

◇ 研究原著 ◇

中国临床药理学与治疗学
中国药理学会主办
CN 34-1206/R, ISSN 1009-2501
E-mail: ccpt96@21.cn.com
May; 11(5): 574-577

葛根素对膳食诱导的高胆固醇血症大鼠的血脂调节作用

闫莉萍^{1,2}, 陈舜宏^{2,3}, 陈伟民⁴, 陈士林^{1,2}, 马小军¹, 徐宏喜⁵

¹中国协和医科大学, 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100055;

²深圳市中药药理学及分子药理学研究重点实验室, 深圳 518057, 广东;

³深圳南粤药业有限公司, 深圳 518055, 广东;

⁴香港理工大学应用生物与化学技术系, 香港; ⁵香港赛马会中药研究院, 香港

摘要 目的: 观察葛根素对膳食诱导的高胆固醇血症大鼠的血脂调节作用, 并对其机制进行探索。方法: SD 大鼠随机分为 3 组, 正常组、模型组和葛根素组。模型组和葛根素组均给予富含胆固醇的饲料 4 周, 葛根素组每天灌喂葛根素溶液 ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)的含量。荧光定量 RT-PCR 分析羟甲基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (HMGCR), 羊毛固醇 14 α 去甲基酶 (CYP51), 7 α 羟化酶 (CYP7A1) 的 mRNA 转录水平。结果: 葛根素显著降低高胆固醇膳食引起的血清胆固醇的升高, 降低动脉粥样硬化指数, 上调 CYP7A1 的 mRNA 转录水平, 对 HMGCR 和 CYP51 的转录水平没有影响。结论: 这些数据表明葛根素能够降低血清胆固醇, 减低动脉粥样硬化发生危险。其降低胆固醇的作用可能是通过促进胆固醇转化为胆酸实现的。

关键词 高胆固醇血症; 血脂水平; 动脉粥样硬化; 胆固醇平衡; 羟甲基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶; 羊毛固醇 14 α 去甲基酶; 7 α 羟化酶

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2006)05-0574-04

2006 03 24 收稿 2006 04 04 修回

香港赛马会慈善基金资助项目

闫莉萍, 女, 博士生, 研究方向: 中药药理学。

Tel: 13794483953 E-mail: lpyan@126.com

马小军, 通讯作者, 男, 博士生导师, 研究方向: 生药学。

Tel: 010-62819410 E-mail: xjma@public.bta.net.cn

动脉粥样硬化的病理学涉及到多种影响脂蛋白代谢的遗传和环境因子^[1]。高胆固醇血症是引发动脉粥样硬化及相关心血管疾病的主要危险因素之一^[2]。高脂膳食是导致脂蛋白代谢不平衡从而继发动脉粥样硬化的主要环境因子。葛根素 (C12H20C9) 是野葛中主要的异黄酮成分, 在发热性疾病、肝病、心血管疾病中都有疗效, 尽管其作为药品及保健品在我国有着广泛的应用, 但对其调血脂作用仍然缺乏深入研究。因此, 本研究旨在探讨葛根素对膳食诱导的高胆固醇血症血脂水平的影响以及对胆固醇平衡相关酶蛋白表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠, 220~250 g, 由广州中医药大学试验动物中心提供, 动物合格证号: 0016120。

1.2 药品与仪器 葛根素购自北京协和药厂; 总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)检测试剂盒均购自北京中生北控; Trizol 购自 Invitrogen; 反转录酶和 SYBR green qPCR 试剂盒均购自大连宝生物; 荧光定量 PCR 仪为 ABI PRISM 7 000; 全自动生化仪为 ALYCON。

1.3 动物分组与模型的建立^[3] SD 大鼠, 适应环境 1 周后, 眼眶取血, 测定血脂水平, 血脂水平不正常动物剔除。然后随机分为 3 组, 每组 8 只。正常组给予正常饲料(蛋白质 14%, 脂肪 10%, 碳水化合物 76%); 模型组和治疗组给予添加有 2% 胆固醇、1% 胆酸、5% 花生油的饲料; 治疗组每天灌服葛根素溶液 ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。

