

木豆叶芪类提取物对高脂模型小鼠血脂和肝脏胆固醇的降低作用

骆庆峰¹, 孙 兰^{1*}, 斯建勇², 陈迪华², 杜冠华³

(1. 北京协和医学院 基础学院, 中国医学科学院 基础医学研究所, 北京 100005;
2. 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100094; 3. 中国医学科学院 药物研究所, 北京 100050)

摘要: 观察木豆叶芪类提取物对高脂饲料诱导的高脂模型小鼠肝脏胆固醇代谢的影响。将昆明种小鼠分为对照组、高脂模型组、木豆叶芪类提取物高剂量组(200 mg·kg⁻¹)、木豆叶芪类提取物低剂量组(100 mg·kg⁻¹)和辛伐他汀组(12 mg·kg⁻¹),分别采用基础饲料和高脂饲料喂养。4周后检测小鼠血清和肝脏脂质的含量,并采用反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)方法检测小鼠肝脏中胆固醇 7 α -羟化酶(cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1)和低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDL-R)的 mRNA 表达。结果发现,高脂模型组的血清脂质和肝脏脂质含量均明显升高。木豆叶芪类提取物 200 mg·kg⁻¹可以使血清和肝脏中总胆固醇水平分别下降 31.5% 和 22.7% ($P < 0.05$),使血清和肝脏中甘油三酯含量分别减少 23.0% 和 14.4%,使血清低密度脂蛋白水平下降 53.0% ($P < 0.01$)。同时,木豆叶芪类提取物还可以上调肝脏组织 CYP7A1 和 LDL-R 的 mRNA 表达水平。结果表明,木豆叶芪类提取物能够显著降低高脂小鼠的血清和肝脏脂质水平,其降低胆固醇的作用可能与促进肝脏 LDL-R 表达和增加肝脏胆固醇向胆汁酸转化有关。

关键词: 木豆叶芪类提取物; 胆固醇; 肝脏 CYP7A1; 肝脏 LDL-R

中图分类号: R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513 - 4870(2008)02 - 0145 - 05

Hypocholesterolemic effect of stilbene extract from *Cajanus cajan* L. on serum and hepatic lipid in diet-induced hyperlipidemic mice

LUO Qing-feng¹, SUN Lan^{1*}, SI Jian-yong², CHEN Di-hua², DU Guan-hua³

(1. School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China; 3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: *Cajanus cajan* L. is a natural plant, which contains a lot of potential active components. In the present study, we identified the effects of the stilbene extract from *Cajanus cajan* L. (sECC) on hepatic cholesterol metabolism in diet-induced (for 4 weeks) hyperlipidemic Kunming mice. All experimental mice were divided into 5 groups: control group, high lipid model group, sECC-treated with 200 or 100 mg·kg⁻¹, and simvastatin (Sim, 12 mg·kg⁻¹) treated group. The mice were fed with fat and cholesterol-enriched chow except control mice that were fed with standard diet. The effects of sECC were investigated by monitoring serum and liver lipid profile (*i. e.* cholesterol homeostasis) in mice. To further explore the mechanism of sECC, hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) and low density lipoprotein (LDL) receptor expressions in cholesterol homeostasis were analyzed by reverse transcription PCR. After 4 weeks pretreatment, the mice in the high lipid model group showed markedly higher serum and hepatic lipid contents than control group ($P < 0.01$). Compared with high lipid model group, the increased serum and hepatic lipid contents were markedly attenuated by sECC (200 mg·kg⁻¹), the serum and hepatic total cholesterol were reduced by 31.5% and 22.7% ($P < 0.05$), respectively. The triglyceride contents of serum and liver were also lowered by 23.0% and 14.4%, respectively. At the

收稿日期: 2007-07-27.

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2004AA2Z3782).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 65296403, E-mail: sunlan2000@yahoo.com

same times, serum LDL cholesterol decreased by 53.0% ($P < 0.01$). The mRNA expressions of hepatic CYP7A1 and LDL-receptor were significantly enhanced in the mice administered with sECC ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), whereas those expressions were suppressed by the fat and cholesterol-enriched diet. These data indicate that sECC reduces the atherogenic properties of dietary cholesterol in mice. It is indicated that expression enhancement of hepatic LDL-receptor and cholesterol 7α -hydroxylase may be responsible for the hypercholesterolemic effect.

