

调肝导浊中药对血载脂蛋白含量及肝细胞膜脂蛋白受体的影响

范英昌, 陆一竹, 马东明

(天津中医学院病理教研室, 天津市 300193)

[关键词] 调肝导浊中药; 载脂蛋白; 受体, 脂蛋白; 动脉粥样硬化; 原位杂交

[摘要] 为观察调肝导浊中药对血载脂蛋白的含量及肝细胞膜脂蛋白受体的影响, 采用高胆固醇饮食造成动脉粥样硬化家兔模型, 用免疫比浊法测定载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B 含量。体外培养大鼠肝细胞, 将氧化型低密度脂蛋白直接加入培养液, 采用原位杂交技术观察它对肝细胞膜脂蛋白受体的影响及调肝导浊中药对其的调节作用。结果发现, 调肝导浊中药可有效升高载脂蛋白 AI 含量和降低载脂蛋白 B 含量。提示调肝导浊中药对脂蛋白受体途径具有良好的调节作用, 可有效调节与脂质代谢密切相关的因素, 从而防治高脂血症, 抑制动脉粥样硬化的形成发展。

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

Effect of Liver-Regulating and Turbid Removing Chinese Medicine to Apolipoprotein Content in Blood and Lipoprotein Receptor in Membrane of Hepatocyte

FAN Ying-Chang, LU Yi-Zhu, and MA Dong-Ming

(Pathology Department of Tcm in Tianjin, Tianjin 300193, China)

[MeSH] Chinese Medicine; Apolipoproteins; Receptors, Lipoprotein; Atherosclerosis; Hybridization in Situ

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of liver-regulating and turbid removing Chinese medicine formula to apolipoprotein content in blood and lipoprotein receptor in membrane of hepatocyte and research the principle of preventing and curing atherosclerosis. **Methods** The rabbits were fed with heavy dosage of cholesterol in order to obtain the model of atherosclerosis by assaying the content of apolipoprotein AI and apolipoprotein B in blood. In addition, the hepatocyte of rat was cultured in vitro by adding ox-LDL into the culture medium, and the effect of lipoprotein receptor and the regulating function of Chinese medicine formula related with given in different ways by means of hybridization in situ were observed. **Results and Conclusions** Liver-regulating and turbid removing Chinese medicine formula can increase effectively the content of apolipoprotein AI, decrease that of apolipoprotein B and have a good regulating function about the lipoprotein receptor or pathway. Consequently, liver-regulating and turbid removing Chinese medicine formula can regulate the factors related with lipid metabolism, thus effectively prevent the formation and progress of hyperlipemia.

肝脏低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体在整个机体的脂蛋白代谢中起着极为重要的作用, 它通过影响血浆 LDL 清除的快慢调节血浆脂蛋白水平, 维持细胞内胆固醇浓度的动态平衡; 而高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)受体则参与细胞内胆固醇外流。我们将从血中分离并氧化的 LDL(oxidized LDL, ox-LDL) 直接加入细胞培养液, 观察它对细胞的损伤及中药对其的调控作用。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

[收稿日期] 2001-09-12

[修回日期] 2002-04-27

[作者简介] 范英昌, 男, 1951 年出生, 教授, 长期从事中医药防治心脑血管疾病的研究, 科研成果多次获得天津市科技进步奖励。

胆固醇购自天津化学试剂批发公司; 洛伐他汀购自天津市协和生物医学工程开发公司; 胎牛血清购自中国医学科学院血液病研究所。DMEM-F₁₂ 培养基(GIBCO 公司产品); 0.03% Ⅰ型胶原酶(Sigma 产品)购自天象人生物制品公司。载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B 检测试剂盒购自上海玉兰生物技术研究。LDL 受体原位杂交检测试剂盒、HDL 受体原位杂交检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自博士德生物工程有限公司。

调肝导浊中药购自天津中医学院中医研究所, 由炙首乌、柴胡、草决明、泽泻、丹参、菟蔚子、姜黄和蒲黄等组成; 以上组方水煎, 醇提, 制成合生药为 1:1 的中药制剂, 高压灭菌使用。

