

## 实验研究

## 冠心康对高脂血症大鼠肝低密度脂蛋白受体基因表达的影响

刘 萍<sup>1</sup> 张静生<sup>2</sup>

**摘要** 目的:在基因水平上探讨中药冠心康的降脂作用机制,为中药新药的研制提供科学依据。方法:将高脂血症大鼠随机分为模型组、冠心康大、中、小剂量组,西药来适可组及中药血脂康对照组,每组 10 只;另取 10 只喂饲正常饲料大鼠为正常对照组。连续灌胃给药 30 天后,RT-PCR 法测定大鼠肝低密度脂蛋白受体信使核糖核酸(LDLR mRNA)水平。结果:冠心康中剂量组 LDLR mRNA 相对含量高于大剂量组和小剂量组,差异具有显著性( $P < 0.05$ )。冠心康中剂量组能明显提高高脂血症大鼠肝 LDLR mRNA 水平,与西药来适可比较,无显著性差异( $P > 0.05$ );与血脂康比较,有显著性差异( $P < 0.05$ )。结论:冠心康可明显增强高脂血症大鼠肝 LDLR 基因表达,从而加快血中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)的清除,起到调控血脂水平的作用,且此作用尤以冠心康中剂量为佳。

**主题词** 高脂血症/中医药疗法 受体, LDL/药物作用 @冠心康

低密度脂蛋白受体(LDLR)功能缺陷是引起动脉粥样硬化及冠心病的主要原因之一。中药复方制剂冠心康临床应用于高脂血症、冠心病的治疗取得了满意的疗效<sup>[1]</sup>。本研究在基因水平上探讨了冠心康对高脂血症大鼠肝 LDLR 基因表达的影响,以期进一步阐明中药复方调脂作用的机制。

## 1 材料与方法

## 1.1 药物与试剂

中药冠心康的制备:冠心康由黄芪、全瓜蒌、薤白、丹参组成,生药材购自辽宁中医学院附属医院。其中黄芪、丹参用渗漉法回收浓缩液,并浓缩成稠膏;薤白提取挥发油;全瓜蒌煎煮 3 次,合并煮液。将上述三者合并浓缩成膏剂。其生药含量为 2.87g/ml。

实验对照药:来适可(氟伐他汀)胶囊由瑞士诺华制药有限公司生产,北京诺华制药有限公司进口分装。血脂康胶囊由北京北大维信生物科技有限公司生产。

基金项目:国家科技部新药基金(96-901-05-222),辽宁省科技厅自然科学基金项目(972122)

1 上海中医药大学附属龙华医院科研实验室,上海市零陵路 532 号(200032)

2 辽宁中医学院附属医院

收稿日期:2002-08-09;修回日期:2002-09-19

动物造模用药:胆固醇、胆酸钠、蔗糖为中国医药集团上海化学试剂公司产品,均为分析纯;丙基硫氧嘧啶由中国上海集成药厂生产。

主要试剂:DEPC 为上海生工生物工程有限公司产品,批号 20000811;逆转录试剂盒为 Promega 公司产品,批号 20010207;DL-2000 为宝生物工程有限公司产品,批号 20010420。

1.2 主要实验仪器:DNA 扩增仪:9600 型,美国 PE 公司产品;蛋白-核酸分析仪:Beckman DL-600,美国生产。

1.3 实验动物:Wistar 雄性大鼠,体重  $180 \pm 20$ g,70 只,购自中国医科大学实验动物中心。合格证号:辽实动质字(2000)015 号。

## 1.4 高脂血症动物模型的建立

高脂饲料配方:2%胆固醇、0.5%胆酸盐、5%蔗糖、10%猪油、0.2%丙基硫氧嘧啶、82.3%基础饲料,由沈阳市于洪区实验动物饲料厂制备。

造模方法:随机抽取 60 只大鼠,每天喂饲高脂饲料 20g/只,不足者补以正常饲料;另取 10 只喂饲正常饲料,共 10 天。

分组及给药方法:(1)正常组:10 只,等体积生理盐水灌胃+普通饲料;(2)模型组:10 只,等体积生理盐水灌胃+高脂饲料;(3)冠心康大剂量组:10 只,按  $54\text{g 生药} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃给药+高脂饲料;(4)冠心康中剂量组:10 只,按  $27\text{g 生药} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃给药+高脂饲料;(5)冠心康小剂量组:10 只,按  $13.5\text{g 生药} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃给药+高脂饲料;(6)中药血脂康对照组:10 只,按  $0.216\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃给药+高脂饲料;(7)西药来适可对对照组:10 只,按  $3.6\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃给药+高脂饲料。共观察 30 天。

