

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.17.016

金花菜对营养性肥胖大鼠体重及血脂的影响

马伯艳¹, 张广庆¹, 刘长喜^{2*}

(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江省哈尔滨市香坊区和平路 24 号, 150040; 2. 北京中医药大学养生学研究所)

摘要 目的 探讨金花菜对营养性肥胖大鼠体重及血脂的影响及可能作用机制。方法 采用高脂饲料喂养 9 周建立营养性肥胖大鼠模型, 将 50 只造模成功大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组和金花菜高、中、低剂量组, 每组 10 只, 另设正常大鼠 10 只为空白对照组。金花菜高、中、低剂量组分别给予金花菜混悬液 2、1、0.5 g/(kg·d) 灌胃, 阳性对照组给予奥利司他胶囊 35 mg/(kg·d) 灌胃, 空白对照组、模型对照组给予同体积 (15 ml/kg) 的蒸馏水灌胃, 连续 6 周。于给药前后测量大鼠体重计算总增重, 给药后检测血清甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平和肝脏卵磷脂胆固醇脂酰转移酶 (LCAT)、胆固醇 7 α -羟化酶 (CYP7A1)、过氧化物增殖激活物受体 α (PPAR α) mRNA 和蛋白表达。结果 与模型对照组比较, 各给药组大鼠给药后体重及总增重明显下降, 金花菜高剂量组和阳性对照组 TC、TG 和 LDL-C 明显降低, HDL-C 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。治疗后各组肝脏组织 PPAR α 和 CYP7A1 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型对照组比较, 金花菜高剂量组 PPAR α 蛋白表达升高, 而阳性对照组 PPAR α 、LCAT 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 金花菜对营养性肥胖大鼠有较好的减肥降脂作用, 其机制可能与激活 PPAR α 蛋白表达有关。

关键词 营养性肥胖; 金花菜; 血脂; 过氧化物增殖激活物受体 α

高脂血症、肥胖、糖尿病等营养代谢类疾病往往互为因果, 呈“共存”的综合征状态。高脂肪、高热量、低膳食纤维的饮食及体力活动过少是造成机体脂肪代谢异常的主要原因之一, 寻找安全、有效、稳定的改善营养代谢类疾病的治疗方法成为研究的热点。金花菜 (*Medicago polymorpha* L.) 又名“秧草”, 是生长于长江中下游地区的一年生豆科苜蓿属草本植物。前期研究证明, 金花菜可食用嫩芽干粉具有高蛋白、高膳食纤维、低脂肪 (低热能)、高维生素含量以及丰富的微量元素和矿物质的营养学特征, 符合营养代谢类疾病患者饮食要求^[1]。本研究就金花菜的减重、降血脂作用进行研究, 并探讨其可能分子机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 71 只, 8 周龄, 体质量

(200 ± 20) g, 实验动物合格证号: SCXX (黑) 2008004, 由黑龙江中医药大学 GLP 中心提供。高脂饲料配方参考文献 [2] 改进为 53% 普通饲料 + 15% 猪油 + 15% 蔗糖 + 15% 蛋黄粉 + 2% 盐。

1.2 药物

金花菜由扬中市绿野金花菜专业合作社统一提供, 经北京中医药大学民族医药实验室低温真空干燥, 超微粉碎成 100 目以上干粉, 低温干燥储存备用。奥利司他胶囊, 重庆植恩药业有限公司, 批号: 201311010532。

1.3 主要仪器及试剂

SL-200 型超微粉碎机, 神炼粉碎机厂; Glamour2000 全自动生化仪, 美国 MD 公司; Fresco 低温冷冻离心机, Thermo 公司; ABI7500 型荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; BA110S 型电子天平, 德国 Sartorius AG 公司; MultiSkan3 酶标仪, Thermo 公司; Western 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司。戊巴比妥 (批号 WS20060401) 购自国药集团化学试剂有限公司; 甘油三酯 (TG, 批号 136471)、低

