

紫甘蓝花色苷对动脉粥样硬化兔血脂的调节作用

朱振宝^{1,2}, 王艳斐¹, 易建华^{1,2}

(1. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021)

(2. 陕西省食品加工工程技术研究中心, 陕西西安 710021)

摘要: 本文研究了紫甘蓝花色苷(RCA)对动脉粥样硬化兔血脂的调节作用。新西兰大白兔分为正常对照组、模型对照组、RCA低、中、高剂量组和阳性对照组(n=8)。正常对照组以普通饲料喂养,其他组均以高脂饲料喂养,6周后,RCA低、中、高三个剂量组分别灌胃30、60、90 mg/(kg d)体重的花色苷,阳性对照组灌胃5 mg/(kg d)体重的辛伐他汀(simvastatin),模型对照组灌胃2 mL/(kg d)体重生理盐水。实验第6周和10周分别检测兔子血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等指标,10周后取血处死,取主动脉作病理形态学观察。结果发现辛伐他汀和RCA能明显降低兔子血清TG、TC、LDL-C的含量,病理切片显示,紫甘蓝花色苷可减轻动脉粥样硬化斑块等病理损伤,揭示RCA对高血脂和动脉粥样硬化具有重要防护作用,且呈现剂量-效应关系。

关键词: 紫甘蓝花色苷; 动脉粥样硬化; 高血脂

文章编号: 1673-9078(2016)2-7-11

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.002

Effect of Red Cabbage Anthocyanins in Regulating the Blood Lipid Profile of Atherosclerotic Rabbits

ZHU Zhen-bao^{1,2}, WANG Yan-fei¹, YI Jian-hua^{1,2}

(1. School of Food Sciences and Bioengineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

(2. Research Center of Food Process Engineering and Technology in Shaanxi Province, Xi'an 710021, China)

Abstract: In this study, the influence of red cabbage anthocyanins (RCAs) in regulation of the blood lipid profile of atherosclerotic rabbits was studied. New Zealand white rabbits were divided into normal control group, model control group, low-, medium-, and high-dose anthocyanin groups, and positive control (simvastatin) group (n = 8). The normal control group was fed an ordinary diet and the other groups were fed high-fat diet. After six weeks, the rats of the low-, medium-, and high-dose anthocyanin groups were administered 30, 60, and 90 mg/(kg d) anthocyanin by gavage, respectively; the positive control group received 5 mg/(kg d) simvastatin; and the model group received 2 mL/(kg d) physiological saline. Serum total cholesterol (TC), triglycerides (TGs), and low-density lipoprotein (LDL-C) were measured after 6 and 10 weeks. After 10 weeks, the rabbits were sacrificed, and the aorta was collected for pathomorphological observation. Results showed that RCA and simvastatin significantly reduced serum TC, TGs, and LDL-C content in the rabbits. Histological sections demonstrated that RCA could mitigate atherosclerotic plaque and other atherosclerotic damages, demonstrating its important, protective, and dose-dependent effects on atherosclerosis and hyperlipidemia.

Key words: red cabbage anthocyanins (RCA); atherosclerosis; hyperlipidemia

花色苷(anthocyanin)是具有 2-苯基苯并吡喃(2-phenylbenzopyrylium)结构的一类糖苷衍生物,为植物界广泛分布的一种水溶性色素。花色苷在深色浆果、蔬菜、薯类和谷物种皮中的含量较为丰富,使其呈红色、紫色乃至蓝色^[1-2]。花色苷除作为天然色素,更多的功效在于它的健康效应^[3]。据报道,花色苷具有多

种生物活性,能预防慢性疾病和退行性疾病,如心脑血管疾病^[4]和癌症^[5],这些健康效应主要归功于花色苷的抗氧化能力,花色苷分子结构上含有多个酚羟基,特别是苯基 B 环 4 位羟基和 3,4 位的邻二羟基,可以通过自身氧化释放电子,直接清除各种自由基,抑制氧化^[6-7]。

