

# 萆薢宁衍生物对高脂血症大鼠调脂作用及其机制的研究

阿 荣<sup>1,2</sup>, 乔延江<sup>3</sup>, 博·格日勒图<sup>4</sup>, 昭日格图<sup>4</sup>, 包力尔<sup>4</sup>

(1. 内蒙古农业大学理学院, 内蒙古 呼和浩特 010020; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 3. 北京中医药大学中药信息工程研究中心, 北京 100102; 4. 内蒙古大学蒙药化学研究所, 内蒙古 呼和浩特 010021)

**摘要:**目的 探讨萆薢宁(GBN)的衍生物(GBNT)对高脂血症大鼠的调脂作用,并考察其作用机制。方法 高脂饲料喂养 Wister 大鼠,建立高脂血症模型,造模同时连续灌胃给药 8 周后,腹主动脉取血,检测各组大鼠血清中总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量;HE 染色检测肝脏病理学形态;Western blot 方法研究低密度脂蛋白受体(LDLR),卵磷脂胆固醇脂酰基转移酶(LCAT),胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶(CYP7A)蛋白表达的变化。结果 GBNT 低、高剂量组均能降低模型大鼠 TC、TG 和 LDL-C 的含量,升高 HDL-C 含量;上调 LDLR,LCAT,CYP7A1 蛋白的表达;并减轻肝脏脂肪变性。结论 GBNT 具有降低高脂血症模型大鼠血脂水平的作用,其机制可能与调节 LCAT,CYP7A1 等脂代谢酶表达有关。

**关键词:** 萆薢宁衍生物(GBNT); 高血脂; 脂质代谢酶

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2015.08.005

**The function of lipid regulation and mechanism study of piperlonguminine derivative( GBNT) in rats with hyperlipidemia**

A Rong<sup>1,2</sup>, QIAO Yan-jiang<sup>3</sup>, BO · Geriletu<sup>4</sup>, et al

(1. College of Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010020, China;  
2. College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;  
3. Research Center of Traditional Chinese Medicine Information Engineering, Beijing University of Chinese Medicine (East Campus), Beijing 100102, China; 4. Institute for Chemical Research of Mongolian Medicine, Inner Mongolia University, Huhhot, Inner Mongolia 010021, China)

**Abstract: Objective** To explore lipid regulation and mechanism of piperlonguminine derivative(GBNT) in rats with hyperlipidemia.

**Methods** High fat diet was fed for hyperlipidemia model to Wister male rats. Meanwhile, piperlonguminine (GBN) and GBNT were intragastric administrated for 28 d respectively. Blood was isolated from abdominal aorta. The concentration of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum were measured. HE staining method assayed the pathology morphology of liver. Finally, the levels of low density lipoprotein cholesterol receptor (LDLR), lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT), and cholesterol 7 alpha hydroxylase (CYP7A1) were assayed by western blot.

**Results** The low and high dose of GBNT could reduce levels of TC, TG, and LDL-C, increase levels of HDL-C, up-regulate the expression of LDLR, LCAT and CYP7A1, and relieve liver fatty degeneration. **Conclusions** GBNT could reduce serum lipid levels in rats with hyperlipidemia, which might be related to regulating lipid metabolic enzyme including LCAT and CYP7A1.

**Key words:** piperlonguminine derivative (GBNT); hyperlipidemia; lipid metabolic enzyme

高脂血症(Hyperlipidemia, HLP)是一种代谢性疾病,表现为一种或几种脂类代谢失调导致的血浆中脂类含量异常,常引起动脉粥样硬化,冠心病,心肌梗死等疾病<sup>[1]</sup>。研究也表明 HLP 的预防治疗可以减少心脑血管疾病的发生,提高生活质量。但是

现今治疗 HLP 的药物如他汀类调脂药和贝特类调脂药,其不良反应影响临床应用,因此寻找安全,有效,低毒的降脂药物具有一定的积极意义。

萆薢宁 (GBN) 是从常用中蒙药胡椒科藤本植物萆薢 (*Piper longum* L.) 中提取分离出的有效单体成分, 具有降脂作用, 但其降脂程度有限<sup>[2]</sup>。因此本课题组在萆薢宁基础上进一步得到其烃基衍生物 (GBNT) (化学式如图 1), 来探讨其对高脂血模型大鼠是否具有调脂作用, 是否更有治疗效果。

