

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.14.021

茵陈五苓散含药血清对 LO2 细胞株 LDL-R 及 HMG-CoA 还原酶表达的影响

李若梦, 刘石密, 吴凝, 赵琳琳, 王东生*

(中南大学湘雅医院, 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 410008)

摘要 目的 探讨茵陈五苓散含药血清调节血脂的可能机制并筛选其最佳给药浓度及作用时间。方法 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为茵陈五苓散低、中、高剂量组, 辛伐他汀组及空白组, 每组 8 只。茵陈五苓散低、中、高剂量组分别给予 4、8、16 g/(kg·d) 茵陈五苓散; 辛伐他汀组给予 1 mg/(kg·d) 辛伐他汀片; 空白组给予 20 mg/(kg·d) 生理盐水, 各组大鼠每天灌胃 2 次, 连续 3 天, 制备含药血清。取对数生长期的 LO2 细胞株经过 24 h 孵化贴壁后随机分为茵陈五苓散低、中、高剂量组, 辛伐他汀组及空白组, 每组各 18 孔, 每孔分别加入受试血清 10 μ l。同浓度的 18 孔再分为 3 组, 每组 6 孔, 分别培养 24、48、72 h, 实时荧光定量法检测各组细胞的低密度脂蛋白受体 (LDL-R) mRNA 及 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶 mRNA 表达情况。结果 与空白组比较, 茵陈五苓散各剂量组及辛伐他汀组各时间点 LDL-R mRNA 表达均明显升高, HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达均明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中茵陈五苓散在中浓度、干预 48 h 的条件下 LDL-R mRNA 表达达高峰、HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达最低。结论 茵陈五苓散含药血清调节血脂的机制可能与其能明显上调 LDL-R 表达、下调 HMG-CoA 还原酶表达有关, 在药物浓度为中浓度、干预时间为 48 h 时效果最佳。

关键词 茵陈五苓散; LO2 细胞株; 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶; 低密度脂蛋白受体

高脂血症是指血液中脂类物质代谢异常, 其与冠心病、糖尿病及多种心脑血管疾病的发生发展密切相关^[1]。茵陈五苓散是《金匱要略》中清热利湿代表方, 研究发现, 其用于治疗高脂血症可取得良好疗效^[2]。动物实验证实, 茵陈五苓散不但能有效调节血脂水平同时还具有显著的抗氧化作用^[3]。本研究采用血清药理学方法, 以人肝细胞株 LO2 为研究对象, 观察给予不同浓度的茵陈五苓散含药血清后, LO2 细胞株内低密度脂蛋白受体 (LDL-R) mRNA 及 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶 mRNA 表达的变化情况, 以探讨茵陈五苓散的调脂机制。

1 材料

1.1 动物及细胞

清洁级雄性 SD 大鼠由中南大学湘雅医学院实验动物学部提供, 共 40 只, 体重 (200 $\pm$ 20) g,

实验动物许可证号: SYXK (湘) 2005-0005。人肝细胞 LO2 细胞株由中南大学肿瘤研究所提供。细胞株在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度下, 常规培养传代。

1.2 药品

茵陈五苓散由中南大学湘雅医院中药房提供, 组成: 茵陈 30 g, 泽泻 15 g, 茯苓 9 g, 猪苓 9 g, 白术 9 g, 桂枝 4 g。将药材洗净后水煎 2 次, 药液过滤浓缩成含生药 1 g/ml, 放入 4℃ 冰箱保存。辛伐他汀片, 杭州默沙东制药有限公司, 批号: 07432, 每片 20 mg。

1.3 试剂

胎牛血清 (杭州四季青公司, 批号 NTM0172); RPMI-1640 基本培养液 (Invitrogen 公司, 批号: 23400021); 胰蛋白酶 (HyClone 公司, 批号: SV30010); 二甲基亚砜 (无锡海硕生物有限公司, 批号: 20081214); 总 RNA 提取试剂盒 Trizol (Invitrogen 公司, 批号: 15596-026); 反转录试剂盒 (Fermentas 公司, 批号: K1631); PCR

基金项目: 国家自然科学基金 (81173198)

* 通讯作者: wdsh66@aliyun.com, 13808481269

荧光定量试剂盒 (ABI 公司, 批号: 4309155); LDL-R、HMG-CoA 还原酶和 GAPDH 内参的引物由长沙市远泰生物科技有限公司提供。

1.4 仪器

超净工作台 (北京半导体设备厂); CO₂ 细胞培养箱 (美国 ThermoForma 公司, 3111 型); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司, IMT-2 型); 台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司, 5415D 型); 低温高速离心机 (湖南湘仪公司, GL20A 型); PCR 仪 (ABI 公司, 7900 型); 水平电泳槽 (北京君意东方仪器公司, JY-SPC 型); 双稳数显电泳仪 (北京鼎国生物科技发展中心, DG-III 型)。