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是一种严重危害人类健康的常见病,是冠心病、脑血管病和血栓栓塞性疾病等缺血性心脑血管的主要病理基础。近年来研究认为 AS 是慢性炎症性病变,炎症从 AS 斑块的

收稿日期: 2015-02-06

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2015JM3085)

作者简介: 朱振宝(1971-),男,博士,副教授,研究方向: 功能食品与人类营养

形成、生长到破裂,构成了其全部病程的基础,但血脂代谢紊乱仍然是AS发生的危险因素之一。多项研究证实,膳食添加黑米皮或黑米皮花色苷提取物,都能够有效地清除Apo-E基因缺陷小鼠体内的活性氧自由基,抑制LDL的氧化,显著抑制动脉粥样硬化不稳定斑块的形成^[8-9]。

紫甘蓝(red cabbage)属十字花科芸薹属,又名紫包菜,其色泽鲜艳,含有大量的天然色素。李桂兰等测定了我国常见蔬菜和水果中的花色苷含量,检测结果表明,紫包菜中的花色苷含量最高,其中花色苷主要是矢车菊素,含量高达163.67 mg/100 g鲜重蔬菜,甚至远远高于其他蔬菜^[10]。紫包菜可不经烹调而食用,其中的花色苷破坏较小,通过食用紫甘蓝,能提高花色苷的摄入。我们前期利用高速逆流色谱技术,从紫甘蓝中分离、纯化出3种主要的花色苷化合物^[11],本文以新西兰白兔为实验动物,研究紫甘蓝花色苷对动脉粥样硬化兔血脂的调节作用,同时观察不同剂量RCA对实验动物动脉粥样硬化斑块的病理损伤作用,通过实验可以揭示紫甘蓝花色苷抗动脉粥样硬化的生理活性及其作用机制,为新的预防和干预心血管疾病功能食品和药物研发提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胆固醇和胆酸钠均为饲料级,购自安徽天启化工科技有限公司;蛋黄粉为食品级,西安双德生物技术有限公司;甲基硫氧嘧啶,药品级,购自西安科创药业有限责任公司;辛伐他汀,药品级,山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司;动物饲料购自第四军医大学动物实验中心;血清测定试剂盒,购自南京建成科技有限公司。

1.2 主要仪器

低速自动平衡离心机,(B160A北京白洋医用离心机有限责任公司);全自动生化分析仪(HITACHI 7170S日本日立公司);冰冻切片机(Leica CM1900德国);数码荧光显微镜及成像系统(BK-FL重庆奥特光学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

新西兰大耳白兔48只,雌雄各半,清洁级,体重 2.0 ± 0.2 kg,购于西安交通大学医学院实验动物中心。

实验动物饲养在西安医学院标准级动物房内进

行。动物房干净整洁,通风良好,温度恒定 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度50%,24 h照明。

1.3.1 动脉粥样硬化模型的建立

实验动物单只分笼饲养,饲喂普通饲料,自由饮水进食。适应环境1周后,空腹称量体重,并随即分为正常对照组($n=8$)和高脂模型组($n=40$),正常对照组普通饲料喂养,高脂模型组用高脂饲料喂养,喂养6周。高脂饲料配方为:0.7%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.5%甲基硫氧嘧啶、10%蛋黄粉、88.3%普通饲料。6周后,空腹测量体重,并于耳中动脉处采血检测血清指标。

1.3.2 实验动物分组及给药

按照血脂水平,将高脂模型组兔子分为5组,分别为:花色苷低剂量组I($n=8$)、中剂量组II($n=8$)、高剂量组III($n=8$),阳性对照组($n=8$),模型对照组($n=8$)。花色苷组每天分别灌胃30、60、90 mg/kg体重的紫甘蓝花色苷,阳性对照组每天灌胃5 mg/kg体重的辛伐他汀,模型对照组灌胃2 mL/kg体重的生理盐水,以上5组均喂养高脂饲料,自由进食饮水,而正常对照组继续用普通饲料喂养。继续饲喂4周后,称量体重,耳中动脉处取血检测血脂水平,并处死实验兔子,取主动脉做病理切片。

