

## 阿伐他汀伍用大豆异黄酮预防大鼠脂质代谢紊乱的作用

何旭东, 吴洪海, 楼宜嘉\*

(浙江大学药学院药理毒理与生化药学研究所, 浙江 杭州 310031)

**摘要:** **目的** 探讨阿伐他汀(AT)伍用大豆异黄酮(SI)调节大鼠脂质代谢紊乱的药效学及相关分子机制以提供联合疗法的科学依据。**方法** 采用喂养法建立食物性高脂血症大鼠模型, 正常对照组和模型组给予蒸馏水, 其他供试组给予不同剂量的药物: AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>, AT 伍用 SI(40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>, 20 mg·kg<sup>-1</sup> + 60 mg·kg<sup>-1</sup>, 10 mg·kg<sup>-1</sup> + 30 mg·kg<sup>-1</sup>), 每日给药一次, 连续给药 12 周。酶法测定血清中各项脂蛋白含量; 制作冰冻切片进行病理学观察; RT-PCR 检测肝脏组织低密度脂蛋白受体(LDLR)和载脂蛋白 apoA-1 的 mRNA 表达, Western 印迹检测 LDLR 蛋白表达变化。**结果** AT 伍用 SI(40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>, 20 mg·kg<sup>-1</sup> + 60 mg·kg<sup>-1</sup>) 与单用 AT 20 mg·kg<sup>-1</sup> 相比, 明显降低血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C) ( $P < 0.05$ ), 明显升高高密度脂蛋白(HDL-C) ( $P < 0.05$ ); AT 伍用 SI(10 mg·kg<sup>-1</sup> + 30 mg·kg<sup>-1</sup>) 与单用 AT 20 mg·kg<sup>-1</sup> 相比, 对指标 TC, TG 及 LDL-C 的作用具有药效等效性, 明显升高 HDL-C ( $P < 0.05$ ); 能够减少肝脏对脂蛋白颗粒的蓄积, RT-PCR 实验和 Western 印迹实验表明能够增强大鼠肝脏 LDLR mRNA 和蛋白的表达, 并上调 HDL-C 代谢相关蛋白 apoA-1 mRNA 的表达。**结论** AT 伍用 SI 对高脂血症大鼠的血脂和脂蛋白代谢紊乱有预防作用, 该脂质代谢紊乱调节作用机制与上调 LDLR 和 apoA-1 mRNA 表达及促进 LDLR 蛋白表达有相关性。

**关键词:** 阿伐他汀; 大豆异黄酮; 脂蛋白; 代谢

**中图分类号:** R972.6

收稿日期: 2006-03-07 接受日期: 2006-05-22

**作者简介:** 何旭东(1974-), 男, 上海市人, 药理学硕士研究生, 主要从事心血管药理研究; 楼宜嘉(1953-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事分子药理与毒理研究。

\* 联系作者 E-mail: yijialou@zju.edu.cn Tel: (0571) 87217206

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3002(2006)05-0381-06

高脂血症是心脑血管发病过程的高危因素。血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein-C, LDL-C)、甘油三酯(triglyceride, TG)升高, 高密度脂蛋白(high density lipoprotein-C, HDL-C)降低可导致动脉内皮损伤, 通透性增强, 加速 LDL-C 在血管内皮下沉积, 促进动脉粥样硬化的形成。因此调节脂质代谢是防治高脂血症和动脉硬化的首要措施。HMG-CoA 还原酶抑制剂类药物调脂治疗效果肯定, 主要通过抑制细胞内胆固醇合成早期阶段的限速酶 HMG-CoA, 使得胆固醇在肝脏内合成减少, 同时诱导肝细胞膜上 LDL 受体(LDLR)上调, 促进 LDL-C 降解从而降低胆固醇<sup>[1]</sup>。但该类物质存在长期使用易导致肝脏损伤的弊端, 如能合用其他降脂药物组成复方, 则有可能减少用量, 降低不良反应。大豆异黄酮(soybean isoflavone, SI)对高脂血症的治疗作用已被多项实验研究所证明<sup>[2-4]</sup>, 对降低 LDL-C 和升高 HDL-C 都具有确切的作用。本实验以阿伐他汀(atorvastatin, AT)伍用 SI 对血脂调节作用进行研究, 旨在为探讨高脂血症的高效低毒联合疗法提供合理依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物与主要仪器

