

基于胆汁酸代谢网络分析绞股蓝总皂苷降脂作用的机制

鲁艳柳^{1,2}, 杜艺玫^{1,2}, 秦琳^{1,2}, 马菲菲^{1,2}, 凌蕾^{1,2}, 吴迪^{1,2}, 周旭美^{1*}, 何芋岐^{1,2*}

¹遵义医学院药学院药理学实验室, 遵义 563009; ²遵义医学院 基础药理教育部

重点实验室暨特色民族药教育部国际合作联合实验室, 遵义 563003

摘要: 绞股蓝总皂苷具有显著的降低血脂的作用, 然而其机制尚未明确。课题组在前期研究的基础上, 将 33 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为 3 组, 对照组 (ND 组)、模型组 (HFD 组) 和绞股蓝总皂苷组 (HFD + GP 组), 分别给予维持饲料和高脂饲料, 从 16 周开始, 每日分别灌胃给予绞股蓝总皂苷 250 mg/kg 和等体积的空白溶剂, 至 38 周, 收集小鼠的血清和肝脏样本。通过 HE 染色观察肝脏组织的病理变化, 检测血清总胆固醇和低密度脂蛋白水平, 利用 UPLC-MS/MS 技术对小鼠肝脏 14 种胆汁酸含量进行分析, 采用实时荧光定量 PCR 检测 *Cyp7a1*、*Cyp8b1*、*Fxr*、*Shp*、*Lrh1*、*Hnf4 α* 基因表达水平。与对照组比较, 模型组有明显的脂肪泡结构, 给予绞股蓝总皂苷可以明显减轻肝脏组织的病理改变。与模型组比较, 绞股蓝总皂苷可以显著降低血清中 TC 和 LDL-C 含量, 显著降低肝脏中牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA)、甘氨酸去氧胆酸 (GCDCA) 和甘氨酸去氧胆酸 (GDCA) 含量, 显著升高肝脏中鹅去氧胆酸 (CDCA)、脱氧胆酸 (DCA) 和牛磺脱氧胆酸 (TDCA) 含量, 并在上调肝脏 *Cyp7a1*、*Cyp8b1*、*Fxr* 和 *Lrh1* 基因表达的同时下调 *Shp* 的基因表达。绞股蓝总皂苷降脂作用的潜在靶点可能与 FXR 介导的胆汁酸代谢通路有关, 为进一步深入探讨绞股蓝总皂苷降脂作用及其机制提供了参考。

关键词: 绞股蓝总皂苷; 胆汁酸代谢网络; 高脂血症

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.7.008

Hypolipemic Mechanism of Saponins from *Gynostemma Pentaphylla* Based on Analysis of Bile Acids

LU Yan-liu^{1,2}, DU Yi-mei^{1,2}, QIN Lin^{1,2}, MA Fei-fei^{1,2}, LING Lei^{1,2},
YANG Tao^{1,2}, LU An-jing^{1,2}, WU Di^{1,2}, ZHOU Xu-mei^{1*}, HE Yu-qi^{1,2*}

¹The Pharmaceutical Lab, School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China;

²Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education and Joint International

Research Laboratory of Ethnomedicine of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China

Abstract: The saponins from *Gynostemma Pentaphylla* have significant effects on reducing blood lipid, however, the mechanism is not clear. The C57BL/6J male mice were randomly divided into three groups, including normal diet group (ND), high fat diet group (HFD), and gypenosides group (HFD + GP). Mice in HFD and HFD + GP group were fed with high fat diet for 38 weeks, and treated with 0.1% CMC-Na and gypenosides (250 mg/kg) respectively, from 16 weeks to 38 weeks. In ND group, mice were fed with normal diet for 38 weeks. At the end point, serum and liver tissue were collected. Mice livers were observed by HE staining. Serum TC and LDL-C levels were measured by commercially available kit. Bile acid metabolic profile was quantified by UPLC-MS/MS. Quantitative real-time-PCR was applied to analyze mRNA expression levels of *Cyp7a1*, *Cyp8b1*, *Fxr*, *Shp*, *Lrh1* and *Hnf4 α* genes. Gypenosides significantly decreased serum TC and LDL-C levels. The hepatic levels of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), and glycodesoxycholic acid (GDCA) were decreased, but those of chenodeoxycholic acid (CDCA), deoxycholic acid (DCA), and taurodeoxycholic acid (TDCA) were increased. The gene expression levels of *Cyp7a1*, *Cyp8b1*,

