

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.23.001

文章编号: 1005-8982(2016)23-0001-05

论著

## 枸骨叶水提物对高脂小鼠胆固醇合成代谢的影响\*

王宏婷<sup>1</sup>, 何丹<sup>2</sup>, 王存琴<sup>2</sup>, 邵海彬<sup>2</sup>, 尚文龙<sup>2</sup>, 王宏梅<sup>2</sup>, 叶灵<sup>2</sup>

(1. 皖南医学院基础医学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 皖南医学院药学院, 安徽 芜湖 241000)

**摘要:目的** 探讨枸骨叶水提物对高脂小鼠血清胆固醇水平及合成代谢信号通路的影响机制。**方法** 实验小鼠随机分 5 组, 其中 3 组用高、中、低剂量枸骨叶水提物灌胃 30 d 后, 测其血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量, 并与辛伐他汀组进行比较; 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)肝脏细胞中 3-羟基-3-甲戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA); 采用蛋白质印迹法(Western blot)检测磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)的表达。**结果** 枸骨叶高、中、低剂量组有降低 TC 的作用( $P < 0.01$ ), 与辛伐他汀组降低 TC 作用无差异; 此外枸骨叶组均可降低 HMG-CoA 水平, 降低肝细胞中 p-EGFR 的表达。**结论** 枸骨叶水提物对高脂饮食小鼠在清除 TC 方面发挥重要作用, 它降低肝细胞中 p-EGFR 的表达, 抑制 HMG-CoA 活性, 进而降低高脂饮食小鼠体内 TC 水平而发挥降血脂作用。

**关键词:** 枸骨叶; 3-羟基-3-甲戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA); 表皮生长因子受体; 高脂血症  
**中图分类号:** R589.2 **文献标识码:** A

## Influence of liex cornuta extracts on constructive metabolism of cholesterol in high-fat mice\*

Hong-ting Wang<sup>1</sup>, Dan He<sup>2</sup>, Cun-qin Wang<sup>2</sup>, Hai-bin Shao<sup>2</sup>,  
Wen-long Shang<sup>2</sup>, Hong-mei Wang<sup>2</sup>, ling Ye<sup>2</sup>

(1. School of Preclinical Medicine, 2. School of Pharmacy, Wannan Medical College,  
Wuhu, Anhui 241000, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the potential synergistic effect of liex cornuta or its essential component on serum cholesterol level and metabolism signal pathway of high-fat diet mice. **Methods** The mice were divided into 5 groups in random. Three groups took liex cornuta orally with different doses for 30 days. After that, serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were measured, and compared with those in Simvastatin group. The level of 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid acyl coenzyme A (HMG-CoA) in liver cells was measured by ELISA. The expression of phosphorylated epithelial growth factor receptor (p-EGFR) in liver cells was detected by Western blot. **Results** Serum total cholesterol was lowered in the liex cornuta groups with different doses ( $P < 0.01$ ). This effect was similar to that of the Simvastatin group. In addition, the HMG-CoA level obviously declined in the liex cornuta groups. The p-EGFR expression in the liver cells of the liex cornuta groups decreased compared to that of the control group. **Conclusions** liex cornuta plays an important role in clearing serum total cholesterol in the mice of high-fat diet. It can lower the expression of p-EGFR, inhibit the activity of 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid acyl coenzyme A in liver cells and then reduce serum total cholesterol in the high-fat diet mice.

**Keywords:** liex cornuta; HMG-CoA; epithelial growth factor receptor; hyperlipemia

收稿日期: 2016-04-21

\* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81402818); 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(No: KJ2010B246, KJ2014A268); 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(No: gxyqZD2016177); 安徽省高校优秀中青年骨干人才国内外访学研究重点项目(No: gxfxZD2016161); 安徽省国家级创新创业训练项目(No: 201410368014)

[通信作者] 王存琴, E-mail: [wqc5188b@163.com](mailto:wqc5188b@163.com); Tel: 0553-3932497

高脂血症已成为威胁人类健康的主要疾病之一。目前,临床用于治疗高脂血症的西药具有很多不良反应。因此,以中草药为代表的植物药以及生长、代谢过程中产生的具有特殊生理活性且结构多样的植物次生代谢产物成为天然药物研究者高度关注的热点<sup>[1]</sup>。