1.5 取材:各组动物连续给药 30 天后,禁食 12 小时,20%氨基甲酸乙酯腹腔注射,麻醉后,腹正中线切口,分离肝脏,取部分肝左叶放入 appendoff 管中,液氮中保存备用。

## 1.6 实验步骤与方法

肝组织中总 RNA 抽提:采用异硫氰酸胍-苯酚

—氯仿一步法<sup>[2]</sup>。总 RNA 纯度鉴定:取总 RNA 10 $\mu$ l 加 490 $\mu$ l DEPC 处理水,测同一样品在 260nm 和 280nm 的吸光度,以 A260nm/A280nm 比值表示其纯度。RNA 电泳:每个 appendoff 管中加甲酰胺 13 $\mu$ l, 10 $\times$ Mops 3 $\mu$ l、甲醛 4 $\mu$ l、溴化乙锭 1 $\mu$ l、甘油—溴酚兰 2 $\mu$ l,加 RNA 样品 6 $\mu$ l,共计约 30 $\mu$ l,将上述含 RNA 样品的混合液在 65 $^{\circ}$ C 水浴箱中变性 5min,上样。RNA 电泳:60V、1 小时。

RT-PCR 反应<sup>[3]</sup>:(1)引物设计:利用 GenBank 数据库中提供的大鼠 LDLR cRNA 全序列和 Oligo5.0 引物设计软件进行引物设计,由上海生工生物工程公司合成。

LDLR:上游 5'-ATT TTG GAG GAT GAG AAG CAG-3';下游 5'-GTA CAG TGT CGA CTT CTG G-3';引物长 40 个 bp,扩增 cDNA 全长 364bp。

$\beta$ -actin:上游 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3';下游 5'-TCC GGG CAT CGG AAC CGC-TCA-3';引物长 42 个 bp,扩增 cDNA 长 422bp。(2)反应过程:采用一步法进行 DNA 扩增。反应体系为:10 $\times$ PCR 扩增缓冲液 5 $\mu$ l、25mM 的 MgSO<sub>4</sub>10 $\mu$ l、10mM 的 dNTP 5 $\mu$ l、RNA 酶抑制剂 1 $\mu$ l、上游引物及下游引物各 1 $\mu$ l、RNA 样品 1 $\mu$ l、AmVRNA 逆转录酶 1 $\mu$ l、Taq DNA 聚合酶 1 $\mu$ l、加无酶水 24 $\mu$ l。反应体系总体积为 50 $\mu$ l,混匀后,置于 PCR 扩增仪中,扩增条件为:(1)LDLR:反转录 48 $^{\circ}$ C 45min;预变性 94 $^{\circ}$ C 2min。PCR 扩增:94 $^{\circ}$ C 变性 30s,60 $^{\circ}$ C 退火 1.5min,68 $^{\circ}$ C 延伸 6min。经 40 个循环,68 $^{\circ}$ C 7min,4 $^{\circ}$ C 10min 终止反应。(2) $\beta$ -actin:反转录 48 $^{\circ}$ C 45min,预变性 94 $^{\circ}$ C 2min。PCR 扩增:94 $^{\circ}$ C 变性 30s,58 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,经 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 5min 终止反应。(3)PCR 产物电泳:取 5 $\mu$ l PCR 产物加上 2 $\mu$ l 0.25%甘油—溴酚兰上样缓冲液,混匀后,小心加样,于 1%琼脂糖胶中电泳,100mV,1 小时。电泳结束后紫外光下观察 PCR 电泳带,摄片,于凝胶成像仪上进行目的条带的密度定量,以目的基因带的密度与内参  $\beta$ -actin 条带的密度之比作为该目的基因的 mRNA 相对含量。

