

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.26.009

银灵通胶囊调节实验性高脂饮食大鼠血脂的研究

刘才冬¹ 侯亚义² 蒋云¹ 金铃^{1△}

(1 南京医科大学附属南京医院检验科 江苏 南京 210093 ;

2 南京大学医学院 & 南京大学国家生物医药技术重点实验室 江苏 南京 210093)

摘要 目的 探究银灵通胶囊对脂质代谢的影响及其机制。方法 建立大鼠高脂模型,用药后检测其血脂、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,检测肝脏组织的高密度脂蛋白受体 SR-BI、低密度脂蛋白受体(LDLR)、氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)受体 CD36 蛋白表达的 mRNA 表达水平,检测血管组织学变化。结果 高脂饮食明显升高大鼠血清中总胆固醇(CH)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和动脉硬化指数(AI 值),银灵通胶囊可降低上述指标,且呈一定的浓度依赖;高脂饮食可增加肝脏中 SR-BI 及 CD36 表达,降低 LDLR 表达,银灵通胶囊引起 SR-BI 的过度表达,使 LDLR 表达增加,CD36 表达下降。高脂饮食使血清中 MDA 的含量增加,给予银灵通胶囊后,明显降低血清 MDA 的含量。结论 银灵通胶囊具有调节脂质代谢,抗动脉粥样硬化(AS)及抗脂质过氧化作用。其机制与银灵通胶囊能引起肝脏中 SR-BI 的过度表达及 LDLR 表达增加,降低肝脏中 CD36 表达和血清 MDA 含量有关。

关键词 银灵通胶囊 脂质代谢 动脉粥样硬化

中图分类号 Q95-3 R285.5 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2015)26-5038-04

The Study of Regulating Serum Lipids by Yinlingtong Capsules in Experimental High-fat Diet

LIU Cai-dong¹, HOU Ya-yi², JIANG Yun¹, JIN Ling^{1△}

(1 Nanjing First Hospital, Nanjing, Jiangsu, 210093, China;

2 Nanjing University Medical School & State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu, 210093, China)

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of Yinlingtong capsules to lipid metabolism. **Methods:** After rat hyperlipidemia model was prepared by the high-fat diet, the different doses Yinlingtong capsules were administered by one time every two days. After three consecutive months, the serum lipid, malonic aldehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), high density lipoprotein receptor SR-BI, LDL receptor (LDLR), oxidation of low-density lipoprotein (ox-LDL) detection of liver tissue) receptors CD36 protein expression of mRNA levels and the vascular histological changes were detected. **Results:** The serum total cholesterol (CH), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and atherogenic index (AI values) of the high-fat diet were significantly increased in the high-fat rat, and Yinlingtong capsules could reduce the above-mentioned indicators a dose dependent. Fat diet can increase the liver in SR-BI and CD36 expression, reduce LDLR expression, and Yinlingtong capsules led to the overexpression of SR-BI LDLR and decrease of CD36 expression. High-fat diet increased serum MDA content, and Yinlingtong capsules could significantly lower serum MDA content. **Conclusion:** Yinlingtong capsules could regulate lipid metabolism, anti-atherosclerosis (AS), and anti-lipid peroxidation in the high-fat rat. The mechanisms were related with overexpression of SR-BI, LDLR in the liver and reducing CD36 expression in the liver and serum MDA.

Key words: Yinlingtong capsules; Lipid metabolism; Atherosclerosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)26-5038-04

前言

银灵通胶囊是由银杏叶提取物^[1]和灵芝孢子提取物^[2]配合而成的复方制剂,它富含银杏黄酮、内酯、灵芝多糖和三萜类化合物。在临床研究中证实,银灵通胶囊具有调节患者微循环的

功效,对高血压、高血脂和冠心病患者就有一定的缓解作用,但具体机理不明。其主要成分中银杏黄酮能扩张血管,降低血管脆性和渗透性,促进大脑血液循环,从而发挥抗动脉硬化和抑制血栓的形成,达到改善微循环的功效。目前,对脂类代谢的调节功能还缺乏相关报道。本实验通过高糖高脂饮食建立大鼠脂类代谢失衡模型,给予不同剂量的银灵通胶囊后观察其对血脂代谢紊乱的干预作用,探讨其调节脂肪代谢的具体分子^[3-5]。

1 材料和方法

作者简介 刘才冬(1982),男,硕士研究生,主要研究方向 基础医学
△通讯作者 金铃, E-mail: 511573504@qq.com
(收稿日期 2015-04-08 接受日期 2015-04-27)

