

## 清源调脂胶囊对高脂血症大鼠低密度脂蛋白受体基因表达的影响

李文彪<sup>1</sup>, 王毅仁<sup>2</sup>

(1. 包头医学院中医药临床应用研究所, 内蒙古自治区包头市 014010; 2. 太原中西医结合医院, 山西省太原市 030003)

[主题词] 清源调脂胶囊; 高脂血症; 受体, 低密度脂蛋白; 大鼠

[摘要] 从分子水平探讨清源调脂胶囊的降脂作用机理。将 27 只 Wistar 大鼠随机分为正常组( $n=9$ )、高脂血症组( $n=9$ )和治疗组( $n=9$ )。正常组大鼠每日予以普通饲料常规喂养, 高脂血症组和治疗组大鼠每日予以高脂饲料喂养, 饮水不限, 计 8 周。其中, 治疗组大鼠从造模一周末起, 每日同步予以清源调脂胶囊 0.96 g/只, 加水溶至 5 mL, 分上下午两次灌胃。实验结束时, 取各组大鼠肝组织为检测样本, 进行总 mRNA 提取, cDNA 合成, 设内参照模板竞争法定量聚合酶链反应检测。结果发现, 治疗组大鼠低密度脂蛋白受体基因表达水平比高脂血症组明显提高( $P<0.001$ )。结果提示, 清源调脂胶囊能有效改善并提高实验性高脂血症大鼠低密度脂蛋白受体基因的表达, 从而起到降脂作用。

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

### Effect of Qing Yuan Tiao Zhi Capsule on Low Density Lipoprotein Receptor Gene Expression in Hyperlipemia Rats

LI Wen Biao, and WANG Yi Ren

(Institute of Clinical Traditional Chinese Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014010, China)

[MeSH] Qing Yuan Tiao Zhi Capsule; Hyperlipemia; Receptors, LDL; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To study the mechanism of Qing Yuan Tiao Zhi Capsule (QYTZC) decreasing blood fat at the molecular level. **Methods** 27 Wistar rats were randomly divided into normal group ( $n=9$ ), hyperlipemia group ( $n=9$ ) and treatment group ( $n=9$ ). In the experiment, all the rats from both hyperlipemia group and treatment group were daily fed with high fat feed for 8 days, with no limit to drinking except those from normal group, which were fed with ordinary feed. The rats in treatment group were given QYTZC (3 pellets for each, dissolved in water of 5 mL) by perfusion, twice a day after a week of the modeling. After the experiment, low density lipoprotein receptor (LDLR) mRNA was detected in the hepatic tissues of the rats from each group by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** QYTZC had a significant effect on LDLR gene expression of the rat ( $P<0.001$ ). **Conclusions** QYTZC could increase LDLR gene expression in rat hepatic tissues and, thus, decrease the level of blood fat.

低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)基因表达异常是体内血脂增高尤其是胆固醇升高的重要原因,也是动脉粥样硬化和冠心病的主要危险因素。人类的低密度脂蛋白受体基因全长超过 46 kb,由 18 个外显子和 17 个内含子组成,其中第 18 号外显子的长度为 2 535 bp。动物中,大鼠和小鼠的低密度脂蛋白受体基因与人接近,而尤以大鼠的低密度脂蛋白受体编码基因更接近于人。本实验选用 Wistar 大鼠高脂造模加药物干预,旨在从分子水平观察中药“清源调脂汤”胶囊对高脂血症

大鼠低密度脂蛋白受体基因表达的影响,以期探讨该药的降脂作用机理。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物选择

Wistar 大鼠 27 只,鼠龄  $80 \pm 7$  天,体重  $220 \pm 10$  g,由山西医科大学动物中心提供。

#### 1.2 试验药物

选用经验处方“清源调脂汤”,由茵陈、泽泻、穿山龙、首乌、薏仁及青荷叶等组成,胶囊剂型,0.32 g/粒(内含原生药 2.75 g),委托山西省中医药研究院制剂中心提取、加工。

#### 1.3 模型建立及分组

将大鼠随机分为正常组( $n=9$ )、高脂血症组( $n=9$ )和治疗组( $n=9$ ),正常组每天予以普通饲料,

[收稿日期] 2001-09-04 [修回日期] 2002-05-20

[作者简介] 李文彪,男,1947 年 12 月出生,医学博士,山西省保德县人,包头医学院中医学教研室主任,中医药临床应用研究所所长,包头医学院第一附属医院中医科主任,主任医师。从事心脑血管病、老年病临床研究,目前承担内蒙古自治区教育厅资助课题“老年性痴呆相关因素分析与中医对策”。王毅仁,男,1963 年 11 月出生,太原中西医结合医院院长,内科主治医师。

