

蒙药童格勒格 -1 四种粗提物对大鼠肝细胞 BRL 株低密度脂蛋白受体基因表达的影响

周成江,和彦苓,周立社*,张智燕,吴刚(包头医学院,内蒙古 包头 014010)

摘要:目的 观察蒙药童格勒格 -1 (TGLG-1)四种粗提物对大鼠正常肝细胞 BRL 株低密度脂蛋白受体 (LDL-R)基因表达的影响。方法 制备出蒙药童格勒格 -1 的乙醇、正丁醇、乙酸乙酯、石油醚的提取物。体外培养大鼠正常肝细胞 BRL 株,通过 MTT 比色法观察蒙药童格勒格 -1 提取物对大鼠肝细胞体外毒性的量效关系,确定合适的用药浓度。将大鼠肝细胞分为 5 组,一组为对照组,其余四组为给药组。将四种粗提物以一定的给药浓度与正常大鼠肝细胞培养 24 h 后,用 RT-PCR 法测定大鼠肝细胞低密度脂蛋白受体 mRNA 表达水平。结果 蒙药童格勒格 -1 提取物中正丁醇和乙酸乙酯提取物作用后的大鼠正常肝细胞低密度脂蛋白受体 mRNA 相对含量高于对照组,具有显著性差异 ($P < 0.01$)。乙醇和石油醚提取物与对照组相比,无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 蒙药童格勒格 -1 正丁醇和乙酸乙酯提取物能明显增强大鼠正常肝细胞低密度脂蛋白受体基因表达,从而加快血中低密度脂蛋白的清除,起到调控血脂水平的作用。

作者简介:周成江,男,研究生,讲师 * 通讯作者:周立社,男,硕士,教授

Tel: (0472) 5991164

E-mail: zhoulishe@shou.com

Effects of Four extracts from Mongolia drug TGLG-1 on expression of low density lipoprotein receptor gene in rat hepatocyte strain BRL

ZHOU Cheng-jiang, HE Yan-ling, ZHOU Li-she*, ZHANG Zhi-yan, WU Gang(Baotou Medical College, Baotou 014010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe effects of four extracts from Mongolia drug TGLG-1 on the expression of low density lipoprotein receptor(LDL-R) gene in rat hepatocyte strain BRL. **METHODS** Four extracts from Mongolia drug TGLG-1 by alcohol, n-butyl alcohol, ethyl acetate and petroleum ether were prepared. The rat normal hepatocytes were cultured in vitro. Through observing the relation of the drug concentration and vitro toxicity on the rat hepatocytes by MTT colorimetric method, the appropriate drug concentration to culture the rat hepatocytes was determined. The rat hepatocytes were divided into five groups. One group was cultured without the drug as the control group and the other four groups were cultured with the drug in the appropriate concentration. After the hepatocytes were cultured with four extracts in the appropriate concentration for 24 hours, RT-polymerase chain reaction(RT-PCR) technique was used to observe the mRNA expression of LDL-R in the rat hepatocytes of every group. **RESULTS** The mRNA expression level in the rat hepatocytes cultured with the drug extracted with n-butyl alcohol and ethyl acetate was significantly higher than the control group($P < 0.01$). But the other two groups cultured with the drug extracted with alcohol and petroleum ether have no remarkable difference with the control group($P > 0.05$). **CONCLUSION** The extracts from Mongolia drug TGLG-1 by n-butyl alcohol and ethyl acetate can increase the LDL-R mRNA expression level in the rat hepatocytes remarkably, so it can promote the metabolism of the low density lipoprotein to adjust the blood-lipid level.

KEY WORDS: Mongolia drug TGLG-1; low density lipoprotein receptor(LDL-R); reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR); gene expression

目前高血症已成为一种常见性、多发性疾病,其作为诱发冠心病、动脉硬化、脑血管病、脂肪肝、糖尿病、肥胖症的重要因素已被广泛认同^[1]。人血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的增高是引起动脉粥样硬化及心血管疾病的主要危险因素之一。低密度脂蛋白受体(LDL-R)对维持血浆中的LDL和胆固醇浓度发挥着重要作用。而LDL-R基因变异可导致家族性高胆固醇血症(FH)。因此,通过药物来上调LDL-R的表达是控制血浆LDL-C水平和治疗FH的一个有效途径。近年来,采用中草药防治高血症已成为当今研究的重要方向,也取得了一定的成果。如黄连素、姜黄素这些从中草药中提取的药物以及一些中药制剂都已证明有降血脂的作用^[2-3]。童格勒格-1是一种蒙药制剂,具有显著降低血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平的作用^[4]。本研究从基因分子水平上探讨了蒙药童格勒格-1对大鼠肝细胞BRL株LDL-R表达的影响,对蒙药童格勒格-1调脂作用的机制进行了研究。

