

香砂六君子汤对脾虚高脂血症大鼠 dyHDL 的影响

陈丝¹, 贾连群^{2*}, 宋罔², 王健², 陈宁¹, 曹媛², 高云飞², 吕晓明¹
(1. 辽宁中医药大学 研究生学院, 沈阳 110847;
2. 辽宁中医药大学 重大科研平台中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**观察脾虚高脂血症大鼠失功能高密度脂蛋白胆固醇(dyHDL)变化及香砂六君子汤的干预作用,从 HDL “质”的变化,揭示香砂六君子汤对脾虚高脂血症大鼠 dyHDL 的影响及机制。**方法:**75 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为正常组、高脂组、脾虚高脂组、香砂六君子低、高剂量组(5.67,11.34 g·kg⁻¹),脾虚高脂组、香砂六君子低、高剂量组采用饮食不节加力竭游泳的复合方法造模 15 d 后,正常组喂饲基础饲料,高脂组、脾虚高脂组、香砂六君子、高剂量组喂饲高脂饲料。12 周后,香砂六君子低、高剂量组给予相对剂量药物,正常组、高脂组、脾虚高脂组给予相应体积生理盐水。4 周后,全自动生化分析仪检测血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量,间苯三酚法检测大鼠 D-木糖排泄率,苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏细胞形态变化,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血浆对氧磷酶 1(PON1),载脂蛋白 A1(apoA1),血清淀粉样蛋白 A(SAA)含量,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测大鼠肝脏 PON1,apoA1,SAA mRNA 表达水平。**结果:**与正常组比较,高脂组及脾虚高脂组大鼠血清 TC,TG,LDL-C 水平明显升高($P<0.05$),HDL-C 水平明显降低($P<0.05$),高脂组及脾虚高脂组大鼠血浆 PON1,apoA1 含量明显降低($P<0.05$),SAA 含量明显升高($P<0.05$),肝脏组织 SAA mRNA 显著升高($P<0.01$),PON1,apoA1 mRNA 表达显著降低($P<0.01$),高脂组及脾虚高脂组大鼠肝细胞肿大变圆、可见散在的脂肪空泡,且脾虚高脂组大鼠尿 D-木糖排泄率明显降低($P<0.05$)。与高脂组及脾虚高脂组比较,香砂六君子汤低、高剂量组血清 TC,LDL-C 水平明显降低($P<0.05$);HDL-C 水平明显升高($P<0.05$),血浆 PON1,apoA1 含量明显升高($P<0.05$),SAA 含量明显降低($P<0.05$),肝脏组织 SAA mRNA 明显降低($P<0.05$),apoA1 mRNA 表达明显升高($P<0.05$),肝细胞肿胀明显减轻、脂肪泡沫化减少。与高脂组相比,脾虚高脂组大鼠血浆中 PON1,SAA 含量明显降低($P<0.05$),肝细胞肿胀明显、泡沫化加重。**结论:**脾虚状态下高脂血症大鼠脂质紊乱加重,香砂六君子汤干预后紊乱得以纠正,其作用机制可能与调控 dyHDL 相关 mRNA 及蛋白表达有关。

[关键词] 香砂六君子汤;脾虚;膏脂;高脂血症;失功能高密度脂蛋白胆固醇(dyHDL)
[中图分类号] R289;R333.1;R972+6;R256.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)07-0022-07
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190737
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181217.1431.008.html>
[网络出版时间] 2018-12-18 11:11

Effect of Xiangsha Liu Junzitang on dyHDL in Hyperlipidemia Rats with Spleen Deficiency

CHEN Si¹, JIA Lian-qun^{2*}, SONG Nan², WANG Jian², CHEN Ning¹, CAO Yuan²,
GAO Yun-fei², LYU Xiao-ming¹
(1. Graduate School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;
2. Key Laboratory for TCM Viscera-State Theory and Applications of Major Scientific Research Platform Under Ministry of Education, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the changes of dysfunctional high density lipoprotein cholesterol

