

山楂总黄酮对复合因素致大鼠脂肪肝模型脂质代谢与低密度脂蛋白受体表达的影响

罗先钦¹, 黄崇刚¹, 伍小波², 刘剑毅¹, 胡荣¹, 兰波¹, 徐嘉红¹

1. 重庆市中药研究院药理毒理研究所, 重庆 400065

2. 西南大学药学院 中医药学院, 重庆 400716

摘要: **目的** 研究山楂总黄酮对复合因素致大鼠脂肪肝模型脂质代谢与低密度脂蛋白受体 (LDL-R) 表达的影响。**方法** 采用复合因素致大鼠脂肪肝动物模型。造模成功后将动物随机分成 6 组, 分别 ig 给予山楂总黄酮 0.3、0.6、1.2 g/kg, 东宝甘泰 0.6 g/kg, 模型组和对照组每天 ig 给予等体积生理盐水。造模后、给药期间、末次给药后分别检测血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (AKP) 活性, 以及三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL-C) 水平; 末次给药后检测血液流变学指标和肝组织匀浆 TG 和 TC 水平, 同时取肝左叶分别用于病理检查观察显微结构变化, RT-PCR 和免疫组化检测 LDL-R mRNA 和蛋白表达。**结果** 山楂总黄酮作用于复合因素致脂肪肝大鼠模型, 其血清中脂质、肝 TC 和肝 TG 与模型组比较有显著性降低; 血清 ALT、AST 和 AKP 活性与模型组比较有显著性降低; 山楂总黄酮能明显降低全血黏度 (高切和低切)、红细胞聚集指数、红细胞压积以及明显增加红细胞变形指数; 病理组织学检查显示, 各给药组脂肪变性和炎症反应程度较模型组均有一定的减轻。RT-PCR 和免疫组化结果显示, 模型组大鼠肝组织 LDL-R mRNA 和蛋白表达与对照组比较显著降低 ($P < 0.05$)。山楂总黄酮和东宝甘泰对复合因素致脂肪肝模型大鼠肝组织 LDL-R mRNA 和蛋白表达降低有明显抑制作用。**结论** 山楂总黄酮可能通过调节脂肪代谢、改善肝脏功能和增加 LDL-R mRNA 和蛋白的表达, 起到治疗大鼠脂肪肝的作用。

关键词: 山楂总黄酮; 脂肪肝; 脂质代谢; 低密度脂蛋白受体 (LDL-R); 复合因素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1367-07

Effect of total flavones of *Crataegi Fructus* on lipid metabolism and expression of low density lipoprotein receptor in rats with fatty liver induced by complex factors

LUO Xian-qin¹, HUANG Chong-gang¹, WU Xiao-bo², LIU Jian-yi¹, HU Rong¹, LAN Bo¹, XU Jia-hong¹

1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

2. College of Pharmaceutical and Traditional Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Objective To investigate the effect of total flavones of *Crataegusi Fructus* (TFCF) on lipid metabolism and expression of low density lipoprotein receptor (LDL-R) in rats with fatty liver induced by complex factors. **Methods** Animal model of fatty liver was established by alcohol combined with high fat diet. Rats were randomly divided into six groups, except the normal and model groups, rats in TFCF groups were daily ig administered with TFCF (0.3, 0.6, and 1.2 g/kg), and rats in Dong-Bao-Gan-Tai group were daily ig administered with Dong-Bao-Gan-Tai (0.6 g/kg). It was measured that the contents of ALT, AST, AKP, TG, TC, HDL-C, and LDL-C, the blood viscosity, and indexes in the serum, TG and TC in the liver during this experiment, respectively. The left lobe of liver was observed by histopathological staining, and the immunohistochemical staining and RT-PCR were used to observe the effects on the expressions of LDLR mRNA and protein. **Results** Compared with the model group, TFCF groups could remarkably decrease the content of lipids, ALT, AST, and AKP in the serum and TC and TG in the liver of the experimental fatty liver induced by alcohol combined with high fat diet; remarkably decrease the blood viscosity (Sr3 and Sr200) and assembling index of RBC, as well as hematocrit (HCT), but remarkably increase the deformation index of red blood cells (RBC). The pathomorphological results of hepatic tissue showed that fatty degeneration and inflammatory reaction of TFCF groups were lightened compared with the model group. The

