

雪菊对胆固醇合成的影响及分子机制研究

谢贵林¹, 李雅丽², 刘江云³, 陈新梅⁴

1. 绍兴第二医院肝胆外科, 浙江 绍兴 312000
2. 新疆医科大学第一附属医院内科, 新疆 乌鲁木齐 830000
3. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123
4. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

[摘要] 目的: 研究雪菊黄酮的制备及对脂变肝细胞胆固醇合成的影响。方法: 采用大孔树脂法制备雪菊黄酮, MTT法筛选雪菊黄酮适宜浓度, 建立脂肪变性肝细胞模型。治疗组加入不同浓度的雪菊黄酮(20, 50, 100 mol/L), 继续培养48 h, 油红O染色定性观察细胞形态和脂滴堆积, 高效液相色谱法定量检测细胞内胆固醇含量, 检测肝细胞3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶mRNA表达及蛋白质水平。结果: 雪菊黄酮能减少细胞内脂滴的积累, 减少细胞内总胆固醇的含量, 同时抑制HMG-CoA还原酶的活性, 其中100 μmol/L的雪菊黄酮效果最佳。随着雪菊黄酮浓度升高, HMG-CoA还原酶蛋白质水平和mRNA的表达均逐渐降低。结论: 雪菊黄酮是雪菊中降血脂的主要活性形式, 可抑制脂变肝细胞HMG-CoA还原酶蛋白质及mRNA的表达; 雪菊黄酮降低肝细胞内总胆固醇的作用, 可能是通过抑制HMG-CoA还原酶活性实现的。

[关键词] 雪菊; 黄酮; 肝细胞; 胆固醇; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2015)04-0269-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.04.128

昆仑雪菊学名两色金鸡菊, 是目前新疆惟一与雪莲齐名的稀有高寒植物。本研究以发生脂肪变性的肝细胞L02模型作为研究对象, 雪菊黄酮为干预因素, 观察雪菊黄酮对肝细胞内胆固醇含量和胆固醇合成限速酶3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶活性, HMG-CoA还原酶蛋白水平和mRNA表达的影响, 研究雪菊的降脂作用、活性形式及作用机制。

1 材料和方法

1.1 试验材料 人L02细胞购自上海中科院细胞所; 胎牛血清及RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司; BCA蛋白质浓度测定试剂盒、胆固醇标品、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶、MTT、油红O、HMG-CoA购自美国Sigma公司; HMG-CoA还原酶液自制; 兔抗人HMG-CoA还原酶抗体(Upstate产品, 美国), β-actin兔IgG单克隆抗体(上海康成生物工程有限公司产品), 羊抗兔IgG(KPL产品, 美国), HMG-CoA还原酶引物及内参照β-actin引物均由上海鼎安生物科技有限公司合成。

1.2 雪菊黄酮的制备鉴定 根据文献[1~2]分离雪菊, 干燥的雪菊(产地: 达坂城雪菊种植基地, 批次130501)1.0 kg, 经

15倍量75%乙醇回流提取, 合并提取液, 滤过, 减压浓缩回收乙醇, 选用AB-8树脂柱, 上样后依次用水6BV, 10%乙醇3BV, 75%乙醇4BV, 95%乙醇2BV洗脱, 流速1.5~2 BV/h; 收集75%乙醇洗脱部位, 浓缩, 干燥, 经CHP20树脂、反相中压柱层析、LH20凝胶等反复柱层析技术, 获得主要黄酮成分。HPLC/PDA/ESI-MS液质联用系统确定了雪菊提取物中的主要成分为黄酮。色谱条件: Shimadzu LC 20XR UFLC液相系统, 色谱柱为KNAUER C18柱, 流动相乙腈: 0.1%醋酸=1:4等度洗脱, 流速1.0 mL/min, 进样量10 μL; PDA检测波长: 280、348 nm; 质谱检测器AB Q trap4500, 扫描模式ESI-EPI、MIM-EPI。

1.3 人L02肝细胞培养 L02肝细胞培养于50 cm³含4 mL体积分数10% FBS的正常培养基的细胞培养瓶中, 置37℃、体积分数5% CO₂及饱和湿度的孵箱内培养, 待细胞80%融合时用含质量分数0.25%胰蛋白酶消化, 传代。

1.4 脂变L02细胞模型的建立 将处于对数生长期的L02以2×10⁴ cell/孔接种于6孔板中, 置于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中贴壁培养48 h后, 改用造模培养液继续培养48 h建立脂肪变性肝细胞模型^[3]。