[收稿日期] 20181030(014)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774022);高层次人才创新计划项目(RC170248)
[第一作者] 陈丝,在读硕士,从事中西医结合防治心血管疾病研究,E-mail:1186426259@qq.com
[通信作者] *贾连群,博士,教授,博士生导师,从事中西医结合防治心血管疾病研究,E-mail:jlq-8@163.com

(dyHDL) and the intervention effect of Xiangsha Liu Junzitang in rats with spleen deficiency and hyperlipidemia, and reveal the effect and mechanism of Xiangsha Liu Junzitang on dyHDL in rats with spleen-deficiency hyperlipidemia. **Method:** Seventy-five SPF SD rats were randomly divided into normal group, high fat group, spleen deficiency and high fat group, Xiangsha Liu Junzitang low and high dose groups (5.67, 11.34 g · kg⁻¹). In the spleen deficiency and high fat group, as well as Xiangsha Liu Junzitang low and high dose groups, composite method of improper diet and exhaustive swimming was used for 15 days for modeling. After modeling for 15 days, normal group was fed with basic diet, while the high-fat group, spleen-deficiency and high-fat group, the Xiangsha Liu Junzitang low and high dose groups were fed with high-fat diet. After 12 weeks, the Xiangsha Liu Junzitang low dose and high dose groups received corresponding dosage of drugs, while normal group, high fat group and spleen deficiency high fat group received corresponding volume of normal saline. After 4 weeks, the contents of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were detected by automatic biochemistry analyzer, while D-xylose excretion rate was measured by phloroglucinol method. The morphological changes of liver cells were observed by hematoxylin eosin (HE) staining. The level of PON1, apoA1 and SAA in plasma were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Paraoxonase 1 (PON1), apolipoprotein A1 (apoA1) and serum amyloid protein A (SAA) gene expression in rats liver were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** As compared with normal group, the serum TC, TG, and LDL-C levels were significantly increased in the high-fat group and spleen-deficiency high-fat group ($P < 0.05$), and HDL-C levels were significantly lower ($P < 0.05$); the levels of PON1 and apoA1 in plasma were decreased ($P < 0.05$), while the content of SAA was increased ($P < 0.05$); the expression of SAA gene in liver tissues was increased ($P < 0.01$), and the expression levels of PON1 and apoA1 genes in liver tissues were significantly decreased ($P < 0.01$). In high-fat group and the spleen-deficiency and high-fat group, the hepatocytes were rounded and scattered, and scattered fat vacuoles were observed. In addition, the urinary D-xylose excretion rate was significantly decreased in the spleen-deficiency and high-fat group ($P < 0.05$). After the intervention with Xiangsha Liu Junzitang, the serum TC, LDL-C levels were significantly decreased ($P < 0.05$); HDL-C levels were significantly increased ($P < 0.05$); plasma PON1, apoA1 levels were increased ($P < 0.05$); the content of SAA was decreased ($P < 0.05$); the expression of SAA gene in liver tissues was decreased ($P < 0.05$); the expression of apoA1 gene was increased significantly ($P < 0.05$). Liver cells swelling was significantly alleviated and fat foaming was reduced. As compared with high-fat group, the plasma PON1 and SAA levels in the spleen-deficiency high-fat group were significantly lower ($P < 0.05$); hepatocyte swelling was obvious and foaming was aggravated. **Conclusion:** The lipid disorder in hyperlipidemia rats was aggravated by the spleen deficiency, but was corrected after intervention with Xiangsha Liu Junzitang. and its mechanism may be related to the regulation of the expression of dyHDL-related genes and protein.

[**Key words**] Xiangsha Liu Junzitang; spleen deficiency; grease; hyperlipidemia; dysfunctional high density lipoprotein cholesterol (dyHDL)

高脂血症是脂质代谢紊乱或转运异常引起的一种临床常见疾病,表现为血浆或血清中某种或多种脂质含量超过正常限值,多以总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)高于正常值和(或)高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)低于正常值为主要特征,是心脑血管疾病独立危险因素之一^[1-2]。随着社会生活水平的不断提高,高脂饮食的摄入量大多超过机体正常需求量,过盛的脂质

