

# 姜黄素、小檗碱及其配伍对 db/db 小鼠糖脂代谢相关基因 mRNA 表达的影响\*

高 艳, 崔广智, 李慧颖, 张艳军, 刘 洋

**摘要** [目的] 观察姜黄素、小檗碱分别及其配伍对 db/db 小鼠糖脂代谢相关基因 mRNA 表达的影响, 为中药配伍合理性提供实验依据。[方法] db/db 小鼠分别及联合口服给予姜黄素和小檗碱, 给药 28 d, 实时定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肝脏中葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)、低密度脂蛋白受体(LDLR)和血管生成素相关生长因子(AGF)的 mRNA 表达。[结果] 将小檗碱和姜黄素分别及配伍作用于 db/db 小鼠, 姜黄素低剂量(19.5 mg/kg)、小檗碱高剂量(144 mg/kg)配伍组可下调 db/db 小鼠肝脏 G-6-Pase mRNA 表达, 姜黄素高剂量(39 mg/kg)、小檗碱高剂量(144 mg/kg)配伍组可上调 db/db 小鼠肝脏 LDLR mRNA 表达, 各组对 db/db 小鼠肝脏 AGF mRNA 表达均无显著性影响。[结论] 小檗碱和姜黄素配伍后, 可调节糖脂代谢相关基因 mRNA 的表达, 其作用优于单独给药组。

**关键词** 姜黄素; 小檗碱; 配伍; db/db 小鼠; 糖脂代谢

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1673-9043(2011)01-0033-03

在前期的研究中, 笔者发现小檗碱和姜黄素对 db/db 小鼠糖脂代谢具有调节作用。因此本实验在此基础上研究姜黄素、小檗碱分别及其配伍对 db/db 小鼠糖脂代谢相关基因 mRNA 表达的影响, 旨在为探讨其作用机制提供部分理论依据。

## 1 实验材料

**1.1 实验动物** db/db 小鼠, 雄性, 51 只, 6~8 周龄, 体质量 30~40 g; C57BL/6J 小鼠, 雄性, 51 只, 6~8 周龄, 体质量 15~20 g。由上海斯莱克实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

**1.2 实验药物及试剂** 姜黄素自微乳, 载药量 40 mg/g, 4℃避光保存备用(天津中医药大学药剂室制备); 小檗碱(天津市一方科技有限公司, 纯度 97%, 批号 20070108); 吐温 80(天津市北方天医化学试剂厂, 批号 20051029)。

**1.3 实验仪器** 低温高速离心机(Beckman, 美国 AllegraTM 64R Centrifuge); 涡旋混合器(北京北德科学器材有限公司, MVS-1); DU-530 紫外分光光

度计(DNA/Protein Analyzer, BECKMAN, 美国); 聚合酶链反应(PCR)扩增仪(480Kin-Elmer, Branchburg, NJ); 核酸蛋白分析仪(Beckman, DU530 DNA/RNA Protein Analyzer); ABI 7300 实时荧光定量系统(Applied Biosystems, 美国)。

## 2 实验方法

**2.1 分组及给药** 取 C57BL/6 小鼠 6 只和 db/db 小鼠 51 只, 所有小鼠均给予高脂饲料喂养。C57BL/6 小鼠为正常对照组, db/db 小鼠 51 只随机分为 9 组, 每组 5~6 只, 分别为模型对照组、姜黄素高剂量(39 mg/kg)组、姜黄素低剂量(19.5 mg/kg)组、小檗碱高剂量(144 mg/kg)组、小檗碱低剂量(72 mg/kg)组、姜黄素低剂量(19.5 mg/kg)小檗碱低剂量(72 mg/kg)配伍组、姜黄素高剂量(39 mg/kg)小檗碱低剂量(72 mg/kg)配伍组、姜黄素低剂量(19.5 mg/kg)小檗碱高剂量(144 mg/kg)配伍组、姜黄素高剂量(39 mg/kg)小檗碱高剂量(144 mg/kg)配伍组。正常组和模型对照组给予生理盐水, 姜黄素自微乳用生理盐水配制, 小檗碱用含 1%吐温 80 的生理盐水配制, 灌胃给药 28 d, 1 次/d, 给药体积为 0.5 mL/g。

