

化痰活血方拆方对高脂血症大鼠肝脏高密度脂蛋白受体基因表达的影响

闻 莉^{1*}, 刘松林¹, 叶 勇², 梅国强¹

(1. 湖北中医学院, 湖北 武汉 430061; 2. 江汉大学医学与生命科学学院, 湖北 武汉 430056)

[摘要] 目的: 拆方观察化痰活血方中化痰与活血药对高脂血症大鼠肝脏高密度脂蛋白受体(SR-B I)基因表达的影响, 从分子水平明确该方防治高脂血症的有效作用部位。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, 采用高脂饲料建立大鼠高脂血症模型。连续灌胃给药 30 d 后, 应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定各组大鼠肝脏 SR-B I mRNA 水平。结果: 模型组大鼠肝 SR-B I mRNA 表达明显低于空白组, 化痰活血全方组和化痰药组大鼠肝 SR-B I mRNA 水平明显高于模型组, 而活血药组和模型组无明显差异。结论: 化痰药是化痰活血方中促进高脂血症模型大鼠肝脏 SR-B I mRNA 水平表达的主要组分, 因而也是调节脂质代谢的主要作用部位。

[关键词] 高脂血症; 化痰活血方; 化痰药; 活血药; 高密度脂蛋白受体

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)07-0035-04

Influences of Divided Formula for Resolving Phlegm and Promoting Blood Circulation on the Expression of Scavenger Receptor, Class B Type I (SR-B I) in the Liver of the Hyperlipemia-modeled Rats

WEN Li^{1*}, LIU Song-lin¹, YE Yong², MEI Guo-qiang¹

(1. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430061, China;

2. The College of Medicine and Life Sciences of Jiangnan University, Hubei Wuhan 430056, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influences divided formula for resolving phlegm and promoting blood circulation on the expression of scavenger receptor, class B type I (SR-B I) in the liver of the hyperlipemia-modeled rats. **Methods:** 50 Wistar rats were divided randomly into 5 groups: blank group, model group, full formula group, group of taking drugs for resolving phlegm, and group of taking drugs for promoting blood circulation. The model was established by high fat feeding into stomach daily except the blank group. After 30 days RT-PCR was adopted to measure the level of SR-B I mRNA for each group. **Results:** The level of SR-B I mRNA of model group was apparently lower than that of blank group. Compared to that of the model, SR-B I mRNA of the full formula group and the group of taking drugs for resolving phlegm increased evidently, but there was no difference between model group and the group of taking drugs for promoting blood circulation for SR-B I mRNA. **Conclusion:** In the full formula, the drugs for resolving phlegm play the most important role in elevating the level of SR-B I mRNA in the liver of the hyperlipemia-modeled rats.

[Key words] Hyperlipemia; the formula for resolving phlegm and promoting blood circulation; drugs for resolving

[收稿日期] 2007-01-11

[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(20055003059-35)、湖北中医学院 2005 年科研立项课题(2005-11)

[通讯作者] * 闻莉, Tel: (027) 68889030; E-mail: wenlitem@yahoo.com.cn

phlegm; drugs for promoting blood circulation; scavenger receptor class B type I

SR-B I (Scavenger receptor, class B type I) 是在分子生物学基础上得到确认的第一个高密度脂蛋白受体,其介导胆固醇的选择性摄取。近年来许多研究发现 SR-BI 在促进 HDL 中游离胆固醇和胆固醇酯转运到肝脏的胆固醇逆向转运(RCT)过程中发挥着重要的生理作用。

化痰活血方具有健脾化痰清热、活血理气止痛之功效。为了进一步明确化痰活血方的调脂作用部位,本文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,进一步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 SR-BI 基因表达的影响,从分子水平上明确该方防治高脂血症的有效作用部位。

1 材料

1.1 实验动物 清洁级健康 Wistar 大鼠 50 只,雄性,体重(230±20)g,由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供,合格证号 TJLA-2005-152。

1.2 药物 化痰活血全方(由法半夏 10 g,全栝蒌 10 g,黄连 6 g,当归 10 g,红花 10 g,川芎 10 g,土鳖 10 g,茯苓 30 g 等 10 味药物组成)以及拆方分为化痰药(由法半夏 10 g,全栝蒌 10 g,黄连 6 g,茯苓 30 g 等 5 味药组成)和活血药(由当归 10 g,红花 10 g,川芎 10 g,土鳖 10 g 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 组药物分别采用水煎醇沉法制成溶液(全方组每 mL 溶液含 2 g 生药,化痰药组每 mL 溶液含 1.1 g 生药,活血药组每 mL 溶液含 0.9 g 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 主要仪器设备 Primus 96 Plus PCR 仪(德国 MWG Biotech 公司);Hoefler SE 600 垂直电泳系列(Hoefler 科学仪器公司);凝胶自动成相仪(美国 GDS 8000)。

