

· 论著 ·

## 对羟基苯乙酮对正常大鼠胆汁分泌及高脂血症的影响

邓轶方<sup>1</sup>, 于鹏霞<sup>1</sup>, 黄晓玲<sup>1</sup>, 贺兴冬<sup>1</sup>, 殷明<sup>2</sup>, 刘珉宇<sup>1</sup> (1. 中国医药工业研究总院, 上海 201203; 2. 上海交通大学药学院, 上海 200240)

**[摘要]** **目的** 研究对羟基苯乙酮(PHA)促胆汁分泌和降血脂作用以及初步作用机制。**方法** 正常SD大鼠行胆管插管术,收集给药前30 min和给药后3 h分泌的胆汁,测定胆汁单位时间内的分泌量和胆汁成分;建立大鼠高脂血症模型,观察PHA的降胆固醇作用;制备正常大鼠可溶性HMG-CoA还原酶,测定PHA对HMG-CoA还原酶活性的影响;对大鼠高胆固醇血症实验中得到的动物肝脏样本,进行Real-time PCR试验。**结果** PHA可以增加实验大鼠胆汁和胆汁酸的分泌量;同时能够显著降低高胆固醇血症大鼠的胆固醇水平,具有调血脂作用;初步的作用机制研究显示,PHA抑制HMG-CoA还原酶活性的作用较弱,但可以促进影响胆汁酸外排及胆固醇转化的AQP8、CYP7A1、OATP、NTCP等基因的转录。**结论** PHA作为茵陈中一种有效的单体化合物,可用于促进胆汁分泌、调节血脂代谢药物的研发。

**[关键词]** 对羟基苯乙酮;茵陈;利胆;胆固醇

**[中图分类号]** R972.6;R975.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2016)06-0507-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.06.007

## Effects of p-hydroxyacetophenone on bile secretion and blood lipid levels in rats

DENG Yifang<sup>1</sup>, YU Pengxia<sup>1</sup>, HUANG Xiaoling<sup>1</sup>, HE Xingdong<sup>1</sup>, YIN Ming<sup>2</sup>, LIU Minyu<sup>1</sup> (1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203 China; 2. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effects and mechanism of p-hydroxyacetophenone (PHA) on bile secretion, cholesterol metabolism and blood lipids. **Methods** Cystic duct cannula was cannulated and bile were collected in SD rats. PHA was administrated in the high cholesterol rats. The activity of HMG-CoA reductase was determined by spectrophotometry in reaction system. Samples of liver were obtained in experiment hypercholesterolemia rats and Real-time PCR test was conducted for AQP8, CYP7A1, OATP and NTCP. **Results** Secretion of bile were increased, cholesterol in bile were reduced and secretion of total bile acid were increased in rats by PHA. The level of serum cholesterol in hyperglycemia rat model was reduced significantly and inhibitory ability had been limited in the activity of HMG-CoA reeducates by PHA, but the gene transcription including AQP8, CYP7A1, OATP, and NTCP were promoted, which are related to function of excretion of biliary acid and transformation of cholesterol. **Conclusion** These results suggest that PHA, as a lead compound, might be of significance for further development for a bile secretory and lipid lowering agent.

**[Key words]** p-hydroxyacetophenone(PHA); artemisiae capillaries; choleric; cholesterol

茵陈是我国传统中药之一,具有清湿热、退黄疸的功效,用于治疗黄疸尿少、湿疮瘙痒、传染性黄疸型肝炎<sup>[1]</sup>。多年来国内外的实践经验已经证明,从具有显著疗效或积累了民间应用经验的药用植物中分离、提取有效成分,对促进传统中药的开发具有重要意义。我们分离、提取出茵陈中主要活性成分之一的对羟基苯乙酮(p-hydroxyacetophenone,

PHA),研究其利胆、降血脂作用,并对其作用机制进行初步探讨。

### 1 材料与方法

**1.1 药物与试剂** 对羟基苯乙酮(PHA,纯度>98%,Fluka)结构式见图1;熊去氧胆酸片(UDCA,上海三维长江生化制药厂);辛伐他汀片(Sim,杭州默沙东制药有限公司);猪油(市售);胆固醇(国药集团化学试剂有限公司);丙硫氧嘧啶片(上海复星朝晖药业有限公司);吐温-80(上海申宇医药化工有限公司);1,2-丙二醇(国药集团化学试剂有限公司);脱氧胆酸钠(国药集团化学试剂有限

