

普洱茶茶褐素对高脂血症大鼠的治疗作用

彭春秀¹, 范艺凡², 谭超², 龚加顺²

(1. 云南农业大学园林园艺学院, 云南昆明 650201) (2. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201)

摘要: 本文探讨了不同分子量普洱茶茶褐素对高脂血症 SD 大鼠的治疗作用。通过 45 d 的治疗, 饲喂 TB1 和 RTB 的大鼠血清 TCTG 和 LDL 均显著低于高脂模型组 ($p < 0.01$), HDL 显著高于高脂模型组 ($p < 0.01$), 且 TG 与 HDL 与正常对照组无显著性差异。TB1 和 RTB 对肝脏组织中 HSL 酶活性影响不显著, 但在附睾组织和肠系膜组织中 HSL 活性极显著高于高脂模型组 ($p < 0.01$), 与正常对照组差异不显著 ($p > 0.01$)。同时, TB1 和 RTB 可显著抑制高脂血症大鼠脂肪组织 ACC 酶活性 ($p < 0.01$) 和 FAS 酶活性 ($p < 0.05$)。说明 TB1 和 RTB 可通过提高 HSL 活性来加速脂质代谢, 同时通过抑制 ACC 和 FAS 活性来减少脂肪酸合成。Western Blot 检测发现, TB1 和 RTB 有上调 HSL 蛋白表达、下调 ACC1 蛋白表达的作用。肝脏病理切片显示, TB1 和 RTB 能有效减缓和降低高脂血症大鼠肝脏脂肪变性的速度和程度。研究结果表明, TB1 是 RTB 的主要活性成分, 对高脂血症大鼠有一定的治疗作用。

关键词: 普洱茶; 茶褐素; 高脂血症大鼠; 治疗作用

文章编号: 1673-9078(2017)2-8-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.002

Therapeutic Effect of Pu-erh Tea Theabrownins of Different Molecular Weights on Hyperlipidemic Rats

PENG Chun-xiu¹, FAN Yi-fan², TAN Chao², GONG Jia-shun²

(1. College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The therapeutic effect of Pu-erh tea theabrownins (TB) with different molecular weights to the hyperlipidemia in a Sprague-Dawley (SD) rat model was explored. After 45 d of treatment, the levels of serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and low-density lipoprotein (LDL) of rats in the TB1 and crude TB (RTB) groups were significantly lower than those of the hyperlipidemia model group ($p < 0.01$). Furthermore, the level of high-density lipoprotein (HDL) in these rats was significantly higher than that of hyperlipidemia model group ($p < 0.01$); their TG and HDL levels were comparable to those of control rats. Enzymatic analysis showed that TB1 and RTB had no significant effect on the activity of hormone-sensitive lipase (HSL) in liver tissue. However, HSL activities in the epididymal and mesenteric tissues were significantly higher than those of the hyperlipidemia model group ($p < 0.01$), and these activities were not significantly different ($p > 0.01$) than those of the normal control. Furthermore, TB1 and RTB were able to significantly inhibit the activity of acetyl-CoA carboxylase (ACC) ($p < 0.01$) and fatty acid synthase (FAS) ($p < 0.05$) in the fatty tissue of hyperlipidemic rats. The results indicated that RTB and TB1 can increase HSL activity in the adipose tissue of hyperlipidemic rats to accelerate lipid metabolism and reduce fatty acid synthesis by inhibiting the activities of ACC and FAS. Western blot analysis demonstrated that TB1 and RTB could upregulate HSL protein expression and downregulate ACC1 protein expression. Liver biopsy showed that TB1 and RTB could also effectively reduce the rate and extent of hepatic steatosis in the hyperlipidemic rats. Together, the results showed that TB1 was the main active component of RTB and had certain therapeutic effects in hyperlipidemic rats.

Key words: Pu-erh tea; theabrownin; hyperlipidemic rats; therapeutic effect

茶叶的保健功能日益得到人们的关注, 开发茶色素产品是一种必然趋势。茶色素的健康功效也已引起

收稿日期: 2016-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260195)

作者简介: 彭春秀 (1977-), 女, 讲师, 研究方向: 植化及功效

通讯作者: 龚加顺 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 普洱茶化学及其功效、机理

医药界的高度重视, 并开发出了茶色素胶囊, 用于心血管疾病、高脂血症和动脉粥样硬化症等的治疗和预防^[1]。普洱茶是中国云南产的特色茶类, 具有调节血脂、降胆固醇和抗氧化等多种功效^[2-5]。在普洱茶固态发酵过程中, 多酚类物质含量大幅度下降, 而茶褐素类物质则大幅度升高^[6]。目前研究认为, 普洱茶茶褐素(theabrownin, TB)是普洱茶(熟茶)重要的活性成分,

