

油酰乙醇胺对高脂血症大鼠降血脂及肝脏的保护作用

陈 博, 沈燕慧, 卢 伟, 朱 浩, 孙丽娟, 唐杨顺, 赵 云, 田 风, 金 鑫

(厦门大学 医学院, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 观察油酰乙醇胺(OEA)对高脂血症模型大鼠降血脂及肝脏保护作用。方法 高脂饮食建立高脂血症大鼠模型,分别观察 OEA(10 20 30 mg/kg)对高脂血症大鼠的血清胆固醇(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)、谷丙转氨酶(ALT)、肝重和肝脏系数、肝脏丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的影响。制作冰冻切片观察大鼠肝脏脂质变性程度。结果 与模型组相比,OEA(20 30 mg/kg)具有降血脂作用,同时降低血清 ALT、肝脏脂质、肝重和肝脏系数、肝脏 MDA 水平,升高肝脏 GSH-Px 活力。结论 OEA 能降低高脂血症大鼠血脂、抑制肝脏脂肪沉积,并减轻脂质过氧化物对肝脏的损伤。

关键词: 油酰乙醇胺; 高脂血症; 脂肪肝; 大鼠

中图分类号: R961 文献标识码: A 文章编号: 1005-4678(2011)05-0374-04

The hypolipidemic and liver protective effect of oleoylethanolamide in hyperlipidemic rats

CHEN Bo, SHEN Yan-hui, LU Wei, ZHU Hao, SUN Li-juan, TANG Yang-shun,

ZHAO Yun, TIAN Feng, JIN Xin

(School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Purpose To observe preventive effect of a novel PPAR α agonist oleoylethanolamide (OEA) on hyperlipidemia and fatty liver in rats. **Methods** High-fat diet was established, the therapeutic effects of OEA(10 20 30 mg/kg) on hyperlipidemic rats were respectively observed, including serum levels of total cholesterol(TC), triglyceride(TG), high-density lipoprotein cholesterol(HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol(LDL-C) and alanine transaminase(ALT), liver weight and liver index, liver tissue malondialdehyde(MDA) and glutathione peroxidase(GSH-Px). Histopathological changes of rat liver were observed by frozen section. **Results** Compared with model group, the results suggest that OEA(20, 30 mg/kg) has a hypolipidemic effect, and the effect of reducing serum ALT levels, liver weight and liver index, liver lipids, liver tissue MDA levels, increasing liver tissue GSH-Px activity. **Conclusion** OEA plays an important role in reducing blood lipid, restraining hepatic fatty deposition and protecting liver to get rid of peroxidation injury in hyperlipidemic rats.

Key words: oleoylethanolamide; hyperlipidemia; fatty liver; rat

油酰乙醇胺(OEA)是动物体内的一种脂肪酸乙醇胺类化合物,是过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (PPAR α)的一个具有高亲和性的天然配体^[1]。PPAR α 的合成配体已成为治疗高脂血症和动脉粥样硬化等疾病的一线药物^[2],但长期应用该类药物易引起肝脏损伤^[3]。因此,寻找降血脂效果明显且毒副作用少的新型 PPAR α 激动剂具有积极的临床

意义。近年来研究表明,OEA 具有抑制食欲和抗肥胖等作用^[1],但其对血脂代谢及肝脏的影响少见报道。本研究旨在观察 OEA 对高脂血症模型大鼠血脂代谢、肝脏脂质水平及过氧化脂质的影响,为进一步研究 OEA 的药理作用提供依据。

1 材料

OEA 厦门大学医学院药学系合成;胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒,北京北化康泰试剂有限公司;考马斯亮蓝、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒,南

收稿日期: 2010-05-21

基金项目: 福建省厦门市科技局科技计划项目(3502Z20083007)

作者简介: 陈 博,男,硕士研究生;赵 云,女,通信作者,讲

师, Tel: 0592-2188681, E-mail: zhaoyunpharm@yahoo.com.cn.