**[作者简介]** 邓轶方,博士研究生,助理研究员,研究方向:降血脂药物的研发.E-mail:squaerfang8403@sina.com

**[通讯作者]** 刘珉宇,博士,研究方向:新药药理研究.E-mail:lium-inmyu\_lm@163.com

公司);RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent (Invitrogen);引物合成(上海生工生物技术有限公司)。

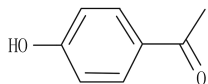


图1 对羟基苯乙酮(PHA)的化学结构

**1.2 实验动物** SD大鼠(上海斯莱克实验动物责任有限公司),雄性,体重200~250 g。

**1.3 仪器** YP2001N电子天平(上海精密科学仪器有限公司);自动生化分析仪7080(日本,日立);ABI Prisma 7000 荧光定量PCR仪(美国,PE)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 胆汁分泌实验** SD大鼠50只,随机分为5组:空白对照组、熊去氧胆酸组(UDCA, 100 mg/kg)、PHA低剂量组(L, 75 mg/kg)、中剂量组(M, 150 mg/kg)和高剂量组(H, 300 mg/kg)。用司可巴比妥钠麻醉大鼠,收集30 min的大鼠胆汁作为自身对照,然后各组大鼠分别给予相应药物灌胃,空白对照组给予空白溶剂。给药后每隔30 min收集一次胆汁,共收集3 h,计算得到的胆汁流量。并测定胆汁中胆固醇(CHO)及总胆汁酸(TBA)的含量。

**1.4.2 高血脂实验** 脂肪乳剂的制备:取猪油25 g,加热融化后,加入10 g胆固醇,再加入1 g丙

硫氧嘧啶以及25 ml吐温-80,充分搅匀,制成油相。同时在另一烧杯中加入30 ml蒸馏水和1,2-丙二醇20 ml,加热至60℃,加入2 g脱氧胆酸钠,搅拌直至完全溶解,制成水相。将水相加入油相,充分混匀,即得脂肪乳剂。

实验动物分组:大鼠70只,随机分为7组,除空白对照组外,其余动物每天上午灌胃脂肪乳,10 ml/kg,连续灌胃5周,制备高血脂大鼠模型。造模2周后,除模型组外,其余各组每天下午给药:辛伐他汀组(Sim, 10 mg/kg)、熊去氧胆酸组(UDCA, 40 mg/kg)、PHA高剂量组(H, 300 mg/kg)、中剂量组(M, 150 mg/kg)和低剂量组(L, 75 mg/kg)。

连续给药21 d,眼眶采血测定血清CHO、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)和高密度脂蛋白(HDL-C),并取肝脏,进行病理学检查。

**1.4.3 HMG-CoA还原酶体外抑制实验** 从大鼠肝中制备微粒体,将微粒体HMG-CoA还原酶增溶,移出含溶解还原酶的上层清液。蛋白纯化,经盐析、热处理、酶浓度定量,最后用分光光度法进行HMG-CoA还原酶的活力测定。

**1.4.4 初步机制研究** 抽提给予PHA的高血脂大鼠肝脏的总RNA,采用RT-PCR的方法观察相关基因表达的变化(表1)。

表1 相关基因及引物

基因名称	上游引物	下游引物
HMGCR(HMG-CoA还原酶)	TAAAGGAGGCCTTCGACAGCA	CGTTTTGGACTGGAGACGGAT
BSEP	TATCGGCTGGTTCGATGACCT	AGCAAGCCCGCAATGATGT
NTCP	CCCTAATGGCCTGAATTCTGG	ATGGTTTTGCCGAAGTGCT
OATP	CAAGGTCCTTGCTGACTGCAA	CGCAAGGCAAGCTGACATGTA
MRP2	TGGTGGATAGCGCCAATGT	AGGATCGATGAGGTCACCATG
CYP7A1	TTCTTGTGCGGTGATGGTTG	AAAATGTGCCCTTCCCTCCAA
AQP8	ACTCCTTTGTGCCCATGGACT	ATGCCCTGCCCTTTCTCAA
ABCG5	CGCTGTGAACCTCTTTCCCAT	GCTGAAAATCACCGTGCCAA
ABCG8	AATGGTTCATGCTGTGTGCGA	CATCACTCCCAGCCTCAAACA
GAPDH	TCCTGCACCACCAACTGCTTAG	AGTGGCAGTGATGGCATGGACT

