



论文

普洱茶对高脂血症大鼠胆固醇代谢的影响及作用机制

郭少晨^{①②}, 刘洪娟^{①②}, 朱迪娜^{①②}, 闫世军^{①②}, 姜国华^③, 沈培平^④,
张文生^{①②*}, 盛军^{④⑤*}

① 北京师范大学资源学院, 地表过程与资源生态国家重点实验室, 北京 100875;

② 北京师范大学资源学院, 中药资源保护与利用北京市重点实验室, 北京 100875;

③ 北京师范大学分析测试中心, 北京 100875;

④ 云南农业大学, 普洱茶学教育部重点实验室, 昆明 650201;

⑤ 普洱茶研究院, 普洱 665000

* 联系人, E-mail: zws@bnu.edu.cn; 623157535@qq.com

收稿日期: 2012-05-22; 接受日期: 2012-09-03

国家自然科学基金(批准号: 81274118)和中国普洱茶研究院基金资助项目

doi: 10.1360/052012-204

摘要 普洱茶为云南特色名茶. 研究表明普洱茶可以调节血脂、防治高脂血症, 而对其降脂机制报道较少. 本研究在普洱茶对高脂血症大鼠血脂水平影响的基础上, 从肝脏中胆固醇合成及低密度脂蛋白胆固醇代谢的影响角度, 探讨其作用机制. 利用不同剂量的普洱茶给高脂血症大鼠灌胃连续 4 周, 观察普洱茶对高脂血症大鼠生理指标和血脂水平的影响, 检测高脂血症大鼠肝脏中胆固醇合成途径中限速酶鲨烯合成酶表达量和活性与低密度脂蛋白受体在转录水平的变化情况. 体外培养的 HepG2 细胞检测普洱茶对胆固醇合成的抑制率以及低密度脂蛋白受体蛋白表达的影响. 结果显示, 普洱茶可降低高脂血症大鼠血浆 TC 和 LDL-C 的水平, 减缓高脂血症大鼠体重增长. 并可抑制肝脏中鲨烯合成酶的表达量及其活性, 同时上调低密度脂蛋白受体 mRNA 表达. 体外实验证明, 普洱茶呈剂量依赖性抑制 ³H-甲羟戊酸掺入细胞胆固醇生物合成, 对低密度脂蛋白受体蛋白表达也有上调作用. 本实验提示普洱茶降血脂的作用可能是通过影响从甲羟戊酸到生成胆固醇之间的鲨烯合成酶催化水平进而抑制内源性胆固醇的生物合成, 降低细胞内胆固醇浓度; 同时提高低密度脂蛋白受体的表达, 促进低密度脂蛋白胆固醇进入肝细胞代谢过程实现的.

关键词

普洱茶
高脂血症
胆固醇合成
鲨烯合成酶
低密度脂蛋白受体

普洱茶是中国云南省特有的饮用茶品种, 由大叶晒青毛茶经过特殊工艺加工而成. 普洱茶中主要

含有茶多酚、茶多糖、生物碱、氨基酸、维生素类和矿物元素等多种成分^[1]. 其中以茶多酚、茶多糖类为

主要的生物活性成分^[2]。研究表明, 普洱茶可以调节高脂动物模型的血脂水平, 延缓动脉粥样硬化等心血管疾病的发病进程^[3,4], 是目前普洱茶研究热点。

高脂血症是由于体内脂类物质代谢紊乱所引起的全身慢性疾病, 是遗传基因与外界环境共同作用的结果, 对人类身体健康危害严重。血脂包括血浆胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇。高脂血症又分为高胆固醇血症、高甘油三酯血症、混合型高脂血症和低高密度脂蛋白血症。

胆固醇(total cholesterol, TC)的代谢异常是高胆固醇血症的主要致病因素。体内三分之二的胆固醇源于内源合成, 胆固醇的合成速率受到限速酶的调控。鲨烯合成酶(squalene synthase, SS)是胆固醇合成过程中的限速酶, 两分子的法尼基焦磷酸通过 SS 的作用结合形成鲨烯, 鲨烯在经过复杂的步骤才能合成胆固醇。近些年, 降血脂药物的研究逐渐开始关注对 SS 的抑制作用, 通过抑制 SS 可以降低胆固醇的合成^[5]。

低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein, LDL-C)是血浆中胆固醇存在的主要形式。LDL-C 在体内的主要代谢途径为受体代谢途径, 约 70%LDL-C 通过此途径代谢至体外。受体代谢途径主要是依赖 LDL-C 与细胞表面的低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)结合, 随 LDLR 转运至细胞内进行代谢。LDLR 是一种跨膜糖蛋白, 特异识别、结合含载脂蛋白 B100 或 E 的脂蛋白, 故又称载脂蛋白 B 或 E 受体。其主要功能是与血浆中 LDL-C 结合, 将 LDL-C 内吞至细胞内, 促使血浆的 LDL-C 快速代谢, 对维持胆固醇的正常代谢起到重要作用^[6]。其中肝脏是胆固醇代谢的主要器官, 肝脏细胞表面的 LDLR 的数量和结合脂蛋白的活性, 直接影响着体内胆固醇的代谢水平。家族性高脂血症由于 LDLR 基因突变、缺陷或缺失, 导致的 LDLR 数量不足以及功能障碍, 使血浆中过多的 LDL-C 无法被正常代谢至体外, 最终体内 TC 或 LDL-C 水平升高^[7]。

本实验重点研究普洱茶对高脂血症大鼠血脂水平、鲨烯合成酶以及低密度脂蛋白受体的影响, 进而阐释普洱茶降血脂的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

