化瘀祛痰方对脾虚型高脂血症大鼠肝脏 SREBP-2 信号通路的干预作用

冷　雪　贾连群　杨关林　王俊岩　朱美林　王　莹　徐　荧

摘要　目的　探讨化瘀祛痰方对脾虚型高脂血症大鼠肝脏固醇反应元件结合蛋白-2(sterol regulatory element binding protein-2, SREBP-2)信号通路的干预作用。**方法**　100 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为空白对照组、高脂血症组、高脂血症治疗组、脾虚型高脂血症组、脾虚型高脂血症治疗组,每组 20 只。空白对照组给予普通大鼠颗粒饲料喂养;高脂血症组和高脂血症治疗组给予高脂饲料;脾虚高脂血症和脾虚高脂血症治疗组采用劳倦过度和饮食不节进行造模,单日除饲喂高脂饲料外,予精炼猪油灌胃,每次 3 mL,每日 2 次,双日喂食甘蓝不限量,造模时间 30 天。高脂血症治疗组和脾虚高脂血症治疗组灌胃化瘀祛痰方煎剂(20 mL/kg),1 次/天,连续 30 天。全自动生化分析仪检测血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C、血清淀粉酶(AMY)水平,间苯三酚法测定 D-木糖排泄率,HE 染色观察肝脏形态变化,油红 O 染色观察肝脏脂质沉积,实时定量反转录－聚合酶链反应(Real time PCR)及 Western blotting 技术检测 HMGCR、CYP7A1、LDL-R、SREBP-2 mRNA 和蛋白表达。**结果**　与空白对照组比较,高脂血症组及脾虚型高脂血症组血清 TC(mmol/L, 1.84 ± 0.19, 2.23 ± 0.43)、LDL-C 水平(mmol/L, 0.99 ± 0.24; 1.13 ± 0.56)显著升高(P < 0.05),HDL-C 水平(mmol/L, 0.41 ± 0.66; 0.41 ± 0.11)及 AMY 活性(mmol/L, 351 ± 45; 153 ± 30)显著降低(P < 0.05),尿 D-木糖排泄率(ng/mL, 26.9 ± 2.1; 15.0 ± 1.7)显著降低(P < 0.05),肝细胞形成脂质沉积,胞浆内多出现脂肪空泡,肝脏 CYP7A1、HMGCR、LDL-R、SREBP-2 mRNA 及蛋白表达显著降低(P < 0.01)。与高脂血症组比较,脾虚高脂血症大鼠血清 TC、LDL-C 水平显著升高(P < 0.05),AMY 及尿 D-木糖排泄率显著降低(P < 0.01),肝脏形成大量脂质沉积,肝细胞萎缩明显,肝脏 CYP7A1、LDL-R、SREBP-2 mRNA 及蛋白表达降低(P < 0.01, P < 0.05);高脂血症治疗组 TC、LDL-C 含量降低(P < 0.05),HDL-C 含量、AMY 活性及 D-木糖排泄率升高(P < 0.05),CYP7A1、LDL-R、SREBP-2 mRNA 及蛋白表达升高(P < 0.01)。与脾虚高脂血症组比较,脾虚高脂血症治疗组 TC 含量降低(P < 0.05),HDL-C 含量、AMY 活性及 D-木糖排泄率升高(P < 0.05),CYP7A1、LDL-R、SREBP-2 mRNA 及蛋白表达升高(P < 0.01)。相应治疗组变化一致。**结论**　脾虚加重血清 TC 水平异常及肝脏脂质沉积,可能与调控 SREBP-2 信号通路中 LDL-R、HMGCR、CYP7A1 基因表达有关,化瘀祛痰方可调控该通路,发挥干预 TC 代谢失常作用。

关键词　脾虚;高脂血症;固醇反应原件结合蛋白 2;化瘀祛痰方;胆固醇

Intervention of Huayu Qutan Recipe on Liver SREBP-2 Signal Pathway of Hyperlipidemia Rats of Pi Deficiency Syndrome

LENG Xue, JIA Lian-qun, YANG Guan-lin, WANG Jun-yan, ZHU Mei-lin, WANG Ying, and XU Ying　*Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera Theory and Applications, Shenyang (110032), China*

ABSTRACT　Objective　To explore the intervention of Huayu Qutan Recipe (HQR) on liver SREBP-2 signal pathway of hyperlipidemia rats of Pi deficiency syndrome (PDS). Methods　Totally 100 SPF grade SD rats were randomly divided into the blank control group, the hyperlipidemia group, the hyperlipidemia treatment group, the PDS hyperlipidemia group, and the PDS hyperlipidemia treatment

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81202834);国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(No. 201133CB531700);沈阳市科学技术计划项目(No.F-12－277－1－49)