1.2 动物及分组

日本大耳白家兔 40 只, 雌雄各半, 体重 2.63 ±

0.22 kg(由天津中医学院医学动物中心提供)。随机分为 4 组: 正常组(control group)、模型组(model group)、中药(Chinese medicine, CM)组和洛伐他汀(lovastatin)组。正常组每日基础饲料喂养。模型组按每天 1 g/只胆固醇拌于饲料中制成高脂颗粒饲料喂养。中药组自造模日起同时给药, 按每天 16.5 g 生药/kg 体重(成人用量 10 倍)给药。洛伐他汀组自造模日起同时给药, 按每天 2.5 mg/只洛伐他汀(成人日用量的 6 倍)给药。以上动物均自由进水, 12 周结束实验。

1.3 兔载药血清制备

日本大耳白家兔 5 只, 雌雄不限, 体重 2~2.5 kg, 按每天 16.5 g 生药/kg 体重(合成成人用量 10 倍)制成的调肝导浊中药煎剂加入基础饲料饲养 6 天。无菌条件心脏取血, 制备血清。

1.4 肝细胞培养及分组

健康 Wistar 大鼠, 雄性, 80~100 g(购自天津医学实验动物研究所)。麻醉后, 无菌打开腹腔, 行门静脉及下腔静脉插管。门静脉灌注 D-Hanks 液约 150 mL 后, 换用 37℃ 0.03% Ⅲ型胶原酶灌注 60~80 mL, 迅速取下肝脏, 除去被膜及结缔组织, 把肝脏剪成 1 mm³ 左右的小块, 贴壁培养在玻片上。少量血清 37℃ 孵育 2~3 h 后, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM-F₁₂ 培养液, 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养。台盼蓝染色计算肝细胞存活率 95% 以上。

待细胞呈现分布均匀而密布的单细胞层, 将肝细胞随机分为 6 组。正常组继续用正常培养基培养。④中药组按每 100 mL 培养液 30:1 比例加入无菌调肝导浊中药药液。④载药血清组加入基础培养基: 胎牛血清: 兔载药血清为 80:15:5 的培养基。

ox-LDL 培养组按每 100 mL 培养液加入 5 mg ox-LDL(购自中国协和医学科学院基础研究)。ox-LDL 加中药组每 100 mL ox-LDL 培养液中按 30:1 比例加入无菌调肝导浊中药药液。ox-LDL 加载药血清组加入 ox-LDL 培养液: 胎牛血清: 载药血清为 80:15:5 的培养基。

1.5 载脂蛋白含量的测定

各组动物心脏取血, 免疫比浊法(全自动单试剂法)测定血载脂蛋白 AI 及载脂蛋白 B 含量。

1.6 细胞处理及原位杂交实验方法

原位杂交用固定液配制: 在 0.1 mol/L PBS 中, 按 4% 比例加入多聚甲醛, 并加入 1/1 000 DEPC(焦碳酸二乙酯)。

各组细胞培养 48 h 后取出玻片, 0.1 mol/L PBS 冲洗, 固定液固定 30 min, 蒸馏水充分洗涤。滴加

3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶, 37℃ 预杂交 4 h, 加杂交液 37℃ 过夜。次日, 滴加封闭液、生物素化鼠抗地高辛工作液、SABC 工作液和生物素化过氧化物酶, DAB 显色。苏木素复染核, 水洗, 脱水, 透明, 封片。10×40 倍镜下以目镜测微网的一个大网格为单位面积, 计数细胞染色阳性率, 每张玻片计数 10 个视野, 取均值。

1.7 统计学处理

采用 SPSS9.0 软件包进行方差分析; 组间对照采用 *F* 检验和 *q* 检验。

2 结果

2.1 血载脂蛋白 AI 含量的变化

从表 1(Table 1) 可见, 模型组载脂蛋白 AI 含量较正常对照组明显降低($P < 0.01$)。中药组载脂蛋白 AI 含量较模型组明显升高($P < 0.01$)。提示调肝导浊中药可有效升高载脂蛋白 AI 含量。