[收稿日期] 2014-11-30

[基金项目] 国家自然科学基金课题(81460634); 新疆医科大学自然科学基金项目(2013ZRZD07)

[作者简介] 谢贵林(1973-), 男, 副主任医师, 主要从事肝胆胰疾病临床与基础研究。

[通讯作者] 陈新梅, E-mail: xinmeichen@126.com。

1.5 MTT 法筛选雪菊作用浓度 雪菊黄酮纯化物用 DM SO 溶解, 过滤除菌备用。将处于对数生长期的 L02 肝细胞以 1×10^3 cell/孔接种于 96 孔板中, 先利用造模培养液培养 48 h 建立脂变肝细胞模型, 然后改用正常培养基培养, 使雪菊黄酮浓度为 0.1, 1, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 $\mu\text{mol/L}$, 继续培养 48 h, 每个质量浓度设 4 个复孔。处理结束后每孔避光加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL , 继续培养 4 h; 小心吸弃孔中的培养液, 以 150 μL /孔的量加入 DM SO 终止反应, 振荡 10 min 使结晶充分溶解; 以 570 nm 的波长于酶标仪上检测各孔吸光值, 计算各药物浓度下 L02 细胞的存活率。

1.6 油红 O 染色 高脂模型组、利伐他丁组、雪菊治疗组经过油红 O 染色法定性观察细胞内脂滴形成染色, 倒置显微镜下利用普通光观察细胞内红色脂滴形成情况。

1.7 肝细胞合成胆固醇测定 HPLC 法测定细胞培养液上清中胆固醇的含量, 色谱条件: C_{18} 色谱柱, 甲醇作为流动相, 体积流量为 1 mL/min, 在 205 nm 下检测 20 min, 柱温 38 $^{\circ}\text{C}$ 。用无水乙醇溶解胆固醇标准品, 配制成 1 mg/mL 的贮备液, 然后以流动相稀释到 20, 40, 60, 80, 100 mg/L, 作为工作液, 经 HPLC 检测, 绘制标准曲线。参考文献[4]采用外标法峰面积定性定量, 结果以 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 表示。

1.8 RT-PCR 分析细胞 HMG-CoA 还原酶 mRNA 的表达 RNA 提取用 Trizol 按说明进行, 取总 RNA, 用 M-MuLV 逆转录酶制备 cDNA, 取 0.2 mL PCR 管, 依次加入下列成分(去离子水 14.4 μL , PCR buffer 2 μL , dNTP 0.4 μL , 引物 1 μL , Tag 酶 0.2 μL), 混匀后置于 PCR 扩增仪中进行 PCR 扩增。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共循环 35 次, 再在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取扩增产物进行琼脂糖凝胶中电泳并拍照。用 BandsScan 5.0 图像分析软件进行光密度积分值分析。每个图像均重复分析 3 次, 取平均值。抑制率的计算公式如下: 抑制率(%) = (溶剂对照组灰度值 - 各给药组灰度值) / 溶剂对照组灰度值 $\times 100\%$ 。

1.9 Western blot 分析细胞 HMG-CoA 还原酶蛋白质的表达 细胞总蛋白抽提用细胞通用裂解液按说明进行, 抽提后用微量加样器分别取蛋白分子量标准和各实验分组的总蛋白提取缓冲液加于孔底进行电泳, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 用 Blocking buffer 封闭 PVDF 膜, 室温振摇 1 h 充分混匀, 加入兔抗人 HMGCoA 还原酶抗体, 室温振摇 1 h 充分混匀。加入羊抗兔 IgG, 室温振摇 1 h 充分混匀。ECL 试剂盒显影, 用 BandsScan 5.0 图像分析软件进行光密度积分值分析。计算出各目的蛋白表达量与内参 β -actin 蛋白表达量的光密度积分值的比值, 作为目的蛋白表达量的相对含量值。每个图像均重复分析 3 次, 取平均值。

1.10 统计学方法 数据处理以上各组试验均重复 4 次, 均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, SPSS 统计软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 提取物化合物结构式 见图 1。鉴定出 12 种主要成分, 主要包括 10 种黄酮类和 2 种绿原酸类成分。