摄入,有碍机体的正常代谢过程,最终将作为致病因素诱发疾病的发生。中医认为脾虚则游溢精气,散精失常,进而膏脂输布转化异常,聚而成脂浊,引起血脂升高^[3]。课题组前期研究发现,脾虚状态可引起高脂血症大鼠血脂紊乱及肝脏脂质沉积^[4]。基于上述病机,课题组采用健脾降浊法加以治疗,选用《古今名医方论·卷一》中具有益气健脾、理气和胃之香砂六君子汤,以补脾益气之党参为主药,配伍

白术、茯苓、炙甘草共达益气健脾之功,陈皮、木香、法半夏、砂仁行气化湿、燥湿化痰,诸药合用,可益气健脾、化湿降浊,尤善治疗脾胃虚弱所致的各种疾病^[5-7]。相关研究发现,血清中 HDL-C 是保护心脑血管疾病的主要因素之一,其保护机制与介导胆固醇逆向转运(RCT),抗氧化及抗炎症等功能密切相关^[8]。而 RCT 是维持机体正常脂质代谢过程的重要环节之一,其功能正常与否将影响高脂血症的发生发展^[9]。因此,本研究通过观察香砂六君子汤调控脾虚高脂血症大鼠失功能高密度脂蛋白胆固醇(dyHDL)的角度,探讨香砂六君子汤与改善脾虚高脂大鼠高脂状态的关系。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 75 只,体质量(190 ± 20) g,由辽宁长生生物科技股份有限公司提供,动物合格证号 SCXK(辽)2015-0001。饲养于辽宁中医药大学实验动物中心,实验单位许可证号 SYXK(辽)2013-0009,室内温度 18 ~ 22 ℃,湿度 40% ~ 70%,单笼饲养,每天 12 h/12 h 昼夜明暗交替。动物实验符合辽宁中医药大学实验动物伦理委员会标准,审查编号 21006092017056。

1.2 药物 香砂六君子汤由木香 6 g,砂仁 3 g,党参片 12 g,茯苓 12 g,白术 12 g,法半夏 6 g,陈皮 6 g,炙甘草 6 g 组成,以上中药饮片均购于辽宁中医药大学附属医院,由辽宁中医药大学附属医院中药实验中心副主任中药师于艳鉴定,符合 2015 年版《中国药典》的要求。方药浸泡 1 h 后,武火煮沸,文火煮 20 min,过滤,重复煎 3 次,合并滤液,浓缩至含生药 0.57 g·mL⁻¹和 1.14 g·mL⁻¹,煎剂冷却后 4 ℃ 保存。

1.3 试剂 CHOD-PAP 法 TC, TG, 直接法 LDL-C, HDL-C 测定试剂盒(四川迈新生物技术有限公司,批号分别为 CH0103152, CH0105151, CH0105162, CH0105161);苏木精-伊红(HE)染色液(碧云天生物技术有限公司,批号 C0105);D-木糖间苯三酚法试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 A035);实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒,trizol(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 DRR047A, DRR820A);大鼠氧磷酶 1(PON1),载脂蛋白 A1(apoA1),血清淀粉样蛋白 A(SAA)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 ml059548, ml059547, ml059546);PCR 引物由 Premier 5.0 软件设计, PON1 上游 5'-CTCCACTTGTCCATCCTTCAGT-3',下游 5'-ACCCG

CTTCGATTCCTTTAACT-3',扩增片段长度为 195 bp; SAA 上游 5'-ACCAAGTTACTGGACCCCCT-3',下游 5'-CTGAAGGCTGTTTTCGAGGA-3'扩增片段长度为 180 bp; apoA1 上游 5'-AGGGTGAAGGATTTCC CCAC-3',下游 5'-CTGTTCTGTAGGCCGA CCAA-3',扩增片段长度为 162 bp;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游 5'-AAGGGTGGGGAC AAGACAGT-3',下游 5'-AAGTTGTCCGAGGT GCTAA-3',扩增片段长度为 158 bp。引物序列均由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

