

杜仲绿原酸对高脂模型小鼠 降血脂作用研究

王建辉^{1,2}, 刘永乐¹, 李赤翎¹, 俞 健¹, 李向红¹, 王发祥¹, 李 艳²

(1.长沙理工大学食品与生物工程系, 湖南长沙 410004;

2.长沙高新开发区大自然生物科技有限公司, 湖南长沙 410205)

摘 要:旨在开展杜仲绿原酸对高脂胆固醇诱导的高血脂模型小鼠脂质代谢的影响研究,以昆明小鼠为实验动物,随机分成5组:阴性对照组,模型对照组,以及低剂量(25mg/kg BW)、中剂量(50mg/kg BW)、高剂量(100mg/kg BW)杜仲绿原酸组,每组10只。后4组喂以高脂饲料,将小鼠灌胃杜仲绿原酸4周,分别测定各组小鼠血清和肝脏脂质水平及血清和肝脏的抗氧化酶活性和脂质过氧化产物MDA含量。研究发现:杜仲绿原酸显著降低小鼠血清TC、TG、LDL-C水平、动脉硬化指数和冠心指数,肝脏TC、TG含量亦有显著降低,血清和肝脏中MDA生成下降,抗氧化酶活性增加。研究表明:在高脂膳食条件下,杜仲绿原酸能够有效地降低血脂和肝脏脂质的积累,提高血清和肝脏抗氧化水平,具有明显的调节脂质代谢作用,其中以中剂量降血脂效果相对最佳。

关键词:绿原酸,血脂代谢,抗氧化,小鼠,高血脂模型

Effect of chlorogenic acid extracted from *Eucommia Ulmoides Oliv* on hyperlipemia of mice induced by high fat diet

WANG Jian-hui^{1,2}, LIU Yong-le¹, LI Chi-ling¹, YU Jian¹, LI Xiang-hong¹, WANG Fa-xiang¹, LI Yan²

(1.Department of Food and Bio-Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410004, China;

2.Supernatural Biotechnology Co., Ltd., Changsha National High-Tech Development Zone, Changsha 410205, China)

Abstract: To investigate the effect of chlorogenic acid extracted from *Eucommia Ulmoides Oliv* on lipid metabolism of hyperlipemia mice, fifty Kunming mice were randomly divided into 5 groups: negative control group, model control group, low dose (25mg/kg BW), medium dose (50mg/kg BW), and high dose (100mg/kg BW) groups of chlorogenic acid. The latter 4 groups were fed with high fat feed. Chlorogenic acid was given by gavage. Serum and liver lipid metabolic indices and their antioxidant enzymes activities and peroxidation product were measured. When chlorogenic acid was fed, the contents of serum TC, TG, LDL-C levels and liver TC, TG were significantly lower. Furthermore, MDA contents in serum and liver were decreased, and activities of antioxidant enzymes were increased. AI and R-CHR were also lower than that of the model group. These results indicated that chlorogenic acid from *Eucommia Ulmoides Oliv* could effectively reduce the blood and liver lipid accumulation and regulate lipid metabolism by improving their antioxidant activities. Among them the group at the dose of 50mg/kg BW showed best effect.

Key words: chlorogenic acid; metabolism of blood lipid; antioxidant; mouse; hyperlipidemia

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)15-0360-04

众所周知,血浆TC、TG、LDL-C过高或HDL-C过低,符合其中任何一项或几项,即为高脂血症^[1-3],它是动脉粥样硬化(AS)发生与发展的生化、病理基础,是动脉粥样硬化的重要诱因,血液胆固醇水平过高,易导致动脉血管内膜损伤,脂类物质附着于动脉