作者单位:辽宁中医药大学省部共建中医脏象理论及应用教育部重点实验室(沈阳　110032)

通讯作者:贾连群, Tel:024－31207385, E-mail:jlq-8@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.03.0320

中国中西医结合杂志

group, 20 in each group. Common granular forage was fed to rats in the blank control group. High fat forage was fed to rats in the hyperlipidemia group and the hyperlipidemia treatment group. Rats in the PDS hyperlipidemia group and the PDS hyperlipidemia treatment group were treated with excessive labor and improper diet for modeling. They were administered refined lard by gastrogavage (3 mL each time, twice per day) and fed with high fat forage on the odd days, and fed with wild cabbage freely on even days. The modeling lasted for 30 days. Rats in the hyperlipidemia treatment group and PDS hyperlipidemia treatment group were administered with Huayu Qutan Recipe (20 mL/kg) by gastrogavage, once a day, for 30 successive days. Levels of serum cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and serum amylase (AMY) were detected by automatic biochemical analyzer. D-xylose excretion rate was determined using phloroglucinol method. Morphological changes of liver and the lipid deposition in liver were observed using HE stain and oil red O stain respectively. mRNA and protein expression levels of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR), cholesterol 7α-hydroxylase 1 (CYP7A1), LDL-R, and sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) were detected using real time RT-PCR and Western blotting. Results Compared with the blank control group, serum levels of TC (1.84 ±0.19 mmol/L, 2.23 ±0.43 mmol/L) and LDL-C (0.99 ±0.24 mmol/L, 1.13 ±0.56 mmol/L) were higher in the hyperlipidemia group and the PDS hyperlipidemia group, serum levels of HDL-C (0.41 ±0.66 mmol/L, 0.41 ±0.11 mmol/L) and AMY activities (351 ±45 mmol/L, 153 ±30 mmol/L) were lower, and urinary D-xylose excretion rates were lower (26.9 ±2.1 ng/mL, 15.0 ±1.7 ng/mL) (all $P<0.05$). Lipid deposition occurred in liver cells. Much fat vacuoles occurred in the cytoplasm. Expression levels of HMGCR, CYP7A1, LDL-R, and SREBP-2 mRNA and proteins in liver significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the hyperlipidemia group, serum levels of TC and LDL-C significantly increased ($P<0.05$), AMY activities and urinary D-xylose excretion rates significantly decreased in the PDS hyperlipidemia group ($P<0.01$). A large amount of lipid deposition occurred in liver. The atrophy of liver cells was obviously seen. Expression levels of CYP7A1, LDL-R, and SREBP-2 mRNA and proteins in liver were significantly lower ($P<0.01$, $P<0.05$). Serum levels of TC and LDL-C significantly decreased ($P<0.05$), AMY activities and urinary D-xylose excretion rates significantly increased in the hyperlipidemia treatment group ($P<0.01$). Expression levels of CYP7A1, LDL-R, and SREBP-2 mRNA and proteins in liver were significantly increased ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with the PDS hyperlipidemia group, serum level of TC significantly decreased ($P<0.05$), HDL-C levels, AMY activities and urinary D-xylose excretion rates significantly increased in the PDS hyperlipidemia treatment group ($P<0.01$), expression levels of CYP7A1, LDL-R, and SREBP-2 mRNA and proteins in liver were significantly increased ($P<0.01$). Similar changes occurred in the two treatment groups. Conclusions Pi deficiency exacerbates abnormal serum TC level and the lipid deposition in liver. These might be related to regulating expression levels of LDL-R, HMGCR, and CYP7A1 genes in the SREBP-2 signal pathway. HQR could regulate this pathway to intervene abnormal metabolism of TC.

KEYWORDS Pi deficiency; hyperlipidemia; sterol regulatory element binding protein-2; Huayu Qutan Recipe; cholesterol

脾虚证是以因脾气虚损引起的消化系统功能紊乱为主,免疫、血液、神经等系统功能障碍的一系列脾生理功能失常的病理现象及病证。膏脂的生成与转化皆有赖于脾的健运,脾虚气弱,膏脂转运、输布亦不利,滞留营中,形成高脂血症[1]。脾失健运,水谷精微不归正化,水湿内生,聚而为痰,日久导致动脉粥样硬化(atherosclerosis)的发生[2,3]。由此可见,脾虚运化功能失常是导致血脂异常的关键病机。现代研究证明,低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein, LDL-R)、3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGCR)等基因的改变可引起 TC 代谢异常,而固醇反应元件结合蛋白-2(sterol regulatory element binding protein-2, SREBP-2)作为一种膜结合的转录因子,在 TC 代谢中起中心作用。目前,SREBP-2 信号通路在脾虚大鼠肝脏中表达和脂质代谢异常之间关系的研究鲜有