Sprague Dawley 大鼠 72 只, ♀ ♂ 各半, 体重 160 ~ 200 g, 浙江省实验动物中心提供。JZ-HS 型低温高速离心机, Beckman 公司; PCR 仪, Biometra 公司; Cryocut 1800 型冰冻切片机, 德国莱卡公司; KS-400 型图像分析仪, 德国远东蔡司公司。

#### 1.2 试剂与药品

AT, 含量 99.8% (批号: 050220) 和 SI, 总黄酮含量 60.67% (批号: 050211) 均为浙江康恩贝药业有限公司产品, 胆固醇(河南平顶山东珠生物制品

有限公司,批号:20050311),三号胆盐(杭州微生物试剂有限公司,批号:20040407),猪油为市售产品。PCR引物由上海生工公司合成;异硫氰酸胍-酚-氯仿,M-MLV(Promega公司);100 bp标志物,Rnasin(50 U· $\mu$ L<sup>-1</sup>,北京华美生物公司);dNTP(上海生工公司);Taq酶(Gibcol公司),LDLR抗体:一抗为兔抗鼠LDLR IgG单抗(Sigma公司);二抗为羊抗兔IgG多抗(北京中山生物技术公司),使用时用TBST溶液按1:200~1:2000稀释。

### 1.3 动物分组与造模

大鼠随机分为6组,每组12只,分别为正常对照组(未给予高脂膳食)、高脂模型组、单用AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>组、AT伍用SI(40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>, 20 mg·kg<sup>-1</sup> + 60 mg·kg<sup>-1</sup>, 10 mg·kg<sup>-1</sup> + 30 mg·kg<sup>-1</sup>)。除正常对照组大鼠喂标准膳食外,其余组均喂饲高脂膳食(标准膳食中混入2%胆固醇,5%猪油,0.3%三号胆盐,每日100 g该膳食),正常对照组、高脂模型组给予蒸馏水灌胃,其余组给予相应剂量药物,自由饮水,每日给药1次,连续给药12周。

### 1.4 血清标本的处理

各组均于给药4,8和12周后于鼠尾静脉取血3 mL,分离血清。用酶法测定TC, TG, LDL-C及HDL-C。

### 1.5 肝脏标本病理制作与图像分析

取肝脏组织制作冰冻切片,每只肝脏切片2张,苏木素染色后油红-O复染,分别对6组标本切片取400倍光镜下观察脂质在肝脏组织中的沉积,用Olympus BH. 41型日产光学显微镜镜检。

### 1.6 半定量逆转录-聚合酶链反应(semiquantitative RT-PCR)检测各供试组大鼠LDLR及apoA-1 mRNA的表达<sup>[5,6]</sup>

处死动物后,取肝脏组织,用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取总RNA。

$\beta$ -actin引物:上游引物为5'-AGCGGAAATCGCGCGTGA-3';

下游引物为5'-CAGGTCATGCTGTGGTGCC-3';

LDLR引物:上游引物为5'-CAATGTCTCACCAAGCTCTG-3';

下游引物为5'-TCTGTCTGGAGGGGAGCTG-3';

apoA-1引物:上游引物为5'-GCTTCCATGGCAGTGGACC-3';

下游引物为5'-AGGGCCCTGAAGTTCGTTAC-3'。

RT反应体系:M-MLV(20 U· $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L,5  $\times$  RT-缓冲液 5  $\mu$ L,Rnasin (50 U· $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.65  $\mu$ L, dNTP(10 mmol·L<sup>-1</sup>),RNA 2  $\mu$ g并补水至25  $\mu$ L。反应条件:70℃变性5 min后加入其余试剂,42℃反应1 h,99℃

