

四逆散对高脂血症小鼠血脂代谢途径的影响

吴越 朱峰 刘建平 李永民

【摘要】 目的 探讨四逆散对高脂血症 C57BL/6 小鼠脂代谢的影响并初步探讨其机制。**方法** 40 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠作为研究对象,随机分为对照组、模型组、四逆散(0.9 mg/g 体重)组、枳实(0.9 mg/g 体重)组,分别以生理盐水、四逆散水煎剂、枳实水煎剂灌胃,干预时间为 90 天。全自动生化分析仪检测血清甘油三酯(triglyceride, TG),低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C),高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、ELISA 法检测血清载脂蛋白 A-I (apolipoprotein A-I, APOA-I) 水平及实时定量反转录-聚合酶链反应检测肝脏以及小肠组织中 APOA-I 的 mRNA 基因表达情况。**结果** 在脂代谢方面,四逆散干预可显著防止高脂饮食小鼠血清 TG、LDL-C 水平的升高($P<0.05$),显著提升血清中 HDL-C 和 APOA-I 水平($P<0.05$),显著增加肝脏中 APOA-I 的 mRNA 表达程度($P<0.05$)。**结论** 四逆散可能是通过促进肝脏 APOA-I mRNA 表达和增加 APOA-I 分泌来干预血脂水平。

【关键词】 四逆散; 高脂血症; 载脂蛋白 A-I

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.12.003

Effects of Sini powder on blood lipid metabolism in mice with hyperlipidemia WU Yue, ZHU Feng, LIU Jian-Ping, et al. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China
Corresponding author: LI Yong-min, E-mail: liyongmin2001@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of Sini powder on C57BL/6J mice with hyperlipidemia and explore its mechanism. **Methods** 40 C57BL/6 mice were randomly divided into blank control group, hyperlipidemia group, hyperlipidemia plus Sini powder (0.9 mg/g weight) group and hyperlipidemia plus fructus aurantii immaturus (0.9 mg/g weight). Blank control group were fed with normal diet and the other groups were fed with high fat diet. Mice were received gavage administration with corresponding drug, Sini powder and fructus aurantii immaturus were intervened for 90 days. The automatic biochemistry analyzers method was used to measure the levels of TG, LDL-C, HDL-C in serum. Elisa methods were used to detect the APOA-I levels in serum. Real-time PCR methods were used to detect the APOA-I mRNA expression changes in liver and small intestine. **Results** Compared with hyperlipidemia group, Sini powder could decrease the levels of TG and LDL-C ($P<0.05$), increase the levels of HDL-C and improve the level of APOA-I in serum ($P<0.05$). The mRNA expressions of APOA-I in liver was increased in Sini powder combined hyperlipidemia group. **Conclusion** Sini powder may be to promote the expression of mRNA APOA-I in liver and increase APOA-I secretion to interfere with blood lipid level.

【Key words】 Sini powder; Hyperlipidemia; Apolipoprotein A-I

基金项目: 河北北方学院创新人才培育基金(CXRC1319); 河北省中医药管理局课题(2015171)

作者单位: 030024 太原, 山西中医学院(吴越); 河北北方学院中医学院(朱峰、李永民); 中南大学湘雅二医院(刘建平)

作者简介: 吴越(1991-), 2014 级在读硕士研究生。研究方向: 中医药防治心血管疾病。E-mail: dawn_233@163.com

通讯作者: 李永民(1970-), 博士, 教授。研究方向: 中医内科学、中药药理学。E-mail: liyongmin2001@sina.com

高脂血症是指血中脂肪代谢或转运异常而导致的任一或所有的脂质和(或)脂蛋白异常升高。高脂血症的存在增加了高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、冠心病和脑卒中等疾病的发病率,并且影响其严重程度^[1-2]。目前用于干预高脂血症患者的降脂药物可能有导致其转氨酶升高或其他毒副作用产生的风险^[3],在积极干预高脂血症患者及高危人群的血脂水平的同时寻找新的低毒高效的防治药物是目前的迫切需求^[4]。中医学的整体观念对治疗各种疾病具有一定的指导意义和优势,“高脂血症”属于中医“痰湿”“浊阻”等范畴^[5]。高脂血症发病与肝郁脾滞、气机不畅、运化不利而致痰湿郁滞密切相关,其治疗以疏肝健脾、调畅气机、除湿化痰为主。四逆散作为汉代名医张仲景所著《伤寒论》中的经方可达木疏土、安和中州,临床上主要用于治疗肝脾气滞、脾胃虚弱或气机郁遏等证^[6]。在本实验中笔者团队采用高脂饲料喂养的小鼠作为研究模型,观察四逆散对脂质代谢途径的干预。