报道。因此,本实验拟利用脾虚型高脂血症动物模型,以 HMGCR、LDL-R、SREBPR-2、TC7α-羟化酶(cholesterol 7α-hydroxylase, CYP7A)为效应指标,观察脾虚状态时相关基因变化对高脂血症大鼠肝脏 TC 代谢SREBP-2通路影响以及化瘀祛痰方对其的影响作用,并探讨 SREBP-2 信号通路中相关基因的关系,旨在揭示"脾主运化"功能在肝脏脂质代谢中的部分调控机制,为临床"从脾论治"血脂异常提供分子生物学依据。

材料与方法

1　动物　健康雄性 SD 大鼠 100 只,SPF/VAF 级,体重(300 ±10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京) 2012 -0001。饲养于辽宁中医药大学实验动物中心,SPF 级,自由摄食与饮水。温度(22 ±1)℃,湿度 50% ±5%,每天光照与黑夜时间各为 12 h。

2　药物、试剂及仪器　化瘀祛痰方由党参 25 g、黄芪 25 g、绞股兰 15 g、丹参 5 g、茯苓 10 g、法半夏 5 g、石菖蒲 5 g、川芎 5 g、郁金 5 g 组成,以上药材均购于辽宁中医药大学附属医院,由辽宁中医药大学中药教研室鉴定。药材浸泡 1 h 后,武火煮沸,文火煮 20 min,过滤,重复煎 3 次,合并滤液,制成水煎剂,4 ℃冷藏备用。TC、TG、LDL-C、HD-C、血清淀粉酶(AMY)测定试剂盒(购于四川麦克生物科技股份有限公司,批号:0113011);D-木糖试剂盒(购于南京建成生物工程研究所,批号:20130628);Real time PCR 试剂盒(购于 TaKaRa 公司,批号:AK2001);TRIzol(购于 TaKaRa 公司,批号:D9108A)。全部引物由 TaKaRa 公司合成。BCA 蛋白定量测定试剂盒(批号:37B00150)、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(批号:37K00130)、二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(批号:36J00180)、二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(批号:35E00150)均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,一抗兔抗鼠 HMGCR(批号:980787w)、CYP7A1(批号:YEYE24w)、LDL-R(批号:YSLS15w)、SREBP-2(批号:980594w)均购自北京博奥森生物技术有限公司。

3　分组、造模及干预方法　100 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、高脂血症组、高脂血症治疗组、脾虚高脂血症组、脾虚高脂血症治疗组,每组 20 只。空白对照组给予普通大鼠颗粒饲料,其余各组给予高脂饲料(含基础饲料 77.9%,花生油 8%,蔗糖 6%,蛋黄粉 5%,TC1.5%,谷氨酸钠 1%,甲基硫氧嘧啶 0.4%,胆盐 0.2%),自由饮水。空白对照组继续给予普通大鼠颗粒饲料喂养;高脂血症组和高脂血症治疗组继续给予高脂饲料;脾虚高脂血症和脾虚高脂血症治疗组采用劳倦过度和饮食不节法进行造模[4,5],单日除饲喂高脂饲料外,予精炼猪油灌胃,每次 3 mL,每日 2 次,双日喂食甘蓝不限量,造模时间 30 天。采用脾虚和高脂血症模型评估标准[6]进行评价,大鼠出现游泳耐力下降、体重减轻、食量减少、倦怠懒动、皮毛干枯、眯眼、弓背现象,表示造模成功,之后空白对照组和模型组予生理盐水灌胃(20 mL/kg),同时对高脂血症治疗组和脾虚高脂血症治疗组灌胃化瘀祛痰方煎剂(20 mL/kg,约为临床人用药剂量 6 倍),1 次/天,连续 30 天。

4　检测指标及方法

4.1　血脂检测　每组取 20 只大鼠,给药 30 天后,禁食不禁水,称体重,10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,装入抗凝试管中,4 ℃ 3 000 r/min 离心 10 min,取血清分装,-20 ℃保存,待测。全自动生化仪检测血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 含量,检测 AMY 活性。

4.2　D-木糖检测　每组取 10 只大鼠,给药第 30 天,每只大鼠灌胃 3%D-木糖溶液 4 mL,然后收集 5 h 尿液(期间禁食不禁水),记录尿量,每例取 0.5 mL尿液样本,双蒸水稀释 9 倍后,按 D-木糖试剂盒说明书测大鼠尿液 D-木糖排泄率。

4.3　形态学检测　每组取 5 只大鼠,取大鼠肝组织,切成小块,分别多聚甲醛固定及冷冻。肝组织常规 HE 染色,并依据非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[7],光镜下判定各个样本的肝脂肪变性程度;肝组织油红 O 染色,冰冻切片采用修正乙醇法。