枸骨叶作为苦丁茶药材的主要来源,具有降低血脂的功效<sup>[2-3]</sup>,现代药理研究表明,枸骨叶具有降血脂、抗心肌缺血、抗氧化、抗菌、免疫抑制、抗生育等作用<sup>[4-11]</sup>,并且毒性很低<sup>[12]</sup>,但降脂机制尚未清楚。本实验拟通过动物学、分子生物学方法测定高脂模型小鼠饮用枸骨叶水提物后血脂水平的改变,并通过对小鼠肝脏内磷酸化表皮生长因子受体(phosphorylation-epidermal growth factor receptor, p-EGFR)的表达,探究分子水平上降血脂的作用机制,为枸骨叶降血脂的开发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

8~10 周龄雄性昆明小鼠由常州卡文斯实验动物有限公司提供,生产许可证:Scxk(苏)2011-0003。70 只,体重(25±2)g 左右。

### 1.2 材料与试剂

干燥的枸骨叶,一般基础饲料,高脂饲料(含猪油 10%、胆固醇 2%、牛胆盐 0.2%和蛋黄粉 10%),小鼠垫料,由江苏省协同医药生物工程有限责任公司提供。3%~5%的苦味酸溶液(用 75%的乙醇溶解),血脂四项试剂盒(南京建成生物工程研究所),p-EGFR(Tyr1608)XP Rabbit mAb、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 IgG 和内参蛋白 GAPD(美国 Cell Signalling 公司),3-羟基-3-甲戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMG-CoA)、酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(上海研谨生物科技有限公司),蛋白浓度测量试剂盒(BCA)和化学发光试剂盒(HRP-ECL)(碧云天生物科技研究所),PVDF 膜(美国 Immobilon)。

### 1.3 实验仪器

DNM-9602 酶标分析仪(北京普朗),荧光紫外凝胶成像系统 Fluor Chem<sup>®</sup> Q(美国 ALPHA),5417R 小型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf),电磁炉(中国 Suboe),铝合金煎煮锅(定制),粉碎机(中国中诚制药机械 XFB-500),电子天平(中国富

朗 FA2004)。

## 1.4 方法

**1.4.1 枸骨叶水提物的制备** 干燥的枸骨叶粉碎成粗粉,每次称取适量的枸骨叶 15 倍水浸泡 20 min,煎煮 1 h,加水煎煮 2 次,合并煎煮液,过滤,减压浓缩后静置过夜,将提取液离心后取其上清液(相对密度约为 1.05),经 D101 型大孔吸附树脂,依次用水,45%、75%和 95%乙醇梯度洗脱,取 95%、75%和 45%乙醇洗脱部位浸膏,得到不同浓度的乙醇水提物半固体浸膏,使每 1 ml 含原生药 1 g。按高剂量组 12 g/kg,中剂量组 8 g/kg,低剂量组 4 g/kg<sup>[13-14]</sup>(注:按照大鼠和小鼠的换算系数为 2 计算)分别量取不同体积的枸骨叶水提物待用。

**1.4.2 辛伐他汀溶液的配制** 取 5 mg 辛伐他汀片剂溶于 30 ml 0.5%羧甲基纤维素钠溶液中配成浓度为 0.167 mg/ml 的均匀混悬液,供实验小鼠灌胃使用。

**1.4.3 动物分组与给药** 小鼠适应性观察 1 周,用一般小鼠饲料喂 2 周,使其体重增长至平均体重 30 g 左右。随机分为空白对照组、高脂模型组、高剂量枸骨叶组(12 g/kg)、中剂量枸骨叶组(8 g/kg)、低剂量枸骨叶组(4 g/kg)、辛伐他汀对照组。实验期间空白对照组小鼠给予一般饲料,其余 5 组给予含 2%胆固醇的高脂饲料,连续喂养 2 周后用枸骨叶水提物灌胃,高、中、低枸骨叶组分别给予 12、8 和 4 g/kg 枸骨叶,辛伐他汀组给予 4.11 mg/kg 的辛伐他汀<sup>[14]</sup>(注:根据人和小鼠的换算系数为 12.33 计算,辛伐他汀的一般规格为 20 mg/d,人均体重 60 kg)。各组小鼠分别灌胃给药 4 周,剪尾取血,测其血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)含量,并取小鼠肝脏测定肝脏 p-EGFR 水平。