普洱茶粉(为普洱茶的水提取物经干燥制成), 由

中国普洱茶研究院提供; 洛伐他汀胶囊(成都永康制药有限公司); 总胆固醇、甘油三酯、直接低密度脂蛋白胆固醇、直接高密度脂蛋白胆固醇试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司); 普通维持鼠料, 高脂饲料(配方: 78.8%普通维持鼠料、10%猪油、10%蛋黄粉、1%胆固醇、0.2%胆酸盐; 北京科澳协力饲料有限公司); 鲨烯合成酶多克隆抗体、GAPDH 多克隆抗体、HMG-CoA 还原酶多克隆抗体(Santa Cruz 公司, 美国); 低密度脂蛋白受体多克隆抗体(R&D 公司, 美国); 鲨烯合成酶(Sigma 公司, 美国); ³H-甲羟戊酸、³H-法尼基焦磷酸、³H-胆固醇(Perkin Elmer 公司, 美国); ³H-鲨烯(ART 公司, 美国); DEPC(Amresco 公司, 美国); PCR TaqMix、DL2000 分子量标准、6×RNA 电泳上样缓冲液、10×MOPS 缓冲液等(北京美莱博医学科技有限公司); M-MuLV 反转录酶、RNase Inhibitor (Fermentas(MBI)公司, 加拿大); 琼脂糖(Biowest 公司, 西班牙); 甲醛、无水乙醇、异丙醇(北京化学试剂公司, 分析醇)。

1.2 普洱茶和洛伐他汀溶液的配制

动物实验中, 普洱茶粉经常温蒸馏水溶解, 配制成浓度为 40 和 120 mg/mL 普洱茶溶液, 经纱布过滤 2 次后使用。洛伐他汀胶囊粉末溶于常温蒸馏水, 浓度为 0.4 mg/kg。两种溶液均 4℃密封保存。HepG2 细胞实验中, 普洱茶粉经常温磷酸缓冲液(PBS 溶液)溶解, 配制成浓度为 1 mg/mL 普洱茶溶液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤器过滤溶液一次, 分装 4℃保存。使用时用无血清培养基将 1 mg/mL 普洱茶溶液稀释成 50, 100, 150 和 200 μg/mL 的溶液。

1.3 实验动物饲养及分组

6~8 周龄(体重 180~200 g)雄性 SD 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2006-0009 和 SCXK(京)2011-0011。开始实验前将大鼠饲养于 SPF 级动物房 7 天适应环境, 动物房内温度为 20℃, 湿度为 45%~60%, 大鼠自由饮水, 饲喂维持饲料。经过 7 天 SPF 级动物房环境适应, 称重记录, 检测血脂四项。随机取 5 只饲喂维持饲料作为正常对照组, 其他均饲喂高脂饲料。连续喂养 4 周后, 称重记录, 检测 SD 大鼠血脂 4 项水平。随后饲喂高脂饲料的 SD 大鼠被随机分为 5 组, 每组 8 只, 分别为: 高脂模型组(高脂饲料); 洛伐他汀阳性对照组(高

脂饲料, 洛伐他汀溶液大鼠灌胃给药, 给药浓度 0.2 mg/kg/天; 普洱茶低剂量组(高脂饲料, 普洱茶灌胃给药, 给药浓度 0.2 mg/kg/天); 普洱茶中剂量组(高脂饲料, 普洱茶灌胃给药, 给药浓度 0.6 g/kg/天); 普洱茶高剂量组(高脂饲料, 普洱茶灌胃给药, 给药浓度 1.8 g/kg/天). 每天 09:00~10:00 灌胃, 持续 4 周.

1.4 体重、肝重、饮食量、饮水量检测

SD 大鼠在 SPF 级动物房适应 7 天后, 称重并记录, 作为初始体重值. 实验期间每 7 天称重记录 1 次, 第 28 天称重作为大鼠最终体重. 每周记录 3 次各组 SD 大鼠 24 h 内的饮食量和饮水量变化情况. 实验结束后, 依据大鼠体重腹腔注射相应量的戊巴比妥钠, 解剖大鼠, 在冰上取出肝脏组织, PBS 将多余血液和杂物冲洗干净, 称重记录, 称重后将肝脏组织剪成小块, 放入液氮中冻存.

1.5 血脂四项检测

利用眼底静脉丛取血法取 SD 大鼠血液 1.5~2.0 mL 至涂布肝素钠的 Ep 管中, 室温静置 30 min, 后低速离心后得血浆后, 根据试剂盒说明书说明, 检测 SD 大鼠血脂 4 项.

1.6 细胞培养

HepG2 细胞复苏后, 用含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素、非必需氨基酸、丙酮酸钠的 DMEM-H 培养基培养, 细胞培养箱环境为: 37℃, 5% CO₂, 相对湿度为 90%.

1.7 MTT 检测

细胞相对活力利用 MTT 法检测, 实验时配制 MTT 浓度为 5 mg/mL 溶液避光备用. 将 HepG2 细胞以 2.5×10^4 个/mL 细胞培养液接种于 96 孔板中, 加入待测药品作用 24 h 后, 吸出药液, 每孔加入 100 μ L MTT 溶液后, 置于细胞培养箱中培养 4 h. 4 h 后, 小心吸去 MTT 溶液, 每孔加入 150 μ L DMSO 溶液, 于 630 和 492 nm 光下检测 A 值.

1.8 HepG2 细胞加药处理及蛋白提取

普洱茶粉溶于 PBS 中, 配制成 5 g/mL 的母液, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装, -20℃ 保存. 实验时无血清培养基稀释母液至实验所需浓度. HepG2 细胞

接种于 6 孔板后培养至细胞融合率达 80%, 更换含药无血清培养基, 继续培养 24 h 用于 Western blot 实验.