4.4　定时定量反转录-聚合酶链反应(Real time PCR)法检测 CYP7A1、HMGCR、LDL-R、SREBP-2 的 mRNA 表达　利用引物 Premier5.0 软件设计 PCR 引物,大连 TaKaRa 公司合成,CYP7A1 上游:5′-AAGCAGGGTGTCGTGGG-3′,下游:5′-GGGACTCGGCTGAAATGA-3′,扩增片段长度为 152bp;HMGCR 上游:5′-CTTTCCGTGCCGTATTCT-3′,下游:5′-TTTAACCCATTGGAGGTG-3′,扩增片段长度为 168 bp;LDL-R 上游:5′-GGGTTCTTGTCCATCTTCC-3′,下游:5′-ACTGGGTTGTCAAAGTTTATG-3′,扩增片段长度为 119 bp;SREBP-2 上游:5′-GTGGGCTGAGAAGAAAGATG-3′,下游:5′-CCAGAGGCAGAAAGGAGAC-3′,扩增片段长度为 121 bp。GAPDH 上游:5′-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3′,下游:5′-TTGCTGTT-

GAAGTCGCAGGAG-3′,扩增片段长度为 150 bp。每组取 5 只大鼠,TRIzol 处理各组肝脏组织,提取总 RNA,逆转录成 cDNA,设定 PCR 反应条件,用 SYBR Green Mater Mix 试剂检测待测基因的 mRNA水平,共重复检测 3 次。用△△CT 法对 Real-time PCR 结果进行相对定量分析。△CT 值为目的基因 CT 值与管家基因(GAPDH) CT 值的差值,△△CT 为各实验组△CT 与空白对照组△CT 的差值。平均相对含量 $=2^{-\triangle\triangle CT}$,为相对于空白对照组 mRNA 的水平。

4.5 Western blotting 法检测 CYP7A1、HMGCR、LDL-R、SREBP-2 的蛋白表达 每组取 5 只大鼠,蛋白裂解液提取各组肝脏组织蛋白,利用 BCA 蛋白定量测定试剂盒对蛋白进行定量。以60 μg蛋白/泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转移至 PVDF 膜,加入一抗,4 ℃封闭过夜,TBST 洗涤 3 次,每次5 min,加入 HRP 标记的二抗。按试剂盒说明书混合发光液 A 和 B,与膜作用5 min 后进行 X 光片曝光。X 光片显影和定影后利用凝胶自动分析成像软件扫描分析结果,以 GAPDH 为内参照,对蛋白条带进行分析。

5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件,多组间统计资料采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *LSD* 方法,数据以$\bar{x}\pm s$ 表示,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 及 AMY 活性比较(表 1) 干预后,脾虚高脂血症组大鼠出现游泳耐力下降、体重减轻、食量减少、粪便时软时溏、倦怠懒动、皮毛干枯、眯眼、弓背现象。实验期间脾虚高脂血症组大鼠死亡 3 只,脾虚高脂血症组治疗组死亡 2 只,最终获取有效实验数据的动物为 95 只。与空白对照组比较,高脂血症组及脾虚高脂血症组血清中 TC、LDL-C 含量升高($P<0.05$),血清 HDL-C 含量及 AMY 活性降低($P<0.05$);与高脂血症组比较,脾虚高脂血症组 TC、LDL-C 含量升高($P<0.05$), AMY 活性降低($P<0.01$);高脂血症治疗组 TC、LDL-C 含量降低($P<0.05$),HDL-C 含量及 AMY 活性升高($P<0.05$)。与脾虚高脂血症组比较,脾虚高脂血症治疗组 TC 含量降低($P<0.05$),HDL-C 含量及 AMY 活性升高($P<0.05$)。

2 各组大鼠尿液 D-木糖排泄率比较(表 2) 与空白对照组比较,高脂血症组及脾虚高脂血症组尿液 D-木糖排泄率降低($P<0.05$)。与高脂血症组比较,高脂血症治疗组尿液中 D-木糖排泄率升高($P<0.05$),脾虚高脂血症组尿液中 D-木糖排泄率降低($P<0.05$)。与脾虚高脂血症组比较,脾虚高脂血症治疗组尿液 D-木糖排泄率升高($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠尿液中 D-木糖排泄率比较 (ng/mL,$\bar{x}\pm s$)

组别	*n*	D-木糖排泄率
空白对照	10	35.6 ± 1.1
高脂血症	10	26.9 ± 2.1 *
高脂血症治疗	10	33.4 ± 1.0 △
脾虚高脂血症	10	15.0 ± 1.7 * △
脾虚高脂血症治疗	10	28.6 ± 2.1 ▲