2.2 血载脂蛋白 B 含量的变

从表 1(Table 1) 可见, 模型组载脂蛋白 B 含量明显高于正常组($P < 0.01$)。中药组载脂蛋白 B 含量较模型组明显降低。提示调肝导浊中药可有效降低载脂蛋白 B 含量($P < 0.01$)。

表 1. 家兔动脉粥样硬化模型血载脂蛋白 AI 及载脂蛋白 B 含量的变化($\bar{x} \pm s$)。

Table 1. The change of apolipoprotein AI and apolipoprotein B content in blood of atherosclerosis rabbit models.

Groups	n	Apo AI	Apo B100(mg/L)
Control	7	317 ± 83 ^a	130 ± 30 ^a
Model	8	15 ± 5 ^b	1010 ± 300 ^b
CM	8	141 ± 42 ^{ab}	370 ± 110 ^{ab}
Lovastatin	7	114 ± 27 ^{ab}	440 ± 120 ^{ab}

a: $P < 0.01$, compared with model group, b: $P < 0.01$, compared with control group.

2.3 细胞低密度脂蛋白受体阳性率的变化

低密度脂蛋白受体阳性表达在细胞浆, 可见胞浆黄染。表 2(Table 2) 显示, ox-LDL 培养组 LDL 受体阳性率明显低于正常培养组($P < 0.01$)。给药后 LDL 受体阳性表达率明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示调肝导浊中药具有升高 LDL 受体的作用, 在调控脂质代谢上, 具有重要意义。

2.4 细胞高密度脂蛋白受体阳性率的变化

高密度脂蛋白受体阳性表达在细胞浆, 可见胞浆黄染。表 2(Table 2) 显示, ox-LDL 组与正常组相

比, HDL 受体阳性率显著升高 ($P < 0.01$)。ox-LDL 加中药组及 ox-LDL 加载药血清组 HDL 受体阳性率比 ox-LDL 组明显增加 ($P < 0.01$)。中药培养组和载药血清组与正常培养组相比, 也具有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。提示调肝导浊中药能显著增强 HDL 受体的表达。

表 2. 肝细胞低密度脂蛋白受体及高密度脂蛋白受体阳性细胞率比较。

Table 2. The comparison of the positive cell rate of LDL receptor and HDL receptor ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	LDLR (%)	HDLR (%)
Control	9	0.29 $\pm$ 0.07 ^a	0.06 $\pm$ 0.02 ^a
CM	7	0.44 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.44 $\pm$ 0.06 ^b
CM serum	8	0.40 $\pm$ 0.10 ^{ab}	0.48 $\pm$ 0.08 ^{ab}
ox-LDL	8	0.06 $\pm$ 0.02 ^b	0.21 $\pm$ 0.06 ^b
ox-LDL+ CM	9	0.39 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.49 $\pm$ 0.08 ^{ab}
ox-LDL+ CM serum	8	0.38 $\pm$ 0.09 ^{ac}	0.50 $\pm$ 0.09 ^{ab}

a: $P < 0.01$, compared with ox-LDL group, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$, compared with control group.

3 讨论

血浆脂蛋白中的蛋白质部分称为载脂蛋白^[1], 各种脂蛋白所含载脂蛋白的种类及含量不同, 不同的载脂蛋白具有各自特定的功能^[2]。载脂蛋白 AI 是 HDL 最主要的载脂蛋白, 它维持 HDL 结构的完整性, 对 LCAT 有激活作用, 是 HDL 受体的配基。载脂蛋白 A 对动脉粥样硬化及防止周围组织胆固醇沉着有重要意义^[3]。载脂蛋白 B 占 LDL 中蛋白质重量的 95% 以上, 是受体结合 LDL 的识别标志, 在 LDL 代谢及动脉粥样硬化的形成中起着极为重要的作用。载脂蛋白 B 与冠心病患病率呈正相关, 载脂蛋白 B 可与 LDL 受体结合, 调节 LDL 从血浆中的清除。