**1.5 数据统计** 胆汁实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间实验数据比较采用t检验。

## 2 实验结果

**2.1 利胆实验结果** 与空白对照组比较,PHA低、中、高各组给药后大鼠胆汁分泌量均有显著增加,且呈剂量依赖关系。PHA(M)组与(H)组给药30 min后,其胆汁分泌量与空白对照组相比有统计学差异( $P < 0.05$ ),至实验末,PHA各剂量组均与空白对

照组有显著差异( $P < 0.01$ )。UDCA组胆汁分泌量虽无明显增加,但其下降幅度平缓,与自身对照(即给药前30 min的胆汁分泌量)比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各剂量PHA组的累积胆汁分泌量均明显高于空白对照组和UDCA组(图2)。

从对胆固醇的影响可以看出,所有给药动物的胆固醇水平均出现先大幅下降、后逐渐恢复的变化趋势。UDCA组与空白对照组胆固醇浓度变化相似,两者无统计学差异。相比之下,PHA组所有动

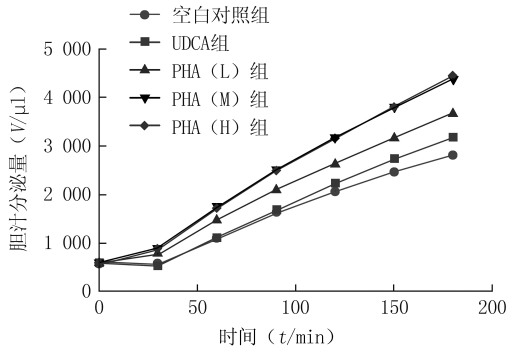


图2 PHA对大鼠累积胆汁分泌量的影响

物在给药后胆固醇浓度明显降低, PHA(L)组在给药后 90 min 与空白对照组以及自身对比较, 均存在差异 ( $P < 0.05$ ), 至试验末与空白对照组比较仍有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); M 组与自身对照及空白

对照组比较, 在整个试验过程中均有显著差异 ( $P < 0.01$ ); H 组与 M 组情况相似。与自身对照比较, PHA 各组在给药 1 h 内使得大鼠胆固醇水平降低 50% 以上。

各剂量 PHA 对实验大鼠 TBA 浓度的影响, 与空白对照组比较, 无显著差异; 但各剂量 PHA 组胆汁酸分泌量的增加高于空白对照组。

在整个试验过程中, PHA 各组的胆固醇累积分泌量低于空白对照组, PHA(H)组与空白对照组比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 而胆汁酸累积分泌量高于空白对照组, 但无统计学差异(图3)。

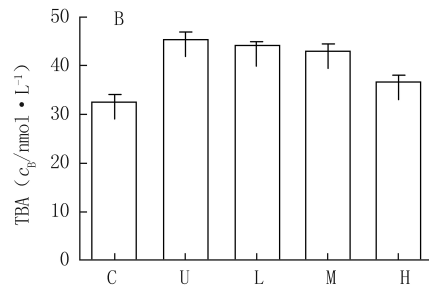
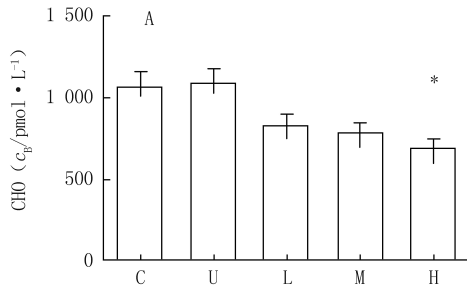


图3 给药3h PHA对大鼠CHO(A)、TBA(B)累积分泌量的影响

\*  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; C: 空白对照组; U: UDCA组; L: PHA(L)组; M: PHA(M)组; H: PHA(H)组

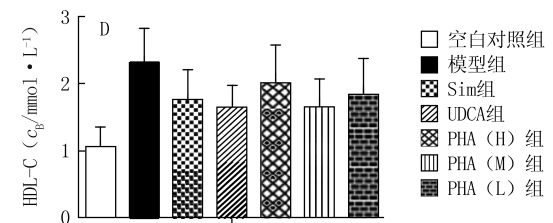
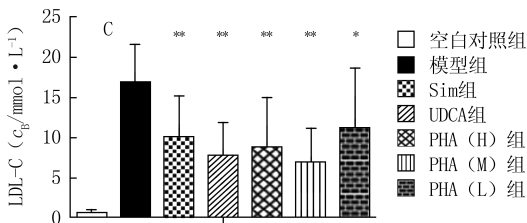
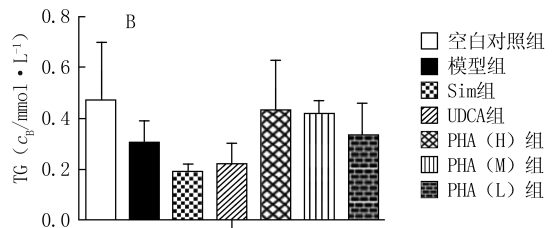
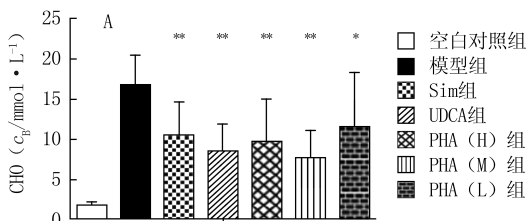