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与高脂血症组比较,△ $P<0.05$;与脾虚高脂血症组比较,▲ $P<0.05$

3 各组大鼠肝组织病理结果比较(图 1) HE 染色结果:与空白对照组比较,高脂血症组及脾虚高脂血症组均出现不同程度的脂肪变性和空泡样变,变性的肝细胞多为圆形,体积增大,胞浆内多出现脂肪空泡。脾虚高脂血症组脂肪变性程度较高脂血症组严重,脾虚高脂血症组肝细胞萎缩;给药后,高脂血症组和脾虚高脂血症组脂肪变性程度及细胞肿胀减轻,空泡变少,肝细胞的体积大小有所恢复。油红 O 染色结果:与空白对照组比较,高脂血症组及脾虚高脂血症组肝细胞内呈现油红着色,脂滴多,呈弥漫性。而脾虚高脂血症组脂滴情况较高脂血症组程度严重;给药后,高脂血症组和脾虚高脂血症组脂滴减少。

4 各组大鼠肝脏 CYP7A1、HMGCR、LDL-R、SREBP-2 mRNA 表达比较(表 3) 与空白对照组比较,高脂血症组及脾虚高脂血症组肝脏 CYP7A1、HMGCR、LDL-R、SREBP-2 mRNA 表达显著降低($P<0.01$)。与高脂血症组比较,高脂血症治疗组 CYP7A1、LDL-R、SREBP-2 mRNA 表达升高($P<0.01$),脾虚

表 1 各组大鼠血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 及 AMY 活性比较 (mmol/L,$\bar{x}\pm s$)

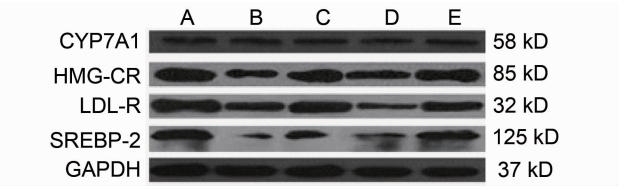
组别	*n*	TG	TC	LDL-C	HDL-C	AMY
空白对照	20	0.65 ± 0.19	1.39 ± 0.41	0.78 ± 0.35	0.66 ± 0.12	417 ± 52
高脂血症	20	0.72 ± 0.10	1.84 ± 0.19 *	0.99 ± 0.24 *	0.41 ± 0.66 *	351 ± 45 *
高脂血症治疗	20	0.68 ± 0.49	1.48 ± 0.23 △	0.84 ± 0.22 △	0.62 ± 0.10 △	381 ± 23 △
脾虚高脂血症	17	0.73 ± 0.15	2.23 ± 0.43 * △	1.13 ± 0.56 * △	0.41 ± 0.11 *	153 ± 30 * △△
脾虚高脂血症治疗	18	0.67 ± 0.14	1.41 ± 0.40 ▲	1.09 ± 0.36	0.59 ± 0.10 ▲	229 ± 28 ▲

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与高脂血症组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与脾虚高脂血症组比较,▲ $P<0.05$

中国中西医结合杂志

高脂血症组大鼠肝脏 CYP7A1、LDL-R、SREBP-2 mRNA 表达降低($P<0.01$)。与脾虚高脂血症组比较,脾虚高脂血症治疗组肝脏 CYP7A1、LDL-R、SREBP-2 mRNA 表达均提高($P<0.01$)。

5　各组大鼠肝脏 CYP7A1、HMGCR、LDL-R、SREBP-2 蛋白表达比较(表4,图2)　与空白对照组比较,高脂血症组及脾虚高脂血症组肝脏 CYP7A1、HMG、LDL-R、SREBP-2 蛋白表达降低($P<0.01$)。与高脂血症组比较,高脂血症治疗组 CYP7A1、LDL-R、SREBP-2 蛋白表达升高($P<0.01$),脾虚高脂血症组大鼠肝脏 CYP7A1、LDL-R、SREBP-2 蛋白表达降低($P<0.01$)。与脾虚高脂血症组比较,脾虚高脂血症治疗组大鼠肝脏 CYP7A1、LDL-R、SREBP-2 蛋白表达升高($P<0.01$)。