1 材料

1.1 实验材料

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 40 只,体质量(20 ± 2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物具备实验动物合格证书 SCXK(京)2012-0001 号。实验动物在清洁级层流架中饲养,环境温度(23 ± 2)℃,照明时间每天 12 小时(7:00 ~ 19:00)适应性饲养 1 周后进行试验。

1.2 高脂饲料配置

3% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、0.2% 丙基硫氧嘧啶、5% 白糖、10% 猪油、81.3% 基础饲料,实验动物所用普通饲料和高脂饲料均购于北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2014-0008。

1.3 药品

四逆散中柴胡、枳实、白芍、炙甘草均由中国北京同仁堂(集团)有限责任公司购买。药材洗净后以 10 倍量水煎煮 1.5 小时,倒出滤液,再以 5 倍量水煎煮 1 小时,合并滤液水浴浓缩成每毫升含生药 1.5 g,4℃ 保存备用。

1.4 试剂

总甘油三酯测定试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供;载脂蛋白 A-I 测定试剂盒购自武汉基因美生物医学工程有限公司;TRIzol 法提取

总 RNA 所用 TRIzol 试剂购于 Invitrogen 公司、用于 RT-PCR 的 Prime Script[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser 及 SYBR[®] Premix Ex Taq TM II 试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司,其余试剂为国产分析纯试剂。

1.5 仪器

仪器包括全自动生化分析仪、Thermo Scientific Heraeus Fresco 21 微量离心机、Thermo Multiskan MK3 全自动酶标仪、Thermo Arktik 多功能 PCR 仪、Thermo Scientific NanoDrop 2000、ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪。

2 方法

2.1 动物分组及标本采集

健康雄性 C57BL/6 实验小鼠 40 只,饲养 1 周后随机分为 4 组,每组 10 只:对照组、模型组、四逆散组、枳实组(阳性对照组)。每日给予足量饲料,空白对照组以普通饲料喂养,其余组均以高脂饲料喂养,高脂饲料若第二天还有剩余则用新的高脂饲料代替,自由饮水^[7]。四逆散组用上述四逆散煎液灌胃,剂量 0.02 mL/(g·d),枳实组用上述枳实煎液灌胃,剂量 0.02 mL/(g·d),模型组和空白组用生理盐水灌胃 0.02 mL/(g·d),每天 1 次,以高脂饲料喂养开始连续 90 天,禁食不禁水 16 小时,麻醉后摘眼球取血备用。采血后处死,每只小鼠取肝脏、小肠,焦硫酸二乙酯处理水清洗后分装到焦硫酸二乙酯处理过的冻存管中,液氮冻存备用。

2.2 血清相关指标测定

将全血室温放置 0.5 小时,4000 rpm 离心 5 分钟,取上层血清为测试样品,按试剂盒说明分别测定血清甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、ELISA 法检测血清载脂蛋白 A-I(apolipoprotein A-I, APOA-I)。

2.3 肝脏和小肠中 APOA-I mRNA 表达的检测

TRIzol 法提取小鼠肝脏及小肠总 RNA,组织在液氮中研磨成粉后,每 50 mg 组织加入 1 mL TRIzol,根据 TRIzol 试剂说明书进行总 RNA 提取。按照说明书逆转录。(1)在 RNase free 的离心管内配制混合液:Total RNA:1 μL;5×gDNA Eraser Buffer:2 μL;gDNA Eraser:1 μL;RNase Free dH₂O:up to 10 μL。(2)42℃ 温育 2 分钟以除去基因组 DNA。(3)取上

表 1 APOA-I mRNA 和 β -actin 引物信息

基因名称	上游引物	扩增产物 (bp)
APOA-I	上游引物 5'-GCA CGT ATG GCA AGA TG-3'	386
	下游引物 5'-TAC CAG AAG TCC CGA GTC AAT G-3'	
β -actin	上游引物 5'-CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3'	171
	下游引物 5'-ATG GAG CCA CCG ATC CAC A -3'	