Key words: stilbene extract from *Cajanus cajan* L.; cholesterol; hepatic CYP7A1; hepatic LDL-receptor

高脂血症可导致动脉粥样硬化,继而引起冠心病、脑卒中、心肌梗死等病症,控制高脂血症的发生对于预防心脑血管疾病有着重要意义。目前常用的他汀类调血脂药物还有些不尽人意的地方^[1]。从药用植物中寻找具有降血脂作用的天然产物,并研究其作用机制是近年来一个研究热点^[2]。

木豆(*Cajanus cajan* L.)生长于我国南部的多个省份,属于豆科木豆属,为多年生常绿灌木。木豆叶提取物主要包括黄酮类提取物和芪类提取物(stilbene extract from *Cajanus cajan* L., sECC)两大部分。木豆叶可用于治疗褥疮、水痘和股骨头坏死等疾病^[3,4],但是,目前还没有木豆叶影响血脂代谢的报道。本实验采用高脂饲料喂养的方法建立小鼠高脂模型,首次观察木豆叶芪类提取物对高脂模型小鼠血脂和肝脏脂质的影响,并初步探讨其影响肝脏胆固醇代谢的作用机制。

材料与amp;方法

实验动物 雄性昆明种小鼠(60只,二级),体重(20 ± 2)g,购自中国医学科学院动物研究所,动物合格证号 SCXK 京 2004-0001。实验期间饲养于清洁级动物房,饲料和饮水均经过消毒。

试剂和材料 木豆叶采自广西省,鉴定人为林雨霖教授,标本保存地点为中国医学科学院药用植物研究所。木豆叶芪类提取物由斯建勇教授提供。将木豆叶经乙醇回流提取3次,依次以己烷和二氯甲烷萃取,结晶析出后过滤得木豆叶芪类提取物。含有木豆素、木豆素 C 和木豆素 A 三种芪类成分,质量比为 4:1:0.26。

总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)检测试剂盒均购自北京中生北控生物科技股份有限公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,反转录聚合酶链式反应

(RT-PCR)试剂盒购自大连宝生物技术有限公司,RT-PCR 反应采用美国 BIO-RAD 系统。

高脂小鼠模型的建立 所有动物适应性喂养1周以后,取尾动脉血液检测血清 TC 水平,并根据血清 TC 水平和体重情况进行随机分组,各组之间血清 TC 和体重水平无统计学差异。采用喂食高脂饲料的方法复制小鼠高脂模型^[5,6],高脂饲料配方如下:2%胆固醇、0.5%胆酸钠、10%猪油,其余为基础饲料。对照组动物以基础饲料喂养,其余4组动物以高脂饲料喂养,每2天记录动物进食量和体重,造模时间为28d。

动物分组及用药 动物分为5组,即对照组(control, Con)、模型组(model, Mod)、木豆叶芪类提取物低剂量组($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, SL)、木豆叶芪类提取物高剂量组($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, SH)和辛伐他汀(杭州默沙东制药有限公司产品, simvastatin, Sim) $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组,每组12只小鼠。所有药物均以0.5%羧甲基纤维素钠作为溶剂制作药物混悬液。造模同时分别给予木豆叶芪类提取物或辛伐他汀灌胃(1次/天)治疗,共28d。对照组和模型组以等量溶剂灌胃。

血清及肝脏组织中脂质含量测定 末次给药后动物禁食过夜,次日摘眼球取血,分离血清后 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。摘取各组动物肝脏,生理盐水冲净,吸干并称湿重,液氮速冻后 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。采用紫外分光光度法检测血清和肝脏中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)和高密度脂蛋白(HDL-C)水平。配制 Folch 液(氯仿-甲醇为2:1),采用 Folch 法提取小鼠肝脏中脂质并检测^[7]。以下列公式计算各组动物的肝脏系数:肝脏系数 = 肝脏重量(g)/体重(g) $\times 100$ 。

肝脏总 RNA 的分离与鉴定 将肝脏组织在液氮中匀浆,使用 Trizol 试剂提取其中的总 RNA。紫外分光光度法测定提取的总 RNA 的吸收度值,凝胶电泳对总 RNA 进行定性分析,验证所提取的总

RNA 纯度高,无降解,可作为逆转录反应的模板。

目的基因的引物设计与合成 胆固醇 7 α -羟化酶(cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1)和低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDL-R)采用 Premier 5 软件设计相应基因的引物序列,以 β -actin 作为内参,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。具体序列见表 1。