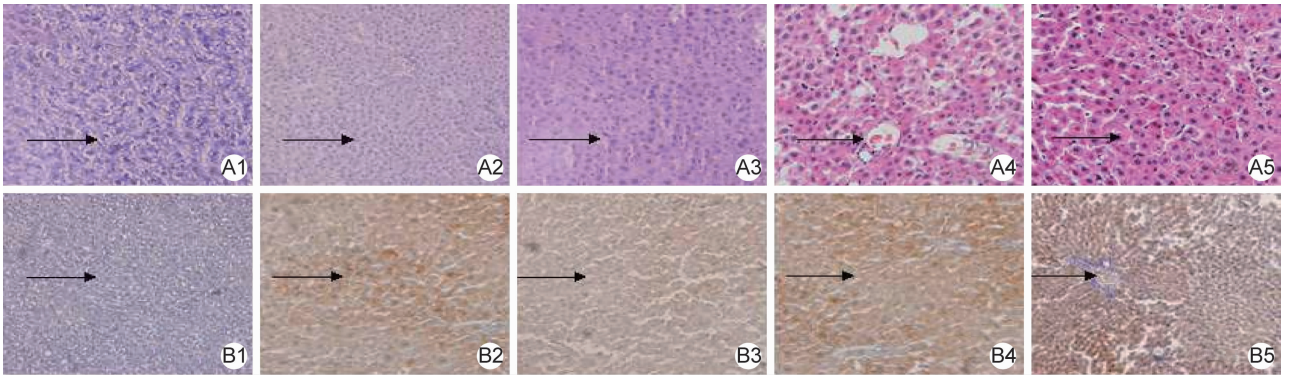


注:A 为空白对照组;B 为高脂血症组;C 为高脂血症治疗组;D 为脾虚高脂血症组;E 为脾虚高脂血症治疗组

图 2　各组大鼠肝脏 CYP7A1、HMGCR、LDL-R 及 SREBP-2 蛋白表达

讨　论

脾主运化,为后天之本,气血生化之源。膏脂属津液范畴,其运化及输布也离不开脾的运化。一旦膏脂在体内的转输、排泄发生异常,则成为病理性的脂



注:A 为 HE 染色;B 为油红 O 染色;1 ~5 分别为空白对照组、高脂血症组、高脂血症治疗组、脾虚高脂血症组及脾虚高脂血症治疗组;箭头所指为肝细胞

图 1　各组大鼠肝组织形态学结果　(×200)

表 3　各组大鼠肝脏 CYP7A1、HMGCR、LDL-R、SREBP-2 mRNA 表达比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CYP7A1	HMGCR	LDL-R	SREBP-2
空白对照	5	1.00 ±0.00	1.00 ±0.00	1.00 ±0.00	1.00 ±0.00
高脂血症	5	0.63 ±0.07 *	0.63 ±0.03 *	0.67 ±0.06 *	0.66 ±0.06 *
高脂血症治疗	5	0.87 ±0.10 △	0.68 ±0.06	0.79 ±0.08 △	0.74 ±0.05 △
脾虚高脂血症	5	0.56 ±0.07 * △	0.66 ±0.07 *	0.43 ±0.11 * △	0.58 ±0.55 * △
脾虚高脂血症治疗	5	0.67 ±0.09 ▲	0.67 ±0.08	0.76 ±0.06 ▲	0.67 ±0.02 ▲

注:与空白对照组比较,*$P<0.01$;与高脂血症组比较,△$P<0.01$;与脾虚高脂血症组比较,▲$P<0.01$

表 4　各组大鼠肝脏 CYP7A1、HMGCR、LDL-R、SREBP-2 蛋白表达比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CYP7A1	HMGCR	LDL-R	SREBP-2
空白对照	5	0.75 ±0.03	0.75 ±0.086	0.75 ±0.004	0.85 ±0.004
高脂血症	5	0.55 ±0.10 *	0.61 ±0.012 *	0.52 ±0.053 *	0.54 ±0.021 *
高脂血症治疗	5	0.73 ±0.50 △	0.66 ±0.027	0.75 ±0.004 △	0.72 ±0.009 △
脾虚高脂血症	5	0.30 ±0.09 * △	0.56 ±0.036 *	0.37 ±0.012 * △	0.33 ±0.020 * △
脾虚高脂血症治疗	5	0.51 ±0.07 ▲	0.64 ±0.013	0.62 ±0.007 ▲	0.57 ±0.019 ▲

注:与空白对照组比较,*$P<0.01$;与高脂血症组比较,△$P<0.01$;与脾虚高脂血症组比较,▲$P<0.01$

中国中西医结合杂志

浊痰湿。脂浊注入血脉，积蓄停留，即可引发高脂血症。高血脂即病理性的膏脂，脾参与了脂质代谢中包括消化、吸收、合成、转运、代谢、分解、清除、排泄等全部过程[6]。因此脾虚与脂类 TC 代谢失常有重要关系。