含量可达 16.86%^[7], 它是一类性质类似于红茶茶褐素的高聚合物, 能溶于水而不溶于乙酸乙酯、乙醇和正丁醇等有机溶剂, 主要由含多苯环的褐色色素、多糖残基和蛋白残基组成, 主要的功能性基团为羟基、羧基、氨基以及甲基等基团, 具有酚类物质特性^[6]。初步研究表明, 茶褐素具有显著的抗疲劳和降血脂作用^[8-10]。由于茶褐素类物质组成复杂, 分子量大, 且分布广。因此, 较难明确其功效物质及其作用机制。为进一步探明普洱茶茶褐素降血脂组分, 本研究通过对普洱茶茶褐素按分子量大小进行分级, 分为分子量 >50 ku、5 ku~50 ku 和 <5 ku 三个部分 (简称 TB1、TB2 和 TB3), 分别研究不同分子量茶褐素对高脂血症大鼠的治疗作用, 揭示其对大鼠胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL) 和低密度脂蛋白 (LDL) 的影响, 明确不同部分普洱茶茶褐素的降脂效果, 并对脂肪组织中激素敏感性脂肪酶 (HSL)、脂肪酸合成酶 (FAS) 和乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 的活性进行测定, 利用 Western Blot 技术对酶蛋白的表达进行检测, 从关键酶学角度探讨普洱茶茶褐素调节血脂作用机制, 为创新利用普洱茶茶褐素提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大益牌普洱茶熟茶, 购自云南大益茶业集团有限公司, 唛号 7512; 批次 111; 生产日期: 2011 年 5 月 18 日; SD 雄性大鼠 [许可证号: SCXK(京)2012-0001]: 北京, 维通利华实验动物技术有限公司。洛伐他汀, 江苏太洋制药有限公司 (国药准字 H19990150); 激素敏感脂肪酶 (HSL)、脂肪酸合成酶 (FASn) 以及乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) ELISA 检测试剂盒 (美国 R&D Systems); 蛋白裂解液、BCA 试剂盒、蛋白 Marker 和 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (上海碧云天生物技术研究); SDS (美国 Sigma); Tris Base、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)、吐温 20 (Biosharp); 丙烯酰胺和 APS (电泳专用级) (美国 Amresco); HSL Antibody、FASn Antibody、Rabbit anti ACC1 Polyclonal antibody 和 HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (美国 Abcam 公司); 预染彩色蛋白 Marker (Thermo Fisher Scientific)。

仪器: 全自动生化仪 (东芝 TBA-40FR), 株式会社三广医疗; 垂直电泳 (Mini-PROTEAN Tetra Cell 4-gel), BIO-RAD; -80 °C 冰箱 (Forma 900), Thermo Fisher Scientific; 高速冷冻离心机 (0002322-08), 德国 Hettich 公司。

1.2 研究方法

1.2.1 茶褐素样品的制备

普洱茶茶样 → 10 倍蒸馏水浸提 2 次 → 过滤 → 合并滤液 → 减压浓缩 (65 °C, 0.07 MPa) → 乙醇醇沉 6 h (滤液: 无水乙醇 = 1:4, V/V) → 离心 (4000 r/min, 20 min) → 收集沉淀 → 真空冷冻干燥 → 粗茶褐素 (RTB) → 蒸馏水溶解 → 超滤膜分离 → 真空冷冻干燥 → 不同分子量茶褐素 (TB1 (>50 ku)、TB2 (5 ku~50 ku)、TB3 (<5 ku))。

1.2.2 不同分子量茶褐素对高脂血症大鼠的治疗作用研究

1.2.2.1 实验动物的分组与饲养管理

(1) 实验动物的选择

健康成年雄性 SD 大鼠 (许可证号: SCXK(京)2012-0001), 体重 180 g~200 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。符合健康标准^[11]。

(2) 饲养方法及管理

大鼠在空调动物饲养室中同室群笼饲养, 自由采食, 自由饮水。室温 20 °C ± 2 °C, 湿度 45%~60%。基础饲料由昆明医科大学动物实验中心提供, 配方: 玉米 35%、麦麸 25%、豆粕 25%、鱼粉 8%、酵母 2%、骨粉 2%、乳清粉 1%、盐 0.5%、菜油 0.5%、矿物添加剂 0.1%、复合维生素 0.03%、蛋氨酸 0.13%、赖氨酸 0.07% 和鱼肝油 0.05%。高脂饲料配方来源于卫生部 2003 年 2 月颁布的《保健食品检验与评价技术规范》, 配方: 基础饲料 78.8%、猪油 10%、蛋黄粉 10%、胆固醇 1% 和胆盐 0.2%^[12]。

(3) 实验大鼠组别设计

所有大鼠全部饲喂基础饲料, 自由采食、饮水, 喂养 1 周, 以适应环境和饲喂方式。1 周后根据总胆固醇 (TC) 基础值水平, 将大鼠分别随机分为 7 组, 每组 10 只大鼠, 具体分为: 正常对照组 (基础饲料+蒸馏水)、高脂模型组 (高脂饲料+蒸馏水)、洛伐他汀组 (高脂饲料+洛伐他汀)、TB1 组 (高脂饲料+TB1 (>50 ku))、TB2 组 (高脂饲料+TB2 (5 ku~50 ku))、TB3 组 (高脂饲料+TB3 (<5 ku)) 以及 RTB 组 (高脂饲料+RTB)。7 d 适应期结束后进入高脂模型建立期 (除正常对照组外, 其余各组均饲喂高脂饲料和蒸馏水, 共培养 45 d, 使大鼠具有高脂血症), 高脂模型建成后进行茶褐素治疗期 (培养 45 d)。

(4) 灌喂剂量

龚加顺等^[8]人研究表明, 受试物的 LD₅₀ > 10 g/kg 体重 (95% 可信限), 属实际无毒级物质。各种动物实验设计的剂量组应相当于人体推荐剂量 (折算为每公斤体重的剂量) 的 5~30 倍, 根据敬明武等人报道,

茶色素的人体推荐量为 2.7 g/60 kg BW^[13]。因此本试验中选择人体推荐量的 27 倍,即灌胃剂量 1215 mg/kg BW。按照每只大鼠的体重,称取一定量的受试物,溶于 3 mL 蒸馏水中,每日经口一次性灌胃,正常对照组和高脂模型组灌胃等量蒸馏水。洛伐他汀胶囊为常用临床降血脂药物,成人常用剂量为 10~20 mg,每日 1 次,最大剂量不超过 80 mg。因此选取人体最大剂量,即 1.1 mg/kg 作为阳性对照组大鼠的灌胃剂量^[14]。