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81102545); 黑龙江省自然科学基金 (D201263); 黑龙江中医药大学优秀创新人才资助计划

* 通讯作者: liuchangxi1963@vip.sina.com, (010) 64286989

密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C, 批号 140561)、总胆固醇 (TC, 批号 131571) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C, 批号 140541) 均购自中生北控生物科技股份有限公司; HRP 标记山羊抗兔 IgG (H + L, 批号 S004)、山羊抗小鼠 IgG (H + L, 批号 S001)、GAPDH 鼠单抗 (批号 DY042) 购自北京天德悦生物科技有限责任公司; 考马斯蓝染色法测蛋白试剂盒 (批号 20131102) 购自北京赛诺博生物技术中心; 超纯 RNA 提取试剂盒 (批号: CW0581)、HiFi-MMLVcDNA 第一链合成试剂盒 (批号: CW0744) 购自 CWbio. Co. Ltd.

1.4 动物分组及处理方法

71 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法分为空白对照组 (10 只) 与造模组 (61 只), 造模组大鼠采用高脂饲料喂养, 自由饮食、饮水, 空白对照组采用普通饲料喂养。于 9 周末, 以造模组体重高于普食组平均体重 20% 作为肥胖标准筛选模型成功大鼠^[9]。将 50 只造模成功大鼠按体重采用随机数字表法分为模型对照组、阳性对照组和金花菜高、中、低剂量组, 每组 10 只; 金花菜高、中、低剂量组分别给予金花菜混悬液 2、1、0.5 g/(kg · d) 灌胃; 阳性对照组给予奥利司他胶囊 35 mg/(kg · d) 灌胃; 空白对照组、模型对照组给予同体积 (15 ml/kg) 的蒸馏水灌胃, 连续 6 周。给药期间, 除空白对照组予以普通饲料外, 其余组均予高脂饲料喂养, 自由饮水、饮食。

1.5 观察指标及方法

末次给药后禁食 12 h, 3% 戊巴比妥 1 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 颈动脉取血, 离心得血清, -20℃ 保存备用; 取肝脏组织, 即刻存入液氮备用。

1.5.1 体重 于给药前后采用电子天平测定各组大鼠体重并计算总增重。

1.5.2 血清血脂检测 全自动生化分析仪检测大鼠血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平。

1.5.3 肝脏卵磷脂胆固醇脂酰转移酶 (LCAT)、胆固醇 7 α -羟化酶 (CYP7A1) 及过氧化物增殖激活物受体 α (PPAR α) mRNA 表达 用超纯 RNA 提取试剂盒提取组织样本中总 RNA。消化 RNA 并用 HiFi-MMLVcDNA 第一链合成试剂盒进行反转录。引物合成由北京普瑞华盛生物科技有限公司完成, CYP7A1: 上游 5'-ATGAAAGCAGCCTCT-GAAGAAGTGA-3', 下游 5'-CGTCCTCAAGATG-GAGAGTGAAGTC-3', 208bp; LCAT: 上游 5'-TG-GCAGGACTGGTAGAGGAGATGT-3', 下游 5'-GTG-

GCTGACGCAGTAAGAAATGGA-3', 108bp; PPAR α : 上游 5'-GGGACAAGGCCTCAGGATACCACTA-3', 下游 5'-GACATCCCGACGGACAGGCACT-3', 184bp; GAPDH: 上游 5'-TGGAGTCTACTGGCGTCTT-3', 下游 5'-TGTCATATTTCTCGTGGTTCA-3', 138bp。反应结束后的 cDNA 放置 -20℃ 保存。用 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪进行检测, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据的相对定量分析。