收稿日期: 2018-02-11 接受日期: 2018-05-30

基金项目: 国家自然科学基金 (81402985, 81660685, 81560673); 教育部春晖计划 (Z2016003); 贵州省科技重大专项 (黔科合重大专项字 [2015]6010); 贵州省科学技术基金项目 (黔科合 JZ 字 [2015]2010 号, 黔科合 J 字 [2015]2158 号); 贵州省教育厅自然科学研究项目 (黔教合 KY 字 [2015]373 号); 贵州省留学人员科技创新项目 (黔人项目资助合同 (2015)03 号); 遵义医学院优秀青年人才项目 (15zy-004); 上海市复方中药重点实验室开放基金 (14DZ2271000)

* 通信作者 Tel: 86-017785211152; E-mail: HyqJeff@foxmail.com, zmczxm@163.com

Fxr, and *Lrh1* were up-regulated by gypenosides. However, the level of *Shp* was down-regulated. The potential therapeutic targets of gypenosides may be genes involved in bile acids regulation.

Key words: gypenosides; bile acid metabolic profile; hyperlipidemia

高脂血症与肝脏、肠道和心脏系统的多种疾病相关^[1],严重危害人类健康。近年来用于治疗高脂血症的药物主要是他汀类药物,但这类药物在临床上往往会导致较严重的不良反应^[2],开发新型的降血脂药物具有强烈的临床需求。绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 广泛分布于中国,韩国,日本和东南亚地区。大量研究报道,绞股蓝中提取的绞股蓝总皂苷可显著降低血清中的胆固醇,甘油三酯和血糖水平,且未发现严重的不良反应^[3-5]。本课题组的前期研究亦证明,给予绞股蓝总皂苷(250 mg/kg)具有显著的降低血脂的作用。然而,绞股蓝总皂苷降血脂的机制尚未明确。

胆汁酸主要在肝脏中,由 CYP7A1, CYP8B1, CYP27A1 等酶催化胆固醇生成^[6],其本身又是调节脂质和碳水化合物稳态的核受体法尼基衍生物 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)的配体^[7,8],可促进脂肪和胆固醇的吸收,调节脂质和碳水化合物的代谢^[6],因此,胆汁酸的代谢通路在防治高脂血症的研究中引起了越来越多的关注。绞股蓝总皂苷的母核为达玛烷型三萜类结构^[5],与内源性胆汁酸的结构极为相似。与绞股蓝总皂苷具有相似母核结构的多种人参皂苷,被研究发现可显著调控胆汁酸合成限速酶 CYP7A1^[9]。此外,具有和绞股蓝总皂苷母核相似结构的没药甾酮(Guggulsterone),也被证明为 FXR 的配体^[10]。因此,作用于 FXR 介导的胆汁酸代谢通路,可能是绞股蓝总皂苷调节脂质的机制之一。本研究将采用 UPLC-MS/MS 来定量分析 14 种主要的胆汁酸分子,采用实时荧光定量 PCR 检测 *Cyp7a1*、*Cyp8b1*、*Fxr*、*Shp*、*Lrh1*、*Hnf4α* 等基因表达的水平,探究绞股蓝总皂苷在胆汁酸含量和基因表达层面对肝脏胆汁酸平衡的影响,寻找其降血脂的作用机制。

1 实验材料

1.1 药物与试剂

绞股蓝总皂苷(批号:150522),购自陕西中鑫生物技术有限公司;辛伐他汀(批号:20150102,每片 20 mg),购自山东鑫齐药业有限公司;牛磺熊去氧胆酸(TUDCA,批号:120617),牛磺鹅去氧胆酸(TC-