1.2.2.2 待测血清制备

采血前禁食 12 h,乙醚麻醉,眼眶采血。收集血样室温放置 1 h 后,在 2000~2500 r/min 低速离心机离心 15 min,用移液器吸出上层血清 0.5 mL 分装于离心管中,待测。

1.2.2.3 大鼠血清中血脂指标的测定

采用全自动生化仪(日本东芝株式会社三广医疗公司,型号:TBA-40FR)分析。

1.2.2.4 待测肝脏及脂肪组织的制备

(1) 肝脏、附睾及肠系膜脂肪组织的制备

试验结束时乙醚麻醉,大动脉放血处死实验大鼠,解剖,摘取大鼠的肝脏组织、肠系膜脂肪组织、附睾脂肪组织迅速放入液氮中冷冻后,-80℃保存备用。

(2) 肝脏病理切片的制备

将大鼠脱颈椎处死,解剖,摘取新鲜肝组织称重后,从最大叶距边缘 5 mm 处取肝脏组织,并固定于 10%的甲醛溶液中。

1.2.2.5 指标的测定

(1) 脂代谢关键酶活性的测定

激素敏感性脂肪酶(Hormone-sensitive triglyceride lipase, HSL)、脂肪酸合成酶(Fatty Acid Synthetase,

FAS)、乙酰辅酶 A 羧化酶(Acetyl-CoA Carboxylase, ACC)活性测定采用美国 RD 公司的 ELISA 检测试剂盒。

(2) 肝脏病理变化

将固定好的肝脏组织脱水,石蜡包埋,切片,HE(苏木精-伊红染色)染色,显微镜观察^[15]。

(3) 脂肪代谢关键酶蛋白表达量测定

采用 HSL Antibody (1:500)、FASn Antibody (1:600)、Rabbit anti ACC1 Polyclonal antibody (1:1000)、alpha Tubulin Antibody (1:10000)、β-Actin Antibody (1:10000)。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,采用 SDS-PAGE 电泳,杂交时,用 PBS 或是封闭液稀释一抗:HSL Antibody (1:500)、FASn Antibody (1:600)、Rabbit anti ACC1 Polyclonal antibody (1:1000)、alpha Tubulin Antibody (1:1000),于 37℃ 摇 2~3 h 或是 4℃ 摇过夜。用含 1% Tween-20 的 PBS 洗膜三次,每次 10 min。加入用 PBS 或是封闭液稀释的相应的二抗:HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (1:10000),4℃ 过夜。再用含 1% Tween-20 的 PBS 洗膜三次,每次 10 min。按 ECL 显色试剂盒说明书显色、定影。

1.2.3 数据统计分析

数据以“平均值±标准差”表示,所有数据先进行 Grubbs 检验,以排除过失误差;经 G 检验合格的数据,采用 SPSS 16.0,用邓肯氏法进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 不同分子量普洱茶茶褐素对高脂血症大鼠血清脂质的影响

表 1 不同分子量茶褐素对高脂血症大鼠血清脂质含量的影响

Table 1 Effect of TB fractions with different molecular weights on the serum total cholesterol and triglycerides levels of hyperlipidemic rats (mmol/L)

组别	适应期 (7 d)		模型期 (45 d)		干预期 (45 d)	
	TC	TG	TC	TG	TC	TG
正常对照组	1.55±0.21 ^A	1.05±0.29 ^A	1.23±0.11 ^A	0.58±0.06 ^A	1.30±0.10 ^a	0.60±0.08 ^{ab}
高脂模型组	1.60±0.26 ^A	1.13±0.34 ^A	1.78±0.16 ^C	0.71±0.10 ^{BC}	1.86±0.10 ^c	0.83±0.09 ^c
洛伐他汀组	1.65±0.27 ^A	1.09±0.14 ^A	1.70±0.10 ^{BC}	0.82±0.18 ^C	1.38±0.07 ^a	0.52±0.15 ^{ab}
TB1 组	1.64±0.30 ^A	1.12±0.33 ^A	1.77±0.12 ^C	0.72±0.07 ^{BC}	1.60±0.11 ^b	0.48±0.14 ^a
TB2 组	1.82±0.35 ^A	1.01±0.20 ^A	1.56±0.17 ^B	0.70±0.08 ^B	1.67±0.21 ^{bc}	0.69±0.10 ^{bc}
TB3 组	1.80±0.27 ^A	1.07±0.28 ^A	1.64±0.28 ^{BC}	0.69±0.16 ^B	1.69±0.10 ^{bc}	0.60±0.14 ^{ab}
RTB 组	1.58±0.24 ^A	1.17±0.26 ^A	1.68±0.09 ^{BC}	0.72±0.10 ^{BC}	1.62±0.14 ^b	0.47±0.05 ^a

注:所有的数据为 mean±SD, n=10, ^{A-C}p<0.05, ^{a-c}p<0.01。

表 2 不同分子量茶褐素对高脂血症大鼠血清脂质含量的影响

Table 2 Effect of TB fractions with different molecular weights on the serum LDL and HDL content of hyperlipidemic rats (mmol/L)

