

甘糖酯对高脂血症大鼠血脂及脂蛋白脂酶的调节作用

高焱, 于文功*, 韩峰, 路新枝, 宫倩红, 胡晓珂, 管华诗

(青岛海洋大学海洋药物与食品研究所, 山东 青岛 266003)

摘要: 目的 探讨甘糖酯调节血脂的分子机制。方法 以不同剂量甘糖酯(37.8, 75.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹)给高脂血症大鼠 ig 给药 3 周, 禁食 12 h 后, 测定大鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的浓度变化, 用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测组织中脂蛋白脂酶(LPL) mRNA 的表达。结果 甘糖酯有降低血清 TC、TG 和 LDL-C, 升高 HDL-C 的作用, 同时提高 LPL mRNA 的表达, 且呈剂量依赖性关系。甘糖酯对 LPL mRNA 转录的促进作用与其降低 TC、TG 和 LDL-C 的作用呈正比关系。结论 甘糖酯通过促进 LPL mRNA 转录而调节血脂水平, 这可能是甘糖酯降血脂、预防动脉粥样硬化等心脑血管疾病的机制之一。

关键词: 甘糖酯; 高脂血症; 脂蛋白脂酶; 反转录聚合酶链式反应

中图分类号: R965; R972.6

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2002)09-0687-04

高脂血症引起血管内皮细胞损伤、平滑肌细胞异常增殖、凝血活性增强及纤溶系统的抑制, 导致血栓形成、动脉粥样硬化等心血管疾病^[1]。脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)是一种分子量为 55 ku 的脂质代谢酶^[2]。LPL 的活性增强能影响血浆 TG 和胆固醇(TC, LDL-C, HDL-C, VLDL-C 等)的水平, 从而调节血浆脂蛋白中的脂质代谢, 抵抗高脂血症的发生^[3]。LPL 的活性下降可引起高脂血症^[4]。

甘糖酯(propylene glycol mannate sulfate, PGMS)是一种低分子量(5 000)的类肝素硫酸多糖物质, 有调节血脂、防止血栓形成和预防动脉粥样硬化的作用^[5]。体外实验表明, 甘糖酯对培养的牛脑微血管平滑肌细胞的增殖有抑制作用^[6], 能防止多聚阴离子和氧自由基致人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的损伤^[7]。但目前关于甘糖酯降血脂作用机制的研究未见报道。本文以高脂血症大鼠为模型, 研究发现甘糖酯可提高脂质代谢酶 LPL mRNA 的转录水平, 阐明了甘糖酯对高脂血症大鼠血脂调节作用的分子机制。

材料与方 法

药品与试剂 甘糖酯(批号: 20001101), 白色粉

末, 由青岛华海制药厂提供; 高脂乳剂(10%胆固醇, 20%猪油, 1%丙基硫氧嘧啶和 2%胆酸钠的脂肪乳剂), 由中国上海惠兴生物试剂有限公司、上海信谊药业有限公司提供; 异硫氰酸胍(Amresco 分装), β-巯基乙醇(2-ME, Sigma), N-十二烷基肌氨酸钠(Sigma), 焦碳酸二乙酯(DEPC, Serva); RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 大连公司); TC, TG, LDL-C 和 HDL-C 测定试剂盒(北京中生生物工程高技术公司); 其他试剂均为国产分析纯。

仪器 9600 GeneAmp PCR System(PE 公司); DY89-I 型电动玻璃匀浆器(宁波新芝科器研究所); RAINBOW 酶标仪(奥地利); DU640 核酸与蛋白质分析仪(Backman 公司); JOUAN BR4i 高速冷冻离心机(法国); Storm 860 激光扫描成像分析系统(Amersham Pharmacia 公司)。