图4 给药3周后大鼠的CHO(A)、TG(B)、LDL-C(C)、HDL-C(D)水平

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与模型组比较

造模高血脂大鼠的肝脏病理学变化, 在光镜( $\times 200$ )下结果如图5所示, 空白对照组大鼠肝脏肝小叶结构正常, 肝细胞索排列正常, 在中央静脉周围呈放射状分布, 细胞呈多边形。模型组出现散在片状脂肪变性, 以肝小叶中央静脉为主, 胞内呈空泡样,

细胞核偏移; 可见肝细胞水样变性, 偶见肝细胞点状坏死; 肝细胞索排列紊乱; 门管区未见胆汁淤积, 偶见炎性细胞浸润。Sim 组与 UDCA 组可见轻度脂肪病变, 肝细胞肿胀不明显, 胞质内有细小脂滴, 偶见肝细胞坏死及炎性细胞。PHA 各剂量组肝细胞

轻度脂肪变性,细胞结构完整,偶见胞浆内细小脂

滴,未见肝细胞坏死及炎性细胞。

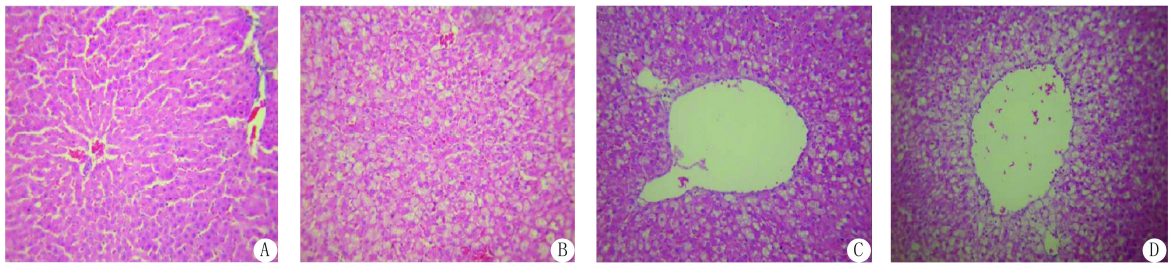


图5 高血脂大鼠肝脏病理学切片图(HE染色,×200)

1.空白对照组;2.模型组;3.Sim组;4.PHA组

### 2.3 HMG-CoA 还原酶体外抑制实验结果 化合物阳性判断标准: $\Delta A/\Delta t = \Delta A_2/\Delta t_2 - \Delta A_1/\Delta t_1$ 。

以  $\Delta A/\Delta t$  代表还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化的净速度,即2个底物均存在情况下的氧化速度减去无HMG-CoA存在下的氧化速度。

以瑞舒伐他汀为阳性对照,对这2个化合物,选取  $6.67 \times 10^{-4}$ 、 $3.33 \times 10^{-4}$ 、 $6.67 \times 10^{-5}$ 、 $3.33 \times 10^{-5}$ 、 $6.67 \times 10^{-6}$ 、 $3.33 \times 10^{-6}$ 、 $6.67 \times 10^{-7}$ 、 $3.33 \times 10^{-7}$  mol/L,8个浓度进行测量,计算化合物对HMG-CoA还原酶活性抑制的  $IC_{50}$  均值,结果显示,瑞舒伐他汀为  $2.74 \times 10^{-6}$  mol/L,PHA为  $2.83 \times$

$10^{-5}$  mol/L。

2.4 对相关基因表达的影响 实验数据采用仪器自带软件ABI Prism 7000 SDS进行分析,采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义(表2)。结果显示:与模型组比较,PHA(M)组的水通道蛋白8(AQP8)、7- $\alpha$ 羟化酶(CYP7A1)、有机阴离子转运多肽(OATP)、 $Na^+$ -牛磺胆酸共转运多肽(NTCP)4个基因的转录均有所上调,推测可能与PHA促进胆固醇转化为胆汁酸有关。