组别	适应期 (7 d)		模型期 (45 d)		干预期 (45 d)	
	LDL	HDL	LDL	HDL	LDL	HDL
正常对照组	0.33±0.05 ^A	0.55±0.06 ^A	0.20±0.03 ^A	0.41±0.01 ^D	0.23±0.05 ^a	0.41±0.02 ^{ab}
高脂模型组	0.34±0.07 ^A	0.54±0.07 ^A	0.43±0.09 ^{BCD}	0.33±0.03 ^A	0.45±0.05 ^d	0.35±0.04 ^a
洛伐他汀组	0.39±0.07 ^A	0.55±0.09 ^A	0.50±0.08 ^D	0.34±0.02 ^{ABC}	0.24±0.05 ^{ab}	0.43±0.06 ^{ab}
TB1 组	0.38±0.12 ^A	0.55±0.09 ^A	0.47±0.07 ^{CD}	0.34±0.04 ^{ABC}	0.35±0.05 ^c	0.46±0.05 ^b
TB2 组	0.33±0.07 ^A	0.55±0.07 ^A	0.40±0.06 ^{BC}	0.36±0.02 ^{BC}	0.38±0.08 ^{cd}	0.43±0.04 ^{ab}
TB3 组	0.32±0.07 ^A	0.52±0.05 ^A	0.39±0.07 ^B	0.37±0.03 ^C	0.37±0.05 ^{cd}	0.42±0.06 ^{ab}
RTB 组	0.35±0.07 ^A	0.56±0.09 ^A	0.47±0.07 ^{CD}	0.34±0.03 ^{AB}	0.32±0.04 ^{bc}	0.50±0.06 ^b

注: 所有的数据为 mean±SD, n=10, ^{A-D}*p*<0.05, ^{a-d}*p*<0.01。

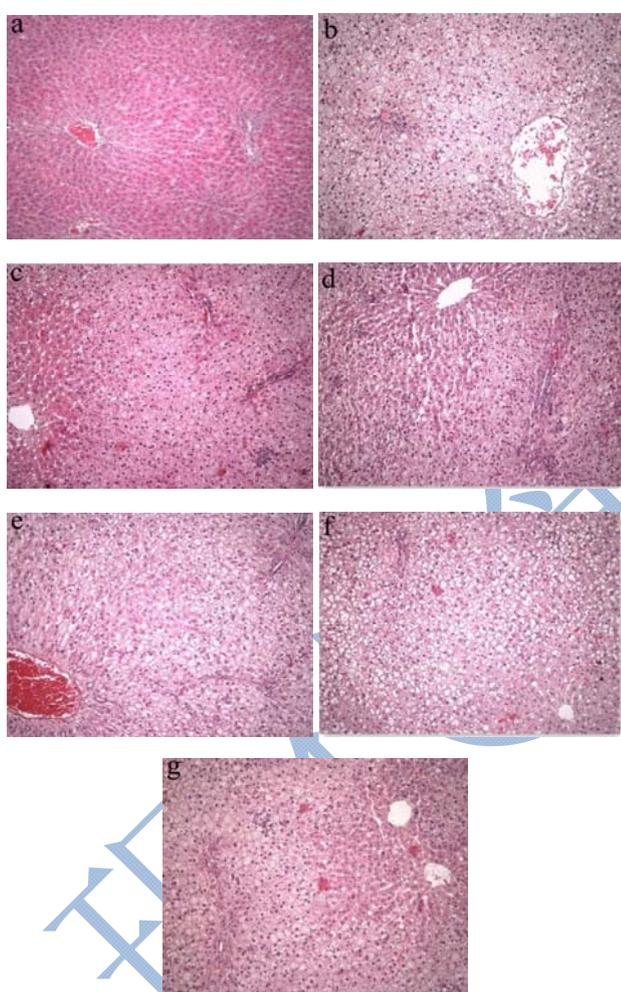


图 1 不同分子量茶褐素治疗高脂血症大鼠肝脏切片效果 (20×)

Fig.1 Liver histology of hyperlipidemic rats from different treatment groups

注: a 为正常对照组; b 为高脂模型组; c 为洛伐他汀组; d 为 TB1 组; e 为 TB2 组; f 为 TB3 组; g 为 RTB 组。

从表 1 和 2 可以看出, 不同组别大鼠血脂指标 TC、TG、LDL 和 HDL 在适应期没有显著性差异, 饲喂高脂饲料 45 d 后, 与饲喂基础饲料的正常对照组相比, 其他饲喂高脂饲料的 6 个组大鼠的血脂指标 TC、

TG 和 LDL 均显著高于正常对照组 (*p*<0.05), HDL 指标则显著低于正常对照组 (*p*<0.05), 说明高脂模型建立成功, 可以进行茶褐素治疗试验。将高脂血症大鼠分为高脂模型组(+蒸馏水)、TB1 组、TB2 组、TB3 组和 RTB 组, 并继续饲喂高脂饲料, 正常对照组继续饲喂基础饲料和蒸馏水。

从 45 d 的茶褐素干预结果看 (见表 1 和 2), 饲喂 TB1 和 RTB 组大鼠血清指标 TC、TG 和 LDL 均显著低于高脂模型组 (*p*<0.01), HDL 显著高于高脂模型组 (*p*<0.01), 且 TG 与 HDL 与正常对照组无显著性差异。洛伐他汀组 (阳性对照) 的血清指标 TC、TG、LDL、HDL 与高脂模型组有显著性差异, 与正常对照组无显著性差异。TB1 的降血脂效果虽不及洛伐他汀, 但也证明了 TB1 和 RTB 具有较强的调节血脂代谢的作用。饲喂 TB2 和 TB3 组大鼠血清指标 TC、LDL、HDL 与高脂模型组无显著差异, 但饲喂 TB2 和 TB3 均提高了 HDL 含量水平, 增幅分别为 19.44% 和 13.51%。试验结果表明, 大分子量茶褐素和粗茶褐素调节血脂代谢的效果优于中、小分子量茶褐素。