收稿日期: 2010-11-01

基金项目: 重庆市科委项目 (2004AAAS004)

作者简介: 罗先钦 (1979—), 男, 四川隆昌人, 硕士, 助理研究员, 长期从事中药药理研究开发工作。

Tel: (023)89029135 E-mail: lxq_0203@163.com

RT-PCR and immuno-histochemical staining results showed that compared with the normal group, the model group could remarkably decrease the expression of low density lipoprotein receptor (LDL-R) mRNA and protein in the liver; Compared with the model group, TFCF groups and Dong-Bao-Gan-Tai group could remarkably increase the expression of LDL-R mRNA and protein in the liver of the experimental fatty liver. **Conclusion** The results show that TFCF has good effects on the treatment of fatty liver induced by alcohol combined with high fat diet in rats. The possible action mechanism of TFCF possess obvious effect of regulating the disorder of lipid metabolism, ameliorating hepatic function, as well as increasing the expression of LDL-R in hepatic cells of rats.

Key words: total flavones of *Crataegi Fructus* (TFCF); fatty liver; lipid metabolism; low density lipoprotein receptor (LDL-R); complex factors

山楂为蔷薇科山楂属植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bunge var. *major* N. E. Br 或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bunge 的干燥成熟果实, 具有消食化积、活血化瘀的功效, 用于肉食积滞、胃脘胀满、泻痢腹痛、瘀血经闭、产后瘀阻、心腹刺痛、疝气疼痛、高血脂症等^[1]。山楂中主要含有黄酮类、有机酸类等成分。现代药理研究表明^[2-6], 山楂总黄酮具有降血压、增加冠脉流量、强心、调血脂等作用。因此, 山楂总黄酮的研究开发具有重要的意义。为此, 本研究拟通过复制与人类脂肪肝病、病理特征极为相似的复合因素致大鼠脂肪肝动物模型, 观察山楂总黄酮的抗脂肪肝作用及其对低密度脂蛋白受体 (LDL-R) mRNA 和蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 动物

雄性 SD 大鼠, 体质量 (200±20) g, SPF 级。合格证号 SCXK (渝) 20020004, 重庆市中药研究院动物室提供。

1.2 药物

山楂总黄酮 (TFCF, 含总黄酮 85.98%, 重庆市中药研究院药物化学室提供), 东宝甘泰片 (吉林通化东宝药业股份有限公司, 批号 060110), 戊巴比妥钠 (上海化学试剂采购供应站试剂厂), 肝素 [中国医药 (集团) 上海化学试剂公司], 95%乙醇 (重庆市中药研究院后勤处), 胆固醇 (北京鼎国生物技术有限责任公司), 三号胆盐 (北京奥博星生物技术有限责任公司)。

1.3 试剂

血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (AKP)、三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 等试剂盒均由四川省迈克科技有限公司提供。丙酮 (重庆东方试剂厂), 无水乙醇 (重庆川东化工有限公司化学试剂厂), LDL-R 抗体免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物工程公司); RT-PCR 试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DNA

引物购自上海 Promega 公司; 焦碳酸二乙基 (DEPC, 北京鼎国生物技术有限公司), Olig (dT)₁₅ (Fermentas 公司); TRIpure 试剂 (百泰克生物技术有限公司), 琼脂糖 (Agarose II, Marker I, Tian Gen 公司)。

1.4 仪器

AW220 型电子天平 (日本岛津公司), AllegraX—12 型离心机 (美国贝克曼库尔特有限公司), 7020 型全自动生化分析仪 (日本 HITACHI 公司), 722 分光光度计 (重庆川仪九厂), Mias—2000 病理图像处理系统 (四川大学图像图形研究所), Fasco—3010B 全自动血液流变快测仪 (重庆大学维多生物工程研究所), Sysmex F—820 半自动血液分析仪 (日本东亚公司), 核酸蛋白分析仪 (Gene Quant Pro), 稳压稳流电泳仪、电泳槽 (DYY—11 型, 北京市六一仪器厂), Bio-Rad 凝胶图像分析仪, Laboratories-segrate, QL—901 旋涡混合器 (江苏海门市麒麟医用仪器厂); PCR 仪 (Eppendorf 公司), Milli-Q 超纯水系统 (MilliPORE 公司), Air Tech 超净工作台 (苏净集团安泰公司)。