我们进一步对载脂蛋白进行分析后, 发现调肝导浊中药对载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B 有明显良性调节作用, 我们认为, 该中药对脂质代谢的调整与对载脂蛋白的调节效应密不可分。

正常情况下, 细胞 LDL 受体的数量决定血循环中 LDL 被清除的速度。细胞内胆固醇含量的多少, 反馈地控制着 LDL 受体的合成。现已明确, LDL 受体的主要功能是通过影响血浆 LDL 清除的快慢, 调节血浆脂蛋白水平, 以维持细胞胆固醇浓度的动态平衡。肝脏的 LDL 受体在整个机体的脂蛋白代谢

中起着极为重要的作用。研究证实, 75% 受体介导的 LDL 的清除是在肝脏进行, 在正常人体中有 1/3 ~ 2/3 的血浆 LDL 通过受体途径降解。

LDL 受体可根据细胞对胆固醇需要进行自我调节^[4], 防止细胞过度聚集脂质。当 LDL 受体由于某种原因受损或发生缺陷时, 脂质可通过受损的 LDL 受体途径导致细胞内的脂质聚集, 促使动脉粥样硬化病变发生。本实验证实, 当给予细胞外源胆固醇时, LDL 受体活性下降, 这可能由于肝细胞在胆固醇浓度增高的培养液环境中细胞内胆固醇负荷增加, 使 LDL 受体基因反馈性转录减少, 膜受体数目减少, 从而使细胞对 LDL 的摄取减少, 以免胆固醇过多积聚在细胞内。这是一种有效的基因水平调节, 其更详细的分子机制正在研究中。我们应用调肝导浊中药, 观察体外培养肝细胞膜 LDL 受体 mRNA 水平, 发现肝细胞膜 LDL 受体水平增加不仅超过未用药的高脂血清培养组, 而且高于正常组, 中药的作用强于高脂负荷引起的负反馈调节。提示调肝导浊中药可能直接作用于肝细胞 LDL 受体基因或影响基因表达某个环节而使转录增加。我们推测, 该中药可能通过诱导肝细胞 LDL 受体基因表达而降血脂。

此外, 我们的实验还观察到当胆固醇负荷后, HDL 受体活性上调。一些研究发现, HDL 受体参与细胞内胆固醇的外流。实验结果显示, 调肝导浊中药促使肝细胞膜 HDL 受体活性显著升高, 其机理尚待进一步探讨。

我们根据中医基础理论及大量临床实践, 提出在动脉粥样硬化病变中存在着“气机壅滞, 瘀浊阻滞, 阴血亏虚”的病机, 采用调肝导浊中药复方。方中重用炙首乌补益精血; 柴胡疏肝理气; 取草决明、泽泻利水渗湿; 蒲黄行血化瘀; 丹参活血祛瘀, 以通为补, 为瘀血为患或经行不畅病证之主药。辅以茺蔚子活血化瘀。姜黄破血行气。全方疏养并调, 体用并治, 活血化瘀兼以泄浊, 扶正与祛邪并重, 两者相辅相成, 而达到降粘祛脂、防治动脉粥样硬化之效。

[参考文献]

- [1] 钟毅, 朱秉匡, 郑仕富. 益寿调脂片抗高脂血症及动脉粥样硬化的实验研究. 中国中西医结合杂志, 1998, 18 (10): 616
- [2] 刘瑞杰. 高脂血症和相关疾病. 北京: 科学技术文献出版社, 1999; 4
- [3] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for homeostasis. Science, 1986, 232: 34
- [4] 刘彦珠, 张侠, 郭维琴. 中医脏腑学说与高脂血症. 北京中医药大学学报, 1996, 19 (6): 16

(此文编辑 朱雯霞)