

藏药烈洗的减肥和促进 LDLR 表达的作用研究

□刘忠荣* 白红艳 (成都地奥制药集团药物研究所 成都 610041)
李祖伦 (成都中医药大学 成都 610075)

摘要:目的:探讨藏药烈洗对高脂饮食诱导的肥胖大鼠的治疗作用以及烈洗所含化学成分对低密度脂蛋白受体(LDLR)的影响。方法:采用高脂饮食喂养诱导建立大鼠肥胖模型,检测药物对肥胖大鼠体重、体脂重、脂/体比的影响;建立低密度脂蛋白受体荧光素酶报告基因系统,检测烈洗所含化学成分对荧光素酶活性的影响。结果:烈洗提取物能够明显减轻高脂饮食诱导的肥胖大鼠的体重及体脂重,使脂/体比降低;其所含部分化学成分使荧光素酶活性增强。结论:烈洗对高脂饮食诱导的肥胖具有明显的治疗作用,其所含化学成分具有促进低密度脂蛋白受体表达的作用。

关键词:烈洗 高脂饮食 肥胖 减肥作用 低密度脂蛋白受体

烈洗(*Eugenia caryophyllata* Thunb.)为藏医药物,《晶珠本草》记载:烈洗性热、燥、温,治命脉病,祛寒气,治疮痘病,也舒胸开胃,生胃火、肝火,消食。《藏药志》记载:烈洗辛、燥、温,祛风寒,暖胃,消食,止呃逆,补肾;治风病和“索龙”病,并有麻醉止痛等作用。但迄今为止,国内外文献中尚未见到烈洗具有减肥作用的实验及临床报道,本研究通过高脂饮食喂养建立大鼠肥胖模型,首次探讨了烈洗提取物的减肥作用,并进一步从分子水平揭示了烈洗所含化学成分对与肥胖发生密切相关的低密度脂蛋白受体(LDLR)表达的影响。

一、材料与方法

1. 材料

收稿日期:2005-10-17

修回日期:2005-11-30

* 联系人:刘忠荣,博士,成都地奥制药集团药物研究所所长,研究方向:中药应用与开发,Tel:028-82900608, E-mail:liuzhongrong@diao.com

(1)实验动物。

SD 雄性大鼠,体重 90~120g,由四川省中药研究所实验动物中心提供,合格证号为川实动字第 2002-32 号。

(2)药物及试剂。

烈洗,购于四川省中药饮片有限责任公司,经四川省药品检定所中药室黎跃成老师鉴定符合药用;奥利司他胶囊(商品名赛尼可),瑞士罗氏制药厂生产,上海罗氏制药有限公司分装,分装号为 SH0026,规格:120mg × 21 粒/盒,生产批号: B1559。普伐他汀,上海施贵宝公司产品,批号:0403063;羧甲基纤维素钠,成都科龙化工试剂厂生产,批号,20031201,规格:500g/袋;pGL3-Basic 载体以及荧光素酶检测试剂盒分别购自 Roche 和 Promega 公司;转染试剂,购自太阳马生物工程公司;HepG2 肝癌细胞,ATCC 来源,地奥制药集团药物筛选中心保存;其它有机溶剂