**1.4.4 TC 和 TG 的测定** 70 只小鼠用剪尾的方法依次取血,放入 1.5 ml 试管中,室温血液自然凝固 10~20 min,离心 20 min 左右(2 000~3 000 r/min),取上清液。在微量加样板上设空白孔、标准孔和待测样品孔,6 个实验组均取 2.5 μl 的上清液加入待测样品孔中,空白孔加入等量的蒸馏水,标准孔加入等量的标准液,再依次加入相应的工作液,混匀,37℃ 孵育 10 min,在规定波长下,用酶标仪测定各孔吸光度值,根据相关公式计算出 TC 和 TG 含量(具体操作见说明书)。

**1.4.5 HMG-CoA 的测定** 取小鼠血清(方法同上),在酶标包被板上进行加样,分别设空白孔、标准孔和待测样品孔,待测样品孔中先加样品稀释液 50  $\mu$ l,然后再加待测样品 10  $\mu$ l,加样时样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动,混匀,标准孔加入稀释的标准液,空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余操作相同。加样后用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min,孵育完毕进行洗涤,小心揭掉封板膜弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。每孔加入酶标试剂 50  $\mu$ l,空白孔除外,再次温育、洗涤(操作同上),然后进行显色,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min,每孔加终止液 50  $\mu$ l 终止反应(此时蓝色立转黄色),以空白空调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度值(OD 值),用吸光度值代入相关公式计算得出 HMG-CoA 的含量。

**1.4.6 蛋白质印迹法(Western blot)** 取适量肝脏匀浆液加入细胞裂解液,以 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 高速离心 15 min,取上清液进行蛋白定量。调整上样量进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),200 V 恒压湿转 150 min,含 3%牛血清蛋白(BSA)的 Tris-HCL 缓冲液室温封闭 2 h。加入特异性抗体(phospho-EGFR XPS Rabbit mAb)(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 过夜。HRP 偶联的羊抗兔免疫球蛋白 IgG 作为二抗(1:1 000 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。用增强化学发光检测试剂盒(HRP-ECL)进行发光成像,于荧光-紫外凝胶成像系统中曝光 3~10 min。

## 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析,两两比较用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高脂血症小鼠模型

高脂模型组与空白对照组比较,高脂模型组的胆固醇含量高于空白对照组,且结果差异有统计学意义( $F=4.590, t=4.741, P=0.006$ )(见表 1),而高脂模型组的 TG 水平比空白对照组低, TG 水平未升高。

### 2.2 枸骨叶水提物对小鼠 TC 水平的影响

高、中、低剂量枸骨叶组 TC 含量比高脂模型组低,且结果差异有统计学意义( $F=1.471, P_{高}=0.036, t_{高}=3.177, P_{中}=0.009, t_{中}=3.736, P_{低}=0.047, t_{低}=2.888$ )( $P < 0.05$ ),枸骨叶水提物能有效降低小鼠体内的 TC(见表 2)。

### 2.3 枸骨叶水提物对小鼠 HMG-CoA 的影响

实验结果显示,各枸骨叶给药组的 HMG-CoA 水平平均降低( $F=2.435, P_{高}=0.001, t_{高}=8.533, P_{中}=0.008, t_{中}=4.770, P_{低}=0.027, t_{低}=3.407$ ),提示枸骨叶水提物可能通过抑制 HMG-CoA 的表达来减少内源性 TC 的合成,使小鼠血清中 TC 水平下降。见表 3。

### 2.4 枸骨叶水提物对小鼠肝脏 p-EGFR 表达的影响

高脂模型组与空白对照组 p-EGFR 表达比较,经  $t$  检验差异有统计学意义( $F=1.792, t=2.849, P=0.044$ ),高脂模型组 EGFR 磷酸化水平更高。枸骨叶高剂量组与高脂模型组比较,经  $t$  检验差异有统计学意义( $F=2.209, t=3.073, P=0.037$ ),高剂量组肝脏细胞内的 p-EGFR 水平降低,并且从附图中可以看到高、中、低剂量组的趋势。高剂量组 p-EGFR 的表达与辛伐他汀组比较,辛伐他汀无抑制小鼠肝脏 p-EGFR 表达水平的作用。

表 1 高脂血症小鼠模型的复制 ( $n=12, \text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$ )

组别	TC	TG	$t$ 值	$P$ 值
空白对照组	3.242 $\pm$ 0.303	3.201 $\pm$ 1.665	4.741	0.006
高脂模型组	8.341 $\pm$ 1.341 <sup>†</sup>	1.281 $\pm$ 0.212		

注:†与空白对照组比较, $P < 0.05$

表 2 枸骨叶水提物对小鼠 TC 水平的影响 ( $\text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$ )

