

· 药理 ·

双蒺调脂汤对高脂血症模型大鼠小肠组织 NPC1L1 及 ABCG8 表达的影响

李若绮¹, 石晶晶¹, 鲁海菲¹, 于露¹, 张风霞^{2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] **目的:**观察高脂血症模型大鼠小肠组织中尼曼-匹克 C1 型类蛋白 1(NPC1L1)及三磷酸腺苷结合盒转运体 G8(ABCG8)的表达水平,探讨双蒺调脂汤对高脂血症的治疗机制。**方法:**选取 40 只雄性 SD 大鼠,随机选取 8 只大鼠为正常组,其余 32 只建立高脂血症大鼠模型,造模成功后随机分为模型组(等量生理盐水),双蒺调脂汤高、低剂量组(15.6、7.8 g·kg⁻¹),辛伐他汀组(4 mg·kg⁻¹),共 4 组,每组 8 只,灌胃给药 8 周。生化法和酶法测定各组大鼠血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG)及肝脏总胆固醇(TTC),游离胆固醇(FTC)的含量;采用苏木素-伊红(HE)染色光镜下观察肝组织形态学的变化;运用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠小肠组织 NPC1L1,ABCG8 及肝 X 受体 α(LXR-α)表达水平;免疫组化法测定 ABCG8 蛋白表达的水平。**结果:**高脂血症大鼠模型复制成功。与正常组比较,模型组血脂水平明显增高,肝脏脂肪变性明显,NPC1L1,LXR-α 及 ABCG8 表达水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,双蒺调脂汤组血脂水平明显下降,NPC1L1 和 LXR-α 的表达明显下调,ABCG8 的表达明显上调,呈现一定的剂量依赖性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。免疫组化法检测结果显示,与正常组比较,模型组小肠中 ABCG8 蛋白表达水平升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 ABCG8 蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中双蒺调脂汤高剂量组效果最为显著($P < 0.05$)。**结论:**双蒺调脂汤通过减少胆固醇的吸收来降低高脂血症模型大鼠的血脂水平,其机制可能与下调 NPC1L1 的表达,上调 ABCG8 的表达有关。

[关键词] 双蒺调脂汤;健脾化浊法;高脂血症;尼曼-匹克 C1 型类蛋白 1(NPC1L1);肝 X 受体-α(LXR-α);三磷酸腺苷结合盒转运体 G8(ABCG8)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0077-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191402

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190403.1503.009.html>

[网络出版时间] 2019-04-04 16:52

Effect of Shuangyu Tiaozi Decoction on NPC1L1 and ABCG8 in Intestine of Hyperlipemic Model Rats

LI Ruo-qi¹, SHI Jing-jing¹, LU Hai-fei¹, YU Lu¹, ZHANG Feng-xia^{2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression levels of niemann-pick C1-like 1(NPC1L1) and adenosine triphosphate-binding cassette transporters G8(ABCG8) in intestine of hyperlipidemic model rats, in order to investigate the therapeutic mechanism of Shuangyu Tiaozi decoction on hyperlipidemia. **Method:** A total of 40 SD rats were selected, including 8 for normal control group. The remaining 32 rats were used to establish hyperlipemic model. After modeling, the rats were randomly divided into the model group (equivalent normal

[收稿日期] 20181228(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573945);王新陆全国名中医工作室项目(鲁财社指[2016]47号);山东省科技计划项目(2013GSF11902);山东省中医药科技发展项目(2013-081)

