

• 药理 •

石榴叶鞣质对高血脂高血糖模型动物脂代谢的影响

孟 甄, 孙立红, 陈芸芸, 叶 敏, 苏 慧, 邢东明, 杜力军
(清华大学生物科学与技术系药物药理研究室, 北京 100084)

摘要: 目的: 观察石榴叶鞣质对高脂模型鼠脂代谢的影响, 以及体外对 HMG-CoA 还原酶的抑制作用。方法: 造大鼠高脂模型, 以四氧嘧啶诱导高血糖伴高血脂小鼠模型, 检测 TC、TG 等生化指标; 制备大鼠肝微粒体 HMG-CoA 还原酶液, 测 1min 内 A_{340nm} 的变化。结果: 石榴叶鞣质大中剂量 (150、75mg/kg) 对高脂大鼠的 TC 和 TG 具有显著的降低作用, 大小剂量 (300、75mg/kg) 对高血糖伴高血脂小鼠的 TC 降低作用明显, 体外抑制 HMG-CoA 还原酶的最低有效浓度为 1×10^{-6} g/mL, 抑制率 15.16%。结论: 石榴叶鞣质对高脂模型鼠脂代谢紊乱具有较好的调节作用, 体外可较强的抑制 HMG-CoA 还原酶活性。

关键词: 石榴叶鞣质; HMG-CoA 还原酶; 高脂模型

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)01-0022-03

The Effect of Pomegranate Leaf Tannide on Hyperlipidemic Models

MENG Zhen, SUN Li-hong, CHEN Yun-yun, YE Min, SU Hui, XING Dong-ming, DU Li-jun
(Laboratory of Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences and Biotechnology,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Objective: To explore the effect of pomegranate leaf tannide (PLT) on lipid metabolite of high-lipid rats and its inhibition on HMG-CoA reductase *in vitro*. Methods: The high-lipid rat model and high-lipid with high-sugar mice model induced by intraperitoneal injection of alloxan were used. The contents of TC and TG of both models was measured. Rat liver microsome HMG-CoA reductase was prepare to measure the content changes of A_{340} in 1minute. Results: PLT can remarkably decrease TC and TG of high-lipid rat at doses of 150 and 75mg/kg, and its reducing effect on TC of high-lipid with high-sugar mice at doses of 300 and 75mg/kg is also obvious. The minimal inhibition concentration of HMG-CoA reductase *in vitro* is 1×10^{-6} g/mL with inhibition percentage of 15.16%. Conclusion: PLT has a noticeable activity of modulating lipid metabolite of high-lipid rat and inhibiting HMG-CoA reductase *in vitro*.

Key words: Pomegranate leaf tannide; HMG-CoA reductase; hyperlipidemic model

心脑血管疾病位于我国死亡原因的前两位, 其中以高胆固醇血症最受重视, 大量的临床数据证明, 控制血胆固醇于合适的水平, 可以预防动脉粥样硬化, 减少冠心病事件。因此调脂药的研究对于治疗及预防心血管疾病具有重要临床意义。目前临床常用的调脂药是羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA) 抑制剂 (他汀类) 和苯氧芳酸类 (贝特类), 前者通过抑制体内胆固醇合成而降低 TC, 后者主要降低血中 TG 水平^[1]。李定格等曾报道了石榴叶水提取物在调节血脂、清除氧自由基^[2] 和脑微循环血流量^[3] 等方面的活性。系统研究石榴叶、尤其是石榴

叶鞣质药理作用的报道不多。经多年研究, 我们发现了石榴叶具有调脂作用的活性部位石榴叶鞣质, 并对其在调血脂方面的特点及可能的机制进行了初步探讨, 以期临床提供一个有效天然药物。

1 材料与方法

1.1 试验动物 雄性 Wistar 大鼠, 体重 150~180g, 购自中国预防医科院微生物流行病学研究所, 合格证号: 京动管字 99(038) 号。雄性昆明种小鼠, 体重 18~22g, 购自中国预防医科院微生物流行病学研究所, 合格证号: 京动管字 99(036) 号。

1.2 药物与制备 石榴叶采自山东枣庄。由本室向兰博士鉴定为石榴科植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥叶。秋季果实成熟后采集, 批号: 001011。石榴叶鞣质 (pomegranate leaf tannide, PLT), 含总鞣质 64%, 批号: 010203, 由本室向兰博士提供, 用时以蒸

收稿日期: 2004-03-15

基金项目: 清华大学科技开发项目 (2002162)

通讯作者: 杜力军: Tel: (010) 62773630, E-mail: pham@mail.