1.9 胆固醇合成抑制率检测

HepG2 细胞以 1×10^5 接种于 6 孔板中, 在培养箱中培养 2~3 天, 更换无血清培养基培养 3~5 天. 实验开始时, 弃去原培养基, 用 PBS 冲洗两遍, 加入 5 μ L 的 ³H-mevalonate (10 μ Ci/mL) 和 2 mL 的含不同浓度普洱茶的培养基, 与细胞共孵育 2 h. 每板留 1 孔细胞用于测蛋白浓度(不加药物和同位素). 2 h 后, 移去培养基, HepG2 细胞用冷 PBS 洗两遍, 0.25% 胰酶消化转移细胞, 用 2 mL 饱和 KOH 乙醇溶液(KOH:EtOH=1:3, 体积比)裂解细胞, 将细胞收集至 Ep 管后, 在 75℃ 皂化 1 h. 待样品冷却至室温后, 用 1 mL 石油醚抽提非皂化物质 3 次(含带标记胆固醇), 合并抽提液. 氮气吹干石油醚, 用 100 μ L 氯仿溶解剩余残渣, 取出 20 μ L 用于薄层分析. 将待测样品和 ³H-cholesterol 标准对照品点在硅胶 G 板(100 mm×200 mm, 厚度 0.2~0.25 mm)上, 放入层析缸中, 展开剂为石油醚: 乙醚: 乙酸(80:20:1, 体积比). 层析后, 将带标记的胆固醇斑点刮下, 加入闪烁液 5 mL 至闪烁瓶中, 用液闪计数器测定 ³H-cholesterol 的 CPMA 值(计数值). 抑制率(%)=100%-(药物组/空白对照组)×100.

1.10 Western blot

(1) 肝脏组织蛋白提取. 从液氮中取出 SD 大鼠肝脏组织, 加入少量液氮研磨成粉状, 称重, 加入 RIPA 裂解液(100 mg 肝脏组织/mL). 置于 4℃ 冰箱裂解 30 min, 每 10 min 上下颠倒 10 次加快裂解过程. 使用超声破碎仪破碎组织 30 次, 10000 r/min、4℃ 离心 15 min, 收集组织蛋白提取液, BCA 法测定组织提取液蛋白浓度, 确定上样体积, 用 2×上样缓冲液按体积比 1:1 稀释样品待上样.

(2) 细胞蛋白提取. 加药培养 24 h 后的细胞用冷 PBS 清洗一遍, 将细胞培养板置于冰上, 每孔加入 100 μ L 的 1×上样缓冲液提取细胞总蛋白, 100℃ 金属浴 10 min, 离心混匀, 分装后放入 -80℃ 保存, 待用.

配制 10% SDS-PAGE, 5% 浓缩胶, 100 V 电泳 20 min, 160 V 电泳 70 min, 295 mA 转膜 90 min, 将 PVDF 膜浸泡至含 5% 脱脂奶粉 PBST 溶液封闭 2 h 后, 加入一抗孵育 4℃ 过夜. 次日 PVDF 膜经 PBST 洗后,

加入二抗, 室温孵育 90 min. ECL 显色, X 光片曝光.

1.11 大鼠肝微粒体提取

利用 4℃PMED buffer 将 SD 大鼠肝脏匀浆, 2 mL/g(肝脏组织), 匀浆后离心(10000×g; 20 min; 4℃), 吸上清. 上清继续离心(178000×g; 90 min; 4℃), 收集离心后的沉淀, 用 1 mL PMED buffer/g 溶解, 玻璃匀浆器研磨 5 次, 测定微粒体浓度, 放入液氮保存. 使用时, 用 PMED buffer 迅速解冻稀释至 1 mg/mL.

1.12 鲨烯合成酶活性测定

SD 大鼠微粒体(1 mg/mL)溶于 1mL Hepes 溶液(含有 10 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L NADPH), 加入不同浓度药物, 样品在 37℃培养箱中孵育 20 min, 加入 5 μL ³H-法尼基焦磷酸至离心管中(10×100 mm)作用 20 min, 加入 1 mg 鲨烯终止反应. 冷却到室温后, 将样品点至硅胶 G 板, 包括 ³H-鲨烯标准对照品和待测样品, 放置层析缸内展开, 将带标记的鲨烯斑点刮下, 加入 5 mL 闪烁液测量 CPMA 值, 每个待测样品重复 3 次.

1.13 引物合成

β-actin 上游引物: 5'-GAAGTGTGACGTTGACA-TCCG-3', β-actin 下游引物: 5'-GCCTAGAAGCATT-TGCGGTG-3', 扩增大鼠 β-actin 基因 282 bp 长度片段. LDLR 上游引物 5'-GTGACAGTGTCTCCCAAG-3', LDLR 下游引物 5'-GCTGACCATCTGTCTCGAG-3', 扩增大鼠 LDLR 基因 270 bp 长度片段.

1.14 Real time PCR 反应

利用通用型 RNA 快速提取试剂盒提取脂大鼠肝脏 RNA 后. 纯化提取出的 RNA, 消化样品中的 DNA, 反应体系中加入 RNA 模板 10 μg, RNase Inhibitor 4 μL, DNase I buffer 10 μL, DNase I 10 μL, DEPC 处理 H₂O 至 100 μL, 混匀后在 37℃反应 90 min. 利用 RNA 琼脂糖凝胶电泳, 紫外分析仪观察模板的纯度. 随后, 将 RNA 反转录为 cDNA, 反应体系中加入 RNA 模板 3 μg、引物 4.0 μL, 补 DEPC 处理 H₂O 至 25 μL, 混匀, 70℃反应 5 min, 立即冰浴, 加入 5×buffer 8.0 μL、dNTP(10 mmol/L) 4.0 μL、RNase Inhibitor 1.0 μL, 混匀, 37℃反应 5 min, 加入 M-MuLV 逆转录酶 2.0 μL, 42℃反应 60 min, 70℃反应 10 min. 随后进行 Realtime

PCR 检测样品.

1.15 普洱茶成分分析

普洱茶粉应用前, 先经 HPLC 进行成分分析, 色谱条件为: Diamonsil-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱见表 1, 流速 1.00 mL/min, 室温, 检测波长 280 nm.

2 结果

2.1 高脂血症大鼠模型的构建

本实验选用的高脂饲料配方参考 Hou 等人^[8]使用的高脂配方. 如图 1 所示, 饲喂 SD 大鼠高脂饲料连续 28 天, 大鼠血浆 TC, TG 和 LDL-C 水平都显著升高, HDL-C 水平无变化. 提示 SD 大鼠高脂模型构建成功, 可用于后续实验研究.