自由饮水、摄食,常规喂养8周。高脂血症组每天予以高脂饲料(胆固醇2.0 g、猪油10 g、猪胆盐0.5 g及甲基硫氧嘧啶0.2 g,加普通饲料至100 g)喂养,饮水不限。治疗组为“清源调脂”胶囊干预组,本组动物与高脂血症组动物同期造模,从造模一周末开始每日同步予以清源调脂胶囊3粒/只(0.96 g/只),加水溶至5 mL,分上下午两次灌胃。

以上三组动物于8周末全部杀检,杀检前禁食、停药24 h,禁饮8 h,35 mg/kg戊巴比妥腹腔注射麻醉、剖腹摘取肝脏,标号备检。

#### 1.4 大鼠肝组织总 mRNA 提取及 cDNA 合成

取大鼠肝组织0.5 g,在4℃下用组织研钵制成细胞匀浆,用总 mRNA 提取试剂盒(Promega 公司提供)进行 mRNA 提取。以 mRNA 为模板,采用反转录试剂盒(Promega 公司提供)进行 cDNA 合成。

#### 1.5 内参照模板竞争法定量聚合酶链反应检测

**1.5.1 聚合酶链反应引物的确定与合成** 参照文献[1,2]合成大鼠低密度脂蛋白受体第18个外显子 PCR 引物,上游引物为 HP1: 5' CCGGGACTGGT-CAGATGAG 3',下游引物为 HP2: 5' CCITGGTGT-GAGGGTCCATG 3',该 PCR 扩增产物为 266 bp。

**1.5.2 内参照模板的制备** 采用青岛大学医学院分子病毒学实验室拥有的 HIV1 前病毒 SF 株全病毒基因质粒 p9B6 的 DNA 序列为参照,合成一对引物。上游引物为 DP1: 5' CCGGGACTGGTCAGATGAGGCAGGTGATGATTCTGTGCC 3',下游引物为 DP2: 5' CCTGGTGTGAGGGTCCATGATTCACACCTAGGACTAACTC 3'。以 3 μL p9B6 质粒为模板,DP1 和 DP2 引物各为 100 mol, DNTP 为 2 mmol/L, PCR 反应缓冲液及 TaqDNA 聚合酶(Promega 公司)共 20 u。扩增条件为 94℃ 30 s → 55℃ 30 s → 72℃,共 35 个循环,获得产物 200 μL。扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒(Promega 公司)纯化后,溶于 1 000 μL 内参照模板中。此 PCR 产物即可作为逆转录聚合酶链反应的内参照模板。以 HP1 和 HP2 为引物,对此内参照模板进行 PCR 扩增,扩增产物为 423 bp 的 DNA 片段。

**1.5.3 内参照模板拷贝数的确定** 从上述 1 000 μL 内参照模板中取 10 μL 加入 90 μL 水,在微量紫外分光光度计(岛津 UV-260)上测定 260 nm 和 280 nm 的光密度值。内参照模板 OD260/OD280 等于 1.8,提示该内参照模板有较高的 DNA 纯度。根据该内参照模板 OD280 的光密度值及其分子量,得出该内参照模板的拷贝数为  $1.2 \times 10^{10}$  个/L。

**1.5.4 逆转录聚合酶链反应条件的确定** 在 50 μL 反应体积中,当反应参与物为引物 HP1 和 HP2 各

为 100 pmol, DNTP 为 2 mmol/L, TaqDNA 聚合酶(购自 Promega 公司)为 1.25 u,待测模板(cDNA 产物)为 5.0 μL,内参照模板为 1.0 μL( $1.2 \times 10^{10}$  个)时,PCR 反应的循环数控制在 22 个循环以内,PCR 反应产物的 DNA 凝胶电泳带密度扫描数值与 DNA 产物对应的模板量有线性关系,即在这样的反应条件下,根据内参照模板的 PCR 扩增条带扫描密度与待测模板 PCR 扩增条带的扫描密度可以相对定量地推断待测模板的数量。

**1.5.5 逆转录聚合酶链反应检测低密度脂蛋白受体基因表达水平** 取经逆转录的 5 μL cDNA 为 PCR 反应模板,在 PCR 缓冲体系中依次加入 PCR 反应模板 5 μL、引物 HP1 和 HP2 各 1 μL、内参照模板 1 μL、4 × dNTP 5 μL、TaqDNA 聚合酶 1.25 μL,用水补足体积至 50 μL。同步设立内参照模板阴性对照组和水对照组。PCR 反应条件为: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 22 个循环。根据凝胶电泳 DNA 条带的密度扫描结果并结合内参照模板的拷贝数,可以对待测模板的拷贝数进行定量检测。待测模板的拷贝数可以相对反应大鼠肝组织低密度脂蛋白受体基因的表达水平。

## 2 结果

### 2.1 逆转录聚合酶链反应扩增结果

正常组在 266 bp 和 423 bp 处出现两条清晰条带,表明该组中有低密度脂蛋白受体基因表达;高脂血症组在 423 bp 处出现比较强的扩增条带,而 266 bp 处条带较弱,提示该组中低密度脂蛋白受体基因表达水平较低;治疗组在 266 bp 和 423 bp 处出现两条较强的扩增带,表明该组中有低密度脂蛋白受体基因表达(图 1, Figure 1)。