1.5.4 肝脏 PPAR α 、CYP7A1 及 LCAT 蛋白表达

采用 Western blot 法检测。样品加入蛋白裂解液提取总蛋白, 利用 BCA 法蛋白定量, 以 RIPA 调整蛋白浓度, 根据目的蛋白的分子量配制 12% 的分离胶, 待检测蛋白样品以 20 μ g/孔上样。经 SDS-PAGE 电泳后湿转法转膜。加一抗, 室温孵育 10 min, 放 4℃ 过夜。第二天从 4℃ 取出膜, 在室温孵育 30 min。TBST 洗膜 5 次, 每次 3 min。加入 HRP 标记的二抗 (1 : 20000) 室温轻摇 40 min。TBST 洗膜 6 次, 每次 3 min。ECL 加到膜上后反应 3 ~ 5 min, 后进行 X 光片曝光、显影, 定影后利用凝胶自动分析成像软件 (型号: ChemiDoc MP System, 美国 Bio-Rad 公司) 分析结果, 以 GAPDH 为内参照, 对蛋白条带进行分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计处理, 所有数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠给药前后体重及总增重比较

实验过程中高、中、低剂量组和阳性药组大鼠各死亡 1 只。表 1 示, 给药前后模型对照组体重高于空白对照组 ($P < 0.01$)。给药后, 与模型对照组比较, 各给药组大鼠体重及总增重明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 各给药组给药前后体重及总增重组间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 模型对照组的 TC、TG 和 LDL-C 明显升高, HDL-C 显著降低 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 金花菜高剂量组和阳性对照组 TC、TG 和 LDL-C 明显降低, HDL-C 显著升高 ($P < 0.01$), 金花菜中剂量组的 TC、LDL-C 降低, HDL-C 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。阳性对照组及金花菜高、中、低剂量组血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平组间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠给药前后体重及总增重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	给药前体重	给药后体重	总增重
空白对照组	10	378.08 ± 25.47	459.05 ± 36.28	80.97 ± 23.00
模型对照组	10	493.50 ± 31.33*	593.21 ± 51.34*	99.71 ± 35.37
金花菜高剂量组	9	493.20 ± 28.16	539.45 ± 29.98 ^{△△}	46.32 ± 34.15 ^{△△}
金花菜中剂量组	9	492.62 ± 27.76	540.62 ± 43.38 [△]	51.68 ± 20.26 ^{△△}
金花菜低剂量组	9	492.73 ± 27.38	539.94 ± 34.92 ^{△△}	49.03 ± 24.25 ^{△△}
阳性对照组	9	496.33 ± 34.91	549.94 ± 36.22 [△]	49.47 ± 22.74 ^{△△}

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 各组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TC	TG	LDL-C	HDL-C
空白对照组	10	1.04 ± 0.22	0.65 ± 0.24	0.48 ± 0.13	0.36 ± 0.08
模型对照组	10	1.30 ± 0.14*	1.08 ± 0.25*	0.67 ± 0.12*	0.23 ± 0.04*
金花菜高剂量组	9	1.07 ± 0.14 ^{△△}	0.66 ± 0.21 ^{△△}	0.52 ± 0.06 ^{△△}	0.34 ± 0.05 ^{△△}
金花菜中剂量组	9	1.11 ± 0.16 ^{△△}	0.80 ± 0.17	0.54 ± 0.16 [△]	0.31 ± 0.08 ^{△△}
金花菜低剂量组	9	1.24 ± 0.40	0.93 ± 0.26	0.56 ± 0.15	0.24 ± 0.09
阳性对照组	9	1.06 ± 0.14 ^{△△}	0.74 ± 0.15 ^{△△}	0.50 ± 0.12 ^{△△}	0.33 ± 0.05 ^{△△}

