

青钱柳多糖对高脂血症大鼠脂代谢及对 PPAR α 、FAS、GLUT4 基因 mRNA 表达的影响

李楠, 赵静, 吴茹, 杨占威, 王文君

(江西农业大学南昌市农产品加工与质量控制重点实验室, 江西南昌 330045)

摘要: 研究青钱柳多糖对高脂血症大鼠脂代谢基因表达的影响。将高脂血症大鼠分为高脂血症模型组、辛伐他汀组、青钱柳水溶液组、青钱柳多糖高、中、低剂量组, 每组 16 只, 连续喂养 8 周。实验结束后测定肝脏 T-AOC、CAT、GSH-Px、MDA 的含量; 采用 qRT-PCR 法测定肝脏和脂肪组织中 PPAR α 、FAS、GLUT4 mRNA 表达水平, 探讨青钱柳多糖的降血脂机制。结果表明, 青钱柳多糖各组、水提取物组均能够降低肝脏中 MDA 值, 以高剂量组多糖效果最为显著, 降幅为 53.47%; 青钱柳高、中、低及水提取物组可显著提高肝脏中 T-AOC、CAT、GSH-Px 值 ($P < 0.01$); 其最大增幅分别为 112.05%、48.63%、6.17%; 此外青钱柳多糖各剂量组均可提高 PPAR α 、GLUT4 mRNA 表达量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中肝脏中表达量的最大增幅分别为 19.45%、35.50%; 降低 FAS mRNA 表达量, 肝脏及脂肪中的最大降幅分别为 25.02%、20.49%。提示青钱柳多糖具有抑制肝脏脂质氧化, 调节与脂类代谢相关基因表达的作用, 进而起到缓解高脂血症的功效。

关键词: 青钱柳; 多糖; 抗氧化; 基因表达; 大鼠

文章编号: 1673-9078(2015)4-29-35

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.006

Effects of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja Polysaccharides on Lipid Metabolism and Expressions of PPAR α , FAS, and GLUT4 mRNA in Hyperlipidemic Rats

LI Nan, ZHAO Jing, WU Ru, YANG Zhan-wei, WANG Wen-jun

(Key Lab for Agro-Products Processing and Quality Control, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: The effects of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides (CPPs) on the expression of genes related to lipid metabolism were examined in hyperlipidemic rats. Hyperlipidemic rats were randomly divided into hyperlipidemia model control, simvastatin, *C. paliurus* (CP) water extract group, low-dose CPP, moderate-dose CPP, and high-dose CPP groups (16 rats per group), and all rats were continuously fed for eight weeks. After the experiment, the total antioxidant capacity (T-AOC) and the contents of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), and maleic dialdehyde (MDA) in the liver were measured. The mRNA expression levels of PPAR α , FAS, and GLUT4 in the liver and adipose tissue were investigated by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) to explore the hypolipemic mechanism of CPPs. All CPP-treated groups, irrespective of dose, and the CP water extract group exhibited decreased MDA in the liver after treatment, and the most significant reduction was observed in the high-dose CPP group (53.47% decrease; $P < 0.01$). The T-AOC value and the contents of CAT and GSH-Px increased in all CPP-treated groups and the CP water extract group ($P < 0.01$), and the largest increases were 112.05%, 48.63%, and 6.17%, respectively. In addition, each CPP-treated group exhibited increased mRNA expression levels of PPAR α and GLUT4 after treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the highest increases in the liver were 19.45% and 35.50%, respectively. All CPP-treated groups had decreased FAS mRNA expression, and the largest declines observed in the liver and adipose tissue were 25.02% and 20.49%, respectively. These results indicated that CPP has inhibitory effects on lipid oxidation in the liver and regulates the expression of genes related to lipid metabolism, thus alleviating hyperlipidemia.

Key words: *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja; polysaccharide; antioxidant; gene expression; rat

收稿日期: 2014-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31160319); 江西省高等学校科技落地计划资助项目 (KJLD13027) 和江西省教育厅科技计划资助项目 (GJJ13281) 和研究生创新项目 (YC2014-S188, NDYC2013-S002); 作者简介: 李楠 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子营养学; 通讯作者: 王文君教授

高脂血症 (hyperlipidemia, HLP) 是因脂肪转运或是代谢异常所导致的血浆中一种或几种脂质过高的疾病。由于其继发心脑血管疾病且损害严重, 故发病率高、病死率高和致残率高, 严重威胁着人类的健康和生命。而临床研究证实, 膳食干预可以有效地降低高脂血症发病的风险及其所带来的危害^[1], 并可避免因长期服用降脂药物对人体健康所产生的危害。近代的营养学研究表明, 从天然植物中提取的功能成分如黄酮、多糖等具有降低血糖和血脂的功效。因此, 从天然植物中寻找疗效确切、作用持久、副作用少的药物具有重要意义, 也是目前的研究热点之一。