京建成生物工程研究所。

雄性 SD 大鼠, 体重(100 ± 5) g 购于上海斯莱克动物实验中心, 许可证号: SCXK(沪) 2007-0005。

SpectraMax-M2 多功能酶标仪, 美国分子仪器公司; CM 1850 UV 冰冻切片机, 德国莱卡公司; E-CLIPSE 501 倒置显微镜, 日本尼康公司。

2 方法

2.1 造模与分组

动物于实验前适应性饲养 1 周。大鼠按血脂水平随机分成 5 组: 即正常对照组, 模型对照组, OEA 低、中、高剂量组。正常对照组给予普通饲料, 其余各组均给予高脂饲料造模。高脂饲料组成为^[4,5]: 2% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、10% 猪油、5% 黄豆、5% 蔗糖、77.5% 基础饲料。造模 14 d 后, 各治疗组分别腹腔注射 OEA(10 20 30 mg/kg), 正常对照组和模型对照组给予生理盐水, 1 次/d。正常对照组继续给予普通饲料, 其他组继续给予高脂饲料, 持续 21 d。每周测定体重, 动物处理前 12 h 禁食不禁水, 然后以 4% 水合氯醛 10 mL/kg 腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 取肝脏称重后保存于 -80 °C, 供肝组织生化指标测定用。另取相应部位肝脏分别以 4% 多聚甲醛溶液固定, 病理切片观察肝组织中脂肪沉积情况。

2.2 血清指标和肝脏系数测定

血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C、ALT 按试剂盒说明测定。肝脏系数 = 肝重(g) / 鼠重(100 g)。

表 1 OEA 对高脂血症大鼠血脂水平的影响 ($n=10 \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of OEA on serum lipid levels in hyperlipidemic rats ($n=10 \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg/kg)	TG/(mmol/L)	TC/(mmol/L)	HDL/(mmol/L)	LDL/(mmol/L)
正常对照组	-	0.34 ± 0.08 ²	1.19 ± 0.24 ²	1.05 ± 0.19 ²	0.73 ± 0.16 ²
模型对照组	-	1.65 ± 0.46	5.87 ± 1.84	0.53 ± 0.07	2.46 ± 1.47
OEA 低剂量组	10	1.18 ± 0.47 ¹	5.31 ± 1.39	0.66 ± 0.24	1.82 ± 1.39
OEA 中剂量组	20	0.69 ± 0.17 ²	3.53 ± 0.98 ²	0.78 ± 0.10 ²	0.91 ± 0.65 ¹
OEA 高剂量组	30	0.50 ± 0.18 ²	3.38 ± 1.29 ²	0.84 ± 0.21 ²	0.74 ± 0.58 ²

与模型对照组相比: ¹ $P < 0.05$ ² $P < 0.01$

¹ $P < 0.05$ ² $P < 0.01$ vs model group

3.2 OEA 对高脂血症大鼠体重、肝重、肝脏系数及肝功能指标的影响

与正常对照组相比较, 高脂血症模型组大鼠血清 ALT 水平、肝重和肝脏系数明显升高 ($P < 0.05$ 或 0.01)。连续给药 21 d 后, OEA 能明显降低高脂血症大鼠血清 ALT、体重、肝重和肝脏系数 ($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 2。

3.3 OEA 对高脂血症大鼠肝组织中 TC、TG、MDA 和 GSH-Px 的影响

与正常对照组相比较, 高脂血症模型组大鼠肝

2.3 组织学观察

肉眼观察肝脏后, 每鼠取肝脏相应部位迅速制作冰冻切片, 油红 O 染色, 200 倍光镜下观察脂质在肝脏组织中的沉积, 脂肪为红色着色。

2.4 肝脂质和肝组织中 MDA、GSH-Px 测定

每鼠称取相应部位肝组织 200 mg, 加三氯甲烷-甲醇(1:1)至 2 mL 后冰浴匀浆, 匀浆液于 4 °C 静置 24 h 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 室温放置 12 h 以上, 挥去上层液体, 抽干残余液体, 加入无水乙醇 1 mL, 取上清分别按试剂盒方法测定肝中的 TC 和 TG 含量^[6]。另称取相应部位肝组织 200 mg, 加冰生理盐水 2 mL 匀浆, 离心取上清, 分别按试剂盒方法测定 MDA、GSH-Px 和蛋白含量。

2.5 统计学处理

采用 Graphpad Prism 5 (GraphPad Software Inc, USA) 软件进行分析, 所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间样本均数比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 OEA 对高脂血症大鼠血脂代谢的影响

