

平卧菊三七对小鼠血糖及血脂的影响

郑国栋, 钟树生, 张清峰, 黎冬明

(江西农业大学食品科学与工程学院江西省天然产物与功能食品重点实验室, 江西南昌 330045)

摘要: 高血糖和高血脂已严重威胁人类健康, 本研究探讨平卧菊三七(GPM)对小鼠血糖和血脂的影响, 并通过分子生物学手段阐明其作用机制。将40只昆明小鼠随机分成4组, 即对照组、2%、4%和8% GPM, 喂养小鼠12周, 称量小鼠体重和脏器, 测定血中的生化指标和肝脏及粪中脂类含量, 用qRT-PCR及蛋白印迹等方法分析肝脏 mRNA 和蛋白表达的变化。结果显示 GPM 对小鼠体重增加和脏器重量没有明显变化。4%以上 GPM 与对照组相比显著降低血中的甘油三酯(TG)、总胆固醇、低密度脂蛋白的胆固醇和血糖及肝脏中 TG 的浓度。而粪中的 TG 却明显增加。8% GPM 明显抑制羟甲基戊二酰 CoA 还原酶(HMGCR)的活力和 mRNA 及蛋白表达水平, 而 Glut4 的 mRNA 和蛋白表达明显增加。以上结果表明 GPM 通过调节 HMGCR 和 Glut4 的 mRNA 及蛋白表达, 和抑制肠道对 TG 吸收, 达到降糖降脂作用。

关键词: 平卧菊三七; 降糖; 降脂; 羟甲基戊二酰 CoA 还原酶; 葡萄糖转运蛋白 4

文章编号: 1673-9078(2013)12-2800-2804

Effects of *Gynura procumbens* on the Blood Glucose and Lipid of Mice

ZHENG Guo-dong, ZHONG Shu-sheng, ZHANG Qing-feng, LI Dong-ming

(Jiangxi Key Lab of Natural Product and Functional Food, College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Hyperglycemia and hyperlipidemia have become strong threat on human health. This study investigated hypoglycemia and hypolipidemia effects of *Gynura procumbens* on mice, and to elucidate its mechanism by molecular biology methods. Forty Kunming mice were randomly divided into 4 groups: control, 2%, 4% and 8% *Gynura procumbens* fed for 12 weeks. Body and organs were weighed, and serum biochemical index and lipids levels in the liver and the feces were measured. The changes of mRNA and protein expression levels were analyzed by qRT-PCR and western blotting, respectively. *Gynura procumbens* had no significantly influence on body and organs weight in mice. Concentrations of triglycerides (TG) in blood, total cholesterols, low density lipoprotein (LDL) cholesterols, glucose in serum, and the hepatic TG level were remarkably decreased by feeding 4% GPM compared with control, while feces TG level obviously increased. The enzyme activity, mRNA and protein expression levels of HMG-CoA reductase (HMGCR) were significantly reduced by feeding 8% GPM, while mRNA and protein expression of Glut4 were up-regulated considerably by *Gynura procumbens*. The results suggested that *Gynura procumbens* had hypoglycemic and hypolipidemic efforts through regulating protein and mRNA expression of HMGCR and Glut4, and inhibiting TG absorption in intestinal tract.

Key words: *Gynura procumbens*; hypoglycemic; hypolipidemic; HMG-CoA reductase; Glut4

糖尿病和高血脂已严重威胁人类健康的全球性流行病, 且呈持续增长趋势。最近国家卫生部统计数据, 我国成年人血脂异常约为 1.6 亿人, 成年人糖尿病患者约为 2000 万人, 并易发多种并发症, 极大影响国民健康和日常生活。目前降糖降脂药物多为人工合成, 其中大部分长期服用有一定副作用。而研究无副作用, 在长期饮食过程中达到预防高血糖和高血脂的天然食物成了当今研究的热门课题之一。

收稿日期: 2013-08-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31160320)

作者简介: 郑国栋(1969-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然产物提取分离, 功能食品等