青钱柳, 系胡桃科青钱柳属植物特有单种属, 为我国所特有, 因其树形似柳, 果实圆形似铜钱, 色青而下垂, 故名“青钱柳”。民间长期应用表明, 青钱柳茶具有生津止渴, 清热解暑, 增强体力和延年益寿等作用。《中国中药资源志要》记载, 其树皮叶味辛微苦, 具有清热消肿、止痛、解毒等功能, 可用于治疗顽癣。实验发现青钱柳叶含多糖、有机酸、三萜、黄酮和甾体类等种重要药效成分。大量研究证实, 青钱柳提取物具有降血脂、降血压、降血糖等生理活性, 同时还有增强肌体免疫力、抗癌、防治糖尿病等生理功能^[2-3]; 多糖是青钱柳叶中的重要活性成分之一, 研究发现青钱柳多糖也有较强的体外抗脂质过氧化作用^[4-5]。但很少有文献探讨青钱柳多糖对实验动物与脂代谢相关基因的表达, 故本实验拟通过观察青钱柳多糖对高脂血症大鼠肝脏脂质及抗氧化能力的影响来探讨其降血脂作用。

高脂血症的形成与营养和遗传因素有关, 也是许多转录因子、生长因子等共同调节的复杂生物学过程。本研究采用 qRT-PCR 技术, 研究青钱柳多糖对高脂血症大鼠过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (peroxisome proliferators-activated receptor α , PPAR α)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthetase, FAS)、葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) mRNA 表达的影响以探讨其降血脂的机制, 为青钱柳多糖研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SD 雌性大鼠 (SPF 级) 130 只, 体重 220~260 g, 湖南斯莱克实验动物有限公司提供 (生产许可证号: SCXK(湘)2009-0004)。大鼠饲养环境湿度 69%~72%, 温度 25 °C~27 °C。

1.1.2 药物、主要试剂和仪器

青钱柳叶, 江西永修; 青钱柳多糖, 由本实验室自行制备, 采用水提醇沉法提取制备, Sevag 法分离蛋白, 经 D301-R 大孔树脂纯化, 苯酚硫酸法测得样品中总糖含量在 60% 左右^[5]; 青钱柳浸提液, 称 50 g 干燥青钱柳叶, 加入 500 mL 沸水浸泡约 2 h; 全价饲料, 江西南昌大学医学院动物室提供。总胆固醇 (TC) 测定试剂盒、甘油三酯 (TG) 测定试剂盒, 中生北控生物科技股份有限公司; 过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测定试剂盒、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒、总抗氧化能力 (T-AOC) 测定试剂盒、蛋白含量测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 辛伐他汀片, 上海迪冉郸城制药有限公司; 其他所用试剂均为分析纯; DNA Marker、Trizol 试剂盒、RNase 喷雾清除剂、RT-PCR 试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; Platinum[®]定量 PCR SuperMix-UDG, 上海英骏生物技术有限公司; PCR 引物, 上海生物工程技术有限公司; DEPC (焦碳酸二乙酯)、Tris、EDTA, Amresco 公司, 美国; 琼脂糖, Promega 公司, 美国。实验所用其他化学试剂均为分析纯。全自动数码成像及分析系统 (GeneGenius), SYNGENE 公司; PE9600PCR 仪, PERKIN ELMER 公司; Eppendorf 5415D 小型高速离心机, Eppendorf 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 高脂乳剂的配制

高脂乳剂的配制见文献^[5]。

1.2.2 高脂血症大鼠模型的建立与分组

130 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分成空白对照组 (20 只) 和造模组 (110 只)。空白对照组不灌胃高脂乳剂, 灌胃等体积的蒸馏水, 造模组大鼠则灌胃高脂乳剂 (20 mL/kg), 各组大鼠均自由采食饮水, 连续灌喂 15 d。实验第 16 d, 130 只 SD 大鼠乙醚麻醉后, 眼眶静脉采血并分离血清, 测定总胆固醇 (TC)、总甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL-C)、高密度脂蛋白 (HDL-C)。以模型组动物血清总胆固醇 TC 升高 (与空白对照组比较 $P < 0.01$) 视为高脂血症模型建立成功。将造模成功的 96 只大鼠按照 TC 水平随机分成模型对照、辛伐他汀、青钱柳多糖低、中、高剂量组、水提物组, 每组 16 只。

1.2.3 降脂实验

降脂实验设计及各参数设定参考叶振南等 (2014)^[5]。除空白对照组外, 各组大鼠每天上午灌胃高脂乳剂 20 mL/kg, 下午三个青钱柳多糖组则分别以 200 mg/kg、400 mg/kg 和 800 mg/kg 剂量的青钱柳多糖水