注: TC, 总胆固醇; TG, 甘油三酯; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C 高密度脂蛋白胆固醇; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 各组大鼠肝脏 PPAR α 、CYP7A1 及 LCAT mRNA 及蛋白表达比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	mRNA			蛋白		
		PPAR α	CYP7A1	LCAT	PPAR α	CYP7A1	LCAT
空白对照组	10	1.80 ± 0.72	20.16 ± 16.59	1.48 ± 0.42	0.02 ± 0.00	0.44 ± 0.01	0.29 ± 0.01
模型对照组	10	2.20 ± 0.92	33.10 ± 24.60	1.69 ± 0.45	0.18 ± 0.00**	0.62 ± 0.01**	0.36 ± 0.03*
金花菜高剂量组	9	1.82 ± 0.75	35.82 ± 30.28	1.15 ± 0.52	0.29 ± 0.01 ^{△△}	0.64 ± 0.02	0.41 ± 0.02
阳性对照组	9	1.45 ± 0.75	26.57 ± 10.06	0.85 ± 0.16 ^{△△}	0.06 ± 0.01 ^{△△#}	0.60 ± 0.01 [#]	0.30 ± 0.02 ^{△##}

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与金花菜高剂量组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.3 各组大鼠肝脏组织 PPAR α 、CYP7A1 及 LCAT mRNA 及蛋白表达比较

金花菜高、中、低剂量组之间减重降脂作用无明显差异, 不存在剂量依赖性, 因而测基因和蛋白表达只选取了金花菜高剂量组。表 3 示, 各组肝脏组织 PPAR α 和 CYP7A1 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型对照组比较, 阳性对照组 LCAT mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$)。与空白对照组比较, 模型对照组 PPAR α 和 CYP7A1、LCAT 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型对照组比较, 金花菜高剂量组 PPAR α 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 而阳性对照组 PPAR α 、LCAT 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与金花菜高剂量组比较, 阳性对照组各个蛋白表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

金花菜俗称黄花苜蓿、草头等^[4]。苜蓿入药在我国具有悠久的历史,《名医别录》将其列为菜部上品,言其“味苦,平,无毒,主安中,利人,

可久食”,《日华子本草》中记载可“去腹藏邪气,胃肠间热气,通小肠”。本实验结果显示,金花菜干预营养性肥胖模型大鼠体重增长明显减缓,血清 TC、TG 和 LDL-C 水平明显降低,血清 HDL-C 水平升高,提示金花菜具有控制营养性肥胖大鼠体重增长、减轻体重、改善血脂紊乱的作用,且与阳性对照组的减肥降脂作用无明显区别。

PPAR α 是核激素受体超家族成员之一,主要表达于肝脏和脂肪组织^[5]。在调节细胞脂质代谢和肥胖的过程中起重要作用^[6],是脂肪酸 β 氧化代谢中最重要的一种核转录因子^[7]。CYP7A1 是细胞色素 P450 家族成员之一,是合成初级胆汁酸的限速酶^[8]。LCAT 由肝脏合成,主要参与胆固醇逆转运^[9]。在接受大量的胆固醇酯后新生的高密度脂蛋白变为成熟的高密度脂蛋白,高密度脂蛋白与肝细胞膜的高密度脂蛋白受体结合,被肝细胞摄取,在此过程中胆固醇被用于合成胆汁酸或通过胆汁排出体外,使胆固醇在肝的代谢中被清除^[10]。本实验结果显示,金花菜高剂量组 PPAR α 蛋白表

达明显增高,提示其可能通过活化 PPAR α 蛋白表达,进而促进 TG 和脂肪酸的分解。本次实验中,各组肝脏组织 PPAR α 和 CYP7A1 mRNA 表达均无明显差异性,与相应蛋白表达不同步,我们推测其原因可能有以下几个方面:第一,被检测组织的转录和翻译发生的时间和位点存在时空间隔;第二,在转录后又会有转录后加工,转录产物的降解、翻译、翻译后加工及修饰多个层面,所以从转录水平和翻译水平并不完全一致,可能造成 mRNA 表达与蛋白表达的差异;第三,亦可能因为检测的时间点不同,在蛋白达到峰值的时候 mRNA 已经降解。具体原因有待进一步探讨。综上,金花菜对营养性肥胖大鼠具有减重降脂的作用其机制可能是通过激活 PPAR α 的表达有关,其作用通路及靶点尚在进一步研究中。