1.7 统计学处理:采用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析。

## 2 结果

2.1 总 RNA 抽提结果:取少量总 RNA 样品经紫外分光光度仪分析,A260nm/280nm 比值介于 1.8~2.0 之间,表示样品为纯 RNA;RNA 经 1.2%变性琼脂糖凝胶电泳后,紫外光下观察到 28s 和 18s RNA 两条清晰带,且 28s 的荧光强度为 18s 的二倍以上,说明

附表 用药 30 天后各组大鼠肝 LDLR mRNA 的

表达情况比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 鼠数(只) | 剂量(g/kg) | LDLR/ $\beta$ -actin mRNA     |
|---------|-------|----------|-------------------------------|
| 正常组     | 10    | 等体积生理盐水  | 0.9890 $\pm$ 0.0391           |
| 模型组     | 10    | 等体积生理盐水  | 0.5194 $\pm$ 0.1623*          |
| 冠心康大剂量组 | 10    | 54       | 0.7834 $\pm$ 0.0325* $\Delta$ |
| 冠心康中剂量组 | 10    | 27       | 0.9286 $\pm$ 0.0326* $\Delta$ |
| 冠心康小剂量组 | 10    | 13.5     | 0.8677 $\pm$ 0.0634* $\Delta$ |
| 来适可组    | 10    | 0.0036   | 0.9582 $\pm$ 0.0586 $\Delta$  |
| 血脂康组    | 10    | 0.216    | 0.8750 $\pm$ 0.0547* $\Delta$ |

与正常组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

RNA 分子无降解。

2.2 冠心康对高脂血症大鼠肝 LDLR mRNA 的影响:附表表示,模型组 LDLR mRNA 表达明显低于正常组( $P < 0.01$ ),各用药组 LDLR mRNA 表达明显好于模型组,经统计学处理,差异具有显著性( $P$  均  $< 0.01$ )。冠心康中剂量组 LDLR mRNA 相对含量高于大剂量组和小剂量组,差异具有显著性( $P < 0.05$ )。冠心康中剂量组 LDLR mRNA 相对含量与正常组、模型组比较,差异均有显著性( $P < 0.01$ );与西药来适可组比较,差异无显著性( $P > 0.05$ );与中药血脂康组比较,差异有显著性( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

LDLR 是血浆中胆固醇代谢的主要途径<sup>[4]</sup>,循环中约 75%低密度脂蛋白(LDL)由肝脏清除,其中 90%是由 LDLR 途径清除的,所以 LDLR 对调节体内胆固醇平衡,调节血浆总胆固醇(TC)含量起着关键作用。最近的研究表明,LDLR 表达低下是引起高脂血症、动脉粥样硬化的主要原因之一<sup>[5]</sup>,高脂血症及冠心病的病因主要是转录水平的调控异常<sup>[6]</sup>,而基因表达的调控多是在转录水平上进行的,因此 mRNA 水平有很大变化。本研究结果表明,高脂血症模型组 LDLR mRNA 表达明显低于正常组,提示高脂血症时,由于抑制了 LDLR 的转录,故 LDLR mRNA 表达低下,此与文献报道一致。

由于循环中的 LDL-c 主要通过肝脏 LDLR 途径清除,因此肝脏 LDLR 表达的变化能够决定并反映血中胆固醇的代谢。LDL-c 与肝细胞表面的 LDLR 结合后被细胞内吞分解成氨基酸和游离胆固醇;游离胆固醇可以抑制羟甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶活性,以减少细胞内合成胆固醇;并激活内质网脂酶—胆固醇酰基转移酶,使游离胆固醇被酯化成胆固醇酯;抑制了通常以膜蛋白的形式存在于内质网膜上固醇调节元件结合蛋白(SREBP)前体切割位点 1 的活性,SREBP 前体不能被切割,不能与内质网膜解离进入核内,与 LDLR 基因 5'端固醇调节元件结合,从而抑制

了 SP1 转录因子活性,使肝脏细胞 LDLR mRNA 水平降低<sup>[6]</sup>。

本研究结果表明,药物可以解除高脂血症时对 LDLR 转录的抑制作用。其中冠心康中剂量组 LDLR mRNA 相对含量高于大剂量组和小剂量组,提示在 3 个剂量组中以中剂量的疗效为佳。而冠心康中剂量组 LDL mRNA 相对含量与西药来适可组比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ ),提示二者在分子水平上对增强 LDLR 基因表达的作用相近;与中药血脂康组比较,冠心康中剂量组作用优于血脂康组 ( $P < 0.05$ )。

