

氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯衍生物对高脂血症模型大鼠的降血脂及抗氧化作用研究[△]

梁观明*, 许军#, 谢燕飞, 黄黎敏, 刘燕华, 唐祯(江西中医药大学药物化学学科组, 南昌 330004)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)41-3863-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.41.08

摘要 目的:研究氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯(AZ)衍生物对高脂血症模型大鼠的降血脂及抗氧化作用。方法:取10只大鼠作为空白对照组,另80只大鼠建立高脂血症模型后随机均分为模型组、AZ(83 mg/kg)组、AZ甲醇酯(86.3 mg/kg)组、AZ乙醇酯(89.3 mg/kg)组、AZ苯酚酯(99.5 mg/kg)组、AZ对氯苯酚酯(106.8 mg/kg)组、AZ对甲基苯酚酯(102.5 mg/kg)组和阳性对照(非诺贝特100 mg/kg)组。除空白对照组和模型组大鼠灌胃0.5%羧甲基纤维素钠生理氯化钠溶液外其余各组大鼠给予相应药物,每日1次,连续2周,每周称体质量2次。末次给药后禁食12 h静取血,测定血清中总胆固醇(TC)、高脂血症(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平和超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)活性。结果:与空白对照组比较,其他各组大鼠的体质量差异无统计学意义($P>0.05$);模型组大鼠血清中TC、TG、LDL-C、MDA水平均明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),HDL-C、SOD、CAT水平明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,AZ组及其衍生物组大鼠血清中TC、TG、LDL-C、MDA水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),SOD、CAT水平明显升高($P<0.01$),HDL-C水平仅阳性对照组明显增加($P<0.01$)。结论:AZ及其衍生物对高脂血症模型大鼠有一定的降血脂和抗氧化作用。

关键词 氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯;高脂血症;大鼠;降血脂;抗氧化

Lipid-lowering and Anti-oxidation Effects of (*E*)-3-[4-[2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoyloxy]-3-methoxyphenyl] Acrylic Acid Derivatives on Hyperlipidemia Model Rats

LIANG Guan-ming, XU Jun, XIE Yan-fei, HUANG Li-min, LIU Yan-hua, TANG Zhen(Laboratory for Pharmacology, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the lipid-lowering and anti-oxidation effects of chlorophenoxyacetic isobutyrate methoxy acrylate {(*E*)-3-[4-[2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoyloxy]-3-methoxyphenyl] acrylic acid, AZ} derivatives on hyperlipidemia model rats. METHODS: 10 rats were included into blank control group, and other 80 hyperlipidemia model rats were induced and randomly divided into model group, AZ (83 mg/kg) group, AZ methanol acetate (86.3 mg/kg) group, AZ ethanol ester (89.3 mg/kg) group, AZ phenol (99.5 mg/kg) group, AZ chlorophenol ester (106.8 mg/kg) group, AZ methyl phenol ester (102.5 mg/kg) group and positive control (fenofibrate 100 mg/kg) group. Except blank control group and model group were given 0.5% Sodium tylose sodium chloride physiological solution intragastrically, other groups were given relevant medicine once a day for consecutive 2 weeks. Body weights of rats were weighed twice a week, and blood samples were collected from vein after fasting for 12 h following last administration. The serum levels of TC, TG, LDL-C and HDL-C, and the activities of SOD, MDA and CAT were determined. RESULTS: Compared with blank control group, body weight of rats had no statistically significant difference ($P>0.05$); the serum levels of TC, TG, LDL-C and MDA were increased significantly in model rats ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the serum levels of HDL-C, SOD and CAT were decreased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, the serum levels of TC, TG, LDL-C and MDA were decreased significantly in AZ group and other derivatives group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the serum levels of SOD and CAT were increased significantly ($P<0.01$); the level of HDL-C was increased significantly in positive control group ($P<0.01$). CONCLUSIONS: AZ and its derivatives have certain lipid-lowering and anti-oxidation effect in hyperlipidemic model rats.

KEYWORDS (*E*)-3-[4-[2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoyloxy]-3-methoxyphenyl] acrylic acid; Hyperlipidemia; Rats; Lipid-lowering; Anti-oxidation

[△] 基金项目:江西省科技支撑专项(No.20121BBG70022);江西省卫生厅科技计划资助项目(No.20122028);2011年江西中医学院研究生教育创新计划立项项目(No.JZYC11B03)