与正常对照组相比较, 高脂血症模型组大鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 明显升高 ($P < 0.01$), HDL-C 明显降低 ($P < 0.01$), 表明大鼠高脂模型造模成功。连续给药 21 d 后, OEA 能明显地降低高脂血症大鼠血清 TC、TG、LDL-C 的水平 ($P < 0.01$), 同时对血清 HDL-C 有一定的升高作用 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 OEA 对高脂血症大鼠血脂水平的影响 ($n=10 \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of OEA on serum lipid levels in hyperlipidemic rats ($n=10 \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg/kg)	TG/(mmol/L)	TC/(mmol/L)	HDL/(mmol/L)	LDL/(mmol/L)
正常对照组	-	0.34 ± 0.08 ²	1.19 ± 0.24 ²	1.05 ± 0.19 ²	0.73 ± 0.16 ²
模型对照组	-	1.65 ± 0.46	5.87 ± 1.84	0.53 ± 0.07	2.46 ± 1.47
OEA 低剂量组	10	1.18 ± 0.47 ¹	5.31 ± 1.39	0.66 ± 0.24	1.82 ± 1.39
OEA 中剂量组	20	0.69 ± 0.17 ²	3.53 ± 0.98 ²	0.78 ± 0.10 ²	0.91 ± 0.65 ¹
OEA 高剂量组	30	0.50 ± 0.18 ²	3.38 ± 1.29 ²	0.84 ± 0.21 ²	0.74 ± 0.58 ²

与模型对照组相比: ¹ $P < 0.05$ ² $P < 0.01$

¹ $P < 0.05$ ² $P < 0.01$ vs model group

组织中 TC、TG 和 MDA 明显升高 ($P < 0.01$), GSH-Px 明显降低 ($P < 0.01$)。连续给药 21 d 后, OEA 能明显降低高脂血症大鼠肝组织中 TC、TG 和 MDA 水平 ($P < 0.05$ 或 0.01), 升高 GSH-Px 活力 ($P < 0.01$)。见表 3。

3.4 组织学观察

肉眼观察空白对照组肝组织无异常变化, 模型对照组肝组织呈无光泽的灰黄色, 肝脏体积明显增大; OEA 各剂量组肝组织颜色较空白对照组颜色稍浅, 光泽度稍差, 体积较模型对照组减小。肝脏冰冻

表 2 OEA 对高脂血症大鼠血清 ALT、体重、肝重和肝脏系数的影响($n = 10 \bar{x} \pm s$)Tab.2 Effect of OEA on serum ALT, body weight, hepatic weight and coefficient of hepatic weight in hyperlipidemic rats($n = 10 \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg/kg)	体重/g	肝重/g	肝脏系数/(g/100g)	ALT/(u/L)
正常对照组	-	277 ± 14	12.0 ± 0.8 ²	4.33 ± 0.17 ²	27.5 ± 7.9 ¹
模型对照组	-	286 ± 23	16.1 ± 1.3	5.65 ± 0.47	41.6 ± 16.6
OEA 低剂量组	10	251 ± 26 ²	12.6 ± 1.6 ²	5.09 ± 0.87	30.9 ± 6.5
OEA 中剂量组	20	245 ± 14 ²	12.1 ± 1.6 ²	4.85 ± 0.71 ¹	19.8 ± 10.7 ²
OEA 高剂量组	30	230 ± 31 ²	11.6 ± 1.5 ²	4.72 ± 0.60 ²	17.1 ± 7.3 ²