现代药理研究表明,黄芪能明显抑制 HMG-CoA 活性<sup>[7]</sup>。瓜蒌能降低血清总胆固醇和  $\beta$ -脂蛋白<sup>[8]</sup>。薤白挥发油能降低血脂,尤其对 TG、TC 作用明显,同时又能降低血清过氧化脂质,提高前列环素含量,抑制血栓素  $A_2$  合成<sup>[9]</sup>。丹参通过抑制胆固醇内源性合成,可降低高脂血症大鼠血清 TC、LDL-c 及主动胆胆固醇水平,提高血中 HDL-c 或肝 LDLR mRNA 水平<sup>[10]</sup>。

综上所述,我们认为冠心康调脂及防治动脉粥样硬化和冠心病的可能机制,一是明显增加肝 LDLR 基因表达,继而增加 LDLR 活性,加快血中 LDL-c 的清除,调控血脂水平;二是对体内合成 TC 过程的限速酶 HMG-CoA 产生竞争性抑制,限制 TC 内源性合成,反

馈性地使 LDLR 数量增加和活性加强,加快极低密度脂蛋白 (VLDL)、LDL 经 LDLR 途径的吸收,使血中 VLDL、LDL 水平降低。其确切机制尚待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 刘萍,张静生,郑菲,等. 中药对低密度脂蛋白受体基因表达的影响. 中国中西医结合急救杂志,2000,7(3):141-144.
- 2 黄培堂,俞炜源,陈添弥,等译. PCR 技术实验指南. 北京:科学技术出版社,2000:77-78.
- 3 Wang A M, Mark D F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction proc. Natl Sci USA, 1989, 86(24):9717-9721.
- 4 Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science, 1986, 232:34-47.
- 5 Kovanen PT, Goldstein JL, Brown MS. Increased binding of low density lipoprotein to live membranes from rats treated with 17- $\alpha$ -ethylestrenol. J Biol Chem, 1979, 253:5126-5131.
- 6 林秋实,陈吉棣. 山楂及山楂黄酮预防大鼠脂质代谢紊乱的分子机制研究. 营养学报,2000,22(2):131-136.
- 7 王树立,李永德,赵勤,等. 山楂、黄芪及刺五加对豚鼠胆固醇代谢的影响. 中西医结合杂志,1987,7(8):483-484.
- 8 彭悦,徐鸿庆,杨立刚,等. 女贞子降血脂作用的临床观察. 辽宁中医杂志,1981,(6):36.
- 9 李海聪,史载祥,吕爱山,等. 脉净胶囊治疗高脂血症疗效分析. 中医杂志,1995,36(3):161-163.
- 10 姜传仓,蔡海江,范乐明. 丹参对 LDL-R 及 ApoA-I mRNA 水平的影响. 南京医科大学学报,1994,14(4):522-525.

### 多快好省 煎好药



**东华煎药包装设备**

6大系列  
25个品种  
30个办事处  
100位维修工程师  
3,000家医院药店正在使用  
10,000名终端用户见证了  
东华10年的奋斗历程

### 紫外线动态空气杀菌机

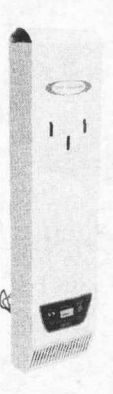
**强力杀菌功能:**  
85%以上的紫外线波长是253.7nm,杀菌率高达99.9%

**动态杀菌:**  
人机共处,可24小时运转;不妨碍日常生活,  
避免空气二次污染

**特点:**

1. 噪音小  $\leq 36\text{dB(A)}$
2. 能耗低
3. 效果好
4. 寿命长(灯管可以使用8000小时)

**适用:**  
《消毒技术规范》规定的Ⅱ、Ⅲ类卫生环境,  
实验室、制药厂等其他需要杀菌的场所。





**东华原医疗**  
DONGHUAYUAN MEDICAL

北京东华原医疗设备有限公司  
电话: 010-89718013  
邮编: 102200

地址: 北京市中关村昌平科技园区振超路1号  
传真: 010-89718021  
网址: www.donghuagroup.com

垂询热线: 810-810-0359