反转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 反应条件为预变性:94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;然后变性:94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s;退火:59 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s;延伸:72 $^{\circ}\text{C}$ 、40 s。其中,LDL-R 基因扩增反应为 24 个循环,CYP7A1 基因扩增反应为 25 个循环。PCR 产物以 2% 凝胶电泳检测,采用凝胶图像处理系统进行扫描半定量分析。

统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 数据处理软件,所有结果采用 ONE-WAY ANOVA 分析进行统计。

结果

1 木豆叶芪类提取物对高脂模型小鼠体重和肝脏系数的影响

实验期间,各组动物的进食量无统计学差异。由表 2 可知,实验前各组动物的体重无统计学差异。实验末期,模型组动物体重和肝脏系数显著高于对照组($P < 0.01$),sECC 组动物的体重和肝脏系数随剂量增加而下降,且 SH 组动物实验末期体重明显低于模型组,显示木豆叶芪类提取物 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可明显降低治疗动物的体重水平。

2 木豆叶芪类提取物对高脂模型小鼠血脂水平的影响

由表 3 可知,模型组的血清胆固醇含量显著高于对照组($P < 0.01$),表明高脂模型建立成功。sECC 和辛伐他汀可以降低血脂水平。sECC 组的血清 TC 和 TG 水平随用药剂量的增加而下降。与模型组相比,SH 组的 TC 和 TG 显著降低,分别减少了 31.5% 和 23.0% ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。显示木豆叶芪类提取物 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可明显降低异常升高的血清 TC 和 TG。

模型组的血清 LDL-C 水平为对照组的 2.87 倍($P < 0.01$),而 SH、SL 和 Sim 组的 LDL-C 水平显著低于模型组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),其中 SH 组和 SL 组的 LDL-C 含量比模型组各自下降了 53.0% 和 32.0%,表明木豆叶芪类提取物具有明显降低血清 LDL-C 的作用。由表 3 可知,各组的血清 HDL-C 水平无显著性差异。

Table 2 Effect of sECC on body and liver wet weight in hypercholesterolemic mice

Group	Dose / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Body weight		Liver wet weight (g/100g BW)
		Initial/g	Final/g	
Control		23.1 \pm 1.5	34.1 \pm 1.7	3.6 \pm 0.5
Model		22.8 \pm 2.1	37.0 \pm 2.2 ^{**}	4.2 \pm 0.5 ^{**}
sECC(SL)	100	23.0 \pm 1.4	36.0 \pm 2.3	4.0 \pm 0.5
sECC(SH)	200	22.7 \pm 2.1	35.1 \pm 2.1 [*]	3.9 \pm 0.4
Simvastatin	12	23.1 \pm 1.7	35.4 \pm 2.1	3.9 \pm 0.4

$n = 12$, $\bar{x} \pm s$. ^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group. BW: body weight

Table 1 Oligonucleotide primers

Gene name	GenBank Accession No.	Sequence		Product size /bp
β -Actin	NM007393	Sense	5'-AGCCATGTACGTAGCGATCC-3'	200
		Anti-sense	5'-CTCTCAGCTCTGGTGGTGAA-3'	
LDL-receptor	NM010700	Sense	5'-TGACTCAGACGAACAAGGCTG-3'	118
		Anti-sense	5'-ATCTACGGAATCTCGCTCTCC-3'	
CYP7A1	NM007824	Sense	5'-GGGATTGCTGTGGTACTGAGC-3'	100
		Anti-sense	5'-CGTATGGAATCAACCCGTTCTC-3'	

Table 3 Effect of sECC on serum lipid contents in hypercholesterolemic mice

Group	Dose / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Total cholesterol / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Triglyceride / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDL cholesterol / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	HDL cholesterol / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
Control		2.69 \pm 0.63	1.92 \pm 0.44	0.63 \pm 0.36	1.75 \pm 0.39
Model		4.83 \pm 1.29 ^{**}	2.78 \pm 0.81 ^{**}	1.81 \pm 0.84 ^{**}	2.39 \pm 0.67
sECC(SL)	100	4.12 \pm 1.01	2.47 \pm 0.92	1.23 \pm 0.73 [*]	2.40 \pm 0.60
sECC(SH)	200	3.31 \pm 0.91 ^{**}	2.14 \pm 0.66 [*]	0.85 \pm 0.60 ^{**}	2.06 \pm 0.60
Simvastatin	12	3.59 \pm 0.82 ^{**}	2.18 \pm 0.60 [*]	1.08 \pm 0.60 ^{**}	2.15 \pm 0.58

