

方药研究

化痰活血方对高脂血症大鼠肝脏过氧化物酶体增植物 激活受体 α 及其目标基因表达的影响

叶 勇¹ 王家宁² 汪道文² 梅国强³ 刘松林³

摘要 目的:观察化痰活血方对高脂血症大鼠肝脏过氧化物酶体增植物激活受体 α (PPAR α)、乙酰辅酶 A 氧化酶 (ACO) 表达的影响。方法:建立高脂血症大鼠模型后分别给予化痰活血方大、中、小剂量及力平脂治疗,检测其相关指标。结果:化痰活血方能显著降低高脂血症大鼠血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 的水平,增强肝脏 PPAR α ACO mRNA 的表达。结论:化痰活血方增强 PPAR α ACO mRNA 的表达可能是其治疗高脂血症的分子机制之一。

主题词 高脂血症/中医药疗法 过氧化物酶体增植物/代谢 @ 化痰活血方

Effects of Huatan Huoxue Prescription on Expressions of Peroxisome Proliferation Substance Activating Receptor α (PPAR α) and the Target Gene in the Liver of Hyperlipemia Rat

Ye Yong¹, Wang Jianing², Wang Daowen², et al.

(1. College of Medicine and Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan 430056; 2. Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Sciences and Technology)

Objective: To observe effects of Huatan Huoxue Prescription on expressions of peroxisome proliferation substance activating receptor α (PPAR α) and the target gene acetyl-CoA oxidase (ACO) in the liver of the rat with hyperlipemia. **Methods:** The rats of hyperlipemia were treated respectively with Huatan Huoxue Prescription of large, middle, small dosages and Lipanthyl, and related indexes were detected. **Results:** The Huatan Huoxue Prescription could significantly decrease level of serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG), and strengthened expressions of PPAR α and ACO mRNA in the liver of hyperlipemia rats. **Conclusion:** Increase of expressions of PPAR α and ACO mRNA is possibly one of the mechanisms of Huatan Huoxue Prescription in treatment of hyperlipemia.

Key Words Hyperlipemia/TCM therapy; Peroxisome proliferation substance/metabolism; @ Huatan Huoxue Prescription

过氧化物酶体增植物激活受体 (PPARs) 是一类能被过氧化物酶体增植物激活的核内受体,由 3 个亚家族 PPAR α PPAR β δ 和 PPAR γ 组成,其中 PPAR α 在介导脂肪酸氧化及脂质代谢中起重要作用。乙酰辅酶 A 氧化酶 (ACO) 是 PPAR α 的目标基因,影响着脂肪酸的摄取、转化、分解代谢过程。化痰活血方具有健脾化痰清热、活血理气止痛之功,临床治疗高脂血症、冠心病疗效满意^[1]。本研究拟从分子水平观察其对高脂血症模型大鼠肝脏 PPAR α ACO 表达的影响,以探求其治疗高脂血症的分子机制。

1 材料

1.1 动物:健康 Wistar 大鼠 60 只,雄性,体重 (230 $\pm$ 20) g,由华中科技大学同济医学院动物中心提供(合格

证号 TJLA-2003-177)。

1.2 药物:化痰活血方组成:法半夏 10g,全瓜蒌 10g,黄连 6g,当归 10g,土鳖虫 10g,山楂 10g,茯苓 20g 等 10 味中药。每剂 112g,先用乙醇提取,挥发去酒精,收集提取液;然后将全部药渣加水 500ml,普通方法煎煮;将提取液与煎煮液混合,浓缩为含生药 4g/ml 浓度的药液。力平脂(法国利博福尼制药公司生产,批号 69660)用生理盐水配成 1.8mg/ml 混悬液。

1.3 试剂:胆固醇、胆酸钠(美国 Sigma 公司);甲基硫氧嘧啶(北京市燕京制药厂);丙二醇、吐温-80(湖北医药公司化学试剂分公司);胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 试剂盒(宁波慈城生化试剂厂);TRIzol Reagent Total RNA 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);PCR 试剂盒(大连宝生生物有限公司)。