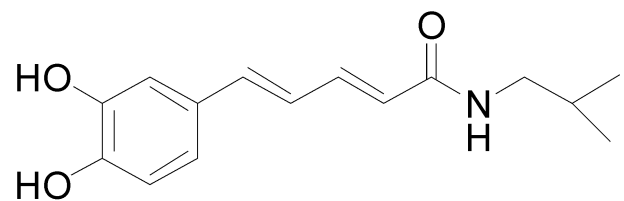


图1 GBNT 化学式

1 材料

1.1 实验动物 Wister 大鼠,体重(200 ± 10) g,清洁级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证[SCXK(京)2012-0004]。室内温度控制在(23 ± 2)℃,大鼠自由饮食和饮水。

1.2 药物与试剂 GBNT 由本课题组制备,其纯度高于 98.0%;辛伐他汀片,购于广东彼迪药业股份有限公司(批号 20140303);总胆固醇测定试剂盒(TC),甘油三酯测定试剂盒(TG),低密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(LDL-C),高密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(HDL-C)均购于中生北控生物科技股份有限公司;卵磷脂胆固醇脂酰基转移酶(LCAT),低密度脂蛋白受体(LDLR)均购于 Epitomics 公司;胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶(CYP7A1)购于 Abcam 公司; $\beta$ -actin 购于碧云天生物技术研究;BCA 试剂盒购于 cw-biotech 公司。

1.3 仪器 PRONTO EVOLUTION 全自动生化仪,意大利产;上海骥辉科学分析仪器有限公司;BSA/24S 型电子天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司;真空冷冻干燥机,意大利 TELSTAR;UV-1601 紫外可见分光光度计,日本岛津;迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪,北京市六一仪器厂;ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统,Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 分组及给药 60 只 Wistar 大鼠,随机分为六组:正常组,模型组,GBN 组,GBNT 低剂量组,GBNT 高剂量组,阳性组(辛伐他汀),每组 10 只。参照文献<sup>[3-4]</sup>,制备高脂饲料,除正常组外,其余每组每天

给予定量高脂饲料,正常组给予基础饲料。GBN 组灌服 10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,阳性组灌服 10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,GBNT 低剂量组灌服 5 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,GBNT 高剂量组灌服 10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,正常组和模型组每天灌服等体积溶媒,连续给药 8 周后各组大鼠腹主动脉取血,并取肝脏标本。血清及标本 -80℃ 冻存,进行各项指标的检测。

2.2 血脂测定 按照试剂盒说明书进行血清 TC, TG, LDL-C, HDL-C 含量检测。

2.3 肝脏病理形态学检测 将固定好的肝脏标本,进行石蜡包埋,切片,HE 染色。

2.4 Western blot 收集处理过的样本,加入裂解液裂解,离心,获得蛋白样品。用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白上样,SDS 凝胶电泳,转膜,封闭,加入一抗 4℃ 孵育过夜。次日加二抗孵育后曝光。

2.5 统计学分析 实验数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用 SPSS19.0 软件对数据进行统计,多组定量数据之间比较采用单因素方差分析的方法,多组之间两两比较采用 SNK-q 检验的方法。 $P < 0.05$  表示有显著意义。

3 结果

3.1 GBNT 对高血脂模型大鼠血脂水平的影响 相对于正常组,模型组中血清 TC, TG, LDL-C 含量显著升高( $P < 0.01$ ),HDL-C 含量下降( $P < 0.01$ ),具有统计学意义;实验组中 GBNT 低、高剂量组能显著抑制模型中血清 TC, TG, LDL-C 含量的上升, HDL-C 含量的下降( $P < 0.01$ ),具有统计学意义;GBN 组和辛伐他汀阳性组中大鼠血清中 TC, TG, LDL-C 含量也均有下降( $P < 0.05$ ),HDL-C ( $P < 0.05$ )含量上升;其中 GBNT 低剂量组降脂效果就与 GBN 相当,高剂量组降脂效果优于 GBN 组,且具有统计学意义( $P < 0.05$ );同时 GBNT 高剂量组调节 TC, TG, HDL-C 比辛伐他汀阳性组更好,无统计学意义,但有一定趋势,见表 1。