$n = 12$, $\bar{x} \pm s$. ^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3 木豆叶芪类提取物对高脂模型小鼠肝脏脂质水平的影响

由表 4 可知, 模型组动物肝脏中 TC 和 TG 含量显著高于正常组 ($P < 0.01$), 表明高脂饮食可以升高动物的肝脏脂质水平。sECC 和辛伐他汀可以减少肝脏的脂质含量, SH 组动物肝脏中 TC 和 TG 含量与模型组相比, 分别降低了 22.7% 和 14.4% ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 显示木豆叶芪类提取物可以抑制肝脏脂质的蓄积。

Table 4 Effect of sECC on liver lipid content in hypercholesterolemic mice

Group	Dose /mg · kg ⁻¹	Liver total cholesterol /mg · g ⁻¹ (wet weight)	Liver triglyceride /mg · g ⁻¹ (wet weight)
Control		2.71 ± 0.13	11.01 ± 0.47
Model		4.62 ± 0.28 ^{**}	15.22 ± 0.75 ^{**}
sECC(SL)	100	4.17 ± 0.24	13.81 ± 0.56
sECC(SH)	200	3.57 ± 0.22 [*]	13.03 ± 0.69 [*]
Simvastatin	12	3.91 ± 0.20 [*]	13.24 ± 0.56 [*]

$n = 12$, $\bar{x} \pm s$. ^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group

4 木豆叶芪类提取物对高脂模型小鼠肝脏 CYP7A1 和 LDL-R 的 mRNA 表达的影响

由图 1 可以看出, 与对照组相比, 模型组肝脏组织中 CYP7A1 和 LDL-R 的 mRNA 表达水平显著下降

($P < 0.01$)。与模型组比较, SH 组的肝脏 CYP7A1 和 LDL-R 的 mRNA 的表达水平显著增加 ($P < 0.01$)。同时, SL 组 LDL-R 的 mRNA 表达水平也有所增加 ($P < 0.05$)。Sim 组肝脏 LDL-R 的 mRNA 的表达水平显著增加 ($P < 0.01$), 而 CYP7A1 的 mRNA 的表达水平与模型组很接近, 显示辛伐他汀对 CYP7A1 的 mRNA 表达无明显影响。

讨论

高脂饲料喂养后动物血脂水平显著升高, 表明高脂模型建立成功。实验结果显示, 给予木豆叶芪类提取物使动物体重下降, 血清 TC、TG 及 LDL-C 的水平显著降低, 同时肝脏中 TC 和 TG 的含量也明显减少。表明木豆叶芪类提取物可以有效抑制血脂升高, 缓解肝脏脂质的蓄积。

肝脏是体内代谢胆固醇的重要器官。肝脏的 CYP7A1 是胆固醇转化为胆汁酸的关键酶, 而 LDL-R 是介导肝脏摄取 LDL-C 的重要受体。本实验发现, 模型组动物摄取高脂饲料后, 肝脏中 CYP7A1 和 LDL-R 的 mRNA 水平与对照组相比明显下降, 与文献^[8,9]报道一致。研究结果说明, 给予木豆叶芪类提取物能够逆转这种改变, 使相关基因的表达接近正常水平。