2 方法

2.1 大鼠含药血清的制备

将 40 只 SD 大鼠按体重从轻到重编号, 体重相近的 5 只大鼠分入 1 个区组, 共 8 个区组, 然后在随机数字表中第 7 行第 5 列开始的 2 位数作为 1 个随机数, 每个区组内将随机数按大小排序, 依次分入茵陈五苓散低剂量组、茵陈五苓散中剂量组、茵陈五苓散高剂量组、辛伐他汀组及空白组 5 组, 每组 8 只。动物实际灌胃剂量按动物体表面积换算得出^[4], 茵陈五苓散低、中、高剂量组分别给予 4 g/(kg·d)、8 g/(kg·d)、16 g/(kg·d) 茵陈五苓散; 辛伐他汀组给予 1 mg/(kg·d) 辛伐他汀片; 空白组给予 20 mg/(kg·d) 生理盐水。每天灌胃 2 次, 连续灌胃 3 天, 第 5 次灌胃结束 1 h 后在无菌条件下取血, 37℃ 恒温水浴箱内放置 30 min, 3000 r/min 离心 25 min, 取上层血清, 56℃ 恒温水浴箱放置 30 min 灭活, 经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌后分装入离心管, 放入 -20℃ 冰箱保存备用。

2.2 细胞分组及处理

取对数生长期的 LO2 细胞株, 用新鲜培养液配制成 2.5×10^4 个/ml, 以 100 μl/孔接种于 96 孔板中, 共接种 90 孔, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。细胞经过 24 h 孵化贴壁后从 1 至 90 编号, 从随机数字表中的第 3 行第 2 列开始, 依次读取 3

位数作为 1 个随机数字录入编号下, 然后全部随机数从小到大排序, 18 孔为 1 组, 依次将细胞分为茵陈五苓散低、中、高剂量组, 辛伐他汀组及空白组 5 组。弃上清后改用无血清的培养基 90 μl, 再分别加入各组受试血清 10 μl/孔, 同浓度的 18 孔再分为 3 组, 分组方法同上, 每组 6 孔, 分别培养 24、48 和 72 h。

2.3 LDL-R mRNA 及 HMG-CoA 还原酶 mRNA 的表达

各组细胞经过药物干预, 分别在各时间点提取细胞 RNA, 实时荧光定量 PCR 测定各组 LDL-R mRNA 及 HMG-CoA 还原酶 mRNA 的含量, RNA 提取按照说明书进行。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件分析数据, 计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行 *t* 检验。

3 结果

3.1 各组含药血清不同时间 LDL-R mRNA 表达比较

表 1 示, 与空白组比较, 茵陈五苓散各剂量组及辛伐他汀组各时间点 LDL-R mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中茵陈五苓散各剂量组 LDL-R mRNA 表达随着浓度和时间升高而变化, 在中浓度、干预 48 h 的条件下 LDL-R mRNA 表达达高峰, 但与辛伐他汀组同时间点比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 各组含药血清不同时间 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 茵陈五苓散各剂量组及辛伐他汀组各时间点 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达均明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中茵陈五苓散组 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达随着浓度和时间升高而不同, 在浓度为中浓度、干预 48 h 的条件下 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达最低, 但与辛伐他汀组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组含药血清不同时间低密度脂蛋白受体 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	24 h	48 h	72 h
空白组	6	1.0416 ± 0.0397	1.0665 ± 0.0182	1.0633 ± 0.0426
茵陈五苓散低剂量组	6	1.8167 ± 0.1122*	2.3049 ± 0.1394*	2.3748 ± 0.1447*
茵陈五苓散中剂量组	6	3.2276 ± 0.1187**	4.7821 ± 0.5332**	4.6877 ± 0.2726**
茵陈五苓散高剂量组	6	3.5098 ± 0.0725**	4.6955 ± 0.0116**	4.5689 ± 0.1785**
辛伐他汀组	6	4.6685 ± 0.2886**	4.8411 ± 0.3935**	4.7767 ± 0.0530**