2.2 普洱茶对高脂血症大鼠血脂水平的影响

给予高脂血症大鼠洛伐他汀溶液和普洱茶低、中、高剂量茶连续 4 周, 洛伐他汀组和普洱茶低、中、高剂

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间(min)	Solution A(%)	Solution B(%)
0~2	8	92
2~17	8~15	92~85
17~30	15~35	85~65
30~55	35~60	65~40
55~60	60~70	40~30
60~65	70~8	30~92
65~70	8	92

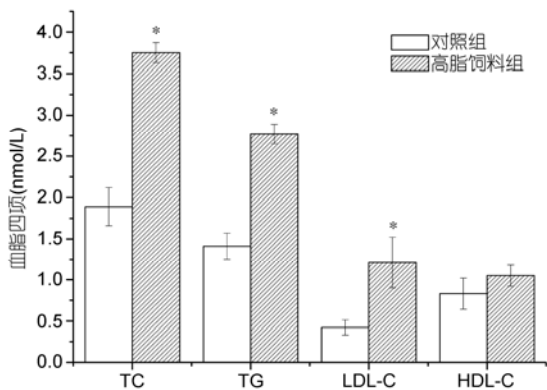


图 1 造模后 SD 大鼠血脂四项水平

*: P<0.05; TC: 胆固醇; TG: 甘油三脂; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇

量组大鼠血浆 TC 和 LDL-C 下降, 其中普洱茶高剂量组大鼠血浆 TC 和 LDL-C 水平较高脂组有显著性差异, $P<0.05$ (图 2, 3). 高脂血症大鼠另两项血脂指标, TG 和 HDL-C 水平并没有显著性变化.

2.3 普洱茶对高脂血症大鼠体重、肝重的影响

实验检测了普洱茶对高脂血症大鼠体重、肝重变化的影响. 造高脂模型前, SD 大鼠在 200~220 g 间, 分组后造模, 饲喂高脂饲料 4 周后与正常组 SD 大鼠体重比较, SD 大鼠体重明显增加, 较正常组大鼠升高约 50 g. 分组给药 4 周后, 饲喂高脂饲料的 SD 大鼠体重增长快速, 达到约 490 g. 而所有饲喂高脂饲料的 SD 大鼠中, 普洱茶中、高剂量组 SD 大鼠体重

增长缓慢, 体重明显轻于高脂模型组, 4 周后 SD 大鼠体重约为 400 g, 较高脂组大鼠体重明显降低(图 4). 阳性对照药物洛伐他汀对大鼠体重增长无影响.

肝重结果显示(图 5), 高脂血症大鼠对照组 SD 大鼠肝重明显高于正常对照组, 普洱茶灌胃后, 中、高剂量组 SD 大鼠肝重显著降低, 明显低于高脂组.

2.4 普洱茶对高脂血症大鼠摄食量和饮水量的影响

实验期间各组大鼠精神状态良好、体毛顺滑、毛色正常、行动敏捷. 各组 SD 大鼠摄食量和饮水量随体重有所增长, 但各组间数据无统计学差异(图 6, 7).

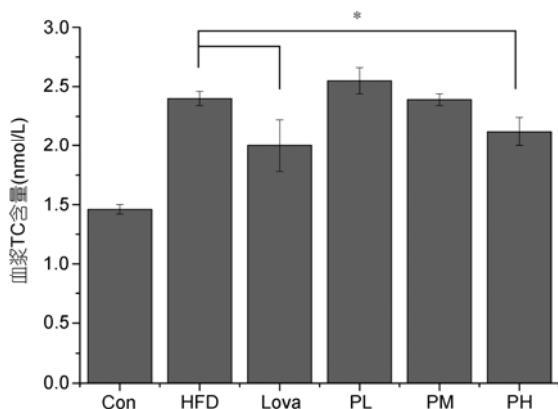


图 2 高脂血症大鼠血浆 TC 水平

*: $P<0.05$; Con: 对照组; HFD: 高脂模型组; Lova: 洛伐他汀组; PL: 普洱茶低剂量组; PM: 普洱茶中剂量组; PH: 普洱茶高剂量组

