

化痰活血方拆方对高脂血症大鼠 肝脏 PPAR α mRNA 的影响

闻 莉¹ 叶 勇² 刘松林¹ 指导:梅国强¹

(1. 湖北中医学院中医系, 武汉市武昌区昙华林特1号, 430061; 2. 江汉大学医学与生命科学学院)

[摘 要] **目的** 通过拆方研究方法, 观察化痰活血方中化痰药和活血药对高脂血症模型大鼠肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体 α PPAR α 的影响, 以明确化痰活血方中不同组分的调脂机理。**方法** Wistar 大鼠50只, 随机分为空白组、模型组、全方组、化痰药组、活血药组等5组, 采用高脂饲料建立大鼠高脂血症模型。连续灌胃给药30天后, 应用 RT-PCR 法测定各组大鼠肝 PPAR α mRNA 水平。**结果** 模型组大鼠肝 PPAR α mRNA 表达明显低于空白组, 全方组和化痰药组大鼠肝 PPAR α mRNA 水平明显高于模型组, 而活血组大鼠肝 PPAR α mRNA 水平和模型组比较差异无统计学意义。**结论** 化痰药是化痰活血方中提高高脂血症模型大鼠肝 PPAR α mRNA 水平的主要组分, 方中活血药可能通过其他途径发挥治疗作用。

[关键词] 高脂血症; 化痰活血方; 化痰药; 活血药; 过氧化物酶体增殖物激活受体

Effect of Separated Formula for Resolving Phlegm and Promoting Blood Circulation on PPAR α mRNA of the Liver of Hyperlipemia Model Rats

WEN Li¹, YE Yong², LIU Song-lin¹, et al.

(1. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061; 2. School of Medicine and Life Sciences of Jiangnan University)

ABSTRACT **Objective** To observe the influence of the medicines for resolving phlegm and the medicines for promoting blood circulation on the peroxysome proliferators-activated receptor α (PPAR α) in the liver of the hyperlipemia-modeled rats in order to make sure the effect of different components of the whole formula. **Methods** The 50 Wistar rats were randomized into 5 groups: blank group, model group, whole formula group, group taking the medicines for resolving phlegm, and group taking the medicines for promoting blood circulation. The rats except the blank group were modeled by giving high fat feed into stomach once a day. After 30 days, RT-PCR was adopted to determine the level of PPAR α mRNA of each group. **Results** The level of PPAR α mRNA of model group was apparently lower than that of blank group. Compared with the model group, the PPAR α mRNA of the whole formula group and the group taking medicines for resolving phlegm increased evidently, but there was no significant difference between the group taking medicines for promoting blood circulation and the model group on the level of PPAR α mRNA. **Conclusion** The medicines for resolving phlegm in the whole formula play the most important role in increasing PPAR α mRNA in the liver of the hyperlipemia model rats, while the medicines for promoting blood circulation may affect through other ways.

Key Words Hyperlipemia; Formula for resolving phlegm and promoting blood circulation; Medicines for resolving phlegm; Medicines for promoting blood circulation; Peroxysome proliferators-activated receptor (PPAR)

化痰活血方是梅国强教授依据《伤寒论》小陷胸汤化裁而来, 临床用于治疗痰瘀互结型高脂血症、冠心病取得了满意的疗效。前期研究证实, 化痰活血方能显著降低高脂血症模型大鼠血脂^[1], 增强肝细胞脂质代谢功能, 提高肝细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 的转录水平, 具有较强的降脂及调节脂蛋白代谢作用^[2]。为了进一步明确化痰活血方的调脂作用机制, 本研究将其拆分为化痰药组和活血药组, 采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法, 观察方中化痰与活血药对高脂血症大鼠肝细胞中调节脂质代谢的

重要分子 PPAR α mRNA 的影响。

1 材料

1.1 动物

清洁级 Wistar 大鼠50只, 雄性, 体重(230 $\pm$ 20) g, 购置于华中科技大学同济医学院实验动物学部, 合格证号 TJLA-2005-152。