2 方法

2.1 复合因素 (酒精合并高脂饮食) 致大鼠脂肪肝模型的复制^[7]及药物处理

80 只 SD 雄性大鼠正常饲养 1 周后, 除对照组 10 只外, 其余大鼠均每天饲以高脂饲料 (88%基础饲料+10.0%猪油+1.5%胆固醇+0.5%三号胆盐配方), 同时每天 ig 给予 56%乙醇 (1 mL/100 g), 持续 1 个月, 建立复合因素致大鼠脂肪肝动物模型。在造模 1 个月通过大鼠尾静脉取血, 检测血清生化指标, 同时随机取 11 只大鼠肝匀浆, 检测 TC、TG 水平, 观察造模情况。根据血清 TC 和 TG 值将剩余 59 只大鼠随机分为 5 组, 即模型组及山楂总黄酮低、中、高剂量组和东宝甘泰组。其中模型组、山楂总黄酮高剂量组和东宝甘泰组各 13 只, 以利于在实验过程中监测肝脏脂肪变的恢复情况, 其余各组均为 10 只。在造模 1 个月停止给予乙醇, 分别 ig 给予 0.3、0.6、1.2 g/kg 山楂总黄酮, 东宝甘泰

0.6 g/kg, 模型组和对照组每天 ig 给予等体积生理盐水, 均连续给药 4 周 (其中在给药第 2 周末, 停止给予高脂饲料, 分别从模型组、山楂总黄酮高剂量组和东宝肝泰组各取 1 只大鼠检测肝脂质, 给药第 4 周末从东宝肝泰组中取 1 只大鼠检测肝脂质)。

2.2 取材及标本制备

末次给药后动物禁食 12 h, 用 45 mg/kg 戊巴比妥钠 ip 麻醉, 腹正中切口开腹, 观察肝脏的大小、颜色、质地, 腹主动脉采血 7 mL, 其中 4 mL 注入试管离心后测定血清相应指标, 3 mL 注入 1%肝素抗凝试管中测定血液流变学相关指标。同时, 取出肝脏, 称质量, 迅速取左叶肝组织分别用于常规病理学检查 (10%中性福尔马林固定)、免疫组化 (10%多聚甲醛固定)、RNA 提取 (液氮速冻后, -70°C 冰箱冻存待用)。其余肝组织匀浆进行相关指标检测。

2.3 血清生化指标测定

大鼠血清 ALT、AST、AKP、TG、TC、HDL-C、LDL-C 采用 7020 型全自动生化分析仪测定。

2.4 血液流变学指标测定

将大鼠血液 3 mL 注入 1%肝素抗凝试管中, 测定全血黏度, 再将全血离心, 测定血浆黏度, 并计算出聚集指数、刚性指数、变形指数, 采用全自动血液流变快测仪测定。

2.5 肝脏组织生化指标测定

处死大鼠后, 迅速取出肝脏, 在相同部位切下 200 mg 组织, 将肝组织置于预冷的 2 mL 无水乙醇和丙酮 (1:1) 混合液中, 冰浴下制备 10%匀浆液, 3 000 r/min, 离心 15 min, 取上清液按试剂盒说明书进行 TG、TC 测定。

2.6 肝脏组织 HE 染色

动物处死后, 取 $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$ 肝左叶组织, 浸泡于 10%中性甲醛固定, 石蜡包埋, HE 染色, 光镜观察肝组织病理改变, 肝脏损伤程度分级: “-” 肝组织结构正常, 未见明显病理变化; “+” 灶性肝细胞轻微脂肪变性, 少量脂滴堆积; “++” 局部区域肝细胞显著性脂肪变性, 许多脂滴堆积于肝细胞内; “+++” 大片区域肝细胞广泛性脂肪变性, 大量脂滴堆积于肝细胞内。

2.7 RT-PCR 测定肝组织 LDL-R mRNA 的表达

按 TRI pure 试剂盒抽提纯化操作方法提取肝脏组织总 RNA。提取的 RNA 通过紫外分光光度计测定 260、280 nm 的吸光度 (A) 值, 计算 RNA 纯度和浓度。按反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录