为国产分析纯试剂。

基础饲料:25%的麦粉、22%黄豆粉、20%玉米粉、16%大米粉、10%鱼粉、5%骨粉、1%酵母粉、1%食盐。

高脂饲料:以基础饲料为准,加10%猪油、鸡蛋1~2个、10%奶粉、鱼肝油0.3%、豆芽250g/d,切碎拌入饲料中,每天每只受试动物喂饲量相等,一次喂给。

(3)仪器。

BIO-RAD 微量板读数仪, Benchmark 公司生产; Wallace Victor2 多功能发光检测仪, PerkinElmer 公司产品。

2. 方法

(1) 烈洗化学成分分离提取。

取烈洗原生药4kg,粉碎后加入10倍量水,采用水蒸馏法加热提取8h,收集芳香水,滤渣再加10倍量水,加热回流提取2h,过滤。合并两次滤液,除杂,浓缩,真空干燥,得烈洗水溶性提取物(以下简称为LX-1)。进一步对LX-1进行系统的分离提取和鉴定,得到以下化学成分:(1)丁香苷I、(2)erythrodiol、(3)齐墩果酸、(4) β -谷甾醇、(5)胡萝卜苷、(6)maslinic acid、(7) $2\alpha, 3\beta, 23$ -三羟基齐墩果烷-12-烯-28-酸、(8) $2\alpha, 3\beta, 23$ -三羟基乌苏-12-烯-28-酸、(12)槲皮素;(13)没食子酸。

(2) 肥胖大鼠模型的建立及药物处理。

SD 雄性大鼠100只,体重90~120g,随机取12只作为正常对照组,正常饲料连续喂养2月;其余88只大鼠每日给予高脂饲料,连续喂养2月,每周称取体重2次,计算体重均数、标准差、体重净增值的均数、标准差,然后进行T检验,与基础饲料喂养的同龄大鼠比较有显著性差异,表明肥胖模型建立,将肥胖模型建立的大鼠留作实验用共61只。将61只大鼠称重后随机分为5组,即模型组、阳性药对照组(以奥利司他为阳性对照药物, $0.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、LX-1高剂量组 ($0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、中剂量组 ($0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 和低剂量组 ($0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。将造模动物分别给予相应的药物,连续灌胃1月,给药期间同时分别称量大鼠的体重、饲料消耗量,每周两次,连续1月;1月后

称量体重,处死动物后解剖取大鼠体脂(睾丸及肾脏周围脂肪)并称量,计算脂/体比,结果见表1、2、3。

(3) 低密度脂蛋白受体荧光素酶(LDLR/Luc)报告基因系统的建立及药物处理。

质粒构建:参考文献方法^[1]提取正常肝组织基因组DNA,选取LDLR基因-166至+35这一片段,根据其序列设计引物,并分别在正义和反义引物中加入酶切位点Kpn I和Bgl II,经PCR反应,扩增得到200bp的片段,将其与pGL3-Basic质粒连接,酶切和测序结果表明该片段与LDLR启动子序列一致,由此获得LDLR/Luc报告质粒。

细胞培养及转染:HepG2细胞在含10%小牛血清的DMEM培养基和37℃、5% CO₂条件下维持培养。转染前用0.25%胰酶消化细胞,并用无血清DMEM混悬,按操作说明加入适量质粒和转染试剂进行转染,转染细胞接种于96孔板。

荧光素酶报告基因活性测定:参照荧光素酶检测试剂盒使用说明进行荧光素酶活性测定,吸弃培养细胞中的上清液,每孔加入PBS洗涤细胞两次,加入裂解液40 μl ,室温放置15 min,使细胞充分裂解,加入底物并振荡,在562 nm波长下测定相对发光单位(relative luciferase unit, RLU),光强弱单位代表酶活性的高低。

药物作用判定:细胞转染24 h后,换用新鲜培养基,分别加入烈洗提取物及各成分(终浓度分别为:高剂量组 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、中剂量组 $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、低剂量组 $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$),以普伐他汀(适量生理盐水溶解,终浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作为阳性对照,以空质粒转染作为阴性对照,继续培养24 h后测定荧光素酶活性,RLU值大于转染细胞的3倍以上即可判定为阳性结果。结果见表4,图1、2。

3. 统计学处理

数据用 $\bar{X} \pm s$ 表示,采用t检验对实验数据进行统计分析。

二、结果

1. 对肥胖大鼠体重、体脂重、脂/体比的影响

表1、2和3结果显示,赛尼可连续灌胃给药1

月,对肥胖大鼠的体重增长具有显著的抑制作用,尤其体现在对大鼠的体重净增值上。从表3看,在给予赛尼可的第3周、第4周时,与模型对照组体重比较有显著性差异($P<0.05$);表2结果显示,在给药结束时对体脂重及脂/体比的影响同样具有显著性($P<0.05$)。