1.4 血脂测定 4 周后, 禁食过夜, 乙醚麻醉后心

脏取血。在全自动生化仪上测定 TC、TG、HDL-c 和 LDL-c。

1.5 RT-PCR 分析羟基 3 甲基戊二酰 CoA 还原酶 (HMGR)、羊毛固醇 14 α 去甲基酶 (CYP51) 和 7 α 羟化酶 (CYP7A1) 的 mRNA 转录水平 将新鲜肝脏匀浆,用 Trizol 试剂提取总 RNA。反转录得到 cDNA。然后采用 SYBR green RT-PCR 试剂盒进行实时定量 RT-PCR。25 μ l 的反应体系中加入 2 μ l cDNA, 50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物(HMGR, 正义: 5' CAACATCGTCACTGCCATC 3', 反义: 5' GATGCTCAAGCTGGCTTCT 3'; CYP51, 正义: 5' GATGCTCATCGGACTGCTG 3', 反义: 5' ATAAACGAAGCATAGTGGACC 3'; CYP7A1, 正义: 5' GGTTCCTCAGGTGTGAACT 3', 反义: 5' CAGAGATCTGCTGGCTCT3'; GAPDH, 正义: 5' GTGACCTCATGGCTACAT 3', 反义: 5' TGTGAGGGAGATGCTCAGT 3')。按照说明书设置扩增程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 预变性, 然后进行 40 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s 变性; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 退火; 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 延伸。用管家基因 GAPDH 来

校正 RNA 样品间质与量的差异。用任意 cDNA 制作标准曲线。根据标准曲线来计算每个样品的相对含量。每次反应设置 3 个重复。

1.6 统计学处理 所有数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组之间的参数比较采用 Newmar-Keul's 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有的统计分析用 GraphPad Prism 4.02 完成。

2 结果

2.1 葛根素对血脂水平的影响 见表 1, 4 周试验结束后, 模型组的 TC, TG, LDL-c 值都不同程度地增加。葛根素能够影响血脂水平, 使其在一定程度上趋于正常, 并使 HDL-c/LDL-c 的比值显著增加($P < 0.05$)。与高胆固醇模型组($4.1 \pm 0.37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比较葛根素治疗组的血清胆固醇($3.0 \pm 0.17 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)显著($P < 0.01$)降低。值得注意的是, 与模型组(3.40 ± 0.28)相比, 葛根素治疗组(2.50 ± 0.20)的动脉粥样硬化指数亦显著降低($P < 0.01$)。

表 1 葛根素 $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 治疗 4 周对大鼠血脂水平的影响($\bar{x}\pm s$, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $n=8$)

组别	总胆固醇	甘油三酯	低密度脂蛋白胆固醇	高密度脂蛋白胆固醇
正常组	2.1 ± 0.03	0.79 ± 0.26	0.47 ± 0.06	1.32 ± 0.07
模型组	4.0 ± 0.38	0.92 ± 0.18	2.43 ± 0.33	1.23 ± 0.09
葛根素组	2.9 ± 0.19^a	0.84 ± 0.08	1.82 ± 0.24	1.20 ± 0.05

与模型组比较^a $P < 0.01$

2.2 与胆固醇平衡的相关酶蛋白的表达水平 本实验检测了胆固醇生成途径中的两个关键酶 HMGR 和 CYP51 以及胆固醇转化为胆酸的限速酶 CYP7A1 的表达水平。模型组和治疗组, HMGR 和 CYP51 的

表达水平均显著降低($P < 0.01$, 图 1)。对于 CYP7A1, 模型组的表达水平显著减少($P < 0.05$), 而葛根素治疗组的表达水平趋于正常(图 1)。