成 cDNA 第 1 链, 再进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 25 μL : 10 \times buffer 5 μL , dNTP 1 μL , Taq DNA Polymerase 5 μL , LDL-R 上、下游引物各 0.25 μL , β -actin 上、下游引物各 0.25 μL , cDNA 模板 1 μL , DEPC 水 17 μL 。使用 β -actin 作为内参照。引物序列由重庆升博公司提供, LDL-R 引物序列上游: 5'-CAAGGACCTCAAGATTGGCTATG-3', 下游: 5'-AGAGCAGAAACCCTATGGAACC-3', 扩增片段长度为 221 bp; β -actin 上游: 5'-AATGAGC GGTTCGATGC-3', 下游: 5'-CGAAGGTGGACAG TGAGGC-3', 扩增片段长度为 304 bp。反应条件: 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 20 s, LDL-R、 β -actin 退火温度分别为 58°C 、 54°C 退火 20 s, 72°C 延伸 40 s, 共 32 个循环。末次循环 72°C 延伸 7 min, 并在 4°C 低温保存。产物经 2%琼脂糖凝胶电泳分析, 利用凝胶成像仪拍照, 测定电泳条带吸光度值, 计算 LDL-R 与 β -actin 吸光度比值。

2.8 免疫组化染色检测肝组织 LDL-R 蛋白表达

采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化法 (SP)。肝组织石蜡切片常规脱蜡至水, 用高温进行抗原修复, 3%过氧化氢灭活内源性酶处理后, 5%BSA 封闭 20 min, 滴加不同浓度特异性一抗后 4°C 过夜, 次日滴加偶联二抗, 室温 30 min 后 DAB 显色, 苏木精复染, 透明, 封片。每次实验均设阴性对照 (PBS 液代替一抗), 结果显示阴性。应用 Olympus 医学生物图像分析系统, 进行免疫组化图像分析, 经标准灰度值校正后, 每个观察组随机取 5 个视野, 测定 LDL-R 蛋白的平均积分光密度值。

2.9 统计学处理

数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 计量资料进行单因素方差分析, 计数资料的比较采用 χ^2 检验, 均采用 SPSS13.0 统计软件计算。

3 结果

3.1 山楂总黄酮对脂肪肝模型大鼠肝功能的影响

由表 1 可见, 在给药第 2 周末, 山楂总黄酮各组大鼠血清 ALT 和 AKP 活性与模型组比较显著降低, 山楂总黄酮低、高剂量组 AST 活性与模型组比较显著降低; 在给药第 4 周末, 山楂总黄酮各组及模型组 ALT、AST、AKP 活性与对照组比较无统计学差异, 表明血清酶学指标已接近正常。提示山楂总黄酮在给药第 2 周末对复合因素致脂肪肝模型大鼠 ALT、AST 和 AKP 活性升高有明显抑制作用。

表 1 山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝大鼠肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of TFCF on hepatic function of rats with fatty liver induced by complex factors ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	ALT/(U·L ⁻¹)		
			造模后	给药第 2 周末	给药第 4 周末
对照	—	10	42.70 ± 7.50**	40.80 ± 5.81*	36.20 ± 9.25
模型	—	12	62.31 ± 13.95	54.83 ± 15.46	33.45 ± 8.12
山楂总黄酮	0.3	10	61.60 ± 13.68	32.00 ± 3.81**	30.70 ± 5.72
	0.6	10	57.40 ± 9.06	31.30 ± 7.33**	32.30 ± 6.02
	1.2	12	61.38 ± 16.98	36.58 ± 9.46*	36.83 ± 9.00
东宝甘泰	0.6	11	68.36 ± 19.20	47.91 ± 20.16	39.14 ± 4.49

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	AST/(U·L ⁻¹)		
			造模后	给药第 2 周末	给药第 4 周末
对照	—	10	161.40 ± 19.75**	209.50 ± 26.21*	86.38 ± 15.50
模型	—	12	254.54 ± 53.95	231.58 ± 39.96	87.36 ± 12.53
山楂总黄酮	0.3	10	263.90 ± 44.87	169.56 ± 15.78**	95.78 ± 7.87
	0.6	10	272.90 ± 48.97	211.40 ± 25.83	90.70 ± 16.79
	1.2	12	261.92 ± 42.77	201.67 ± 27.63*	92.17 ± 12.47
东宝甘泰	0.6	11	253.71 ± 43.77	187.27 ± 26.27**	96.88 ± 12.73