1.1 实验材料

药物 银灵通胶囊,由南京中科药业有限公司馈赠。实验动物 SD 大鼠,4-6 周龄,雌性大鼠 40 只,180-250 g,购于扬州大学比较医学中心。实验进行前,大鼠在动物房饲养 1 周,在室温条件下,自由摄食和饮水。

1.2 高脂模型建立

动物检疫期后进行动物分组 40 只大鼠分为 4 组,每组 10 只,分别为:对照组(喂以正常饲料),高脂组(喂高脂饲料),低剂量组(喂高脂饲料同时喂以银灵通胶囊 50 mg/kg),高剂量组(喂高脂饲料同时喂以银灵通胶囊 250 mg/kg)。饲料购买于南京安立默科技发展有限公司(批号,S20130304),其中高脂饲料配方在正常饲料中添加配方如下:78.8%基础饲料、1%胆固醇、10%蛋黄粉和 10%猪油、0.2%胆酸钠^[6]。给药采取灌胃方式,两天一次,连续 3 个月取各组织样本用以下检测。

1.3 血清学检测指标

1) 血脂指标检测 给药结束后,眼眶取血后,取血清进行血脂指标检测。血总胆固醇(CH)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),用全自动生化分析仪(奥林巴斯 5300)常规方法测定。并进行动脉硬化指数 AI 的评判,AI=[CH-HDL]÷HDL^[7-9]。

2) 抗氧化应激指标检测 收集血清后,-80℃保存备用,按照试剂盒说明书用 ELISA 试剂盒检测血清中过氧化脂质指标 MDA(CSB-E08559r,武汉华美生物工程有限公司)、SOD(KB-R3891,上海凯博生化试剂有限公司)和 GSH-Px(CSB-E12146r,武汉华美生物工程有限公司)的活性^[10]。

1.4 肝脏组织中相关脂质代谢受体的 mRNA 表达水平检测

实验结束后,用 0.1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,在无菌条件下迅速取出部分肝左叶,置于 DEPC 处理的离心管中,-80℃冰箱冻存。取出组织块,在液氮冷冻条件下将组织捣碎成粉末,按照凯基生物公司的 RNA 抽提试剂盒进行 RNA 抽提,将提取出 RNA 产物进行逆转录,操作按照逆转录试剂盒说明进行,反转录产物于 -20℃冰箱中保存备用。采用以 β -action 为内参基因,用 Q-PCR 方法计算目的基因 LDLR、HDLR 和 CD36

的 mRNA 表达量^[11-13]。引物序列如下 LDLR 5'-GTGGCA GTAGTGAGTGTATC-3'和 5'-ATCCCAAAGACGAGAAGT-3'; CD36: 5'-GTGGCA AAGAATAGCAGCAAGA-3'和 5'-AAGAT-GGCTCCATTGGGTTGTA-3'; SR-BI 5'-GTTCCCTTCTACTTG-TCCGT-3'和 5'-CGTTCCACTTATCCACCAGAT-3'; β -action: 5'-CACTGTGCCCATCTATGAGGGTTAC-3'和 5'-AACCCTGCT-CATTGCCG ATAGTGAT-3'。

1.5 组织学检测

动物解剖后 取冠状动脉血管长约 1 cm,先用生理盐水冲洗,后予 10% 中性甲醛溶液固定 24 h,逐级酒精脱水,石蜡包埋,常规切片,HE 染色,Weigert 染色,乙醇分化,二甲苯透明,中性树胶封固,显微镜下摄片^[14-16]。

1.6 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件,计量资料用 $\bar{X} \pm SD$ 表示,治疗前后资料均数间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 银灵通胶囊对血脂的影响

见表 1。与对照组相比,高脂饮食明显升高大鼠血清中 CH (14.73 ± 1.2 VS 3.05 ± 0.63)、TG (2.07 ± 0.51 VS 1.02 ± 0.27) 和 LDL-C (8.73 ± 1.46 VS 3.34 ± 0.69),而对极低密度脂 VLDL-C 和 HDL-C 没有影响。当给予银灵通胶囊后升高的这些指标均有一定的下降,且高剂量组 CH (6.23 ± 1.78 VS 14.73 ± 1.2) 和 TG (1.13 ± 0.32 VS 2.07 ± 0.51) 与高脂组有统计差异 ($P < 0.05$),而其它血脂指标没有明显的下降趋势。根据所得的数据,进行各组动物的动脉硬化指数 AI 进行统计分析,AI 值能反映动脉粥样硬化程度。数值越小动脉硬化的程度就越轻,引发心脑血管病的危险性就越低,数值越大动脉硬化的程度就越重,发生心脑血管病的危险性就越高。结果(图 1)显示 高脂饮食组的 AI 值 (6.5 ± 3.2) 与正常对照组 (1.8 ± 0.4) 比较明显升高,而进行银灵通胶囊后 AI 的值明显下降,且高剂量组 AI 值下降与高脂组有统计学差异 ($P < 0.05$),但没有降到正常对照组水平。

