

理脾调脂胶囊对血脂失调症大鼠及 ApoE 基因敲除小鼠 PPARs mRNA 的调控作用

刘桂荣 闫滨 闫石 刘非

摘要 目的 研究理脾调脂胶囊对血脂失调症大鼠及 ApoE 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠 PPAR α 、 γ mRNA 的调控作用,探讨其调节脂质代谢的作用机制。**方法** 48 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、理脾调脂胶囊治疗组 (理脾调脂组)、血脂康对照组 (血脂康组),造模 4 周,将 ApoE^{-/-} 小鼠 30 只随机分为空白组、血脂康组、理脾调脂组。理脾调脂组大鼠、ApoE^{-/-} 小鼠 (以下简称大、小鼠) 每日灌胃理脾调脂胶囊,血脂康组每日灌胃血脂康,用药 8 周。酶法测定大、小鼠血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 浓度,沉淀法测定大、小鼠血清高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C); 内参照模板法荧光定量 PCR 检测大、小鼠肝脏 PPAR α 、 γ mRNA 的表达。**结果** 理脾调脂组大、小鼠血清 TC、TG、LDL-C 浓度较模型组、空白组显著降低 ($P < 0.01$), HDL-C 浓度显著提高 ($P < 0.01$), 大、小鼠 PPAR α 、 γ mRNA 表达较模型组 (或空白组) 显著提高 ($P < 0.01$); 与血脂康组比较,理脾调脂组大、小鼠血清 TC、TG、LDL-C 浓度均降低 ($P < 0.05$), HDL-C 浓度均显著提高 ($P < 0.01, P < 0.05$), PPAR α 、 γ mRNA 表达明显提高 ($P < 0.05$)。**结论** 理脾调脂胶囊能显著提高实验性血脂失调症大、小鼠肝脏 PPAR α 、 γ mRNA 的表达,具有调控核因子而影响血脂代谢的作用。

关键词 理脾调脂胶囊; 血脂康; 血脂失调症; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 大鼠及 ApoE^{-/-} 小鼠

Regulatory Effect of Lipi Tiaozi Capsule on the Expression of Peroxisome Proliferator-activated Receptors mRNA in Dyslipidemia Rats and ApoE^{-/-} Mice LIU Gui-rong, YAN Bin, YAN Shi, et al College of Basic Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250014)

ABSTRACT Objective To study the regulatory effect of Lipi Tiaozi Capsule (LTC) on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and γ mRNA in dyslipidemia rats and ApoE^{-/-} mice, and to explore its mechanisms for regulating lipid metabolism. **Methods** 48 Wistar rats were randomly divided into the blank group, the model group, the treatment group (treated by LTC), and the control group (treated by Xuezhi-kang Capsule). After four-week modeling (except the blank group) 30 ApoE^{-/-} mice were randomly divided into the blank group, the treatment group, and the control group. LTC was given by gastrogavage to rats and ApoE^{-/-} mice in LTC groups while XZKC was given to XZKC groups. The medication was conducted once daily for eight weeks. The serum TC and TG contents of rats and mice were determined by enzymic method. The serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were detected by precipitation method. PPAR α and γ mRNA expressions were detected in the liver tissue of the rats and mice by fluorescent PCR. **Results** Compared with the model group and the blank group, the serum contents of TC, TG, and LDL-C of rats or mice in the treatment group decreased significantly ($P < 0.01$). The serum content of HDL-C increased significantly ($P < 0.01$). PPAR α and γ mRNA expressions of rats or mice increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the control group, the serum contents of TC, TG, and LDL-C of mice and rats in the treatment group decreased (all $P < 0.05$), the serum content of HDL-C increased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$). And PPAR α and γ mRNA expressions of rats or mice increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** LTC could significantly increase PPAR α and γ mRNA expressions of experimental dyslipidemia rats and ApoE^{-/-} mice, playing roles in regulating nuclear factors and further effecting lipid metabolism.