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	AKP/(U·L ⁻¹)		
			造模后	给药第 2 周末	给药第 4 周末
对照	—	10	197.30 ± 64.05**	213.00 ± 43.24**	143.44 ± 12.75
模型	—	12	455.08 ± 78.31	432.92 ± 90.42	177.33 ± 26.83
山楂总黄酮	0.3	10	432.70 ± 152.19	290.00 ± 37.90**	172.50 ± 24.21
	0.6	10	462.10 ± 162.82	306.90 ± 53.29**	199.75 ± 31.25
	1.2	12	437.23 ± 129.50	279.67 ± 76.21**	187.92 ± 47.27
东宝甘泰	0.6	11	420.36 ± 134.79	306.82 ± 68.58**	185.55 ± 53.24

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

3.2 山楂总黄酮对脂肪肝模型大鼠血清脂质的影响

由表 2 可见, 山楂总黄酮在给药第 2 周末各剂量组大鼠血清中脂质与模型组比较没有统计学差异; 在给药第 4 周末, 中、高剂量组大鼠血清中脂质与模型组比较有显著性降低。提示山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝模型大鼠血清中脂质升高有明显抑制作用。

3.3 山楂总黄酮对脂肪肝模型大鼠肝组织 TC、TG 的影响

由表 3 可见, 在给药第 4 周末, 山楂总黄酮中、高剂量组大鼠肝组织的 TC 和 TG 值与模型组比较有显著性降低, 提示山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝模型大鼠的肝组织 TC、TG 升高有明显抑制作用。

3.4 山楂总黄酮对脂肪肝模型大鼠血液流变学指标的影响

由表 4 可见, 在给药第 4 周末, 山楂总黄酮高

剂量组能明显降低复合因素致脂肪肝模型大鼠的全血黏度(高切和低切)和红细胞聚集指数; 山楂总黄酮各剂量组能明显降低大鼠的红细胞压积; 山楂总黄酮低剂量组能明显增加大鼠的红细胞变形指数, 以上指标均与模型组比较有显著性差异。提示山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝模型大鼠全血黏度、红细胞聚集指数和红细胞压积的升高有明显降低作用。

3.5 山楂总黄酮对脂肪肝模型大鼠肝脏病理组织学的影响

由图 1 和表 5 可知, 山楂总黄酮中剂量组能明显改善大鼠肝脏组织的病理组织学变性, 与模型组比较有显著性差异, 但山楂总黄酮低、高剂量组对肝组织病理组织学变性有明显改善趋势。提示山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝模型大鼠肝组织的病理学改变有明显缓解修复作用。

表 2 山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝大鼠血清脂质的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of TFCF on lipid in serum of rats with fatty liver induced by complex factors ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	TC/(mmol·L ⁻¹)			TG/(mmol·L ⁻¹)		
			造模后	给药第 2 周末	给药第 4 周末	造模后	给药第 2 周末	给药第 4 周末
对照	—	10	1.45±0.17**	1.54±0.12**	1.23±0.19**	1.67±0.42	1.78±0.51**	1.26±0.25
模型	—	12	7.25±2.24	4.58±0.63	2.18±0.46	1.68±1.15	0.95±0.24	1.29±0.42
山楂总黄酮	0.3	10	6.81±2.20	5.42±1.25	1.81±0.27	1.74±0.76	0.77±0.07	0.91±0.22
	0.6	10	7.44±2.95	6.25±1.36	1.76±0.41*	1.62±0.69	0.98±0.23	0.65±0.14**
	1.2	12	7.09±3.07	4.16±0.92	1.60±0.36**	1.60±1.07	0.85±0.13	0.72±0.14**
东宝甘泰	0.6	11	7.18±2.23	5.11±0.78	1.98±0.44	1.82±0.79	1.03±0.37	0.91±0.29*

