

大黄素对非酒精性脂肪肝大鼠脂质水平及肝脏脂质代谢基因表达的影响

刘涛¹, 徐秋玲¹, 赵岩², 李学军², 刘长勤², 杨叔禹^{2*}

(1 海南医学院, 海南 海口 571101; 2 福建医科大学附属厦门市第一医院 厦门市糖尿病研究所, 福建 厦门 361003)

摘要:目的 探讨大黄素 (emodin) 对高脂喂养导致的非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 大鼠脂质水平和肝脏脂质代谢基因表达的影响。方法 大鼠高脂饮食 6 周形成 NAFLD 模型, 大黄素低、高剂量 (30、60 mg/kg) 干预 4 周, 肝脏 HE 染色观察 NAFLD 模型大鼠肝脏病理改变, 检测血清和肝脏的甘油三酯 (TG)、游离脂肪酸 (FFA) 和转氨酶 (ALT、AST) 水平; 采用荧光实时定量 PCR 技术检测肝脏 X 受体 (LXR)、固醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c)、脂肪酸合成酶 (FAS)、二酰基甘油酰基转移酶 2 (DGAT-2)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (SCD-1)、脂酰辅酶 A 氧化酶 (ACO)、肉毒碱棕榈酸转移酶-1 (CPT-1) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR- α) 等脂质代谢基因表达。结果 与模型组相比, 大黄素低剂量组大鼠血清 FFA、TG、ALT 显著下降, 肝脏 HE 染色显示脂质沉积减轻, SCD-1 表达下降; 高剂量组大鼠 ALT、AST、血清和肝脏 TG、FFA 显著下降, 肝脏脂质沉积显著下降, 肝脏 FAS、DGAT-2、SCD-1 表达降低, CPT-1 和 PPAR- α 的表达显著增高。结论 大黄素剂量依赖性地改善 NAFLD, 其机制可能与下调肝脏脂质合成基因和上调脂肪酸氧化基因的表达有关。

关键词: 大黄素; 非酒精性脂肪肝; 脂质代谢; 荧光实时定量多聚酶链反应

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1516-03

随着生活水平的提高, 非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 已成为目前最常见的肝脏疾病之一, 被认为是代谢综合征在肝脏的表现。NAFLD 以肝脏中性脂肪沉积为特点, 肝脏的脂肪沉积与肝脏脂肪的摄取和分解的失衡有关^[1]。大黄素 (emodin) 是蒽醌类物质, 是大黄、何首乌等中药的有效成分, 近期研究表明大黄素对肝脏具有保护作用^[2], 并且对代谢综合征某些组分具有治疗作用^[3,4]。本实验通过高脂喂养的方法建立 NAFLD 大鼠模型, 观察大黄素对 NAFLD 大鼠的脂质水平及肝脏脂质代谢相关基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及药物: Wistar 大鼠, 雄性, (180 ± 20) g, 动物合格证号为 SCXK (沪): 2007-0005, 购自上海斯莱克公司。按照随机数字表, 将大鼠随机分为对照组、模型组、大黄素低剂量和高剂量组, 每组各 8 只。实验大鼠饲养在厦门市医药研究所实验动物室, 室内温度和湿度分别保持在 22 °C 和 50%。大黄素购自南京替斯艾么中药研究所, 质量分数为 95%, 先融于 DMSO (Sigma Chemical, USA), 再用双蒸水稀释成 3 和 6 mg/mL。

1.2 实验仪器: Automatic analyzer, 7600—110 生化分析仪, 日本 Hitachi 公司; UV—2450 紫外可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; PCR 仪, Bio-Rad

Mycycler, 美国; 荧光定量 PCR 仪, Roche lightcycler 480, 瑞士; RNA 提取试剂盒, Tiangen Biotech 公司; PrimeScriptTM RT reagent 和 SYBR Premix ex TaqTM II, Takara 宝生物(大连)工程有限公司; 游离脂肪酸 (FFA) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 NAFLD 大鼠模型建立及给药: 对照组由普通饲料喂养, 每 100 克普通饲料提供 1 364 kJ 热量。NAFLD 组大鼠由高脂饲料喂养, 高脂饲料由 20% 猪油、4% 白糖、2% 奶粉、1% 胆固醇、73% 普通饲料组成, 每 100 克高脂饲料提供 1 895 kJ 热量, 两组均自由饮水。高脂喂养 6 周, 大黄素高、低剂量组分别给予 30、60 mg/(kg · d) 大黄素, 对照和模型组 ig 等体积双蒸水, 给药时间为 4 周。