表1结果显示,LX-1高剂量组具有降低肥胖大鼠体重增长的趋势;表2结果显示,LX-1高剂量组

能明显降低肥胖大鼠的体脂重和脂/体比,与模型对照组比较有显著性差异($P<0.05$);表3结果显示,LX-1高剂量组对肥胖大鼠的体重净增值亦具有明显的影响,与模型对照组比较,LX-1高剂量组在第3周时对肥胖大鼠的体重净增值具有显著的降低作用($P<0.05$)。因此LX-1高剂量组对高脂饲料造成的肥胖大鼠模型具有明显的抑制体重增长、减少体内脂肪蓄积、减少脂/体比的作用,其对肥胖的治疗

表1 LX-1对肥胖大鼠体重影响($\bar{X} \pm s$)

组别	只数	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	体重(g)				
			给药前	给药1周	给药2周	给药3周	给药4周
正常组	12	-	335.9±33.5	357.4±32.3	375.7±36.6	395.5±41.1	415.6±40.9
模型组	13	-	382.5±29.1**	401.6±27.9**	415.4±32.8**	436.2±37.1*	457.3±35.3*
阳性药组	12	0.06	391.0±36.5**	402.0±39.8	412.2±39.1	424.2±33.7	435.8±34.9
LX-1高剂量组	12	0.8	374.3±35.7**	392.4±39.9	400.8±42.3	406.6±43.5	436.1±44.9
LX-1中剂量组	12	0.4	379.1±36.6**	394.8±34.5	406.0±35.2	421.2±35.9	444.5±31.2
LX-1低剂量组	12	0.2	384.6±54.0**	402.0±47.8	412.1±44.2	418.7±36.7	445.4±61.3

注:与正常组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较:▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

表2 LX-1对肥胖大鼠体脂、脂/体比的影响($\bar{X} \pm s$)

组别	只数	剂量($g \cdot kg^{-1}$)	体脂重(g)	脂/体比
正常组	12	-	10.4±1.99	2.50±0.40
模型组	13	-	15.6±6.25**	3.36±1.22*
阳性药组	12	0.06	10.6±3.37▲	2.41±0.67▲
LX-1高剂量组	12	0.8	11.0±3.23▲	2.51±0.61▲
LX-1中剂量组	12	0.4	15.2±4.75	3.41±0.99
LX-1低剂量组	12	0.2	15.7±6.49	3.42±1.12

注:与正常组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较:▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

表3 LX-1对大鼠体重净增值的影响($\bar{X} \pm s$)

组别	只数	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	给药后体重净增值(g)			
			1周	2周	3周	4周
正常组	12	-	21.5±11.4	39.8±19.1	59.6±22.4	79.8±23.2
模型组	13	-	19.2±12.8**	33.0±18.9**	53.7±26.5*	74.8±33.0*
阳性药组	12	0.06	10.5±8.0	20.4±8.9	32.4±12.4▲	44.0±16.8▲
LX-1高剂量组	12	0.8	18.1±12.7	26.4±16.4	32.3±22.8▲	61.8±31.7
LX-1中剂量组	12	0.4	15.7±11.2	27.0±20.1	42.1±22.0	61.8±27.6
LX-1低剂量组	12	0.2	17.5±14.8	27.5±25.5	34.2±32.7	60.8±32.5

注:与正常组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较:▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

是有效的,中、低剂量组具有抑制体重增长的作用趋势。

2. 对 LDLR/Luc 荧光素酶活性的影响

表 4 结果表明,LX-1 对 LDLR/Luc 荧光素酶活性没有明显的影响;但从烈洗中分离的各种化学成分中,齐墩果酸和 Maslinic acid 对 LDLR/Luc 荧光素酶活性表现出激活作用。