述反应液 10 μ L, 5 \times PrimeScript[®] Buffer2 (for Real Time): 4 μ L; PrimeScript[®] RT Enzyme Mix I: 1 μ L; RT Primer Mix: 1 μ L; RNase Free dH₂O: up to 20 μ L。反转录体系为 37℃ 15 分钟、85℃ 5 秒、4℃, 获取 cDNA 模版。(4) qPCR 反应体系: SYBR[®] Premix Ex Taq II (THIRNaseH Plus) (2 \times): 10 μ L; Primer R (10 μ M): 0.8 μ L; Primer F (10 μ M): 0.8 μ L; ROX Reference Dye (50 \times): 0.4 μ L; cDNA: 2 μ L; dH₂O: 6 μ L。PCR 反应条件为: 20 μ L 反应体系两步法 PCR 扩增, 预变性 95℃ 30 秒, PCR 反应 95℃ 5 秒、60℃ 31 秒, 共 40 个循环。引物信息见表 1。

2.4 统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行多组间比较, 组间两两比较采用 LSD 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, RT-PCR 的结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。

3 结果

3.1 各组小鼠血清 TG、LDL-C、HDL-C 及 APOA-I 水平

与对照组相比, 模型组小鼠血清 TG 和 LDL-C 水平均显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 四逆散组和枳实组小鼠血清 TG 和 LDL-C 水平均显著降低 ($P<0.05$), 四逆散组 HDL-C 水平显著升高 ($P<0.05$)。四逆散组和枳实组 TG 和 HDL-C 水平比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。四逆散组血清 APOA-I 含量明显高于模型组和对照组 ($P<0.05$), 但枳实组 APOA-I 只与模型组有差别 ($P<0.05$), 说明四逆散可通过提高血清 APOA-I 促进脂质在体内的消化。见表 2。

3.2 小肠和肝脏 APOA-I mRNA 基因实时荧光定量方法检测

3.2.1 方法的特异性分析 溶解曲线可见 APOA-I mRNA 基因与 β -Actin RNA 基因的荧光定量产物均呈较为锐利的单一峰 (图 1、图 2), 溶解温度 T_m 分别为 86.1℃ 和 84.9℃。溶解曲线中没有其他杂峰

出现, 可知在用 SYBR Green 荧光染料进行 RT-PCR 检测时, 荧光信号全部为 RT-PCR 扩增产物, 没有其他干扰, 验证了反应的特异性。

表 2 四逆散对高脂血症小鼠血清 TG、LDL-C、HDL-C 及 APOA-I 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	APOA-I (μ g/mL)
模型组	1.65 \pm 0.19 ^a	0.28 \pm 0.04 ^a	2.63 \pm 0.18	1.67 \pm 0.21
四逆散组	0.84 \pm 0.07 ^{ab}	0.16 \pm 0.04 ^b	3.11 \pm 0.28 ^{ab}	2.87 \pm 0.46 ^{ab}
枳实组	0.99 \pm 0.05 ^b	0.18 \pm 0.03 ^b	2.10 \pm 0.34 ^{ab}	2.19 \pm 0.26 ^b
对照组	1.11 \pm 0.11 ^b	0.18 \pm 0.05 ^b	2.64 \pm 0.26	2.07 \pm 0.30