本研究以中医理论为指导，施以劳倦过度加饮食不节结合高脂饲料喂饲来制备大鼠脾虚型高脂血症模型。结果发现，与空白对照组比较，高脂血症组出现了血脂异常、脂质沉积的变化。与高脂血症组比较，脾虚高脂血症组上述变化进一步加重，并且血清 AMY 及尿 D-木糖排泄率显著降低。对 TC 代谢相关基因进行研究发现，与空白对照组比较，高脂血症组及脾虚高脂血症组大鼠肝脏基因 LDL-R、CYP7A1、HMGCR、SREBP-2 表达显著降低。上述结果表明，本研究选用造模方法成功。

本研究结果显示，当 TC 含量及血脂含量增加时，脾虚高脂血症组 SREBP-2、LDL-R、HMGCR mRNA 表达降低($P<0.01$)，同时相关蛋白表达量也呈现对应变化，从形态学上可以直观看到脾虚加重了病理变化。中医学认为脾虚的实质是脾失健运，“脾运化失司”久则表现为物质及能量转化障碍出现体内的营养物质堆积而形成高血脂症[7]。

SREBP-2 是一种存在于脊椎动物内质网内参与调节细胞 TC 代谢的转录调节物，可直接影响细胞膜上 TC 代谢水平，其可在 TC 含量降低的情况下，增进 HMG-CoA 还原酶、LDL 受体等靶基因的表达，从而升高细胞内 TC 水平，从而调控 TC 及脂肪酸等脂类的代谢过程[8-10]。SREBP-2 作为一种特异的核转录因子主要参与 TC 合成酶的基因调控，常在固醇缺乏的情况下被激活[11,12]，可以说此条通路对脂类 TC 代谢起到了重要的作用。TC 在其中转化为胆汁酸是体内 TC 代谢的重要途径，CYP7A1 是胆汁酸合成的限速酶[13]，HMG 是体内 TC 合成的限速酶[14]，肝脏表面的 LDL-R 的功能是介导血浆中 LDL-C 的含量，可以通过此种方式来调节血浆含量和体内 TC 的水平[15,16]。因此 CYP7A1、HMGCR、LDL-R 与 SPEBP-2 通路对 TC 代谢调节有密切关系。研究显示，TC 代谢受阻发生高脂血症时，CYP7A1 活性表达下降，此时 TC 不能转变为胆汁酸[16]。高 TC 影响肝细胞表面 LDL-R 受体活性减弱，导致肝细胞摄取、转化及排泄 LDL-C 减少，引起血中 TC 和 TG 升高[17]。此时，正常 SREBP-2 通道蛋白水解暴露 SREBP-2 氨基末端，其与 SRE-1 结合，通过与 2 个 spl 位点的协同作用，促进 LDL-R 的高效转录[18]。从而导致 TC 吸收增加。本实验结果显示脾虚高脂血症及高脂血症组的 SREBP-2 表达下降，脾虚高脂血症组下降更明显($P<0.05$)，这很可能由于脾虚引起的脾虚散精不利，血脂化生为痰浊，加重血脂的生成，TC 调控通路受到影响，SREBP-2 通道蛋白不能过多的吸收多余 TC，TC 增高又影响 LDL-R 受体表达降低，HMGCR 的浓度受到 TC 的反馈调节，TC 浓度升高会导致 HMGCR 浓度降低，从而使 TC 的生物合成减少，最终达到控制体内 TC 浓度的目的。

化瘀祛痰方中的丹参具有调节 TC 的生物合成和代谢转化的作用[19]。本实验研究显示化瘀祛痰方能显著提高 CYP7A1、SREBP-2 、LDL-R、HMGCR mRNA 表达水平；同时降低 TG、TC 含量，提高 AMY 活性和 D-木糖排泄率。有资料显示，健脾降脂中药可上调 LDL-R 的表达，促进 TC 内吞进入肝脏代谢转化，降低血清 TC 水平，同时通过上调 LCAT、SR-BI 的表达，增加 TC 的逆转运。既能干扰外源性 TC 的吸收，又能影响内源性 TC 的代谢[19-21]。本实验所用中药对脾虚高脂血症具有一定的缓解作用，可能通过上调 LDL-R 的表达，促进 CYP7A1 转化 TC 为胆汁酸，激活 SREBP-2 通道调控作用，从而降低血清 TC 水平，增加 TC 的逆转运。

综上所述，通过构建脾虚高脂血症组大鼠模型，从 SREBP-2 通路探讨脾虚高脂血症大鼠肝脏 TC 代谢的影响及机制，表明脾的运化功能失常加重 TC 代谢异常，这可能与调控肝脏 SREBP-2 通路的相关基因有关，本实验研究由于样本量有限还存在些许不足，更深入的机制研究仍有待进行。

参 考 文 献

[1] 郑贵力，王煦，王棉之. 王绵之教授治疗高脂血症的学术思想及经验[J]. 北京中医药大学学报，2000，23(2)：48-50.