表 1 银灵通降低血清中血脂指标水平

Table 1 YLevels of serum lipid reduced by Yinlingtong capsules

组别(Group)	CH(mmol/l)	TG(mmol/l)	LDL-C (mmol/l)	VLDL-C (mmol/l)	HDL-C (mmol/l)
正常组(Normal group)	3.05 ± 0.63	1.02 ± 0.27	3.34 ± 0.69	0.68 ± 0.17	1.34 ± 0.23
高脂组(Fat group)	$14.73 \pm 1.2^*$	$2.07 \pm 0.51^*$	$8.73 \pm 1.46^*$	0.58 ± 0.29	1.68 ± 0.45
低剂量组(Low-dose group)	8.72 ± 3.72	1.57 ± 0.43	7.02 ± 2.3	0.42 ± 0.12	1.44 ± 0.32
高剂量组(High dose group)	$6.23 \pm 1.78^{\#}$	$1.13 \pm 0.32^{\#}$	5.94 ± 3.2	0.42 ± 0.13	1.32 ± 0.27

注 * 表示与对照组比较 $P < 0.05$, # 表示与高脂组比较 $P < 0.05$ 。

Note: *: compared with control group $P < 0.05$, #: compared with the high-fat group $P < 0.05$.

2.2 银灵通胶囊对肝脏组织中相关脂质代谢受体的 mRNA 表达水平的影响

如图 2 所示,银灵通胶囊引起肝脏中 SR-BI 受体的过度表达 ($P < 0.01$),从而增强 HDL 的胆固醇逆转运功能而防止动脉粥样硬化的发生。高脂饮食使肝脏中 LDLR 受体降低,从而使

血清中 LDL 增加,银灵通胶囊使用后使 LDLR 表达增加,从而降低了血清中 LDL 降低 ($P < 0.05$),减少了动脉粥样硬化的发生。高脂饮食使肝脏中 CD36 表达升高,增加了动脉粥样硬化的风险,银灵通胶囊可能通过降低 CD36 而起到调整血脂及抗动脉粥样硬化作用 ($P < 0.05$)。

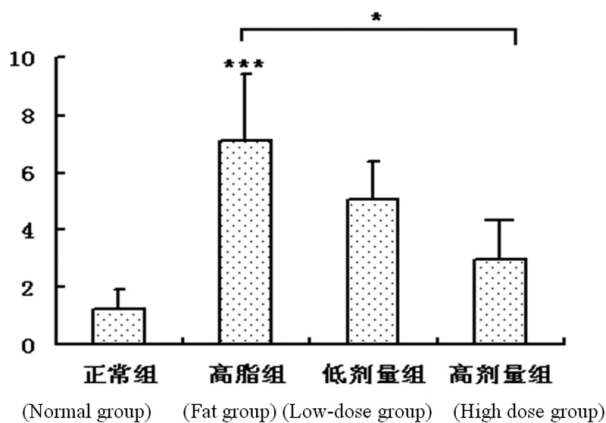


图 1 各组动脉粥样硬化指标 AI 的比较

Fig. 1 Compare each group's atherosclerotic index of AI

2.3 冠状动脉组织学检查

组织学结果表明,与正常组相比(图 3A),高脂组(图 3B)血管内膜脱落,内皮细胞体积增大,细胞间连接间隙增宽(箭头处),内膜有大量单核细胞浸润(圆圈处),中膜见合成型平滑肌

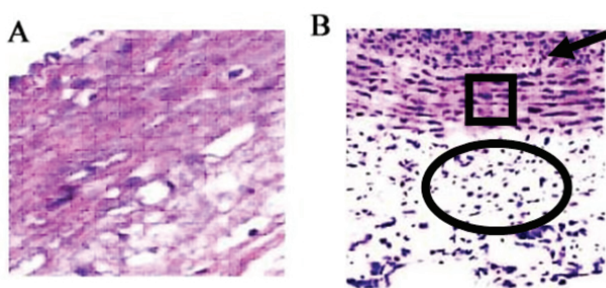


图 3 冠状动脉组织学检查 (100×)