注: 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$ 。

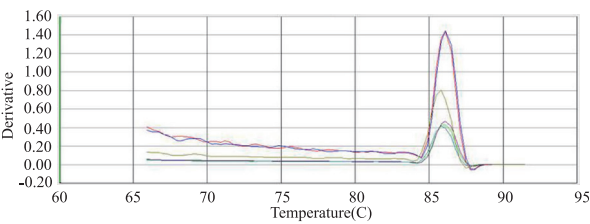


图 1 APOA-I mRNA 扩增产物溶解峰图

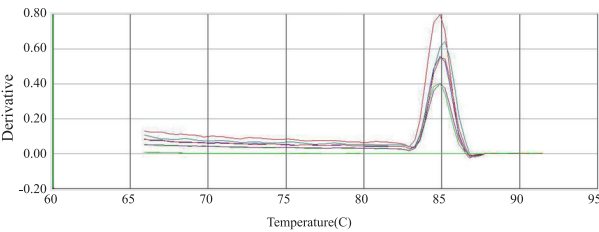


图 2 β -Actin RNA 扩增产物溶解峰图

3.2.2 APOA-I mRNA 基因 在小肠和肝脏中相对表达量在小肠中, APOA-I mRNA 在四个实验组中均有不同的表达, 在四逆散组 APOA-I mRNA 表达量最高, 约为模型组的 2.4 倍, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。对照组 APOA-I mRNA 的表达量约是模型组的 1.5 倍, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 枳实组的 APOA-I mRNA 的表达量与模型组表达量相当, 差异不显著 ($P>0.05$)。在肝脏中, 四逆散组 APOA-I mRNA 的表达量约是模型组的 5 倍, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。枳实组 APOA-I mRNA 的表达量约是模型组的 3 倍, 差异具有统计学意义

($P<0.05$), 对照组 APOA-I mRNA 的表达量约是模型组的 2.2 倍, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。将模型组 mRNA 的相对表达量作为一个单位, 由此计算出四逆散组和小肠和肝脏中 APOA-I mRNA 的相对表达量。四逆散组、枳实组、对照组的肝脏 APOA-I mRNA 的表达量均比小肠中的高。

表 3 APOA-I mRNA 在小肠和肝脏中的相对表达量($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	小肠	肝脏
模型组	1.00±0.06	1.01±0.02
四逆散组	2.44±0.22 ^a	5.20±0.02 ^a
枳实组	1.26±0.02	3.01±0.05 ^a
对照组	1.54±0.06 ^a	2.21±0.15 ^a

注: 与模型组比较, ^a $P<0.05$ 。

4 讨论

脂质在体内的过量积累能够直接引起高脂血症, 进而诱发各种疾病。鉴于饮食是导致人类高脂血症发生的重要原因, 因此在实验研究中模拟高脂血症的发病规律, 用高脂饮食诱导小鼠高脂血症模型以研究相关病理生理改变, 对干预目前高脂血症的发生发展有一定的意义^[8]。

中医治疗高脂血症是以“郁”“痰”“瘀”为根本出发, 四逆散以柴胡疏肝解郁, 透热邪于外; 枳实行气导滞, 散积结于内; 柴胡与枳实配伍可奏升清降浊之功。芍药柔肝养血敛阴, 与柴胡共奏疏经通络之效而无耗伤阴血之弊; 炙甘草益脾和胃而安中。四药合用疏肝和脾, 调达气机, 促进脏腑功能复常, 运化水湿痰液, 避免聚而成痰^[9]。研究证实组成四逆散的四味中药的成分均有不同程度的降血脂作用, 甘草酸通过促进血管壁细胞脂质外流降低了血清 TG、总胆固醇(total cholesterol, TC)水平进而调节血管壁的脂质沉积^[10]。芍药苷可减少动脉粥样硬化模型小鼠血清中 TC 和 TG 水平, 使其腹主动脉脂质沉积显著减少^[11]。柴胡可改善四氧嘧啶诱导的高脂血症小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 升高及 HDL-C 降低的情况^[12]。枳实能够通过改善高脂血症患者内皮功能以降低血清 TC、TG 和 LDL-C 含量, 升高 HDL-C 含量^[13]。本实验证实四逆散可显著干预高脂血症小鼠血清的 TG、LDL-C 上升水平且可升高 HDL-C 的水平。

四逆散降血脂的机制之一可能是影响肝脏 APOA-I mRNA 基因的表达促使 APOA-I 分泌增多,

APOA-I 约占 HDL 蛋白组成的 70%, 因而血清 APOA-I 的浓度与 HDL-C 水平密切相关。新生的 APOA-I 作为 ATP 结合盒式转运子的配体可以促进巨噬细胞内胆固醇流出并为之形成新的 HDL, 新生及圆盘状 HDL 不断地从外周组织摄取磷脂和游离胆固醇逐渐成为成熟的 HDL, 进行脂质结合和分化无脂 APOA-I, 进一步激活卵磷脂胆固醇酯基转移酶促进胆固醇的酯化以实现胆固醇逆向转运^[14-15], 实现胆固醇在肝外组织的清除, 达到干预血脂的目的。