**2.2 样本的采集** 灌胃给药 28 d 后, 处死动物, 取肝脏液氮冻存。

## 2.3 实时定量逆转录聚合酶链反应

**2.3.1 引物序列及扩增片段长度** 见表 1。

\* 基金项目: 天津市卫生局资助项目(2005063)。

作者单位: 300193 天津中医药大学, 天津市中药药理重点实验室

作者简介: 高 艳(1985-), 女, 硕士在读, 主要从事中药药理研究。

通讯作者: 崔广智。

表1 引物序列及扩增片段长度

| 基因       | 引物序列                            | 扩增片段长度 |
|----------|---------------------------------|--------|
| GAPDH    | Forward:CTCA TGACCACAGTCCATGA   | 201 bp |
| G-6-Pase | Reverse: CACATTGGGGGTAGGAACAC   | 101 bp |
|          | Forward: TGAACATTTTCAGCCACATCCG |        |
| LDLR     | Reverse: GCAGGTAAATCCAAGTGCAGAA | 239 bp |
| AGF      | Forward:GAGGAAGTGGCGGCTGAA      |        |
|          | Reverse: GTGCTGGATGGGGAGGTCT    |        |
|          | Forward: TCGTGTAGTAGCCGTGTGTGT  |        |
|          | Reverse: CACCTGATGCACAGTTCCA    | 172 bp |

**2.3.2 总 RNA 提取及定时定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)** 肝脏总 RNA 的提取 称取肝脏组织 50 mg,按试剂盒说明书提取总 RNA。用核酸蛋白分析仪计算所提 RNA 含量和纯度。

RT 反应 :10 μL 反应体系。置 PCR 仪中 37 °C 反应 15 min ,85 °C 变性 5 秒。

RT-PCR 反应 :建立 25 μL 反应体系 ,95 °C 预变性 10 s ,95 °C 变性 10 s ,60 °C 退火/延伸 31 s ,扩增 40 个循环。在 RT-PCR 仪上检测各样本基因表达 ,以 GAPDH 作为内参照 ,用 ABI 7300 实时荧光定量系统进行分析 ,以空白作为标准 ,根据 Ct 值 ,计算各组基因表达为空白的倍数 ,以此倍数作统计。

表达倍数 = 2<sup>-(Ct 用药目的基因 - Ct 用药内参基因) / (Ct 对照组的基因 - Ct 对照组内参基因)</sup>

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理 ,用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较 ,所有数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

### 3 实验结果

**3.1 姜黄素小檗碱对 db/db 小鼠葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)、低密度脂蛋白受体(LDLR)和血管生成素相关生长因子(AGF)mRNA 表达的影响**

**3.1.1 基因扩增曲线及溶解曲线** GAPDH、G-6-Pase、LDLR 和 AGF 的基因溶解曲线均为单峰 ,说明目的基因引物质量可靠 ,产物单一。

**3.1.2 姜黄素小檗碱分别及配伍对 db/db 小鼠葡萄糖-6-磷酸酶、低密度脂蛋白受体和血管生成素相关生长因子 mRNA 表达的影响** 见表 2。

与模型组比较 ,单独给药各剂量组对 db/db 小鼠肝脏 G-6-Pase 和 LDLR mRNA 的表达无显著性影响;姜黄素低剂量(19.5 mg/kg)小檗碱高剂量(144 mg/kg) 配伍组可显著下调 G-6-Pase mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ) ;姜黄素高剂量(39 mg/kg)小檗碱高剂量(144 mg/kg) 配伍组可显著上调 LDLR mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ) ;姜黄素和小檗碱按照不同的剂量配伍后 ,