Fig. 3 Histological examination of the coronary (100×)

2.4 抗氧化应激指标的影响

图 4 显示,高脂组大鼠外周血中 MDA 水平显著高于正常对照组 ($P < 0.01$),而当服用银灵通胶囊后对高脂大鼠血液中 MDA 升高有一定的抵抗作用,且有一定的剂量依赖性,其中高剂量组 MDA 的抑制作用高于低剂量组。在试验过程中没有发现对 SOD 和 GSH-Px 没有影响。

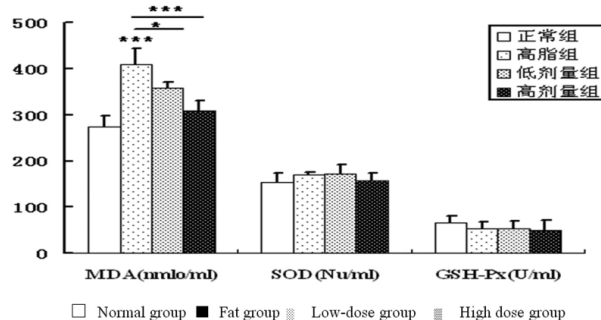


图 4 各组氧化应激相关指标的检测

Fig. 4 Detection of oxidative stress-related indicators in each group

3 讨论

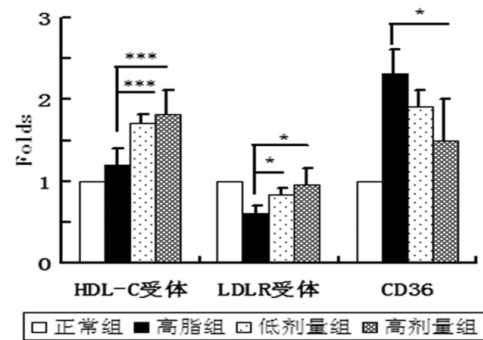
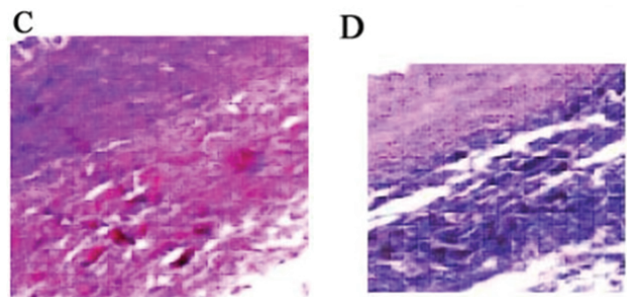


图 2 大鼠肝脏组织中相关脂质代谢受体的 mRNA 表达水平

Fig. 2 mRNA expression levels of Lipid metabolism-related receptor in rat liver tissue

细胞(方框处)而给予银灵通胶囊后(图 3C,D)病变程度比较轻,内膜尚完整且较平坦,内膜增厚的程度以及黏附于内皮和浸润于内膜下的单核细胞较 B 组明显减少。结果表明,银灵通胶囊抑制了动脉硬化形成,且抑制了内膜单核细胞的浸润。



随着我国人民生活水平提高和饮食习惯改变,高脂血症引发的各种疾病越来越为人们所重视。高脂饮食使血清中的总胆固醇、低密度或极低密度脂蛋白、甘油三酯的浓度长期维持一个较高水平,银灵通胶囊作为保健品,其在调节血脂方面的功能越来越受到人们的重视。

在肝脏中,高密度脂蛋白通过与肝细胞膜上的 SR-BI^[17]受体结合后,肝细胞能将其中的胆固醇摄取并转化成胆汁酸排出体外,从而起清除血浆胆固醇的作用,以防动脉粥样硬化的发生。此外,肝脏表面的 LDLR 可介导血浆中 LDL-C 和 VLDL-C 的清除^[18],肝脏可以通过此种方式来调节血浆 LDL-C 含量和体内胆固醇的水平。CD36 是 oxLDL 的高亲和力受体,其作用是识别和内存 oxLDL,而 oxLDL 可通过诱导 CD36 表达来刺激其对本体的摄取,使此循环继续进行下去,造成胆固醇在细胞内积累,最终导致泡沫细胞的形成,构成动脉粥样硬化损害的核心基础^[19,20]。

有研究表明,银灵通的活性成分具有降低血液甘油三酯含量,提高高密度脂蛋白的活性,对冠心病、心绞痛、高血脂有良好的功效脂蛋白的含量和红细胞超氧化物歧化酶。本实验从银灵通对动脉粥样硬化损害的核心基础进行相关系统性研究,更具有有一定的目的性。本实验观察到,银灵通胶囊可以通过增加肝