注: 与空白组同时间点比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 各组含药血清不同时间 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	24 h	48 h	72 h
空白组	6	4.5717 $\pm$ 0.2722	4.5319 $\pm$ 0.1571	4.4615 $\pm$ 0.1805
茵陈五苓散低剂量组	6	3.1638 $\pm$ 0.0853 [*]	2.9078 $\pm$ 0.1573 [*]	2.6316 $\pm$ 0.0815 [*]
茵陈五苓散中剂量组	6	2.0856 $\pm$ 0.0798 [*]	1.3278 $\pm$ 0.1135 ^{**}	1.3545 $\pm$ 0.3187 ^{**}
茵陈五苓散高剂量组	6	1.8612 $\pm$ 0.0629 ^{**}	1.4350 $\pm$ 0.2552 ^{**}	1.4441 $\pm$ 0.5156 ^{**}
辛伐他汀组	6	1.5015 $\pm$ 0.2287 ^{**}	1.3733 $\pm$ 0.0402 ^{**}	1.3739 $\pm$ 0.2381 ^{**}

注: 与空白组同时点比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 讨论

中医学并无“血脂”这一概念,但在大量文献中均可找到有关于“膏脂”的论述。中医理论认为,膏脂来源于中焦,由水谷精微化生,随气血运行至周身,类似于现代医学中的血脂。对于血脂异常,中医学认为其与脾胃功能失常、痰浊内生有关,临床采用健脾利湿之法常获良效^[9]。现代医学对高脂血症的治疗一般涉及抑制胆固醇的合成,影响体内血脂分布、运转与清除等机制^[10]。前期临床及试验研究证实茵陈五苓散具有良好的调脂作用^[9],本研究试图寻找出该药调脂的相关机制。

茵陈五苓散中茵陈苦、辛,微寒,善清脾胃肝胆之湿热,为方中君药;茯苓、猪苓甘淡,能利水消肿、健脾渗湿;泽泻甘寒,泄水湿、行痰饮之外尚能泄下焦湿热;白术甘温,能健脾益气、燥湿利尿;桂枝辛温,可温扶脾阳、化气行水而行水湿痰饮之邪,六药合用,有清湿热、利湿浊、通阳健脾之功。

脂蛋白受体调节血浆脂蛋白和血脂水平,同时也调控着周围组织对血浆脂蛋白的摄取,其中较为重要的脂蛋白受体为 LDL-R^[11],大多数低密度脂蛋白(LDL)的代谢由该受体调控。LDL-R 不但调节 LDL 的代谢,同时它还可以影响 LDL 生成^[12],因而提高和促进 LDL-R 的表达对于维持血浆 LDL 水平相对恒定有重要作用,对与动脉粥样硬化相关的心脑血管疾病的防治有着积极意义^[13]。本研究结果显示,茵陈五苓散具有良好的升高 LDL-R 表达的作用,其作用强度与作用浓度存在量效关系,与空白组比较差异明显。

HMG-CoA 还原酶是合成胆固醇的重要限速酶,在胆固醇的代谢中起着极其重要的作用^[14],抑制该酶的活性或下调其表达均能抑制胆固醇的合成,目前临床应用最广泛的他汀类调脂药就是属于此类药物^[15]。在本研究中,以辛伐他汀为阳性对照药物,茵陈五苓散表现出抑制 HMG-CoA 还原酶表达的效应,且该效应随着浓度及干预时间的变化而不

同,其中以中浓度干预 48 h 效果最佳,与辛伐他汀对该酶的表达抑制效果相当,与空白组相比存在显著差异,提示茵陈五苓散可能通过抑制 HMG-CoA 还原酶的表达从而起到限制胆固醇生成的作用。

本研究从抑制胆固醇合成和促进胆固醇代谢两方面入手,采用血清药理学方法,证实茵陈五苓散可有效上调 LDL-R mRNA 表达,同时下调 HMG-CoA 还原酶 mRNA 的表达,对血脂的代谢起到积极的调节作用。本研究同时证明在不同浓度及不同作用时间下,茵陈五苓散对于 LDL-R 和 HMG-CoA 还原酶表达的影响也不一样,提示在临床应用时应考虑选择适当的剂量及使用时间以求达到最佳疗效。

参考文献

- [1] 赵水平. 缺血性心血管病高危患者强化调脂的共识 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2008, 10(6): 401-402.
- [2] 王东生, 周衡, 殷文学. 清热利湿法调脂的临床观察 [J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(5): 50-51.
- [3] 喻嵘, 吴勇军, 周衡. 茵陈五苓散对高脂蛋白血症及其脂质过氧化影响的实验研究 [J]. 中医杂志, 1997, 38(2): 104-107.
- [4] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5): 52-53.
- [5] 胡燕. 茵陈五苓散利水渗湿治疗高脂血症 [J]. 四川医学, 2012, 33(8): 1478-1480.
- [6] 张翔炜, 张敏州. 中医药对冠心病血脂代谢异常的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2004, 2(4): 226-228.
- [7] 李小玲, 李菁, 朱伟杰, 等. 丝瓜络对高脂血症小鼠 LDL-R 基因表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(6): 1156-1159.
- [8] Nagayama D, Ishihara N, Bujo H, et al. Effects of serotonin on expression of the LDL receptor family member LR11 and 7-ketocholesterol-induced apoptosis in human vascular smooth muscle cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(4): 906-910.
- [9] 黄波, 刘梅林. 高甘油三酯血症与冠心病关系的研究进展 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2011, 13(7): 659-

660.