1.4 仪器 SHZ-88 型水浴恒温振荡器(其林贝尔仪器制造有限公司);MULTISKAN FC 型酶标仪,ST 16R 型冷冻高速离心机(德国 Thermo 公司);BioSpec-nano 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);7500 型 Real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);TAB-120FR 型全自动生化分析仪(日本东芝公司);DM IL LED 型普通光学显微镜,ASP 6025 型全自动脱水机,RM2235 型手动石蜡切片机,EG 1150H 型包埋机,HI1220 型烘片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 SD 大鼠适应性喂养 2 周后,随机分为正常组,高脂组,脾虚高脂组,香砂六君子汤低、高剂量组,脾虚高脂组,香砂六君子汤低、高剂量组大鼠采用自由饮食加力竭游泳的复合方法(饱食 1 d,禁食 2 d,自由饮水)造模^[10-11],根据《中医脾虚大鼠证候动物模型评价系统软件研究》《脾虚证动物模型的客观评估》对大鼠脾虚证进行评估,当大鼠出现游泳耐力下降、体质量减轻、食量减少、粪便时软时溏、倦怠懒动、毛色枯槁无光泽等表现时,证明脾虚模型造模成功^[12-13]。15 d 后,正常组喂饲基础饲料,高脂组,脾虚高脂组及香砂六君子汤低、高剂量组喂饲高脂饲料(配方:10% 猪油,1% 胆固醇,0.5% 胆酸钠,0.2% 甲基硫氧嘧啶,5% 蔗糖,加 83.3% 普通饲料)^[14]。造模成功后,灌胃给药,给药剂量按人和动物体表面积折算系数换算,香砂六君子汤低、高剂量组分别给予香砂六君子汤方药,给药剂量分别为 5.67,11.34 g·kg⁻¹(以生药量计算)^[15],正常组、高脂组及脾虚高脂组给予相应体积的生理盐水。

2.2 全自动生化分析仪检测血清 TC, TG, LDL-C, HDL-C 含量 取材前一晚,大鼠禁食不禁水,取材当天 10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心 30 min 取血清, - 20 ℃ 保存

备用。按生化试剂盒说明书和仪器操作流程将检测试剂和待检测样本分别加入仪器试剂瓶和待测样本区中,进行检测。

2.3 ELISA 检测血浆中 PON1, apoA1, SAA 含量
3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 取血浆,按 ELISA 试剂盒说明分别检测血浆 PON1, apoA1, SAA 含量。将不同浓度的标准品依次加入酶标板孔内,每孔 50 μL。再将大鼠血浆 10 μL 和标准品稀释液 40 μL 加入酶标板孔内配成 50 μL 体系,加酶标试剂 100 μL 后 37 ℃ 温育 60 min,洗涤 5 次后,加入显色试剂(A-B 1:1)100 μL,避光后 37 ℃ 显色 15 min,再分别加入 50 μL 终止液,450 nm 波长测各孔吸光度 *A*。

2.4 间苯三酚法测定 *D*-木糖排泄率 实验前每只大鼠灌胃 5% *D*-木糖溶液 5 mL,禁食不禁水,5 h 后收集尿液并记录尿量,取尿液 5 μL 与双蒸水 45 μL 稀释,按 *D*-木糖试剂盒说明书操作,分别配制试剂空白管,测定空白管,标准管及测定管,加样结束后混合,置于 100 ℃ 沸水中煮沸 4 min,放于冷水中冷却,554 nm 下测各管 *A* 并计算其对应 *D*-木糖排泄率。

2.5 肝脏组织病理形态学观察 将肝脏置于 4% 多聚甲醛 24 h 以上,乙醇梯度脱水,包埋,石蜡切片,片厚为 5 μm,放于蒸馏水中 2 min 后,HE 染液染色 5 min,浸于自来水中洗涤 10 min,再用蒸馏水洗涤 1 次,95% 乙醇脱水 2 min 重复洗 2 次,二甲苯

透明 5 min 重复洗 2 次,用中性树胶封片。

2.6 Real-time PCR 检测肝脏 PON1, SAA, apoA1 mRNA 水平 trizol 裂解肝脏组织,提取总 RNA,逆转录成 cDNA,设定 PCR 反应条件:95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环。用 SYBR Green Mater Mix 试剂检测 mRNA 水平,重复 3 次。用 $\Delta\Delta C_t$ 法对 Real-time PCR 结果进行定量分析, ΔC_t 值为目的 mRNA C_t 值与内参 mRNA C_t 值的差值, $\Delta\Delta C_t$ 为各用药组 ΔC_t 与空白组 ΔC_t 的差值,平均相对含量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