* 硕士研究生。研究方向:药物化学结构修饰。E-mail: lgm_870207@163.com

通信作者:教授。研究方向:药物活性物质产业化大开发。E-mail: xujun881@163.com

随着生活水平的提高,由高脂血症导致的动脉粥样硬化、冠心病等心血管疾病发病率逐年升高,并伴有年轻化趋势,寻找低毒有效的新降血脂药物已成为药物研究的重点之一^[1]。氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯{(*E*)-3-[4-[2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoyloxy]-3-methoxyphenyl] acrylic acid, AZ}系将化学成分阿魏酸为母核通过化学结构筛选及结构改造所得的有降血脂活性的全新化合物^[2];而AZ衍生物是以AZ

为先导化合物,经过结构改造筛选,通过化学结构修饰,所设计合成的一系列全新化合物,对开发新的降血脂药物有重大意义。通过临床前动物实验研究发现,AZ能较好地从胃肠道吸收,进入血液后代谢为氯苯氧异丁酸^[3]。通过对其药效学的深入研究,已证明AZ为一种有效的降血脂候选药物^[4],对高脂饲料所致大鼠高脂血症有着显著的改善作用^[5]。本实验筛选出5个AZ衍生物(AZ甲醇酯、AZ乙醇酯、AZ苯酚酯、AZ对氯苯酚酯、AZ对甲基苯酚酯),通过观察其对高脂血症模型大鼠的血清生化指标和超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响,研究AZ衍生物的降血脂及抗氧化作用,为系统研究AZ及其衍生物药效提供数据参考,为进一步寻找更加稳定有效的AZ衍生物奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Dimension RXL Max全自动生化分析仪(德国Siemens公司);XL2100K制备型超速离心机(美国Beck-Coulter Optima公司);酶标仪(美国Biotek公司)。

1.2 药品与试剂

AZ、AZ甲醇酯、AZ乙醇酯、AZ苯酚酯、AZ对氯苯酚酯、AZ对甲基苯酚酯(江西中医药大学药物化学学科组提供,批号:20121208、20121225、20121230、20130110、20130112、20130120,纯度:均大于99%);非诺贝特片(上海黄海制药有限公司,批号:20110921,规格:每片0.1g);血清总胆固醇(TC)、高脂血症(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒(美国Siemens公司);SOD测定试剂盒(批号:20120917)、MDA测定试剂盒(批号:20120920)、CAT测定试剂盒(批号:20120920)均购自南京建成生物研究所。

1.3 动物

SD大鼠90只,♀♂各半,体质量180~220g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2009-0004。

1.4 饲料

高脂饲料的配方:基础饲料87.3%(由江西中医药大学动物中心提供),猪油10%、胆固醇2%、胆盐0.5%、丙基硫氧嘧啶0.2%(上海蓝季科技有限公司)。

2 方法

2.1 建模与分组^[6-8]

取大鼠90只,实验前适应性饲养1周,随机取10只作为空白对照组,♀♂分笼饲养,每笼5只,给予普通饲料喂养;剩余80只大鼠给予高脂饲料喂养4周,禁食12h(不禁水)后静脉取血分离血清,于自动生化分析仪上测定血清生化指标(TC、TG、LDL-C、HDL-C),根据血脂水平将大鼠随机分为模型组、AZ(83 mg/kg)组、AZ甲醇酯(86.3 mg/kg)组、AZ乙醇酯(89.3 mg/kg)组、AZ苯酚酯(99.5 mg/kg)组、AZ对氯苯酚酯(106.8 mg/kg)组、AZ对甲基苯酚酯(102.5 mg/kg)组和阳性对照(非诺贝特100 mg/kg)组,每组10只,♀♂分笼饲养,每笼5只。

2.2 给药

空白对照组大鼠一直灌胃给予普通饲料,从第5周开始在其他组大鼠给药时灌胃给予等体积的0.5%羧甲基纤维素钠生理氯化钠溶液;其余各组大鼠持续给予高脂饲料,从第5周(29 d)开始,各给药组大鼠分别灌胃给予相应药物,模型组大

鼠灌胃给予等体积0.5%羧甲基纤维素钠生理氯化钠溶液。给药周期为2周(第5、6周),每日1次,自由摄食饮水。每周称体质量2次,根据体质量调整给药剂量。

2.3 指标检测

给药期间,密切观察记录各组大鼠的行为活动、饮食、排便和排尿情况。末次给药后禁食12h静脉取血,采用自动生化分析仪测定血清生化指标,测定试剂盒测定血清中SOD、MDA、CAT活性变化。

2.4 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验结果的2个独立组样本采用SPSS 13.0进行独立样本 t 检验,多组样本采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠高脂血症模型的鉴定

与空白对照组比较,高脂饲料饲养的大鼠血清中TC、TG、LDL-C含量均明显升高,HDL-C含量明显降低($P < 0.01$),表明大鼠高脂模型建立成功。

3.2 AZ衍生物对高脂血症大鼠基本情况和体质量的影响

给药期间,各组大鼠毛色光洁、行为活动、食欲及二便情况均正常,未出现异常体征,未发生自然死亡。与空白对照组比较,其余各组大鼠体质量差异均无统计学意义($P > 0.05$),具体结果见表1。