### 3 讨论

中药茵陈收载于《中华人民共和国药典》。近年

表2 RT-PCR结果( $2^{-\Delta Ct}$ 平均值)

组别	HMGCR	OATP	MRP2	BSEP	ABCG5	ABCG8	NTCP	AQP8	CYP7A1
空白对照组	0.114	0.172	0.162	0.502	0.049 8	0.007 428	1.034	0.230	0.558
模型组	0.042	0.117	0.170	0.528	0.018 3	0.000 411	0.800	0.268	0.654
UDCA(40 mg/kg)组	0.058	0.166	0.204	0.622	0.032 7	0.001 340	0.916	0.297	0.864
Sim(10 mg/kg)组	0.058	0.157	0.163	0.514	0.015 7	0.000 542	0.839	0.310	0.631
PHA(M,150 mg/kg)组	0.064	0.158	0.167	0.530	0.019 6	0.000 959	0.926	0.381	0.797

注:  $2^{-\Delta Ct}$  是目标基因与管家基因的比值,表示原始模板中的浓度

来,许多文献报道了茵陈的利胆作用及其化学成分研究<sup>[2-4]</sup>,证实了茵陈的利胆作用。在此基础上,我们对茵陈提取物PHA(利胆作用的主要活性物质之一)进行了比较深入和系统的研究。

我们通过正常SD大鼠利胆实验验证了PHA促进胆汁分泌的作用。与空白对照组比较,PHA组给药后30 min内即能显著增加胆汁分泌量,高剂量组(300 mg/kg)的增幅达56%,表现出很好的剂量依赖关系。据Yoon等<sup>[5]</sup>研究发现,茵陈有松弛胆道扩约肌、促进胆汁分泌、增加胆汁中胆酸和胆红素排出量等功效;向怀等<sup>[6]</sup>将茵陈用于临床治疗妊娠期肝内胆淤积症有肯定疗效,说明茵陈有一定的

利胆作用,能促进胆汁分泌,本研究结果与其一致。

根据文献报道茵陈有调节血脂的作用<sup>[7]</sup>,实验中我们发现PHA能影响胆汁的CHO代谢:增加胆汁和胆汁酸的分泌量,降低CHO的浓度和分泌量。PHA治疗高血脂大鼠研究结果表明,PHA能够降低血清CHO和LDL-C水平。有文献报道<sup>[8]</sup>,茵陈提取物可有效降低小鼠血清中TC、TG的含量;Richard等<sup>[9]</sup>研究表明,茵陈提取物可对脂肪组织中脂肪细胞的代谢产生影响;也有实验表明<sup>[10,11]</sup>茵陈具有抗脂质过氧化和抗肝细胞坏死的作用,并可显著降低组织中CHO和TG的含量。本研究结果

(下转第525页)

## 【参考文献】

- [1] 谢国勋, 罗维成, 赵文智. 荒漠草原带沙源及灌丛对灌丛沙堆形态的影响[J]. 中国沙漠, 2015, 35(3): 573-581.
- [2] 玉苏甫·买买提, 艾萨迪拉·玉苏甫. 新疆白刺属植物空间分布及其生物学特性分析[J]. 安徽农学通报, 2015, 21(12): 28-31.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998, 43(1): 117.
- [4] 梅新娣, 沈应柏. 西伯利亚白刺化学成分研究进展[J]. 中药材, 2012, 35(12): 2045-2049.
- [5] 杨仁明, 索有瑞, 王洪伦. 唐古特白刺果实化学成分和功效作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(7): 985-989.
- [6] 索有瑞, 李玉林, 王洪伦, 等. 柴达木盆地唐古特白刺果实调节免疫、抗疲劳和耐寒作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 717-721.
- [7] 索有瑞, 王洪伦, 陈桂琛. 柴达木盆地唐古特白刺籽油的安全

- 性与降血脂作用[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 217-219.
- [8] 齐敬浩, 张桂霞, 陈贵林. 白刺果实活性成分提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国现代中药, 2013, 15(10): 827-831.
- [9] 李岩, 刘晶, 李田叶, 等. 白刺叶提取物的抗氧化及抑菌性研究[J]. 食品工业, 2015, 36(3): 94-98.
- [10] 王莹, 孙文, 张静晗, 等. 叉毛蓬化学成分的体外抗菌及抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(2): 251-254.
- [11] Agnese AM, Pérez C, Cabrera JL. *Adesmia aegiceris*: antimicrobial activity and chemical study [J]. *Phytomedicine*, 2001, 8(5): 389-94.
- [12] 王恒, 朱瑞罡, 谭勇, 等. HPLC测定唐古特白刺中槲皮素、山奈素和异鼠李素的含量[J]. 中成药, 2008, 30(12): 1860-1861.
- [13] 李鹏, 朱芸, 成玉怀. 西伯利亚白刺和唐古特白刺的生物学鉴定[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 2060-2061.