1.4 主要仪器:Primus 96 Plus PCR 仪(德国 MWG Biotech 公司);Hoefer SE 600 垂直电泳系列(Hoefer 科学仪器公司);凝胶自动成像仪(GDS 8000,美国);半自动生化仪;BH-2 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

基金项目:湖北省教育厅重点科研计划项目(2003X046)

1 江汉大学医学与生命科学学院中医系,湖北省武汉市经济技术开发区(430056)

2 华中科技大学同济医学院附属同济医院

3 湖北中医学院

收稿日期:2005-03-10;修回日期:2005-07-08

2 方法

2.1 动物分组及造模:取上述大鼠 60 只,随机分为空白组、高脂血症模型组(简称模型组)、力平脂组、化痰活血方大、中、小剂量组(简称中药大、中、小剂量组),每组 10 只。常规饲养 1 周后,禁食 12 小时,剪尾采血,检测基础血脂。参照文献[2]方法制备高脂乳剂,即由 10%胆固醇、20%猪油、2%胆酸钠、1%甲基硫氧嘧啶、20%吐温-80、30%丙二醇加水至 100%制成。除空白组外其余各组大鼠以高脂乳剂 $10\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,每日 1 次,灌服 30 天。

2.2 给药方法及标本处理:大鼠造模的第 11 天,各组分别给予相应药物灌胃。给药剂量按药理实验方法学^[3]计算,中药大、中、小剂量组分别按 $20.16\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $10.08\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $5.04\text{g}/\text{kg}$ 体重的标准灌服,力平脂组按 $0.018\text{g}/\text{kg}$ 体重的标准灌服,空白组及模型组以 $10\text{ml}/\text{kg}$ 体重的标准灌服生理盐水。每日 1 次,连服 20 天。第 21 天起,末次给药前禁食 12 小时,给药 1 小时后,用 20%乌拉坦 $0.5\text{ml}/100\text{g}$ 体重麻醉,从腹主动脉取血,在 4°C 下 3000 转/分钟离心 10 分钟,取血清。同时切开腹部迅速取肝脏,一部分液氮冻存,一部分制成病理切片。

2.3 TC、TG 的测定:以胆固醇氧化酶法和甘油磷酸氧化酶法分别测定 TC、TG 水平。

2.4 病理组织学检查:取大鼠肝组织,10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,光学显微镜下观察。

2.5 RT-PCR 法测定肝 PPAR α ACO mRNA 的表达:PPAR α ACO 引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。以 GAPDH 为内参照。PPAR α 上游引物为 5'-CCT GAA CAT CGA GTG TCG AA-3',下游引物为 5'-GTC ACG GAG CTC ACA GAA TT-3';ACO 上游引物为 5'-GGC TAC CTG AAG ATG GAC AA-3',下游引物为 5'-AAG TGG AAG GCA TAG GCA GT-3'。采用 Trizol 常规一步法提取总 RNA,然后测定 RNA 样品含量及纯度: $A_{260}/A_{280}=1.8\sim 2.0$ 。按参考文献[4]RT-PCR 法分别扩增 PPAR α ACO 及 GAPDHmRNA,取 $10\mu\text{L}$ PCR 反应产物,在 2%琼脂糖凝胶(含 $0.5\text{mg}/\text{L}$ 溴化乙锭)中电泳,以 DL2000 为分子量标准,电泳缓冲液为 $1\times\text{TAE}$,电泳完毕后,在凝胶自动成像仪上进行照像、数据分析。待测基因 mRNA 相对表达量以其扩增带吸光度值与相应内参照扩增带吸光度值的比值表示:PPAR α mRNA 相对量 = PPAR α 电泳带吸光度值/GAPDH 电泳带吸光度值,ACO mRNA 相对量 = ACO 电泳带吸光度值/GAPDH