2.2 不同分子量茶褐素对高脂血症大鼠肝脏的影响

在正常情况下, 除脂肪细胞外, 其他细胞在光镜下一般不见脂滴, 若这些细胞浆中出现脂滴或脂滴增多, 则称为脂肪变性, 简称脂变。由图 1a 可见, 正常对照组肝脏组织切片显示肝脏血窦明显, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列, 肝细胞呈六边形, 胞质内容丰富, 细胞周界清楚; 图 1b 显示, 肝细胞中出现大量脂肪滴空泡, 散布在整个胞浆中, 部分已融合成大空泡, 占据整个胞浆位置, 将细胞核挤压至一边, 与脂肪细胞相似, 且肝细胞周界模糊不清, 细胞弥漫肿胀, 肝细胞排列紊乱, 胞浆淡染、疏松。说明高脂模型大

鼠肝脏脂肪细胞变性严重。从图 1d (TB1 组) 和图 1g (RTB 组) 来看, 肝脏组织结构基本正常, 未见有脂肪变性及其它病理变化; 而图 1e (TB2 组)、图 1f (TB3 组) 显示, 肝细胞内出现数量不等的小脂肪滴空泡, 但肝细胞索排列仍呈明显放射状, 与图 1a 相比, 有轻微的脂肪变性, 但与图 1b 相比, 程度较轻。从肝脏切片结果来看, 大分子量茶褐素 (TB1) 和粗茶褐

素 (RTB) 能有效减缓和降低高脂血症大鼠肝脏脂肪变性的速度和程度。

2.3 不同分子量茶褐素对高脂血症大鼠脂质代谢关键酶活性的影响

表 3 不同分子量茶褐素对高脂血症大鼠激素敏感性脂肪酶 (HSL)、乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 及脂肪酸合成酶 (FAS) 的影响

Table 3 Effect of theabrownins with different molecular weights on HSL, ACC, and FAS activities in hyperlipidemic rats (U/L)

组别	激素敏感性脂肪酶(HSL) (治疗 45 d)			乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC) (治疗 45 d)		
	肝脏组织	附睾组织	肠系膜组织	肝脏组织	附睾组织	肠系膜组织
正常对照组	858.96±34.53 ^A	1247.73±223.25 ^{ab}	603.62±15.99 ^a	25.28±1.26 ^b	27.49±2.12 ^b	28.09±1.06 ^b
高脂模型组	1258.66±165.70 ^B	1055.16±58.12 ^a	551.73±73.27 ^a	28.10±1.86 ^b	31.18±1.31 ^c	38.01±1.84 ^d
洛伐他汀组	1366.46±203.51 ^B	1426.47±108.71 ^b	861.29±39.15 ^b	25.78±1.38 ^b	27.62±1.43 ^b	29.67±1.46 ^b
TB1 组	1422.17±219.38 ^B	1456.74±165.64 ^b	800.67±56.46 ^b	16.97±1.27 ^a	22.44±2.16 ^a	16.69±0.99 ^a
TB2 组	943.29±76.95 ^A	1183.12±109.83 ^{ab}	784.79±46.02 ^b	27.57±2.39 ^b	30.62±2.26 ^{bc}	35.62±2.35 ^{cd}
TB3 组	934.70±105.41 ^A	1181.37±55.46 ^{ab}	806.51±69.47 ^b	27.67±1.10 ^b	30.16±1.62 ^{bc}	33.72±2.34 ^c
RTB 组	1418.54±177.94 ^B	1374.35±243.71 ^b	844.43±89.72 ^b	17.49±1.47 ^a	21.94±1.98 ^a	19.63±2.65 ^a

组别	脂肪酸合成酶(FAS) (治疗 45 d)		
	肝脏组织	附睾组织	肠系膜组织
正常对照组	10.36±0.49 ^B	10.30±0.62 ^c	6.84±3.67 ^A
高脂模型组	11.88±0.84 ^C	12.48±0.63 ^d	12.36±0.43 ^C
洛伐他汀组	10.70±0.60 ^B	5.76±0.46 ^a	8.80±0.59 ^{AB}
TB1 组	10.73±1.02 ^B	5.14±0.62 ^a	9.33±1.11 ^{AB}
TB2 组	8.82±0.68 ^A	11.12±0.66 ^{cd}	8.66±0.76 ^{AB}
TB3 组	8.93±0.98 ^A	11.67±0.49 ^{cd}	9.96±1.1 ^B
RTB 组	10.63±0.83 ^B	7.60±2.06 ^b	8.36±2.43 ^{AB}

注: 所有的数据为 mean±SD, n=10, ^{A-C}p<0.05, ^{a-d}p<0.01。

从表 3 可以看出, TB1 组、TB2 组、洛伐他汀组以及高脂模型组大鼠肝脏组织中的 HSL 酶活性差异不显著 ($p>0.05$), 但他们显著高于正常对照组、TB2 组以及 TB3 组 ($p<0.05$), 而正常对照组、TB2 组以及 TB3 组的 HSL 酶活性差异不显著 ($p>0.05$)。TB1 组和 RTB 组的 HSL 酶活性较高脂模型组分别提高了 13.0% 和 12.7%。从总体变化看, 肝脏组织中的 HSL 活性提高并不明显, 这与表 4 的肝脏组织 HSL 蛋白表达变化是一致的。从附睾组织中的 HSL 活性变化看, TB1 组、RTB 组以及洛伐他汀组的 HSL 活性极显著高于高脂模型组 ($p<0.01$), 与正常对照组无显著差异, 而 TB2 组和 TB3 组与高脂模型组也无显著差异。说明大分子量茶褐素 (TB1) 和粗茶褐素 (RTB) 有助于提高高脂血症大鼠附睾组织中的 HSL 酶活性。从肠系膜组织中的 HSL 活性变化看, TB1 组、TB2 组、TB3 组、RTB 组以及洛伐他汀组的 HSL 活性均极显著高于高脂模型组和正常对照组 ($p<0.01$)。说明