【收稿日期】 2016-01-02 【修回日期】 2016-06-23

【本文编辑】 李睿旻

(上接第510页)

也与文献报道一致,说明 PHA 是茵陈的有效成分之一。

为探究 PHA 降血脂的作用机制,我们进行了 HMG-CoA 还原酶活性抑制实验和 Real-time PCR 对相关基因表达的影响研究。结果显示 PHA 对 HMG-CoA 还原酶无明显的抑制作用;但能增加 CYP7A1、APQ8、OATP 和 NTCP 基因的转录。CYP7A1 促进 CHO 转化为胆汁酸;APQ8 能促进胆汁分泌;OATP 和 NTCP 可能促进肝细胞对胆汁酸的摄取,进而增加胆汁酸的排放;对胆酸盐外排泵(BESP)和多种耐药相关转运蛋白 2(MRP2)的转录无明显影响。这些结果提示,PHA 促进胆汁分泌和影响血脂代谢的作用表现为多靶点性质。有研究<sup>[12]</sup>认为茵陈提取物在 AMPK 通路中发挥作用,对糖代谢及脂代谢产生影响,降低脂质在肝脏的累积。下一步,我们将进行该化合物对代谢影响的研究。

综上所述,传统利胆中药茵陈中的活性成分之一是 PHA,具有促进胆汁分泌和调节脂肪代谢的作用。若将 PHA 作为先导化合物,有望研发出更好的可促进胆汁分泌和调节血脂代谢的药物。

## 【参考文献】

- [1] 胡照明,张文康,朱庆生,等.中华本草(第7册)[M].上海:上海科学技术出版社,1999:687-693.
- [2] 谢韬,梁敬钰,刘净.茵陈化学成分和药理作用研究进展[J].海峡药学,2004,16(1):8-13.

- [3] 曹锦花.茵陈的化学成分和药理作用研究进展[J].沈阳药科大学学报,2013,30(6):489-494.
- [4] 董岩,王新芳,崔长军,等.茵陈蒿的化学成分和药理作用研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(04):874-876.
- [5] Yoon M, Kim MY. The anti-angiogenic herbal composition Ob-X from *Morus alba*, *Melissa officinalis*, and *Artemisia capillaris* regulates obesity in genetically obese ob /ob mice [J]. *Pham Biol*, 2011, 49(6): 614-619.
- [6] 向怀,覃薛文.茵陈清热利胆汤治疗妊娠期肝内胆汁淤积症30例总结[J].湖南中医杂志,2013,29(6):49-50.
- [7] 张林丽.茵陈的药理研究和临床应用近况[J].广西医学,2003,25(11):2184-2185.
- [8] 李佳佳,罗贞恋,覃川,等.茵陈蒿汤加味方对高脂血症小鼠血清总胆固醇和甘油三酯影响的实验研究[J].贵阳中医学院学报,2014,36(6):24-27.
- [9] Richard A J, Fuller S, Fedocenco V, et al. *Artemisia scoparia* enhances adipocyte development and endocrine function *in vitro* and enhances insulin action *in vivo* [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e98897.
- [10] 王喜军,李廷利,孙晖.茵陈蒿汤及其血中移行成分6,7-二甲氧基香豆素的肝保护作用[J].中国药理学通报,2004,20(2):239-240.
- [11] 阙金花,黄鸣清,郑海音,等.复方熊胆茵陈颗粒的保肝、降血脂、抗脂肪肝药效学研究[J].中国医院药学杂志,2015,35(19):1736-1740.
- [12] Wang Z Q, Zhang X, Yu Y, et al. *Artemisia scoparia* extract attenuates non-alcoholic fatty liver disease in diet-induced obesity mice by enhancing hepatic insulin and AMPK signaling independently of FGF21 pathway [J]. *Metab Clin Exp*, 2013, 62(9):1239-1249.

【收稿日期】 2015-12-28 【修回日期】 2016-05-30

【本文编辑】 李睿旻