血管壁上,易造成动脉粥样硬化斑化,使动脉血管变窄,甚至完全阻塞,造成供血部位缺血性损害,大大增加冠心病发病危险。杜仲作为我国传统中草药,我研究团队已开展杜仲提取物和杜仲绿原酸研究多年,前期研究发现:杜仲提取物尤其是杜仲绿原酸具有较好的体内外抗氧化作用,且调控营养物质代谢及机体免疫等性能优良^[4-6]。绿原酸等多酚类物质被誉为“第七类营养素”。自1947年Rudkin和Nelson首次确定绿原酸的化学结构以来,大量研究表明其具有一系列生理活性,自由基清除活性为 $IC_{50} = 3.09 \mu\text{g/mL}$ ^[7];能抑制LDL的氧化,上调细胞抗氧化酶的表达,其抗氧化能力甚至优于常见抗氧化剂,

收稿日期: 2011-11-21

作者简介: 王建辉(1980-),男,博士后,副教授,主要从事食品资源开发与利用。

基金项目: 第39批留学回国人员科研启动基金项目;湖南省自然科学基金项目(11JJ6025);湖南省科技厅科技计划项目(2010NK3004);湖南省教育厅科学研究项目(10C0391)。

如 BHA 和生育酚等^[8]。绿原酸能有效增加大鼠血浆脂质过氧化产物如 TBA 反应底物和脂质过氧化体含量^[9],提高小鼠肝脏和肠道 GSH/GSSG 和 Cys/CySS 比率,维持其肝脏和肠道巯基氧化还原平衡^[10]。国外研究发现口服绿原酸有降低大鼠内肝脏脂肪堆积和体质量趋势^[11];绿原酸静脉给药能显著降低大鼠血浆中 TC 和 TG 的含量及肝脏中的 TG 水平^[12]。国内研究发现杜仲的乙醇提取物(含绿原酸约 4%)具有降血脂功能^[13],然而就高纯度绿原酸对高血脂小鼠降血脂作用尚无系统研究,本文采用高脂和高胆固醇膳食诱导构建小鼠高脂血症模型,通过综合分析杜仲绿原酸对血脂代谢及体内过氧化状态的影响,揭示绿原酸降血脂保肝作用的相关功能及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

杜仲绿原酸 实验室自制,98%;硫代巴比妥酸 上海化学试剂三厂;二甲亚砜(分析纯)、四乙氧基丙烷 天津市化学试剂三厂;总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)测定试剂盒 北京中生生物工程高技术公司;高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒 温州东欧生物工程有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)活力测定试剂盒、丙二醛(MDA)含量测定试剂盒 均由南京建成生物工程研究所提供;其它化学试剂 均为国产分析纯。

全自动生化仪 深圳迈瑞医用仪器有限公司;恒温水浴锅 北京国华仪器有限公司产品;台式离心机 湖南赛特湘仪离心机公司;微量式移液器 德国 Eppendorf。

1.2 动物及高脂模型建立

1.2.1 实验动物 选取体重 18~22g 昆明小鼠 50 只,雌雄各半。

1.2.2 日粮配方 普通饲料配方:玉米面 58.5%、麸皮 35%、面粉 3%、鱼粉 2%、食盐 1%、鱼肝油 0.5%^[14-15];高脂饲料配方:胆固醇 3.00%、丙基硫氧嘧啶 0.20%、猪油 10.00%、普通饲料 86.80%^[16]。

1.2.3 高脂模型的建立 饲以基础饲料 1 周后,将小鼠以体重为区组因素随机分成 5 组,每组 10 只,除空白对照组给予一般日粮外,其他 4 组均给予高脂饲料。各组小鼠自由采食,自由饮水。4 周后形态学和血清检测发现,与正常组小鼠相比,高脂血症模型组血清总胆固醇含量明显升高,肝脏颜色呈淡黄色,说明按该方法建模成功。

1.2.4 实验管理 造模成功小鼠,按实验初始时分组情况分为空白对照组、高脂模型组和绿原酸高、中、低剂量组,添加水平分别为 100、50、25mg/kg BW,除空白对照组给予普通饲料外,其他 4 组均给予高脂饲料。同时绿原酸各组以 100、50、25mg/kg BW 剂量灌胃,空白和高脂对照组灌服等容量的生理盐水,每天两次,上午 8~9 点,下午 3~4 点各一次,连续喂饲 4 周,每周末禁食 12h 称重,实验结束时,眼眶取血,制备血清,备用;并摘取完整肝脏,用 0~4℃冷生理盐水洗去血污,滤纸吸干后称重。取适量肝脏,用冷生理盐