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 30772848); 山东省自然科学基金资助项目 (No. Y2007C099)

作者单位:山东中医药大学基础医学院 (济南 250355)

通讯作者:刘桂荣, Tel: 0531-89628077, E-mail: lwy8668@163.com

KEYWORDS Lipi Tiaozhi Capsule; Xuezhikang Capsule; dyslipidemia; peroxisome proliferator-activated receptor α and γ ; rats and ApoE-gene knockout mice

我们以往的临床试验和动物实验研究证明,理脾调脂胶囊在多个层次上具有明显调节脂质代谢的作用^[1,2]。过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs)是一类配体激活转录因子,属于核受体超家族新成员,是体内膳食脂质感受器,在脂代谢、脂肪形成和胰岛素敏感性调节中发挥重要的作用。为了进一步弄清理脾调脂胶囊的调脂作用,我们观察了其对应血脂失调症大鼠和 ApoE^{-/-}小鼠肝脏 PPAR α 、 γ mRNA 表达的影响,从分子生物学的角度进一步探讨理脾调脂胶囊调节脂质代谢的作用是否与 PPARs mRNA 相关。

材料与方法

1 实验动物 Wistar 大鼠 48 只,雄性,体重(178 $\pm$ 19)g,由山东大学实验动物中心提供。ApoE^{-/-}小鼠 30 只,8 周龄,体重(35 $\pm$ 11)g,由中国科学院实验动物中心提供。

2 药物与脂肪乳剂

2.1 理脾调脂胶囊 主要由红芪、苍术、野葛根等组成,本院制剂室制作。制成药液(含生药量 3 g/mL),放入无菌容器中 4℃ 冷藏保存备用。

2.2 阳性对照药物 血脂康胶囊,0.3 g/粒,北大维信生物科技有限公司生产,批号:950012。研末后制成 0.001 g/mL 药液,置于无菌容器 4℃ 冷藏备用。

2.3 制备脂肪乳剂 胆固醇 10 g,猪油 20 g,胆酸钠 2 g,丙基硫氧嘧啶 1 g,吐温-80 20 mL,丙二醇 30 mL。先取猪油加热融化,然后依次加入胆固醇、胆盐、丙基硫氧嘧啶(用前研末)、吐温和丙二醇,加蒸馏水至 100 mL 制成脂肪乳 100 mL。

3 主要仪器及试剂盒

3.1 仪器 VIS-723 分光光度计,上海第三分析仪器厂生产;Becman700 全自动生化分析仪,美国 Becman 公司生产;SuperScriptTM Preamplification System 购自 GIBCO BRL 公司。

3.2 试剂盒 总胆固醇(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)试剂盒均由北京中生生物工程高技术公司生产;RT-PCR 试剂盒由宝生物工程(大连)有限公司生产。

4 实验方法

4.1 动物分组 将 48 只大鼠称重,随机分为空

白组、模型组、血脂康对照组(血脂康组)、理脾调脂胶囊治疗组(理脾调脂组),每组 12 只。在血脂失调大鼠模型制造成功时,将 ApoE^{-/-}小鼠 30 只,随机分为空白组、血脂康组、理脾调脂胶囊组,每组 10 只。

4.2 造模方法 各组大鼠每天予普通饲料,自由饮水、摄食,常规饲养 1 周。1 周后血脂康组、理脾调脂组每只大鼠每天灌服脂肪乳 0.5 mL/100 g,正常组大鼠每天灌服等量生理盐水。每天同一时间灌胃,每日 1 次,连续 4 周。第 28 天灌完后,停灌 24 h(禁食 12 h),戊巴比妥钠溶液麻醉,目内眦取血,检测血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C,证明血脂失调症模型制造成功。

4.3 给药方法 血脂失调大鼠模型制造成功后,正常组继续灌服生理盐水 1 mL/100 g,每天 1 次;理脾调脂组每只大鼠灌胃理脾调脂胶囊药液 1 mL/100 g,血脂康组每只大鼠灌胃血脂康胶囊药液 1 mL/100 g 体重。ApoE^{-/-}小鼠空白组、血脂康组、理脾调脂组灌服方法与大鼠相同。均在每天相同时间灌服。连续 8 周。

4.4 标本采取与处理 停药 24 h(禁食 12 h),戊巴比妥钠溶液麻醉,分别取动物(活体)肝组织各 1~1.5 g,液氮速冻后,放置-70℃ 冰箱保存备检。实验期间大鼠死亡 5 只,小鼠死亡 6 只,加之个别动物实验数据离散度过大,最终获取有效实验数据的动物为:大鼠 38 只,小鼠 22 只。