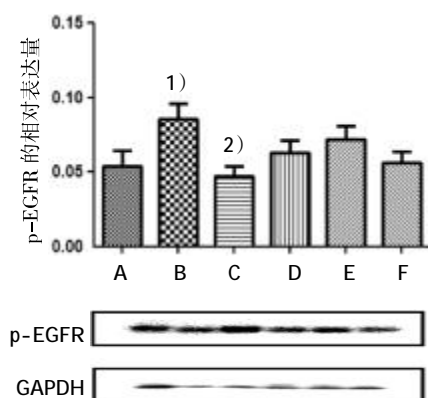
组别	例数	TC	$t$ 值	$P$ 值
空白对照组	12	3.242 $\pm$ 0.303		
高脂模型组	12	8.341 $\pm$ 1.341		
高剂量枸骨叶组	11	4.053 $\pm$ 0.879 <sup>†</sup>	3.177	0.036
中剂量枸骨叶组	12	3.194 $\pm$ 0.506 <sup>†</sup>	3.736	0.009
低剂量枸骨叶组	11	3.454 $\pm$ 0.571 <sup>†</sup>	2.888	0.047
辛伐他汀组	12	3.732 $\pm$ 0.921 <sup>†</sup>	2.783	0.032

注:†与高脂模型组比较, $P < 0.05$

表 3 枸骨叶水提物对小鼠 HMG-CoA 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	HMG-CoA	$t$ 值	$P$ 值
空白对照组	12	10.232 $\pm$ 2.471		
高脂模型组	12	14.344 $\pm$ 2.442		
高剂量枸骨叶组	11	4.051 $\pm$ 1.473 <sup>1)</sup>	8.533	0.001
中剂量枸骨叶组	12	8.191 $\pm$ 2.503 <sup>1)</sup>	4.770	0.008
低剂量枸骨叶组	11	10.454 $\pm$ 1.572 <sup>2)</sup>	3.407	0.027
辛伐他汀组	12	6.321 $\pm$ 1.322 <sup>1)</sup>	4.234	0.007

注:1)与高脂模型组比较, $P < 0.01$ ;2)与高脂模型组比较, $P < 0.05$



A: 空白对照组; B: 高脂模型组; C: 高剂量枸杞叶组; D: 中剂量枸杞叶组; E: 低剂量枸杞叶组; F: 辛伐他丁组

1) 与空白对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与高脂模型组比较,  $P < 0.05$

附图 枸杞叶水提物对小鼠肝脏 p-EGFR 的影响

( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

EGFR 是表皮生长因子受体 (HER) 家族成员之一, HER 家族在细胞生理过程中发挥重要的调节作用。EGFR 广泛分布于哺乳动物细胞表面, 对 EGFR 信号通路的调节发挥重要作用<sup>[5]</sup>。EGFR 磷酸化反映该信号通路被激活, 肝细胞 p-EGFR 可促进肝细胞 TG、胆固醇、LDL 合成<sup>[16-18]</sup>。因此探究枸杞叶提取物对肝脏 EGFR 信号通路的影响有很重要的现实意义。本次实验通过对高血脂小鼠灌胃枸杞叶, 发现其具有降低小鼠胆固醇的作用; 此外, 还从分子水平上探究其发生的机制。实验结果显示, 高脂模型组与空白对照组比较其 TC 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ), 提示高脂模型 EGFR 信号通路激活并促进肝脏合成 TG, 游离胆固醇的释放增多<sup>[9]</sup>, 进一步说明高脂模型造模成功, 但 TG 水平未升高, 这可能与其在体内的分布情况有关, 小鼠体内含有大量的脂肪组织, 当一次性或长期摄入过多的高脂类饲料, 体内的脂肪组织会暂时把它贮存起来, 一旦脂溶性的外来物进入脂肪组织就很难释放出来, 在体内长期蓄积, 所以血清中游离的 TG 水平就显著降低, 笔者的实验数据显示高脂模型组 TG 水平比空白对照组低。HMG-CoA 是胆固醇合成限速酶, 在胆固醇的合成中起着决定性作用<sup>[20]</sup>。笔者进一步检测 HMG-CoA 水平, 实验结果显示各给药组 HMG-CoA 含量降低, 与高脂模型组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。在肝脏细胞内, EGF 通常与 EGFR 特异性结合, 蛋白质的磷酸化和去磷酸化过程几乎调节着包括细胞的生长、增殖、发育、分化、