1 实验材料

细胞株:大鼠正常肝细胞BRL株,购于中国科学院上海细胞研究所。

试剂和仪器:MTT(Amersco),DMEM培养基(Gibco公司),胎牛血清(杭州四季清公司),DMSO(Amersco),RNA提取试剂盒(宝生物公司),RT-PCR试剂盒(宝生物公司),琼脂糖(Promega)。Forma CO₂培养箱(美国),ELX-800酶标仪

(美国),Eppendorf低温离心机(德国),PCR仪(美国),紫外分光光度计(日立),倒置显微镜,凝胶成像系统(上海康乐)。童格勒格-1原料:购于包头市中蒙医院药房,由包头市药品检验所中蒙药室蒋蓉主任药师鉴定。

2 实验方法

2.1 童格勒格-1提取物制备

自然干燥童格勒格-1 300 g用95%乙醇回流三次,之后用50%乙醇回流三次,每次2 h,将回流液浓缩合并后分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等体积萃取得到乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇的提取物。

2.2 细胞体外培养

大鼠正常肝细胞BRL株用含10%胎牛血清的DMEM培养基置于37℃,5%CO₂培养箱培养。每2 d换液一次。

2.3 童格勒格-1提取物对细胞增殖的影响

将肝细胞以每毫升 1×10^4 接种于96孔培养板中,每孔200 μ L。于37℃,5%CO₂条件下培养24 h后,弃去原有培养液,加入用DMEM培养液稀释成0.5,0.4,0.3,0.2, 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} mg·mL⁻¹浓度的四种不同极性童格勒格-1提取物。每个浓度设6个复孔。对照孔只加含10%胎牛血清的DMEM培养基。共同培养24 h后用MTT比色法在495 nm下测各孔的吸光度值。测定不同浓度不同极性童格勒格-1提取物对肝细胞增殖的影响,据此确定童格勒格提取物在肝细胞培养中合适的药物浓度。

2.4 童格勒格-1 提取物对肝细胞 LDL-R 表达影响的测定

2.4.1 细胞分组及给药 细胞分为 1 个对照组和乙醇、正丁醇、乙酸乙酯和石油醚 4 个给药组,将 2 mL 相对密度为每毫升 5×10^5 的肝细胞悬液接种于 6 孔板的 5 个孔中,于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,弃去原培养液,分别对给药组细胞给药,给药浓度由 MTT 试验结果所确定。乙醇和正丁醇提取物的给药浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、乙酸乙酯和石油醚提取物的给药浓度为 $1 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,对照孔只加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,继续培养 24 h。

2.4.2 总 RNA 的提取 将 6 孔板内的对照组和给药组细胞弃去原培养液,用总 RNA 提取试剂提取所有细胞的总 RNA,后经氯仿抽提,乙醇沉淀。提取的总 RNA 纯度用紫外分光光度计在 260 nm 和 280 nm 下检测吸光度值,以 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 比值表示其纯度, $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} > 1.8$ 方可进行 RT-PCR 检测。

2.4.3 RT-PCR 反应 ① 逆转录:取总 RNA 1 μL 按反转录试剂盒要求配成 10 μL 反应体系进行逆转录。反应条件:30 ℃,10 min;50 ℃,20 min;99 ℃,5 min;5 ℃,5 min,共一个循环。② PCR 反应:LDL-R 的引物序列^[5]及扩增条件:上游 5'-ATTTTGGAGGATGAGAAGCAG-3',下游 5'-GTACAGTGTCGACTTCTGG-3',95 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 30 s→54 ℃复性 45 s→72 ℃延伸 50 s,共 30 个循环,最后再 72 ℃延伸 10 min。产物片段为 364 bp。β-actin 的引物序列^[6]及扩增条件:上游 5'-CGTTGACATCCGTAAAGA-3',下游 5'-AGCCACCAATCCACACAG-3',95 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 30 s→