[第一作者] 李若绮,在读硕士,从事心脑血管及代谢疾病的研究,E-mail:18364166064@163.com

[通信作者] *张风霞,博士,副主任,硕士生导师,从事心脑血管及代谢疾病的研究,E-mail:fxzhang0987@163.com

saline), the high and low-dose Shuangyu Tiaozhi groups ($15.6, 7.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and the Simvastatin group ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 8 in each group. They were given drugs by gavage for 8 weeks. The levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG) in serum and total cholesterol (TTC), free cholesterol (FTC) in liver of rats in each group were determined by biochemical and enzymatic methods. The morphological changes of liver were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the levels of expressions of NPC1L1, ABCG8 and liver X receptor- α (LXR- α) in intestine were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. The expression of ABCG8 protein was determined by immunohistochemistry. **Result:** After successful replication of the hyperlipidemia model, the blood lipid level was abnormally increased, and the liver steatosis became obvious in the model group compared with the normal control group. The expression levels of NPC1L1, LXR- α and ABCG8 increased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with the model group, the blood lipid levels were significantly reduced in the Shuangyu Tiaozhi decoction group. The expressions of NPC1L1 and LXR- α were significantly down-regulated, but ABCG8 was obviously up-regulated in a dose-dependent manner ($P < 0.05, P < 0.01$). The results of immunohistochemistry indicated that the protein expression of ABCG8 in intestine of the model group increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of ABCG8 in each drug-administered groups increased obviously ($P < 0.05, P < 0.01$), especially in high-dose Shuangyu Tiaozhi group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shuangyu Tiaozhi decoction can reduce the blood lipid level of hyperlipemic rat model by reducing the absorption of cholesterol. Its mechanism may be correlated with the down-regulation of NPC1L1 expression and the up-regulation of ABCG8 expression.

[**Key words**] Shuangyu Tiaozhi decoction; spleen tonifying turbid method; hyperlipidemia; niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1); liver X receptor- α (LXR- α); adenosine triphosphate-binding cassette transporters G8 (ABCG8)

心血管疾病是引起世界人口死亡率升高的重要原因之一,研究表明,发展中国家心血管疾病的死亡率明显高于发达国家^[1],而高脂血症是诱发心血管疾病的独立危险因素之一^[2],因此研究高脂血症的发病机制和防治措施具有极其重要的科研价值。高脂血症是由于体内胆固醇合成和吸收增多而使血脂水平异常增高导致的代谢性疾病。脂质代谢是多基因严密调控的复杂过程,尼曼-匹克 C1 型类蛋白 1 (NPC1L1)是肠道胆固醇吸收的关键蛋白,具有与胆固醇特异性结合的 N-末端结构域(NTD)^[3],能够感知并结合胆固醇通过细胞的内吞作用将其运至胞内^[4]。然而与 NPC1L1 作用相反的三磷酸腺苷结合盒转运体 G8 (ABCG8)被激活后形成二聚体能够将胆固醇从小肠细胞运输回肠腔,ABCG8 在胆固醇吸收过程中起着至关重要的作用^[5]。肝 X 受体 α (LXR- α)通过调节 NPC1L1 和 ABCG8 的表达来参与胆固醇的吸收调节^[6]。所以,干预相关通路蛋白表达、进而减少胆固醇吸收是治疗高脂血症的研究热点。

目前临床上常用的降脂药以他汀类为主,虽然降脂疗效确切,但长期用药出现的胃肠不适、横纹肌溶解、肝肾损伤等副作用大大的限制了临床应

用^[7-8],而中医药的多靶点、整体调节、副作用少等优势成为近年来研究热点^[9-11]。课题组在 10 余年临床研究中提出健脾化浊是治疗高脂血症的基本治疗原则,并从经典健脾化浊法有效中药复方化浊行血汤中提炼出双赭调脂汤^[12-13],该汤由山药和萹薹组成,两者一补一泻,共奏补气健脾、祛湿化浊之功效^[14]。前期临床试验发现双赭调脂汤能显著降低高脂血症患者血清中胆固醇(TC),甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的水平^[15],降脂疗效确切,但其降脂机制尚不明确。本研究旨在用双赭调脂汤干预高脂血症模型大鼠,通过观察其对 NPC1L1 和 ABCG8 信号通路的影响为预防和治疗高脂血症提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 40 只 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180 ~ 200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2012-0001,于山东中医药大学 SPF 级动物实验中心饲养,大鼠在温度为 $(23 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度为 40% ~ 60%,光照为 12 h/12 h 明暗交替循环的环境中饲养,自由饮食饮水。高脂饲料购自于北京科澳协力饲料有限公司,饲料中含有 2% 胆固醇,4.5% 粗脂肪,0.3% 胆酸

钠,其余为基础饲料。本动物实验已获得山东中医药大学动物伦理委员会批准,编号 SDUTCM20180110002。

1.2 药物与试剂 双赭调脂汤由山药 60 g 和菝葜 18 g 组成,药材购自于山东中医药大学附属医院药房,经山东中医药大学药学院冯莉教授鉴定均为正品。上述药物采用传统水煎法制备成浓度为 1 mL 含 1.56 g 生药的双赭调脂汤水煎液备用。辛伐他汀(北京默沙东制药有限公司,批号 35508);总胆固醇(TTC)酶法测定试剂盒,游离胆固醇(FTC)酶法测定试剂盒(北京普利莱有限公司,批号分别为 E1015, E1016);All-In-One RT Master Mix 反转录试剂盒(南京 Absci 公司,批号 AB490);PCR 试剂盒(上海 DBI Bioscience 公司,批号 DBI-2043);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0010S);NPC1L1 鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-166802);LXR- α 鼠单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab41902);ABCG8 兔多克隆抗体(北京博奥森公司,批号 bs-10149R); β -肌动蛋白(β -actin)鼠单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 66009-1-Ig);辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG,DAB 显色试剂盒,免疫组化通用法二步检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 ZB-2305, ZB-2301, ZLI-9017, PV-9000);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号 C02-04004)。