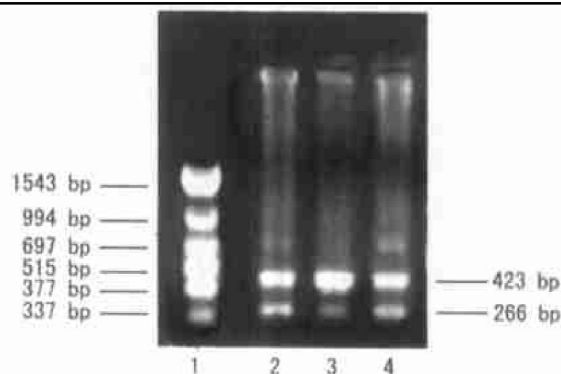


图 1. 逆转录聚合酶链反应扩增结果.

**Figure 1. The gel electrophoresis photograph of the RT-PCR products** 1: PCR Marker; 2: Treatment group; 3: Hyperlipemia group; 4: Normal group.

## 2.2 低密度脂蛋白受体基因表达电泳条带密度扫描结果

低密度脂蛋白受体基因表达电泳条带密度扫描结果显示, 高脂血症组与正常组比较呈显著差异 ( $P < 0.001$ ), 提示高脂血症组大鼠低密度脂蛋白受体基因表达水平明显低于正常组。治疗组与高脂血症组比较呈显著差异 ( $P < 0.001$ ), 提示清源调脂胶囊干预组大鼠低密度脂蛋白受体基因表达水平明显提高(表 1, Table 1)。

表 1. LDLR 基因表达电泳条带密度扫描结果.

Table 1. Density of electrophoresis bands of LDLR gene expression ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9$ ).

Groups	266 bp	423 bp
Normal	40.08 $\pm$ 12.06	59.9 $\pm$ 12.07
Hyperlipemia	11.89 $\pm$ 8.81 <sup>a</sup>	88.1 $\pm$ 8.81
Treatment	37.9 $\pm$ 11.42 <sup>b</sup>	61.7 $\pm$ 11.65

a:  $P < 0.001$ , compared with normal group; b:  $P < 0.001$ , compared with hyperlipemia group.

## 3 讨论

新近研究报告, 据统计 60% 以上的血脂变化由遗传因素所决定, 至少有 200 种基因可能对脂质在体内的摄取、代谢和排泄产生影响。在普通人群中, 多基因影响(包括编码载脂蛋白 E 和载脂蛋白 B 基因)与环境因素(饮食可能最重要)之间的相互作用可能构成了发生高脂血症的最常见原因<sup>[3]</sup>。祖国医学认为, 血脂源于脾胃, 由饮食中的膏脂化生而成, 经脾胃的“运化、转输”进入血中, 它是人体生命、生

理活动的重要物质。或因禀赋差异, 肾阳素亏(遗传因素)而不能温脾助运, 或因饮食不节, 膏粱厚味(饮食因素)而过食伤脾, 均可导致脾胃运化失司, 浊脂内停, 浸渍血脉, 发为高脂血症。清源调脂胶囊, 取温阳补肾固其本, 健脾利湿澄其源, 活血化浊洁其流, 如是则本正源清, 其流自洁, 自无血脂异常升高之弊。

肝脏是人体脂蛋白及胆固醇代谢的主要场所, 也是低密度脂蛋白受体较为密集的器官。动物中, 大鼠一半以上的低密度脂蛋白受体位于肝脏。因此, 本实验选择大鼠肝组织为测定样本, 从分子水平观察了中药“清源调脂”胶囊对实验大鼠低密度脂蛋白受体基因表达的影响。结果发现, “清源调脂”胶囊对高脂血症大鼠低密度脂蛋白受体基因表达有明显改善作用, 并能有效提高低密度脂蛋白受体基因表达水平。随着编码细胞膜上低密度脂蛋白受体数目的增加, 低密度脂蛋白受体结合/摄取低密度脂蛋白的数量亦随之增多, 从而有效降低血浆低密度脂蛋白浓度。由此提示, “清源调脂”胶囊有望从根本上改善并治疗高脂血症。

[致谢] 本实验得到青岛大学医学院分子病毒实验室主任王斌教授的帮助和指导。

## [参考文献]

- [1] Lee LY, Mohler WA, Schafer BL, et al. Nucleotide sequence of the rat low density lipoprotein receptor Cdna. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**: 1 259-260
- [2] Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, et al. The LDL receptor gene: amosaic of exons shared with different proteins. *Science*, 1985, **228**: 815-822
- [3] 蔡海江. 动脉粥样硬化基础与临床. 江苏科学技术出版社, 1996, 113

(此文编辑 文玉珊)