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)			LDL-C/(mmol·L ⁻¹)		
			造模后	给药第 2 周末	给药第 4 周末	造模后	给药第 2 周末	给药第 4 周末
对照	—	10	1.21±0.11**	1.48±0.12**	1.12±0.27**	0.34±0.07**	0.17±0.04**	0.11±0.05**
模型	—	12	2.99±0.36	2.69±0.24	1.83±0.25	5.24±1.89	3.08±0.62	0.92±0.41
山楂总黄酮	0.3	10	2.76±0.50	2.77±0.24	1.58±0.30	4.40±2.44	3.86±1.18	0.58±0.14
	0.6	10	2.80±0.47	2.78±0.25	1.58±0.24*	4.47±1.99	4.76±1.30	0.55±0.33*
	1.2	12	3.10±0.56	2.61±0.26	1.50±0.29*	4.49±1.78	2.67±0.89	0.47±0.30**
东宝甘泰	0.6	11	3.41±0.64	2.90±0.20*	1.81±0.33	5.38±2.08	3.67±0.88	0.81±0.32

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

表 3 山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝大鼠肝脏 TC、TG 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of TFCF on TC and TG contents in liver of rats with fatty liver induced by complex factors ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	TC/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	10	1.90±0.77**	2.37±0.91**
模型	—	12	4.29±0.91	3.96±0.74
山楂总黄酮	0.3	10	3.85±0.85	3.80±0.68
	0.6	10	3.36±1.06**	3.30±0.77*
	1.2	12	3.16±0.99**	3.11±0.90**
东宝甘泰	0.6	11	3.61±1.18	2.87±0.53**

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

表 4 山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝大鼠血液流变学指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of TFCF on blood viscosity and indexes in rats with fatty liver induced by complex factors ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	全血黏度/(mPa·s)		血浆黏度/ (mPa·s)	红细胞 压积	红细胞 聚集指数	红细胞 变形指数	红细胞 刚性指数
			200 s ⁻¹	3 s ⁻¹					
对照	—	10	3.88±0.26**	8.75±0.82**	1.19±0.09	0.42±0.04**	7.12±0.98**	0.88±0.11	5.18±1.08*
模型	—	12	4.34±0.41	9.69±0.74	1.08±0.10	0.46±0.03	8.94±0.94	0.92±0.10	6.74±1.42
山楂总黄酮	0.3	10	4.13±0.49	9.13±0.83*	1.14±0.12	0.38±0.05**	8.30±1.11	1.06±0.12**	6.97±1.14
	0.6	10	4.11±0.48	9.31±0.96	1.12±0.07	0.42±0.03**	8.29±0.75	0.96±0.09	6.34±1.02
	1.2	12	3.92±0.19**	8.60±0.74**	1.17±0.10	0.40±0.02**	7.44±0.96**	0.93±0.10	5.66±1.03
东宝甘泰	0.6	11	4.00±0.41*	9.25±0.73*	1.19±0.13	0.40±0.03**	7.85±0.83**	0.96±0.11	5.97±1.14

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

3.6 山楂总黄酮对脂肪肝模型大鼠肝组织 LDL-R mRNA 和蛋白表达的影响

由表 6 和图 2 可见, RT-PCR 和免疫组化结果显示, 模型组与对照组比较, LDL-R mRNA 和蛋白表达显著降低。各给药组大鼠肝组织 LDL-R mRNA 和蛋白表达与模型组比较有所增加, 高剂量组和东宝甘泰组与模型组比较有显著性差异。提示山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝模型大鼠肝组织 LDL-R mRNA 和蛋白表达的降低有升高作用。

4 讨论

脂蛋白受体的发现被誉为脂代谢研究的里程碑, 脂蛋白受体决定了各种脂蛋白的代谢去路, 其

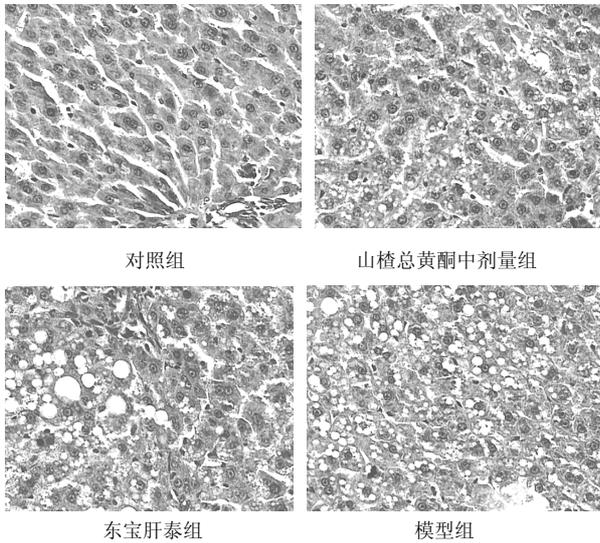


图 1 山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝大鼠肝脏病理组织学的影响

Fig. 1 Effect of TFCF on pathomorphology of hepatic tissue in rats with fatty liver induced by complex factors