平卧菊三七(*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) (GPM) 为一种多年生菊科三七属植物, 2012 年 5 月被国家卫生部批准为新资源普通食品。Zahra 等^[1]研究大鼠伤口愈合试验发现每天用 100 和 200 mg/mL 的 GPM 乙醇提取物涂抹大鼠伤口上, 发现伤口的炎症细胞明显减少, 伤口愈合明显加快, 表明 GPM 具有消炎杀菌作用。另外 GPM 乙醇提取物能抑制基质金属蛋白酶-1 和-9 的酶活性及基因表达量, 减少细胞因子的释放和活性氧的产生, 具有抗氧化效果^[2]。Kim 等^[3]研究自发性高血压大鼠每日口服 500 mg/kg 的 GPM 水提物 4 周, 血清乳酸脱氢酶以及肌酸磷酸激酶含量显著降低, 增加 NO 的含量, 降低大鼠血压。

这些研究表明 GPM 有许多生理生化功效。其主要活性成分有绿原酸、黄酮类、生物碱、萜烯类、香豆素类、挥发油等^[4-5]。我国在上世纪末从马来西亚引进的 GPM 在江西省都昌县等地已通过无性繁殖技术进行大面积人工栽培,单位产量大,成本低,是一种具有很好开发和应用潜力的食物。本研究用 2%、4% 和 8% GPM 混合饲料喂养小鼠 12 周,测定小鼠体重、血清生化指标、肝脏及粪中脂类含量,和分析其对糖代谢和脂类代谢相关酶的活性、基因及蛋白表达的影响,探讨 GPM 对小鼠血糖和血脂的作用机制,为新食品资源 GPM 进一步利用和开发提供一些理论基础和实验数据。

1 材料与方 法

1.1 动物、饲料及其材料

40 只 4 周龄雌性昆明小鼠,体重 20 g 左右,购自江西中医学院实验动物研究所(单位许可证是 SCXK(赣)2011-0001)(动物许可证为 JDW No: 2012-0027)。喂养小鼠的粉末饲料购自江西中医学院实验动物研究所。

饲料配制:平卧菊三七叶(采自江西农业大学中药园)烘干粉碎后过筛 60 目,得到粉末与粉末饲料按 2%、4% 和 8% 比例进行混合。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及饲养

40 只雌性昆明小鼠在动物室适应性饲养一周后,随机分成对照组、2%、4%、8% GPM 四组,每组 10 只,自由采食和饮水,两天换 1 次饲料,每周称 1 次体重,饲养 12 周。小鼠粪收集从第 12 周开始,每天早上一次,连续 1 周,收集的粪烘干后,保存在-80 °C 的超低温冰箱(Thermo Forma-725, American)中至脂类指标分析结束为止。饲养条件:室温(22±2) °C,光暗周期 12/12(光照时间从 8:00~20:00)。

1.2.2 动物解剖

投喂试验结束后,小鼠禁食 12 h 以上,照常饮水,用乙醚麻醉,从心脏采血,血液以 2400 r/min,离心 15 min 分离得到血清,保存在-80 °C 的超低温冰箱中至血清生化指标测定结束为止。摘取肝脏、脾脏、肾脏、肾上腺、卵巢、大脑及腹腔脂肪等组织并称量,肝脏保存在-80 °C 的超低温冰箱中。

1.2.3 血中生化指标和肝脏脂类分析

血清中 TC、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、TG、血糖(GLU)

浓度用 TC、HDL-C、LDL-C、TG、GLU 试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)测定;血清中游离脂肪酸(NEFA)浓度用游离脂肪酸试剂盒(南京建成生物技术有限公司)测定。

肝脏和粪中脂类提取按 Folch 等^[6]方法进行部分修改,胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)含量分别用 TC、TG 试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)测定。

1.2.4 肝脏脂肪代谢酶测定

肝脏匀浆:-80 °C 保存肝脏按其重量 3:20(g/mL)的比例加入匀浆缓冲液(3 mM Tris/HCl, pH 7.2; 1 mM EDTA; 1 mM Dithiothreitol; 25 μM ALLN; 100 μM AEBSF; 100 μM Leupeptin; 0.25 M 蔗糖)在冰上进行低温匀浆。