tsinghua.edu.cn

馏水配制成所需浓度。制备方法:取石榴叶用 70% 乙醇回流提取,提取液滤过,减压回收乙醇,加水至 0.5g 生药/mL,离心取上清,上大孔吸附树脂。先以水洗脱,继以 80% 乙醇洗脱,收集 80% 乙醇洗脱液,减压回收乙醇,浓缩液水浴(80℃)干燥,即得石榴叶鞣质。

1.3 试剂 总胆固醇(TC),甘油三脂(TG),高密度脂蛋白(HDL-C),低密度脂蛋白(LDL-C)和血糖(GLU)试剂盒,均购自北京中生生物高技术公司,批号:010401。大、小鼠高脂饲料:10% 蛋黄粉,5% 猪脂肪油,0.5% 胆盐,0.2% 胆固醇,84.3% 基料,购自中国医学科学院实验动物研究所。非诺贝特(Fenofibrate),0.1g/粒,批号:0012162,广州威尔曼药业有限公司。辛伐他汀(Simvastatin),20mg/粒,批号:01041,杭州默东制药有限公司。三羟基三甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA),二硫苏糖醇(DTT),还原型辅酶 I(NADPH),均购自 Sigma 公司。磷酸盐缓冲液(pH6.8):300mmol/L KCl,240mmol/L KH₂PO₄,6mmol/L EDTA-Na₂ 和 15mmol/L DTT,均为分析纯。

1.4 测试仪器 7060 型全自动生化分析仪,日本 HITACHI;752 型紫外可见分光光度计,上海分析仪器厂。

1.5 试验方法

1.5.1 对高血脂大鼠血脂的调节作用 取大鼠,随机分为 7 组,每组 10 只。给高脂料 2 周,第 15 天眼眶静脉丛采血,分离血清,测 TC、TG。根据 TC 和 TG 做组间均匀调整,给予不同剂量的药物。分别于给药后第 7 天和第 14 天眼眶静脉丛采血,分离血清,测 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C,并计算 VLDL[= TC-LDL-C]和 TC/HDL-C。计算药物抑制百分率[= (TC_{对照组} - TC_{给药组})/TC_{对照组} × 100%]。石榴叶鞣质的三个剂量组分别为 150mg/kg、75mg/kg 和 37.5mg/kg,非诺贝特为 70mg/kg。模型对照组给等体积蒸馏水,正常对照组给普通饲料,并给等体积蒸馏水。

1.5.2 对高血糖伴高血脂小鼠的血脂调节作用^[4]

取小鼠,随机分为 6 组,每组 12 只。连续给高脂料 3 天,禁食 24h 后腹腔注射四氧嘧啶(80mg/kg)。继续饲以高脂料 7 天,第 7 天禁食 8h 后眼眶静脉丛采血,分离血清,测 TC、TG 和 GLU(血糖)。根据 TC、TG、GLU 值进行组间均匀调整。继续饲以高脂料,同时给予不同剂量的药物,分别于给药后第 7 和 14 天眼眶静脉丛采血,分离血清,测 TC、TG 和 GLU,计算药物抑制百分率[= (TC_{对照组} - TC_{给药组})/TC_{对照组} ×

100%]。石榴叶鞣质的三个剂量组分别为 300mg/kg、150mg/kg 和 75mg/kg,非诺贝特为 140mg/kg。模型对照组给等体积蒸馏水。正常对照组给普通饲料,并给等体积蒸馏水。

1.5.3 体外对 HMG-CoA 还原酶的影响 按文献方法^[5]制备大鼠肝微粒体 HMG-CoA 还原酶液。Lowry 法测定蛋白含量,将还原酶液调至 80g/L, - 30℃冻存备用。采用分光光度法进行 HMG-CoA 还原酶测定^[6]。取还原酶液 100μL 置于试管中,依次加入磷酸缓冲液(pH6.8)600μL,0.1% NADPH 100μL,0.1% HMG-CoA 100μL,不同浓度的药物 100μL,对照管给等体积生理盐水,混匀后于 340nm 处测 1min 内吸光度(A)值的变化。计算药物抑制百分率[= (A_{对照组} - A_{给药组})/A_{对照组} × 100%]。石榴叶鞣质的 5 个浓度分别为 1 × 10⁻³, 1 × 10⁻⁴, 1 × 10⁻⁵, 1 × 10⁻⁶, 1 × 10⁻⁷ kg/L,阳性药的 2 个浓度分别为 1 × 10⁻⁴, 1 × 10⁻⁵ kg/L,每组 3 个平行管。