表 5 山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝大鼠肝脏病理组织学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of TFCF on the pathomorphology of hepatic tissue in rats with fatty liver induced by complex factors ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	肝脏组织病理表现			
			-	+	++	+++
对照	—	10	10	0	0	0
模型	—	12	0	4	4	4
山楂总黄酮	0.3	10	2	3	4	1
	0.6	10	1	5	3	1
	1.2	12	1	5	5	1
东宝甘泰	0.6	11	0	5	4	2

表 6 山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝肝内 LDLR mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effects of TFCF on expression of LDL mRNA and protein in liver tissue of rats with fatty liver induced by complex factors ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	LDL-R/ β-actin	LDL-R 蛋白表达
对照	—	10	1.275 ± 0.102	89.76 ± 20.31
模型	—	12	0.896 ± 0.109 ^{ΔΔ}	32.82 ± 17.33 ^{ΔΔ}
山楂总黄酮	0.3	10	0.939 ± 0.097	47.58 ± 12.91
	0.6	10	1.015 ± 0.134	69.75 ± 20.01*
	1.2	12	1.252 ± 0.101**	77.93 ± 19.20*
东宝甘泰	0.6	11	1.351 ± 0.095**	61.58 ± 15.91*

与对照组比较: ^{ΔΔ}P<0.01; 与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01
^{ΔΔ}P<0.01 vs control group; *P<0.05 **P<0.01 vs model group

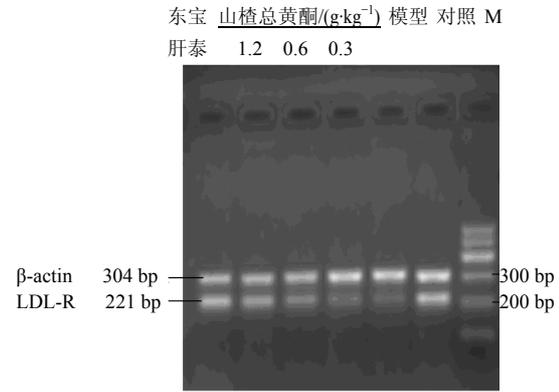


图 2 山楂总黄酮对大鼠肝组织 LDL-R mRNA 表达的影响
 Fig. 2 Effect of TFCF on expression of LDL-R mRNA of hepatic tissue

调节血浆脂蛋白水平, 调节和决定周围组织摄取血浆脂蛋白的量。LDL-R 广泛分布于全身各组织, 特别是肝脏、动脉壁细胞等细胞膜的表面, 特异识别与结合含 ApoE 和 ApoB₁₀₀ 的脂蛋白, 故又称为 ApoB、E 受体^[8]。LDL-R 的主要功能是将胆固醇转运到肝外组织细胞, 用于细胞增殖和固醇类激素及胆汁酸盐的合成, 这种代谢过程称为 LDL 受体途径 (LDL-R pathway)^[9]。

LDL-R 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^[10]。在 LDL 代谢过程中, LDL-R 起双重作用^[11]: 第一, 通过清除循环中的中间密度脂蛋白 (IDL), 限制 LDL 的生成。第二, 通过介导细胞摄取 LDL, 增加 LDL 的降解。当 LDL-R 基因变异或 LDL-R 表达下调, LDL-R 合成不足时, 对 LDL 的分解、代谢能力下降, 将使血清 LDL 浓度增加, 故 LDL-R 在脂代谢中起着重要作用。由于循环中的 LDL-C 主要通过肝脏 LDL-R 途径清除, 因此肝脏 LDL-R 表达的变化能够决定并反映血中胆固醇的代谢水平^[12]。研究表明, 一些调脂药物如洛伐他汀、非诺贝特能增加 LDL-R 的数量以调脂。随着对调脂中药研究的不断深入, 发现有些单味中药、中药复方的降脂作用机制为提高 LDL-R 的基因表达, 解除 LDL-R 的抑制状态, 使肝中 LDL 减少, 从而调控肝脂水平。如山楂及山楂酮能提高高脂血症大鼠肝 LDL-R mRNA 水平^[13]; 姜传仓等^[14]利用 Northern 印迹杂交法研究丹参、大黄对实验性高脂血症大鼠肝细胞 LDL-R mRNA 水平的影响, 发现两种药物均能升高大鼠 LDL-R mRNA 水平, 且有量效依赖关系。调