图 1 结果显示,与转染组细胞比较,Maslinic acid 3 个剂量组均显著增强 HepG2 细胞 LDLR/Luc 荧光素酶活性(P 分别<0.01 和 0.05);阳性药物普伐他汀诱导的荧光素酶活性非常显著(P<0.01),这表明了检测方法的可靠性。

图 2 结果显示,与转染组细胞比较,齐墩果酸中、低剂量组显著增强了 HepG2 细胞 LDLR/Luc 荧光素酶活性(P<0.05);阳性药物普伐他汀诱导的荧光素酶活性非常显著(P<0.01)。

三、讨 论

肥胖是一种多因素引起的疾病,既有遗传倾向,又有非常强的环境危险因素。近年来的研究表明,肥胖的发生与遗传基因、环境因素、膳食结构等多种因素有关,遗传因素大约占 25~40%,环境因素中,高脂饮食是引起肥胖的主要原因。因此,我们采用高脂饮食诱导成功建立了肥胖大鼠模型^[2]。

在本实验中,烈洗提取物作用于高脂饮食诱导的肥胖大鼠,显著降低了肥胖大鼠的体重、体脂重及脂/体比,说明烈洗具有明显的减肥作用。由于高脂饮食诱导的肥胖的形成与大鼠摄入并吸收过量的脂肪以及碳水化合物密切相关,因此烈洗的减肥作用极有可能是通过抑制脂肪和/或碳水化合物的吸收实现的,但其确切的减肥作用机理尚有待于进一步的实验加以验证。

低密度脂蛋白受体(LDLR)为一种膜受体蛋白,存在于多种组织如肝脏、动脉平滑肌、血管内皮以及淋巴、单核巨噬细胞等细胞膜表面。LDLR 在脂蛋白代谢和胆固醇代谢方面起着重要作用,尤其肝细胞 LDLR 是血浆低密度脂蛋白(LDL)和胆固醇代谢的主要途径^[3]。LDLR 的表达受固醇调节元件结合蛋白

(SREBP)调控,SREBP 存在于细胞内质网膜上,水解后以活性形式转移至细胞核,与 LDLR 编码基因上游启动子序列或称固醇调节元件(sterol regulatory element,SRE)结合,启动下游 LDLR 基因的表达^[4-6]。