四逆散^[16]具有一定的防止肝损伤的作用且均优于方中单味药柴胡^[17]、白芍^[18]、枳实^[19]和甘草^[20], 在降脂治疗过程配合四逆散干预血脂代谢途径, 可达到降脂保肝目的。

参 考 文 献

- [1] kazuo Shigematsu, Yoshiyuki Watanabe, Hiromi. Nakano Influences of hyperlipidemia history on stroke outcome; a retrospective cohort study based on the Kyoto Stroke Registry[J]. BMC Neurology, 2015, 15(1): 1-6.
- [2] Karcher HS, Holzwarth R, Mueller HP, et al. Body fat distribution as a risk factor for cerebrovascular disease: an MRI-based body fat quantification study [J]. Cerebrovasc Dis, 2013, 35(4): 341-348.
- [3] Michael Demyen, Kawtar Alkhalloufi, Nikolaos T. Pyrsopoulos. Lipid-Lowering Agents and Hepatotoxicity [J]. Clin Liver Dis, 2013, 17(4): 699-714
- [4] Seth S, Martin Erin D, Michos. Mapping Hyperlipidemia in Young Adulthood to Coronary Risk: Importance of Cumulative Exposure and How to Stay Young [J]. Circulation, 2015, 131(5): 445-447.
- [5] 朴胜华, 郭姣, 胡竹平. 高脂血症住院患者中医证候临床研究[J]. 中国中西医结合杂志 2012, 32(10): 1322-1325.
- [6] 张乔, 金阳, 徐瑞鑫, 等. 四逆散有效组分改善睡眠作用与 5-羟色胺能神经系统相关性的实验研究[J]. 中国医药导报, 2012, 14(9): 29-30.
- [7] 陈华. 医学实验动物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2013: 270-273.
- [8] Ma S, Yu H, Zhao Z, et al. Activation of the cold-sensing TR-PM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity[J]. J Mol Cell Biol, 2012, 4(2): 88-96.
- [9] 赵玉敏. 调畅气机在治疗高脂血症中的意义[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(8): 488-489
- [10] 黄金花, 马俐, 杜芬, 等. 甘草酸对动脉粥样硬化斑块的消退作用[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(7): 571-575.
- [11] 吴东方, 靳善睿, 刘娟, 等. 芍药苷抗 ApoE 基因缺失小鼠动脉粥样硬化作用的初步研究[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(5): 385-388
- [12] 邵淑丽, 徐兴军, 马德滨, 等. 柴胡、姜黄对小白鼠实验性高脂血症的预防作用[J]. 中医药学报, 2002, 30(4): 59-60.
- [13] 吴立华, 吉中强, 纪文岩, 等. 枳实对高脂血症患者血脂和内

- 皮功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(3): 283-285
- [14] 吴剑锋, 唐艳艳, 曾高峰, 等. 载脂蛋白 AI 对 HDL 生成影响的研究新进展[J]. 生理科学进展, 2014, 45(2): 81-86.
- [15] Lagerstedt JO, Budamagunta MS, Liu GS, et al. The "beta-clasp" model of apolipoprotein A-I a lipid-free solution structure determined by electron paramagnetic resonance spectroscopy[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1821(3): 448-455.
- [16] 蒋洁云, 徐强. 四逆散及其各组成中药对实验性肝损伤的影响[J]. 中国天然药物, 2004, 2(1): 45-49
- [17] 郑纯威, 丁华熳, 陈宇, 等. 柴胡皂苷改善大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国中医急症, 2011, 20(5): 755.
- [18] 魏伟, 刘家骏, 刘家琴, 等. 白芍总苷对乙型肝炎的治疗作用及其前景[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(5): 596
- [19] 焦士蓉, 黄承钰, 王波, 等. 枳实提取物对实验性糖尿病小鼠肝脏抗氧化防御功能的影响[J]. 卫生研究, 2007, 36(6): 689-693.
- [20] 陈云华, 黄明进, 王文全, 等. 不同来源甘草药材成分含量及其保肝降酶作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 18(19): 113-116.

(收稿日期: 2016-07-22)

(本文编辑: 董历华)