1.3.3 检测指标与方法

饲喂6周(动脉粥样硬化模型建立)和10周(给药4周)后分别于实验兔子耳中动脉处取血,待血液自凝后,4000 r/min离心10 min,留取血清用于测定TG、TC、HDL-C、LDL-C。所有血样均保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待测。

血清的TG、TC、HDL-C、LDL-C含量应用全自动生化分析仪测定。

1.3.4 病理形态学观察

实验开始后的第10周末,实验兔子用气栓法处死,然后取2 cm主动脉,放入10%福尔马林内浸泡固定,HE染色,主动脉做冰冻切片,低温干燥保存,用于光镜观察。

1.4 数据处理与统计分析

数据统计用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示,各組间比较采用t检验,数据统计分析采用SPSS16.0软件包来完成。 $p<0.05$ 为显著, $p<0.01$ 为极显著。

2 结果与分析

2.1 实验兔子体重的变化

表 1 实验兔子体重变化情况 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Changes in the weight of experimental rabbits)

| 组别 | 数量 (n) | 体重/kg | | |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0 w | 6 w | 10 w |
| 正常对照组 | 8 | 1.89±0.09 | 2.93±0.25 | 3.72±0.37 |
| 高脂模型组 | 40 | 1.93±0.12 | 2.84±0.23 | 3.51±0.52 |

在整个实验过程中,新西兰大白兔总体生长情况良好,正常对照组无一例死亡,高脂饲料组,在建模过程中死亡 5 只,其他均生长良好,各项体征正常。实验不同时期,不同实验组兔子的体重变化见表 1。从表 1 中可以看出,与正常对照组相比,在实验第 6 周和第 10 周,高脂饲料组的兔子体重稍低于正常对照组,但是并不显著,不具有统计学意义,这说明实验

兔子的体重不受高脂饲料的影响。

2.2 实验兔子血脂水平变化

表 2 是不同组实验兔子饲喂高脂饲料 6 周后(给药前)检测血清各指标情况。由表 2 中可以看出,与正常对照组相比,各实验动物组血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 等指标与正常对照组均存在极显著性差异($p<0.01$),说明动脉粥样硬化动物模型建立成功。高血脂是 AS 发生发展的一个重要的危险因素,本研究通过饲喂 0.7%胆固醇造成兔实验性高脂血症而成功建立了 AS 动物模型也证明血脂升高确实可以引起 AS。

表 2 给药前各组实验兔子血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 指标 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Content of serum TC, TG, HDL-C, and LDL-C of experimental rabbits before receiving study drug

| 组别 | 剂量 (mg/kg) | 数量 (n) | 给药前(mmol/L) | | | |
|--------------|---------------|-----------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C |
| 正常对照组 | - | 8 | 1.85±0.21 | 1.65±0.23 | 0.23±0.09 | 0.46±0.10 |
| 模型对照组 | - | 7 | 14.57±4.33 ^a | 2.57±2.26 ^a | 4.57±1.63 ^a | 7.12±2.53 ^a |
| 辛伐他汀组 | 5 | 6 | 14.76±1.67 ^a | 1.89±1.07 ^a | 4.50±0.69 ^a | 7.16±1.06 ^a |
| 花色苷组 I (低) | 30 | 8 | 14.81±7.61 ^a | 2.50±2.08 ^a | 4.70±2.65 ^a | 7.53±4.23 ^a |
| 花色苷组 II (中) | 60 | 7 | 15.50±5.71 ^a | 2.72±1.70 ^a | 5.51±2.60 ^a | 8.05±3.46 ^a |
| 花色苷组 III (高) | 90 | 7 | 15.29±2.60 ^a | 3.85±4.83 ^a | 4.57±0.98 ^a | 7.38±1.71 ^a |