1.4 肝脏 HE 染色: 肝组织经石蜡切片, HE 染色后, 普通光镜下观察肝组织病理学变化。

1.5 脂质检测: 血清脂质转氨酶 (ALT、AST) 通过生化分析仪检测。取适量新鲜肝脏, 制成组织匀浆, 用抽提液甲醇-氯仿 (1: 1) 抽提脂质, 用分光光度法测定甘油三酯 (TG) 的量。FFA 的检测严格按照 FFA 试剂盒的检测说明书操作。

1.6 肝脏 RNA 的提取和逆转录反应: 50 mg 肝组织液氮中研磨, 利用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 在波长 260 nm 处紫外检测 RNA 量, 并计算浓度。将

* 收稿日期: 2010-01-15

基金项目: 福建省卫生厅创新项目资助 (2007-CXB-10); 厦门市科技局项目资助 (3502Z20077050)

作者简介: 刘涛 (1977—), 男, 博士后, 辽宁省沈阳人。Tel: 13959224685 E-mail: tangsong368@163.com

* 通讯作者 杨叔禹 Tel: (0592) 2137558

RNA 通过逆转录反应合成 cDNA, 其体系及反应为 Primescript™ Buffer 2 μL、Prime Script™ RT Enzyme Mix 0.5 μL、Oligo dT Primer (50 μmol/L) 0.5 μL、Random 6 mers (100 μmol/L) 0.5 μL、Total RNA 2 μL、ddH₂O 4 μL, 37 °C 15 min (逆转录反应), 85 °C 5 s (反转录酶的失活反应)。

1.7 实时定量 PCR: 引物设计由 NCBI 网站 Primer-BLAST 软件设计, 由上海英俊生物有限公司合成, 具体引物序列见表 1。实时定量 PCR 混合物体系总体积为 20 μL, 其中包括 SYBR Taq II 酶 10 μL, 引物各 0.6 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 6.8 μL。实时定量 PCR 扩增过程: 95 °C、5 s, 65 °C、1 min, 1 个循环, 进行融解曲线分析。最终结果由目的基因与自身 GAPDH 的比值, 再与目的阳性基因与自身 GAPDH 比值进行相除的结果来表示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因类别	基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
内参基因	GADPH	TGGTGGA CCT CAT GCCT A C	GCAACT GAGGCC TCT CT
脂质合成	L×R	TCAGCATCTT CT CTG CAGACCGG T	CATTAGCAT CCGTGGAACA
	SREBP-1c	GC CATGGAT TG CACATT G	TGTGTCT CCT GT CT CACCCC
	FAS	GGACATGGTGCAGACGATGAC	G GAGCGGTGCAACTGGGA
	DGAT2	TCTTCTACCGGATGTCAATC	TCCCTGCAGACACA CTTTG
	SCD1	CCTTAAACCTGAGATCCGTAAGA	GCCCATAAAGATTTCTGCAAA
FFA 氧化	ACO	GATTCAAGACAAAGCCGTCCAG	TGCCAGAGCAAACGACATTG
	CPT-1	AGCCATGAGGCTTGCTACG	GCTCTGTCTCAAGTGCTTCC
	PPARα	CTCGTGCAGGTGATCAAGAA	CAGCCCTCTCATCTGCAAG

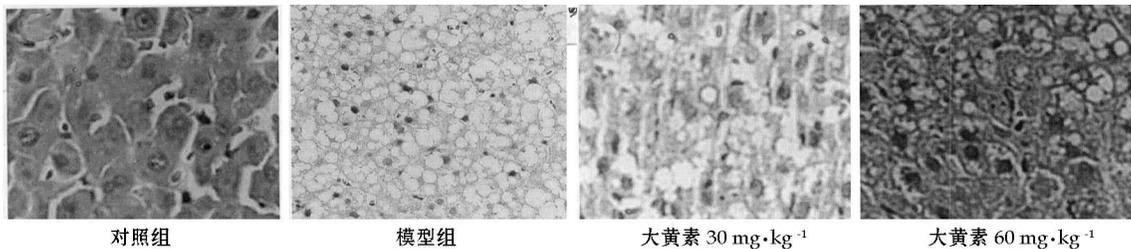


图 1 肝脏 HE 染色
Fig. 1 Liver HE staining

表 2 脂质和转氨酶水平 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Level of lipids and transaminase ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肝 脏		血 清		ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)
		TG/(mg·g ⁻¹)	FFA/(μmol·L ⁻¹)	FFA/(μmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)		
对照	-	15.22±3.72	72.25±13.73	349.67±110.33	0.27±0.04	44.22±6.88	162.86±21.68
模型	-	27.82±5.63*	106.48±11.38*	506.96±121.37*	0.55±0.15*	80.86±8.65*	195.71±37.77*
大黄素	30	22.85±4.96	100.16±16.42	465.17±64.53 [▲]	0.32±0.05 [▲]	68.42±10.18	187.14±27.91
	60	19.61±4.77 [▲]	92.26±8.22 [▲]	442.45±118.80 [▲]	0.27±0.09 [▲]	61.83±5.25 [▲]	142.33±18.19 [▲]