茶褐素与洛伐他汀一样具有提高高脂血症大鼠肠系膜组织中 HSL 的酶活性。

表 3 显示, 在肝脏组织中 TB1 组和 RTB 组的乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 活性极显著低于高脂模型组、TB2 组、TB3 组以及正常对照组 ($p<0.01$), 而其他组之间无显著差异。在附睾组织, TB1 组和 RTB 组 ACC 活性极显著低于其他组别 ($p<0.01$), 高脂模型组则显著高于其他组别 ($p<0.01$)。在肠系膜组织, TB1 组和 RTB 组 ACC 活性也极显著低于其他组别 ($p<0.01$), TB3 组也显著低于高脂模型组 ($p<0.01$), 但显著高于正常对照组 ($p<0.01$)。因此, 大分子量茶褐素 (TB1) 和粗茶褐素 (RTB) 有助于抑制高脂血症大鼠脂肪组织乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 活性 ($p<0.01$), 这与表 4 的 ACC1 蛋白表达变化趋势是一致的。

另从表 3 还可看出, 茶褐素有助于抑制高脂血症大鼠肝脏组织脂肪酸合成酶 (FAS) 的活性 ($p<0.05$),

且 TB2 和 TB3 抑制效果显著高于其他组别 ($p < 0.05$)。但在附睾组织中, TB1、RTB 以及洛伐他汀均显著抑制 FAS 酶活性 ($p < 0.01$), 且高脂模型组的 FAS 酶活显著高于正常对照组 ($p < 0.01$), TB2 和 TB3 组的 FAS 与高脂模型组无显著性差异。在肠系膜组织中, 各茶褐素组与洛伐他汀组的 FAS 活性无显著差异 ($p > 0.05$), 但显著低于高脂模型组 ($p < 0.05$)。总体上看, 大分子量茶褐素 (TB1) 和粗茶褐素 (RTB) 均有显著的抑制高脂血症大鼠脂肪组织中 FAS 酶活性。

2.4 脂质代谢关键酶蛋白的表达分析

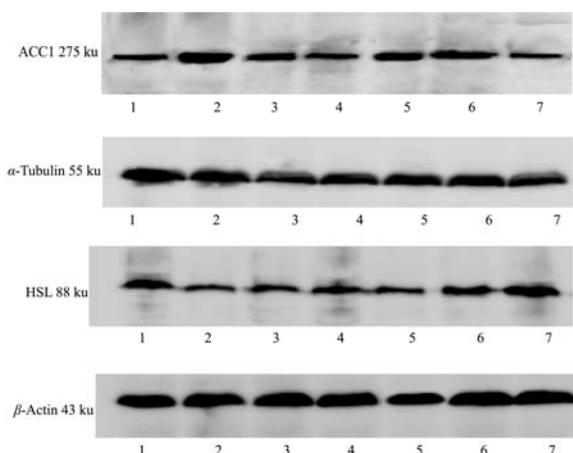


图 2 不同分子量茶褐素对高脂血症大鼠肝脏组织中 ACC1、HSL 蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of theabrownins with different molecular weights on the expression of ACC1 and HSL in the liver tissues of hyperlipidemic rats

注: 1 为正常对照组; 2 为高脂模型组; 3 为洛伐他汀组; 4 为 TB1 组; 5 为 TB2 组; 6 为 TB3 组; 7 为 RTB 组。

表 4 不同分子量茶褐素对高脂血症大鼠肝脏组织中 ACC1、HSL 蛋白表达影响 (N=3)

Table 4 Effect of theabrownins with different molecular weights on the expression of ACC1 and HSL proteins in the liver tissues of hyperlipidemic rats (N=3)

组别	HSL	ACC1
正常对照组	1.4966±0.087 ^B	0.6847±0.188 ^A
高脂模型组	0.7387±0.095 ^A	1.5778±0.265 ^B
洛伐他汀组	1.4053±0.320 ^{AB}	0.9545±0.251 ^{AB}
TB1 组	1.2722±0.337 ^{AB}	0.9557±0.309 ^{AB}
TB2 组	1.2755±0.062 ^{AB}	1.2550±0.246 ^{AB}
TB3 组	0.8225±0.242 ^{AB}	1.2540±0.172 ^{AB}
RTB 组	1.0360±0.077 ^{AB}	0.9946±0.348 ^{AB}

注: 所有的数据为 mean ± SD, n=3, ^{A-B} $p < 0.05$ 。

不同分子量茶褐素对高脂血症大鼠肝脏组织中

ACC1 和 HSL 蛋白表达的影响见图 2。采用 Image J 软件, 测定条带光密度值, 实验数据用目的蛋白条带光密度值与内参条带光密度值的比值表示, 结果见表 4。Western Blot 检测发现, 大分子量茶褐素 (TB1) 和粗茶褐素 (RTB) 有上调 HSL 蛋白表达、下调 ACC1 蛋白表达的作用。