DCA,批号:120702),鹅去氧胆酸(CDCA,批号:120316),猪去氧胆酸(HDCA,批号:120528),熊去氧胆酸(UDCA,批号:120419),脱氧胆酸(DCA,批号:120407),胆酸(CA,批号:120510),牛磺胆酸(TCA,批号:120609),购自长沙昂诺生物科技有限公司,质量分数 $\geq 98\%$;甘氨酸胆酸(GCA,批号:051M5308V),甘氨酸脱氧胆酸(GDCA,批号:039K0308V),甘氨酸鹅去氧胆酸(GCDCA,批号:SL-BH7686V),牛磺石胆酸(TLCA,批号:110M5004V),购自美国 Sigma-Aldrich 公司,质量分数 $\geq 97\%$;牛磺脱氧胆酸(TDCA,批号:SLBC5399V),购自美国 Sigma-Aldrich 公司,质量分数 $\geq 95\%$;牛磺猪去氧胆酸(THDCA,批号:111943-201301),购自江苏晶美生物技术有限公司,质量分数 $\geq 95.2\%$ 。高脂饲料购自美国 Research Diet 公司;逆转录试剂盒购自宝日医生物技术有限公司;SYBR Green Supermix 购自美国 Bio-rad 公司。应用 Primer 5.0 软件设计实时定量 PCR 引物,由上海捷瑞生物工程有限公司代为合成。色谱纯乙酸铵、乙腈、甲醇,购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;其余试剂均为分析纯,购自成都市科龙化工试剂厂。

1.2 仪器

Y10 型超细匀浆机(上海翼控机电有限公司);NANO DROP 2000 超微量分光光度计(Thermo 公司,美国);Dura 12 型超纯水机(泽拉布仪器科技(上海)有限公司);逆转录用多功能 PCR 仪(Eppendorf 公司,德国);实时定量 PCR 仪(Bio-rad 公司,美国);DN-36A 型水浴氮吹仪(上海乔枫实业有限公司);6420 型超高效液相色谱联用三重四级杆质谱仪(Agilent 公司,美国);-80 °C 超低温冰箱(中国海尔公司)。

1.3 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 33 只,体重 23 ~ 25 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供(许可证号 SCXK(京)2014-0004),自由进食及饮水,湿度 50% ~ 60%,室温约 22 °C,适应性喂养一周后进行实验。

2 实验方法

2.1 动物实验

将小鼠随机分为 3 组,分别为对照组(ND),模

型组(HFD)和绞股蓝皂苷组(HFD/GP)。模型组和绞股蓝皂苷组始终给予高脂饲料,依据血清总胆固醇水平出现显著差异($P < 0.05$),在16周时制得高脂血症模型。造模成功后,绞股蓝皂苷组每日灌胃给予绞股蓝总皂苷(250 mg/kg,0.1%羧甲基纤维素钠助悬),模型组每日灌胃给予等体积的空白溶剂,持续22周。正常组始终给予正常维持饲料,并从16周开始每日灌胃给予等体积的空白溶剂直至实验终点。小鼠以7%水合氯醛(0.005 mL/g)麻醉,眼眶取血,分离血清备用。采集肝脏,取各小鼠相同部位肝组织固定于10%甲醛溶液中,其余于液氮速冻后-80℃保存备用。

2.2 组织病理学检查及血清生化指标检测

肝脏样本常规石蜡包埋切片、苏木精-伊红染色(Hematoxylin and eosin, HE),光镜下观察并拍照。采用商业试剂盒测定血清总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL-C)水平。

2.3 肝脏组织中的胆汁酸分析

称取约100 mg肝脏组织,加300 μ L乙腈,匀浆,14 300 rpm,4℃离心10 min。取上清液250 μ L氮气吹干,100 μ L 50%甲醇复溶。14 300 rpm,4℃离心10 min后,取上清液50 μ L待UPLC-MS/MS分析。