1.3 仪器 Axio Observer 型荧光倒置显微镜(德国蔡司公司);Power Pac 型电泳仪,Trans-Blot Turbo System 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Light Cycler 480 II/96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士罗氏公司);Fluor Chem Q 型 Protein simple 数字成像系统(美国普诺森生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 大鼠适应性喂养 1 周后,按随机数字表法选取 8 只大鼠作为正常组,剩余 32 只大鼠为模型组,正常组饲以普通饲料,模型组给予高脂饲料喂养 4 周。4 周后颈静脉采血检测血脂,造模成功后仍给予高脂饲料喂养^[16-17],并按随机数字表法将大鼠分为模型组,双赭调脂汤高、低剂量组,辛伐他汀组。按人与大鼠间等效剂量换算法计算出大鼠每日服用的剂量应为 $7.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。双赭调脂汤高、低剂量组分别用药为每日 $15.6, 7.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,辛

伐他汀组每日给予辛伐他汀 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,正常组与模型组给予等量生理盐水。每组 8 只大鼠每日灌胃给药,连续给药 8 周。

2.2 取材 末次给药后大鼠禁食不禁水 12 h,腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉,腹主动脉取血后室温静置 30 ~ 60 min, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血清,将血清储存在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 以便进一步的生化检测。取每只大鼠肝脏同一部位,一部分用于进一步 TTC 和 FTC 检测,另一部分放于 10% 多聚甲醛中固定 12 ~ 24 h 用于 HE 染色,取每只大鼠近十二指肠端小肠组织,一份于冻存管中储存在 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 用于蛋白免疫印迹法(Western blot)测定,一份于 trizol 中储存在 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 用于 Real-time PCR 测定,另一份于 10% 多聚甲醛固定 12 ~ 24 h 用于免疫组化检测。

2.3 指标检测

2.3.1 血生化检测 TC, TG 以及酶法测定 TTC 和 FTC 全自动生化分析仪酶法检测各组大鼠血清中 TC 和 TG 的含量,将肝组织 50 mg 在预冷的含 1% 蛋白酶抑制剂(PMSF)的 RIPA 裂解液(RIPA 500 μL 加 PMSF 5 μL)中快速匀浆,肝脏匀浆质量浓度为 $0.099 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清,按照试剂盒说明书对肝脏中 TTC 与 FTC 的含量进行测定。

2.3.2 HE 染色法观察肝脏组织形态学变化 取材固定后进行石蜡包埋、切片,肝组织常规 HE 染色,在光学显微镜下观察其病理改变。

2.3.3 Real-time PCR 检测大鼠小肠中 NPC1L1, LXR- α 和 ABCG8 mRNA 的表达 使用 trizol 法提取组织总 RNA,小肠组织 50 mg 在 trizol 1 mL 中匀浆,检测 RNA 的纯度及浓度,吸光度 $A_{260/280}$ 在 1.8 ~ 2.2 为纯度合格,按照反转录试剂盒说明进行 cDNA 的反转录反应,以甘油醛-3 磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,引物由上海铂尚生物技术有限公司合成,按照 20 μL 的体系进行扩增,反应条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 s; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 10 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 s, 扩增 45 个循环; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 60 s, $97 \text{ }^\circ\text{C}$ 酶瞬间灭活; $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷却 30 s。对 NPC1L1, LXR- α 和 ABCG8 进行定量分析,每个样本检测 3 个复孔。所有数据处理均采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析。基因引物序列见表 1。

2.3.4 Western blot 检测大鼠小肠中 NPC1L1, LXR- α 和 ABCG8 蛋白表达 采用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液提取总蛋白,按照 BCA 法测定蛋白浓度。以 4:1 将样品与蛋白上样缓冲液混匀, $100 \text{ }^\circ\text{C}$