2.5 讨论

2.5.1 茶褐素对脂质代谢关键酶活性的影响

激素敏感性脂肪酶 (HSL) 主要分布在脂肪细胞, 可催化细胞内甘油三酯、甘油二酯和单酰甘油等脂质水解^[16]。乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 是催化脂肪酸合成代谢第一步反应的限速酶, 是生物素依赖性酶, 存在两种基因形式 ACC1 和 ACC2, 其中 ACC1 存在于大多数脂肪组织中, 催化长链脂肪酸合成的限速反应^[17]。脂肪酸合成酶 (FAS) 催化乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 合成脂肪酸, 从而在动物体脂沉积中发挥重要作用^[18]。本研究表明, 大分子量茶褐素 (TB1) 和粗茶褐素 (RTB) 治疗高脂血症大鼠 45 d 后, 对肝脏组织中 HSL 酶活性影响不显著, 但对附睾组织和肠系膜组织中的 HSL 活性影响极显著 ($p < 0.01$), 同时, 显著抑制脂肪组织中的乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) ($p < 0.01$) 活性和 FAS 酶活性 ($p < 0.05$)。这说明 TB1 和 RTB 可通过提高高脂血症大鼠脂肪组织中的 HSL 活性来加速脂质代谢, 同时通过抑制 ACC 和 FAS 活性来减少脂肪酸合成, 从而有效调节血脂含量。总体来看, TB1 和 RTB 调节血脂代谢的效果优于 TB2 和 TB3。有研究认为, 普洱茶水提取物可通过降低 FAS 和 ACC 的表达, 抑制肝脏脂肪酸合成, 上调肝脏 HSL 的表达, 促进脂肪酸氧化和分解等作用来改善 NAFLD 大鼠肝脏脂肪变性, 但不确定是什么成分起作用^[19]。我们之前的研究显示^[9], 普洱熟茶茶褐素可显著上调大鼠附睾组织、肝脏中 HSL 的 mRNA 表达。但从图 2 和表 4 的蛋白表达结果看, TB1 和 RTB 能上调 HSL 蛋白的表达和下调 ACC1 蛋白表达, 但未达到显著变化水平。由于 FAS 蛋白表达结果不理想, 文中未列出。蛋白表达不显著一方面可能与干预或治疗时间短有关, 另一方面可能与高脂血症大鼠还继续饲喂高脂饲料也有密切关系。若茶褐素干预或干预的同时不再饲喂高脂饲料, 也许会获得更好的治疗效果。这需要进一步研究。不过, 本实验结果已经充分说明灌胃高脂血症大鼠大分子量茶褐素 (TB1) 和粗茶褐素 (RTB) 具有调节脂质代谢关键酶的作用, 并通过升高 HSL 活性, 抑制 ACC 和 FAS 活性来干预血脂代谢, 特别是具有显著降低血脂 TG 的水平 ($p < 0.01$)。

2.5.2 茶褐素对肝脏脂肪的影响

肝脏具有多种生理化功能,在蛋白质、糖、脂类和维生素等物质代谢中均起着重要的作用,还具有解毒和排泄功能等。脂肪代谢异常、脂质过氧化损伤、游离脂肪酸作用以及环境因素等均可影响肝脏脂肪变性^[20]。其中来自饮食、高脂血症及脂肪组织动员增加等皆可导致肝细胞脂肪代谢异常^[21,22]。一般高脂饲料容易引起大鼠肝脏脂肪变性^[23]。本实验肝脏病理切片结果显示,灌胃TB1和RTB的大鼠肝脏组织结构基本正常,未见有脂肪变性及其它病理变化,大鼠肝脂肪变性显著改善,且肝脏结构接近正常对照组;灌胃TB2和TB3,大鼠肝细胞内出现数量不等的小脂肪滴空泡,但肝细胞索排列仍呈明显放射状。而高脂模型组大鼠肝细胞显著发生脂肪变性,肝细胞肿大变圆,胞浆疏松,肝细胞周界模糊不清,肝细胞内出现大量脂肪滴,肝小叶中央静脉周围肝细胞呈典型大的脂滴空泡样改变,肝细胞排列紊乱,有的细胞内脂滴将细胞核挤向胞膜边缘。这说明TB1和RTB能有效抑制高脂血症大鼠肝脏中的脂肪变性现象。

3 结论

研究首次发现分子量>50 ku的茶褐素(TB1)和粗茶褐素(RTB)对高脂血症大鼠有一定的治疗和恢复作用,45 d的治疗处理可使高脂血症大鼠血清脂质向正常化水平方向转变,TG和HDL已恢复至正常水平。同时,脂质代谢关键酶有显著变化,HSL活性增强,ACC和FAS活性降低或受抑制。提示,茶褐素可作为功能性膳食补充剂,用于预防高脂血症的形成,降低冠心病的风险。