灭活2 min。PCR反应体系:cDNA 10  $\mu$ L,Taq酶 0.5  $\mu$ L,10  $\times$  缓冲液 5  $\mu$ L,25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L,dNTP 2  $\mu$ L,上下游引物各 0.5  $\mu$ L,补水至50  $\mu$ L。PCR反应条件:94℃变性2 min,60℃退火1 min,72℃延伸90 s,循环30轮后延伸10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖电泳,凝胶成像仪扫描并分析。

### 1.7 Western印迹分析各供试组大鼠肝脏LDLR蛋白表达

取各实验组冻存的肝脏组织100 mg,加入预冷的组织裂解液1 mL,在碎冰上匀浆后,于4℃,12 000  $\times$  g离心15 min。上清液转移至另一1.5 mL离心管中,参照考马斯亮蓝法<sup>[7]</sup>测定蛋白质含量。蛋白样品和4  $\times$  上样缓冲液按照3:1的比例混合,100℃水中煮沸5 min使蛋白质变性。SDS-PAGE电泳后转移至PVPF膜上,5%脱脂牛奶封闭后加入一抗于室温2 h,用TBS缓冲液洗涤3次,每次5 min,加入二抗于室温孵育2 h,再用TBS缓冲液洗涤3次,每次10 min,加入发光试剂(ECL)显色,以 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作内参,用图像分析软件Scion Image进行光密度积分值分析。

1.8 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用方差分析,组间差异采用两两比较的Dunnett *t*检验,统计采用SPSS10.0软件。

## 2 结果

### 2.1 阿伐他汀伍用大豆异黄酮对SD大鼠血脂的影响

表1结果显示,模型组与正常对照组相比,血清TC、TG、LDL-C浓度明显高于正常对照组( $P < 0.05$ ),HDL-C浓度显著低于正常对照组( $P < 0.05$ ),提示造模成功。给药4周后,单用AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>与模型组相比,明显降低TC、LDL-C( $P < 0.05$ ),AT伍用SI(40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>, 20 mg·kg<sup>-1</sup> + 60 mg·kg<sup>-1</sup>)与模型组相比,TC、LDL-C明显降低( $P < 0.05$ ),HDL-C明显升高( $P < 0.05$ ),AT伍用SI(40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>)对HDL-C的升高作用与单用AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>相比有显著差异( $P < 0.05$ );给药8周后,AT伍用SI(40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>, 20 mg·kg<sup>-1</sup> + 60 mg·kg<sup>-1</sup>)与单用AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>相比明显升高HDL-C( $P < 0.05$ ),AT伍用SI(40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>)与单用AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>相比明显降低TG( $P < 0.05$ );给药12周后,AT伍用SI(40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>,