[2] 熊文生. 从脾论治高脂血症的概况与展望[J]. 新中医，1997，29(5)：58.

[3] 宋剑南，刘军莲，房祥忠，等. 高脂血症和动脉粥样硬化不同痰瘀证候患者血浆蛋白质差异表达谱与脏腑功能的关系[J]. 中西医结合学报，2008，12(6)：1233-1237.

[4] 谭亮，徐超，张琦，等. 旱芹膳食纤维对高脂血症大鼠血脂的影响[J]. 中药新药与临床药理，2010，21(3)：251-253.

[5] 黄永艳. 化痰活血方对高脂血症大鼠调脂作用的机制研究[D]. 武汉：湖北中医学院，2006.

[6] 王晓明，易杰，廖世新，等. 脾虚证动物模型的客观评估[J]. 中华中医药杂志，2006，21(7)：406-408.

[7] 张晨, 赵冰.试论高脂血症与脾虚的关系[J]. 湖北中医学院学报, 2003, 5(1): 9 -10.
[8] 刘功国, 刘桂荣.从脾主运化和转枢谈血脂失调症的治疗[J]. 新中医, 2009, 41(6): 3 -4.
[9] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor[J]. Cell, 1997, 89(3): 331 -340.
[10] Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(20): 11041 -11048.
[11] Radhakrishnan A, Sun LP, Kwon HJ, et al. Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol sensing domain[J]. Mol Cell, 2004, 15(2): 259 -268.
[12] Xu J, Cho H, O'Malley S, et al. Dietary polyunsaturated fats regulate rat liver sterol regulatory element binding proteins-1 and -2 in three distinct stages and by different mechanism[J]. J Nutr, 2002, 132(11): 3333 -3339.
[13] Shimomura I, Shimano H, Horton JD, et al. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells[J]. J Clin Invest, 1997, 99(5): 838 -845.
[14] 李燕, 凌文华.胆固醇和脂肪酸对 CYP7A1 的调节[J]. 国外医学内科学分册, 2004, 31(1): 1 -4.
[15] Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70(7): 2162 -2166.
[16] Angelin B. Regulation of hepatic cholesterol metabolism in man[J]. Ann Med, 1991, 23(2): 177 -180.
[17] Yang TT, Koo MW. Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion[J]. Life Sci, 2000, 66(5): 411 -423.
[18] Navab M, Hama SY, Cooke CJ, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein step 1[J]. J Lipid Res, 2000, 1(4): 148.
[19] 陈宏, 袁施彬.低密度脂蛋白在脂蛋白代谢中的作用及其调控[J].中国畜牧杂志, 2010, 46(19): 72 -76.
[20] 杜莹, 贾连群, 杨关林, 等.健脾降脂中药对脾失健运膏脂转输障碍大鼠肝脏胆固醇代谢相关基因表达的影响[J].辽宁中医杂志, 2014, 41(8): 1753 -1755.
[21] 董波, 于永慧, 刘忠志, 等.脑心通对动脉硬化兔保护作用血管内皮功能的保护作用探讨[J]. 中国中西医结合心脑血管杂志, 2005, 3(4): 328 -329.

(收稿:2014 -04 -15　修回:2014 -11 -15)

2015 全国中西医结合皮肤性病学术年会征文通知

经中国中西医结合学会批准,中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会定于 2015 年 4 月 16—20 日在湖南长沙圣爵菲斯酒店召开 2015 全国中西医结合皮肤性病学术年会。此次会议将发扬历次年会的优良传统,注重中西医结合治疗皮肤病的新方法及新的研究进展等方面的学术交流,内容密切联系临床,切合皮肤科医师的实际需求,会议将邀请知名专家做特邀演讲,阐述皮肤科相关领域的最新研究进展,创造形式多样、内容充实、紧张热烈、活跃互动的学术交流形式,达到全国皮肤科中医、西医、中西医结合医师共同展现才华、获取知识和信息、增强友谊和情感的目的,拟参加会议者请仔细阅读本通知并按规定的时间和要求投稿。

投稿要求:(1)投稿内容:皮肤科各种基础研究论文、皮肤科临床诊断和治疗等方面的论文、典型与疑难病例等;(2)投稿方式:中文全文和 400 字以内的中文摘要,请通过电子邮件投稿,Email: pfkxh@126.com。来稿请注明 2015 会议征文,截稿日期:2015 年 3 月 5 日。(3)会议交流形式:特邀讲演、大会发言、分会发言、书面交流。

联系方式:上海市黄浦区成都北路 500 号峻岭广场 19 楼 1908 室,上海长征医院《中国真菌学杂志》编辑部,邮编:200003,E-mail: pfkxh@126.com,联系人:朱和平,021 -81885501 手机:13671816152。