水和异丙醇制成 10% 匀浆,4000r/min 离心 15min, -20℃保存备用。

1.3 观察方法与测定指标

从实验第 2 周开始,每日记录饲料的消耗情况并每周称 1 次质量。血清 TC、HDL-C 和 TG 采用 CHOD-PAP 酶法,测定方法准确按照相应试剂盒操作说明进行,测定均用深圳迈瑞全自动生化分析仪完成;由 Friedwald WT 公式算出 LDL-C = TC - (1/5TG + HDL-C)^[17];动脉硬化指数(AI):以公式 AI = (TC - HDL-C)/HDL-C 计算^[18];冠心指数(R-CHR):由公式 R-CHR = TC/HDL-C 计算^[19];肝指数:即肝湿重占体重百分数。

1.4 统计分析

实验数据结果以平均值表示,显著性统计采用 SAS 8.0 统计软件的单因素方差分析,并进行 Duncan 氏多重比较, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 杜仲绿原酸对高血脂小鼠体重变化的影响

实验过程中各组小鼠在各周结束时的体重见表 1。由表 1 可见,高脂模型组及各实验组间小鼠初始体重差异不显著($p > 0.05$),实验期间亦无明显差异($p > 0.05$),纵观实验全程,小鼠生长良好,无不良反应。

表 1 杜仲绿原酸对高脂小鼠体重的影响(g)

Table 1 Effect of chlorogenic acid on body weight of hyperlipidemia mice(g)

组别	初重	第一周	第二周	第三周	第四周
模型组	24.25 ^a	26.35 ^a	27.42 ^a	29.36 ^a	32.66 ^a
阴性对照组	24.14 ^a	25.98 ^a	27.12 ^a	29.18 ^a	32.22 ^a
低剂量组	24.03 ^a	25.78 ^a	27.03 ^a	28.48 ^a	31.56 ^a
中剂量组	24.02 ^a	25.85 ^a	26.75 ^a	28.79 ^a	32.32 ^a
高剂量组	24.08 ^a	25.68 ^a	27.24 ^a	29.42 ^a	31.65 ^a
SEM	0.4534	0.8567	1.034	0.9467	0.8745
<i>p</i>	0.9745	0.7654	0.8246	0.7658	0.6837

注:同列上标不同表示差异显著($p < 0.05$),表 2 同。

2.2 杜仲绿原酸对高血脂小鼠血清血脂及动脉硬化指数和冠心指数的影响

杜仲绿原酸对实验性高血脂小鼠血清血脂及动脉硬化指数和冠心指数的影响见表 2。高 TC 和高 LDL-C、低 HDL-C 是动脉粥样硬化重要危险因素。小鼠经高脂饲料诱导,高脂模型组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 显著高于阴性对照组,而 HDL-C 显著低于阴性对照组($p < 0.05$)。摄入不同剂量的杜仲绿原酸,高脂小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平显著降低($p < 0.05$),HDL-C 水平显著升高($p < 0.05$),其值接近或优于阴性对照组,且各绿原酸剂量组间,除 LDL-C 水平外,无显著差异,其中以中剂量杜仲绿原酸效果最佳。在医学上常用动脉硬化指数(TC-HDL-C)/HDL-C 和 LDL-C/HDL-C 表示动脉粥样硬化的危险性,冠心指数 TC/HDL-C 表示发生冠心病的危险性。由表 2 可知,小鼠经高脂诱导,其两个动脉硬化指数和冠心指数均显著升高($p < 0.05$),饲喂杜仲绿原酸后,各剂量组的动脉硬化指数和冠心指数均较

表2 杜仲绿原酸对血脂水平、AI 和 R-CHR 的影响

Table 2 Effect of chlorogenic acid on serum lipid levels, AI and R-CHR in hyperlipidemia mice