**Tab 1. Effects of atorvastatin(AT) combined with soybean isoflavones(SI) on serum lipid levels in rats**

Time/ week	Group /mg·kg <sup>-1</sup>	TC /mmol·L <sup>-1</sup>	TG /mmol·L <sup>-1</sup>	LDL /mmol·L <sup>-1</sup>	HDL /mmol·L <sup>-1</sup>
4	Normal	1.80 ± 0.29	1.10 ± 0.40	0.35 ± 0.06	0.70 ± 0.09
	Model	2.61 ± 0.60 <sup>##</sup>	1.19 ± 0.16	0.75 ± 0.22 <sup>##</sup>	0.50 ± 0.07 <sup>##</sup>
	AT 20	2.10 ± 0.35 <sup>*</sup>	1.17 ± 0.31	0.58 ± 0.11 <sup>*</sup>	0.46 ± 0.08
	AT 40 + SI 120	2.06 ± 0.28 <sup>*</sup>	1.11 ± 0.17	0.52 ± 0.17 <sup>*</sup>	0.63 ± 0.10 <sup>*△</sup>
	AT 20 + SI 60	2.12 ± 0.23 <sup>*</sup>	1.16 ± 0.17	0.60 ± 0.16 <sup>*</sup>	0.57 ± 0.09 <sup>*</sup>
	AT 10 + SI 30	2.21 ± 0.54	1.17 ± 0.20	0.74 ± 0.28	0.46 ± 0.09
8	Normal	1.80 ± 0.20	1.09 ± 0.34	0.23 ± 0.05	0.67 ± 0.10
	Model	2.78 ± 0.65 <sup>##</sup>	1.63 ± 0.67 <sup>##</sup>	0.84 ± 0.25 <sup>##</sup>	0.42 ± 0.05 <sup>##</sup>
	AT 20	2.30 ± 0.34 <sup>*</sup>	1.48 ± 0.33	0.67 ± 0.13 <sup>*</sup>	0.38 ± 0.08
	AT 40 + SI 120	1.78 ± 0.31 <sup>*△</sup>	1.00 ± 0.19 <sup>*△</sup>	0.60 ± 0.08 <sup>**</sup>	0.79 ± 0.49 <sup>*△</sup>
	AT 20 + SI 60	2.18 ± 0.27 <sup>*</sup>	1.23 ± 0.44	0.63 ± 0.16 <sup>*</sup>	0.77 ± 0.30 <sup>*△</sup>
	AT 10 + SI 30	2.34 ± 0.21	1.33 ± 0.50	0.73 ± 0.03	0.40 ± 0.06
12	Normal	1.76 ± 0.15	0.59 ± 0.20	0.27 ± 0.05	1.00 ± 0.10
	Model	2.96 ± 0.44 <sup>##</sup>	1.11 ± 0.22 <sup>##</sup>	1.02 ± 0.15 <sup>##</sup>	0.52 ± 0.09 <sup>##</sup>
	AT 20	2.31 ± 0.27 <sup>*</sup>	0.90 ± 0.18 <sup>*</sup>	0.74 ± 0.19 <sup>*</sup>	0.53 ± 0.16
	AT 40 + SI 120	1.9 ± 0.18 <sup>*△△</sup>	0.69 ± 0.14 <sup>*△</sup>	0.44 ± 0.10 <sup>*△△</sup>	0.90 ± 0.09 <sup>*△△</sup>
	AT 20 + SI 60	2.0 ± 0.14 <sup>*△△</sup>	0.78 ± 0.22 <sup>*△</sup>	0.59 ± 0.12 <sup>*△△</sup>	0.78 ± 0.13 <sup>*△△</sup>
	AT 10 + SI 30	2.26 ± 0.55 <sup>*</sup>	0.93 ± 0.10	0.70 ± 0.26 <sup>*</sup>	0.68 ± 0.11 <sup>*△</sup>

TC; total cholesterol; TG; triglyceride; LDL; low density lipoprotein; HDL; high density lipoprotein. The Sprague Dawley rats were fed with high fatty diet for 12 consecutive weeks as hyperlipidemia model. AT combined with SI were given once a day for 12 weeks.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$ , compared with corresponding normal group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with corresponding model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ , compared with corresponding AT 20 mg·kg<sup>-1</sup> group.

20 mg·kg<sup>-1</sup> + 60 mg·kg<sup>-1</sup>)对血脂各项指标的调节作用均明显优于单用 AT 20 mg·kg<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ ), AT 伍用 SI (10 mg·kg<sup>-1</sup> + 30 mg·kg<sup>-1</sup>)与单用 AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>对 TC, TG, LDL-C 的作用具有药效等效性,升高 HDL-C 的作用明显优于单用 AT 20 mg·kg<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ )。提示 AT 伍用 SI 后能提高调节脂质代谢紊乱的作用,降低患动脉粥样硬化的危险性。

## 2.2 各供试组动物肝脏病理切片观察

肉眼观察对照组肝组织呈褐红色,有光泽;高脂模型组肝组织呈灰黄色,无光泽,触之有油腻感;各给药组肝组织颜色较对照组颜色稍浅,光泽度稍差。肝脏冰冻切片脂质染色结果表明(图1),对照组肝细胞结构完整,细胞内基本未见脂滴;模型组肝细胞内可见大量脂滴,细胞核被推向一侧;单用 AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>组的大鼠肝细胞内脂滴较高脂组有所减少;AT 伍用 SI 各剂量组均有不同程度的脂质斑块形成,其中 AT 伍用 SI (40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>, 20 mg·kg<sup>-1</sup> + 60 mg·