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

| 引物 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|---------------|-------------------------|-------|
| NPC1L1 | 上游 TGACAAAGTTCAGGTTGCGT | 96 |
| | 下游 TAGCTGACGGCAAAGACAGG | |
| LXR- α | 上游 AGATCGCCTTGCTGAAGACC | 82 |
| | 下游 ATGCTCTCACTCCGAGGGTT | |
| ABCG8 | 上游 GGACTCAAAGTGCCTAGCTC | 184 |
| | 下游 GCTGCTCGGAGGCTTGAA | |
| GAPDH | 上游 TCTCTGCTCCTCCCTGTCT | 95 |
| | 下游 ATCCGTTACACCGACCTTC | |

水浴加热 8 min 变性。上样 80 μ g 蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜到 PVDF 膜上。室温 5% 脱脂奶粉摇床封闭 1 h, 加入 NPC1L1 一抗(1:200), LXR- α 一抗(1:1 000), ABCG8 一抗(1:1 000), β -actin 内参(1:5 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min。二抗(1:1 万)室温摇床孵育 1 h, TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min, 然后进行 ECL 显色曝光摄图并进行灰度值测量, 以目的蛋白与 β -actin 比值来评估蛋白表达水平。

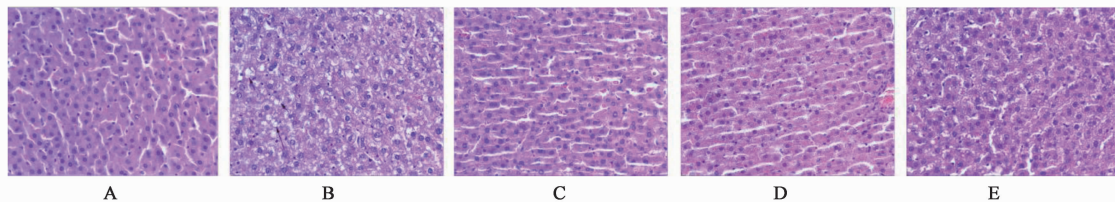
2.3.5 免疫组化检测 ABCG8 蛋白表达 取材固定后进行石蜡包埋、切片, 脱蜡并用高压锅法修复抗原, 按照免疫组化通用二步法检测试剂盒说明来

封闭, 并滴加 ABCG8 一抗(1:400) 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后依次滴加试剂盒中反应增强液和增强酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物室温湿盒中孵育 30 min, DAB 显色, 镜下控制反应时间, 以棕黄色阳性产物为度。苏木素复染, 脱水透明, 中性树脂封片, 显微镜下观察照相。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行统计分析, 计量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 如满足正态性检验和方差齐性, 则用 One-way ANOVA 分析, 组间比较采用 LSD-*t* 法检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对高脂血症大鼠肝组织病理学的影响 肉眼观察正常组肝脏颜色暗红, 体积正常, 包膜光滑; 模型组肝脏颜色淡黄, 体积明显变大, 包膜紧张。镜下显示, 正常组肝小叶结构完整清晰, 肝细胞索呈规则排列, 未见脂肪变性及炎细胞浸润; 与正常组比较, 模型组肝脏观察到广泛大小不等的脂肪滴, 部分肝细胞核被挤压而明显偏位, 脂质沉积明显, 有明显的肝细胞脂肪变性; 与模型组比较, 各药物组肝脏损伤程度减轻, 肝细胞结构较为完整清晰, 脂肪空泡数量也不同程度的减少, 尤以双蕢调脂汤高剂量组效果最显著。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 双蕢调脂汤高剂量组; D. 双蕢调脂汤低剂量组; E. 辛伐他汀组(图 2~3 同)

图 1 双蕢调脂汤对高脂血症大鼠肝组织病理学的影响(HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Shuangyu Tiaozi decoction on liver histopathology of rats with hyperlipidemia (HE, $\times 400$)

3.2 对高脂血症大鼠血清和肝脏的相关指标的影响 与正常组比较, 模型组大鼠 TC, TG, TTC 和 FTC 含量显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 给药后双蕢调脂汤高、低剂量组、辛伐他汀组 TC, TG, TTC 和

FTC 含量均降低, 其中双蕢调脂汤高剂量组降低效果最显著($P < 0.01$), 双蕢调脂汤低剂量组和辛伐他汀虽能降低 TC, TG, TTC 和 FTC 含量, 但差异不显著。见表 2。