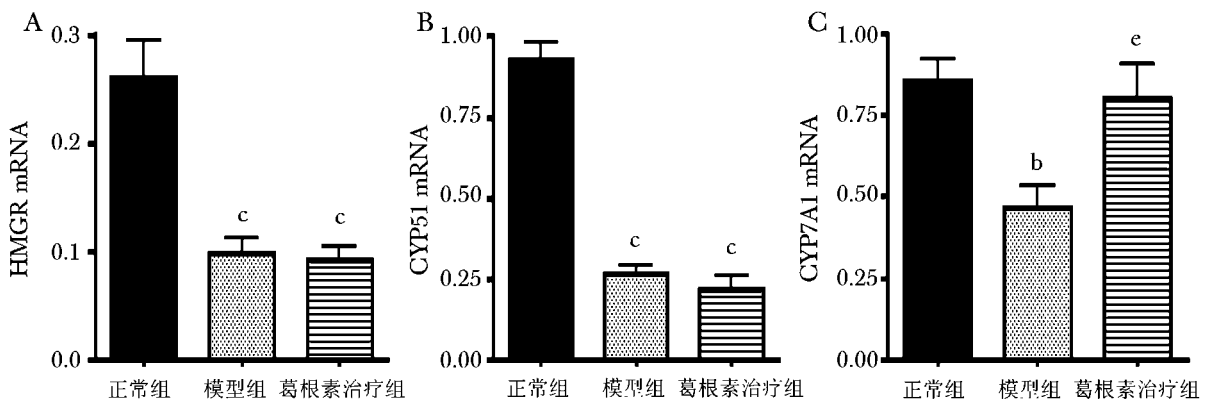


图 1 葛根素 $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 治疗 4 周对大鼠对胆固醇代谢相关酶蛋白 HMGR (A)、CYP51 (B) 和 CYP7A1 (C) mRNA 转录水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

与正常对照组比较^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与模型组相比较^a $P < 0.05$;

HMGR: 羟基 3 甲基戊二酰 CoA 还原酶; CYP51: 羊毛固醇 14 α 去甲基酶; CYP7A1: 7 α 羟化酶

3 讨论

前研究表明,葛根素能够通过降低血清总胆固醇,调节高胆固醇血症大鼠的血脂水平。富含胆固醇(2%),胆酸(0.5%)和花生油(5%)的饲料常用来建造大鼠或小鼠高胆固醇血症模型,能够引起动脉粥样斑块的形成^[3]。添加有胆酸和胆固醇的饲料与仅添加有胆固醇的饲料相比,能引起更大幅度总胆固醇的升高^[4]。在本研究中,模型组显示出了不正常的血脂水平:总胆固醇和低密度脂蛋白升高,但是甘油三酯和高密度脂蛋白却仍然保持正常水平,这样的情况亦有所报道^[5]。另外,葛根素治疗组,动脉粥样硬化指数(TC/HDL-c)显著降低,表明葛根素能够降低动脉粥样硬化发生危险。

动脉粥样硬化是心脏疾病的主要诱因,而血脂含量可能是心脏疾病发生发展的重要决定因素,许多中药被广泛用来降低血脂,治疗心血管疾病。葛根素是分离自野葛的主要异黄酮物质之一。研究表明,其对心血管疾病有着显著疗效。然而,对葛根素的血脂调节机理至今没有深入的研究。

本研究发现葛根素不仅能够降低总胆固醇的含量,还能够降低动脉粥样硬化指数。肝脏胆固醇的平衡主要通过以下3种方式:(1)膳食胆固醇的吸收;(2)胆固醇的生物合成;(3)胆固醇代谢转化为胆酸。本研究对肝脏胆固醇代谢进行了监测,发现模型组和葛根素治疗组肝脏的HMGR和CYP7A1的表达水平显著降低,这可能是由于膳食中大量胆固醇所引起的反馈抑制。葛根素能够上调CYP7A1的表达达到正常水平,CYP7A1是胆固醇代谢转化为胆酸途径的限速酶^[6],这是机体清除胆固醇的主要途径,大约占日常分泌(外排)胆固醇的50%^[7]。因此,葛根