4.5 检测指标及方法

4.5.1 酶法测定大、小鼠血清 TC、TG 浓度,沉淀法测定大、小鼠血清 HDL-C、LDL-C;Real-time PCR 法检测大、小鼠肝脏 PPAR α 、 γ mRNA 的表达。

4.5.2 实时定量 PCR 法(Real-time PCR)检测方法

4.5.2.1 总 mRNA 的提取 按照 RNA 提取试剂盒中说明书提取 RNA,然后测定纯度和浓度,-80℃ 冰箱保存。

4.5.2.2 PCR 引物的确定与合成 根据 RGD^[3]提供的基因序列设计引物。PPAR α 引物:上游:5'-CTCGTCAGGTCATCAAGAA-3',下游:5'-CAGCCCTCTTCATCTCCAAG-3';PPAR γ 引物:上游:5'-ATGACA-GC-GACTTGGCAATA-3',下游:5'-GCAACTGGAAGAAGG-GAAAT-3'。上述引物设计及合成均由北京六合华大基因有限公司完成。

4.5.2.3 在提取 mRNA 之后,20 μ L 反应体系包含总 RNA 1 μ g,2 μ L(10 $\times$ RTbuffer), 4 μ L(25 mmol/L MgCl₂), 4 μ L(10 mmol/L dNTP), 1 μ L(RTase (5U/ μ L), 1 μ L(50 μ mol/L Randon 9 mers)。在 Takara-PCR 仪中反应,反应条件为 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min,95 $^{\circ}$ C 5 min,合成好的 cDNA 放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

4.5.2.4 Real-time PCR 在 Roche480 仪器中进行,反应的总体积是 10 μ L(5 μ L of SYBR Green Real-time PCR Master Mix 和 1 μ L 引物)。反应步骤如下: 95 $^{\circ}$ C 10 s;45 个循环的 60 $^{\circ}$ C 5 s;72 $^{\circ}$ C 10 s;65 $^{\circ}$ C 30 s。

5 统计学方法

所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,用 SAS 8.12 软件进行统计分析。

结 果

1 各组大鼠血脂变化比较(表 1) 用药后,理脾调脂胶囊能够显著降低血脂失调症大鼠血清的 TC、TG、LDL-C 水平($P < 0.01$),显著升高 HDL-C 的水平($P < 0.01$)。且理脾调脂胶囊改善各指标幅度显著高于血脂康($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 含量变化比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
空白	11	1.54 $\pm$ 0.50 *	0.28 $\pm$ 0.08 *	0.61 $\pm$ 0.17 *	1.2 $\pm$ 0.22 *
模型	9	3.47 $\pm$ 0.63	0.60 $\pm$ 0.16	0.36 $\pm$ 0.12	2.61 $\pm$ 0.61
血脂康	9	2.28 $\pm$ 0.49 *	0.37 $\pm$ 0.06 *	0.43 $\pm$ 0.12	1.71 $\pm$ 0.68 *
理脾调脂	9	1.87 $\pm$ 0.42 Δ	0.30 $\pm$ 0.08 Δ	0.59 $\pm$ 0.15 $\Delta\Delta$	1.14 $\pm$ 0.48 Δ

注:与模型组比较,* $P < 0.01$;与血脂康组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

2 各组小鼠血脂变化比较(表 2) 用药后,理脾调脂胶囊与血脂康均能显著降低 ApoE^{-/-}小鼠血清的 TC、TG、LDL-C 水平,并能显著升高 HDL-C 的水平($P < 0.05, P < 0.01$)。且理脾调脂胶囊改善 TG、HDL-C 及 LDL-C 的幅度显著高于血脂康($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 含量变化比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
空白	7	2.22 $\pm$ 0.35	0.37 $\pm$ 0.12	0.22 $\pm$ 0.07	1.74 $\pm$ 0.46
血脂康	7	1.49 $\pm$ 0.34 **	0.25 $\pm$ 0.02 *	0.29 $\pm$ 0.08 *	1.11 $\pm$ 0.45 **
理脾调脂	8	1.19 $\pm$ 0.29 **	0.19 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$	0.39 $\pm$ 0.11 $\Delta\Delta$	0.75 $\pm$ 0.34 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,* $P < 0.05, ** P < 0.01$;与血脂康组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