表2 姜黄素小檗碱分别及配伍对 db/db 小鼠 G-6-Pase、LDLR 和 AGF mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n | G-6-Pase   | LDLR       | AGF       |
|-----------|---|------------|------------|-----------|
| 正常对照组     | 6 | 0.56±0.30* | 4.59±0.73* | 1.15±0.73 |
| 模型对照组     | 6 | 1.00±0.11  | 1.005±0.00 | 1.17±0.70 |
| 姜黄素高剂量组   | 6 | 1.06±0.18  | 2.30±1.35  | 0.96±0.51 |
| 姜黄素低剂量组   | 6 | 1.16±0.12  | 1.63±0.33  | 1.46±1.26 |
| 小檗碱高剂量组   | 6 | 0.74±0.24  | 1.35±0.07  | 0.92±0.81 |
| 小檗碱低剂量组   | 5 | 1.09±0.38  | 1.75±0.67  | 1.50±0.95 |
| 姜黄素低小檗碱低组 | 6 | 1.32±0.25  | 3.25±0.81  | 1.50±0.81 |
| 姜黄素高小檗碱低组 | 6 | 0.79±0.23  | 3.13±1.89  | 1.98±1.57 |
| 姜黄素低小檗碱高组 | 5 | 0.61±0.20* | 2.69±2.38  | 0.51±0.04 |
| 姜黄素高小檗碱高组 | 5 | 1.19±0.39  | 4.11±3.64* | 1.39±1.34 |

注 :与模型组相比较 ,\* $P < 0.05$ 。

对 G-6-Pase 和 LDLR mRNA 表达的均有显著的调节作用 ,并优于单独给药组 ;各给药组对 db/db 小鼠肝脏 AGF mRNA 的表达无显著性影响。

### 4 讨论

糖尿病突变基因(db)是美国 Jackson Laboratory 在 1966 年于 C57BL/Ks 品系小鼠中发现的<sup>[1]</sup>。它是隐性染色体的基因突变 ,这种糖尿病小鼠(C57BL/KsJ-db/db) 是目前应用于研究 2 型糖尿病最好的动物模型。本实验中 ,选用了 6~8 周龄的雄性 db/db 小鼠 ,观察姜黄素、小檗碱单独及联合用药对 db/db 小鼠糖脂代谢相关基因表达的影响。

葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)是催化 6-磷酸葡萄糖水解为葡萄糖的关键酶 ,主要在人和动物的肝脏和肾脏中表达,小肠也有少量表达<sup>[2]</sup>。大量的糖尿病动物实验研究证实 ,无论 1 型还是 2 型糖尿病动物 G-6-Pase 的活性均明显增加。Clore 等<sup>[3]</sup>通过对 14 例肥胖型糖尿病患者和 13 例单纯性肥胖病患者的对比研究指出 ,G-6-Pase 活性增强和 GK 活性降低是 2 型糖尿病肝糖输出增加的主要原因。1998 年 Perfetti R<sup>[4]</sup>撰文提出了 2 型糖尿病的新型治疗靶点和治疗策略指出 Glu-6-Pase/GK 以及糖原合酶均是糖尿病的治疗靶点。这些研究结果均表明 G-6-Pase 在糖尿病的病因学中起着一定的作用。

低密度脂蛋白受体(LDLR)是一种细胞表面糖蛋白 ,LDLR 的主要功能是为细胞提供生长所必须的胆固醇 ,并维持细胞内胆固醇代谢的动态平衡<sup>[5]</sup>。低密度脂蛋白受体与体内低密度脂蛋白(LDL)的代谢密切相关 ,通过介导细胞摄取 LDL ,增加 LDL 的降解 ,对 LDL 维持相对恒定水平具有重要作用<sup>[6]</sup>。近