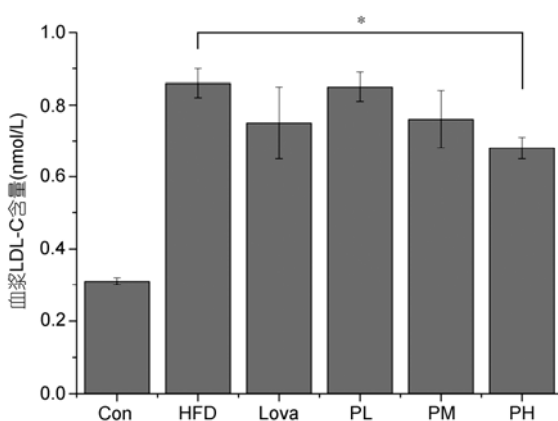


图 3 高脂血症大鼠血浆 LDL-C 水平

*: $P<0.05$; 图注同图 2

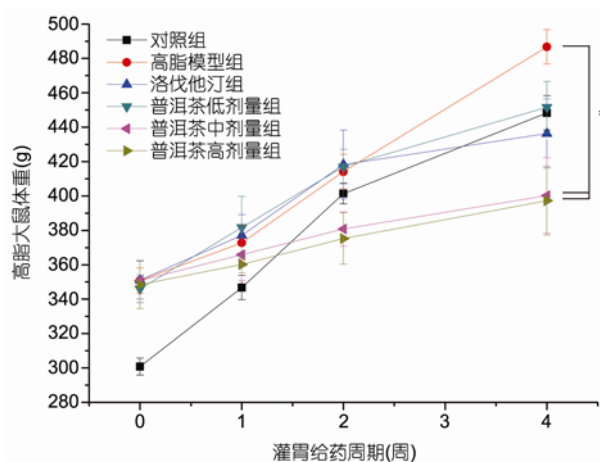


图 4 灌胃期间高脂血症大鼠体重变化

*: $P<0.05$

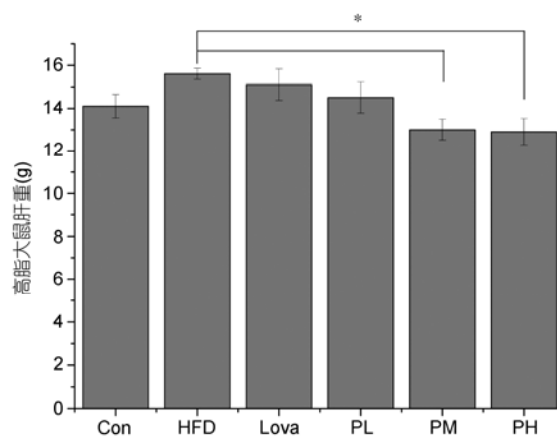


图 5 高脂血症大鼠肝重变化

*: $P<0.05$; 图注同图 2

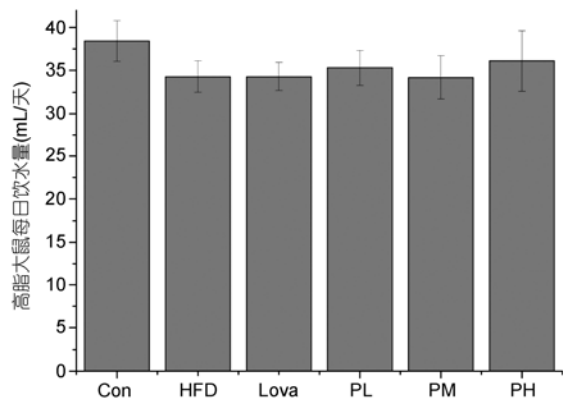


图6 高脂血症大鼠每日饮水量

图注同图2

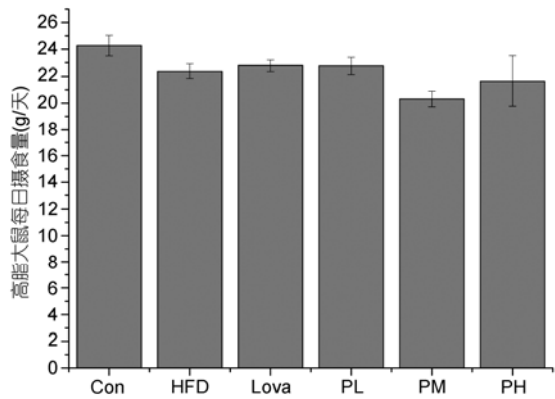


图7 高脂血症大鼠每日摄食量

图注同图2

2.5 普洱茶对 HepG2 细胞的毒性作用

实验设置不同浓度的普洱茶溶液作用于 HepG2 细胞, 作用 24 h, 浓度设置分别为 0, 100, 200, 300 和 400 $\mu\text{g/mL}$. 作用 24 h 后, 显微镜下观察细胞形态, MTT 法检测细胞的成活率, HepG2 细胞成活率 80% 以上设为安全作用浓度. 结果显示, 普洱茶浓度在 200 $\mu\text{g/mL}$ 以下时, HepG2 细胞生长状态良好, 本研究后续实验将安全浓度设置在 200 $\mu\text{g/mL}$ 以内.

2.6 普洱茶对 HepG2 细胞胆固醇合成抑制率的影响

HepG2 细胞与普洱茶共孵育 2 h 后, 检测细胞中新合成的胆固醇的量, 如图所示, 随着普洱茶剂量的

升高, 胆固醇的合成抑制率也随之升高. 25 $\mu\text{g/mL}$ 的普洱茶对 HepG2 细胞胆固醇合成抑制率高达 70%, 而 150 $\mu\text{g/mL}$ 普洱茶可使抑制率高达 95%, 抑制率与普洱茶浓度成正比(图 8).

2.7 普洱茶对高脂血症大鼠肝脏中鲨烯合成酶表达量的影响

检测普洱茶对高脂血症大鼠肝脏中 SS 的表达量的影响. 如图所示(图 9), 普洱茶能够降低高脂血症大鼠肝脏中 SS 的表达量, 普洱茶中、高剂量组 SD 大鼠肝脏中 SS 表达量下降, 表达量约是高脂组的 50%, 较高脂组有明显差异($P<0.05$). 而阳性对照药洛伐他汀对 SD 大鼠肝脏中 SS 的表达量无影响.

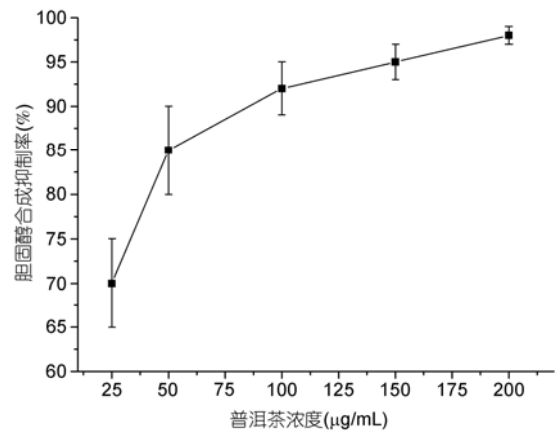


图8 普洱茶对 HepG2 中胆固醇合成的影响

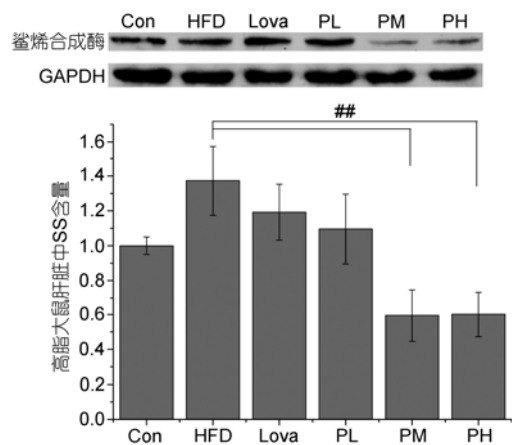


图9 普洱茶对高脂血症大鼠肝脏中 SS 表达的影响

##: $P<0.01$; 图注同图2

2.8 普洱茶对高脂血症大鼠肝脏中鲨烯合成酶活性的影响

测定普洱茶对高脂血症大鼠肝脏中 SS 的活性的影响. 如图 10 所示, 普洱茶中、高剂量组大鼠肝脏中 SS 活性较高脂组降低明显, 活性分别降低至正常组的 57% 和 52%, 说明普洱茶对 SS 活性具有明显的抑制作用.