肝脏中 ACO、FAS 和 HMGCR 的活性用 Moriyama 等^[7]和 Field 等^[8]的部分改变方法测定。

1.2.5 测定脂类代谢相关酶的 mRNA 表达

按照 Trizol 试剂盒说明书提取肝脏组织中的总 RNA。在逆转录酶催化下合成 cDNA。由基因库查得目的基因核酸序列,采用 Primer Primer 3.0 在线软件设计,目的基因和内参管家基因 GAPDH 的引物和探针:ACO:前引物:5'-TCA CAG CAG TGG GAT TCC AA-3';后引物:5'-TCT GCA GCA TCA TAA CAG TGT TCT C-3';探针:5'-TAT TTA CGT CAC GTT TAC CCC GGC CTG-3';GLUT4:前引物:5'-CAT GGC TGT CGC TGG TTT C-3';后引物:5'-AAA CCC ATG CCG ACA ATG A-3';探针:5'-CCA ACT GGA CCT GTA AC-3'。HMGCR:前引物:5'-GAA GGG TTT GCA GTG ATA AAG GA-3';后引物:5'-CAT CGT CAC GTG GAG TTT CTG T-3';探针:5'-CCT TTG ATA GCA CCA GCA GAT TTG CTC G-3'。GADPH:前引物:5'-TGT GTC CGT CGT GGATCT GA-3';后引物 primer:5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA-3';探针:5'-TGC CGC CTG GAG AAA CCT GCC-3'。

20 μL 的反应体系包括 800 ng cDNA, 0.4 μL 前引物、后引物和探针, 10 μL Premix Ex Taq, 0.4 μL ROX Reference Dye, 用无菌水补足到 20 μL。用 Applied Biosystems 7900HT PCR 仪来进行实时荧光定量。PCR 反应条件:95 °C/30 s 预变性,然后 94 °C/10 s, 60 °C/37 s, 共 45 个循环。每个样品做两个平行,每次循环收集 SYBR Green 荧光,循环结束时从 60 °C 开始做融解曲线。结果根据目的基因和 GAPDH 的 CT 值,并用 2^{-ΔΔCT}法确定样品中目的基因的相对表达量。

1.2.6 肝脏脂肪代谢相关酶的提取和蛋白表达

取-80 °C 保藏的肝脏样品,在液氮中磨碎到无可

见颗粒后转移到 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 预冷的 RIPA 裂解液, 振荡均匀, 4 °C 裂解 1 h。之后用 24000 r/min, 4 °C, 离心 15 min, 移取上清液于新的离心管中, 置于 -80 °C 保存待测。用考马斯法测定样品中蛋白质含量, 并将样品的蛋白质浓度调到同一水平。取适量调整后的样品与上样缓冲液混匀后于 100 °C 水浴, 煮沸 8 min, 将变性后的蛋白样品储存于 -20 °C。

取上述变性后的蛋白样品, 用 8% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行钠十二烷基硫酸盐-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后转到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭, 孵育一抗 2 h, 孵育二抗 2 h, 最后用 DAB 试剂显色。采集图片, 用凝胶图像分析软件 (Gene Tools Analysis) 进行数据处理。结果以目的条带与内参 β -actin 条带的 OD 值的比值表示, 计算实验组与对照组的相对密度比值。

1.3 统计分析

实验数据采用 DPS 统计软件 (Version. 6.55) 进行 student's t-test 分析, $P < 0.05$ 为差异显著, 各项指标以平均数 \pm 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 小鼠体重、各器官质量和摄食量的变化

表 1 是 GPM 对小鼠体重增加的影响, 小鼠体重增加 GPM 与对照组相比均无明显变化。表 2 中 GPM 投喂的小鼠各组织器官的质量与对照组相比也无明显

差异。说明 GPM 对小鼠体重和生长均没有影响, 是安全无毒副作用。

表 1 GPM 对小鼠体重增加的影响 (g, n=10)

Table 1 Effect of GPM on the increase of body weight in mice

Weeks	Control	2% GPM	4% GPM	8% GPM
4	11.60 \pm 0.61	12.18 \pm 0.91	10.79 \pm 0.43	10.30 \pm 0.75
8	15.80 \pm 0.68	15.97 \pm 1.01	14.67 \pm 0.66	14.01 \pm 0.79
12	18.71 \pm 0.78	18.81 \pm 0.98	17.06 \pm 0.70	17.14 \pm 0.87

表 2 GPM 对小鼠器官和腹腔内脂肪 (IPAT) 质量的影响 (n=10)

Table 2 Effect of GPM on weight of organs and intraperitoneal adipose tissues (IPAT) in mice

