灯下检测见5S、18S、28S 3条条带。在GenBank库中查找大鼠LDLR基因序列,同时查找选定内参β-actin基因序列,然后用Primer Primier 5软件设计引物:LDLR上游引物为5′-AACTAGACTGCTCCCCCAAGAC-3′(LP1),下游引物为5′-CTGCGATGGATACACTCACTACTG-3′(LP2),扩增的cDNA序列片段长度为380 bp;β-actin上游引物为5′-CACTGTGCCCATCTATGAGGGTTAC-3′(BP1),下游引物为5′-AACCGCTCATTGCCGATAGTGAT-3′(BP2),扩增的cDNA序列片段长度为210 bp。反应体系:RNase Free ddH_2O 16 μl,2 × 1 Step Buffer 25 μl,LP1和LP2或BP1和BP2各1 μl,Template RNA 5 μl,PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μl,在冰上依次加到0.5 ml EP管中,总量为50 μl。扩增条件:50 ℃ 30 min,94 ℃ 2 min,94 ℃变性30 s、60 ℃退火30 s、72 ℃延伸1 min,经30个循环,最后72 ℃延伸5 min,终止反应4 ℃保存。对扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳检测(100 V,30 min)。紫外灯下照相,经凝胶成像仪Eagle Eye-Ⅱ型图像处理系统处理,测定各电泳条带灰度值,以目的基因的灰度值与β-actin灰度值的比值作为目的基因的表达强度。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件,计量资料先经正态分布和方差齐性检验,再采用方差分析和t检验。

2 结果

2.1 野马追总黄酮对高脂血症大鼠血脂的影响

由表1可知,灌胃给予脂肪乳剂30 d后,与正常对照组相比,高脂模型组TC、TG、LDL-C均显著升高($P<0.01$),各用药组TC、TG、LDL-C和HDL-C有不同程度的恢复,与高脂模型组相比,辛伐他汀片组与野马追大、中剂量组能显著降低高脂血症大鼠TC、TG和LDL-C($P<0.01$),显著升高HDL-C($P<0.01$);灌胃给予脂肪乳剂60 d后,与30 d相比较,高脂模型组的TC、LDL-C进一步升高($P<0.01$),而辛伐他汀片组与野马追大、中剂量组的TC、TG和LDL-C进一步降低($P<0.01$)。

表1 野马追总黄酮对高脂血症大鼠血脂的影响(mmol/L,$n=10$,$\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	30 d				60 d			
		TC	TG	LDL	HDL	TC	TG	LDL	HDL
正常对照组	0	2.70 ± 0.50[a]	0.58 ± 0.22[a]	1.28 ± 0.45[a]	1.30 ± 0.26	2.20 ± 0.28[a]	0.41 ± 0.07[a]	0.95 ± 0.29[a]	1.17 ± 0.13[a]
高脂模型组	0	16.22 ± 1.47[b]	1.38 ± 0.24[b]	14.90 ± 1.44[b]	1.04 ± 0.28	19.05 ± 1.11[bc]	1.27 ± 0.21[b]	17.84 ± 1.17[bc]	0.95 ± 0.14[b]
辛伐他汀片组	0.001	7.79 ± 1.18[ab]	0.82 ± 0.24[a]	5.69 ± 1.02[ab]	1.93 ± 0.41[ab]	5.91 ± 1.09[abc]	0.48 ± 0.07[ac]	4.06 ± 1.23[abc]	1.75 ± 0.37[ab]
野马追大剂量组	25	8.19 ± 1.10[ab]	0.63 ± 0.11[a]	6.15 ± 1.07[ab]	1.91 ± 0.38[ab]	5.65 ± 1.73[abc]	0.48 ± 0.07[ac]	3.92 ± 1.92[abc]	1.64 ± 0.38[ab]
野马追中剂量组	12.5	9.74 ± 1.24[ab]	0.96 ± 0.43[a]	7.72 ± 1.41[ab]	1.83 ± 0.33[ab]	7.02 ± 1.23[abc]	0.54 ± 0.06[abc]	5.44 ± 1.18[abc]	1.47 ± 0.11[abc]
野马追小剂量组	6.25	11.20 ± 1.58[ab]	1.34 ± 0.44[b]	9.32 ± 1.38[ab]	1.61 ± 0.26[a]	9.67 ± 1.23[ab]	0.85 ± 0.11[abc]	8.34 ± 1.24[ab]	1.16 ± 0.08[ac]

a:$P<0.01$,与高脂模型组比较;b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.01$,与30 d比较

表 2　野马追总黄酮对高脂血症大鼠 FCH、FFA、LCAT、LPL、HL 活性的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	剂量(g/kg)	FCH (mmol/L)	FFA (mmol/L)	LCAT (nmol·ml^{-1}·h^{-1})	LPL (μmol·ml^{-1}·h^{-1})	HL (μmol·ml^{-1}·h^{-1})
正常对照组	0	1.86±0.19^{a}	717.91±74.62^{a}	44.34±4.88^{b}	37.99±3.19^{b}	13.13±2.92^{b}
高脂模型组	0	2.03±0.17^{c}	1 329.18±103.85^{c}	27.41±5.40^{d}	32.15±3.72^{d}	7.40±1.21^{d}
辛伐他汀片组	0.001	1.77±0.17^{a}	559.93±79.80^{ac}	42.98±7.97^{b}	46.05±3.95^{bd}	11.50±2.64^{bd}
野马追大剂量组	25	1.80±0.17^{a}	647.90±58.35^{ac}	45.95±5.02^{b}	47.56±6.78^{bd}	14.67±2.09^{b}
野马追中剂量组	12.5	1.79±0.22^{a}	857.20±89.87^{ac}	41.01±6.09^{b}	42.99±4.60^{b}	11.94±3.06^{b}
野马追小剂量组	6.25	1.98±0.12	1 107.22±113.21^{ac}	33.38±6.95	37.11±2.72^{b}	9.51±2.79^{d}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$, 与高脂模型组比较; c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与正常对照组比较