2 方法

2.1 实验分组及造模 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 1w 后,除空白

组外,其余各组以高脂饲料(参照文献^[2]以 10% 胆固醇,10% 猪油,2% 胆酸钠,0.1% 丙基硫氧嘧啶,加基础饲料制备)喂养造模。

2.2 给药方法 大鼠造模的第 15 d,全方组、化痰药组、活血药组分别给予相应药物 10 mL/kg 灌胃,给药剂量按中药药理实验方法学^[3]计算,全方组剂量为原生药材 20 g/kg,化痰药组剂量为原生药材 11 g/kg,活血药组剂量为原生药材 9 g/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 d。给药期间各组均自由饮水,除空白组外,其余各组继续以高脂饲料喂养,共计 45 d。

2.3 取材 大鼠灌胃第 31 d,末次给药前禁食 12 h,给药 1 h 后,用 20% 乌拉坦 1 g/kg 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。

2.4 观察指标 采用酶法测定血清血脂(TC、TG、LDL-C、HDL-c)的含量。采用 RT-PCR 法检测 SR-BI mRNA,引物设计:在 GenBank 上查找 SR-BI 基因序列,用 Primer Primer5.0 软件设计引物,由北京奥科生物技术有限公司合成,以 3 磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参照。SR-BI 上游引物为 5'-GTTCCCTTCTACTTG-TCCGT-3';下游引物为 5'-CGTCCACTTATCCACCA-GAT-3';扩增的 cDNA 片段长度为 535 bp。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 309 bp。

检测方法: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:A260/A280=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 μPCR 反应产物,在 1% 琼脂糖凝胶(含 0.1 mg/L 溴化乙啶)中电泳,以 DL2000 为分子量标准,电泳缓冲液为 1×TAE,电泳完毕后,在凝胶自动成相仪上照像。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 SR-BImRNA 相对量。

SR-BImRNA 相对量=SR-BI 电泳带灰度值/
GAPDH 电泳带灰度值。

2.5 统计学处理 所有数据用 SPSS10.0 统计软件

处理, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 均数间用单因素方差分析。

3 结果

3.1 化痰活血方拆方对高脂血症大鼠血脂的影响

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、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, 化痰活血方全方组、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 $P < 0.01$)。化痰药组能显著降低高脂血症大鼠血清 TC、TG 水平, 升高 HDL-c 水平, 与活血组比较有显著性差异($P < 0.05$), 而在降低血清 LDL-c、升高血清 HDL₂-c 的作用上与活血组无明显差异。表明化痰活血方全方组、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。结果见表 1。

表 1 化痰活血方拆方对高脂血症大鼠血脂的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-c (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	HDL ₂ -c (mmol/L)
空白组	—	1.75 ± 0.34 ²⁾	1.66 ± 0.42 ²⁾	0.84 ± 0.13 ²⁾	1.04 ± 0.30 ²⁾	0.56 ± 0.10 ²⁾
模型组	—	5.52 ± 1.09	4.88 ± 0.90	2.09 ± 0.63	0.56 ± 0.15	0.27 ± 0.10
全方组	20	3.55 ± 0.65 ^{2,3)}	2.53 ± 0.83 ^{2,3)}	1.36 ± 0.34 ²⁾	0.98 ± 0.20 ^{2,3)}	0.48 ± 0.12 ²⁾
化痰药组	11	3.70 ± 0.67 ^{2,3)}	2.58 ± 0.68 ^{2,3)}	1.51 ± 0.33 ¹⁾	0.88 ± 0.13 ^{1,3)}	0.43 ± 0.12 ¹⁾
活血药组	9	4.58 ± 0.70 ¹⁾	3.55 ± 0.66 ²⁾	1.56 ± 0.56 ¹⁾	0.64 ± 0.12	0.37 ± 0.16

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与活血组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 化痰活血方拆方对高脂血症大鼠 SR-BI mRNA 表达的影响