溶液灌胃, 模型对照组给予等体积的蒸馏水, 阳性对照组灌胃辛伐他汀水溶液 10 mg/kg, 水提物组大鼠的日常饮水替换为青钱柳叶浸提液。连续给药 8 周, 每周称一次体重, 以便调整给药剂量。灌胃期间各组大鼠均自由摄食和饮水, 每天观察动物的活动并称量记录各组采食量。

1.2.4 生化指标测定

大鼠喂养 4 周后, 禁食不禁水 12 h, 用玻璃毛细管从大鼠眼底静脉丛采血, 随后在 4 °C、3500 r/min 离心 10 min, 分离血清, 按试剂盒说明测定血清 TC、TG。初步分析青钱柳多糖的干预效果并继续多糖干预实验 4 周。实验结束后, 同样的方法采血并测定相关的指标, 采完血后, 处死大鼠, 立即分离大鼠肝和腹腔脂肪, 其中一部分肝脏和脂肪组织生理盐水清洗后, 在冰浴中制成不同浓度的组织匀浆, 按试剂盒使用说明测定肝组织中 CAT、GSH-Px、T-AOC 活力及 MDA 含量。剩余脏器及脂肪组织分装于冻存管, 液氮速冻后转移至 -80 °C 超低温冰箱中保存以提取 RNA。

1.2.5 RNA 提取、逆转录和定量 PCR(Real time Quantitative PCR, qRT-PCR)

总 RNA 提取: 采用 Trizol 常规一步法提取肝脏

及脂肪组织总 RNA, 紫外分光光度计分别测定 A_{260} 及 A_{280} 下 OD 值, 要求 A_{260}/A_{280} 比值介于 1.8~2.0, 根据 A_{260} 计算总 RNA 含量, -80 °C 保存备用。

逆转录反应: 按试剂盒说明。分别为 Total RNA/mRNA 50 ng-5 μ g/5-500 ng, 2 \times ES Reaction Mix 10 μ L, Anchored Oligo(dT) 18(0.5 μ g / μ L) 1 μ L, EasyScriptTM RT/RI Enzyme Mix 1 μ L, 加入 RNase-free Water 至总体积 20 μ L。将各组分混匀, 42 °C 孵育 30 min, 85 °C 加热 5 min 灭活逆转录酶, 取出 1 μ L cDNA 超微量用紫外分光光度计测定其浓度, 剩余 cDNA 可保存于 -20 °C 或立即用于 PCR。

荧光定量 PCR: 参照 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 提供的大鼠各基因序列, 用 Primer Express 3.0 软件设计 FAS、PPAR α 、Glut-4 和肌动蛋白(β -actin) 基因的引物和探针, 并由上海生工合成, 引物序列和探针序列见表 1。qRT-PCR 反应条件分别为: 95 °C 预变性 5 min, 随后 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 45 s (FAS 和 β -actin)、PPAR α 55 °C 退火 45 s、Glut-4 56.5 °C 退火 45 s, 45 个循环。PCR 反应体系为: cDNA 1 μ L, MIX 5 μ L, FP 和 RP 各 0.2 μ L, ROX II 0.2 μ L, 加水至总体积 10 μ L。

表 1 不同基因 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences for each gene

基因名称	序列名称	碱基序列	登入序列号
FAS	FP	5'-TGATGAAGGGCATGGTTTAGAA-3'	
	RP	5'-TCTTTGCACCTGCACCTGGTA-3'	NM_017332.1
	Probe	FAM-TGGAAACGAACTGCACCCGGACC-TAMRA	
PPAR α	FP	5'-TCCCAAAACTCCTTCAAAAATG-3'	
	RP	5'-CACGAGCTGCGCATGCT-3'	XM_006242154.1
	Probe	FAM-TGGACCTCCGGCAGCTGGTCAC-TAMRA	
Glut-4	FP	5'-TGTGGCCTTCTTGAGATTGG-3'	
	RP	5'-CTGAAGAGCTCGGCCACAA-3'	NM_012751.1
	Probe	FAM-CCTGGCCCCATCCCCTGGTTC-TAMRA	
β -actin	FP	5'-TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA-3'	
	RP	5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'	NM_031144.3
	Probe	FAM-CCTGGCCTCACTGTCCACCTTCCA-TAMRA	

1.3 数据分析

以目的基因与 β -actin 电泳条带的 OD 值的比值表示目的基因 mRNA 的相对表达量。以对照组 mRNA OD 值为 1 计算实验组 mRNA 与对照组的相对密度比值。实验数据采用 DPS 统计软件(Version 7.05)进行 Duncan 新复极差法分析, $P < 0.05$ 为差异显著, 各项指标以平均数 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 青钱柳多糖对肝脏 T-AOC、CAT、GSH-Px 和 MDA 的影响