2.7 统计学方法 应用 SPSS 16.0 统计软件分析,数据类型属于计量资料,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey's 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血脂及 *D*-木糖排泄率结果 与正常组比较,高脂组和脾虚高脂组大鼠血清 TC, TG, LDL-C 明显升高($P < 0.05$),HDL-C 显著降低($P < 0.01$),且脾虚高脂组大鼠血脂变化幅度明显大于高脂组,但无统计学差异,脾虚高脂组大鼠尿 *D*-木糖排泄率显著降低($P < 0.01$),高脂组大鼠尿 *D*-木糖排泄率较正常组比较差异无统计学意义;与脾虚高脂组比较,香砂六君子汤低、高剂量组大鼠血清 TC, LDL-C 明显降低($P < 0.05$),HDL-C 显著升高($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 香砂六君子汤对大鼠血清 TC, TG, LDL-C, HDL-C 含量及 *D*-木糖排泄率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on TC, TG, LDL-C, HDL-C levels and *D*-xylose excretion rate in rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

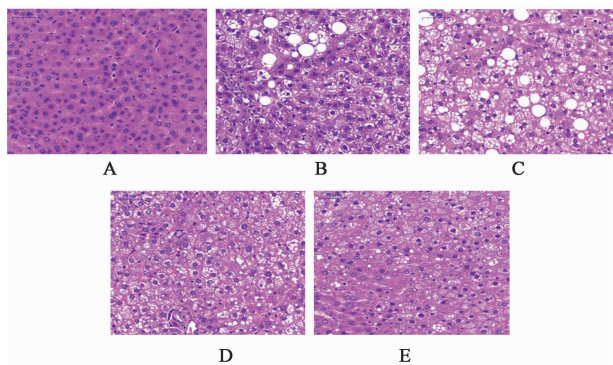
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TC /mmol·L ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹	LDL-C /mmol·L ⁻¹	HDL-C /mmol·L ⁻¹	<i>D</i> -木糖排泄 /%
正常	—	1.38 ± 0.21	0.48 ± 0.18	0.53 ± 0.17	1.15 ± 0.18	29.32 ± 2.18
高脂	—	1.78 ± 0.34 ¹⁾	0.72 ± 0.23 ¹⁾	1.02 ± 0.35 ²⁾	0.75 ± 0.21 ²⁾	22.44 ± 4.66
脾虚高脂	—	1.82 ± 0.33 ¹⁾	0.75 ± 0.16 ¹⁾	1.14 ± 0.27 ²⁾	0.72 ± 0.26 ²⁾	19.01 ± 6.63 ²⁾
香砂六君子汤	5.67	1.41 ± 0.26 ⁵⁾	0.53 ± 0.15	0.55 ± 0.14 ^{4,6)}	1.13 ± 0.25 ^{3,6)}	26.08 ± 4.57
	11.34	1.40 ± 0.18 ⁵⁾	0.52 ± 0.11	0.57 ± 0.19 ^{4,6)}	1.14 ± 0.23 ^{3,6)}	27.02 ± 7.91 ⁵⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与高脂组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与脾虚高脂组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 对各组大鼠肝脏组织病理形态学的影响 正常组肝细胞核圆、大而居中,细胞索条理清晰,肝窦正常;与正常组比较,高脂组和脾虚高脂组肝细胞肿大变圆,脂肪空泡明显,肝细胞形态异常,细胞浆疏松,部分细胞核挤向胞膜,且与高脂组比较,脾虚高脂组大鼠肝脏细胞脂肪空泡明显增多,肝细胞异常明显;香砂六君子汤干预后大鼠肝脏细胞脂肪空泡

显著减少,肝细胞肿胀减轻,细胞排列整齐清晰,胞核正常。见图 1。

3.3 对大鼠血浆 PON1, apoA1, SAA 含量的影响 与正常组比较,高脂组和脾虚高脂组大鼠血浆 SAA 含量显著升高($P < 0.01$),PON1, apoA1 含量显著降低($P < 0.01$),且脾虚高脂组大鼠血浆 PON1, SAA 含量明显低于高脂组($P < 0.05$);与脾虚高脂组