各组大鼠肝脏 SR-BI mRNA 相对含量见表 2。

表 2 化痰活血方拆方对高脂血症大鼠肝组织 SR-BI mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	SR-BI mRNA
空白组	—	0.402 ± 0.085 ¹⁾
模型组	—	0.156 ± 0.046
全方组	20	0.338 ± 0.079 ¹⁾
化痰药组	11	0.242 ± 0.040 ^{1,3)}
活血药组	9	0.137 ± 0.042 ²⁾

注: 与模型组比较: ¹⁾ $P < 0.01$; 拆方组与全方组比较: ²⁾ $P < 0.01$; 化痰药组与活血药组比较: ³⁾ $P < 0.01$ 。

从表 2 可见, 模型组大鼠肝组织 SR-BI mRNA 的水平显著低于空白组($P < 0.01$); 化痰活血全方组和化痰药组的 SR-BI mRNA 水平显著高于模型组($P < 0.01$); 化痰药组与全方组比较, 无明显差异, 但与活血药组比较, 化痰药组显著高于活血药组($P < 0.01$)。说明化痰活血方中的化痰药可以显著上调高脂血症模型大鼠肝组织 SR-BI mRNA 的转录, 促进高脂血症模型大鼠肝组织 SR-BI 水平表达。而活血药则作用不明显。

4 讨论

HDL 在胆固醇逆向转运过程中起着重要作用,

它可将外周细胞胆固醇移出, 直接或间接地将胆固醇运回肝脏, 在此过程的起始步骤, 即 HDL 介导的细胞胆固醇外流以及终止步骤, 即肝细胞对 HDL-C 的选择性摄取中 SR-BI 都发挥了重要作用^[4,9]。

前期研究证实^[11], 化痰活血方具有较好的调脂作用, 能显著降低血清 TC、TG、LDL-c 水平, 升高 HDL-c 和 HDL₂-c 水平。本研究在此基础上, 观察化痰活血方中化痰药和活血药对 SR-BI 基因的表达, 从分子水平上明确该方防治高脂血症的有效作用部位。结果显示, 模型组大鼠肝组织 SR-BI mRNA 的水平显著低于空白组; 化痰活血全方组和化痰药组的 SR-BI mRNA 水平显著高于模型组; 化痰药组与全方组比较, 无明显差异, 但与活血药组比较, 有显著性差异, 化痰药组大鼠肝组织的 SR-BI mRNA 水平显著高于活血药组。说明化痰活血方中的化痰药可以显著上调高脂血症模型大鼠肝组织 SR-BI mRNA 的转录, 促进高脂血症模型大鼠肝组织 SR-BI 表达。化痰药是化痰活血方中促进高脂血症模型大鼠肝组织 SR-BI mRNA 表达, 调节 RCT 通路的主要组分, 因而也是调节脂质代谢的主要作用部位。活血药组则对高脂血症模型大鼠肝组织 SR-BI mRNA 表达的作用不明显, 其对 TC、TG 和 HDL-c 的调节作用也不如化痰药组, 因此, 活血药对血脂的调节作用可能是通过其他途径实现的, 其具体作用机制还有待于进一步研究。

本研究从分子水平探讨了化痰活血方拆方化痰药及活血药对高脂血症大鼠肝脏 SR-BI mRNA 表达的作用,结果表明化痰活血方上调高脂血症大鼠肝脏的 SR-BI mRNA 表达,促进胆固醇逆向转运过程是其改善高脂血症的重要分子机制之一,其中发挥作用的主要有效部位应当在化痰药中。

[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[J].时珍国医国药,2005,16(10):968-969.
- [2] 魏泓.医学实验动物学[M].成都:科学技术出版社,1998.86.
- [3] 徐叔云.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1991.1136.
- [4] Yang J, Bo J, Wang N, *et al.* Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol

efflux[J]. J Biol Chem, 1997, 272(34): 20982-20985.

- [5] Katherine TL, Ravindra KP, Attilio R, *et al.* Regulation of Scavenger receptor, class B type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rats[J]. J Clin Invest, 1996, 98(4): 984-995.
- [6] 王克勤.脂蛋白与动脉粥样硬化[M].北京:人民卫生出版社,1995.318-326.
- [7] Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, *et al.* Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor[J]. Science, 1996, 271: 518-520.
- [8] Karen FK, Mary HD, Attilio R, *et al.* Over expression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 414-417.
- [9] Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, *et al.* Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile[J]. J Biol Chem, 1999, 274(47): 33398-33402.