2.9 普洱茶对高脂血症大鼠肝脏中 LDLR 转录的影响

检测普洱茶对高脂血症大鼠肝脏中 LDLR mRNA 水平的影响. 如图 11 所示, 高脂状态下, SD 大鼠肝脏中 LDLR mRNA 水平下降, 说明高水平的胆固醇和脂肪含量可降低 LDLR mRNA 的水平, 抑制其转录. 中、高剂量的普洱茶能够是 LDLR mRNA 水平升高,

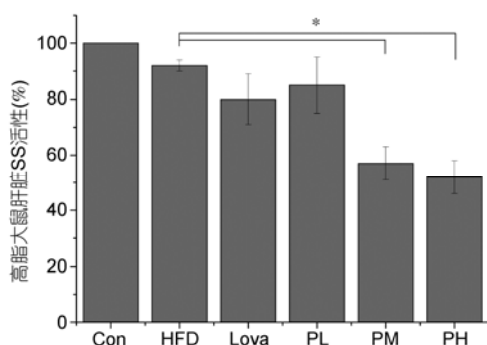


图 10 普洱茶对高脂血症大鼠肝脏中 SS 活性的影响

*: $P < 0.05$; 图注同图 2

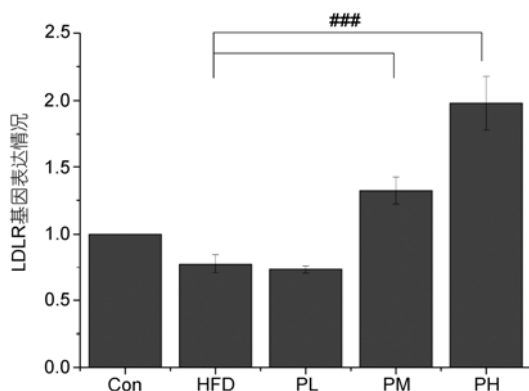


图 11 高脂血症大鼠肝脏中 LDLR 基因表达

###: $P < 0.001$; 图注同图 2

较高脂组分别提高约 1.3 和 2.0 倍, 说明普洱茶在转录水平上调了 LDLR 的表达.

2.10 普洱茶对 HepG2 细胞中成熟 LDLR 表达量的影响

检测普洱茶对 HepG2 细胞中 LDLR 表达量的影响. 普洱茶作用于 HepG2 细胞 24 h 后, 利用 Western blot 方法检测肝细胞表面 LDLR 表达量. LDLR 在图中出现 120 和 160 kD 两条条带, 其中 160 kD 条带表示糖基化后的 LDLR, 可在细胞表面与 LDL-C 正常结合, 而 120 kD 的 LDLR 为非糖基化的 LDLR, 亦称非成熟的 LDLR, 不能与 LDL-C 正常结合. 结果显示 (图 12), 普洱茶能上调成熟化的 LDLR 表达量, 相应地降低非成熟化 LDLR 表达量. 提示普洱茶降低 LDL-C 水平可能是通过促进 LDLR 的成熟, 增加肝脏表面 LDLR 的数量, 加快细胞外大量 LDL-C 与 LDLR 结合进行代谢.

2.11 普洱茶粉 HPLC 分析结果

普洱茶粉经 HPLC 分析, 结果显示, 普洱茶粉主要有效成分中咖啡因 (caffeine) 及没食子酸 (gallic acid, GA) 的含量最高, 分别约占普洱茶粉的 6.01% 和 3.02%, 儿茶素 (catechin, C) 约为 0.65%, 表儿茶素 (epicatechin, EC) 约为 0.43%, 表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 约为 0.07%.

3 讨论

高脂血症是由体内血脂代谢紊乱而引起的全身慢性疾病, 可引起动脉粥样硬化等心血管疾病, 严重危害人类健康^[9]. 高脂血症临床表现为血脂中的一项或是几项超出正常值范围, 血脂值异常. 防治高脂血症已经成为研究热点. 研究表明, 普洱茶具有降血脂、减肥、抗氧化等功效, 能有效预防心血管疾病的发生^[8]. 本研究采用高脂饲料饲喂 SD 雄性大鼠的方法构建高脂血症大鼠模型, 此模型是研究调血脂药物的最常用的动物模型^[10-13].

本实验选择的普洱茶溶液剂量是参考了刘勤晋等人^[14]《普洱茶急性毒性安全性评价研究报告》中所报道的普洱茶灌胃 LD_{50} 数值, 再根据本课题组以往研究结果所确定出来的, 低、高剂量浓度则是根据要求折算后确定的, 具有一定的安全性和科学性.