将各种胆汁酸标准配置成0.015~9.0 μ mol/L

的一系列混合溶液,以空白肝脏按样品处理方法处理,用于绘制标准曲线。

采用Agilent 6420超高效液相色谱联用三重四级杆质谱系统,固定相为Waters BEH C_{18} 色谱柱(100 mm \times 21 mm, 1.7 μ m),流动相为乙腈及乙酸铵溶液梯度洗脱,参数设置参考已报道文献^[9]。流速0.3 mL/min,柱温45℃。质谱检测器采用电喷雾电离方式进行离子化,以负离子选择离子检测(SIM)模式进行扫描,质谱参数 Gas Temp:326℃, Gas Flow:12 L/min, Nebulizer:55 psi, Capillary:3 500 V。

2.4 胆汁酸调节相关基因 mRNA 表达水平检测

称取肝脏约20 mg,在1 mL Trizol中解冻,冰上匀浆,室温孵育5 min,加入200 μ L氯仿,混合均匀,室温孵育10 min,低温离心。上清液用500 μ L异丙醇沉淀RNA。75%乙醇(DEPC水配制)洗涤沉淀,离心,沉淀在室温下挥干后加DEPC水复溶,超微量分光光度计检测RNA浓度及质量。经逆转录试剂盒反转录为cDNA,逆转录条件:25℃预热10 min,37℃逆转录2 h,85℃加热5 min逆转录酶失活。cDNA用于实时荧光定量PCR分析,引物序列如表1所示。扩增条件:95℃预变性3 min,95℃变性10 s,60℃延伸45 s,共40个循环。结果以Gapdh表达值为内参进行校正。

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 Primers for real time PCR assays

| 基因 Gene | 正向引物 Forward Primers | 反向引物 Reverse primers |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Cyp7a1</i> | GAGCCCTGAAGCAATGAAAG | GCTGTCCGGATATTCAAGGA |
| <i>Cyp8b1</i> | GGACAGCCTATCCTTGCTGA | GACGGAACCTCCTGAACAGC |
| <i>Nr1h4</i> | TTCCTCAAGTTCAGCCACAG | TCGCCTGAGTTCATAGATGC |
| <i>Nr0b2</i> | GGAGTCTTTCTGGAGCCTTG | ATCTGGCTTGAAGAGGATCC |
| <i>Nr5a2</i> | TCAGTTCGATCAGCGGGAGTTTGT | TGCAGGTTCCTCCAGGTTCTTCACA |
| <i>Hnf4α</i> | GTGCTTCCGGGCTGGCATGAA | AGGTGATCTGCTGGACAGAAAC |
| <i>Gapdh</i> | TGTGTCCGCTGCTGGATCTGA | CCTGCTTCACCACCTTCTTGA |

2.5 统计学分析

以SPSS 18.0统计软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用One-way ANOVA单因素方差分析,当 $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

3 结果

3.1 绞股蓝总皂苷降血脂的作用

肝脏组织切片,HE染色,光镜下观察,对照组

可见小鼠的肝脏结构正常,细胞膜完整,肝索排列规则。模型组可见明显的脂肪泡结构,绞股蓝总皂苷给药组的肝组织未见明显的脂肪泡结构,肝小叶结构基本完整(如图1)。与对照组相比,高脂饮食能显著升高小鼠血清中的TC和LDL-C水平($P < 0.01$),而绞股蓝总皂苷减轻了血清中TC和LDL-C的异常升高($P < 0.05$,如表2)。由实验结果可知,绞股蓝总皂苷具有良好的降血脂作用。