肝导浊中药能升高实验性高胆固醇大鼠肝细胞 LDL-R mRNA 的水平^[15]。

山楂总黄酮高、中剂量组大鼠血清中脂质、肝 TC 和肝 TG 与模型组比较有显著性降低；山楂总黄酮各剂量组 ALT 和 AKP 的活性与模型组比较有显著降低，山楂总黄酮高、低剂量组 AST 的活性与模型组比较有显著性降低；山楂总黄酮中剂量组肝脏组织的病理组织学检查有明显改善，山楂总黄酮高、低剂量组在肝组织病理组织学检查有明显改善趋势。同时山楂总黄酮高剂量组能明显降低复合因素脂肪肝模型大鼠的全血黏度（高切和低切）和红细胞聚集指数；山楂总黄酮各剂量组能明显降低大鼠的红细胞压积；山楂总黄酮低剂量组能明显增加红细胞变形指数。提示山楂总黄酮对复合因素致脂肪肝模型大鼠有一定的活血化瘀作用。

从 RT-PCR 和免疫组化实验结果来看，选用 SD 大鼠经过高脂和酒精造模形成复合因素致脂肪肝模型，其肝脏脂肪变性明显且伴炎性细胞浸润，而且 LDL-R mRNA 和蛋白表达明显降低。提示经过山楂总黄酮治疗后增加 LDL-R 的基因表达，解除 LDL-R 的抑制状态，从而提高肝细胞 LDL-R mRNA 和蛋白表达水平，调控肝脂水平，起到预防脂肪肝的作用。

综上所述，山楂总黄酮可能通过调节脂肪代谢、改善肝脏功能和增加 LDL-R mRNA 和蛋白的表达，治疗酒精合并高脂饮食性（复合因素）大鼠脂肪肝。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 林启云. 广西大果山楂药理作用研究 [J]. 广西中医药, 1990, 13(3): 45-46.
- [3] 李红, 张爽, 纪影实, 等. 山楂叶总黄酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 794-798.
- [4] 李贵海, 孙敬勇, 张希林, 等. 山楂降血脂有效成分的实验研究 [J]. 中草药, 2002, 33(1): 50-52.
- [5] 刘家兰, 徐晓玉. 山楂的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 63-66.
- [6] 杨宇杰, 林静, 王春民, 等. 山楂叶总黄酮对大鼠高脂血症早期干预的实验研究 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1848-1850.
- [7] 王媛媛, 李琳琳, 毛新民, 等. 酒精合并高脂饮食性脂肪肝大鼠模型的建立 [J]. 新疆医科大学学报, 2005, 28(2): 106-109.
- [8] Brown M S, Goldstein J L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis [J]. *Science*, 1986, 232(4746): 34-47.
- [9] Yacoub L K, Fogt F, Griniuviene B, et al. Apoptosis and bcl-2 protein expression in experimental alcoholic liver disease in the rats [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1995, 19(4): 854-859.
- [10] Kume N. Roles of oxidized low-density lipoprotein and its receptors in the pathogenesis of atherosclerotic diseases [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2002, 2(4): 172-178.
- [11] Hill J M, Zalos G, Halcox J P, et al. Circulating endothelial progenitor cells as a marker of cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(7): 593-600.
- [12] Libby P, Schoenbeck U, Mach F, et al. Current concepts in cardiovascular pathology: The role of LDL cholesterol in plaque reupture and stabilization [J]. *Am J Med*, 1998, 102(2A): 145-185.
- [13] Stlning T M, Klockner H, Harwood H J. In vivo LDL receptor and HMG-CoA reductase regulation in human lymphocytes and its alteration during aging [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15(7): 872-878.
- [14] 姜传仓, 蔡海江, 范乐明. 中药丹参及大黄对实验性高脂血症大鼠 LDL 受体基因表达的影响 [J]. 中国病理生理学杂志, 1993, 9(1): 108-110.
- [15] 范英昌, 陆一竹, 马东明. 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 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(3): 228-230.