与对照组比较: * P < 0.05; 与模型组比较: [▲] P < 0.05

* P < 0.05 vs control group; [▲] P < 0.05 vs model group

1.8 统计学处理: 采用 SPSS 11.5 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差别应用 ANOVA 检验处理数据。

2 结果

2.1 肝脏病理染色: HE 染色显示, 对照组肝细胞排列整齐, 肝小叶规则, 细胞呈多边形, 中央有大而圆的核, 细胞质均匀, 肝细胞内无脂滴沉积。模型组大鼠肝细胞肿胀, 胞质中出现大小不等的脂滴空泡, 以大泡性脂肪滴为主, 核居边, 细胞界限不清。大黄素低剂量组脂滴空泡有所减少, 高剂量组脂滴空泡显著下降 (图 1)。

2.2 肝脏及血清脂质的检测: 模型组与对照组相比, 肝脏和血清 FFA、TG 显著增高 (P < 0.05) (表 2)。与模型组相比, 大黄素低剂量组大鼠血清 FFA、TG、ALT 显著下降, 高剂量组大鼠 ALT、AST, 血清和肝脏 TG、FFA 显著下降 (表 2)。

2.3 肝脏脂质代谢基因的表达: 模型组与对照组相比, 固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c)、脂肪酸合成酶 (FAS)、二酰基甘油酰基转移酶 2 (DGAT-2)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (SCD-1)、脂酰辅酶 A 氧化酶 (ACO)、肉毒碱棕榈酸转移酶 1 (CPT-1) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR-α) 呈现显著性增加 (P < 0.05, 0.01), 肝脏 × 受体 (L × R) 无显著变化。与模型组相比, 大黄素剂量组 SCD-1 表达下降 (P < 0.05), 高剂量组 FAS、DGAT-2、SCD-1 表达降低 (P < 0.05), CPT-1 和 PPAR-α 的表达显著增高 (P < 0.05) (表 3)。

表 3 肝脏脂质代谢相关基因的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Related gene expression of lipid metabolism in liver ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	L×R	SREBP-1c	FAS	DGAT-2	SCD-1	ACO	CPT-1	PPAR-α
对照	-	2.06±1.16	0.45±0.21	1.08±0.36	1.22±1.05	1.04±0.16	0.99±0.44	1.21±0.44	0.99±0.42
模型	-	2.17±1.36	7.06±3.18 [*]	2.27±0.35 [*]	2.97±1.28 [*]	7.44±2.82 ^{**}	6.22±2.25 ^{**}	8.04±2.40 ^{**}	1.95±0.32 [*]
大黄素	30	1.80±1.01	6.40±2.74	2.47±1.10	1.93±0.60	2.09±0.96 [▲]	4.20±3.31	7.72±2.21	1.73±0.72
	60	1.87±1.25	5.30±1.09	1.52±0.84 [▲]	1.03±0.75 [▲]	1.59±1.01 [▲]	3.63±2.90	16.68±4.54 [▲]	3.40±1.44 [▲]

与对照组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01; 与模型组比较: ▲ P < 0.05

* P < 0.05 ** P < 0.01 vs control group; ▲ P < 0.05 vs model group

3 讨论

NAFLD 是目前最常见的肝脏疾病之一,目前控制饮食和运动是 NAFLD 的治疗方法。肝脏脂肪沉积是 NAFLD 的主要病理改变,其实质为肝脏脂质摄入和分解的失衡。Higuchi 等^[5]研究证实,L×R 与 SREBP-1c 是 NAFLD 脂质合成的主要调控因素。Stefanovic-Racic 和 Yeon^[6-7]研究表明,脂肪酸氧化相关的 CPT-1 过表达的肥胖大鼠肝脏的甘油三酯显著下降,PPAR-α 的低表达是 NAFLD 发病的重要原因,说明促进脂肪酸氧化相关基因的高表达能够减轻 NAFLD 的肝脏脂肪沉积。