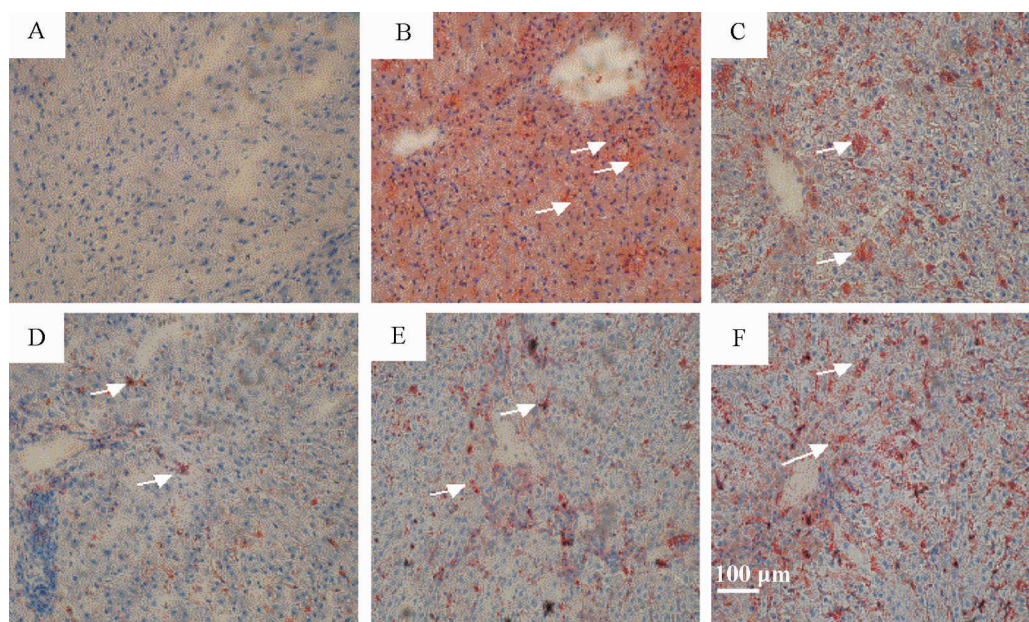
kg<sup>-1</sup>)组的脂质沉积明显少于单用 AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>组, AT 伍用 SI (10 mg·kg<sup>-1</sup> + 30 mg·kg<sup>-1</sup>)组的脂质沉积与单用 AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>组类似。

## 2.3 阿伐他汀伍用大豆异黄酮对大鼠肝细胞 LDLR, apoA-1 mRNA 表达的影响

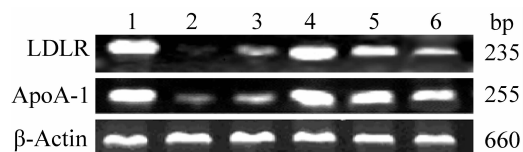
LDLR 和 apoA-1 与  $\beta$ -肌动蛋白的灰度扫描比值表明各给药组目的基因的 mRNA 表达都比模型组有显著升高,AT 伍用 SI (40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>; 20 mg·kg<sup>-1</sup> + 60 mg·kg<sup>-1</sup>)组的 mRNA 表达明显高于单用 AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>组 ( $P < 0.05$ ), AT 伍用 SI (10 mg·kg<sup>-1</sup> + 30 mg·kg<sup>-1</sup>)与单用 AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>组相比,有升高 LDLR 和 apoA-1 mRNA 表达的趋势(图2,表2)。

## 2.4 阿伐他汀伍用大豆异黄酮对大鼠肝细胞 LDLR 蛋白表达的影响

Western 印迹实验显示了特异性抗体对肝脏细胞 LDLR 蛋白的作用(表3,图3)。正常对照组和



**Fig 1. Oil red staining of liver frozen slices from normal, model and drug-treated rats.** A: normal,  $\times 400$ . B: model,  $\times 400$ . C: treated with AT  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $\times 400$ . D: treated with AT + SI ( $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} + 120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),  $\times 400$ . E: treated with AT + SI ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} + 60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),  $\times 400$ . F: treated with AT + SI ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} + 30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),  $\times 400$ . Arrows refer to the lipid sediments in liver.