表1 各组大鼠体质量变化($\bar{x} \pm s, g, n=10$)

Tab 1 The changes of body weight of rats in each group($\bar{x} \pm s, g, n=10$)

组别	给药前	给药1周后	给药2周后
空白对照组	259±5.1	266±6.5	283±8.5
模型组	265±5.9	279±4.5	296±3.8
AZ组	247±4.5	261±5.1	277±5.6
AZ甲醇酯组	261±3.9	278±3.0	290±2.1
AZ乙醇酯组	260±4.6	270±5.7	293±7.8
AZ苯酚酯组	264±7.3	278±7.3	291±9.1
AZ对氯苯酚酯组	269±3.8	285±2.8	296±3.5
AZ对甲基苯酚酯组	274±8.1	283±4.2	293±4.7
阳性对照组	268±4.3	276±3.2	285±4.6

3.3 AZ衍生物对高脂血症大鼠血清生化指标的影响

与模型组比较,AZ组、AZ甲醇酯组、AZ乙醇酯组、AZ苯酚酯组、AZ对氯苯酚酯组、AZ对甲基苯酚酯组、阳性对照组大鼠血清中TC、TG和LDL-C含量均降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$);各AZ组大鼠血清中HDL-C含量差异无统计学意义($P > 0.05$),阳性对照组大鼠血清中HDL-C含量明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明,AZ、AZ甲醇酯、AZ乙醇酯、AZ苯酚酯、AZ对氯苯酚酯和AZ对甲基苯酚酯对高脂血症模型大鼠有降低血清TC、TG和LDL-C含量的作用,但对增加血清HDL-C的效果不明显。AZ降低大鼠血清TC、TG和LDL-C含量的作用与非诺贝特相当,差异无统计学意义($P > 0.05$)。AZ衍生物降低大鼠血清TC、TG和LDL-C含量的作用与AZ相当,差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清生化指标的比较见表2。

3.4 AZ衍生物对高脂血症大鼠血清中SOD、MDA、CAT活性的影响

与空白对照组比较,模型组大鼠血清中SOD、CAT活性均降低,MDA活性升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模

表2 各组大鼠血清生化指标的比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Comparison of biochemical indicators of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	TC,mmol/L	TG,mmol/L	LDL-C,mmol/L	HDL-C,mmol/L
空白对照组	2.64±0.34	1.34±0.25	0.66±0.17	1.31±0.23
模型组	15.40±0.91**	2.39±0.47**	2.76±1.03**	0.79±0.66**
AZ组	10.29±0.63***	1.53±0.35*	0.86±0.26*	0.82±0.55**
AZ甲醇酯组	10.41±0.45***	1.49±0.13*	0.93±0.19**	0.73±0.13**
AZ乙醇酯组	10.39±0.23***	1.58±0.32*	0.96±0.25**	0.87±0.28**
AZ苯酚酯组	10.27±0.51***	1.43±0.21*	0.84±0.37*	0.83±0.16**
AZ对氯苯酚酯组	10.63±0.13***	1.37±0.27*	1.01±0.26***	0.90±0.20**
AZ对甲基苯酚酯组	10.81±0.72***	1.56±0.48*	0.90±0.15**	0.76±0.15**
阳性对照组	9.98±0.43***	1.46±0.43*	0.75±0.34*	1.25±0.38*

与空白对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较: # $P<0.01$

vs. blank control group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group: # $P<0.01$

型组比较,各AZ组和阳性对照组大鼠血清中SOD、CAT活性均升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);各AZ组大鼠血清中MDA活性均降低,差异具有统计学意义($P<0.01$);阳性对照组大鼠血清中MDA活性差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠血清中SOD、MDA和CAT活性比较见表3。

表3 各组大鼠血清中SOD、MDA和CAT活性比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Comparison of SOD, MDA and CAT activity in serum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SOD,u/kg	MDA,nmol/L	CAT,u/ml
空白对照组	85.77±2.34	7.35±0.98	2.67±0.24
模型组	59.49±0.91*	8.94±1.43*	1.65±1.09*
AZ组	98.47±1.49**	5.54±1.47**	5.27±0.64**
AZ甲醇酯组	93.41±0.32**	5.98±1.53**	5.13±0.22**
AZ乙醇酯组	91.12±1.26**	6.05±0.39**	4.96±0.45**
AZ苯酚酯组	90.33±2.41**	6.23±0.91**	4.88±1.07**
AZ对氯苯酚酯组	90.74±2.01**	5.74±1.07**	4.72±1.16**
AZ对甲基苯酚酯组	93.15±0.76**	5.83±1.28**	4.90±0.14**
阳性对照组	110.38±2.34**	7.49±0.23*	7.21±0.79**