大黄素是大黄等中药的有效成分,具有抗肿瘤^[8]、免疫抑制^[9]等作用。近期研究表明大黄素对肝脏具有保护作用^[2],并且对代谢综合征某些组分具有治疗作用^[3,4]。本实验通过高脂喂养建立 NAFLD 模型,观察大黄素对 NAFLD 的药效,结果显示大黄素高剂量组(60 mg/kg)大鼠肝脏的脂肪沉积显著降低,血清和肝脏的脂质及转氨酶水平显著下降,而大黄素低剂量组(30 mg/kg)大鼠虽然与 NAFLD 组相比,肝脏脂肪沉积和脂质及转氨酶水平有所改善,但改善程度远不如高剂量组,说明大黄素对 NAFLD 的治疗作用呈现剂量依赖性。通过对肝脏脂质代谢基因表达的分析,NAFLD 大鼠脂质合成与脂肪酸氧化基因的表达均显著增高,而大黄素高剂量组抑制脂质合成的基因 FAS、DGAT-

2 和 SCD-1 的表达,上调了 FFA 氧化的基因 CPT-1 和 PPAR-α 的表达。以上实验说明,大黄素治疗 NAFLD 呈剂量依赖性,机制可能与抑制肝脏脂质合成和促进 FFA 氧化有关。

参考文献:

- [1] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48(1): 1-26
- [2] Dang S S, Zhang X, Jia X L, et al. Protective effects of emodin and astragalus polysaccharides on chronic hepatic injury in rats [J]. *Chin Med J*, 2008, 121(11): 1010-1014.
- [3] Zhou M, Xu H, Pan L, et al. Emodin promotes atherosclerotic plaque stability in fat-fed apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2008, 215(1): 61-69
- [4] Hei Z Q, Huang H Q, Tan H M, et al. Emodin inhibits dietary induced atherosclerosis by antioxidant and regulation of the sphingomyelin pathway in rabbits [J]. *Chin Med J*, 2006, 119(10): 868-870
- [5] Higuchi N, Kato M, Shundo Y, et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2008, 38(11): 1122-1129
- [6] Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell B S, et al. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294(5): E969-E977.
- [7] Yeon J E, Choi K M, Baik S H, et al. Reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor-α may have an important role in the development of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19(7): 799-804
- [8] 王春光, 刘北忠, 金丹婷, 等. 大黄素对裸鼠体内 K562 细胞移植瘤的抑制作用及其与调控 Caspase 3 和 Caspase 9 表达的关系 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 751-756
- [9] 于泳浩, 崔乃强, 王国林, 等. 重型脓毒症患者单核细胞功能改变及大黄素和参脉注射液对其调节作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(Suppl): 98-101

《药物评价研究》征稿与征订启事

《药物评价研究》(原《中文科技资料目录·中草药》)杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级药科学术性期刊,双月刊,国内外公开发行人。桑国卫院士为名誉主编,刘昌孝院士任编委会主任委员,汤立达研究员为主编。

办刊宗旨:报道药物评价工作实践,推动药物评价方法研究,开展药物评价标准或技术探讨,促进药物评价与研究水平的提高,为广大药物研究人员提供交流平台。

内容与栏目:针对药物及其制剂的评价规范以及药理学评价、安全性评价、药效学评价、药物代谢动力学评价、临床评价、上市药物评价等评价研究的内容,设置论坛、综述、方法学研究、试验研究(论著)、审评规范、国外信息、专题 7 个栏目。

读者对象:药品管理、新药研发、药物临床应用、药理学教育等相关的高等院校、科研院所、CRO 组织、生产企业、药品管理与审评机构的研究人员、管理人员、临床医生和研究生等。

本刊的创办填补了药物评价领域期刊的空白,将为广大药物研究人员提供一个交流的平台,通过交流药物评价工作的实践经验,发展和完善评价的方法学,探讨评价相关的国际标准或指南,提高我国的总体评价研究水平。

本刊已正式开通网上在线投稿、审稿、查询系统,欢迎广大读者、作者、编委使用!本刊自办发行,订阅请直接与编辑部联系!欢迎广大读者踊跃订阅!本刊热忱与中外制药企业合作,宣传推广、刊登广告(包括处方药品广告)。

地址:天津市南开区鞍山西道 308 号(300193)

电话/传真:(022)23006822

网址:www.中草药杂志社.中国或 www.tiprpress.com

邮箱:der@tiprpress.com

开户银行:兴业银行天津南开支行

账号:441140100100081504

户名:天津中草药杂志社