1.2 药物

化痰活血方全方由法半夏10g、全瓜蒌10g、黄连6g、当归10g、红花10g、川芎10g、土鳖虫10g等10味药物组成, 另将全方严格按比例拆方分为化痰药组(由法半夏10g、全瓜蒌10g、黄连6g等5味药组成)和活血药组(由当归10g、红花10g、川芎10g、土鳖虫10g等5味药组成), 中药饮片均购于湖北中医学院附属门诊部。3组药物分别采用水煮醇沉法制成溶液(全方组每毫升溶

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2005ABA126), 武汉市青年科技晨光计划项目(2005-202)C135, 湖北中医学院2005年科研立项课题(2005-11)

通讯作者: 闻莉, wenlitem@yahoo.com.cn, (027) 68889030

液含2g 生药,化痰药组每毫升溶液含1.1g 生药,活血药组每毫升溶液含0.9g 生药),分装、灭菌,4℃贮存备用。

1.3 试剂

Trizol Reagent Total RNA 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);RNA PCR 试剂盒(大连宝生物有限公司);丙烯酰胺和定标用蛋白(美国 Sigma 公司);标准分子量 DNA marker(日本 TaKaRa Biotech 公司);其他试剂均为国产分析纯。

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(美国 GDS 8000)。

2 方法

2.1 动物分组及造模

将50只大鼠随机分为5组:空白组、模型组、化痰活血方组(全方组)、化痰药组、活血药组,每组10只。常规饲养1周后,除空白组外,其余各组以高脂饲料(参照文献[3]以10%胆固醇、10%猪油、2%胆酸钠、0.1%丙基硫氧嘧啶,加77.9%基础饲料制备)喂养造模。大鼠造模的第15天,全方组、化痰药组、活血药组分别给予相应药物灌胃,给药剂量按中药药理实验方法学^[1]计算,剂量为2ml/200g 体重(分别相当于原生药材20g/kg、11g/kg、9g/kg),空白组及模型组以等体积生理盐水灌胃。每日1次,连续30天。大鼠药物灌胃第31天,末次给药前禁食12小时,给药1小时后,用20%乌拉坦0.5ml/100g 体重麻醉,剖腹迅速取出肝脏,以液氮冻存。同时,从腹主动脉取血,分离血清。

2.2 观察指标及方法

采用酶法测定血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的含量。采用 RT-PCR 法检测 PPAR α mRNA,引物设计:在 GenBank 上查找 PPAR α 基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,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'-CACAAGTGCCTGTCCGTC-3';下游引物为5'-ATCAGCATCCCGTCTTTG-3'。

扩增的 cDNA 片段长度为520bp。GAPDH 上游引物为5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3';下游引物为5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3';扩增的 cDNA 片段长度为309bp。指标检测:将冻存的肝组织剪碎,采用 Trizol 常规一步法提取总 RNA,测定 RNA 样品含量及纯度为:A 260/A 280=1.8~2.0,说明其纯度满足分子生物学实验要求。RT-PCR 法扩增后,取25 μ l PCR 反应产物,在1%琼脂糖凝胶(含0.1mg/L 溴化乙锭)中电泳,以 DL2000 为分子量标准,电泳缓冲液为1 $\times$ TAE,电泳完毕后,在凝胶自动成像仪上照像。经凝胶密度扫描系统处理,测定各电泳带灰度值。以 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物为内参照,计算 PPAR α mRNA 相对量=PPAR α 电泳带灰度值/GAPDH 电泳带灰度值。

2.3 统计学方法

用 SPSS 10.0 统计软件进行统计处理,数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用单因素方差分析,组间比较用 q 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 化痰活血方拆方对高脂血症大鼠血脂的影响