青钱柳多糖对肝脏 T-AOC、CAT、GSH-Px 和 MDA 的影响见表 2。与空白对照组相比, 高脂血症大

鼠肝脏组织中 GSH-Px、T-AOC、CAT 活性均明显降低,MDA 含量显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),说明灌胃高脂乳剂不仅导致大鼠脂质代谢紊乱而且还加重了大鼠体内脂质过氧化作用程度。与高脂血症模型组相比,低、中、高剂量多糖和辛伐他汀均可不同程度的提高大鼠肝脏中 GSH-Px、CAT、T-AOC 活力。其中, GSH-Px 酶的增幅分别为 1.51%、3.16%、6.17%、11.43%; CAT 的增幅分别为 30.35%、42.59%、48.63%、66.27%; T-AOC 的增幅分别为 36.75%、59.04%、112.05%、73.49%; 相应的,低、中、高剂量多糖和

辛伐他汀均组 MDA 的降幅分别为 38.61%、49.61%、53.47%、25.67%。可以看出青钱柳多糖各剂量组对 T-AOC、CAT、GSH-Px 均有提高作用,且青钱柳多糖对于 T-AOC、CAT 和 GSH-Px 的提高效果呈现量效关系,以高剂量组效果最佳,但仍不及降脂药物辛伐他汀的效果。对于 MDA 含量,与高脂血症模型组相比,各处理组 MDA 含量均极显著降低 ($P<0.01$),说明青钱柳多糖可以降低高脂血症模型动物 MDA 的水平,从而起到抗氧化的作用。

表 2 青钱柳多糖对大鼠肝脏中 T-AOC、CAT、GSH-Px 和 MDA 的影响

Table 2 Effect of CPPs on T-AOC and the levels of CAT, GSH-Px, and MDA in rat livers

组别	剂量/(mg/kg)	肝脏 T-AOC 值/(U/mg prot)	肝脏 CAT 值/(U/mL)	肝脏 GSH-Px 值/U	肝脏 MDA 值/(nmol/mg prot)
空白	-	2.84±0.53 ^{AB}	22.65±3.99 ^A	1027.74±19.09 ^A	2.64±0.72 ^C
高	800	3.52±0.25 ^A	21.15±6.06 ^A	878.82±101.45 ^B	2.41±0.52 ^C
中	400	2.64±0.57 ^{AB}	20.29±7.33 ^{AB}	853.92±71.74 ^B	2.61±0.51 ^C
低	200	2.27±0.31 ^{AB}	18.55±3.73 ^{AB}	840.18±85.98 ^B	3.18±0.46 ^{BC}
辛	10	2.88±0.91 ^{AB}	23.66±3.47 ^A	922.41±68.14 ^{AB}	3.85±1.10 ^B
水提物	-	2.12±0.48 ^{AB}	18.49±5.21 ^{AB}	911.17±114.22 ^{AB}	3.46±0.86 ^{BC}
模型	-	1.66±0.48 ^B	14.23±4.03 ^B	827.72±108.49 ^B	5.18±1.26 ^A

注:同一列标不同大写字母表示差异显著 ($P<0.01$)。

2.2 青钱柳多糖对大鼠肝脏和脂肪组织中

PPAR α mRNA 表达的影响

2.2.1 大鼠各组总 RNA 提取结果

大鼠各组织总 RNA 提取后经琼脂糖凝胶电泳分析,泳道中 28s、18s 条带清晰(图 1),说明提取的 RNA 较完整,降解程度较低。紫外分光光度计分析 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 之间,说明样品的纯度较高,符合荧光定量 PCR 的纯度要求。

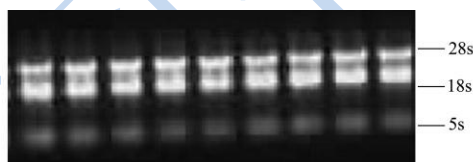


图 1 组织总 RNA 的提取结果

Fig.1 Results of total RNA extraction from tissues

2.2.2 青钱柳多糖对大鼠组织中基因表达的影响

2.2.2.1 青钱柳多糖对大鼠肝脏和脂肪组织中 PPAR α mRNA 表达的影响

肝脏组织中 PPAR α mRNA 的表达结果如图 2 所示,与空白对照组相比,水提物组、辛伐他汀组、青钱柳多糖低、中、高剂量组肝脏组织中 PPAR α mRNA

表达量无显著性差异。高脂模型组与空白组相比, PPAR α mRNA 表达量显著下调 ($P<0.05$),下调 12.74%。与模型组相比,青钱柳多糖高剂量、辛伐他汀、水提物组能够显著上调 PPAR α mRNA,分别上调: 19.45%、15.07%、17.08% ($P<0.05$);青钱柳多糖中、低剂量组肝脏组织中 PPAR α mRNA 表达也有上调,分别上调: 9.36%、10.39% ($P>0.05$)。