表1 GBNT 对大鼠血脂 TC, TG, LDL-C, HDL-C 含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/mg · kg <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup>	TC/mmol · L <sup>-1</sup>	TG/mmol · L <sup>-1</sup>	LDL-C/mmol · L <sup>-1</sup>	HDL-C /mmol · L <sup>-1</sup>
正常组	—	1.96 ± 0.43	0.95 ± 0.25	1.42 ± 0.33	0.62 ± 0.13
模型组	—	12.33 ± 2.32 <sup>aa</sup>	2.46 ± 0.77 <sup>aa</sup>	9.38 ± 2.02 <sup>aa</sup>	0.19 ± 0.04 <sup>aa</sup>
阳性组	10	5.83 ± 1.79 <sup>bb</sup>	2.07 ± 0.82	5.86 ± 1.27 <sup>bb</sup>	0.23 ± 0.05 <sup>b</sup>
GBN 组	10	8.02 ± 2.23 <sup>bb</sup>	1.42 ± 0.56 <sup>bb</sup>	5.40 ± 1.13 <sup>bb</sup>	0.48 ± 0.13 <sup>bb</sup>
GBNT 低剂量组	5	9.26 ± 2.16 <sup>b</sup>	1.95 ± 0.60 <sup>b</sup>	6.22 ± 1.46 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.09 <sup>bb</sup>
GBNT 高剂量组	10	7.14 ± 1.96 <sup>bb</sup>	1.31 ± 0.34 <sup>bb</sup>	5.08 ± 1.29 <sup>bb,c</sup>	0.62 ± 0.15 <sup>bb,c</sup>

注:<sup>aa</sup> $P < 0.01$  vs 正常组;<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,<sup>bb</sup> $P < 0.01$  vs 模型组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs GBN 组。

3.2 病理学检测 GBNT 对高血脂模型大鼠肝组织的保护作用 正常组肝组织染色均匀,结构清晰完

整,肝细胞形状较为一致,呈多边形,未见脂肪病变(见图 2A);模型组肝细胞数目减少,形态各异,排列

紊乱,体积变大,细胞间隙出现空泡,发生脂肪变性,并有大量炎性细胞浸润(见图 2B);辛伐他汀组肝脏有水肿表现,出现一些空泡,有脂肪颗粒变性,但与模型组相比较,脂肪变性有所改善,肝损伤有所恢复(见图 2C)。GBN 组及 GBNT 低剂量组显示出肝细胞有

稍微空泡现象,有轻度肝细胞脂肪变性,无水肿表象,较模型组有所改善(见图 2D,见图 2E);GBNT 高剂量组可以观察到肝细胞肿胀、脂肪变性的程度较之模型组均很大改善,肝细胞数目增多,结果也较为完整,趋于正常细胞(见图 2F),其恢复程度优于 GBN 组。