信号传导、凋亡和神经活动等所有的生命过程<sup>[21]</sup>。蛋白质印迹法检测结果表明给药组小鼠肝脏内磷酸化的 EGFR 表达较空白对照组低, 提示枸杞叶水提物可能通过影响肝脏细胞内 EGFR 的磷酸化, 调控 EGFR 通路以抑制 HMG-CoA 表达, 进而降低血清胆固醇水平。

综上所述, 枸杞叶水提物通过抑制肝细胞内 EGFR 的磷酸化水平, 调控 EGFR 下游信号通路传导, 从而使胆固醇的合成限速酶 HMG-CoA 合成受阻, 降低血清胆固醇水平。

### 参 考 文 献:

- [1] WOHLFARTH C, EFFERTH T. Natural products as promising drug candidates for the treatment of hepatitis B and C[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30: 25-30.
- [2] 刘彬, 许宏大. 苦丁茶降血脂的实验及临床研究[J]. 护理研究, 2005, 19(1): 21.
- [3] 申梅淑, 张淑芹, 郭新民, 等. 苦丁茶对大鼠血脂和载脂蛋白的影响[J]. 中国林副特产, 2012(63): 7.
- [4] 李维林, 吴菊兰, 任冰如, 等. 枸杞中 3 种化合物的心血管药理作用[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(3): 6-10.
- [5] 旷春桃, 陈如锋, 吴斌, 等. 枸杞叶中多酚类物质的提取及抗氧化性能分析[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(2): 427-429.
- [6] 申梅淑, 李元柱. 苦丁茶对大鼠血脂和载脂蛋白的影响[J]. 中国林副特产, 2002(4): 403.
- [7] 林晨, 谭玉波, 张晶, 等. 枸杞叶不同溶剂萃取物对小鼠体外 T 淋巴细胞活化增殖的影响[J]. 暨南大学学报 (医学版), 2006, 27(2): 199-203.
- [8] 邢莹莹, 岑颖洲, 王一飞, 等. 瑶药枸杞叶不同溶剂组分体外抑菌活性比较[J]. 暨南大学学报 (自然科学版), 2004, 25(1): 119-121.
- [9] 张晶, 林晨, 岑颖洲, 等. 枸杞叶抗真菌作用初探[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(11): 1562.
- [10] 杨卫华, 赵玉丛. 中药枸杞叶化学成分和药理作用的研究进展[J]. 医药世界, 2007(3): 103-105.
- [11] 魏成武, 杨翠芝, 任华能, 等. 枸杞抗生育作用[J]. 中药通报, 1988, 13(5): 48-50.
- [12] 许实波, 蒋建敏, 许东晖, 等. 苦丁茶水提物的毒理学研究[J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2001, 40(3): 93-111.
- [13] 潘慧娟, 应奇才, 等. 苦丁茶大叶冬青的降脂作用研究[J]. 茶叶科学, 2004, 24(1): 49.
- [14] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理实验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [15] STATEVA S R, SALAS V, BENGURÍA A, et al. The activating role of phospho (Tyr)-calmodulin on the epidermal growth factor receptor[J]. Biochem J, 2015, 2(472): 195-204.
- [16] SCHEVING L A, ZHANG X Q, GARCIA I O A. Epidermal growth factor receptor plays a role in the regulation of liver and

- plasma lipid levels in adult male mice[J]. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2014, 5(306): 370-381.
- [17] GNONI G V, PAGLIALONGA G, SICULELLA L. Quercetin inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat liver cells[J]. *Eur J Clin Invest*, 2009, 39(9): 761-768.
- [18] LU C H S, LIU K, TAN L P, et al. Current chemical biology tools for studying protein phosphorylation and dephosphorylation[J]. *Chemistry European Journal*, 2012, 1(18): 28-39.
- [19] LEE J C, PARK B K, CHOUNG S, et al. Amelioration of hypercholesterolemia by an EGFR tyrosine kinase inhibitor in mice with liver-specific knockout of mig-6[J]. *PLoS One*, 2014, 12(9): 1-13.
- [20] ZHANG Z, HO W K, HUANG Y, et al. Hawthorn fruit is hypolipidemic in rabbits fed a high cholesterol diet[J]. *J Nutr*, 2002, 132(1): 5-10.
- [21] SALINERO-FORT M Á, SAN ANDRÉS-REBOLLO F J, DE BURGOS-LUNAR C, et al. Cardiovascular and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes mellitus in the MADIA-BETES cohort study: Association with chronic kidney disease[J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(2): 227-236.

(申海菊 编辑)