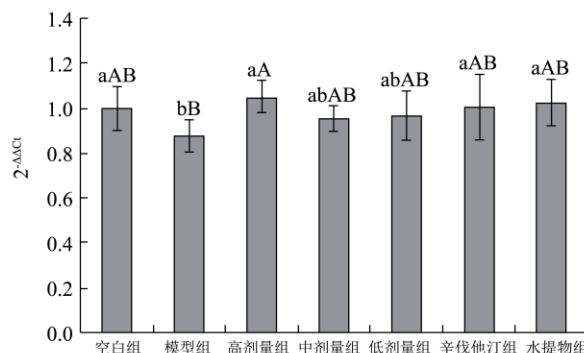


图 2 青钱柳多糖对 SD 大鼠肝脏组织 PPAR α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm SD, n=6$)

Fig.2 Effect of CPPs on PPAR α mRNA expression in the liver (mean \pm SD, n = 6)

脂肪组织中 PPAR α mRNA 的表达结果如图 3 所示,与空白对照组相比,水提物组、辛伐他汀组、青钱柳多糖低、中、高剂量组脂肪组织中 PPAR α mRNA

表达量无显著性差异。高脂模型组与空白组相比, *PPARα* mRNA 表达量有轻微的下调, 下调 2.87%。与模型组相比, 青钱柳多糖中剂量组脂肪组织 *PPARα* mRNA 的表达显著上调, 上调率为: 7.54% ($P < 0.05$); 青钱柳多糖高、低剂量组、辛伐他汀组、水提物组与模型组相比 *PPARα* mRNA 表达量无显著性差异, 这可能与 *PPARα* 基因的表达主要是发生在生长发育的早期有关。

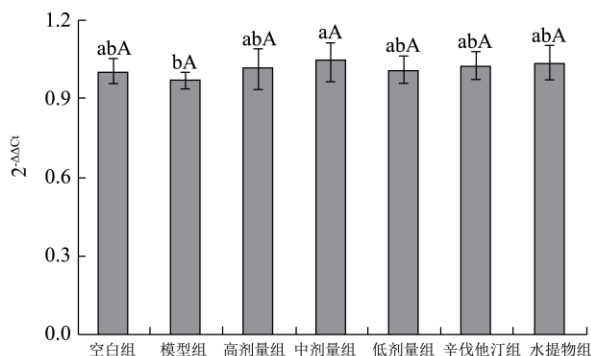


图3 青钱柳多糖对 SD 大鼠脂肪组织 *PPARα* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm SD, n=6$)

Fig.3 Effect of CPPs on *PPARα* mRNA expression in adipose tissues (mean \pm SD, n = 6)

2.2.2.2 青钱柳多糖对大鼠肝脏和脂肪组织中 *FAS* mRNA 表达的影响

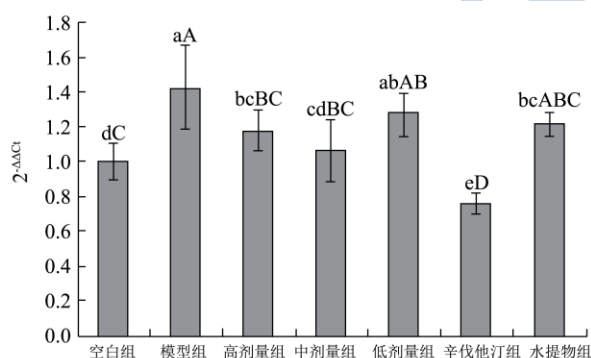


图4 青钱柳多糖对 SD 大鼠肝脏组织 *FAS* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm SD, n=6$)

Fig.4 Effect of CPPs on *FAS* mRNA expression in the liver (mean \pm SD, n = 6)

由图4可知, 未经处理的模型组大鼠肝脏中 *FAS* mRNA 表达量平均水平比空白对照组高 41.77%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示高脂饮食可能会导致肝脏组织中 *FAS* mRNA 的异常高表达。与模型组相比, 青钱柳多糖高剂量、中剂量组、辛伐他汀组、水提物组肝脏组织中 *FAS* mRNA 显著下降, 下调率分别为: 17.35%、25.02%、46.64% ($P < 0.01$)、14.67% ($P < 0.05$); 青钱柳多糖低剂量组 *FAS* mRNA 表达量与模型组相比差异不显著。