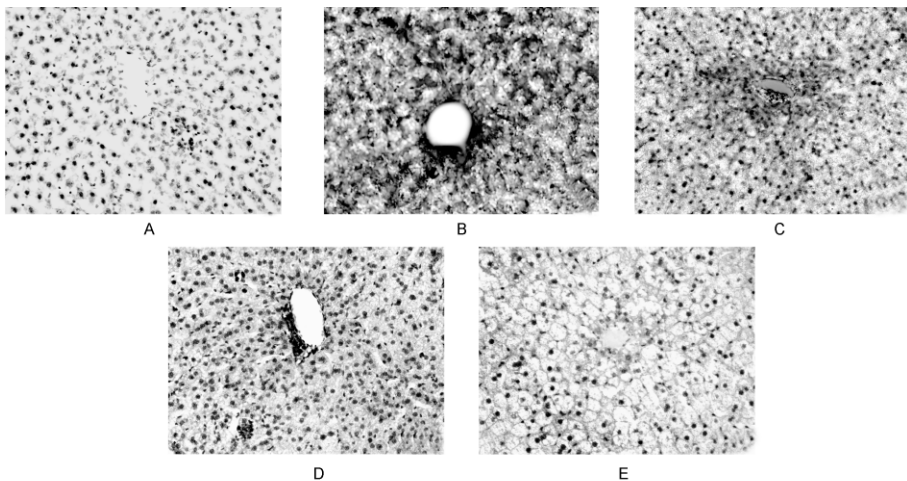
与模型对照组相比: ¹ $P < 0.05$; ² $P < 0.01$ ¹ $P < 0.05$; ² $P < 0.01$ vs model group表 3 OEA 对高脂血症大鼠肝组织中 TC、TG、MDA 和 GSH-Px 的影响($n = 10 \bar{x} \pm s$)Tab.3 Effect of OEA on liver tissue TC, TG, MDA and GSH-Px in hyperlipidemic rats($n = 10 \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg/kg)	TC/(mg/g)	TG/(mg/g)	MDA/($\mu\text{mol/g Prot}$)	GSH-Px/(u/mg Prot)
正常对照组	-	0.91 ± 0.14 ²	4.03 ± 0.96 ²	1.56 ± 0.24 ²	578.3 ± 95.1 ²
模型对照组	-	4.28 ± 0.52	14.03 ± 2.73	2.56 ± 0.77	429.2 ± 34.9
OEA 低剂量组	10	4.20 ± 0.48	7.98 ± 3.08 ²	1.64 ± 0.30 ²	492.3 ± 27.9 ²
OEA 中剂量组	20	4.08 ± 0.42	7.58 ± 2.13 ²	1.61 ± 0.24 ²	527.5 ± 42.4 ²
OEA 高剂量组	30	3.63 ± 0.55 ¹	7.51 ± 2.35 ²	1.61 ± 0.41 ²	589.4 ± 75.6 ²

与模型对照组相比: ¹ $P < 0.05$; ² $P < 0.01$ ¹ $P < 0.05$; ² $P < 0.01$ vs model group

切片脂质染色结果表明,空白对照组肝细胞内基本未见脂滴,基本无着色;模型对照组肝细胞内可见大量脂滴,呈大面积着色,其中肝小叶中央区着色较

深,边缘略浅;OEA 各剂量组大鼠肝细胞内脂滴较模型对照组有所减少,着色面积和深度随剂量增加有减少趋势。见图 1。



A. 空白对照组; B. 模型对照组; C. OEA 低剂量组; D. OEA 中剂量组; E. OEA 高剂量组

A. Control group; B. Model group; C. OEA low-dose group; D. OEA middle-dose group; E. OEA high-dose group

图 1 各组大鼠肝脏冰冻切片油红 O 染色($\times 200$)Fig. 1 Oil red O staining of liver frozen slices from control, model and drug-treated rats($\times 200$)

4 讨论

OEA 是 PPAR α 的内源性高亲和力配体,在激活 PPAR α 时存在结构选择性,激活 PPAR α 的半数有效浓度(EC_{50}) 仅为 120 nmol/L,并可通过激活核受体 PPAR α 调节进食和体重^[7]。研究表明,OEA 的抗肥胖作用与其激活 PPAR α 刺激脂肪分解有

关^[8]。本研究观察到,OEA 亦能显著降低高脂血症大鼠体重,与文献报道^[8]一致,同样表明 OEA 调节体重与其调节脂质代谢有关。

PPAR α 与脂质代谢关系密切,贝特类 PPAR α 激动剂主要通过激活脂蛋白酯酶、抑制载脂蛋白 B 的合成等作用降低血中 TG,同时可以增强载脂蛋白

A-1 的表达,升高血中 HDL-C,进而预防高脂血症、动脉粥样硬化等疾病的发展^[9]。有报道,OEA 同样具有抗动脉粥样硬化的潜力^[10]。本研究结果显示,饲喂高脂饲料 21 d 后,大鼠血清的 TG、TC 和 LDL-C 均比饲喂正常饲料的大鼠血清的相应指标有显著性升高,且 HDL-C 显著性降低,而给予不同剂量的 OEA 后,TG、TC 和 LDL-C 均相应降低,HDL-C 升高,且有剂量依赖性。此结果表明,OEA 具有调节血脂作用,进而推测其对动脉粥样硬化有防治潜力。