2.2　野马追总黄酮对高脂血症大鼠 FCH、FFA 的影响

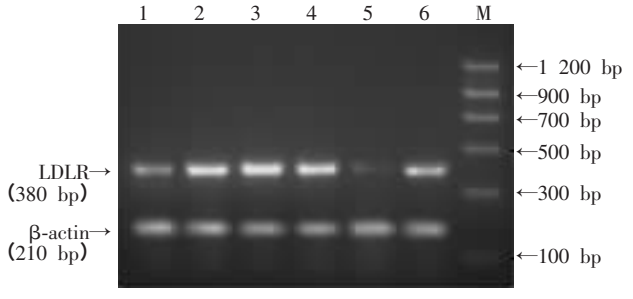
由表 2 可知,灌胃给予脂肪乳剂 60 d 后,高脂模型组大鼠血浆中 FCH 和 FFA 值较正常组显著升高($P<0.05$),辛伐他汀片组与野马追大、中剂量组大鼠血浆中 FCH 和 FFA 值与高脂模型组相比,显著性降低($P<0.05$)。

2.3　野马追总黄酮对高脂血症大鼠 LCAT、LPL 和 HL 活性的影响

灌胃给予脂肪乳剂60 d 后,高脂模型组大鼠血浆中 LCAT、LPL 和 HL 酶活性较正常对照组,显著降低($P<0.01$),辛伐他汀片组与野马追大、中剂量组大鼠血浆中 LCAT、LPL 和 HL 酶活性与高脂模型组相比,显著性升高($P<0.01$),见表 2。

2.4　野马追总黄酮对高脂血症大鼠肝细胞 LDLR mRNA 表达的影响

从图 1 可见,大鼠肝脏总 RNA 经特定引物扩增后得到的 LDLR 基因部分片段大小约为 380 bp,与预期长度相同。正常对照组和各用药组 LDLR mRNA 水平均显著高于高脂模型组($P<0.01$)。



1:野马追小剂量组; 2:野马追中剂量组; 3:野马追大剂量组; 4:辛伐他汀片组; 5:高脂模型组; 6:正常对照组; M:标准

图 1　各组大鼠肝 LDLR RT-PCR 产物电泳结果

3　讨论

中药降脂作用往往是通过多成分、多途径而起综合作用。本实验室在前期的实验中得出结果[2]:野马追提取液能使实验性高脂血症大鼠的 TC、TG 和 LDL-C含量明显降低,HDL-C 含量明显升高,与本实验所得结果一致。本实验在前期实验的基础上,因改良了高脂模型建立方法,模型更加稳定可靠,并进一步探讨了野马追降脂作用机制。

LPL 可催化乳糜微粒(CM)和极低密度脂蛋白(VLDL)中的 TG 水解,HL 则继续 LPL 的工作,进一步催化水解 CM 和 VLDL 残骸颗粒中的 TG。本实验中,与模型组相比,野马追各组可显著升高血浆 LPL、HL 的活性,从而使其 TG 含量显著低于模型组。HDL-C 为有效的抗动脉粥样硬化因子,可将外周组织的游离胆固醇转移到肝脏代谢,而影响 HDL-C 代谢的主要因素之一就是 LCAT 的活性[6]。LCAT 是催化胆固醇与不饱和脂肪酸酯化的一种酶,在 LCAT 催化下,表面的胆固醇被酯化并转入 HDL 的核心以便表面继续接收新的胆固醇,其在 HDL-C 的代谢和胆固醇的逆向转运中起着重要的作用。LCAT 的活性决定了 HDL-C 的生成量,从而影响着胆固醇的消除过程。本实验中,与模型组相比,野马追各组显著提高了 LCAT 的活性,增加 HDL-C 的含量,从而增强 HDL 逆转运胆固醇的作用。

肝脏的 LDLR 在整个机体的脂蛋白代谢中起着极为重要的作用,血浆中 2/3 以上的 LDL-C 通过其降解[7]。本实验中,模型组 LDL-R 的表达显著低于正常组,而野马追各组的表达量则显著高于模型组,这说明野马追总黄酮有可能通过提高 LDLR 的转录水平促进 LDLR 蛋白质的合成,从而降低血清 LDL-C 水平。

综上所述,野马追总黄酮可通过多途径、多靶点调节机体脂质代谢紊乱,其作用机制是通过激活脂代谢酶的活性、促进 LDL-R mRNA 的表达来实现的。

参考文献:

[1] 钱士辉, 杨念云, 段金廒, 等. 野马追中黄酮类成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(1): 50-52.

[2] 周远大, 江　舟, 何海霞, 等. 野马追对大、小鼠实验性高脂血症的防治作用[J]. 中国药房, 2007, 18(3): 178-179.

[3] 倪鸿昌, 李　俊, 金　涌, 等. 大鼠实验性高脂血症和高脂血症性脂肪肝模型研究[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(6): 703-706.

[4] 李春艳, 成小松, 刘　浩. 仙人掌粉对高脂血症大鼠血脂的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(6): 347-349.

[5] 吕俊华, 程朝晖, 张世平, 等. 红丝线草提取物对高血压并发高脂血症模型大鼠调脂作用的研究[J]. 陕西医学杂志, 2005, 34(4): 396-399.

[6] 刘秉文. 生物化学[M]. 第5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 134-141.

[7] 李文彪, 王毅仁. 清源调脂胶囊对高脂血症大鼠低密度脂蛋白受体基因表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(4): 327-329.

(编辑　栗　嘉)