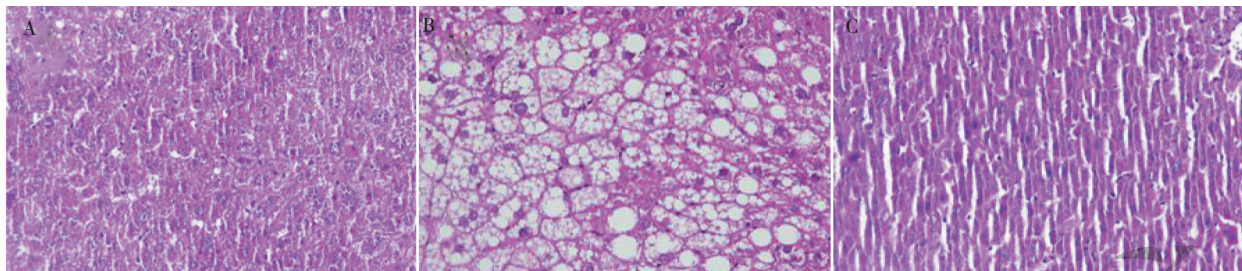


图1 小鼠肝脏病理学变化 ($n = 11, \times 40$)

Fig. 1 HE staining of liver tissues ($n = 11, \times 40$)

注:A为给予正常维持饲料的对照组;B为给予高脂饲料的模型组;C为给予高脂饲料和绞股蓝皂苷的实验组。

Note:A, normal diet treatment; B, high fat diet group; C, gypenosides treatment on mice fed with high fat diet.

表2 绞股蓝总皂苷对血清总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的影响($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 2 Changes in serum total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels induced by gypenosides ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

| 组别 Group | 血清总胆固醇 TC | 低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组 Normal diet group | 1.00 ± 0.03 | 1.00 ± 0.15 |
| 模型组 High fat diet group | 2.12 ± 0.22 ^a | 1.91 ± 0.38 ^a |
| 绞股蓝皂苷组 Gypenosides group | 1.43 ± 0.13 ^b | 1.00 ± 0.14 ^b |

注:a表示与对照组相比 $P < 0.01$; b表示与模型组相比 $P < 0.05$ 。

Note: a means $P < 0.01$ compared with normal diet group; b means $P < 0.05$ compared with high fat diet group.

3.2 绞股蓝总皂苷对肝脏组织中胆汁酸水平的影响

采用 UPLC-MS/MS 方法定量分析小鼠肝脏中 14 种胆汁酸,如图 2。对各胆汁酸含量变化进行统计分析发现,与模型组相比,绞股蓝总皂苷能显著升高肝脏中 CDCA, DCA 和 TDCA 的含量($P < 0.01$),降低 TUDCA, GCDCA 和 GDCA 的含量($P < 0.01$)。此外,高脂饮食能显著降低作为评价肝功能重要指标的 CA/CDCA 比率($P < 0.01$),表明胆汁酸疏水性增强。然而,绞股蓝总皂苷未能恢复该指数,结果见表 3。

3.3 绞股蓝总皂苷对肝脏中胆汁酸调控相关基因表达的影响

与对照组相比,高脂饮食显著抑制了小鼠肝脏 *Cyp7a1* 和 *Cyp8b1* 的基因表达水平($P < 0.01$)。而给予绞股蓝总皂苷后,肝脏 *Cyp7a1* 的基因表达显著升高,不仅高于模型组,也高于对照组($P < 0.01$)。同时,绞股蓝总皂苷也上调 *Cyp8b1* 的基因表达水平,但没有恢复至正常水平,结果见表 4。*Fxr*, *Shp*, *Lrh1*, *Hnf4 α* 是肝脏中调节胆汁酸稳态的关键基因。与对照组相比,高脂饮食显著下调这 4 个基因的表

达水平。给予绞股蓝总皂苷后, *Fxr* 和 *Lrh1* 基因表达水平恢复至正常, *Hnf4 α* 表达水平没有改变,而 *Shp* 基因表达水平显著下调,结果见表 4。