注:“-”表示为未给药;与正常组比较: a: $p<0.01$ 。

表 3 是不同组实验兔子给药 4 周后血脂的变化情况,由表 3 中可以看出,与正常对照组相比,其他各组的血清 TC、HDL-C、LDL-C 均有不同程度的升高, TG 则不存在显著差异;而与模型对照组相比,其他各组兔子的血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 均有不同程度的降低。由表 3 同时可以发现,与模型对照组相比,辛伐他汀和花色苷 II、III 组均具有极显著降低 LDL-C 和升高 HDL-C 的作用 ($p<0.01$),流行病学研究表明,每降低 1%的低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)就能够降低 1%的心血管疾病的发生,每增加 1%高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)就能够降低 3%的发病^[12]。

从表 3 还可以看出,随着花色苷剂量的增加, I、II、III 实验组兔子血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 含量越低,揭示紫甘蓝花色苷(PCA)对动脉硬化兔血脂的调节能力可能存在剂量-效应关系。同模型对照组相比,当饲喂花色苷<30 mg/kg 体重每天,花色苷组 I 对兔子的血脂调节作用不显著($p<0.01$),进一步说明了存在这种效应-剂量关系。就总体水平而言,抗动脉粥样硬化药物辛伐他汀调节兔子血脂的能力高于紫甘蓝花色苷,但花色苷组(高剂量)III 血清中各指标已经和辛伐他汀的水平接近。

表 3 给药后各组实验兔子血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 的含量变化 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Content of serum TC, TG, HDL-C, and LDL-C of experimental rabbits after receiving study drug

| 组别 | 剂量 (mg/kg) | 数量 n | 给药后(mmol/L) | | | |
|--------------|---------------|---------|-------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|
| | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C |
| 正常对照组 | - | 8 | 1.79±0.22 | 1.62±0.23 | 0.30±0.05 | 0.45±0.05 |
| 模型对照组 | - | 7 | 13.84±2.55 ^a | 1.83±0.53 | 4.06±1.00 ^a | 5.79±1.31 ^a |
| 辛伐他汀组 | 5 | 6 | 6.75±2.13 ^a | 1.44±0.54 | 1.81±0.58 ^{ab} | 2.66±0.83 ^{ab} |
| 花色苷组 I (低) | 30 | 8 | 11.71±2.95 ^a | 1.72±0.78 | 3.48±1.24 ^a | 4.99±1.61 ^a |
| 花色苷组 II (中) | 60 | 7 | 9.90±3.11 ^{ab} | 1.36±0.57 | 2.77±1.04 ^{ab} | 4.17±1.49 ^{ab} |
| 花色苷组 III (高) | 90 | 7 | 8.97±2.94 ^{ab} | 1.41±0.59 | 2.44±0.88 ^{ab} | 3.61±1.31 ^{ab} |

注：“-”表示为未给药；与正常对照组比较：a: $p < 0.01$ ；与模型对照组比较：b: $p < 0.01$ 。

2.3 病理形态学观察

肉眼观察，正常对照组主动脉内膜光滑，无粥样斑块形成。模型对照组主动脉内膜粗糙、不平，并有白色乳状小突起。辛伐他汀组和花色苷组主动脉内膜，上述病变较模型对照组均有不同程度减轻。HE 染色，图 1、2 分别是兔子主动脉血管 AS 病变在 10、40 光镜下变化。

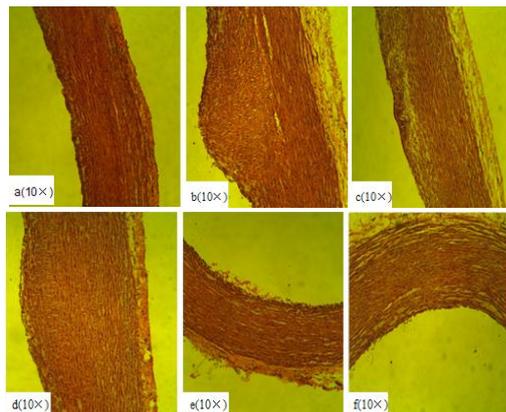


图 1 10 倍光镜下实验兔子主动脉血管的 AS 病理变化

Fig.1 Pathological changes of the rabbit aorta as viewed under an optical microscope ($\times 10$)