当血液中含有过量 LDL-C 时会导致 LDL-C 在血管壁的沉积, 进而可能引起动脉粥样硬化的脂质

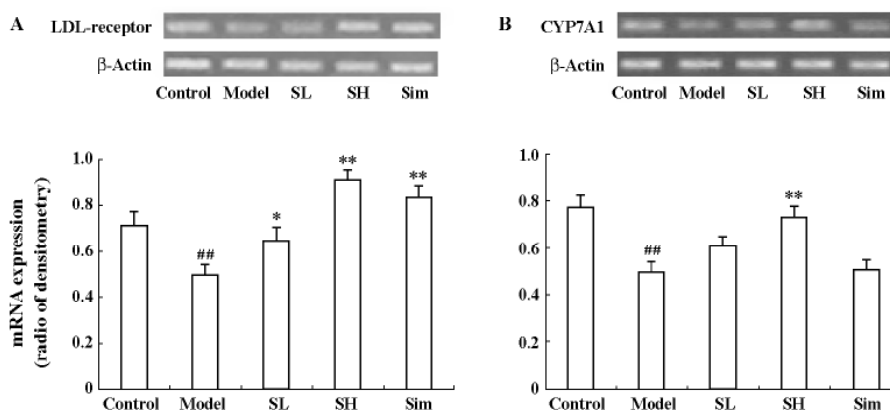


Figure 1 Effect of sECC on hepatic LDL-receptor (A) and CYP7A1 (B) mRNA bands quantified by densitometric analysis. The relative levels of mRNA expression for LDL-receptor and CYP7A1 were normalized to β -actin. The values of these mRNA were expressed relative to the value of β -actin mRNA in the respective groups. A: After 4 weeks treatment, compared with the model group, the LDL-receptor mRNA expressions were markedly up-regulated in the mice administered with sECC at 200 and 100 mg · kg⁻¹ group; B: The mRNA expression of CYP7A1 in the sECC at 200 mg · kg⁻¹ group was significantly higher than that of model group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group

斑块形成。高胆固醇饲料能增加血脂水平并减少肝脏胆固醇的排泄,由此改变肝脏 LDL-R 的表达。应用 sECC 能显著上调肝脏 LDL-R 的 mRNA 表达,增加肝脏对 LDL-C 的吸收,并通过该作用减少体内胆固醇总量。

CYP7A1 催化胆固醇转化为胆汁酸是肝脏排泄胆固醇的主要方式^[10],本研究发现辛伐他汀对肝脏 CYP7A1 的 mRNA 表达无明显影响。与辛伐他汀相比,木豆叶芪类提取物能够增加肝脏 CYP7A1 mRNA 的表达,促进肝脏胆固醇经由胆汁酸排出体外,从而降低体内胆固醇的水平。结果显示,木豆叶芪类提取物具有与辛伐他汀不同的调血脂机制,其作用靶点可能更为多样。

通过上述结果可知,木豆叶芪类提取物可以显著降低高脂模型小鼠体重以及血清 TC、TG 及 LDL-C 的水平,同时能够减少肝脏 TC 和 TG 的蓄积。木豆叶芪类提取物可能是通过促进肝脏吸收 LDL-C 以及增加肝脏胆固醇向胆汁酸转化来降低体内胆固醇的含量。木豆叶芪类提取物能够改善体内紊乱的脂质平衡,并具有治疗动脉粥样硬化和脂肪肝等疾病的潜在作用。本研究结果为进一步探讨木豆叶芪类提取物影响胆固醇代谢的作用机制奠定了基础。

References

- [1] Chen BS, Su LH. The investigative advancement of statins [J]. J China Pharm (中国药房), 2005, 16: 545 - 546.
- [2] Yokozawa T, Cho EJ, Sasaki S, et al. The protective role of Chinese prescription Kangen-karyu extract on diet-induced hypercholesterolemia in rats [J]. Biol Pharm

Bull, 2006, 29: 760 - 765.

- [3] Zhong XR. The utilization value of pigeon pea [J]. Res Inf Tradit Chin Med (中药研究与信息), 2001, 3: 47.
- [4] Zhang DX, Wang HB, Tang LM, et al. The twenty-one cases observations of combined therapy effects on femoral head necrosis of manipulative reduction for childhood developing dislocation of hip joint [J]. J New Chin Med (新中医), 2006, 38: 52 - 53.
- [5] Li YB, Zhao ZG, Tang MD. Changes of blood lipid level and anti-oxidation ability in mice after feeding with algin [J]. Chin J Clin Rehabil (中国临床康复), 2006, 10: 80 - 81.
- [6] Paik HD, Park JS, Park E. Effects of bacillus polyfermenticus SCD on lipid and antioxidant metabolisms in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28: 1270 - 1274.
- [7] Ma XR, Lin CR, Wang M, et al. Effect of Rongban Tongmai Granules on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2006, 28: 1167 - 1170.
- [8] Han KH, Iijuka M, Shimada K, et al. Resistant starch lowered serum cholesterol and hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA mRNA levels and increased hepatic LDL-receptor and cholesterol 7alpha-hydroxylase mRNA levels in rats fed a cholesterol diet [J]. Br J Nutr, 2005, 94: 902 - 908.
- [9] Yan LP, Chan SW, Chan AS, et al. Puerarin decreases serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelial nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats [J]. Life Sci, 2006, 79: 324 - 330.
- [10] Yang TT, Koo MW. Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion [J]. Life Sci, 2000, 66: 411 - 423.