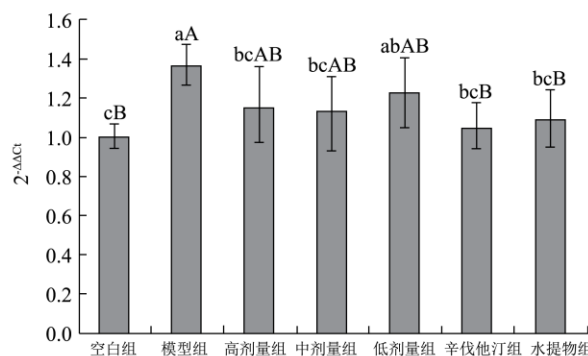


图5 青钱柳多糖对 SD 大鼠脂肪组织 *FAS* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm SD, n=6$)

Fig.5 Effect of CPPs on *FAS* mRNA expression in the adipose tissue (mean \pm SD, n = 6)

由图4可知, 青钱柳多糖对脂肪中 *FAS* mRNA 表达的影响与肝脏组织中的结果相似, 未经处理的模型组大鼠肝脏中 *FAS* mRNA 表达量平均水平比空白对照组高 36.39%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白组相比, 青钱柳多糖中、高剂量组、辛伐他汀组、水提物组脂肪组织中 *FAS* mRNA 表达量无显著性差异。与模型组相比, 中、高剂量 CPP、辛伐他汀、水提物能够显著抑制 *FAS* mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 差异显著, 抑制率分别为: 16.99%、15.72% ($P < 0.05$)、23.63%、20.49% ($P < 0.01$)。

2.2.2.3 青钱柳多糖对大鼠肝脏和脂肪组织 *GLUT-4* mRNA 表达的影响

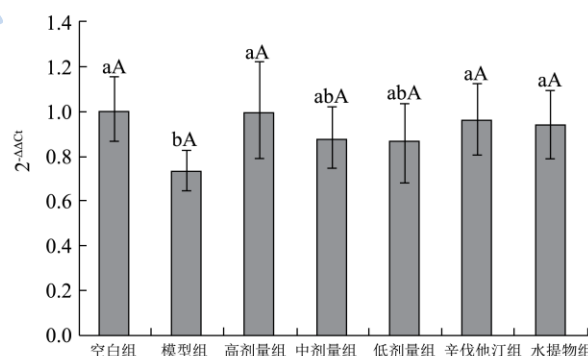


图6 青钱柳多糖对 SD 大鼠肝脏中 *GLUT-4* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm SD, n=6$)

Fig.6 Effect of CPPs on *GLUT4* mRNA expression in the liver (mean \pm SD, n = 6)

肝脏组织中 *GLUT4* mRNA 的表达结果如图6所示, 与空白对照组相比, 水提物组、辛伐他汀组、青钱柳多糖低、中、高剂量组肝脏组织中 *GLUT4* mRNA 表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。高脂模型组与空白组相比, *GLUT4* mRNA 表达量显著下调, 下调 26.84% ($P < 0.05$)。与模型组相比, 青钱柳多糖高剂量、辛伐他汀、水提物组均能够显著上调 *GLUT4* mRNA 表达

($P < 0.05$), 分别上调: 35.50%、30.43%、27.82%; 青钱柳多糖中、低剂量组肝脏组织中 *GLUT4* mRNA 表达也有上调, 分别上调: 19.67%、18.17% ($P > 0.05$)。

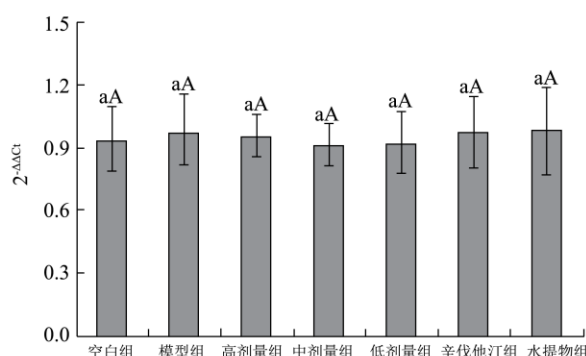


图7 青钱柳多糖对SD大鼠脂肪中*GLUT-4* mRNA表达的影响
($\bar{x} \pm SD, n=6$)

Fig.7 Effect of CPPs on *GLUT4* mRNA expression in the adipose tissue (mean \pm SD, n = 6)

脂肪组织中 *GLUT4* mRNA 表达的结果见图7。与空白对照组相比, 水提物组、辛伐他汀组、青钱柳多糖低剂量组、中剂量组大鼠中脂肪组织 *GLUT4* mRNA 的表达量没有显著性差异 ($P > 0.05$)。与高脂模型组相比, 水提物组、辛伐他汀组、青钱柳多糖低剂量组、中剂量组大鼠中脂肪组织 *GLUT4* mRNA 的表达量没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