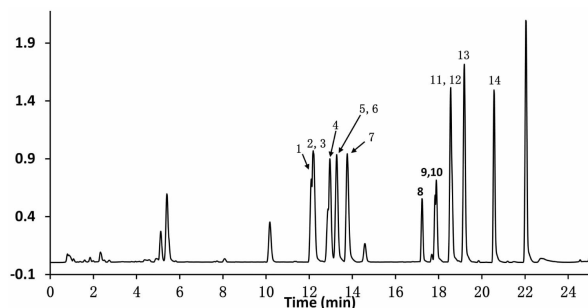


图2 胆汁酸总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of bile acids

注:图中每个色谱峰代表 1 种胆汁酸,经对照品比对,鉴定 14 种胆汁酸,分别是:1. 牛磺熊去氧胆酸,2. 甘氨酸胆酸,3. 熊去氧胆酸,4. 牛磺猪去氧胆酸,5. 胆酸,6. 猪去氧胆酸,7. 牛磺胆酸,8. 甘氨酸鹅去氧胆酸,9. 牛磺鹅去氧胆酸,10. 甘氨酸胆酸,11. 牛磺胆酸,12. 鹅去氧胆酸,13. 脱氧胆酸,14. 牛磺石胆酸

Note: Each peak represents a bile acid. 14 kinds of bile acids were identified as follows: 1. TUDCA, 2. GCA, 3. UDCA, 4. THDCA, 5. CA, 6. HDCA, 7. TCA, 8. GCDCA, 9. TCDCA, 10. GDCA, 11. TDCA, 12. CDCA, 13. DCA, 14. TLCA

表3 肝脏中 CDCA, DCA, TDCA, TUDCA, GCDCA 和 GDCA 丰度及 CA/CDCA 比率($\bar{x} \pm s, n=11$)Table 3 The contents of CDCA, DCA, TDCA, TUDCA, GCDCA and GDCA and the ratio of CA/CDCA in liver ($\bar{x} \pm s, n=11$)

| 组别 Group | CDCA | DCA | TDCA | TUDCA | GCDCA | GDCA | CA/CDCA |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 对照组 Normal diet group | 1.00 ± 0.17 | 1.00 ± 0.21 | 1.00 ± 0.13 | 1.00 ± 0.11 | 1.00 ± 0.14 | 1.00 ± 0.05 | 1.50 ± 0.36 |
| 模型组 High fat diet group | 0.30 ± 0.03 ^a | 0.22 ± 0.04 ^a | 0.28 ± 0.06 ^a | 1.89 ± 0.23 ^a | 1.04 ± 0.20 | 1.24 ± 0.33 | 0.18 ± 0.06 ^a |
| 绞股蓝皂苷组 Gypenosides group | 0.88 ± 0.13 ^b | 0.83 ± 0.10 ^b | 0.76 ± 0.09 ^b | 1.00 ± 0.11 ^b | 0.00 ± 0.00 ^b | 0.61 ± 0.12 ^b | 0.05 ± 0.01 ^{a,b} |

注: a 表示与对照组相比 $P < 0.01$; b 表示与模型组相比 $P < 0.01$ 。

Note: a means $P < 0.01$ compared with normal diet group; b means $P < 0.01$ compared with high fat diet group.

表4 绞股蓝总皂苷对胆汁酸合成及调控关键基因表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=11$)Table 4 Gypenosides changed the mRNA expression levels of genes involved in hepatic pathway of bile acids homeostasis regulations ($\bar{x} \pm s, n=11$)

| 组别 Group | <i>Cyp7a1</i> | <i>Cyp8b1</i> | <i>Fxr</i> | <i>Shp</i> | <i>Lrh1</i> | <i>Hnf4α</i> |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 对照组 Normal diet group | 1.00 ± 0.18 | 1.00 ± 0.15 | 1.00 ± 0.06 | 1.00 ± 0.16 | 1.00 ± 0.07 | 1.00 ± 0.08 |
| 模型组 High fat diet group | 0.18 ± 0.06 ^a | 0.21 ± 0.07 ^a | 0.46 ± 0.08 ^a | 0.44 ± 0.07 ^a | 0.42 ± 0.05 ^a | 0.48 ± 0.08 ^a |
| 绞股蓝皂苷组 Gypenosides group | 2.73 ± 0.51 ^{a,c} | 0.45 ± 0.05 ^{b,c} | 1.23 ± 0.20 ^c | 0.18 ± 0.04 ^c | 0.98 ± 0.14 ^c | 0.52 ± 0.05 |

注: a 表示与对照组相比 $P < 0.01$; b 表示与对照组相比 $P < 0.05$; c 表示与模型组相比 $P < 0.01$ 。

Note: a means $P < 0.01$ compared with normal diet group; b means $P < 0.05$ compared with normal diet group; c means $P < 0.01$ compared with high fat diet group.