Organs/mg	Control	2% GPM	4% GPM	8% GPM
Liver	1440 \pm 110	1443 \pm 132	1503 \pm 99	1432 \pm 101
Spleen	123.7 \pm 16.0	117.3 \pm 6.0	114.9 \pm 10.2	109.8 \pm 7.2
Kidneys	458.3 \pm 18.9	440.0 \pm 14.5	436.7 \pm 17.2	455.3 \pm 17.6
Adrenals	11.6 \pm 1.0	11.3 \pm 1.2	11.5 \pm 1.6	12.1 \pm 1.1
Ovaries	34.9 \pm 1.8	32.2 \pm 1.9	34.2 \pm 2.2	36.8 \pm 1.9
Brain	459.3 \pm 15.0	453.4 \pm 22.2	433.0 \pm 17.2	451.6 \pm 21.6
IPAT	1678 \pm 221	1608 \pm 305	1612 \pm 223	1532 \pm 153

2.2 小鼠血中的生化指标及肝脏和粪中的脂类含量

表 3 表示经过 12 周喂养 GPM 后小鼠血中的生化指标与肝脏和粪中脂类的含量。从表中可知, 与对照组相比 GPM 饲养小鼠血中 TC、LDL-C、TG、GLU 浓度显著降低。GPM 投喂的肝脏中 TC 和 TG 含量明显减少, 而粪中 TG 含量明显增加。

表 3 GPM 对血液中生化指标, 肝脏和粪中的脂类含量的影响 (n=10)

Table 3 Effect of GPM on the biochemical parameters in serum, lipids levels of liver and feces in mice

指标		Control	2% GPM	4% GPM	8% GPM
Serum biochemical parameters	TC/(mg/dL)	81.4 \pm 5.8	66.1 \pm 7.6	59.4 \pm 7.8*	61.1 \pm 6.8*
	HDL-C/(mg/dL)	33.4 \pm 4.1	28.8 \pm 5.1	32.7 \pm 4.8	31.5 \pm 3.9
	LDL-C/(mg/dL)	43.8 \pm 5.7	34.7 \pm 5.3	28.3 \pm 3.8*	27.5 \pm 3.0*
	TG/(mg/dL)	82.1 \pm 7.5	67.8 \pm 4.9*	62.4 \pm 3.3*	65.3 \pm 6.9*
	NEFA/(μ mol/L)	3.81 \pm 0.55	3.27 \pm 0.47	3.59 \pm 0.45	3.35 \pm 0.52
	GLU/(mg/dL)	56.3 \pm 5.0	47.9 \pm 4.7	43.5 \pm 2.7*	40.3 \pm 2.1*
Liver lipids	TC	38.4 \pm 4.9	30.9 \pm 2.4*	33.5 \pm 5.2	28.4 \pm 2.0*
	TG	27.5 \pm 3.6	22.4 \pm 3.7*	19.2 \pm 2.1*	16.5 \pm 1.8*
Feces lipids	TC	1.43 \pm 0.19	1.49 \pm 0.18	1.38 \pm 0.20	1.45 \pm 0.25
	TG	6.15 \pm 0.64	9.41 \pm 0.91*	9.82 \pm 0.81*	9.75 \pm 0.78*

注: TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白中胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白中胆固醇; GLU: 葡萄糖; NEFA: 游离脂肪酸。*: 表示与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$)。

GPM 改善血清及肝脏中脂类含量, 特别是降低血

中 TC、LDL-C、TG 及肝脏中 TG 含量, 有较好降脂

作用。GPM 含有较高含量的黄酮类化合物^[9]和绿原酸^[5]等化学成分。黄酮类化合物有降低血中和肝脏中的 TG 和 TC 浓度^[10]。绿原酸降低高胆固醇饲料诱导高血脂大鼠血中 TG 浓度^[11]。GPM 降脂作用可能于它含有黄酮类化合物及绿原酸有关。GPM 乙醇提取物能降低小鼠血糖浓度^[12]。

2.3 小鼠肝脏脂类代谢相关酶活性的变化

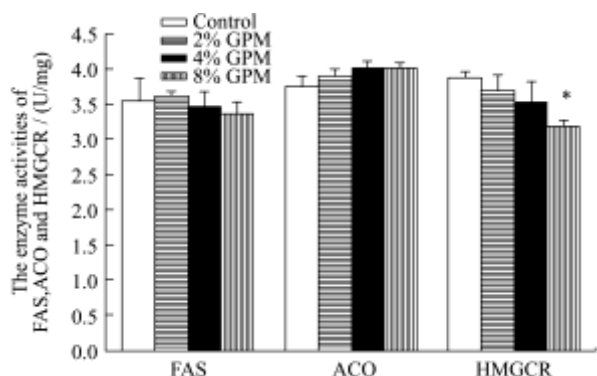


图 1 GPM 对肝脏脂肪酸合成酶、酰基辅酶 A 氧化酶和羟甲基戊二酸 CoA 还原酶活性的影响 (n=10)