表 1 TGLG-1 提取物对大鼠肝细胞的抑制作用 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Inhibition of the extracts from TGLG-1 on the rat hepatocytes ($n=6, \bar{x} \pm s$)

药物浓度 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	吸光度值 (细胞抑制率 /%)			
	乙醇	正丁醇	乙酸乙酯	石油醚
0 (对照组)	0.172 ± 0.008 (0)	0.172 ± 0.008 (0)	0.152 ± 0.018 (0)	0.152 ± 0.018 (0)
0.5	0.091 ± 0.029 (47)	0.098 ± 0.029 (43)	0.013 ± 0.006 (91.4)	0.013 ± 0.011 (91.4)
0.4	0.133 ± 0.027 (22.7)	0.129 ± 0.022 (25)	0.010 ± 0.006 (93.4)	0.008 ± 0.007 (94.7)
0.3	0.171 ± 0.038 (0.6)	0.158 ± 0.006 (8.1)	0.011 ± 0.005 (92.8)	0.010 ± 0.009 (93.4)
0.2	0.165 ± 0.030 (4)	0.170 ± 0.014 (1.2)	0.024 ± 0.011 (84.2)	0.015 ± 0.010 (90.1)
1×10^{-1}	0.160 ± 0.026 (7)	0.171 ± 0.018 (0.6)	0.023 ± 0.009 (84.9)	0.125 ± 0.014 (17.8)
1×10^{-2}	0.130 ± 0.022 (24.4)	0.148 ± 0.016 (14)	0.131 ± 0.035 (13.8)	0.149 ± 0.020 (2)
1×10^{-3}	0.117 ± 0.019 (32)	0.128 ± 0.005 (25.6)	0.103 ± 0.019 (32.2)	0.115 ± 0.015 (24.3)

注:细胞抑制率 = (1 - 药物组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%

Note: Inhibition rate of cell = (1 - value A of drug group / value A of control group)

3.3 童格勒格-1 提取物对大鼠肝细胞 LDL-R 表达的影响

正丁醇和乙酸乙酯提取物能明显增强大鼠肝细胞 LDL-R 的表达 ($P < 0.01$),见表 2。

4 讨论

低密度脂蛋白受体 (LDL-R) 是血浆中胆固醇代谢的主要途径,循环中约 75% 低密度脂蛋白 (LDL) 由肝脏清除,其中 90% 是由 LDL-R 途径清除的。所以,LDL-R 对调节体内胆固醇平衡,调节血浆总胆固醇 (TC) 含量起着关键作用^[7]。

53 ℃复性 45 s→72 ℃延伸 50 s,共 25 个循环,最后再 72 ℃延伸 10 min。产物片段为 173 bp。

2.4.4 PCR 产物电泳 取 5 μL PCR 产物加上 2 μL 上样缓冲液,混匀后小心加样,于 2% 琼脂糖凝胶中电泳,100 V 电泳 45 min。电泳结束后紫外光下观察电泳带,于凝胶成相仪上进行目的条带的密度定量,以目的基因带的密度与内参 β-actin 条带的密度之比作为该目的基因的 mRNA 相对含量。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件。组间比较用 *t* 检验来进行统计学分析。 $P < 0.05$ 提示有显著性差异。

3 实验结果

3.1 总 RNA 抽提结果

取少量总 RNA 样品经紫外分光光度计分析, $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 比值介于 1.8 ~ 2.0 之间,表示样品为纯 RNA。

3.2 童格勒格-1 提取物对细胞增殖的影响

童格勒格-1 四种粗提取物对大鼠肝细胞 BRL 株增殖的影响呈现出一个“低剂量促进增殖,高剂量抑制”为特征的双相剂量-效应关系。说明童格勒格-1 提取物对大鼠肝细胞的抑制作用并不是随着药物浓度的增大而增加,而是在一定浓度的范围内呈现出抑制率的增加或降低。见表 1。实验中为了保证最后提取的总 RNA 的量,需要各组细胞有足够的数量。因此,在选定用药浓度时就要选取细胞抑制率相对较低的浓度。从表 1 中可确定乙醇和正丁醇的适合用药浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,而乙酸乙酯和石油醚的适合用药浓度为 $1 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