脏组织中 SR-BI 和 HDLR 受体的表达,并降低 CD36 的表达,从调节高脂饮食大鼠血脂水平,缓解高脂饮食所造成的冠状动脉的病变程度。但银灵通胶囊作为一个中药复方制剂成分复杂,具体调控的有效成分及其作用机理还需进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] 李娟莉,张志雄.银杏叶提取物对慢性间歇性缺氧大鼠肺动脉高压血管内皮损伤的保护作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2011, 11(9):1352-1354
Li Juan-li, Zhang Zhi-xiong. Protective effect of Ginkgo biloba extract on rats with chronic intermittent hypoxic pulmonary vascular endothelial injury in high pressure [J] Journal of Medicine cardiovascular diseases, 2011, 11 (9): 1352-1354
- [2] 王亚东,王海玉,张桂霞,等.三七和灵芝孢子粉提取物对高血脂模型大鼠降血脂作用的实验研究 [J]. 实用预防医学,2006,6(13): 1452-1453
Wang Ya-dong, Wang Hai-yu, Zhang Gui-xia, et al. Experimental study of Panax and Ganoderma spore powder extract on lipid-lowering effects of high blood lipids in rats [J]. Practical Preventive Medicine, 2006,6 (13): 1452-1453
- [3] O Flaherty JT, Wykle RL. Biology and biochemistry of platelet-activating factor[J]. Clin Rev Allergy, 2003, 1:353-367
- [4] Macmanus LM, Pinckard RN. PAF, a putative mediator of oral inflammation[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2010, 11(2):240-258
- [5] Chen J, Yang L, Foulks JM, et al. Intracellular PAF catabolism by PAF acetylhydrolase counteracts continual PAF synthesis [J]. J Lipid Res, 2007, 48(11):2365-2376
- [6] 徐淑云,卞如瀛,陈修.药理学实验方法学[M].北京:人民卫生出版社, 2005: 203-207
Xu Shu-yun, Bian Ru-lian, Chen Xiu. Pharmacological experiments methodology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 203-207
- [7] Kang NH, Lee WK, Yi BR, et al. Risk of cardiovascular disease is suppressed by dietary supplementation with protamine and chitoooligosaccharide in Sprague-Dawley rats [J]. Mol Med Report, 2012, 12(5): 212-214
- [8] Karabina SA, Ninio E. Plasma PAF-acetylhydrolase: an unfulfilled promise?[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1761:1351-1358
- [9] Tselepis AD, Chapman MJ. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor acetylhydrolase[J]. Atherosclerosis, 2012, 3:57-68
- [10] Chroni A, Mavri-Vavayanni M. Characterization of a platelet activating factor acetylhydrolase from rat adipocyte [J]. Life Sci, 2000, 67: 2807-2825
- [11] Many H, Aoki J, Kato H, et al. Biochemical characterization of various catalytic complexes of the brain platelet activating factor acetylhydrolase[J]. J Biol Chem, 1999, 274(45):827-832
- [12] Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, et al. Platelet activating factor acetylhydrolases[J]. J Biol Chem, 1997, 272(29):895-898
- [13] Sanchez-Quesada JL, Vinagre I, De Juan-Franco E, et al. Effect of improving glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus on low-density lipoprotein size, electronegative low-density lipoprotein and lipoprotein-associated phospholipase A2 distribution[J]. Am J Cardiol, 2012, 110(1):67-71
- [14] Detopoulou P, Nomikos T, Fragopoulou E, et al. Platelet Activating Factor in Heart Failure: Potential Role in Disease Progression and Novel Target for Therapy[J]. Curr Heart Fail Rep, 2013, 10:122-129
- [15] Rizos E, Tambaki AP, Gazi I, et al. Lipoprotein-associated PAF-acetylhydrolase activity in subjects with the metabolic syndrome [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2012, 72:203-209
- [16] Snyder F. Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes [J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1254(3):231-249
- [17] Liu X, Xiong SL, Yi GH, et al. Transit of HDL-associated sphingosine-1-phosphate[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(3-4): 384-390
- [18] Go GW, Mani A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis[J]. Yale J Biol Med, 2012, 85(1): 19-28
- [19] Love-Gregory L, Abumrad NA. CD36 genetics and the metabolic complications of obesity [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011, 14(6): 527-534
- [20] Martin C, Chevrot M, Poirier H, et al. CD36 as a lipid sensor[J]. Physiol Behav, 2011, 105(1): 36-42