素降低胆固醇的作用可能是由于促进胆固醇向胆酸转化,从而外排。据报道大豆异黄酮也有相似的作用机制,它通过增加CYP7A1的表达及其酶活性来降低血清总胆固醇的含量^[8]。

总之,当前研究表明,葛根素能够降低血清总胆固醇含量,调节血脂到正常水平,降低动脉粥样硬化指数。其降低血清胆固醇的作用可能是促进肝脏胆固醇向胆酸转化并外排。此机制的进一步阐明还需要利用别的动物模型进行验证。

参考文献

- 1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1900s[J]. *Nature*, 1993; 362: 801- 9
- 2 Prasad K, Kalra J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E[J]. *Am Heart J*, 1993; 125: 958- 73
- 3 Nakamura H, Izumiyama N, Nakamura K, Ohtsubo K. Age associated ultrastructural changes in the aortic intima of rats with diet induced Hypercholesterolemia[J]. *Atherosclerosis*, 1989; 79: 101- 11
- 4 Chiang MT, Chen YC, Huang AL. Plasma lipoprotein cholesterol levels in rats fed a diet enriched in cholesterol and cholic acid[J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 1998; 68: 328- 34
- 5 Hoekstra M, Out R, Kruijt JK, Van Eck M, Van Berkel TJ. Diet induced regulation of genes involved in cholesterol metabolism in rat liver parenchymal and Kupffer cells[J]. *J Hepatology*, 2005; 42: 2400- 7
- 6 Russell DW, Satchell KDR. Bile acid biosynthesis[J]. *Biochemistry*, 1992; 31: 4737- 49
- 7 Yang TTC, Koo MWL. Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion[J]. *Life Sci*, 2000; 66: 411- 23
- 8 Kawakami Y, Tsurugasaki W, Yoshida Y, Igarashi Y, Nakamura S, Osada K. Regulative actions of dietary soy isoflavone on biological antioxidative system and lipid metabolism in rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2004; 52: 1764- 8

Regulatory effect of puerarin on lipid profile in hypercholesterolemic rats

YAN Li-ping^{1,2}, CHEN Shun-hong^{2,3}, CHEN Wei-min⁴, CHEN Shi-lin^{1,2}, MA Xiao-jun¹, XU Hong-xi⁵

¹Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100055, China; ²State Key Laboratory of Chinese Medicine and Molecular Pharmacology, Shenzhen 518057, Guangdong, China; ³Shenzhen South China Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen 518055, Guangdong, China; ⁴Department of Applied Biology and Chemical Technology, the Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong SAR, China; ⁵Hong Kong Jockey Club Institute of Chinese Medicine, Hong Kong SAR, China

ABSTRACT AIM: To investigate the regulatory effect of puerarin on lipid profile in diet-induced hypercholester-

olemic rats and elucidate the mechanisms involved. **METHODS:** SD rats were randomly divided into the

control group, hypercholesterolemia group and puerarin-treated group. The hypercholesterolemia group and puerarin-treated group were given diet rich in cholesterol. In the meantime, the puerarin-treated group was orally administered with puerarin ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The lipid profile was investigated by the content of serum TC, TG, HDL-c and LDL-c. The mRNA levels of 7α -hydroxylase (CYP7A1), 3 -hydroxy- 3 -methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) and lanosterol 14α -demethylase (CYP51) were analyzed by real time RT-PCR. **RESULTS:** Puerarin markedly attenuated the increased serum total cholesterol

induced by hypercholesterolemic diet. It caused a significant reduction in the atherogenic index. Expression of mRNA of CYP7A1 was significantly enhanced but not for those of HMGR and CYP51. **CONCLUSION:** These data indicate that puerarin can reduce the atherogenic properties of dietary cholesterol in rats. Its hypocholesterolemic function may be due to promoting the conversion of cholesterol into bile acids.

KEY WORDS hypercholesterolemia; serum lipids levels; atherosclerosis; 3 -hydroxy- 3 -methylglutaryl-CoA reductase; lanosterol 14α -demethylase; 7α -hydroxylase