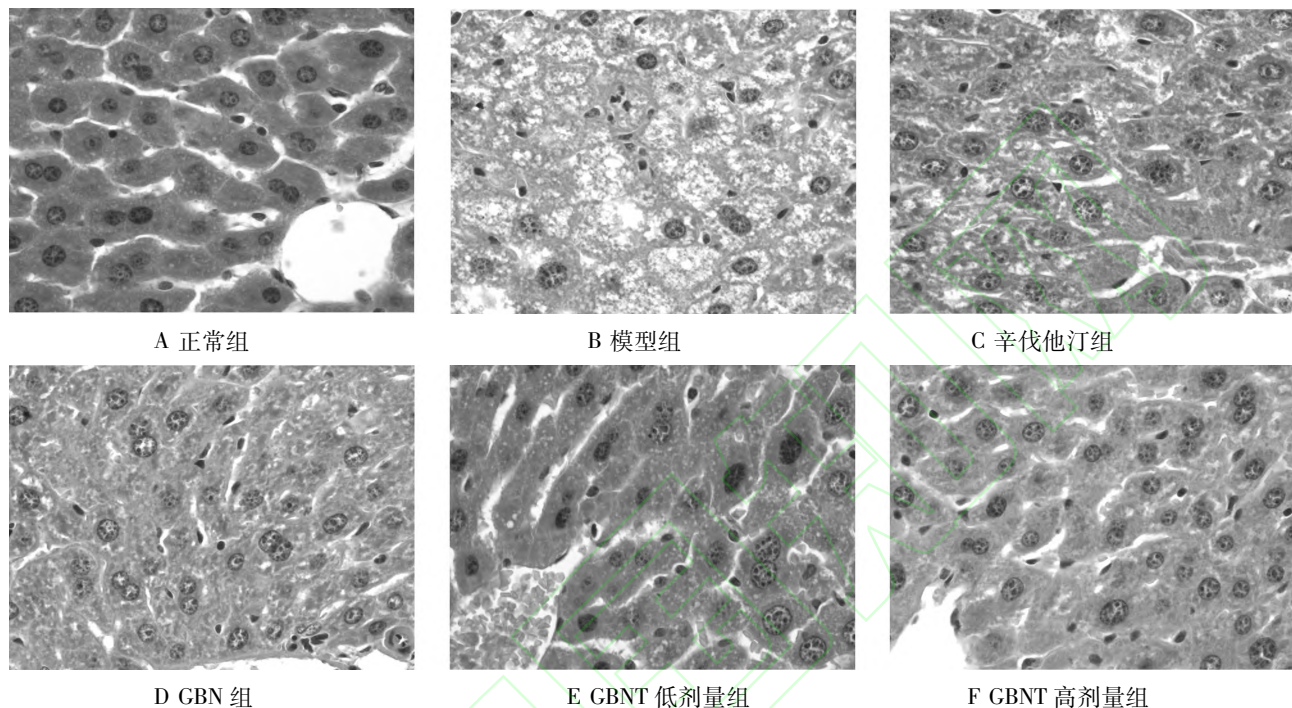


图 2 GBNT 对高血脂模型大鼠肝组织的保护作用(×400 倍)

**3.3 GBNT 对高血脂模型大鼠肝脏脂质关键代谢酶及 LDLR 含量的影响** 如图 3 所示,相对于正常组,模型组中 LCAT, LDLR, CYP7A1 表达量皆下降,辛伐他汀阳性组、GBN 组、GBNT 低、高剂量组皆能极显著的提高 LCAT, LDLR, CYP7A1 表达量;其中 GBNT 低剂量组提高 LCAT, CYP7A1 表达与 GBN 组相当,在提高 LDLR 表达量上优于 GBN 组;GBNT 高剂量组皆优于 GBN 组和阳性组;说明 GBNT 组在调节高血脂模型大鼠肝脏脂质关键代谢酶更具优势。

#### 4 讨论

高血脂症也可以称之为血脂代谢紊乱征,高含量血脂可使肝脏成为一个油库,经血液循环后,致使血液凝稠,产生血稠,阻塞血管壁,导致冠心病,心肌梗死等心脑血管病的产生,而且发病年龄逐年提前,影响人们生活质量。从中药材中寻找有效单体成分及其衍生物进行调血脂已成为热点,并且已有报道胡椒碱的衍生物中 GBN 具有预防小鼠酒精性脂肪肝作用,但有一定毒性且药效不显著<sup>[5-6]</sup>,因此本课题组在 GBN 基础上进行结构改造获得其衍生物 GBNT,并发现其具有显著调血脂作用。