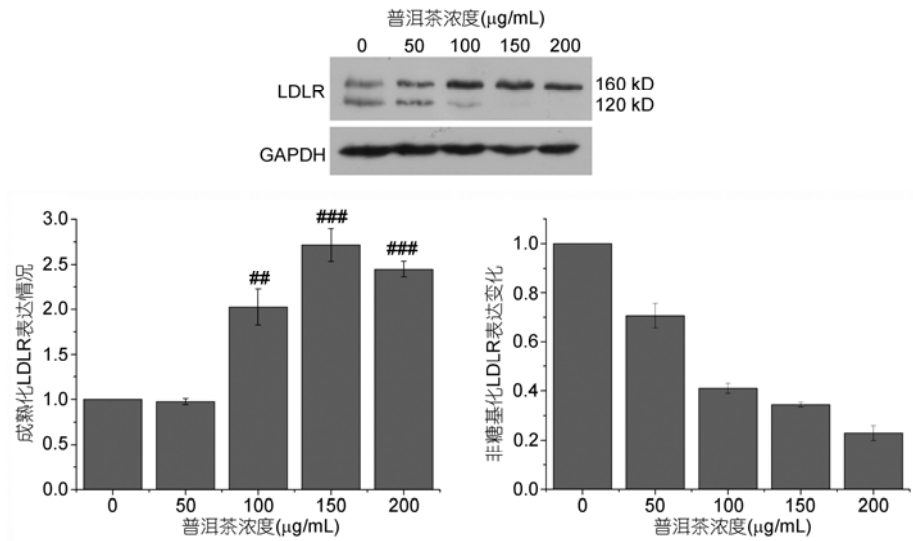


图 12 HepG2 细胞中 LDLR 的表达量
##: $P < 0.01$; ###: $P < 0.001$

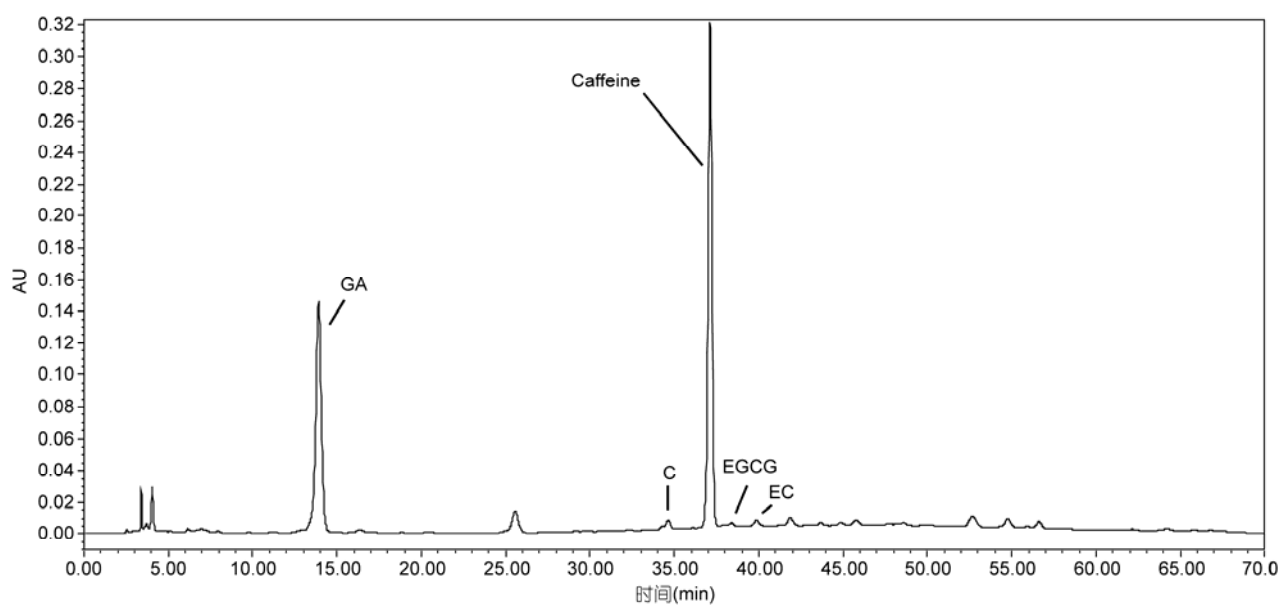


图 13 普洱茶粉有效成分检测色谱图

实验观察普洱茶对高脂血症大鼠血脂水平的影响。结果显示, 给予高脂血症大鼠不同剂量普洱茶连续 28 天, 高脂血症大鼠血浆 TC 和 LDL-C 水平较高脂组明显降低, 证实了普洱茶具有降低血脂的功效。此外, 高脂血症大鼠体重增长迅速, 肝重较正常组有显著增加。普洱茶中、高剂量可延缓体重的增长, 与高脂组有显著性差异, 并可降低肝重, 提示普洱茶具有减肥的功效。这些实验结果与以往研究普洱茶降

脂功效所发表的论文结果相一致, 证实了普洱茶的降脂功效。本研究阳性对照药洛伐他汀对血浆 TC 水平有降低作用, 但对高脂血症大鼠的体重、肝重无影响, 提示了普洱茶在降脂的同时具有减肥效果, 具有良好的应用前景。

体内胆固醇的来源绝大多数为体内合成。胆固醇合成过程中需要 HMG-CoA 还原酶、鲨烯合成酶、鲨烯氧合酶等限速酶的参与, 限速酶的活性和表达

量影响胆固醇的合成. 已有研究证明, 普洱茶富含多酚类成分, 可抑制 HepG2 细胞合成胆固醇^[15]. 本实验以甲羟戊酸为前体, 证实普洱茶抑制胆固醇的合成是在甲羟戊酸合成之后, 说明普洱茶作用靶点是通过影响甲羟戊酸途径后的某 1 个或某几个酶. 实验结果显示, 不同剂量的普洱茶后大鼠肝内鲨烯合成酶的表达和活性均受到了不同程度的抑制, 从而提示普洱茶通过抑制鲨烯合成酶的表达和活性而减少胆固醇的合成量, 降低血浆 TC 水平.

血浆 TC 水平与胆固醇代谢密切相关. LDL-C 是胆固醇在体内存在的主要形式, LDL-C 主要通过受体代谢途径排出体外. LDLR 是 LDL-C 代谢的主要结合受体, LDLR 受到细胞内胆固醇含量的调控^[6]. 降低细胞内胆固醇水平, 可促进 LDLR 的转录与表达, 并随细胞表面 LDLR 数量增多, 将更多血浆中 LDL-C 转运至细胞内. 以往研究表明, 绿茶能上调 LDLR 的

表达, 促进 LDL 结合 LDLR 水平, 降低血浆中 LDL 的水平^[16]. 本研究证实普洱茶能上调大鼠肝脏中 LDLR mRNA 的表达, 并随普洱茶浓度增高, 上调 HepG2 细胞中 LDLR 的蛋白表达.