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	LDL-C /HDL-C	AI	R-CHR
模型组	5.26 ^a	1.34 ^a	1.08 ^c	3.91 ^a	3.62 ^a	3.87 ^a	4.87 ^a
阴性对照组	3.55 ^b	0.87 ^b	2.38 ^a	1.00 ^d	0.42 ^e	0.49 ^d	1.49 ^d
低剂量组	3.69 ^b	0.97 ^b	1.78 ^b	1.72 ^c	0.96 ^c	1.07 ^c	2.07 ^c
中剂量组	3.75 ^b	0.94 ^b	1.75 ^b	1.81 ^c	1.04 ^d	1.14 ^c	2.14 ^c
高剂量组	3.86 ^b	1.04 ^b	1.58 ^b	2.07 ^b	1.31 ^b	1.44 ^b	2.44 ^b
SEM	0.0312	0.0063	0.1114	0.0488	0.0925	0.0980	0.0980
<i>p</i>	<0.00011	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

模型组显著降低($p < 0.05$),但仍显著高于阴性对照组($p < 0.05$)。这说明饲喂杜仲绿原酸后,可通过改善小鼠血脂代谢水平,对阻止动脉硬化和冠心病的形成和发展具有改善作用。

2.3 杜仲绿原酸对高脂小鼠肝脏指数及肝脏血脂水平的影响

由图1可知,杜仲绿原酸和模型组小鼠肝重均显著高于阴性对照组($p < 0.05$),低、中剂量杜仲绿原酸小鼠肝重均显著低于模型组($p < 0.05$);就肝脏指数而言,高脂模型组显著高于阴性对照组和中剂量组($p < 0.05$),且后两者间无显著差异($p > 0.05$)。由图2可知,模型组肝脏 TC、TG 显著高于阴性对照组($p < 0.05$),而低、中、高剂量组的肝脏 TC、TG 显著低于模型组($p < 0.05$),中剂量组接近阴性对照组,与低、高剂量组间均存在显著差异($p < 0.05$)。

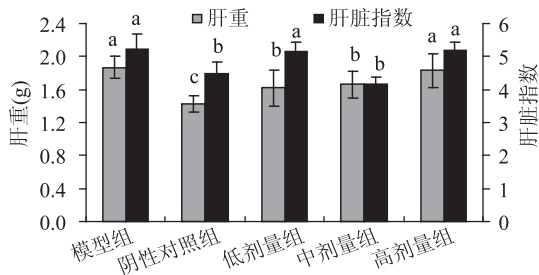


图1 绿原酸对高脂小鼠肝重和肝脏指数的影响

Fig.1 Effect of chlorogenic acid on liver weight and liver index in hyperlipidemia mice

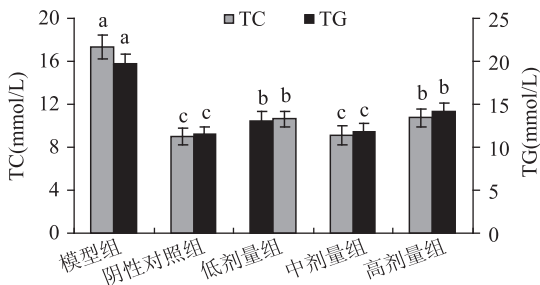


图2 绿原酸对高脂小鼠肝脏 TC、TG 的影响

Fig.2 Effect of chlorogenic acid on liver TC and TG levels in hyperlipidemia mice

2.4 杜仲绿原酸对小鼠 SOD 和 MDA 生成的影响

由图3可知,经高脂高胆固醇诱导,高脂模型组小鼠血清和肝脏中 SOD 水平显著低于阴性对照组($p < 0.05$)。饲喂杜仲绿原酸,各剂量组血清和肝脏

SOD 活性均显著升高($p < 0.05$),且显著高于阴性对照组($p < 0.05$)。同时,各剂量组小鼠血清和肝脏 MDA 含量较模型组显著下降($p < 0.05$)(图4)。