动物 体重 160~180 g, ♂, Wistar 大鼠, 购自青岛市药品检验所。饲养条件为: 室温(22±1)℃, 湿度(55±10)%。

高脂模型建立及药物治疗 实验前, 按体重将大鼠随机分为 4 组: 正常对照组、高脂模型组、低剂量甘糖酯治疗组和高剂量甘糖酯治疗组, 每组 6 只。各组每日均以基础饲料饲养。除正常组外, 其他 3 组每日根据文献^[8], 按 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 的剂量 ig 高脂乳剂, 15 d 后尾静脉取血, 测定血脂各指标, 证实模型建立成功。治疗组每日 ig 甘糖酯, 非治疗组 ig 等体积生理盐水作对照。甘糖酯的用量按照“人和动物体表面积折算的等效剂量比值表”计算, 即低剂

收稿日期: 2001-11-09。

基金项目: 科技部科技基础性工作项目(G-99-A-15b)。

* 通讯作者 Tel: (0532) 2032067, Fax: (0532) 2033054,

E-mail: yuwengong@public.qd.sd.cn

量组为 37.8 mg·kg⁻¹·d⁻¹,高剂量组为 75.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹。给药 3 周,在禁食 12 h 后,眼眦静脉取血,分离血清。然后,引颈处死,迅速取出肝脏、脾脏和胸主动脉,液氮速冻,于 - 80℃保存。

血脂的测定 血液于室温凝血后,12 000 × g,4℃高速离心分离血清,按照试剂盒说明的步骤测定血清 TC, TG, LDL-C 和 HDL-C。按 Friedewald 和 Levy^[9]提出的公式,计算 VLDL-C 的含量,即 VLDL-C = TC - (HDL-C + LDL-C)。

RNA分离与鉴定 用异硫氰酸胍一步法提取组织中总 RNA。每 100 mg 组织加 1 mL 变性液匀浆,在每 0.5 mL 匀浆液中加入 2 mol·L⁻¹ (pH 4.0) 乙酸钠 50 μL,水饱和酚 0.5 mL,氯仿-异戊醇(49:1) 100 μL 混匀,冰浴 15 min,4℃,10 000 × g 离心 20 min;取出上层水相,加入等体积异丙醇,-20℃放置 30 min,4℃,10 000 × g 离心 20 min 沉淀 RNA;用 75% 乙醇 1 mL 洗涤;干燥后的 RNA 沉淀溶解于 DEPC 处理过的水中,以 1.5% 凝胶电泳法检测 RNA 的纯度和完整性。

引物设计与合成 根据 Genebank 中 LPL mRNA 的全序列^[10],利用 DNASIS 软件设计引物为上游引物:5'-CAACTGGCTGGAGGAAGA-3' (18 bp);下游引物:5'-CACCTGTATGCCTTGCTG-3' (18 bp),扩增片段长度 456 bp。β 肌动蛋白(β-actin)作为内标,根据 Genebank 中 mRNA 全序列^[11]设计引物为上游引物:5'-CCACACTTCTACAATGAGG-3' (20 bp);下游引物:5'-ATTGTGATGGACTCCGGAGA-3' (20 bp),扩增片段长度 200 bp。所有引物均由上海生工生物工程技术

服务有限公司(Sangon)合成。

反转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 参照试剂盒说明进行。首先进行反转录反应合成 cDNA,条件为:30℃ 10 min,42℃ 30 min,97℃ 5 min,5℃ 5 min。然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应,反应条件:(1) 94℃ 2 min;(2) 30 个循环:94℃ 0.5 min,62℃ 0.5 min,72℃ 1.5 min;(3) 72℃ 7 min。PCR 产物以 1.5% 凝胶电泳检测。用 Storm 860 激光扫描成像分析系统对照片进行光密度扫描定量。

统计分析 用配对 t 检验进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1 甘糖酯对高脂血症大鼠血脂的调节作用

如表 1 所示,高脂血症模型组比正常组血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)均显著升高,其中 TC 含量升高约 2.9 倍,TG 含量升高 67.6%;而高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)显著降低,由(2.04 ± 0.17) mmol·L⁻¹ 降至(1.45 ± 0.04) mmol·L⁻¹。甘糖酯用药组与高脂模型组相比,血清中 TC, TG, LDL-C, VLDL-C 和 HDL-C 均有显著变化,且呈剂量依赖性关系。在甘糖酯高剂量用药组中,血清中 TC 比高脂模型组降低 32.1%,LDL-C 降低 47.8%,VLDL-C 降低 44.0%,TG 降低 37.0%,尤其是 TG 和 HDL-C 几乎接近于正常组水平。