参考文献

- [1] ZHAO Ya-ping, YU Wen-li, WANG Da-pu. Chemiluminescence determination of free radical scavenging abilities of tea pigments and cocspareion with tea polyphenole [J]. Food Chemistry, 2003, 80(1): 115-118
- [2] Sano M, Takenaka Y, Kojima R, et al. Effects of pu-erh tea on lipid metabolism in rats [J]. Chem. Pharm. Bull., 1986, 34(1): 221-228
- [3] Yang T T C, Koo M W L. Hypocholesterolemic effects of Chinese tea [J]. Pharmacol. Res., 1997, 35(6): 505-512
- [4] Kuo K L, Weng M S, Chiang C T, et al. Comparative studies on thehypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rats [J]. J. Agric. Food Chem., 2005, 53(2): 480-489
- [5] Chiang C T, Weng M S, et al. Pu-erh tea supplementationsuppresses fatty acid synthase expression in the rat liver through down regulating akt and jnk signalings as demonstrated in human hepatoma HepG2 cells [J]. Oncol. Res., 2006, 16(3): 119-128
- [6] 龚加顺,周红杰.云南普洱茶化学[M].昆明:云南科技出版社, 2011
GONG Jia-shun, ZHOU Hong-jie. Chemistry of Yunnan Pu-erh Tea [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2011
- [7] 秦谊,龚加顺,张惠芬,等.普洱茶茶褐素提取工艺及理化性质的初步研究[J].林产化学与工业,2009,29(5):95-98
QIN Yi, GONG Jia-shun, ZHANG Hui-fen, et al. Extraction technology of theabrownin from Pu-erh tea and its physic-chemical properties [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2009, 29(5): 95-98
- [8] 龚加顺,陈文品,周红杰.云南普洱茶特征成分的功能与毒理学评价[J].茶叶科学,2007,27(3):201-210
GONG Jia-shun, CHEN Wen-pin, ZHOU Hong-jie. Evaluation on the function and toxicity of extraction of characteristic components in Yunnan pu-erh tea [J]. Journal of Tea Science, 2007, 27(3): 201-210
- [9] Gong J S, Peng C X, Chen T, et al. Effects of theabrownin from Pu-erh tea on the metabolism of serum lipids in rats: mechanism of action [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(6): 182-189
- [10] 易恋.普洱茶多酚与茶褐素的分离及功能研究[D].长沙:湖南农业大学,2010
YI Lian. Study on extraction and function of polyphenols and theabrowns in Pu-erh tea [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2010
- [11] 苗明三.实验动物和动物实验技术[M].北京:中国中医药出版社,1997
MIAO Ming-san. Experimental animal and animal experimental technology [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 1997
- [12] 中华人民共和国卫生部颁布.保健食品检验与评价技术规范.2003,2
China National Ministry of Health. Technical standards for testing & assessment of health food. 2003, 2
- [13] 敬明武,葛宇杰,刘科亮.茶色素胶囊对大鼠辅助调节血脂的研究[J].中国现代医生,2007,45(5):18-19
JING Ming-wu, GE Yu-jie, LIU Ke-liang. Study on the effect of tea pigment capsule on assisting to adjust blood-fat of rat [J]. China Modern Doctor, 2007, 45(5): 18-19
- [14] 李运曼,雷志冈,杨贵成.辛伐他汀与洛伐他汀的降血脂作

- 用比较[J].中国药科大学学报,2002,33(5):448-450
- LI Yun-man, LEI Zhi-gang, YANG Gui-cheng. Comparative anti-hyperlipidemic effects of simvastatin and lovastatin [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2002, 33(5): 448-450
- [15] 徐湘婷,王鹏,罗绍忠,等.普洱茶调节SD大鼠血脂及保护血管内皮的研究[J].茶叶科学,2010,30:470-474
- XU Xiang-ting, WANG Peng, LUO Shao-zhong, et al. Effects of Pu-erh tea on hyperlipidemia, antioxidation and vascular endothelium protection in SD rats [J]. Journal of Tea Science, 2010, 30: 470-474
- [16] Mulder H, Sorhede-Winzell M, Contreras J A, et al. Hormone-sensitive lipase null mice exhibit signs of impaired insulin sensitivity whereas insulin secretion is intact [J]. J. Biol. Chem., 2003, 278(38): 36380-36388
- [17] 李洁琼,郑世学,喻子牛,等.乙酰辅酶A羧化酶:脂肪酸代谢的关键酶及其基因克隆研究进展[J].应用与环境生物学报,2011,17(5):753-758
- LI Jie-qiong, ZHENG Shi-xue, YU Zi-niu, et al. Acetyl-coenzyme A Carboxylase: A key metabolic enzyme of fatty acid and progress of its gene clone [J]. Chin. J. Appl. Environ. Biol., 2011, 17(5): 753-758
- [18] 颜新春,汪以真,许梓荣.动物脂肪酸合成酶(FAS)基因表达的调控[J].动物营养学报,2002,4(14):1-4
- YAN Xin-chun, WANG Yi-zhen, XU Zi-rong. Regulation of fatty acid synthase(FAS) gene expression in animals [J]. Acta Zoonutrimenta Sinica, 2002, 4(14): 1-4
- [19] 肖凯.普洱茶水提物对大鼠非酒精性脂肪性肝病模型的早期干预研究[D].杭州:浙江大学,2013
- XIAO Kai. Studies on the early intervention of Pu-erh tea water extract in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013
- [20] 范建高,曾民德,王国良.脂肪肝的发病机制[J].世界华人消化杂志,1999,7(1):75-76
- FAN Jian-gao, ZENG Min-de, WANG Guo-liang. Mechanism of hepatic adipose infiltration production [J]. WCJD, 1999, 7(1): 75-76
- [21] Chen J, Song W, Redinger R. Effects of dietary cholesterol on hepatic production of lipids and lipoproteins in isolated hamster liver [J]. Hepatology, 1996, 24: 424-431
- [22] Bachman A L, Dubin M D, Moukarzel A A. Choline deficiency, a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reverse with intravenous choline supplementation [J]. Hepatology, 1995, 22: 1399-1405
- [23] 侯艳,肖蓉,邵宛芳,等.普洱茶对高脂实验大鼠肝脏病理的影响[J].茶叶科学,2010,30(增刊1):573-578
- HOU Yan, XIAO Rong, SHAO Wan-fang, et al. Effect of Pu-erh tea on liver pathology of high-fat rats [J]. Journal of Tea Science, 2010, 30(Supp.1): 573-578