表 2 双蕢调脂汤对高脂血症大鼠血清中 TC 和 TG 以及肝脏中 TTC 和 FTC 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Shuangyu Tiaozi decoction on TC and TG in serum and TTC and FTC in liver of rats with hyperlipidemia($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | TC/ $mmol \cdot L^{-1}$ | TG/ $mmol \cdot L^{-1}$ | TTC/ $\mu mol \cdot g^{-1}$ | FTC/ $\mu mol \cdot g^{-1}$ |
|-------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 正常 | - | 1.37 \pm 0.10 | 0.28 \pm 0.08 | 8.14 \pm 0.24 | 17.23 \pm 1.70 |
| 模型 | - | 1.83 \pm 0.41 ²⁾ | 1.24 \pm 0.29 ²⁾ | 161.05 \pm 22.23 ²⁾ | 86.52 \pm 3.85 ²⁾ |
| 双蕢调脂汤 | 15.6 | 1.40 \pm 0.24 ⁴⁾ | 0.51 \pm 0.22 ⁴⁾ | 58.75 \pm 9.76 ⁴⁾ | 56.23 \pm 3.66 ⁴⁾ |
| | 7.8 | 1.59 \pm 0.25 | 0.45 \pm 0.18 ⁴⁾ | 103.04 \pm 4.34 ^{4,6)} | 56.37 \pm 4.41 ⁴⁾ |
| 辛伐他汀 | 4 $\times 10^{-3}$ | 1.59 \pm 0.27 | 0.60 \pm 0.13 ⁴⁾ | 38.12 \pm 13.29 ⁴⁾ | 78.45 \pm 6.57 ⁴⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与双蕢调脂汤高剂量组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 3~5 同)。

3.3 对高脂血症大鼠小肠 NPC1L1, LXR- α 及 ABCG8 mRNA 的影响 与正常组比较,模型组小肠组织的 NPC1L1, LXR- α , ABCG8 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,双赭调脂汤组和辛伐他汀组 NPC1L1, LXR- α mRNA 水平明显下降,

ABCG8 mRNA 水平含量明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),与双赭调脂汤低剂量组比较,双赭调脂汤高剂量组 NPC1L1, LXR- α mRNA 的含量低于低剂量组,ABCG8 mRNA 的含量高于低剂量组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 双赭调脂汤对高脂血症大鼠小肠 NPC1L1, LXR- α , ABCG8 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Shuangyu Tiaozhi decoction on mRNA expressions of NPC1L1, LXR- α , ABCG8 in intestine of rats with hyperlipidemia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | NPC1L1/GAPDH | LXR- α /GAPDH | ABCG8/GAPDH |
|-------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 正常 | - | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 模型 | - | 1.89 \pm 0.14 ²⁾ | 1.91 \pm 0.26 ²⁾ | 1.85 \pm 0.53 ²⁾ |
| 双赭调脂汤 | 15.6 | 1.13 \pm 0.33 ³⁾ | 1.30 \pm 0.19 ³⁾ | 5.37 \pm 0.99 ⁴⁾ |
| | 7.8 | 1.72 \pm 0.51 ⁵⁾ | 1.41 \pm 0.37 ³⁾ | 3.67 \pm 1.32 ^{3,5)} |
| 辛伐他汀 | 4 \times 10 ⁻³ | 1.46 \pm 0.19 | 1.70 \pm 0.21 | 3.05 \pm 0.47 ⁶⁾ |

3.4 对高脂血症大鼠小肠中 NPC1L1, LXR- α , ABCG8 蛋白的影响 与正常组比较,模型组大鼠 NPC1L1, LXR- α 蛋白表达均明显增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,双赭调脂汤高剂量组和辛伐他汀组能够显著下调 NPC1L1, LXR- α 蛋白的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$),上调 ABCG8 蛋白的表达 ($P < 0.05$);与双赭调脂汤低剂量组比较,双赭调脂汤高剂量组的 NPC1L1, LXR- α 蛋白表达明显低于双赭调脂汤低剂量组和辛伐他汀组,ABCG8 的蛋白含量明显高于双赭调脂汤低剂量组和辛伐他汀组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

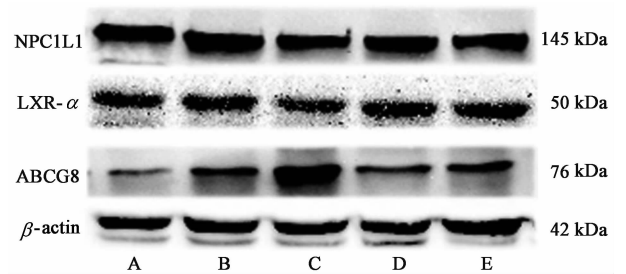


图 2 大鼠小肠 NPC1L1, LXR- α , ABCG8 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of protein expressions of NPC1L1, LXR- α , ABCG8 in intestine of rats