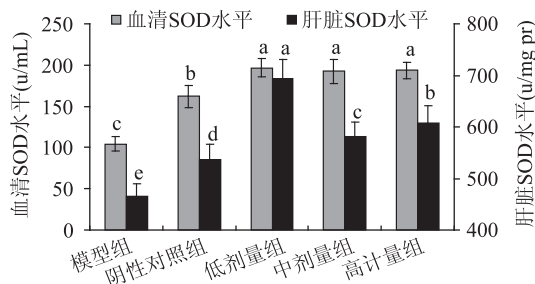


图3 绿原酸对高脂小鼠血清和肝脏 SOD 水平的影响

Fig.3 Effect of CGA on SOD levels in serum and liver of hyperlipidemia mice

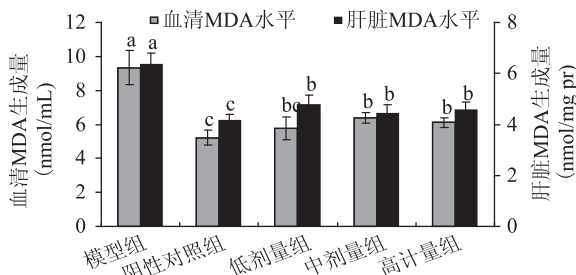


图4 绿原酸对高脂小鼠血清和肝脏 MDA 水平的影响

Fig.4 Effect of CGA on MDA levels in serum and liver of hyperlipidemia mice

3 结论

本实验以我国传统中草药杜仲提取而得的绿原酸为原料,通过小鼠高脂血症模型实验,研究发现:小鼠经高脂高胆固醇饲料诱导后,高脂模型组血清 TG、TC、LDL-C 含量显著高于阴性对照组($p < 0.05$),HDL-C 含量显著低于阴性对照组($p < 0.05$),饲喂杜仲绿原酸后,高、中、低3个剂量组血清 TC、TG、LDL-C 含量、冠心指数和动脉硬化指数均有显著降低($p < 0.05$),同时作为脂质代谢的重要器官肝脏,肝脏 TC、TG 含量亦有显著降低($p < 0.05$),各测定指标接近甚至低于阴性对照组。同时,实验研究发现,高、中、低3个剂量组血清和肝脏 SOD 水平均显著升高($p < 0.05$),MDA 水平显著降低($p < 0.05$),这表明在高脂膳食条件下,杜仲绿原酸能够十分有

(下转第375页)

谱-质谱分析[J].分析测试学报,2003,22(1):67-70.

[36]高翔.辣椒的保健功能及其产品的开发研究[J].食品研究与开发,2004,25(3):115-116.

[37]Suzuk I K, Mor I M. Carotenoid composition of new cultivar of Capsicum annum during maturation and its high capsanthin content[J]. Journal of the Japanese Society for Food Science & Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaish, 2003, 50(7):324-326.

(上接第362页)

效地降低血脂和肝脏脂质的积累,提高血清和肝脏清除自由基能力和抗氧化水平,具有明显的抗脂质过氧化和调节脂质代谢作用,其中以中剂量降血脂效果最佳。国内外研究发现口服绿原酸有降低大鼠内脏脂肪堆积和体质量的趋势^[11];绿原酸静脉给药能显著降低大鼠血浆中 TC、TG 的含量以及肝脏中的 TG 水平^[12],本研究结果与以往研究报道基本一致,但小鼠体质量的降低趋势不显著,可能是由于实验周期的差异(本实验周期仅为2个月),绿原酸对体重的影响尚没有表征出来。