Table 1 Effect of propylene glycol mannate sulfate (PGMS) on blood lipid parameters in hyperlipidemic rats

Group	Dose/ mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Blood lipid / mmol·L ⁻¹				
		TC	TG	LDL-C	HDL-C	VLDL-C
Normal control		1.94 ± 0.16	0.69 ± 0.05	0.15 ± 0.12	2.04 ± 0.17	- 0.2 ± 0.3
Hypertipidemic control		7.5 ± 0.5 ^{△△△}	1.16 ± 0.14 ^{△△△}	4.4 ± 0.5 ^{△△△}	1.45 ± 0.04 ^{△△△}	1.65 ± 0.28 ^{△△△}
PGMS	37.8	6.4 ± 0.5 ^{**△△△}	1.09 ± 0.08 ^{*△△}	3.4 ± 0.4 ^{**△△△}	1.57 ± 0.10 ^{*△△}	1.42 ± 0.24 ^{*△△△}
	75.6	5.1 ± 0.5 ^{***△△△}	0.73 ± 0.11 ^{***}	2.31 ± 0.27 ^{***△△△}	1.9 ± 0.3 ^{***△}	0.93 ± 0.04 ^{***△△△}

PGMS was given to Wistar rats by ig at different doses for three weeks. The blood lipid parameters: total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C). n = 6, $\bar{x} \pm s$. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs hyperlipidemic control group; [△] P < 0.05, ^{△△} P < 0.01, ^{△△△} P < 0.001 vs normal control group

2 甘糖酯对肝及胸主动脉 LPL mRNA 表达的促进作用

RT-PCR 结果显示,高脂模型组与正常对照组相比较,肝脏组织中 LPL mRNA 表达水平降低

48.0%;而甘糖酯用药组,LPL mRNA 表达显著升高,尤其是高剂量组,比高脂模型组升高了 1.85 倍(图 1,2)。脾和胸主动脉组织中 LPL mRNA 的表达与肝脏具有同样的变化(图 1,2)。

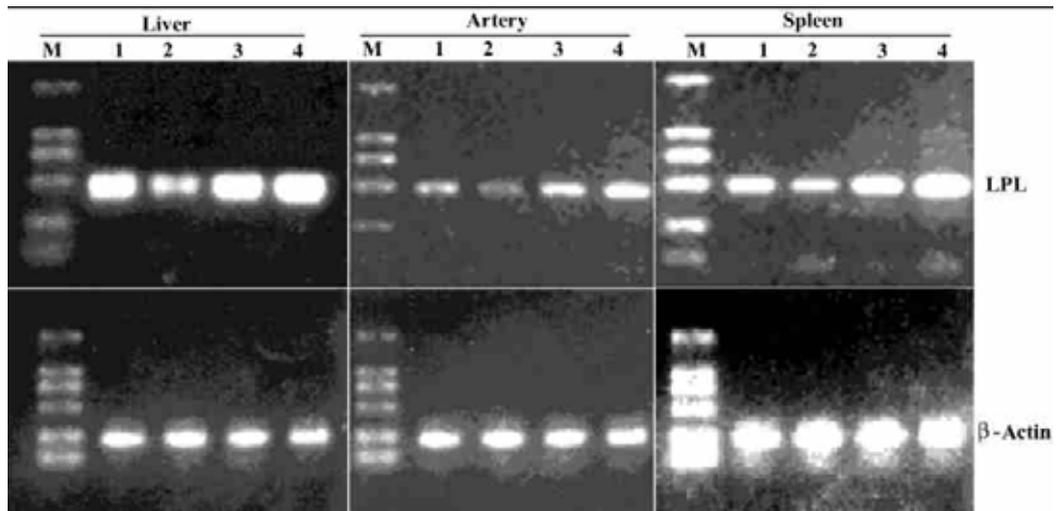


Figure 1 Effect of PGMS on LPL mRNA expression in hyperlipidemic rat liver, artery and spleen. PGMS was given to Wistar rats by ig at different doses for three weeks. The total RNA was extracted from the rat liver. LPL and β -actin levels were detected with RT-PCR. The PCR samples were loaded on 1.5% agarose gel. Lane M. Molecular weight marker of DL-2000 (2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp) (TaKaRa); Lane 1. Normal control; Lane 2. Hyperlipidemic control; Lane 3. PGMS $37.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; Lane 4. PGMS $75.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$