表 4 双赭调脂汤对高脂血症大鼠小肠 NPC1L1, LXR- α , ABCG8 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Shuangyu Tiaozhi decoction on protein expressions of NPC1L1, LXR- α , ABCG8 in intestine of rats with hyperlipidemia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | NPC1L1/ β -actin | LXR- α / β -actin | ABCG8/ β -actin |
|-------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 正常 | - | 0.70 \pm 0.18 | 0.57 \pm 0.08 | 2.29 \pm 0.31 |
| 模型 | - | 1.17 \pm 0.19 ¹⁾ | 1.02 \pm 0.27 ¹⁾ | 3.95 \pm 1.75 |
| 双赭调脂汤 | 15.6 | 0.72 \pm 0.17 ³⁾ | 0.66 \pm 0.03 ³⁾ | 6.74 \pm 1.79 ³⁾ |
| | 7.8 | 0.88 \pm 0.21 | 0.74 \pm 0.28 | 4.12 \pm 1.38 ⁵⁾ |
| 辛伐他汀 | 4 \times 10 ⁻³ | 0.67 \pm 0.16 ⁴⁾ | 0.66 \pm 0.13 ³⁾ | 2.25 \pm 0.99 ⁶⁾ |

3.5 对高脂血症大鼠小肠 ABCG8 蛋白的影响 与正常组比较,模型组大鼠小肠细胞 ABCG8 棕褐色较深,蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,双赭调脂汤高、低剂组和辛伐他汀组棕褐色明显变深 ($P < 0.05, P < 0.01$),其中双赭调脂汤高剂量组蛋白表达量最高 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 5。

4 讨论

随着生活水平的提高,高热量高脂肪的饮食、缺乏运动等不良饮食及生活习惯造成高脂血症患者

人数的日趋增长。虽然中医典籍中无“高脂血症”之名与之对应,但临床观察到高脂血症以脘痞腹胀、倦怠乏力、肥胖懒言为常见表现,祖国医学认为,脾主升清降浊,若脾气亏虚,则运化失司,湿浊内蕴为病,故本病之本在脾虚,标在湿浊。因此在治疗上应补气健脾、祛湿化浊。双赭调脂汤方中山药性平、味甘,有健脾除湿、补肺益气等功效,萆薢性平、味苦,有祛湿化浊之功效,二者合用一补一泻,标本兼治,从而化浊降脂。现代药理学研究表明,

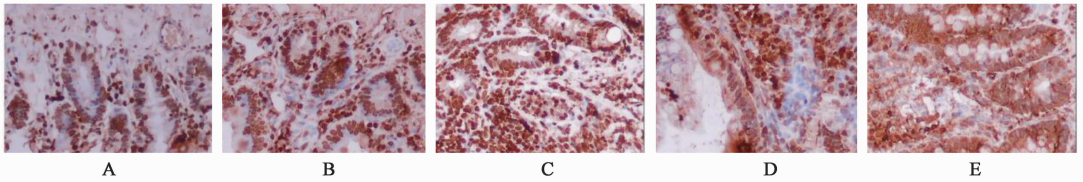


图 3 双赭调脂汤对大鼠小肠 ABCG8 蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig.3 Effect of Shuangyu Tiaozi decoction on protein expressions of ABCG8 in intestine of rats with hyperlipidemia(IHC, ×200)

表 5 双赭调脂汤对大鼠小肠 ABCG8 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Shuangyu Tiaozi decoction on protein expressions of ABCG8 in intestine of rats with hyperlipidemia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | ABCG8 |
|-------|-----------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | 0.29 ± 0.01 |
| 模型 | - | 0.36 ± 0.01 ²⁾ |
| 双赭调脂汤 | 15.6 | 0.41 ± 0.02 ³⁾ |
| | 7.8 | 0.31 ± 0.02 ^{4,6)} |
| 辛伐他汀 | 4 × 10 ⁻³ | 0.32 ± 0.02 ⁴⁾ |