近年来,中草药为治疗高脂血症开辟了一条崭新的道路。吴刚等^[4]通过用不同剂量浓度的童格勒格-1 对高血脂模型大鼠进行药理实验,表明童格勒格-1 对高血脂模型的血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 都有显著的降低作用,而且呈一定的药物剂量依赖关系。但其只是从血浆水平证明了童格勒格-1 的降血脂作用。

本实验从基因分子水平进一步探讨童格勒格-1 降血脂的机制,结果发现,在童格勒格-1 的不同极性提取物中,正丁

表 2 童格勒格-1 提取物对大鼠肝细胞 LDL-R 表达的影响
($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of the extracts from TGLG-1 on LDL-R expression of the rat hepatocytes($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	药物浓度 /mg· mL ⁻¹	LDL-R mRNA / β-actin mRNA
对照组	0	0.493 4 ±0.092 1
乙醇组	0.3	0.497 6 ±0.095 6
正丁醇组	0.3	1.285 1 ±0.217 6 ¹⁾
乙酸乙酯组	1 × 10 ⁻²	1.221 5 ±0.129 0 ¹⁾
石油醚组	1 × 10 ⁻²	0.534 9 ±0.096 0

注:各组与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$

Note: Every drug group vs the control group,¹⁾ $P < 0.01$
醇和乙酸乙酯提取物能明显增强大鼠肝细胞 LDL-R 的表达。因此,表明蒙药童格勒格-1 可以通过增强 LDL-R 的表达来达到降低血脂的作用,从而达到调节血脂水平的作用。一些具有调脂作用的中草药主要通过其中所含的不饱和脂肪酸来达到调脂的作用^[8]。部分中草药中的黄酮类成分能通过增强 LDL-R 表达来达到调脂作用^[9]。蒙药童格勒格-1 的主要成分为内蒙地区产的野艾蒿 (*Artemisia lavandulaefolia* DC.),而野艾蒿中就含有部分脂肪酸成分^[10]。但对内蒙地区产的野艾蒿中黄酮类成分的分析尚未见报道。因此,要想确定蒙药童格勒格-1 中能增强 LDL-R 表达的有效成分,还需对此药进行进一步的分离提纯后做相应的实验研究。

REFERENCES

[1] YU R F, SHI Q F, LIAN X Z. Experimental studies of XUEZH I POWDER on regulating blood lipid of rabbit [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2001, 32(5): 432-434.
[2] DOU X B, FAN C L, HONG X Q, *et al*. Effect of curcum in on

expression of LDL-R in human lymphocytes[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2005, 40(13): 980-983.
[3] PAN H N, WANG S Q, WANG Z Z, *et al*. Effects of berberine on the expression of LDLR in human liver cell strain Bel-7402[J]. Acta Univ Med Nanjing: Nat Sci(南京医学大学学报:自然科学版), 2005, 25(12): 865-868.
[4] WU G, PANG D W, MIAO L, *et al*. Effect of Mongolia drug TGLG-1 on serum lipids in hyperlipidemic rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2006, 23(4): 272-274.
[5] LIU P, ZHANG J S, ZHANG X Z. Effect of GUANXINKANG on expression of low density lipoprotein receptor gene in hyperlipidemic rats liver[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中医药学刊), 2003, 21(9): 1516-1517.
[6] MA A L, WANG Z R, ZHENG J, *et al*. Effects of Qidantongmai tablets on gene expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in artery vessels of experimental arteriosclerotic rats[J]. J Fourth Mil Med Univ(第四军医大学学报), 2004, 25(4): 355-358.
[7] BROWN M S, GOLDSTEIN J L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis[J]. Science, 1986, 232(4746): 34-47.
[8] LIU Z L. Experimental study of the effect of extracts of the seeds of *Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl on regulating hyperlipidemia[J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2000, 18(1): 15-17.
[9] LING Q S, CHEN J K. Molecular Mechanism of hawthorn and its flavonoids in prevention on lipid metabolism disorder in rats [J]. Acta Nutr Sin(营养学报), 2000, 22(2): 131-136.
[10] WU G, CHENG X H, CHENG J, *et al*. GC-MS Analysis of Supercritical Carbon Dioxide Extract from *Artemisia lavandulaefolia* DC. [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(Suppl): 68-69.