表 4 烈洗提取物对 LDLR/Luc 荧光素酶活性的影响烈洗提取物 LDLR/Luc 荧光素酶活性

烈洗提取物	LDLR/Luc 荧光素酶活性
LX-1	-
1	-
2	-
3	+
4	-
5	-
6	+
7 和 8	-
12	-
13	-

注:“+”表示具有影响,“-”表示没有影响

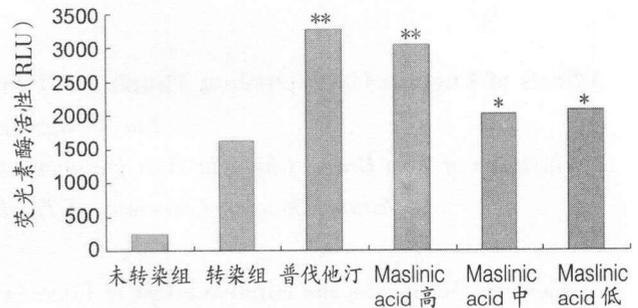


图 1 Maslinic acid 对 LDLR/Luc 荧光素酶活性的影响

注:与转染组比较 *P<0.05, **P<0.01

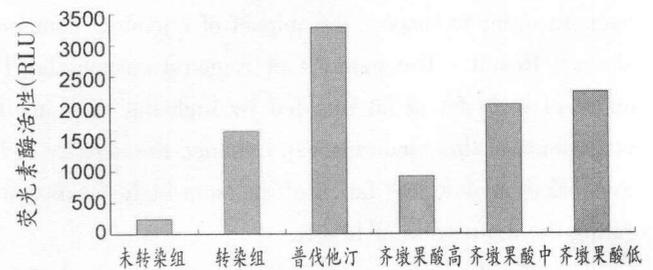


图 2 齐墩果酸对 LDLR/Luc 荧光素酶活性的影响

注:与转染组比较 *P<0.05, **P<0.01

为此,我们采用 LDLR/Luc 报告基因检测系统,将 LDLR/Luc 基因转染至 HepG2 细胞,检测了烈洗提取物对 LDLR 启动子活性的影响,结果烈洗中所含成分齐墩果酸和 Maslinic acid 显著诱导 LDLR 启动子调控的荧光素酶基因表达,阳性药物普伐他汀也非常显著地诱导了荧光素酶活性,即增强了 LDLR 启动子活性,进一步证实了烈洗对 LDLR 的作用,也表明烈洗的作用是通过激活 LDLR 基因上游的 SRE,进而启动了 LDLR 基因转录和表达。由此可以推测,烈洗进入体内,可能上调肝脏 LDLR 表达,加速肝脏摄取低密度脂蛋白胆固醇(LDLc),使血浆胆固醇的清除加快,从而起到降低血浆低密度脂蛋白的作用。

本文实验研究结果充分证实了烈洗治疗肥胖及促进低密度脂蛋白受体表达的作用,为烈洗作为减肥药物的开发提供了初步实验依据,同时也为从民族药物中开发具有减肥作用的药物提供了新的选择。

参考文献

- 1 Kamal D.Methta, Ruixin Chang, Joey Underwood, et al. Identification of a Novel cis-Acting Element Participating in Maximal Induction of the Human Low Density Lipoprotein Receptor Gene Transcription in Response to Low Cellular Cholesterol Levels. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996, 52(271): 33616~33622.
- 2 戴经銓. 肥胖与减肥药研究的新动向. *国外医药-合成药·生化药·制剂分册*, 2002, 23(3): 142~146
- 3 Osono Y, Woollett LA, Herz J, et al. Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. *J Clin Invest*, 1995, 95: 1124
- 4 Ness GC, Eales S, Lopez D, et al. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression by sterols and non-sterols in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys*, 1994, 308: 42
- 5 Ness GC, Zhao Z, Lopez D, et al. Inhibitors of cholesterol biosynthesis increase hepatic low density lipoprotein receptor protein degradation. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 325: 242
- 6 Ness GC, Chambers CM, Lopez D. Atorvastatin action involves diminished recovery of hepatic HMG-CoA reductase activity. *J lipid Res*. 1998, 39: 75.

Effects of *Eugenia Caryophyllata* Thunb. on Reduction of Obesity and Stimulation of LDLR Expression

Liu Zhongrong and Bai Hongyan

(Institute of New Drugs, Chengdu Diao Pharmaceutical Group, Chengdu 610041, Sichuan Province, China)

Li Zulun (Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)

Objective To discuss the curative effect of *Eugenia caryophyllata* Thunb., a traditional medicine of Zang nationality in China, on fat rats forced by high-fat diet and the effect of its chemical components on LDLR. **Method** To select high-fat diet for rats in order to establish a model of fat rats and then inspect the impact of the said medicine on the weight, the weight of body fat and body/weight ratio of the fat rats, and to establish a gene system of LDLR luciferase report in order to inspect the impact of chemical components of *Eugenia caryophyllata* Thunb. on the activity of luciferase. **Result** The extracts of *Eugenia caryophyllata* Thunb. can apparently be able to reduce the weight and the weight of body fat of fat rats fed by high-fat diet and lower down their body/weight ratio, and part of the chemical components of this medicine can enhance the activity of luciferase. **Conclusion** *Eugenia caryophyllata* Thunb. has obvious effect of reducing fat resulting from high-fat diet and its chemical components are endowed with the role of stimulating the expression of LDLR.

Key Words: *Eugenia caryophyllata* Thunb., high-fat diet, obesity, effect of reducing fat, LDLR

(责任编辑:付建华 王 瑀,英文译审:秦光道)