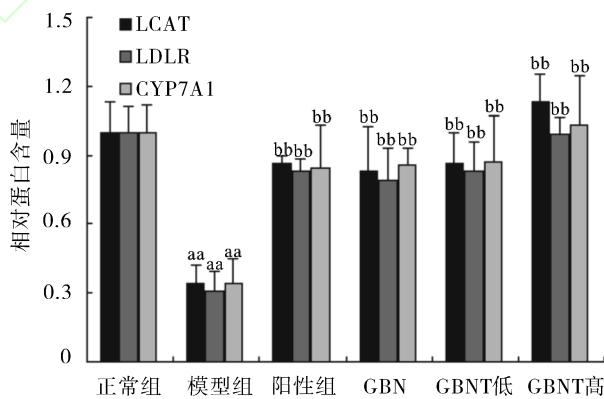


图 3 GBNT 对高血脂模型大鼠肝脏脂质关键代谢酶及 LDLR 蛋白表达的影响

注: <sup>aa</sup> $P < 0.01$  vs 正常组; <sup>bb</sup> $P < 0.01$  vs 模型组。

正常生理状态下,血脂处于稳态,当发生异常时,TC 会沉淀在血管壁上, TG 会促进凝血异常,产生血栓,导致动脉粥样硬化,甚至是冠心病; LDL-C 参与 TC 的运输,从肝脏中运往肝外组织中,过高的话,也会沉淀于血管壁上,呈现粥样化,导致动脉粥样硬化。 HDL-C 可以把肝外组织中的 TC 运到肝脏中进行分解,代谢为胆汁酸排除体外,当其含量降低的时候,会导致血浆中胆固醇发生聚集,导致血



栓或动脉粥样硬化。因此调节血脂含量有助于降低动脉粥样硬化等疾病。本实验结果发现高脂饲料饲养可使大鼠血清 TC, TG, LDL-C 含量显著升高, HDL-C 含量下降, 说明高脂血症模型大鼠建立成功, 与文献报道一致<sup>[7-8]</sup>; 通过给药发现, GBN 组, 辛伐他汀阳性组和 GBNT 组都能抑制此变化, 其中 GBNT 低剂量组和 GBN 组改善程度一致, 高剂量组效果优于 GBN 组。

肝脏是胆固醇生成的主要场所, 当血脂含量升高, 容易诱发肝细胞肿胀“变性”坏死, 造成肝细胞损害。高血脂模型组中, 肝细胞发生脂肪变性、肿胀, 肝细胞胞浆疏松化, 严重者呈气球样变, 与陈梅霞<sup>[7]</sup>, Liu<sup>[8]</sup>等学者报道基本一致, 而不管是阳性对照组还是 GBNT 治疗组都一定程度上减轻肝细胞肿胀, 缓解肝脏脂肪病变等受损症状, 但 GBNT 使肝组织恢复程度更好, 更具优势。

从膳食或者肝脏中获得的大部分 LDL-C 能特异性结合 LDLR, 胞饮进入溶酶体降解, 保持较正常水平, 因此 LDLR 在一定程度上能够反映血液中胆固醇的含量<sup>[9]</sup>。Bell<sup>[10]</sup>, Pauta<sup>[11]</sup>等学者报道 LDLr<sup>-/-</sup>小鼠可以作为高血脂模型小鼠, 进一步说明 LDLr 改善高血脂症中的重要性。正如 Dong<sup>[12]</sup>, Zhang<sup>[13]</sup>等学者阐述, 高脂血症模型组 LDLR 表达量下降, 经 8 周连续给药后发现, GBNT 低、高剂量组皆能上调 LDLR 表达, 效果皆优于 GBN 组。

LCAT 是促进 HDL-C 运转肝外游离胆固醇到肝脏中进行分解代谢的关键酶, 从而维持机体胆固醇稳态, 避免动脉粥样硬化等疾病的产生。一定程度上也说明 LCAT 活性决定了 HDL-C 生成量<sup>[8,14]</sup>。CYP7A1 是胆汁酸合成经典途径的限速酶, 其活性的提高可以促进肝脏中 TC 分解成胆汁酸, 排除体外, 机体内 50% 左右的 TC 的清除都依赖于 CYP7A1 的活性<sup>[15]</sup>。长期摄入高脂饲料会使 LCAT<sup>[13,16]</sup>, CYP7A1<sup>[2,17]</sup>表达量下降, 通过给药发现, GBNT 低、高剂量组皆能上调 LDLr, CYP7A1 表达, 其中低剂量组与 GBN 治疗效果相当, 高剂量组疗效更好。

从而得出 GBNT 可以调节高血脂模型大鼠血脂水平, 恢复肝功能, 是通过提高 LCAT 和 CYP7A1 表达, 促进 HDL-C 生成, 达到清除 TC, TG, LDL-C 的目的, 但更具体机制还有待进一步探讨。