高脂血症是导致脂肪肝的重要因素之一。长期摄入高脂饮食会导致高脂血症、肝内 TG 合成增加,当 TG 过量超过肝脏转运能力时则导致 TG 在肝内质网堆积,压迫肝血窦逐渐坏死,而肝脏的脂肪病变又会影响到脂质代谢,从而加重高脂血症^[11]。本研究结果表明,在给予 OEA 治疗 21 d 后可明显降低高脂血症大鼠肝脏 TG、TC,肝重及肝脏系数,血清 ALT,肝脏 MDA 水平,升高 GSH-Px 活力,表明 OEA 可调节肝脏脂质代谢,改善肝功能,其清除自由基作用可能与存在某些高水平的内源性抗氧化剂(GSH)有关。结果提示 OEA 可能通过调节血脂及肝脏脂质代谢,提高肝脏自由基清除酶的活性,抵抗自由基介导的脂质过氧化,减轻肝脏自由基损伤,对肝脏具有一定保护作用。

本研究表明 OEA 具有较好的降血脂及肝脏保护作用。OEA 由于口服后易被水解^[12],故本文采用腹腔注射给药的方式。然而 OEA 兼具高效低毒性的优势,表明其有潜力作为治疗高脂血症的一种先导化合物,为今后开发安全有效的降血脂药物提供思路。

参考文献:

[1] Fu J, Oveisi F, Gaetani S, et al. Oleylethanolamide, an endogenous PPAR- α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese

rats [J]. *Neuropharmacology* 2005, 48: 1147-1153.

[2] Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism [J]. *Circulation* 1998, 98: 2088-2093.

[3] Arnaiz S L, Travacio M, Llesuy S, et al. Hydrogen peroxide metabolism during peroxisome proliferation by fenofibrate [J]. *Biochimica Biophysica Acta* 1995, 272: 175-180.

[4] 徐庭鑫,王丽云,石根勇,等.牛蒡皮提取物对高脂血症大鼠血脂及抗氧化作用的研究[J].中国生化药物杂志 2009, 30(3): 189-191.

[5] Reaven G M, Risser T R, Chen Y, et al. Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, nonobese rats [J]. *J Lipid Res* 1979, 20: 371-378.

[6] Cequier S E, Rodriguez C, Ravelo A, et al. Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(12): 4297-4303.

[7] Fu J, Gaetani S, Oveisi F, et al. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α [J]. *Nature* 2003, 425(6594): 90-93.

[8] Guzman M, Lo Verme J L, Fu J, et al. Oleylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) [J]. *J Biol Chem* 2004, 279(27): 27849-27854.

[9] Kota B P, Huang T H W, Roufogalis B D. An overview on biological mechanisms of PPARs [J]. *Pharmacol Res* 2005, 51: 85-94.

[10] 秦文金,鑫,陈彩霞,等.油酰乙醇胺对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子-1 表达的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(6): 374-377.

[11] Rector R S, Thyfault J P, Wei Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update [J]. *World J Gastroenterol* 2008, 14(2): 185-192.

[12] Giuseppe A, Giacomo B D, Gaetani S, et al. Pharmacological characterization of hydrolysis-resistant analogs of oleylethanolamide with potent anorexiatic properties [J]. *J Pharmacol Exp* 2006, 318(2): 563-570.

(上接第 373 页)

[7] Heidland U E, Heintzen M P, Michel C J, et al. Effect of adjunctive intracoronary adenosine on myocardial ischemia, hemodynamic function and left ventricular performance during percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical access to ischemic preconditioning [J]. *Coron Artery Dis* 2000, 11(5): 421-428.

[8] Canyon S J, Dobson G P. Protection against ventricular arrhythmias and cardiac death using adenosine and lidocaine during regional ischemia in the *in vivo* rat [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(3): H1286-H1295.

[9] Masakatsu W, Tetsuo M, Osamu S, et al. Long-term stimulation of adenosine A2B receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats [J]. *Circulation* 2006, 114(18): 1923-

1932.

[10] Chen Fang, Sun Yangzhao, Zhao Guanghua, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Ultrason Sonochem*, 2007, 14: 767-778.

[11] Leea W C, Yusofa S, Hamidb N S A, et al. Optimizing conditions for hot water extraction of banana juice using response surface methodology (RSM) [J]. *J Food Eng* 2006, 75(4): 473-479.

[12] 汪宇,于荣敏,杨光照,等.高效液相色谱法测定蛹虫草人工固体培养物中核苷类化合物的含量 [J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(5): 306-308.