电泳带吸光度值。

2.6 统计学方法:用 SPSS 10.0 统计软件进行统计,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 化痰活血方对高脂血症大鼠血脂的影响:表 1 示,模型组大鼠血清 TC、TG 水平明显高于空白组($P<0.01$),说明高脂血症模型复制成功。化痰活血方各剂量组及力平脂组血清 TC、TG 水平明显低于模型组($P<0.01$)。结果表明,化痰活血方与力平脂均具有显著的降脂作用,且二者之间差异无显著性($P>0.05$)。

表 1 化痰活血方对高脂血症大鼠血清 TC、TG 的影响($\text{mmol}/\text{L}, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量(g/kg 体重)	灌药 天数	TC	TG
空白组	10	等体积	20	$1.53 \pm 0.09^*$	$1.39 \pm 0.12^*$
模型组	10	等体积	20	2.62 ± 0.09	4.38 ± 0.34
中药大剂量组	10	20.16	20	$1.73 \pm 0.07^*$	$1.03 \pm 0.08^*$
中药中剂量组	10	10.08	20	$1.74 \pm 0.07^*$	$0.95 \pm 0.06^*$
中药小剂量组	10	5.04	20	$1.42 \pm 0.07^*$	$1.19 \pm 0.12^*$
力平脂组	10	0.018	20	$1.66 \pm 0.13^*$	$1.00 \pm 0.05^*$

与模型组比较, $*P<0.01$

3.2 化痰活血方对高脂血症大鼠肝脏 PPAR α ACO mRNA 表达的影响:RT-PCR 后,琼脂糖凝胶电泳,在 579bp 和 317bp 处分别显示出 PPAR α ACO 阳性电泳带;在 309bp 处显示出 GAPDH 电泳带,与预期结果一致。表 2 示,模型组大鼠肝脏 PPAR α ACO mRNA 的表达显著低于空白组($P<0.01$)。化痰活血方各剂量组及力平脂组 PPAR α ACO mRNA 的表达显著高于模型组($P<0.01$)。化痰活血方各剂量组 PPAR α mRNA 相对含量与力平脂组比较差异无显著性($P>0.05$),而 ACO mRNA 相对含量低于力平脂组($P<0.01$)。化痰活血方各剂量组之间 PPAR α ACO mRNA 相对含量差异无显著性($P>0.05$)。提示化痰活血方可上调 PPAR α ACO mRNA 的表达,在调

表 2 化痰活血方对高脂血症大鼠肝脏 PPAR α ACO mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量 (g/kg 体重)	灌药 天数	PPAR α / GAPDHmRNA	ACO / GAPDHmRNA
空白组	10	等体积	20	$1.410 \pm 0.174^*$	$0.560 \pm 0.084^*$
模型组	10	等体积	20	0.949 ± 0.352	0.419 ± 0.074
中药大剂量组	10	20.16	20	$1.554 \pm 0.217^*$	$1.103 \pm 0.196^*\Delta$
中药中剂量组	10	10.08	20	$1.561 \pm 0.172^*$	$1.029 \pm 0.152^*\Delta$
中药小剂量组	10	5.04	20	$1.546 \pm 0.155^*$	$0.984 \pm 0.158^*\Delta$
力平脂组	10	0.018	20	$1.717 \pm 0.215^*$	$1.490 \pm 0.163^*$

与模型组比较, $*P<0.01$;与力平脂组比较, $\Delta P<0.01$

控脂质代谢方面有一定的意义。

3.3 化痰活血方对肝脏形态学的改变:光镜下空白组肝小叶清晰可见,结构正常,肝组织的形态学表现正常;模型组肝组织出现了弥漫性肝细胞脂肪变性,肝细胞变大,胞浆内的脂滴多为大泡型,细胞核被挤向细胞周边;化痰活血方各剂量组与力平脂组肝组织仅见轻度脂肪变性。