年来的研究表明<sup>[7]</sup>,血浆中 2/3 以上的 LDL 是通过 LDLR 途径降解的。Weijia Kong 等<sup>[8]</sup>实验证明小檗碱可明显升高高脂血症仓鼠肝 LDLR mRNA 和 LDLR 蛋白的表达。在 LDLR 结合、内化、降解和再循环过程中任一环节出现障碍,均可能导致 LDL 积聚,引发高胆固醇血症。

血管生成素相关蛋白家族是最新发现的一族促血管生长因子,自 1999 年以来,先后发现了该家族的 6 个成员,其中 5 个可能与心血管疾病的治疗有关。其主要作用是调节血管内皮生长,保护内皮细胞功能,其次是调节脂肪代谢。

本实验结果表明,联合用药后可调节糖脂代谢相关多个基因 mRNA 的表达,而单独给药组并没有此作用。说明姜黄素和小檗碱配伍后对糖脂代谢的调节作用可能是通过调节糖脂代谢相关基因 mRNA 的表达而实现的。

参考文献:

- [1] T Ishizuka, P Klepcyk, S Liu, et al. Effects of overexpression of human GLUT4 gene on maternal diabetes and fetal growth in spontaneous gestational diabetic C57BLKS/J Lepr (db/+) mice[J]. *Diabetes*, 1999, 48:1061-1069.
- [2] Gilles Mithieux, Fabienne Rajas, Amandine Gautier-Stein. A Novel Role for Glucose 6-Phosphatase in the Small Intestine

in the Control of Glucose Homeostasis[J]. *J Biol Chem Oct*, 2004, 279(43):44231-44234.

- [3] Clore J N, Stillman J, Sugeran H. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2000, 49(6):969-974.
- [4] Perfetti R, Barnett PS, Mathur R, et al. Novel therapeutic Strategies for the treatment of type 2 diabetes[J]. *Diabetes Metab Rev*, 1998, 14(3):207-225.
- [5] Noam Zelcer, Cynthia Hong, Rima Boyadjian, et al. LXR Regulates Cholesterol Uptake Through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor[J]. *Science*, 2009, 325:100-104.
- [6] Britta Loeffler, Joerg Heeren, Mareike Blaeser, et al. Lipoprotein lipase-facilitated uptake of LDL is mediated by the LDL receptor[J]. *J Lipid Res*, 2007, 48:288-298.
- [7] Pedreno J, Castellarnau C, Cul-lare C, et al. LDL binding sites on platelets differ from the "Classical" receptor of nucleated cells [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1992, 12(11):1353-1362.
- [8] Weijia Kong, Jing Wei, Parveen Abidi, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins[J]. *Nature Medicine*, 2004, 10:1344-1351.

(收稿日期 2010-10-11)

### Effects of curcumin, berberine and its compatibility on mRNA expression of glucose and lipid metabolism-related genes in db/db mice

GAO Yan, CUI Guang-zhi, LI Hui-ying, et al

(Tianjin University of TCM, Tianjin Laboratory of Chinese medicine pharmacology, Tianjin 300193, China)

**Abstract [Objective]** To observe the effects of curcumin, berberine and its compatibility on mRNA expression of glucose and lipid metabolism-related genes in db/db mice and provide the experimental basis for the rational compatibility. **[Methods]** The db/db mice were orally administered with curcumin and berberine for 28 days. Real Time RT-PCR was used to detect G-6-Pase, LDLR and AGF mRNA expression in liver. **[Results]** Treating db/db mice with curcumin, berberine and its compatibility, curcumin low-dose (19.5 mg/kg), berberine high-dose (144 mg/kg) could down-regulate the expression of LDLR in liver, but without significant effect on AGF mRNA. **[Conclusion]** Compatibility of berberine and curcumin, may regulate the expression of glucose and lipid metabolism-related genes mRNA and its effects are better than the separated administration group.

**Key words:** curcumin; berberine; compatibility; db/db mice; glucose and lipid metabolism