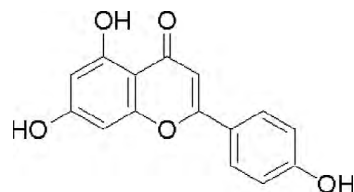


图 1 提取物化合物结构式

2.2 雪菊黄酮定性定量分析 见图 2。以马里苷(0.8653 mg/mL)为对照品, 采用 HPLC/PDA 系统建立了雪菊黄酮的定性定量分析方法。色谱条件: Shimadzu LC 20A HPLC 液相系统, Cosmosil C_{18} 色谱柱(4.6 \times 250 mm), 以乙腈-0.1% 乙酸铵(20:80)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL ; PDA 检测波长: 280、348 nm。

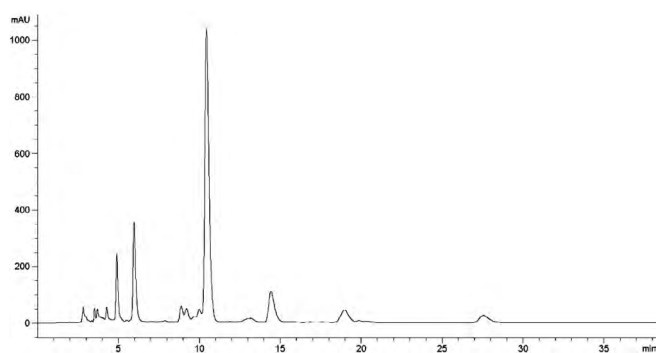


图 2 雪菊黄酮定性定量分析

2.3 不同浓度雪菊黄酮对脂变 L02 肝细胞存活率影响比较 见图 3。细胞存活率随着雪菊黄酮浓度的增加而呈逐渐下降的趋势, 低浓度的雪菊黄酮对脂变后的 L02 肝细胞增殖无明显抑制, 细胞存活率均在 90% 以上, 但在高浓度的雪菊黄酮作用下, L02 肝细胞出现了较多的死亡, 表现出明显的增殖抑制效应, 故在本实验中选定 0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内与脂变肝细胞孵育 48 h 进行后续的实验研究。

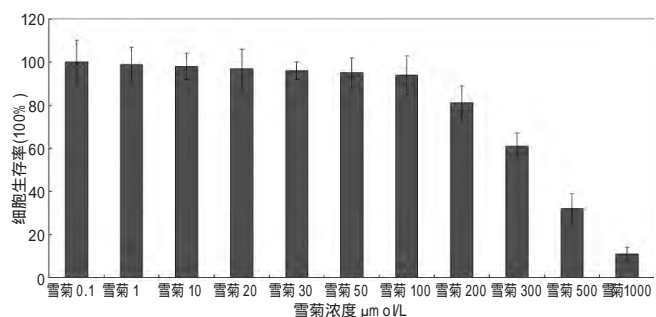


图 3 不同浓度雪菊黄酮对脂变 L02 肝细胞存活率影响比较

2.4 油红 O 染色定性观察不同浓度雪菊黄酮处理下细胞脂肪滴计数比较 见图 4。高脂模型组细胞有明显的增大,细胞内均可见较多较大的红色脂肪滴,甚至出现脂肪滴的融合现象,有趋向于大泡性脂肪样变;辛伐他丁组细胞边缘较清晰,细胞内积累较少的红色脂肪滴;不同浓度雪菊黄酮与细胞共孵育 48 h 后,均能剂量依赖性地减少细胞内脂肪滴的堆积。