Fig.1 Effect of GPM on activities of fatty acid synthase (FAS), acyl-CoAoxidase (ACO) and HMG-CoA reductase (HMGCR) in liver

注：*：表示与对照组相比差异显著 (p<0.05)。

GPM 对小鼠肝脏脂肪酸合成酶 (FAS)、酰基辅酶 A 氧化酶 (ACO) 和羟甲基戊二酸 CoA 还原酶 (HMGCR) 活性的影响如图 1 所示, 8% GPM 投喂小鼠肝脏中 HMGCR 活性明显低于对照组。肝脏是体内胆固醇代谢最主要器官, 它与血中胆固醇浓度有密切关系。HMGCR 是胆固醇合成的限速酶, 并与血浆胆固醇浓度呈正相关关系^[13]。本研究中, GPM 降低肝脏 HMGCR 活性, 是导致血中和肝脏 TC 含量下降的主要原因之一。

2.4 小鼠肝脏中 Glut4、ACO 和 HMGCR 的 mRNA 表达

图 2 为 GPM 对小鼠肝脏 Glut4、ACO 和 HMGCR 的 mRNA 表达水平的影响。与对照组相比, GPM 增加 Glut4 的 mRNA 表达水平, 特别是 8% GPM 显著增加; 8% GPM 显著减少 HMGCR 的 mRNA 表达水平。

2.5 小鼠肝脏中 Glut4、FAS 和 HMGCR

的蛋白表达

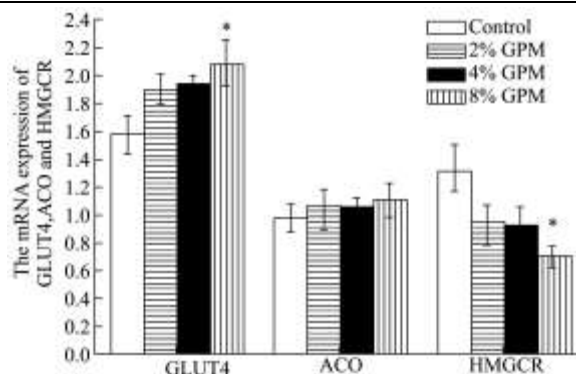


图 2 GPM 对肝脏葡萄糖转运蛋白 4、酰基辅酶 A 氧化酶和羟甲基戊二酸 CoA 还原酶 mRNA 表达水平的影响 (n=10)

Fig.2 Effect of GPM on mRNA expression levels of Glut4, ACO and HMGCR in liver

注：*：表示与对照组相比差异显著 (p<0.05)。

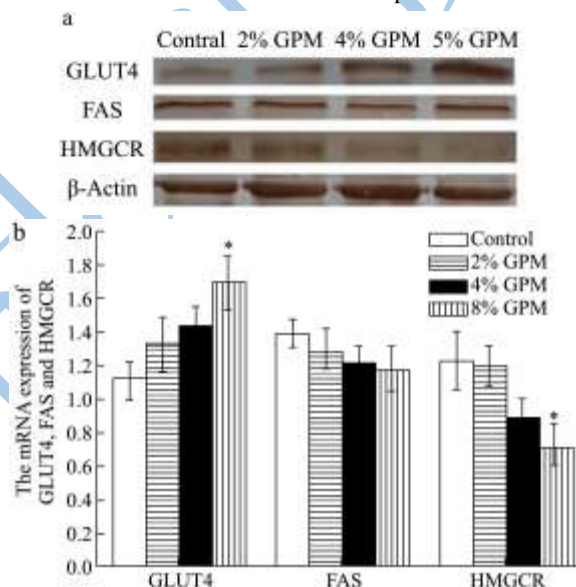


图 3 GPM 对肝脏葡萄糖转运蛋白 4、脂肪酸合成酶和羟甲基戊二酸 CoA 还原酶 mRNA 表达水平的影响 (n=10)

Fig.3 Effect of GPM on protein expression levels of Glut4, FAS and HMGCR in liver