**Fig 2. Expression of LDLR and apoA-1 mRNA in rats.** Lane 1: normal; lane 2: model; lane 3: AT  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; lane 4: AT + SI ( $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} + 120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); lane 5: AT + SI ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} + 60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); lane 6: AT + SI ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} + 30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

**Tab 2. Effects of atorvastatin combined with soybean isoflavones on LDLR and apoA-1 mRNA expression in rats**

Group/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	LDLR: $\beta$ -actin	apoA-1: $\beta$ -actin
Normal	0.923 $\pm$ 0.063	0.937 $\pm$ 0.052
Model	0.163 $\pm$ 0.015*	0.194 $\pm$ 0.021**
AT 20	0.335 $\pm$ 0.019 <sup>#</sup>	0.228 $\pm$ 0.031
AT 40 + SI 120	0.898 $\pm$ 0.133 <sup>###<math>\Delta\Delta</math></sup>	0.930 $\pm$ 0.156 <sup>###<math>\Delta\Delta</math></sup>
AT 20 + SI 60	0.613 $\pm$ 0.047 <sup>###<math>\Delta\Delta</math></sup>	0.892 $\pm$ 0.118 <sup>###<math>\Delta\Delta</math></sup>
AT 10 + SI 30	0.421 $\pm$ 0.038 <sup>#</sup>	0.752 $\pm$ 0.121 <sup>###<math>\Delta\Delta</math></sup>

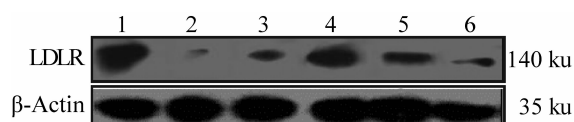
See Tab 1 for drug treatments. The semiquantitative RT-PCR analysis of LDLR and apoA-1 mRNA were given in ratios of LDLR:  $\beta$ -actin and apoA-1:  $\beta$ -actin, respectively.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>###</sup>  $P < 0.01$ , compared with model group;  $\Delta\Delta P < 0.01$ , compared with AT  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  group.

各供试组 LDLR 蛋白表达丰度明显高于模型组 ( $P < 0.05$ ), AT 伍用 SI ( $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} + 120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} + 60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 的蛋白表达明显高于单用 AT  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组 ( $P < 0.05$ ), AT 伍用 SI ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} + 30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 与单用 AT  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组相比, 有促进 LDLR 蛋白表达的趋势。各供试组大鼠肝脏细胞 LDLR 的 mRNA 水平与蛋白含量呈平行性变化, 表明两药伍用对 LDLR 表达的上调作用可能主要取决于 mRNA 水平。

**Tab 3. Effect of atorvastatin combined with soybean isoflavones on LDLR protein expression in rats**

Group/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	LDLR: $\beta$ -actin
Normal	1.293 $\pm$ 0.233
Model	0.163 $\pm$ 0.018*
AT 20	0.371 $\pm$ 0.109 <sup>#</sup>
AT 40 + SI 120	1.103 $\pm$ 0.153 <sup>###<math>\Delta\Delta</math></sup>
AT 20 + SI 60	0.783 $\pm$ 0.147 <sup>###<math>\Delta</math></sup>
AT 10 + SI 30	0.392 $\pm$ 0.031 <sup>##</sup>

See Tab 1 for drug treatments. Western blot analysis of LDLR protein expression was represented as ratios of LDLR:  $\beta$ -actin.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , compared with normal group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>###</sup>  $P < 0.01$ , compared with model group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ , compared with AT  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  group.



**Fig 3. Western blot analysis of LDLR protein expression in rats.** Lane 1: normal; lane 2: model; lane 3: AT 20 mg·kg<sup>-1</sup>; lane 4: AT + SI (40 mg·kg<sup>-1</sup> + 120 mg·kg<sup>-1</sup>); lane 5: AT + SI (20 mg·kg<sup>-1</sup> + 60 mg·kg<sup>-1</sup>); lane 6: AT + SI (10 mg·kg<sup>-1</sup> + 30 mg·kg<sup>-1</sup>).