山药的有效成分是薯蓣皂苷元^[18],薯蓣皂苷元具有降血脂、抗肿瘤、改善心血管功能等多种药理作用^[19-21],高脂血症与血浆中 TC, TG 及肝细胞中 TTC, FTC 呈正相关,前期临床研究发现双赭调脂汤能够降低高脂血症患者血清中 TC, TG, LDL-C 水平^[15]。本实验研究结果显示,低剂量双赭调脂汤的干预就表现出降低高脂血症大鼠血清中 TC, TG 及肝细胞中 TTC, FTC 的作用,高剂量双赭调脂汤则能显著降低血脂水平,明显改善肝脏的脂肪变性,这说明双赭调脂汤能够通过改善脂质代谢,预防和治疗高脂血症。

小肠是体内胆固醇吸收的最主要场所^[22]。在肠腔内,NPC1L1 位于小肠细胞的刷状缘膜上,是胆固醇的内流转运体。混合胶束将大量的胆固醇分子运输到细胞表面,NPC1L1 通过囊泡的内吞作用将胆固醇转运到细胞内^[23]。因此,下调 NPC1L1 表达对治疗高脂血症尤为重要。有文献证明 NPC1L1 基因敲除的小鼠胆固醇吸收率下降了 90%^[24]。与之功能相反,ABCG8 与 ABCG5 能限制胆固醇在小肠中的吸收,是胆固醇的外流转运体。由于 ABCG 半转运体仅包括一个核苷酸结合区和一个跨膜区,二者必须形成二聚体才能够将胆固醇从小肠细胞外流到肠腔中,从而减少体内胆固醇水平,NPC1L1 和 ABCG8 的联合调节能够维持体内胆固醇的稳态。研究发现 NPC1L1 基因还受核受体 LXR-α 的调控^[25],LXR-α 是氧化型固醇激活的核受体之一,当

体内氧化胆固醇增多,被激活的 LXR-α 能够下调 NPC1L1 从而减少胆固醇的吸收。此外,有研究表明 ABCG8 同样也受 LXR-α 的调节^[26],YU 等^[27]发现 LXR-α 能够增加 ABCG5/G8 的表达在饮食胆固醇的代谢方面。因此本文以 NPC1L1 和 ABCG8 为切入点,探讨双赭调脂汤可能改善高脂血症大鼠脂代谢的作用机制。

本实验研究采用双赭调脂汤高、低剂量和辛伐他汀作用于高脂饮食诱导的高脂血症大鼠模型,观察了双赭调脂汤与辛伐他汀对胆固醇吸收相关通路指标的影响,笔者发现模型组的 NPC1L1, LXR-α, ABCG8 mRNA 和蛋白的表达异常升高。而双赭调脂汤和辛伐他汀均能够显著下调小肠中 NPC1L1, LXR-α mRNA 和蛋白的表达,上调 ABCG8 mRNA 和蛋白的表达,尤其是双赭调脂汤高剂量组。这与双赭调脂汤组和辛伐他汀组大鼠体内血脂水平降低相一致,表明双赭调脂汤可能通过下调 NPC1L1 和 LXR-α,上调 ABCG8 而抑制胆固醇的吸收来治疗高脂血症。然而,笔者发现双赭调脂汤并不能通过抑制 LXR-α 的表达来下调 NPC1L1,有研究表明 LXR-α/SREBP-1c 通路是经典的脂肪生成通路^[28],固醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c) 是脂肪细胞分化的决定因子,当 LXR-α 被激活时,可以调控 SREBP-1c 的转录,导致脂肪合成量骤增,从而引发脂质堆积^[29],因此笔者推断双赭调脂汤能够减少 LXR-α 的表达来避免脂肪生成的副作用,同时直接抑制 NPC1L1 来减少胆固醇的吸收从而治疗高脂血症。

综上所述,本研究发现双赭调脂汤能够降低高脂血症模型大鼠的胆固醇的水平,改善肝脏脂肪变性,这一作用可能与减少胆固醇的吸收有关,且推测其机制为通过下调 NPC1L1 和 LXR-α 表达,上调 ABCG8 表达。但对于双赭调脂汤可能存在的其他调节脂质代谢的机制及其有效成分尚未完全明确,今后将针对其他降脂机制进行进一步的深入探讨,为其临床应用提供可靠的理论依据。

[参考文献]