4 讨论

肝脏是脂质和脂肪酸代谢的重要器官,正常肝脏的脂质含量为 4%~7%,其中 TG 占一半。当某些致病因子使这种调控系统受损,输入肝脏的脂质及脂肪酸过多时,肝脏脂蛋白合成代谢就会发生障碍,造成脂质代谢紊乱。PPAR α 能与脂肪酸及其衍生物、贝特类降脂药等结合而使其活化,活化后的 PPAR α 可与维甲酸类受体 X 或糖皮质激素受体形成异二聚体,再与靶基因中的 PPARs 反应元件相互作用,从而启动一系列与脂质代谢有关的酶和蛋白的基因转录^[5]。如增加肝脏的脂肪酸结合蛋白、乙酰辅酶 A 合成酶、ACO、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶等,从而在多个水平即目标基因介导 TG 和脂肪酸的分解代谢^[6]。过氧化物酶体增殖物激活 ACO,主要是使过氧化物体 β 氧化明显增强,继而诱导线粒体的 β 氧化,使用于三酰甘油合成的乙酰辅酶 A 酯减少,影响 TG 的合成。PPAR α 对于 TG 的作用是通过激活目标基因来达到降低高甘油三酯血症的作用^[7,8]。

本实验结果表明,模型组大鼠血清 TC、TG 水平

明显增高,而 PPAR α ACO mRNA 表达明显降低;从肝脏病理形态学来看,高脂血症模型大鼠发生了明显肝细胞脂肪变性。治疗后,化痰活血方各剂量组血清 TC、TG 水平明显降低,肝细胞轻度脂肪变性,而 PPAR α ACO mRNA 表达增强,因此推测化痰活血方可能是通过增强 PPAR α 的表达而发挥其调控脂质代谢的目的,达到降低 TG 的作用;同时启动或激活了目标基因 ACO 的基因转录,促进脂肪氧化分解,以保护肝细胞,减轻脂肪变性的发生。这可能是其治疗高脂血症和脂肪肝的分子机制之一。

参考文献

- 1 叶勇,梅国强.梅国强教授运用化痰活血法治疗高脂血症.光明中医,2003,18(6):222.
- 2 刘明,董超仁,苏静怡.一种简便实用的大鼠高脂血症模型.中国药理学通报,1989,5(2):119.
- 3 徐叔云.药理实验方法学.北京:人民卫生出版社,1991:1136.
- 4 王兆君,叶平,张秀锦.大鼠过氧化物体增殖物激活型受体 α 在衰老过程中表达差异及与脂质代谢的关系.中国动脉硬化杂志,2003,11(6):498~500.
- 5 Isseemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature, 1990, 347(6294):645~650.
- 6 Lee CK, Klopp RG, Weindrich R, et al. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. Science, 1999, 285(5432):1390~1393.
- 7 Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. Semin Liver Dis, 2001, 21(1):43~55.
- 8 戚晓红,张昭萍,李晓宇.过氧化物酶体增殖物激活受体 α 在实验性大鼠脂肪肝中的表达.中国病理生理杂志,2003,19(9):1206~1209.

中医药发展的前景

— 中药因加工手段落后,使医师就像一个优秀的修理工却没有一件称手的工具,难以发挥,即时提供各种有效剂型,医师可以随意选择汤剂(真空包装,不变质),蜜丸、水丸、浓缩丸、胶囊、片、散、酒、外用膏、敷、栓、脐等剂型或给药方式,使更多的患者会选择中医药,中医药发展空间无限广阔……

理念 · 品质 · 信誉 · 价格

中华文化的精神 精益求精的质量 传统医学的精髓 现代科技的方法



小型粉碎机 胶囊灌装线 煎药机 水、蜜丸机 栓剂模 膏药机 压片机 干燥箱 切片机 提取浓缩锅 软膏、药液分装机

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

精诚机械有限公司

● 销售部电话: 0536-3988472 3988473 3988474 3988476 传真: 0536-3988472 邮编: 262500

地址: 山东省青州市火车站西街 ● 欢迎您的姓名、地址发短信至 13869655350 索取资料