在正常情况下, 生物体内自由基的产生和消除是处于平衡状态的。但研究发现, 当血脂水平出现异常时, 机体的抗氧化能力下降, 氧自由基生成增加, 脂质过氧化作用增强。脂质过氧化所产生的过氧化物具有一定的细胞毒性, 会对细胞及机体的正常生理功能产生影响。CAT、GSH-Px 都是机体广泛存在的催化过氧化氢分解的酶, 可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用^[6]。大量实验证明青钱柳多糖具有较强的体外抗脂质过氧化作用, 能够调节羟基自由基的活性, 抑制 DPPH 和自氧化的活性并呈一定的量效关系^[4]。本研究发现, 青钱柳多糖具有增强肝脏 T-AOC 的能力和提高了 GSH-Px、CAT 酶活性作用, 减少脂质过氧化产物 MDA 的含量, 说明青钱柳多糖具有体内抗氧化生物活性, 这与他人研究结果一致^[7]。

PPARα 是脂肪代谢的关键性转录调节因子, *PPARα* 与相应配体结合后被激活, 对肝脏的线粒体、过氧化物酶体及微粒体的脂肪酸 β 氧化中的关键酶发挥关键的基因调控作用; *PPARα* 还可通过甘油醇激酶途径参与脂肪组织中的脂质代谢调节^[8]。本研究结果表明, 与模型组相比, 青钱柳多糖高剂量、辛伐他汀、

水提物组能够显著提高肝脏中 *PPARα* mRNA 表达量; 青钱柳多糖中、低剂量组肝脏组织中 *PPARα* mRNA 表达也有上调; 但在脂肪组织中, 仅中剂量青钱柳多糖提高了 *PPARα* mRNA 的表达。郑承红等^[9]研究发现, 高脂血症的模型组大鼠左心室心肌组织 *PPARα* mRNA 相对表达量与正常组相比明显降低。而经中药糖脂安治疗后, 其相对表达量较病理组明显升高。宋冰^[10]等在探讨大黄素改善 KKAY 糖尿病小鼠脂肪组织胰岛素敏感性及降血糖的作用机制时发现, 与模型组相比, 治疗组脂肪组织 *PPARα* mRNA 的丰度表达明显升高 ($P < 0.05$)。这些结果都表明, 多糖在改善血糖和血脂紊乱用可能与激活 *PPARα* 受体有关。

葡萄糖是机体能量的主要来源, 葡萄糖的转运活动是机体能够利用这一能源物质的限速步骤, 而这又是由葡萄糖转运蛋白(GLUTs)介导完成的。*GLUT4* 是其中最主要的葡萄糖运载体, 为一种跨膜转运蛋白, 存在于胰岛素敏感的脂肪组织、骨骼肌组织和心肌组织中。Kim 等^[11]研究则发现, 肌肉 *GLUT4* 选择性表达下降会造成脂肪组织葡萄糖摄取的障碍。Takahashi 研究发现^[12], 高脂饮食可以下调白色脂肪组织中的 *GLUT4* 水平, 而当控制饮食后, 骨骼肌中的甘油三酯含量降低, *GLUT4* 的基因表达上调。本研究发现, 在肝脏中, 与模型组相比, 青钱柳多糖高剂量、辛伐他汀、水提物组均能够显著上调 *GLUT4* mRNA 表达 ($P < 0.05$), 青钱柳多糖中、低剂量组对肝脏组织中 *GLUT4* mRNA 表达也有上调; 但在脂肪组织中, 各剂量组青钱柳多糖并不能显著影响 *GLUT4* mRNA 的表达量。其可能原因是试验中所给的多糖剂量少; 或者是在试验后期大鼠的体重变化较小有关。

脂肪酰合成酶(FAS)是脂肪酸生物合成的关键酶之一, 其数量、活性对控制动物体脂沉积具有重要影响, 其表达水平的升高能够显著地增加甘油三酯在体内的沉积从而导致肥胖^[13]。本试验发现, 高脂血症大鼠肝脏及脂肪中 *FAS* mRNA 表达量相对模型组较高, 青钱柳多糖高剂量、中剂量组、辛伐他汀组、水提物组 *FAS* mRNA 表达量显著下降。各浓度的青钱柳多糖能有效的降低大鼠肝脏及脂肪组织中 *FAS* mRNA 的表达, 影响 *FAS* 参与脂类物质的代谢过程, 这与刘姚等的研究结果类似^[14]。Chiang CT 等^[15]报道, 灌胃普洱茶的大鼠肝脏内脂肪酰合成酶的表达量得到显著抑制, 人肝肿瘤 HepG2 细胞在加入普洱茶提取物后, 在蛋白和 mRNA 水平上, 脂肪酰合成酶表达得到抑制, 多糖可通过调控 *FAS* 基因的表达而起到降脂的功效。

4 结论

青钱柳多糖具有提高肝脏组织中 T-AOC 的能力、CAT 和 GSH-Px 酶活性, 减少脂质过氧化产物 MDA 的含量, 且其可增加肝脏和脂肪中 *PPAR α* 和 *GLUT4* 基因表达, 降低 *FAS* 基因表达, 表明青钱柳多糖具有良好的抗氧化、降血脂的效果。