4 讨论

通过高脂饮食建立高脂血症的动物模型是一种广泛使用的造模方法,与化学诱导和转基因动物模型相比,此种方法更能准确反映高脂血症相关的临床症状^[11]。有研究者发现,持续给予绞股蓝主要成分绞股蓝总皂苷^[12] 5 周,能显著降低高脂血症大鼠血清中脂质含量,肝脏中 TC, TG 含量以及改善肝脏脂肪变性和炎症反应^[13]。在本研究中持续给予绞股蓝总皂苷 22 周,能显著降低高脂血症小鼠血清中 TC, LDL-C 含量,与临床上广泛使用的降脂药物辛伐他汀作用相当^[14],但其作用机制有待研究。正如前言中提及,绞股蓝总皂苷的母核结构与核受体 FXR 的内源性配体胆汁酸的母核结构极其相似,而 FXR 是脂质和碳水化合物代谢的重要调节因子^[15],因此,本研究假设绞股蓝总皂苷是通过 FXR 介导的信号通路降低血清 TC 和 LDL-C 水平,并选择肝脏通路的关键基因进行考察,包括肝脏 *Cyp7a1*、*Cyp8b1*、*Fxr*、*Shp*、*Lrh1* 和 *Hnf4 α* ^[16,17]。结果表明,绞股蓝总皂苷显著地改变了大多数这些基因的表达水平。因此,我们认为 FXR 介导的胆汁酸代谢通路,可能是小鼠肝脏中绞股蓝总皂苷的重要靶点之一。

CYP7A1 是胆汁酸合成经典途径的限速酶。肝脏 SHP 通过与 LRH1 竞争从而抑制 *Cyp7a1* 的转

录^[16]。本研究发现,绞股蓝总皂苷能降低高脂血症小鼠肝脏 *Shp* 的基因表达水平,增加 *Cyp7a1* 和 *Lrh1* 的基因表达,表明绞股蓝总皂苷可以促进胆固醇转化为胆汁酸。同时观察到,小鼠肝脏中有效胆汁酸的含量增加,如 CDCA, DCA 和 TDCA。因此,抑制 *Shp* 基因表达并且诱导 *Cyp7a1* 和 *Lrh1* 基因表达,进而增强胆固醇代谢,可能是绞股蓝总皂苷降低血清胆固醇的机制之一。

CYP8B1 是 CA 合成的必需酶,调控 CA/CDCA 比率^[18]。本研究中,绞股蓝总皂苷虽上调 *Cyp8b1* 的表达但未恢复至正常水平,因此,肝脏中 CA 的含量依旧较低。另一方面,与 HFD 组相比,绞股蓝总皂苷显著上升 CDCA 含量,最终,与 ND 和 HFD 组相比,绞股蓝总皂苷显著降低了 CA/CDCA 比率。有研究发现,CA/CDCA 增加可以促进胆固醇的吸收,导致高脂血症的发生^[19]。因此,限制胆固醇吸收可能是绞股蓝总皂苷降低小鼠血清胆固醇水平的另一机制。

有研究表明,游离型胆汁酸的甘氨酸结合物可能会诱发活性氧的生成,最终导致肝细胞凋亡^[20]。本研究发现,绞股蓝总皂苷未改变牛磺酸与胆汁酸的结合效率,却限制了甘氨酸与胆汁酸的结合。这可能成为绞股蓝总皂苷开发成为安全性药物的一大优势。

综上所述,绞股蓝总皂苷显著改善高脂饮食导致的小鼠血脂异常,调节胆汁酸稳态相关的基因,推测其降脂作用的潜在靶点可能与 FXR 介导的胆汁酸代谢通路有关,为进一步开发利用绞股蓝总皂苷提供了参考。