表1示,高脂血症大鼠模型组血清 TC、TG、LDL-C 水平明显高于空白组,HDL-C、高密度脂蛋白2型-胆固醇(HDL₂-C)水平明显低于空白组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明高脂血症模型复制成功。经治疗后,全方组、化痰药组、活血药组血清 TC、TG、LDL-C 水平均明显低于模型组,全方组、化痰药组血清 HDL-C、HDL₂-C 水平明显高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。化痰药组显著降低高脂血症大鼠血清 TC、TG 水平,升高 HDL-C 水平,与活血药组比较差异有统计学意义($P<0.05$);而在降低血清 LDL-C、升高血清 HDL₂-C 的作用上与活血药组差异无统计学意义。表明全方组、化痰药组、活血药组均具有显著的调脂作用,其中化痰药在调节 TC、TG 及 HDL-C 作用方面优于活血药。

3.2 化痰活血方拆方对高脂血症大鼠肝脏 PPAR α mRNA 表达的影响

根据电泳图灰度值计算出各组大鼠肝脏 PPAR α mRNA 的表达量。表2示,模型组大鼠肝组织 PPAR α

表1 各组大鼠血脂比较(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量(g/kg)	TC	TG	LDL-C	HDL-C	HDL ₂ -C
空白组	10	—	1.75 $\pm$ 0.34	1.66 $\pm$ 0.42	0.84 $\pm$ 0.13	1.04 $\pm$ 0.30	0.56 $\pm$ 0.10
模型组	10	—	5.52 $\pm$ 1.09*	4.88 $\pm$ 0.90*	2.09 $\pm$ 0.63*	0.56 $\pm$ 0.15*	0.27 $\pm$ 0.10*
全方组	10	20	3.55 $\pm$ 0.65 $\triangle\triangle\blacktriangle$	2.53 $\pm$ 0.83 $\triangle\triangle\blacktriangle$	1.36 $\pm$ 0.34 $\triangle\triangle$	0.98 $\pm$ 0.20 $\triangle\triangle\blacktriangle$	0.48 $\pm$ 0.12 $\triangle\triangle$
活血药组	10	9	4.58 $\pm$ 0.70 $\triangle$	3.55 $\pm$ 0.66 $\triangle\triangle$	1.56 $\pm$ 0.56 $\triangle$	0.64 $\pm$ 0.12	0.37 $\pm$ 0.16
化痰药组	10	11	3.70 $\pm$ 0.67 $\triangle\blacktriangle$	2.38 $\pm$ 0.88 $\triangle\blacktriangle$	1.31 $\pm$ 0.33 $\triangle$	0.88 $\pm$ 0.13 $\blacktriangle$	0.43 $\pm$ 0.12 $\blacktriangle$

与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$;与活血药组比较, $\blacktriangle P<0.05$

mRNA 的水平显著低于空白组 ($P<0.01$) ; 全方组和化痰药组 PPAR α mRNA 的水平显著高于模型组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$) ; 全方组与化痰药组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) , 但与活血药组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$) ; 化痰药组大鼠肝组织 PPAR α mRNA 的水平显著高于活血药组 ($P<0.05$) 。说明化痰活血全方及其中的化痰药可以显著上调高脂血症模型大鼠肝组织 PPAR α mRNA 的水平, 而活血药则对大鼠肝组织 PPAR α mRNA 表达的作用不明显。

表2 各组大鼠肝脏 PPAR α mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量 (g/kg)	PPAR α mRNA
空白组	10	—	0.580 $\pm$ 0.137
模型组	10	—	0.155 $\pm$ 0.025 *
全方组	10	20	0.284 $\pm$ 0.076 $\triangle\triangle$
活血药组	10	9	0.148 $\pm$ 0.032 $\blacktriangle$
化痰药组	10	11	0.218 $\pm$ 0.048 $\triangle$

与空白组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$; 与活血药组比较, $\blacktriangle P<0.05$