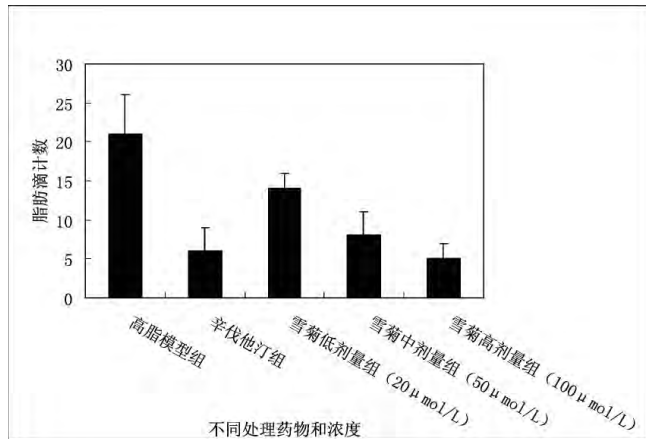


图 4 油红 O 染色定性观察不同浓度雪菊黄酮处理下细胞脂肪滴计数比较

2.5 HPLC 测定不同浓度雪菊处理下细胞内胆固醇合成比较 见图 5。高脂模型组细胞胆固醇合成明显增多,辛伐他丁组细胞明显减少;雪菊黄酮与细胞共孵育后成剂量依赖性地减少胆固醇合成。

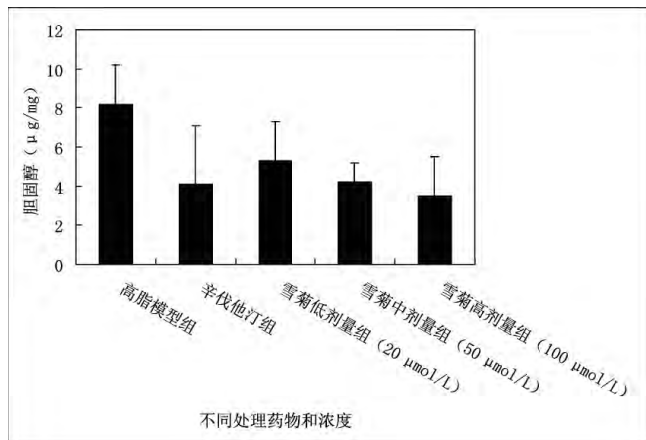


图 5 HPLC 测定不同浓度雪菊处理下细胞内胆固醇合成比较

2.6 不同浓度雪菊黄酮对 HMG-CoA 还原酶 mRNA 水平影响比较 见图 6。看家基因不随雪菊黄酮浓度升高而发生表达含量变化,提示上样浓度均一。而随着药物浓度升高, HMG-CoA 还原酶 mRNA 积分光密度逐渐降低,呈明显的剂量依赖关系。

2.7 不同浓度雪菊黄酮对 HMG-CoA 还原酶蛋白质水平影响比较 见图 7。Western blot 实验可观察到,内参 β-actin 的

表达量不随雪菊黄酮浓度升高而改变,随着雪菊黄酮浓度升高, HMG-CoA 还原酶蛋白质积分光密度逐渐降低,呈明显的剂量依赖关系。



图 6 不同浓度雪菊黄酮对 HMG-CoA 还原酶 mRNA 水平影响比较

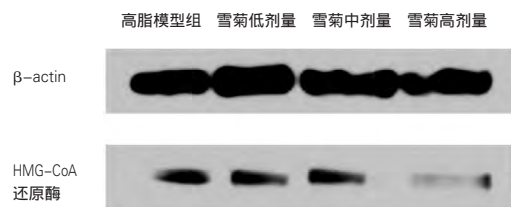


图 7 不同浓度雪菊黄酮对 HMG-CoA 还原酶蛋白质水平影响比较

3 讨论

目前临床上使用的降脂药物主要有 HMG-CoA 还原酶抑制剂(他汀类药物)、苯氧芳酸类(也称贝特类)、烟酸和胆酸络合剂等,中药含有多种活性成分可作用于多个靶点经整合而产生综合疗效,其作用温和且不良反应小,因此从中药中寻找抑制 HMG-CoA 还原酶的活性成分,是近年来医药界关注的课题。

雪菊具有抗脂质氧化等功能,笔者认为雪菊中的黄酮类成分是其有效成分,推测其抗氧化功效可能是其降糖、降血压、调脂的主要作用机制之一。本课题拟在此基础上,进一步研究其调节脂质代谢紊乱相关疾病——高脂血症的效果,并从脂质过氧化及脂质代谢关键基因的变化等方面来探讨其可能的作用机制,为雪菊的进一步开发和应用提供科学的依据。

脂质在肝细胞内的大量堆积会引起肝细胞脂肪变性,这与细胞内胆固醇含量的改变密切相关。胆固醇在细胞内的含量主要受其合成的影响, HMG-CoA 还原酶是胆固醇生物合成的限速酶,因此脂质的堆积所导致的肝细胞脂肪变性可能与 HMG-CoA 还原酶活性提高相关。笔者在脂变肝细胞模型的基础上,探究了雪菊黄酮对 L02 肝细胞内胆固醇和胆固醇酯含量的影响,发现雪菊黄酮能降低肝细胞内胆固醇水平,同时通过 HMG-CoA 还原酶活性测定发现,雪菊黄酮能降低 HMG-CoA 还原酶活性。固醇调节元件结合蛋白质(sterol-regulatory element binding protein, SREBP)是参与调节细胞胆固醇代谢的转录激活因子,可参与调节胆固醇合成通路的有

关基因如 HMG-CoA 还原酶基因的表达,从而达到对细胞内胆固醇水平的有效调控。雪菊黄酮对 HMG-CoA 还原酶活性的抑制可能是通过细胞信号途径而实现的,其具体的调控途径有待于进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Zhang Y, Shi SP, Zhao MB, et al. Coreosides A-D, C14-polyacetylene glycosides from the capitula of *Coreopsis tinctoria* and its anti-inflammatory activity against COX-2[J].