## 参考文献:

[1] Li Q, Yin W, Cai M, et al. NO-1886 suppresses diet-induced insulin resistance and cholesterol accumulation through STAT5-

- dependent upregulation of IGF1 and CYP7A1 [J]. J Endocrinol, 2010, 204(1): 47-56.
- [2] Bao L, Borjhan G. Hypolipidemic effects of piperlonguminine in HepG2 cells and in Wistar rats [J]. Pharmazie, 2012, 67(10): 858-861.
- [3] 康卓颖, 初欣欣, 杨润梅, 等. 金黄地鼠高脂血症模型胆固醇代谢紊乱的生物标志物的研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(6): 880-883.
- [4] 董振兴, 彭代银, 宣自华, 等. 牡丹籽油降血脂、降血糖作用的实验研究 [J]. 安徽医药, 2013, 17(8): 1286-1289.
- [5] 昭日格图, 白朝鲁门, 博格日勒图, 等. 芡实宁对小鼠酒精性脂肪肝的预防作用 [J]. 食品科学, 2014, 35(13): 232-235.
- [6] Jin Z, Borjhan G, Zhao R, et al. Antihyperlipidemic compounds from the fruit of Piper longum L [J]. Phytother Res, 2009, 23(8): 1194-1196.
- [7] 陈梅霞, 苏洁, 张玥莉, 等. 银杏叶提取物与银杏黄酮对高脂血症大鼠血脂水平影响的比较研究 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(7): 833-838.
- [8] Liu Y, Wu J, Wang Z, et al. Characteristic, polymorphism and expression distribution of LCAT gene in a Mongolian gerbil model for hyperlipidemia [J]. Exp Mol Pathol, 2014, 97(2): 266-272.
- [9] Go GW, Mani A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis [J]. Yale J Biol Med, 2012, 85(1): 19-28.
- [10] Bell TR, Graham MJ, Lee RG, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of cholesteryl ester transfer protein enhances RCT in hyperlipidemic, CETP transgenic, LDLr<sup>-/-</sup> mice [J]. J Lipid Res, 2013, 54(10): 2647-2657.
- [11] Pauta M, Rotllan N, Vales F, et al. Impaired liver regeneration in Ldlr<sup>-/-</sup> mice is associated with an altered hepatic profile of cytokines, growth factors, and lipids [J]. J Hepatol, 2013, 59(4): 731-737.
- [12] Dong B, Singh AB, Fung C, et al. CETP inhibitors downregulate hepatic LDL receptor and PCSK9 expression in vitro and in vivo through a SREBP2 dependent mechanism [J]. Atherosclerosis, 2014, 235(2): 449-462.
- [13] Zhang X, Wu C, Wu H, et al. Anti-hyperlipidemic effects and potential mechanisms of action of the caffeoyl-quinic acid-rich Pandanus tectorius fruit extract in hamsters fed a high fat-diet [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61922.
- [14] Abd ET, Mohamed RH, Hagrass HA. Increased risk of premature coronary artery disease in Egyptians with ABCA1 (R219K), CETP (TaqIB), and LCAT (4886C/T) genes polymorphism [J]. J Clin Lipidol, 2014, 8(4): 381-389.
- [15] Guo J, Bei W, Hu Y, et al. A new TCM formula FTZ lowers serum cholesterol by regulating HMG-CoA reductase and CYP7A1 in hyperlipidemic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(2): 299-307.
- [16] Choi WH, Gwon SY, Ahn J, et al. Cooked rice prevents hyperlipidemia in hamsters fed a high-fat/cholesterol diet by the regulation of the expression of hepatic genes involved in lipid metabolism [J]. Nutr Res, 2013, 33(7): 572-579.
- [17] Kumar VR, Inamdar MN, Nayeemunnisa, et al. Protective effect of lemongrass oil against dexamethasone induced hyperlipidemia in rats: possible role of decreased lecithin cholesterol acetyl transferase activity [J]. Asian Pac J Trop Med, 2011, 4(8): 658-660.
- (收稿日期: 2014-12-15, 修回日期: 2015-03-16)