[10] Stakhneva EM, Vavilin VA, Ragino YI, et al. Effects of simvastatin and atorvastatin on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver [J]. Bull

Exp Biol Med, 2013, 156(1): 63-65.

[11] 张雪玲, 糜漫天, 张乾勇, 等. Lovastatin 对 HL-60 细胞 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达及细胞增殖功能的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(1): 39-42.

Effects of Serum with *Yinchen Wuling San* (茵陈五苓散) on Expression of LDL-R and HMG-CoA Reductase in LO2 Cell Line

LI Ruomeng, LIU Shimi, WU Ning, ZHAO Linlin, WANG Dongsheng

(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha City, Hunan Province, 410008)

ABSTRACT Objective To probe possible mechanisms of serum with *Yinchen Wuling San* (茵陈五苓散) for regulating blood lipids, and to select the best concentration of the drug and action time. **Methods** 40 male SD rats were randomly divided into low, medium and high dose of *Yinchen Wuling San* groups, simvastatin group and blank group, with eight rats in each group. Low, medium and high dose of *Yinchen Wuling San* groups were respectively given 4 g/ (kg · d), 8 g/ (kg · d) and 16 g/ (kg · d) of *Yinchen Wuling San*. Simvastatin group was given 1 mg/ (kg · d) of simvastatin. Blank group was given 20 mg/ (kg · d) of saline lavage, 2 times a day for three days to prepare medicated serum. LO2 cell lines in the logarithmic phase were incubated adherence for 24 h, then were randomly divided into low, medium and high dose of *Yinchen Wuling San* groups, simvastatin group and blank group, with 18 holes in each group. 10 μ l of tested serum was added in each hole respectively. Each 18 holes with the same concentration were divided again into three groups, with 6 holes in each group, and cultivated for 24 h, 48 h, and 72 h respectively. Real-time fluorescence quantitative method was used to detect expression levels of the low density lipoprotein receptor (LDL-R) mRNA and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG CoA) reductase mRNA in cells of each group. **Results** Compared with the blank group, expression of LDL-R mRNA significantly increased but expression of HMG-CoA reductase mRNA significantly decreased at each time point in each group with different doses of *Yinchen Wuling San* and the simvastatin group, ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). And the expression of LDL-R mRNA reached the top point but the expression of HMG-CoA reductase mRNA was at the lowest point when medium concentration of *Yinchen Wuling San* intervened for 48 h. **Conclusion** *Yinchen Wuling San* can obviously raise LDL-R expression and lower HMG-CoA reductase expression. This may be its mechanisms of regulating blood lipids. The best effect can be obtained with the medium drug concentration and intervention for 48 h.

Keywords *Yinchen Wuling San*; LO2 cell line; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; Low density lipoprotein receptor

(收稿日期: 2014 - 11 - 20; 修回日期: 2015 - 01 - 20)

编辑: 王利芬

读者 · 作者 · 编者

论文中表的应用

表格是学术论文中清晰、直观地表达结果的必要工具,正确、合理、规范地使用表格,有助于读者理解全文,往往可以达到文字叙述难以达到的效果。图的运用应遵从如下规则。

1. 应具有自明性和可读性,读者不必查找前后文内容即可理解表格中所表达的含义。
2. 应按正文中出现的顺序用阿拉伯数字依序编号,表题连同表序置于表的上方。
3. 表中的内容不应与正文文字及插图内容重复。
4. 数据表宜采用国际通行的三线表格式,力求结构简洁。
5. 表中的量、单位、符号、缩略语等应与正文中所写一致。出现缩略语宜在表注中注明中文名称。
6. 表内参数同一指标保留的小数位数应相同,同一栏的数字应按位次上下对齐。
7. 统计表中应列出样本数,表中的符号、标记、代码以及需要说明的事项以最简练的文字作为表注附于表的下方。
8. 中文期刊表题及表内其他文字说明可以只使用中文,也可以中英文对照,但不应仅使用英文。