注：*：表示与对照组相比差异显著 (p<0.05)。

如图 3 所示, 与对照组相比, GPM 的 Glut4 蛋白表达量增加, 尤其是 8% GPM 显著增加。而 8% GPM 投喂的 HMGCR 蛋白表达水平明显减少。FAS 蛋白表达有降低趋势, 但不显著。GLUT4 有利于哺乳动物体内葡萄糖转运。它是调节餐后葡萄糖进入肌肉和脂肪组织^[14]。一旦受到葡萄糖刺激, GLUT4 迅速到达细胞膜, 促进葡萄糖转运^[15]。本实验结果表明 GPM 增加肝脏 GLUT4 的 mRNA 和蛋白质的表达水平, 促进体内葡萄糖转运, 从而降低血中葡萄糖浓度。

3 结论

GPM 投喂对小鼠体重和生长均无明显影响,却能降低血糖和血脂,表明有较好的降糖降脂作用。其降脂作用可能通过抑制 HMGCR 的基因和蛋白表达,降低 HMGCR 活性,减少机体内胆固醇合成。而降糖作用是通过增加 Glut4 的基因和蛋白表达量,促进体内葡萄糖转运引起的。因此, GPM 是一种很好降糖降脂食品,可作为预防代谢综合病有效食物。

参考文献

- [1] Zahra A A, Kadir F A, Mahmood A A. Acute toxicity study and wound healing potential of *Gynura procumbens* leaf extract in rats [J]. J. Med. Plants Res., 2011, 5(12): 2551-2558
- [2] Kim J, Lee CW, Kim EK, et al. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts [J]. J. Ethnopharmacol., 2011, 137(1):427-433
- [3] Kim MJ, Lee HJ, Kim HK, et al. Antihypertensive effects of *Gynura procumbens* extract in spontaneously hypertensive rats [J]. J. Med. Food, 2006, 9(4): 587-590
- [4] Akowuah GA, Mariam A, Chin JH. The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf [J]. Pharmacogn Mag., 2009, 5: 81-85
- [5] 朱玉婷,廖为明,郑国栋,等.平卧菊三七中绿原酸的提取纯化工艺研究[J].湖北农业科学,2012,51(19):4348-4352
Zhu YT, Liao WM, Zheng GD, et al. Optimization of Extraction and Purification Technology of Chlorogenic Acid from *Gynura procumbens* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(19): 4348-4352
- [6] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. J. Biol. Chem., 1957, 226: 479-509
- [7] Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, et al. Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, down regulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption [J]. Biotechnol. Biochem., 2004, 68: 353-359
- [8] Field FJ, Albright EJ, Mathur SN. Effect of dietary n-3 fatty acids on HMG-CoA reductase and ACAT activities in liver and intestine of the rabbit [J]. J. Lipid Res., 1987, 28: 50-58
- [9] Akowuah GA, Sadikun A, Mariam A. Flavonoid identification and hypoglycaemic studies of the butanol fraction from *Gynura procumbens* [J]. Pharm. Biol., 2002, 40(6): 405-410
- [10] 马洁桃,张岭,王茵.黄酮类化合物的降脂活性及其作用机制的研究进展[J].中国预防医学杂志,2011,12(4):370-372
Ma JT, Zhang L, Wang Y. Research progress of flavonoids on hypolipidemic active and its mechanism [J]. Chin. Prev. Med., 2011, 12(4): 370-372
- [11] Wan CW, Wong CN, Pin WK, et al. Chlorogenic Acid Exhibits Cholesterol Lowering and Fatty Liver Attenuating Properties by Up-regulating the Gene Expression of PPAR- α in Hypercholesterolemic Rats Induced with a High-Cholesterol Diet [J]. Phytother. Res., 2013, 27(4): 545-551
- [12] Lee HW, Hakim P, Rabu A, et al. Antidiabetic effect of *Gynura procumbens* leaves extracts involve modulation of hepatic carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J. Med. Plants Res., 2012, 6(5): 796-812
- [13] Li M, Shi Y, Tian WX. Factor influencing the levels of fatty acid synthase complex activity in fowl [J]. Biochem. Mol. Biol. Int., 1999, 47: 63-69
- [14] Vishwanath D, Srinivasan H, Patil MS, et al. Novel method to differentiate 3T3-L1 cells in vitro to produce highly sensitive adipocytes for a GLUT4 mediated glucose uptake using fluorescent glucose analog [J]. J. Cell Commun. Signal, 2013, 7: 129-140
- [15] Lawrence JC, Piper RC, Robinson LJ. GLUT4 facilitates insulin stimulation and cAMP-mediated inhibition of glucose transport [J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 1992, 89: 3496-3497