A. 正常组;B. 高脂组;C. 脾虚高脂组;D. 香砂六君子汤低剂量组;
E. 香砂六君子汤高剂量组

图1 香砂六君子汤对脾虚高脂血症大鼠肝脏病理形态的影响
(HE, ×200)

Fig.1 Effect of Xiangsha Liu Junzitang on liver pathology in rats
with spleen deficiency and hyperlipidemia (HE, ×200)

表 2 香砂六君子汤对大鼠血浆 PON1,apoA1,SAA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	PON1/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	apoA1/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	SAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	—	10.66 ± 0.21	1.47 ± 0.18	1.56 ± 0.11
高脂	—	10.12 ± 0.25 ²⁾	1.22 ± 0.09 ²⁾	2.01 ± 0.15 ²⁾
脾虚高脂	—	9.66 ± 0.10 ^{2,4)}	1.14 ± 0.10 ²⁾	1.83 ± 0.16 ^{2,3)}
香砂六君子汤	5.67	10.16 ± 0.34 ^{2,6)}	1.37 ± 0.07 ⁶⁾	1.60 ± 0.08 ^{4,6)}
	11.34	10.45 ± 0.13 ^{3,6)}	1.41 ± 0.09 ^{3,6)}	1.59 ± 0.08 ^{4,6)}

表 3 香砂六君子汤对肝脏 PON1,SAA,apoA1 mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	PON1	apoA1	SAA
正常	—	1	1	1
高脂	—	0.78 ± 0.09 ²⁾	0.62 ± 0.08 ²⁾	1.47 ± 0.13 ²⁾
脾虚高脂	—	0.73 ± 0.14 ²⁾	0.54 ± 0.12 ²⁾	1.53 ± 0.29 ²⁾
香砂六君子汤	5.67	0.81 ± 0.14 ¹⁾	0.81 ± 0.09 ^{2,4,6)}	1.19 ± 0.24 ⁵⁾
	11.34	0.88 ± 0.08	0.82 ± 0.09 ^{2,4,6)}	1.15 ± 0.34 ⁵⁾

归属于膏脂,生理性膏脂是人体正常津液的重要组成部分,可充养五脏六腑、四肢百骸。而病理性膏脂多由于先天禀赋、饮食失调、劳逸失常等情况导致而成,病理性膏脂长期存在可导致多种疾病的发生^[16]。中医认为膏脂源于中焦,由脾胃运化的水谷精微所化生,类属津液^[17]。脾失健运及中焦气机失调均可导致津液失于输布,则津无以灌四旁、滋润濡养筋脉关节,则化痰、化饮壅滞筋津皮部、经脉关节、留滞营中,则发为高脂血症^[18]。课题组前期研究发现,脾失健运为高脂血症的关键病因^[19],脾虚引发高脂血症的机制研究尚不完全清楚。香砂六君子汤以四君子汤为主方,四君子汤为气分之总方,对脾虚功能失常有较好的纠正作用,在此基础上增加陈皮

比较,香砂六君子汤低、高剂量组大鼠血浆 SAA 含量明显降低($P < 0.01$),PON1,apoA1 含量显著升高($P < 0.01$)。见表 2。

3.4 对大鼠肝脏 PON1,SAA,apoA1 mRNA 水平的影响 与正常组比较,高脂组和脾虚高脂组大鼠肝脏 PON1,apoA1 mRNA 水平显著下降($P < 0.01$),SAA mRNA 水平显著上升($P < 0.01$);与脾虚高脂组比较,香砂六君子汤低、高剂量组大鼠肝脏 apoA1 mRNA 水平显著上升($P < 0.01$),SAA mRNA 水平明显下降($P < 0.05$)。见表 3。