参考文献

- 1 Su J, Wang H, Ma C, *et al.* Hypolipidemic mechanism of gypenosides via inhibition of pancreatic lipase and reduction in cholesterol micellar solubility [J]. *Eur Food Res*, 2016, 242:305-312.
- 2 Bao L, Bai S, Borijhan G. Hypolipidemic effects of a new piperine derivative GB-N from *Piper longum* in high-fat diet-fed rats [J]. *Pharm Biol*, 2012, 50:962-967.
- 3 He Q, Li JK, Li F, *et al.* Mechanism of action of gypenosides on type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21:2058-2066.
- 4 Zhang N(张妮), Song N(宋囡), Cao HM(曹慧敏), *et al.* Effect of gypenosides on the prevention and treatment of atherosclerosis by autophagosome [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2017, 29:2112-2116.
- 5 Wang J, Yang JL, Zhou PP, *et al.* Further new gypenosides from *Jiaogulan (Gynostemma pentaphyllum)* [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65:5926-5934.
- 6 Asgharpour A, Kumar D, Sanyal A. Bile acids: emerging role in management of liver diseases [J]. *Hepatol Int*, 2015, 9: 527-533.
- 7 Zheng Z, Zhao Z, Li S, *et al.* Altemusin, a non-steroidal microbial metabolite, attenuates non-alcoholic fatty liver disease by activating the farnesoid X receptor [J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 92:425-436.
- 8 Kim KH, Choi S, Zhou Y, *et al.* Hepatic FXR/SHP axis modulates systemic glucose and fatty acid homeostasis in aged mice [J]. *Hepatology*, 2017, 66:498-509.
- 9 Kawase A, Yamada A, Gamou Y, *et al.* Increased effects of ginsenosides on the expression of cholesterol 7 α -hydroxylase but not the bile salt export pump are involved in cholesterol metabolism [J]. *J Nat Med*, 2013, 67:545-553.
- 10 Urizar NL, Moore DD. A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR [J]. *Science*, 2002, 296: 1703-1706.
- 11 Hu HM(胡慧明), Zhu YC(朱彦陈), Zhu QQ(朱巧巧), *et al.* Analysis on animal models of experimental hyperlipidemia [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2016, 41: 3709-3714.
- 12 Sonf YN, Dong S, Wei B, *et al.* Metabolomic mechanisms of gypenoside against liver fibrosis in rats: An integrative analysis of proteomics and metabolomics data [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12: e0173598.
- 13 Yang YH, Yang J, Jiang QH. Hypolipidemic effect of gypenosides in experimentally induced hypercholesterolemic rats [J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12:154.
- 14 Adameova A, Hancarova A, Matejkova J, *et al.* Simvastatin alleviates myocardial contractile dysfunction and lethal ischemic injury in rat heart independent of cholesterol-lowering effects [J]. *Physiol Res*, 2009, 58:449-454.
- 15 Yan Z, Liu H, Min Z, *et al.* Fatty liver diseases, bile acids, and FXR [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2016, 6: 409-412.
- 16 Goodwin B, Jones SA, Price RR, *et al.* A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis [J]. *Mol Cell*, 2000, 6:517-526.
- 17 Kir S, Zhang Y, Gerard RD, *et al.* Nuclear receptors HNF4 α and LRH-1 cooperate in regulating *Cyp7a1 in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287:41334-41341.
- 18 Pozzo L, Vornoli A, Coppola I, *et al.* Effect of HFD/STZ on expression of genes involved in lipid, cholesterol and glucose metabolism in rats [J]. *Life Sci*, 2016, 166:149-156.
- 19 Yang F, He Y, Liu HX, *et al.* All-trans retinoic acid regulates hepatic bile acid homeostasis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 91:483-489.
- 20 Yang F, Xu Y, Xiong A, *et al.* Evaluation of the protective effect of *Rhei Radix et Rhizoma* against α -naphthylisothiocyanate induced liver injury based on metabolic profile of bile acids [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144:599-604.