3 各组大鼠肝组织细胞中 PPAR α, γ mRNA 表达比较(表 3) 用药后,血脂康组、理脾调脂组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);理脾调脂组与血脂康组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示理脾调脂胶囊对血脂失调症大鼠肝细胞中 PPAR α, γ mRNA 基因表达有显著的上调作用。

表 3 各组大鼠肝组织细胞 PPAR α, γ mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PPAR α mRNA	PPAR γ mRNA
空白	11	0.055 $\pm$ 0.015 **	0.00102 $\pm$ 0.00033 **
模型	9	0.026 $\pm$ 0.017	0.00046 $\pm$ 0.00018
血脂康	9	0.040 $\pm$ 0.012 *	0.00073 $\pm$ 0.00027 *
理脾调脂	9	0.052 $\pm$ 0.014 $\Delta\Delta$	0.00099 $\pm$ 0.00033 $\Delta\Delta$

注:与模型组比较,* $P < 0.05, ** P < 0.01$;与血脂康组比较, $\Delta P < 0.05$

4 各组小鼠肝组织细胞中 PPAR α, γ mRNA 表达比较(表 4) 用药后,PPAR α, γ mRNA 表达,血脂康组、理脾调脂组与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);理脾调脂组与血脂康组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示理脾调脂胶囊对血脂失调症 ApoE^{-/-}小鼠肝细胞中 PPAR α, γ mRNA 基因表达有显著的上调作用。

表 4 各组 ApoE^{-/-}小鼠肝组织细胞 PPAR α, γ mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PPAR α mRNA	PPAR γ mRNA
空白	7	0.037 $\pm$ 0.011	0.00016 $\pm$ 0.00003
血脂康	7	0.051 $\pm$ 0.015 *	0.00029 $\pm$ 0.00018 *
理脾调脂	8	0.066 $\pm$ 0.017 $\Delta\Delta$	0.00049 $\pm$ 0.00023 $\Delta\Delta$

注:与模型组比较,* $P < 0.05, ** P < 0.01$;与血脂康组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

PPARs 由英国科学家 Issemann 等^[4]于 1990 年首次发现。PPARs 是一类由配体激活的核转录因子,属于 II 型核激素受体超家族成员,包括由不同基因编码的 3 种亚型 α, β, γ ^[5]。

PPAR α 主要在肝脏中表达,可调控多种靶基因的表达,包括参与脂代谢几乎所有过程如脂肪酸摄取、结合与氧化,脂蛋白组合、运输与代谢的基因,是脂代谢关键的调节因子。人工合成的 PPAR α 激动剂可以使 PPAR α 活化,通过脂酰辅酶 A 氧化酶、载脂蛋白 A、脂蛋白脂酶、清道夫受体等 PPAR α 靶基因增加脂肪酸摄取、降低 TG,增加 HDL 合成,在脂代谢中发挥有益的作用。

PPAR γ 除了在脂肪细胞分化中起关键作用外,还在介导脂肪酸氧化及脂质代谢中起重要作用^[6]。PPAR γ 在脂肪细胞中高表达,多种参与脂肪酸转运和代谢的基因在转录水平受 PPAR γ 调控,如脂肪细胞脂肪酸结合蛋白(FABP)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEP-CK)、乙酰辅酶 A 合成酶(ACS)、脂肪酸转运蛋白(FATP)、脂肪酸移位酶(CD36PFAT)及 LPL 等^[7]。PPAR γ 可以调节脂肪酸代谢的各个环节,增加 FATP 和脂肪酸转运酶的表达,刺激细胞对脂肪酸的摄入和向脂酰 CoA 的转化^[8]。PPAR γ 还能选择性诱导 LPL 基因在脂肪组织的表达,调节脂肪细胞的信号转导,减缓脂解速度,从而降低游离脂肪酸的量。