4 讨论

《黄帝内经·灵枢集注》云:“中焦之气,蒸津液化,其精微溢于外则皮肉膏肥,余于内则膏脂丰满。”中医根据高脂血症的发病机制及特点,将其

理气健脾化痰,木香、砂仁行气化湿止痛,共奏益气化痰、行气温中,使生理性膏脂得以输布、病理性膏脂生化无源。

HDL 是血液中一种密度组成、颗粒大小及功能极不均一的脂蛋白,功能性 HDL 参与 RCT,抗氧化,抗炎症,内皮细胞修复和抗血栓形成等过程^[20-21]。当机体受到环境、营养、糖尿病、吸烟等因素诱导时,将引发 HDL 失功能^[22]。研究发现,dyHDL 可阻碍 apoA1 促进 ATP 结合盒转运体 A1(ABCA1)所介导的 RCT 过程^[23]。RCT 作为胆固醇主要代谢途径之一,可将胆固醇由外周转移至肝脏进行再利用和代谢,当其过程受到抑制时,胆固醇再利用和代谢水平降低,而机体内胆固醇水平升高,进而加剧机体脂质

代谢紊乱,诱发或加重高脂血症的发生发展。apoA1 作为 RCT 功能的主体,其表达水平可间接反映 RCT 水平^[24],此外,apoA1 还是 HDL 抗氧化活性的主要成分^[25],可与 HDL 主要的抗氧化酶 PON1 结合^[26],起到防止氧化脂质积累的作用^[27]。PON1 是肝脏合成的,存在于高密度脂蛋白中的一种抗氧化性功能蛋白^[28],是维持 HDL 结构完整性及功能的重要结构基础。同时,HDL 对促进 PON1 的分泌及提供 PON1 功能所需的疏水环境有着重要的意义,由此可见,PON1 与 HDL 有密切的生理联系。就抗炎反应方面而言,SAA 作为炎症最敏感标志物之一,在血浆中可替代 apoA1 与 HDL-C 结合,继而影响 HDL-C 功能^[24],此外,SAA 还可通过置换 HDL 上的 apoA1 抑制卵磷脂胆固醇酰基转移酶活性,继而抑制胆固醇逆向转运^[25]。可见,高表达 SAA 可能是导致 HDL 失功能的主要原因之一。

本实验结果显示,与正常组比较,高脂组和脾虚高脂组大鼠血脂异常明显,肝细胞泡沫化严重,且脾虚高脂组大鼠结果较高脂组更严重。此外,脾虚高脂组大鼠尿 D-木糖排泄率明显低于正常组,D-木糖排泄率降低是脾虚证的主要指标之一^[29],因此说明脾虚高脂血症大鼠模型造模成功。ELISA 结果显示,与正常组比较,高脂组和脾虚高脂组大鼠血浆 apoA1,PON1 表达水平显著降低,SAA 表达显著升高,且脾虚高脂组血浆 apoA1,SAA 含量明显低于高脂组,说明脾虚条件对高脂血症大鼠 HDL 功能相关的 RCT 过程有一定的抑制作用,而对 HDL 功能相关的抗氧化过程有一定的缓解作用。Real-time PCR 结果可知,与正常组比较,高脂组和脾虚高脂组 apoA1,PON1 mRNA 表达水平显著降低,SAA 表达显著升高,且脾虚高脂组 HDL 功能相关 mRNA 表达降低较为明显,说明脾虚高脂血症大鼠血浆中 HDL 功能明显降低,而香砂六君子汤干预后,大鼠肝脏 apoA1,PON1 mRNA 表达显著升高,SAA mRNA 表达显著降低,说明香砂六君子汤可纠正 HDL 失功能状态进而改善高脂血症疾病状态。且根据药物作用效果来看,香砂六君子汤不同剂量未见明显量效关系。因而本实验得出,香砂六君子汤可能通过调控脾虚高脂血症大鼠 dyHDL 进而改善其高脂状态,且不同剂量香砂六君子汤的作用效果无显著性差别。

[参考文献]

[1] 朱美林,贾连群,杨关林,等. 脾虚状态对高脂血症大

鼠肝脏胆固醇代谢的影响及机制研究[J]. 中华中医药杂志,2015,30(8):2712-2716.

[2] 黄珮,郭姣,朴胜华. 高脂血症中医证候实质研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(9):1904-1907.

[3] 李维娜,冯玲. 高脂血症从脾论治探幽[J]. 世界中西医结合杂志,2017,12(4):577-580.