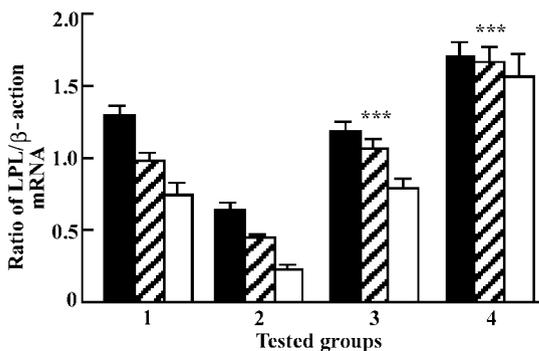


Figure 2 Quantitative analysis of LPL mRNA expression in hyperlipidemic rat liver, artery and spleen. Storm 860 analysis system was used to determine the relative quantity of LPL of Figure 1. β -actin was used as an internal standard. 1. Normal control; 2. Hyperlipidemic control; 3. PGMS $37.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 4. PGMS $75.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs hyperlipidemic control group. ■ Liver; ▨ Artery; □ Spleen

讨 论

血脂代谢的调节主要由脂蛋白代谢酶直接发挥作用,包括脂蛋白脂酶(LPL)、肝脂酶(HL)、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)和胆固醇酯转移蛋白(CETP)等,其中LPL的作用尤为重要,它广泛分布于体内的多种组织中,包括脂肪组织、心脏、骨骼肌、胸主动脉、脾脏及肝脏等。国内外很多实验证明,LPL基因突变或活性降低,可导致高脂血症^[4];并且一些能够提高LPL的表达或活性的药物或活性化合

物,可以降低血清中TC、TG、LDL-C和VLDL-C的水平,提高HDL-C的水平,从而降低高脂血症和动脉粥样硬化的发生^[12]。

LPL调节血脂水平的机制包括两个方面:一方面,它可促进载有丰富胆固醇的CM和VLDL中的TG水解,产生缺乏TG的CM和VLDL残粒,二者可在肝脏被迅速代谢清除,结果使血液中的TG和VLDL-C含量降低^[2,13];另一方面,除肝脏和小肠分泌合成HDL-C外,CM和VLDL的分解代谢产物也是HDL-C的一个重要来源^[14],故LPL的含量升高可大量水解血液VLDL和CM,提高血液HDL-C的含量。本实验结果表明,甘糖酯明显提高高脂血症大鼠肝、脾、主动脉组织中LPL mRNA水平,且呈剂量依赖关系;同时LPL活性的增强与其对血清中TC、TG、LDL-C和VLDL-C的降低作用及HDL-C的升高作用成正相关。因此认为甘糖酯通过提高LPL的表达调节血脂水平,可能是它治疗高脂血症、预防血栓形成和动脉粥样硬化的重要分子机制之一。另外,本实验中还发现高脂血症大鼠肝、脾等组织中LPL mRNA水平比正常大鼠组织明显降低,这可能是由于在严重的高脂血症,尤其是高甘油三酯症时,常伴有载脂蛋白C III(apo C III)含量的明显升高所致。Apo C III主要存在于极低密度脂蛋白(VLDL)及乳糜微粒(CM)中,有抑制脂蛋白脂肪酶(LPL)及肝细胞apo受体的功能,在调节VLDL及CM的分解代谢中起重要作用^[15]。本研究结果表明,甘糖酯通过提高LPL

的表达调节血脂水平,这一发现对进一步探讨甘糖酯防止血栓形成、动脉粥样硬化等心脑血管疾病的机理奠定了基础。

REFERENCES:

- [1] Li JZ, He SL, Wang HL. *Thrombosis Disease* (血栓病学) [M]. Beijing: Science Press, 1998. 142 - 149.
- [2] Bruckert E, Dejager S. Lipoprotein lipase: a key enzyme of lipid metabolism [J]. *Rev Prat*, 1994, **44**(11): 1487 - 1493.
- [3] Blomhoff JP. Lipoproteins, lipases, and the metabolic cardiovascular syndrome [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992, **20**(Suppl 8): S22 - 25.
- [4] Gehrisch S. Common mutations of the lipoprotein lipase gene and their clinical significance [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 1999, **1**(1): 70 - 78.
- [5] Weng J, Lin Y, Zhu X, et al. Effects of PGMS on the functions of human platelets and endothelial cells [J]. *Acta Acad Med Sin* (中国医学科学院学报), 1997, **19**(6): 414 - 418.
- [6] Zhang XM, Sun XH, Wei XB, et al. Effects of propylene glycol mannate sulfate (PGMS) on the proliferation of bovine cerebral microvessel smooth muscle cells in culture [J]. *Chin Mar Drugs* (中国海洋药物), 1998, **2**: 1 - 5.
- [7] Hu MW, Zhou XB, Zhang LH, et al. Protective effect of polysaccharides sulfate on human umbilical vein endothelial cell [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, **30**(9): 641 - 645.
- [8] Miao MS. *Experimental Animal and Technology* (实验动物和动物实验技术) [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Publishing House, 1997. 199 - 202.
- [9] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge [J]. *Clin Chem*, 1972, **18**(6): 499 - 502.
- [10] Brault D, Noe L, Etienne J, et al. Sequence of rat lipoprotein lipase-cDNA [J]. *Gene*, 1992, **121**(2): 237 - 246.
- [11] Nudel U, Zakut R, Shani M, et al. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11**(6): 1759 - 1771.
- [12] de Man FH, de Beer F, van der Laarse A, et al. The hypolipidemic action of bezafibrate therapy in hypertriglyceridemia is mediated by upregulation of lipoprotein lipase: no effects on VLDL substrate affinity to lipolysis or LDL receptor binding [J]. *Atherosclerosis*, 2000, **153**(2): 363 - 371.
- [13] Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. Lipoprotein lipase: structure, function and mechanism of action [J]. *Int J Clin Lab Res*, 1994, **24**(3): 143 - 147.
- [14] Lamarche B, Rashid S, Lewis GF. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview [J]. *Clin Chim Acta*, 1999, **286**(1-2): 145 - 161.
- [15] Jong MC, Rensen PC, Dahlmans VE, et al. Apolipoprotein C III deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wild-type and apo E knockout mice [J]. *J Lipid Res*, 2001, **42**(10): 1578 - 1585.

EFFECT OF PROPYLENE GLYCOL MANNATE SULFATE ON BLOOD LIPIDS AND LIPOPROTEIN LIPASE IN HYPERLIPIDEMIC RAT

GAO Yan, YU Wen-gong, HAN Feng, LU Xin-zhi, GONG Qian-hong, HU Xiao-ke, GUAN Hua-shi

(Institute of Marine Drugs and Foods, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effect of propylene glycol mannate sulfate (PGMS) on blood lipids and lipoprotein lipase in hyperlipidemic rat, and its anti-hyperlipidemic mechanism. **METHODS** PGMS was administered ig at different doses ($37.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $75.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) to hyperlipidemic rats for three weeks and blood serum was obtained after starved 12 h. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were examined. The mRNA expression of lipoprotein lipase (LPL) in liver, spleen and artery was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **RESULTS** PGMS significantly decreased the levels of TC, TG and LDL-C and increased that of HDL-C in hyperlipidemic serum dose-dependently. PGMS was shown to increase the level of LPL mRNA expression, which is related directly to the controlling effects of PGMS on blood lipids. **CONCLUSION** PGMS modulated blood lipids by promoting mRNA expression of LPL. This may be one important mechanism of PGMS to modulate blood lipids.

KEY WORDS: propylene glycol mannate sulfate (PGMS); Hyperlipidemia; lipoprotein lipase (LPL); reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)