参考文献

- [1] Wenying Yang, Juming Lu, Jianping Weng, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *New England Journal of Medicine*, 2010, 362: 1090-1101
- [2] 刘姚,叶振南,傅凌韵,等.青钱柳多糖对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖分化的影响[J].*食品科学*,2013,34(23):291-295
LIU Yao, YE Zheng-nan, FU Ling-yun, et al. Effect of cyclocarya paliurus (*Batal.*) iljinskaja polysaccharide on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Food Science*, 2013, 34(23): 291-295
- [3] 谢明勇,谢建华.青钱柳研究进展[J].*食品与生物技术学报*, 2008,27(1):113-121
XIE Ming-yong, XIE Jian-hua. Review about the research on cyclocarya paliurus (*Batal.*) iljinskaja [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27(1): 113-121
- [4] XIE Jian-Hua, XIE Yong-ming, SHEN Ming-yue, et al. Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of cyclocarya paliurus (*Batal.*) iljinskaja polysaccharides [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 89(1): 177-184
- [5] 叶振南,李楠,盛丹丹,等.青钱柳多糖对高脂血症大鼠血脂及抗脂质过氧化作用的影响[J].*现代食品科技*,2014,30(4): 1-5
YE Zhen-nan, LI Nan, SHENG Dan-dan, et al. Effect of cyclocarya paliurus polysaccharide on hyperlipidemia and anti-lipid peroxidation in hyperlipidemic rats [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(4): 1-5
- [6] Kocer I, Tay si S, Ertekin M V, et al. The effect of Lcamitine in the prevention of ionizingradiation induced cataracts: a rat model [J]. *Graefes Archive for Clinic and Experimental Ophthalmology*, 2007, 245(4): 588-594
- [7] 段小群,张小芳,卢曦,等.青钱柳多糖体外抗脂质过氧化作用研究[J].*中药材*,2010,33(10):1618-1621
DUAN Xiao-qun, ZHANG Xiao-fang, LU Xi, et al. Study on the anti-oxidant effects of cyclocarya paliurus. polysaccharide in vitro [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2010, 33(10): 1618-1621
- [8] Mazzucotelli A, Viquerie N, Tiraby C, et al. The transcriptional coactivator peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma coactivator-1 alpha and the nuclear receptor PPAR alpha control the expression of glycerol kinase and metabolism genes independently of PPAR gamma activation in human white adipocytes [J]. *Diabetes*, 2007, 56(10): 2467-2475
- [9] 郑承红,黄蓓,彭聪.PPAR α 和 PPAR γ mRNA 在 2 型糖尿病大鼠心肌中的表达及糖脂安的干预作用[J].*中国医院药学杂志*,2009,29(11):867-868
ZHENG Cheng-hong, HUANG Bei, PENG Cong. Study of the expression of PPAR α , PPAR γ mRNA in myocardium of type 2 diabetic rats and the intervention effect of Tangzh'an [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2009, 29(11): 867-868
- [10] 宋冰,刘学政.大黄素对 KKAY 糖尿病小鼠脂肪组织 PPAR α 及 PPAR γ 表达影响的实验研究[J].*北京中医药大学学报*,2012,35(10):692-695
SONG Bing, LIU Xue-zheng. Influences of emodin on expressions of PPAR α mRNA and PPAR γ mRNA in adipose tissue in KKAY mice with diabetes [J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 35(10): 692-695
- [11] Kim J K, Zisman A, Fillmore J J, et al. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4 [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001, 108: 153-160
- [12] Takahashi Y, Ide T. Dietary n-3 fatty acids affect Mrna level of brown adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat [J]. *British Journal of Nutrition*, 2000, 84(2): 175-184
- [13] Hofbauer HF, Schopf FH, Schleifer H, et al. Regulation of gene expression through a transcriptional repressor that senses Acyl-chain length in membrane phospholipids [J]. *Developmental Cell*, 2014, 29(6): 729-39
- [14] 刘姚,陈婷婷,傅凌韵,等.青钱柳多糖对高脂血症小鼠脂肪酸合成酶基因(FAS)表达影响[J].*江西农业大学学报(自然科学版)*,2013,35(2):392-397
LIU Yao, CHEN Ting-ting, FU Ling-yun, et al. Effect of cyclocarya paliurus (*Batal.*) iljinskaja polysaccharide on the fatty acid synthase expression in hyperglicemia mice [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(2): 392-397
- [15] Chiang C T, Weng M S, Lin-shiau S Y, et al. Pu-eh tea supplementation suppresses fatty acid synthase expression in the rat liver through down regulating Akt and JNK signals as demonstrated in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Oncology Research*, 2005, 16(3): 119-128

现代食品科技