[4] 朱美林. 脾虚状态对高脂血症大鼠肝脏脂质沉积的影响及机制研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2016.

[5] 吕美君,贾连群,王志丹,等. 香砂六君子汤的文献分析研究[J]. 中华中医药学刊,2016,34(7):1620-1623.

[6] 奚锦要,朱永钦,朱永苹,等. 香砂六君子汤联合针刺疗法治疗功能性消化不良临床疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(20):157-162.

[7] 黎豫川,贾波,彭腾,等. 香砂六君子汤水煎液乙酸乙酯部位化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(20):112-114.

[8] 尔璐,边云飞,宋晓苏,等. 失功能高密度脂蛋白与心血管疾病研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2017,25(3):309-313.

[9] 王静,林晶晶,沈涛. 高脂血症的现代医学研究[J]. 山西医药杂志,2015,44(19):2243-2245.

[10] 郑小伟. 中医实验动物模型方法学[M]. 上海:上海中医学院出版社,1999:63-111.

[11] 姜晓琳,张立德. 脾气虚证模型大鼠中 BNP 介导的 cAMP-PKA 信号通路对 bFGF 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(2):251-255.

[12] 陈雷,李海权. 中医脾虚大鼠证候动物模型评价系统软件研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(2):370-371.

[13] 王晓明,易杰,廖世新,等. 脾虚证动物模型的客观评估[J]. 中华中医药杂志,2006,21(7):406-408.

[14] 黄永艳. 化痰活血方对高脂血症大鼠调脂作用的机制研究[D]. 武汉:湖北中医学院,2006.

[15] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1994:205-208.

[16] 贾连群,杨关林,张哲,等. 从“脾主运化”理论探讨膏脂传输与胆固醇逆向转运[J]. 中医杂志,2013,54(20):1793-1795.

[17] 林巧云. 周仲瑛教授从“痰瘀”辨治高脂血症的临床经验及学术思想研究[D]. 南京:南京中医药大学,2017.

[18] 杨胜兰. 高脂血症的基本病机探讨[J]. 中医杂志,2005,46(11):861-863.

[19] 贾连群,宋囡,张妮,等. 基于“脾主运化”理论探讨肠道微生物稳态与膏脂传输的关系[J]. 中医杂志,2017,58(18):1554-1557.

[20] 李娜,龙石银,陈志军,等. 代谢综合征患者血浆甘油

三酯水平对 HDL 亚类分布的影响[J]. 中国动脉硬化杂志,2015,23(3):285-289.

[21] 翟振丽,马维红,李全忠,等. 高密度脂蛋白功能差异与动脉粥样硬化的研究进展[J]. 实用医学杂志,2013,29(21):3608-3609.

[22] 尔璐,边云飞,宋晓苏,等. 失功能高密度脂蛋白与心血管疾病研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2017,25(3):309-313.

[23] 应如,秦亚飞,郭志刚,等. 失功能高密度脂蛋白致动脉粥样硬化的研究进展[J]. 广东医学,2012,33(11):1671-1673.

[24] 闫丽荣. 冠心病患者血浆 HDL 组分中 apoC-Ⅰ, SAA 水平变化及 SAA mRNA 多态性研究[D]. 北京:北京协和医学院,2014.

[25] 王子熹. 吸烟对高密度脂蛋白功能的影响[D]. 北京:北京协和医学院,2009.

[26] 田迪,秦亚飞,应如,等. 辛伐他汀对 ApoE^{-/-} 小鼠 HDL 抗炎抗氧化功能的影响[J]. 解放军医学杂志,2013,38(3):195-200.

[27] Bounafaa A, Berrougui H, Ikhlef S, et al. Alteration of HDL functionality and PON1 activities in acute coronary syndrome patients [J]. Clin Biochem, 2014, 47 (18): 318-325.

[28] 曾宪钦,胡雪松. 血清 PON1 活性与冠状动脉粥样硬化研究新进展[J]. 中国实用医药,2008,3(12):179-181.

[29] 黄辰,李瑛,赵妍,等. 脾虚证动物模型评价方法评述[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(2):433-437,447.

[责任编辑 孙丛丛]