### 2.5 阿伐他汀伍用大豆异黄酮对大鼠肝功能及肌肉毒性指标的影响

本研究检测了供试组大鼠的天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶及肌酸激酶的变化,发现 AT 伍用 SI 各剂量组大鼠的上述指标与单用 AT 组无明显差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

近年来,HMG-CoA 还原酶抑制剂类药物已被广泛应用于各种类型高脂血症病人的调脂治疗。各项大型随机对照临床实验都证明,该类物质可以明显降低心血管事件的风险<sup>[8]</sup>。许多指南也将其推荐为多种心血管疾病患者的治疗方案。然而,应用该类药物的病人中约有 2/3 的人仍不能避免心血管事件的发生。这就促使研究方向拓宽到一些新的药物靶点,其中有代表性的趋势是针对不同类型血脂异常的单体化合物结合天然植物成分的联合治疗<sup>[9]</sup>。

SI 主要含有金雀异黄酮、大豆昔元和相应的葡萄糖苷,近年来的研究表明,SI 具有良好的调脂作用<sup>[10]</sup>,因此本研究选用了 AT 伍用 SI 作为研究对象。结果表明,相同剂量下 AT 伍用 SI 后,具有较强抑制 TC, TG, LDLR 水平升高和防止 HDL-C 水平下降的作用,调脂效果明显优于单用 AT;且 AT 剂量减半伍用 SI 与 AT 相比,对血脂各项指标的作用具有药效等效性。表明 AT 伍用 SI 不仅具有增强调节血脂代谢紊乱及增强体内胆固醇清除的功能,而且可以减少 AT 用量,降低对肝脏和肌肉的潜在毒性作用,为单体化合物结合天然植物成分治疗脂质代谢紊乱作出了有意义的探索。

大量研究结果表明,LDL-C 水平越高,患动脉粥样硬化的危险性越大<sup>[11]</sup>。当血清胆固醇增高时,机体通过抑制内源性胆固醇合成以及增加胆固醇的清除,使之维持正常水平。由于血清 LDL-C 主要通过肝脏 LDLR 途径清除,因此肝脏 LDLR 表达的变化

能够决定并反映血清胆固醇的代谢;而 HDL 被认为是一种抗动脉粥样硬化的血浆脂蛋白,是冠状动脉的保护因子,HDL 参与胆固醇逆向转运,促进动脉胆固醇的清除,它是胆固醇从细胞转运出来的不可缺少的接受体;apoA-1 是 HDL 的最主要载脂蛋白,既是卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(LCAT)的激活剂和 HDL 的配体,又是胆固醇从细胞移出的不可缺少的接受体,具有胆固醇逆向转运,促进动脉胆固醇清除的作用<sup>[12]</sup>,apoA-1 水平与血浆 HDL-C 水平呈正相关。本研究表明,AT 伍用 SI 后在转录水平增强大鼠肝脏 LDLR mRNA 和 apoA-1 mRNA 的表达,对 LDLR mRNA 的促表达作用明显优于单用相同剂量下的 AT,使 LDLR 结合更多的 LDL 及其他含有载脂蛋白 apoB 和 apoE 的脂蛋白,从而加速血浆中 LDL-C 的消除,使胆固醇水平降低。联合用药后对 apoA-1 基因表达的促进作用是单用 AT 所没有体现的,提示 AT 伍用 SI 后调血脂作用增强的机制与此相关,联合用药后肝脏 apoA-1 mRNA 水平显著增高,促进肝脏合成 apoA-1,增加血浆 apoA-1 含量,提高血浆 HDL 水平,有利于胆固醇的逆转运,有效预防高脂血症对机体的损害。

本研究结果表明 AT 伍用 SI 后,可能通过增强 LDLR 活性和提高 apoA-1 mRNA 表达预防脂质代谢紊乱的发生,此结果为 AT 伍用 SI 预防心脑血管疾病的临床应用提供了动物实验依据。