4 讨论

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 (如脂肪酸及其衍生物、贝特类降脂药等) 激活的核内受体^[5], 由 3 个亚家族 PPAR α PPAR β δ PPAR γ 组成^[6,7], 该受体家族在脂质代谢、脂肪细胞分化中起作用。其中 PPAR α 主要表达于肝脏、心脏和肾脏, 在介导脂肪酸氧化及脂质代谢中起重要作用。PPAR α 与脂肪酸及其衍生物、贝特类药物等结合而活化, 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^[8], 启动一系列与脂质氧化分解代谢有关的酶和蛋白的基因转录^[9], 在多个目标基因位点介导 TG 和脂肪酸的分解代谢^[10], 从而显著降低血中 TG 水平。

前期研究已证实, 化痰活血方能显著降低高脂血症模型大鼠血脂^[1,2], 增强肝细胞脂质代谢功能, 提高肝细胞 PPAR α 的转录水平, 具有较强的降脂及调节脂蛋白代谢作用^[3]。本实验通过拆方研究发现, 在化痰活血方中, 具有显著的促进肝细胞 PPAR α 转录作用的是化痰药组分, 其促进作用与化痰活血方全方相当, 而活血药组分作用不明显。结果提示, 在化痰活血方中, 主要是通过化痰药促进肝细胞 PPAR α 的转录及活化, 进而促进 TG 及脂肪酸的分解, 来实现其调脂作用的。其中的活血药^[11]则可能是通过其他途径实现其调脂作用, 其具体的作用和机制有待于进一步研究。

参考文献

[1] 叶勇, 梅国强, 刘松林, 等. 化痰活血方对高脂血症大鼠血脂

代谢的影响及其抗氧化作用. 时珍国医国药, 2005, 16(10) : 968~969.

[2] 叶勇, 王家宁, 汪道文, 等. 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. 中医杂志, 2006, 47(1) : 53~55.

[3] 魏泓主编. 医学实验动物学. 成都: 四川科学技术出版社, 1998: 86.

[4] 徐叔云. 药理实验方法学. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1136.

[5] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature, 1990, 347(6294) : 645~650.

[6] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev, 1999, 20(5) : 649~688.

[7] Qi C, Zhu Y, Reddy JK. Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. Cell Biochem Biophys, 2000, 32(spring) : 187~204.

[8] 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.

[9] Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, et al. Aging-induced decrease in the PPAR alpha level in hearts is improved by exercise training. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(5) : 1750~1760.

[10] Rubins HB, Robins J, Collins D, et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. N Engl J Med, 1999, 341(6) : 410~418.

[11] 叶勇, 梅国强, 刘松林, 等. 化痰活血方对高脂血症大鼠血液流变学的影响. 湖北中医学院学报, 2005, 27(3) : 11~13.

(收稿日期: 2006-11-22, 修回日期: 2007-02-20)

[编辑: 叶 晨]

汇编《中国名医医案精选》征稿通知

历代名医名家的医案是中医学重要的组成部分。而当代各地知名医生的医案蕴藏着丰富的学术精华, 同样也可启迪后学, 因此, 我们拟将汇编《中国名医医案精选》。征稿如下: 各科医案医论的整理与经验总结, 包括个案和误诊医案分析; 论述、论著、笔谈、讲座等; 借鉴或参考历代名医名家医案中的治疗方法与思路在临床中的应用体会与发挥。

为研究和传承我国各地中医专家的学术思想与临床经验, 拟于 2008 年 6 月在上海举行“首届中医药继承与创新学术研讨会”。征稿如下: 中医药在继承、创新、现代化等方面的理论研究与实践探索; 中医药临床诊治各科疾病的思路及经验总结, 包括病例报告、体会与心得等。

录用稿件将按《著作权法》发放稿酬, 细则请见录用通知。截稿日期: 2008 年 4 月 28 日。来稿请寄: 南京市商埠街 27 号南京聚杰医药信息科技中心刘凤国收, 邮编: 210011; 电话: (025) 82038887、58820656。请分别注明“医案精选”、“会议”字样。