脂代谢紊乱常表现为明显的 TG、TC 升高, HDL-C 降低。PPAR γ 能够诱导肝细胞表达载脂蛋白、脂肪酸氧化酶系与 LPL,从而促进脂质的氧化代谢,降低血脂浓度。动物及临床研究发现^[9],应用 PPAR γ 激动剂噻唑烷二酮类(TZDs),可使血 HDL-C 升高, LDL-C、TG 降低,纠正脂代谢紊乱。PPAR γ 通过增加细胞内磷脂和胆固醇的外流,促进高密度脂蛋白对胆固醇的转运^[10]。

血脂失调症的形成与脾的关系至为密切,这与脾为后天之本,脾主运化的功能密切相关。脾失运化,造成机体的精微(脂质、载脂蛋白等)不能正常化生、变化和转化、排泄,升清(如化生 HDL-C、ApoA-I 等)降浊(如 LDL-C、TG、ApoB 等代谢)功能失调,以致精气的新陈代谢失常,发生了脂质代谢紊乱^[11]。因此,治疗血脂失调症重在调理脾的运化功能。

从本研究结果看,理脾调脂胶囊组 PPAR α 、 γ mRNA 有很强的表达,且显著优于血脂康组。说明理脾调脂胶囊有显著上调血脂失调症大鼠肝脏细胞 PPAR α 、 γ mRNA 的效应。理脾调脂胶囊提高 PPAR α 、 γ mRNA 的可能机制是:通过理脾,激发、增强了脾的运化功能,从整体上改善了机体代谢环境,加强了机体代谢机能,从而为 PPAR α 、 γ mRNA 创造了条件。理脾调脂胶囊具有类似 PPAR α 、 γ 激动剂的作用,促使 PPAR α 、 γ 活化,诱导肝细胞表达载脂蛋白、脂肪酸氧化酶系与 LPL 等,从而促进脂质的氧化代谢,降低血脂浓度。主要体现在使血 HDL-C 升高, LDL-C、TG 降低,以纠正脂代谢紊乱。此种作用与实验结果一致。由此推测,理脾调脂胶囊通过活化 PPAR α 、 γ , 激发脾运化功能,促进机体的新陈代谢机能,使清升浊降,脂质代谢进入良性循环,这可能是理脾调脂胶囊治疗血脂失调症的主要特色所在。

参 考 文 献

- [1] 刘桂荣,周次清,邹勇. 理脾调脂胶囊治疗单纯性血脂失调症临床研究[J]. 山东中医药大学学报, 2002, 26(3): 179-181.
Liu GR, Zhou CQ, Zou Y. Clinical study on treating simple dyslipidemia with Lipi Tiaozhi Capsule[J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2002, 26(3): 179-181.
- [2] 崔爱庆,刘桂荣. 理脾调脂胶囊治疗高三酰甘油血症疗效观察[J]. 山东中医杂志, 2005, 24(7): 398-399.
Cui AQ, Liu GR. Observation of effects of treating hypertriglyceridemia with Lipi Tiaozhi Capsule[J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2005, 24(7): 398-399.
- [3] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25747>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25664>.
- [4] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. Nature, 1990, 347(6294): 645-650.
- [5] Grimaldi PA. The roles of PPARs in adipocyte differentiation[J]. Prog Lipid Res, 2001, 40(4): 269-281.
- [6] Kurosaki E, Nakano R, Shimaya A, et al. Differential effects of YM440: a hypoglycemic agent on binding to a peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its transactivation[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65(5): 795-805.
- [7] Brown JD, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets[J]. Circulation, 2007, 115(4): 518-533.
- [8] Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism[J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(6): 331-336.
- [9] Ahluwalia M, Evans M, Morris K, et al. The influence of the Pro12Ala mutation of the PPAR-gamma receptor gene on metabolic and clinical characteristics in treatment of naive patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes Obes Metab, 2002, 4(6): 376-378.
- [10] Ricote M, Glass CK. New roles for PPARs in cholesterol homeostasis[J]. Trends Pharmacol Sci, 2001, 22(9): 441-443.
- [11] 刘桂荣,袁汝明. 对高脂血症几个问题的探讨[J]. 山东中医药大学学报, 2001, 25(5): 330-332.
Liu GR, Yuan RM. Discussion on several problems about hyperlipidemia[J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2001, 25(5): 330-332.

(收稿:2010-10-11 修回:2011-01-20)