与空白对照组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: # $P<0.05$, ** $P<0.01$
vs. blank control group: * $P<0.01$; vs. model group: # $P<0.05$, ** $P<0.01$

4 讨论

心脑血管疾病及高血脂是近年来威胁人类生命的主要疾患,预防心脑血管疾病及降血脂药物的研制一直是医药科技工作者关注的热点,大量流行病学、病理学观察及临床干预研究表明,血脂水平升高是心脑血管疾病的主要独立危险因素。高脂血症是诱发心血管病和动脉粥样硬化的重要因素之一,而动脉粥样硬化和高血黏度是脑血管病和冠心病的首要诱因。当血清LDL-C浓度升高时,动脉壁内脂质特别是胆固醇酯增多,沉积到一定程度时可引起中膜平滑肌组织大量增殖,促进动脉粥样硬化的发生、发展^[9]。而HDL-C被称为血管清道夫,能将外围组织和血液中的胆固醇运送至肝脏进行代谢,具有抗动脉粥样硬化作用。

对于本文各衍生物的给药剂量的确认:首先AZ作为全新结构的先导化合物,亦可看作对氯苯氧异丁酸结构改造而来,

故选用药物对氯苯氧异丁酸衍生物氯贝特为标准等摩尔质量换算出给药剂量;其次前期实验证明AZ的给药剂量83 mg/kg(拟定临床给药剂量的10倍)也有较好的降血脂活性,其各衍生物则也以这个剂量等摩尔质量换算出来^[4]。本实验结果表明,AZ、AZ甲醇酯、AZ乙醇酯、AZ苯酚酯、AZ对氯苯酚酯、AZ对甲基苯酚酯能显著降低高脂血症模型大鼠的血清TC、TG和LDL-C含量水平,但对增加血清HDL-C的效果不明显,原因可能为需要更高剂量和(或)更长的实验周期才能明显增加血清HDL-C含量。

SOD是体内最重要的抗氧化酶之一,被誉为自由基的清除剂,其通过抑制过氧化脂质反应,减少MDA和自由基的产生。MDA为氧自由基氧化细胞膜上磷脂形成的脂质过氧化物的稳定存在形式,可反映机体内脂质过氧化的程度。当血脂升高时,氧自由基生成增加,脂质过氧化作用增强,MDA产生增多,SOD消耗增多,活力降低,造成氧自由基堆积。CAT是清除H₂O₂的主要酶,减少自由基的生成。其与SOD发生协同作用减少氧自由基的产生,防止脂质过氧化对机体造成的损害。而本实验中5个AZ衍生物能显著升高血清SOD、CAT活性,显著降低MDA活性,由此可见,AZ衍生物可增强机体抗氧化能力,其进一步提示AZ衍生物的降血脂作用可能与其增强抗氧化活力、预防脂质过氧化有关。

参考文献

- [1] 赵士魁,周伟澄.降血脂药物研究进展[J].中国医药工业杂志,2009,40(7):536.
- [2] Chen XB, Xu J, Zhao P, et al. Lipid lowering activity of (E)-3-[4-[2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoyloxy]-3-methoxyphenyl] acrylic acid (AZ) in hyperlipidemic rats [C]. The International Conference on Bioengineering: Chemistry and Environment Science, 2011:7 664.
- [3] 汪风华,许军,唐祯,等.氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯代谢物在大鼠体内的药动学[J].中国医院药学杂志,2012,32(11):844.
- [4] 赵坡,许军,陈小兵,等.对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯的小鼠急性毒性和大鼠长期毒性[J].中国药理学与毒理学杂志,2011,25(4):391.
- [5] 唐祯,许军,徐彭,等.阿魏酸结构改造新化合物对大鼠高脂血症的影响及机制[J].时珍国医国药,2013,24(6):1 369.
- [6] 吴栩,韦伟标,刘少斌.高脂血症大鼠模型4种造模方法的筛选及优化[J].动物医学进展,2013,34(9):75.
- [7] 朱竟赫,赵金明,秦文艳,等.高脂血症实验动物模型研究概述[J].实验动物科学,2012,29(2):48.
- [8] 刘雪梅,吴符火.几类高脂血症动物模型的比较[J].中西医结合学报,2004,2(2):132.
- [9] 傅颖,梅松,陈建国,等.茶多酚对高脂大鼠体重及血清中脂代谢水平的影响[J].中国卫生检验杂志,2009,19(11):2 506.

(收稿日期:2014-02-11 修回日期:2014-05-20)