## 4 参考文献:

- [1] Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors[J]. *Lipid Res*, 2003, **33**(4):1569 - 1582.
- [2] Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G. Differences in coronary mortality can be explained differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland[J]. *Circulation*, 1993, **99**(5): 2771 - 2779.
- [3] Lovati MR, Manzoni C, Canavesi A. Soybean protein diet increases low density lipoprotein receptor activity in mononuclear cells from hypercholesterol patients [J]. *Clin Invest*, 1987, **80**(7):1498 - 1502.
- [4] Potter SM, Baum JA, Teng H. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women[J]. *Am J Clin Nutr*, 1998, **68**(1):1375 - 1379.
- [5] Williams KJ, Fless GM. Mechanism by which lipopro-

- tein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein and nascent lipoproteins[J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**(19):13284 - 13292.
- [6] Nagasaki A, Kikuchi T. Vitamin A regulates the expression of apolipoprotein A<sub>1</sub> genes in the rat[J]. *Biochem Biophys Res*, 1994, **27**(3):1510 - 1517.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**(1):248 - 254.
- [8] Brown AS, Bakker-Arkema RG. Treating patients with documented atherosclerosis to National Cholesterol Education Program-recommended low-density-lipoprotein cholesterol goals with atorvastatin, fluvastatin, lovastatin and simvastatin[J]. *Am Coll Cardiol*, 1998, **32**(3):665 - 672.
- [9] Kashyap ML, Evans R, Simmons PD. New combination niacin/statin formulation shows pronounced effects on major lipoproteins and is well tolerated [abstract][J]. *Am Coll Cardiol*, 2000, **35**(Suppl A):326A.
- [10] Yamakoshi J, Piskula MK, Izumi T. Isoflavone, a glycone rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits[J]. *J Nutr*, 2000, **130**(1):1887 - 1893.
- [11] Stein EA. New statins and new doses of older statins [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2000, **11**(3):14 - 28.
- [12] Srivastava RA. Saturated fatty acid, but not cholesterol, regulates apolipoprotein A<sub>1</sub> gene expression by posttranscriptional mechanism [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1994, **34**(5):393 - 402.

## Combined effects of atorvastatin and soybean isoflavones on hypercholesterolemia and lipoprotein metabolism

HE Xu-Dong, WU Hong-Hai, LOU Yi-Jia \*

(Institute of Pharmacology, Toxicology and Biochemical Pharmaceutics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

**Abstract:** **AIM** To study the combined effects of atorvastatin and soybean isoflavones on hypercholesterolemia and lipoprotein metabolism to provide scientific basis for the combination therapy. **METHODS** The Sprague-Dawley rats were fed with high fatty diet for 12 consecutive weeks as hyperlipidemia model. The content of lipoprotein in serum, pathological process and mRNA expression of low density lipoprotein receptor and apoA-1 were detected by enzymatic analysis, frozen section, RT-PCR and Western blot respectively. **RESULTS** The combination of atorvastatin and soybean isoflavones decreased the contents of total cholesterol (TC), low density lipoprotein-C (LDL-C) and increased the content of high density lipoprotein-C (HDL-C), superior than using atorvastatin alone ( $P < 0.05$ ). It inhibited the deposition of lipoprotein in liver. The results of RT-PCR and Western blot test showed

the combination atorvastatin and soybean isoflavones ( $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} + 120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} + 60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) were better than atorvastatin  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  in regulating the expression of LDL receptor (LDLR) and apoA-1 mRNA and LDLR protein expression ( $P < 0.05$ ), combination of atorvastatin and soybean isoflavones ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} + 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) upregulated apoA-1 mRNA expression better than atorvastatin  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION** Combination of atorvastatin and soybean isoflavones can prevent lipid metabolism disorders through upregulation of LDLR and apoA-1 transcription level and LDLR protein level.

**Key words:** atorvastatin; soybean isoflavones; lipoproteins; metabolism

\* Corresponding author.