- [1] Lopez A D, Mathers C D, Ezzati M, et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001; systematic analysis of population health data [J]. *Lancet*, 2006, 367(9524):1747-1757.
- [2] 冯利民,李立凤,杜武勋,等.高脂血症基本病机与证型规律研究进展[J].*时珍国医国药*, 2012, 23(12):3101-3103.
- [3] Kamishikiryo J, Haraguchi M, Nakashima S, et al. N-terminal domain of the cholesterol transporter Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) is essential for α -tocopherol transport[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(2):476-480.
- [4] Nihei W, Nagafuku M, Hayamizu H, et al. NPC1L1-dependent intestinal cholesterol absorption requires ganglioside GM3 in membrane microdomains[J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(11):2181-2187.
- [5] YU X H, QIAN K, JIANG N, et al. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2014, 428(2):82-88.
- [6] Bonamassa B, Moschetta A. Atherosclerosis: lessons from LXR and the intestine [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2013, 24(3):120-128.
- [7] 姜春玲,原隼.他汀类药物的副作用与临床观察[J].*中国实用医药*, 2016, 11(1):193-194.
- [8] 孙吉叶.治疗高脂血症的新药研究进展[J].*现代药物与临床*, 2012, 27(5):435-441.
- [9] 徐凤,肖韩艳,周淑芬,等.柴朴汤对哮喘模型大鼠气道炎症及 ERK/p38 MAPK 信号通路的影响[J].*中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2):104-109.
- [10] 韦乃球,郝二伟,洗寒梅,等.白子菜对 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用的分子机制[J].*中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2):110-115.
- [11] 赵梓邯,张琳,李文斌,等.中药毒性与安全性评价研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20):208-216.
- [12] 席加秋,王中琳.化浊行血汤治疗高脂血症 30 例临床研究 [J]. *山东中医药大学学报*, 2017, 41(4):338-340.
- [13] 张风霞,张铭,孙西庆,等.化浊行血汤治疗 2 型糖尿病 40 例[J].*河南中医*, 2013, 33(11):1919-1920.
- [14] 张珊,尹立祥,王爱迪,等.穿龙薯蓣皂苷对再生障碍性贫血小鼠 PPAR γ , C/EBP α 及脂肪分泌因子表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(5):126-134.
- [15] 张风霞,王新陆,高聆,等.双藜调脂汤治疗高脂血症 118 例[J].*山东中医杂志*, 2013, 32(2):91-92.
- [16] 刁婷婷,闵清.高脂血症动物模型研究进展[J].*湖北科技学院学报:医学版*, 2018, 32(6):541-545.
- [17] 赵媛媛,覃骊兰,郝二伟.高脂血症动物模型研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(18):215-221.
- [18] 邵礼梅,许世伟.山药化学成分及现代药理研究进展[J].*中医药学报*, 2017, 45(2):125-127.
- [19] 刘梦莹,张风霞,荀丽英,等.薯蓣皂苷元降血脂作用及其机制研究进展[J].*中华中医药学刊*, 2016, 34(4):798-800.
- [20] 苏瑾,王丹,胡孟洋,等.山药总多糖脂质体的制备及表征[J].*中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(16):18-21.
- [21] Mckoy M L, Thomas P G, Asemota H, et al. Effects of Jamaican Bitter Yam (*Dioscorea polygonoides*) and diosgenin on blood and fecal cholesterol in rats [J]. *J Med Food*, 2014, 17(11):1183-1188.
- [22] Losacco M C, de Almeida C F T, Hijo A H T, et al. High-fat diet affects gut nutrients transporters in hypo and hyperthyroid mice by PPAR- α independent mechanism [J]. *Life Sci*, 2018, 202:35-43.
- [23] WANG H, Garruti G, LIU M. Cholesterol and lipoprotein metabolism and atherosclerosis recent advances in reverse cholesterol transport [J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(1):s27-s42.
- [24] Davis H R, ZHU L J, Hoos L M, et al. Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(32):33586-33592.
- [25] Duval C, Touche V, Tailleux A, et al. Niemann-pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340:1259-1263.
- [26] Bonamassa B, Moschetta A. Atherosclerosis: lessons from LXR and the intestine [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2013, 24:120-128.
- [27] YU L, Lihawkins J, Hammer R E, et al. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(5):671-680.
- [28] 杨丽丽,王淼,柳涛,等.降脂颗粒对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝 X 受体 α 和固醇调节元件结合蛋白 1c 表达的影响 [J]. *结合医学学报:英文版*, 2011, 9(9):998-1004.
- [29] 赵敏,徐安莉,陈会敏,等.右归丸对肾虚高脂血症大鼠 JAK/STATs 通路的实验探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(21):108-112.

[责任编辑 周冰冰]