4 结论

普洱茶调节血脂的作用主要体现在可以降低血浆 TC 和 LDL-C 水平, 并能抑制高脂血症大鼠体重迅速增长. 推测其作用机制为普洱茶通过影响胆固醇合成限速酶鲨烯合成酶的蛋白表达和活性, 抑制细胞内胆固醇的合成, 导致细胞内胆固醇的含量降低, 通过负反馈调节, 促使细胞内 LDLR mRNA 和蛋白表达量上调, 通过增加细胞表面 LDLR 数量, 使血浆中更多的 LDL-C 转运到细胞内, 从而降低血浆 LDL-C 水平, 起到调节血脂的作用.

参考文献

- 1 邹盛勤. 茶叶的药用成分、药理作用及应用研究进展. 中国茶叶加工, 2004, 18: 35-37
- 2 薛水英, 张勇. 普洱茶的主要化学成分及其保健作用的研究. 农业与技术, 2008, 28: 71-73
- 3 徐湘婷, 王鹏, 罗绍忠, 等. 普洱茶预防 SD 大鼠高脂血症及抗氧化、保护血管内皮的研究. 云南农业大学学报, 2011, 26: 260-264
- 4 Kuo L K, Weng M S, Chiang C T, et al. Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rats. Food Chem, 2005, 53: 480-489
- 5 Harwood H J Jr, Barbacci-Tobin E G, Petras S F, et al. 3-(4-Chlorophenyl)-2-(4-diethylaminoethoxyphenyl)-a-pentenitrile monohydrogen citrate and related analogs: reversible, competitive, first half-reaction squalene synthetase inhibitors. Biochem Pharmacol, 1997, 53: 839-864
- 6 Matsui M, Sakurai F, Elbashir S, et al. Activation of LDL receptor expression by smallRNAs complementary to a noncoding transcript that overlaps the LDLR promoter. Chem Biol, 2010, 17: 1344-1355
- 7 Goldstein J L, Brown M S. The LDL receptor. Arteriosclerosis, 2009, 29: 431-438
- 8 Hou Y, Shao W, Xiao R, et al. Pu-erh tea aqueous extracts lower atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. Exp Gerontol, 2009, 44: 434-439
- 9 沈丽萍. 银杏叶提取物治疗高甘油三脂血症疗效分析. 中国实用医药, 2008, 3: 149-150
- 10 Gholamhoseinian A, Shahouzehi B, Joukar S, et al. Effect of quercus infectoria and rosa damascena on lipid profile and atherosclerotic plaque formation in rabbit model of hyperlipidemia. Pakistan J Biol Sci, 2012, 15: 27-33
- 11 高莹, 李可基, 唐世英, 等. 几种高脂血症动物模型的比较. 卫生研究, 2002, 31: 97-99
- 12 吴文华, 吴文俊. 普洱茶多糖降血脂功能的量效关系. 福建茶叶, 2006, 32: 42-43
- 13 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. 茶叶科学, 2010, 30: 470-474
- 14 刘勤晋, 陈文品, 白文祥, 等. 普洱茶急性毒性安全性评价研究报告. 茶叶科学, 2003, 23: 141-145
- 15 Lu C, Hwang L S. Polyphenol contents of Pu-Erh teas and their abilities to inhibit cholesterol biosynthesis in Hep G2 cell line. Food Chem, 2008, 111: 67-71
- 16 Bursill C, Roach P D, Bottema C D K, et al. Green tea upregulates the low-density lipoprotein receptor through the sterol-regulated element binding protein in HepG2 liver cells. J Agric Food Chem, 2001, 49: 5639-5645

Effects and mechanisms of Pu-erh tea on metabolism of cholesterol in hyperlipidemia rats

GUO ShaoChen^{1,2}, LIU Hongjuan^{1,2}, ZHU DiNa^{1,2}, YAN ShiJun^{1,2}, JIANG GuoHua³, SHEN PeiPing⁵, ZHANG WenSheng^{1,2} & SHENG Jun^{4,5}

1 State Key Laboratory of Earth Surface Processes and Resource Ecology, College of Resources Science & Technology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

2 Protection and Utilization of Chinese Medicine Resources of Beijing Key Laboratory, College of Resources Science & Technology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

3 Analytical & Testing Center of Beijing Normal University, Beijing 100875, China

4 Ministry of Education Key Laboratory of Pu'er Tea, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

5 Pu'er Tea Research Institute, Pu'er Yunnan 665000, China

Pu-erh tea, one of the most popular beverages, is reported to have many healthy beneficial effects of lowering the plasma levels of lipids and lipoproteins, which may be relevant with its oxidation activity. However, the possible mechanisms of affecting the cholesterol biosynthesis and metabolism of LDL-C remain unknown. In this study, we examined the effects of different doses of Pu-erh tea on weight gain, plasma levels of lipids and lipoprotein, protein expression and activity of Squalene synthase, and transcription levels of LDLR, in a rat hyperlipidemia model. The inhibition ratio of cholesterol biosynthesis is determined by the method of liquid scintillation counting in HepG2 cell line. We found that the plasma TC and LDL-C levels were significantly reduced compared with the value of hyperlipidemic control group after 4 weeks treatment of different doses of Pu-erh tea. The protein expression of squalene synthase in rat liver was significantly decreased in Pu-erh tea-treated groups while activity of this rate-limiting enzyme was inhibited in the same groups. Pu-erh tea also inhibited the cholesterol biosynthesis in a dose-dependent manner from ³H-Mevalonate in HepG2 cell line. Our results suggest that Pu-erh tea exerts lipid-lowering effects by inhibiting the expression and activity of squalene synthase, as well as evaluating the transcription level and protein expression of LDLR.

Pu-erh tea, hyperlipidemia, cholesterol biosynthesis, squalene synthase, low-density lipoprotein receptor

doi: 10.1360/052012-204