1.6 实验所得数据经 EXCEL 软件处理,组间 t 检验。以 P < 0.05 和 P < 0.01 为有显著性标准。

2 试验结果

2.1 对高血脂大鼠血脂的调节作用

表 1 给药 14 天后大鼠的 TC、TG、LDL-C($\bar{x} \pm s$, n = 10)

分组	剂量 mg/kg	TC mmol/L	抑制率 %	TG mmol/L	抑制率 %	LDL-C mmol/L
模型	—	4.59 ± 0.61		2.34 ± 0.92		2.26 ± 0.83
非诺贝特	70	3.94 ± 0.69 ¹⁾	14.17	1.87 ± 0.83	19.92	2.04 ± 0.54
石榴叶鞣质	150	4.02 ± 0.53 ¹⁾	12.34	1.34 ± 0.86 ¹⁾	42.84	2.23 ± 0.90
石榴叶鞣质	75	4.05 ± 0.54 ¹⁾	11.81	1.06 ± 0.48 ¹⁾	54.55	2.38 ± 0.52
石榴叶鞣质	37.5	4.28 ± 0.38	6.90	2.03 ± 1.12	13.29	2.29 ± 0.31
正常	—	3.16 ± 0.27 ²⁾		1.26 ± 0.60 ¹⁾		1.57 ± 0.35

与模型组相比,¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, 下同

表 2 给药 14 天后大鼠的 HDL-C、VLDL、TC/HDL-C($\bar{x} \pm s$, n = 10)

分组	剂量 mg/kg	HDL-C mmol/L	VLDL mmol/L	TC/HDL-C
模型	—	1.12 ± 0.32	2.93 ± 0.61	4.48 ± 1.75
非诺贝特	70	1.57 ± 0.27 ²⁾	1.90 ± 0.79 ¹⁾	2.88 ± 1.14 ¹⁾
石榴叶鞣质	150	1.32 ± 0.57	1.80 ± 1.09 ¹⁾	3.14 ± 0.76 ¹⁾
石榴叶鞣质	75	1.29 ± 0.31	1.67 ± 0.37 ²⁾	3.28 ± 0.87
石榴叶鞣质	37.5	1.63 ± 0.55 ¹⁾	1.98 ± 0.39 ¹⁾	2.93 ± 0.92 ¹⁾
正常	—	1.36 ± 0.45	1.59 ± 0.23 ²⁾	2.61 ± 1.02 ²⁾

2.2 对高血糖高血脂小鼠的血脂调节作用(表 3)

2.3 体外对 HMG-CoA 还原酶的影响(表 4)

3 讨论

实验结果表明,高脂大鼠造模后 TC 为(4.59 ±

0.61) mmol/L, TG(2.339±0.918) mmol/L, 均高于正常饲料组大鼠(3.16±0.27) mmol/L, (1.262±0.602) mmol/L。给药 2 周后, 石榴叶鞣质大中小三剂量对 TC 的抑制率分别为 12.34%, 11.81% 和 6.9%, 对 TG 的抑制率分别为 42.84%, 54.55% 和 13.29%。阳性药非诺贝特对 TC 的抑制率为 14.17%, 对 TG 的抑制率为 19.92%。与模型组相比, 大中剂量组活性明显($P < 0.05$)。石榴叶鞣质三剂量组及阳性药对 LDL-C 均无明显作用, 主要原因是模型组 LDL-C 未表现出明显升高, 影响了药物作用的评价, 其原因有待于进一步研究。石榴叶鞣质可以明显降低 VLDL, 对 HDL-C 有一定的升高趋势, 小剂量有明显的作用。其对 TC/HDL-C 的明显降低提示该药可以明显改变胆固醇的构成, 即升高 HDL-C, 降低 VLDL, 这与其明显抑制 TG 的功能可以相互印证。近年来的研究发现, 血浆 TG 越高, TG 由乳糜微粒 CM 和 VLDL 向 HDL 和 LDL 转移越快, 使 LDL 与 HDL 颗粒缩小, LDL 变小、致密, 其致粥样硬化作用变强; 小而密的 HDL 从血流清除较快, 从而将胆固醇从周围组织转运到肝内的保护作用减弱。同时胆固醇量增高的 VLDL 与 CM 残余粒被巨噬细胞摄取而进入动脉壁, 沉着于粥样斑块内, 从而导致动脉粥样硬化^[7]。因此石榴叶鞣质能降低 TC, 升高 HDL, 降低 VLDL 和 TC/HDL, 对于调节脂代谢紊乱具有积极的作用。