注：a: 正常对照组；b: 模型对照组；c: 花色苷组 I (低)；d: 花色苷组 II (中)；e: 花色苷组 III (高)；f: 辛伐他汀组。

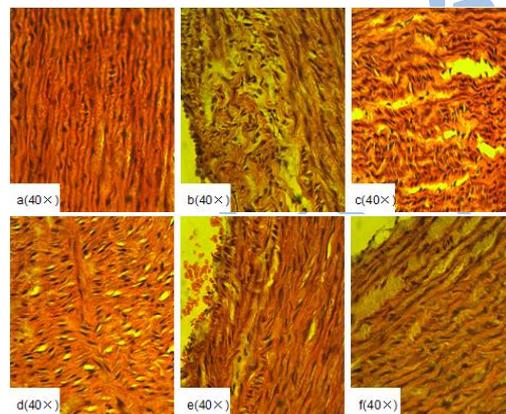


图 2 40 倍光镜下兔子主动脉血管的 As 病理变化

Fig.2 Pathological changes of the rabbit aorta as viewed under an optical microscope ($\times 40$)

注：a: 正常对照组；b: 模型对照组；c: 花色苷组 I (低)；d: 花色苷组 II (中)；e: 花色苷组 III (高)；f: 辛伐他汀组。

由图 1 可以看出，正常对照组：血管腔呈圆形，内膜完整且光滑，内皮下组织连接紧密，间隙较小，平滑肌细胞排列整齐，没有脂质沉积；模型对照组：内膜不平，粗糙，血管壁和内膜明显增厚，并向内成乳状突起，平滑肌细胞排列紊乱，且组织明显增生，向内膜突起，组织间隙较大，有明显的脂质沉积；花

色苷低剂量组 (30 mg/kg)：内膜与管腔有明显增厚，内膜不平，有明显的凹凸不平，平滑肌细胞排列杂乱无章，有明显增生 (图 2)，组织间间隙较大，伴有断层现象，有明显的脂质沉积；花色苷中剂量组 (60 mg/kg)：内膜不平，粗糙，有一定程度的增厚，少量突起，平滑肌细胞排列不规则，有明显增生，少见或不见脂质沉积；花色苷高剂量组 (90 mg/kg)：内膜基本整齐，有增厚现象，平滑肌细胞排列基本规则，无明显增生，内膜上附有少量泡沫细胞，少见或不见脂质沉积；辛伐他汀组：内膜基本平整，少有增厚，但不明显，平滑肌细胞排列基本正常，无明显增生，组织间间隙较小，少见或不见脂质沉积。

从病理切片还可以看出，与模型对照组相比，辛伐他汀组的主动脉血管变化较花色苷组的变化小，说明抗动脉粥样硬化药物辛伐他汀在消退动脉硬化斑块的能力比花色苷强。花色苷 I、II、III 组病理切片显示，低剂量组兔子主动脉血管的变化较大，组织增生严重，脂质沉积比较明显，而高剂量组的主动脉血管变化较小，进一步说明，花色苷在预防动脉硬化方面的效果与其浓度之间存在明显的量效关系。

3 结论

3.1 到目前为止，AS 的发病机制尚未完全清楚，存在多种学说，涉及多种危险因素。高血脂是 AS 形成过程中一个比较常见的症状，也是形成 AS 病变的一个重要因素，研究表明，血清中血脂水平的升高与 AS 的发生呈正相关，另外，大规模临床实验也证实，药物性降脂治疗是冠状 AS 性心脏病一级及二级预防的有效措施。此外，低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平的高低与 AS 的发生呈正相关，因为 LDL-C 通过 ApoE100 与细胞外基质之间的相互作用而沉积在动脉内皮组织下形成粥样硬化斑块^[13]，因此，调节血脂是防治 AS 的重要措施。马亚兵等发现，葡萄籽原花青素对血脂有调节作用，可通过降低 TC、LDL-C、TG、TG/HDL-C 和升高 HDL-C 等作用而发挥抗 AS 作用^[14]。