Fitoterapia, 2013, 87(10): 93-97.

- [2] 赵军, 孙玉华, 徐芳, 等. 昆仑雪菊黄酮类成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(3): 50-52.
- [3] 曹燕, 庞市宾, 徐磊, 等. 金鸡菊提取物体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 144-147.
- [4] 邹凤平, 熊鸣, 余琼卫, 等. 高效液相色谱检测巨噬细胞内胆固醇的研究[J]. 分析科学学报, 2007, 23(6): 647-650.

(责任编辑: 骆欢欢)

微乳液相色谱在双黄连注射剂质量控制中的应用

成晓岚, 陶斯湄

中山大学附属第三医院药剂科, 广东 广州 510095

[摘要] 目的: 建立双黄连注射剂中黄芩苷的微乳液相色谱(MELC)测定方法, 并考察其影响因素。方法: 以 2.0% SDS—0.8% 正己烷—6.0% 异丙醇—93.2% 水, 磷酸调 pH 至 3.00 为流动相。采用 Hypersil BDS C₁₈ 5 μm (4.6 mm×150 mm) 色谱柱, 柱温为 25℃, 检测波长 278 nm。结果: 实验发现, 被测成分黄芩苷的线性范围和相关系数分别为 6 μg/mL~60 mg/mL, $r=0.9997$ 。对应的平均回收率和相对标准偏差 RSD 分别为: 99.24%, 0.56% ($n=6$)。结论: 本法简便、快速、精确、专属性强, 可用于双黄连注射剂中的黄芩苷质量控制。

[关键词] 微乳液相色谱法(MELC); 双黄连注射剂; 黄芩苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 04-0272-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.04.129

中药制剂的质量控制常采用高效液相色谱法(HPLC), 然而, 对于复方中药制剂, HPLC 法进行有效成分含量的检测, 突显出了诸多不足。如复杂的样品预处理过程, 同一制剂需 2 种、3 种甚至更多色谱分离条件, 大大增加了日常分析工作量。复杂的样品预处理过程又容易导致分析误差, 也增加分析成本^[1]。由于微乳液相色谱法(MELC)具有极强的溶解能力、高分离效率, 样品制备过程简化, 也能实现复方制剂中多组分的同时测定, 弥补了 HPLC 的不足, 有望解决中药制剂质量控制中所面临的困境。现拟采用 MELC 法测定双黄连注射液中黄芩苷成分的含量, 探讨 MELC 在中药制剂质量控制中应用的可行性和优越性, 为 MELC 广泛应用于中药制剂质量控制提供理论基础和实践经验。

1 材料与仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), 配二

极管阵列检测器及化学工作站; 十二烷基硫酸钠(SDS)为化学纯(广东省汕头市西陇化工厂); 甲醇为色谱纯, 其它试剂均为分析纯; 水为三蒸水; 对照品黄芩苷由中国药品生物制品检验所提供, 其余辅料均为药用规格; 双黄连注射液由哈尔滨珍宝制药有限公司生产提供, 批号为 120910。

2 方法与结果

2.1 溶液制备 微乳流动相制备: 取 20 g SDS, 加入 800 mL 注射用水, 搅拌至全溶后, 再加入 60 mL 异丙醇和 8 mL 正己烷, 最后加入注射用水稀释至 1000 mL, 超声至形成澄清透明液体溶液, 即得微乳, 用磷酸调节 pH 至 3.00, 超声 15 min, 0.45 μm 滤膜过滤。对照品溶液的制备: 精密称取对照品黄芩苷 1.07 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇至 40 mL 溶解, 超声使全溶, 冷却至室温后加甲醇至刻度。

2.2 色谱条件 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ 5 μm (4.6 mm ×

[收稿日期] 2014-11-10

[作者简介] 成晓岚 (1986-), 女, 中药师, 研究方向: 中药学。