表 3 给药后 14 天小鼠 TC, TG, GLU 变化($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分组	剂量 mg/kg	TC mmol/L	抑制率 %	TG mmol/L	GLU mmol/L
模型	—	5.76±1.43	0	2.64±1.28	17.33±6.11
非诺贝特	140	4.75±0.99 ¹⁾	17.55	1.18±0.35 ¹⁾	8.67±3.92 ¹⁾
石榴叶鞣质	300	4.44±0.91 ¹⁾	22.87	1.68±1.04 ¹⁾	6.81±3.39 ¹⁾
石榴叶鞣质	150	5.23±0.79	9.15	2.47±1.64	13.56±12.42
石榴叶鞣质	75	4.83±0.78 ¹⁾	16.11	4.05±1.64	14.89±14.47
正常	—	2.89±0.59 ²⁾	—	1.42±0.59 ¹⁾	7.23±4.4 ¹⁾

表 4 石榴叶鞣质体外对 HMG-CoA 还原酶的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	剂量 1 × g/mL	ΔA ₃₄₀	抑制率 %
对照	—	0.15±0.01	—
石榴叶鞣质	10 ⁻³	0.08±0.01 ²⁾	50.09
石榴叶鞣质	10 ⁻⁴	0.09±0.01 ²⁾	42.87
石榴叶鞣质	10 ⁻⁵	0.11±0.01 ²⁾	28.35
石榴叶鞣质	10 ⁻⁶	0.13±0.01 ¹⁾	15.16
石榴叶鞣质	10 ⁻⁷	0.15±0.00	1.58
辛伐他汀	10 ⁻⁴	0.12±0.01 ¹⁾	17.40
辛伐他汀	10 ⁻⁵	0.14±0.01	7.25

型的作用, 我们在反复预试验的基础上, 以四氧嘧啶糖尿病造模的阈下剂量 80mg/kg(造模剂量为 120 mg/kg) 作为模型诱导剂, 通过不完全性损伤肝和胰岛组织细胞, 使糖代谢紊乱, 进而在此基础上通过喂高脂饲料, 加重脂代谢的紊乱, 造成高血脂小鼠模型。结果表明, 这种高血糖小鼠血脂升高快而明显, 提示糖代谢的紊乱加速了高血脂的形成。给药 14d 后, 模型组血脂仍然停留在较高水平, 此也达到了我们最初的设计, 即以高血糖来加速诱导高血脂的形成。小鼠给药 14d 后, 模型组小鼠 TC 为(5.76±1.43) mmol/L, 明显高于正常组(2.89±0.59) mmol/L, 但各组小鼠 GLU 已恢复正常。石榴叶鞣质大中小三剂量对 TC 的抑制率分别为 22.87%, 9.15% 和 16.11%, 阳性药非诺贝特的抑制率为 17.55%。与模型组相比, 大、小剂量差异有显著性($P < 0.05$)。

体外试验中, 石榴叶鞣质表现出较好的抑制还原酶活性的作用, 其最低有效浓度(MIC) 为 1×10^{-6} g/mL, 抑制率为 15.16%; 辛伐他汀的 MIC 为 1×10^{-4} g/mL, 抑制率为 17.4%。石榴叶鞣质的效价较辛伐他汀强 100 倍($1 \times 10^{-4}/1 \times 10^{-6}$) 左右。同时也提示石榴叶鞣质降低胆固醇的作用部分地与抑制该酶活性有关。

参考文献:

[1] 顾复生. 血脂异常—心血管病防治工作中的重要课题[J]. 中华心血管病杂志, 1997, 25(3): 163-164.

[2] 李定格, 苏传勤, 孙力, 等. 石榴叶调节血脂和清除氧自由基作用的实验研究[J]. 山东中医药大学学报, 1999, 23(5): 380-381.

[3] 李定格, 荆雪梅, 林清义, 等. 石榴叶注射液对脑微循环血流量影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 1998, 9(4): 327-329.

[4] Sun Lihong, Xing Dongming, Sun Hong, et al. Effect of puerarina flavonoid on diabetes in mice complicated by hyperlipidemia[J]. Tsinghua Science and Technology, 2002, 7(4): 369-373.

[5] Dansette PM, Jaouen M, Pons C. HMG-CoA reductase activity in human liver microsomes: compared vastatins inhibitions[J]. Toxicology Letters, 1998, 95(Suppl. 1): 118-122.

[6] Menedez R, Amor AM, Rodeiro I. Policosanol modulates HMG-CoA reductase activity in cultured fibroblast[J]. Archives of Medical Research, 2001, 32(1): 8-12.

[7] 陆宗良. 血脂异常与心血管病危险因素控制[J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29(5): 315-317.

为观察药物对糖代谢紊乱所导致脂代谢紊乱模