3.2 本研究发现实验兔子饲喂高脂饲料和胆固醇，能形成明显的动脉粥样硬化病变；在一定剂量范围，紫甘蓝花色苷能显著降低兔子血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量，从而起到降血脂的作用，且 RCA 与降血脂的能力大小之间存在明显的剂量-效应关系。病理切片显示，中、高剂量的 RCA 对动脉粥样硬化斑块的有一定的消退作用。实验结果揭示，高含量的花色苷可能是紫甘蓝

中重要的功能因子,对动脉粥样硬化具有干预作用。值得注意的是,花色苷有多种健康促进和疾病预防功效,包括抗炎、抗氧化和改善糖脂代谢等,紫甘蓝中花色苷以矢车菊素为主^[10],其调节血脂,抗动脉粥样硬化的途径和机制尚不明晰,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 郭红辉,凌文华.花色苷[J].营养学报,2013,35(6):525-528
GUO Hong-hui, LING Wen-hua. Anthocyanins [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2013, 35(6):525-528
- [2] Cerezo, A.B., Cuevas, E., Winterhalter, P. et al. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry [J]. Food Chemistry, 2010, 123:574-582
- [3] Wu X L, Prior R L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53: 2589-2599
- [4] Prior R L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage [J]. American Journal of Clinic Nutrition, 2003, 78: 570s-578s
- [5] Hou D X. Potential mechanism of cancer chemoprevention by anthocyanin [J]. Current Molecular Medicine 2003, 3: 149- 159
- [6] Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M D L, Páez-Hernández M E, et al. Chemical studies of anthocyanins: A review [J]. Food Chemistry, 2009, 113:859-871
- [7] Joseph M A, Lloyd W R, Ralph D W. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties [J]. Food Chemistry, 2004, 90:293-301
- [8] 牟海英,屈琪,刘静,等.花色苷对高脂血症血脂及体内氧化应激水平的影响[J].营养学报,2010,32(6):551-555
MOU Hai-ying, QU Qi, LIU Jing et al. Effect of anthocyanin on oxidative stress in subjects with hyperlipidemia [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2010, 32(6): 551-555
- [9] Xia XD, Ling WH, Ma J. et al. An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Journal of Nutrition, 2006, 136: 2220-2225
- [10] 李桂兰,凌文华,郎静,等.我国常见蔬菜和水果中花色苷含量[J].营养学报,2010,32(6):592-597
LI Gui-lan, LING Wen-hua, LANG Jing, et al. The anthocyanin contents of common vegetables and fruits in China [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2010, 32(6):592-597
- [11] 易建华,潘毛头,朱振宝.高速逆流色谱分离纯化紫甘蓝色素[J].食品与机械,2012,28(6):129-132
YI Jian-hua, PAN Mao-tou, ZHU Zhen-bao. Isolation and purification of anthocyanins by high-speed counter current chromatography from red cabbage [J]. Food & Machinery, 2012,28(6):129-132
- [12] 孙吉叶,蔡旭东,康秀娟,等.治疗高脂血症的新药研究进展[J].现代药物与临床,2012,27(5):435-441
SUN Ji-ye, CAI Xu-dong, KANG Xiu-juan, et al. Advances in studies on new drugs used for treatment of hyperlipidemia [J]. Drugs & Clinic, 2012, 27(5):435-441
- [13] Joyce C W, Amar M J, Lambert G, et al. The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and ApoE-knockout mice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99: 407-412
- [14] 马亚兵,高海青,由倍安,等.葡萄籽原花青素对动脉粥样硬化兔血脂的调节作用[J].中国药理学通报,2004,20(3): 325-329
MA Ya-bing, GAO Hai-qing, YOU Bei-an, et al. Effect of grape seed proanthocyanidin on the lipid profile of atherosclerosis in rabbits [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2004, 20(3): 325-329