总之,绿原酸对高血脂小鼠的脂肪代谢具有良好的改善作用。究其原因,可能源于绿原酸优良的抗氧化性能,其可与常见的抗氧化剂如 BHA、BHT 和生育酚等媲美,而其在肠道中的水解产物咖啡酸的抗氧化性能更为突出^[8]。同时,绿原酸能显著抑制脂肪代谢途径中脂肪酸合成酶、HMG-CoA 还原酶、脂酰辅酶 A、ACAT 活性,提高脂肪酸 β -氧化和过氧化物酶体增殖物激活受体 α 的表达,从而调节脂质代谢^[20]。另外,绿原酸能通过降低嗜中性粒细胞的通透性,在转录水平下抑制肝脏 Toll-样受体 4、TNF- α 和 NF- κ B mRNA 的表达,维持肝细胞活力,减缓肝细胞的坏死^[21];有效降低血浆抗氧化酶活性^[9],维持其肝脏氧化还原平衡^[10],然而杜仲绿原酸的降血脂和保肝作用的具体机制尚不明晰,仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] Knouff C, Briand O, Lestavel S, et al. Defective VLDL metabolism and severe atherosclerosis in mice expressing human apolipo-protein E isoforms but lacking the LDL receptor[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1684(1-3):8.
- [2] Engler MB. Familial hypercholesterolemia: genetic predisposition to atherosclerosis[J]. Medsurg Nurs, 2004, 13(4):252.
- [3] Kullo IJ, Bailey KR, McConnell JP, et al. Low-density lipoprotein particle size and coronary atherosclerosis in subjects belonging to hypertensive sibships[J]. Am J Hypertens, 2004, 17(9):845-851.
- [4] 王建辉,贺建华,易宣,等.杜仲提取物对猪胴体品质和肌肉氨基酸含量的影响[J].动物营养学报,2007(3):269-276.
- [5] 王建辉,贺建华,易宣,等.杜仲提取物对猪生长性能及血液指标的影响[J].饲料研究,2007(2):1-4.
- [6] 吕武兴,贺建华,王建辉,等.杜仲提取物对三黄鸡生产性能和胴体品质的影响[J].湖南农业大学学报,2005,31(6):640-643.

[38]贾洪峰,贺稚非,刘丽娜,等.辣椒碱的研究进展[J].食品研究与开发,2006,27(7):210-212.

[39] Lidia D, Elizabeth F, Humberto H. Antimicrobial activity of capsicum extracts against some pathogenic bacteria [A]. Proceedings of the 16th international pepper conference [C]. Tampico, Tamaulipas, Mexico. NOVEMBER, 2002; 10-12.

[40]张泽生,徐慧,张兰,等.辣椒果胶的提取工艺研究[J].食品工业科技,2010,31(9):273-276.

[7] Kwon SH, Lee HK, Kim JA, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1-3):210-217.

[8] Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid[J]. Int J Pharm, 2011, 403(1-2):136-138.

[9] Pari L, Karthikesan K, Menon VP. Comparative and combined effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin on antioxidant disparities in chemical induced experimental diabetes [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 341(1-2):109-117.

[10] Park HJ, Davis SR, Liang HY, et al. Chlorogenic acid differentially alters hepatic and small intestinal thiol redox status without protecting against azoxy-methane-induced colon carcinogenesis in mice[J]. Nutr Cancer, 2010, 62(3):362-370.

[11] Shimoda H, Seki E, Aitani M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice [J]. BMC Complement Altern Med, 2006, 17(6):9.

[12] Rodriguez DS, Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats [J]. J Nutr Biochem, 2002, 13:717-726.

[13]左航,黄文,李天宏,等.杜仲叶中绿原酸的提取条件优化及其提取物的降血脂作用[J].林业科学,2009,45(1):158-160.

[14]何天培,昝于明,周毓平.牛磺酸对脂代谢的影响及其作用机制的研究[J].营养学报,1999(2):233.

[15]马小凤,陕方,刘森,等.膨化燕麦麸对大鼠血脂水平的影响及营养品质研究[J].营养学报,1999,21(2):196-199.

[16]陈奇主编.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1994:520.

[17] Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge [J]. Clin Chem, 1972, 18(2):499-502.

[18]萧越峰,谌捷,陈文荣.血尿酸水平与血浆致动脉硬化指数关系探讨[J].齐齐哈尔医学院学报,2011(4):29-31.

[19]王卓,朱宝长,徐楠楠,等.丹参提取物对高脂血症小鼠糖脂代谢的影响[J].时珍国医国药,2009,20(5):1067-1070.

[20]Zhang X, Huang H, Yang T, et al. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Injury, 2010, 41(7):746-752.

[21]Xu Y, Chen J, Yu X, et al. Protective effects of chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice [J]. Inflamm Res, 2010, 59(10):871-877.