参考文献

- [1] 马伯艳,刘长喜,李雨庭,等. 淮扬金花菜(秧草)不同生长期苜蓿嫩芽干粉营养成分的分析与评价[J]. 营养学报,2015,37(1):102-104.
- [2] 杨晓姣,洪阁,刘天军. 高脂饮食对营养性肥胖大鼠模型建立的影响[J]. 武警后勤学院学报(医学版),2014,23(2):121-122.
- [3] 葛可佑. 肥胖的研究方法[M]. 北京:北京人民卫生出版社,2004:871-880.
- [4] 魏臻武,盖钧镒. 豆科模式植物:蒺藜苜蓿[J]. 草业学报,2008,17(1):114-120.
- [5] KOTA BP, HUANG TH, ROUFOGALIS BD. An overview on biological mechanisms of PPARs[J]. Pharmacol Res, 2005, 51(2):85-94.
- [6] KARAKAN T, KEREM M, CINDORUK M, et al. PPAR- α agonist treatment increases trefoil factor family-3 expression and attenuates apoptosis in the liver tissue of bile duct-ligated rats[J]. Turk J Gastroenterol, 2013,24(2):134-140.
- [7] 白阳,冯义朝. BSEP 的调控及其突变与胆汁淤积性肝病的关系[J]. 医学信息,2013,26(2):326-327.
- [8] HUBACEK JA, BOBKOVA D. Role of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in nutrigenetics and pharmacogenetics of cholesterol lowering[J]. Mol Diagn Ther, 2006, 10(2):93-100.
- [9] 赵仁宏,赵心童,贺圣文,等. 马齿苋脂肪油对动脉粥样硬化大鼠胆固醇逆向转运相关基因表达的影响[J]. 中国慢性病预防与控制,2013,23(1):12-14.
- [10] 陈玉霞,郭长江. 茶多酚降血脂作用及其机制研究进展[J]. 中国食品与营养,2006,4(4):47-49.

Impact of Jinhuacai [*Medicago polymorpha*] on Weight and Blood Lipid in Alimentary Obesity Rats MA Boyan¹, ZHANG Guangqing¹, LIU Changxi²

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150040; 2. Institute of Health Preserving Science, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the impact of *medicago polymorpha* on weight and blood fat of lipid in alimentary obesity rats and the possible mechanism. **Methods** SD rats were fed with high fat diet for 9 weeks to establish alimentary obesity models of rats. Fifty successfully modeled rats were randomized into model control group, positive control group, high, middle and low dose medicated group, 10 rats in each group. Ten normal and healthy rats were set as blank control group. The high, middle and low dose medicated groups were given *medicago polymorpha* suspension 2, 1, 0.5 g/(kg · d) respectively by gavage. The positive control group was given orlistat capsules 35 mg/(kg · d) by gavage. The blank control group and the model control group were given equivoluminal (15 ml/kg) distilled water by gavage for 6 weeks. Body weights were measured before and after treatment, and total weight increment was calculated. Levels of serum triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), total cholesterol (TC) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), as well as the expressions of liver lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT), cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), peroxide proliferation activated receptor α (PPAR α) mRNA and proteins were determined. **Results** Compared with the model control group, body weights and total weight increment after administration in each drug administration group decreased. TC, TG and LDL-C in the high dose medicated group and the positive control group decreased, while HDL-C increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After treatment, the difference of the expressions of liver tissue PPAR α and CYP7A1 mRNA in each group was not significant ($P > 0.05$). Compared with the model control group, the expression of PPAR α protein in the high dose medicated group increased. While the expressions of PPAR α and LCAT proteins in the positive control group decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *medicago polymorpha* might have effect of losing weight and decreasing blood lipid on alimentary obesity rats. The mechanism might relate to activating the expression of PPAR α protein.

Keywords alimentary obesity; *medicago polymorpha*; blood lipid; peroxide proliferation activated receptor α

(收稿日期: 2015-11-18; 修回日期: 2016-03-23)

编辑: 邓 媛