短篇论著

文章编号:1000-5404(2013)18-1992-04

普洱茶水提取物对大鼠非酒精性脂肪性肝病的干预作用

肖 凯, 朱晟易, 童钰铃, 余咪咪, 宋震亚 (310009 杭州,浙江大学医学院附属第二医院消化内科)

[摘要] **目的** 探讨普洱茶水提取物对大鼠非酒精性脂肪肝病的干预作用。**方法** 根据干预方式不同将50只SD大鼠分成空白对照组、脂肪肝模型组、普洱茶组、饮食控制组、饮食普洱茶组,每组10只。实验12周后,测定大鼠体质量、肝质量、血脂水平、肝组织TG和TC含量,并进行肝脏组织病理学检查。**结果** 与脂肪肝模型组比较,3个干预组肝脏病理切片提示肝脏脂肪变均有不同程度的改善,大鼠肝湿质量显著下降($P<0.01$),肝组织TG、TC含量显著下降($P<0.01$),血清HDL-C显著升高($P<0.01$);饮食控制组与饮食普洱茶组大鼠血清LDL-C显著降低($P<0.01$);普洱茶组和饮食普洱茶组大鼠血清TG显著降低($P<0.01$);普洱茶组和饮食普洱茶组大鼠体质量显著降低($P<0.01$)。**结论** 普洱茶水提取物具有明显降低血脂,改善肝脏脂肪变性的作用,可能作为非酒精性脂肪肝病早期预防和治疗有效的饮食策略。

[关键词] 普洱茶;非酒精性脂肪肝;降血脂

[中图法分类号] R151.3;R575.5 [文献标志码] A

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)是一种除外酒精和其他明确因素所致的以肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为主要特征的临床综合征,其疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎及其相关的肝硬化[1]。根据Fan等[2]的流行病学研究,中国发达地区NAFLD患病率约15%。目前NAFLD的治疗以生活方式干预和药物治疗为主,但减肥等生活方式干预患者依从性差,难以达到理想减肥目标,TZD类[3]及他汀类等药物治疗对改善肝脂肪变有一定疗效,但成本高,患者依从性差,导致NAFLD的治疗效果不佳,所以寻找一种安全、有效、便捷的干预措施尤为重要。

国内外研究证实普洱茶具有良好的降血脂、抗氧化[4]、减肥[5-6]、抗癌[7]等功效。为探讨普洱茶是否具有改善脂肪肝的功效,我们建立了大鼠NAFLD模型,通过普洱茶干预,观察大鼠体质量、肝质量、血脂水平、肝脂质含量及肝脏病理改变分析肝脂肪变程度变化。

1 材料与方法

1.1 普洱茶水提取物的制备

4 kg普洱茶(熟茶)由云南德宏志诚茶厂提供。普洱茶提取物的制备:1∶15的茶水比例,100 ℃沸水提取5 min;将提取液合并、过滤,冷冻干燥,得到提取物粉末0.75 kg,茶粉4 ℃冰箱保存。

1.2 主要试剂及仪器

TC、TG试剂盒(美国贝克曼-库尔特公司),HDL-C、LDL-C试剂盒(德国Autec公司),胆固醇(杭州昊天生物技术有限公司),油红染料(美国Sigma公司)。AU5400自动生化分析仪(美国贝克曼-库尔特公司),显微镜(德国Carl Zeiss公司),石蜡包埋机、石蜡切片机、组织脱水机、CM1950冰冻切片机均购自德国Leica公司。

1.3 实验动物及分组

4~5周龄雄性清洁级SD大鼠50只,体质量(130±10)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2007-0005],饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏[SYXK(浙)2008-0115],室温(23±2)℃,相对湿度60%~70%。

高脂饲料配方:基础饲料84%,猪油14%,胆固醇2%。基础饲料由浙江中医药大学实验动物研究中心提供,高脂饲料配方是根据Xu等[8]的高脂饲料配方进行改良。

动物分组及处理:大鼠在实验环境下适应性饲养1周后随机挑选10只作为空白对照组,喂养基础饲料。其余40只给予高脂饲料喂养4周建立单纯脂肪肝模型,4周后40只大鼠随机分成4组,每组10只进行8周干预治疗:脂肪肝模型组,继续喂养高脂饲料;普洱茶组,喂养高脂+普洱茶水提取物;饮食控制组,喂养基础饲料;饮食普洱茶组,喂养基础饲料+普洱茶水提取物。普洱茶水提取物用蒸馏水配制成溶液按1 mL/100 g经口灌胃,剂量为1.58 g/(kg·d),非普洱茶治疗组灌胃等体积的生理盐水。实验期间大鼠自由饮水和进食,每周称1次体质量。实验12周后,大鼠禁食12 h,戊巴比妥钠腹腔麻醉后,经腹主动脉采血5 mL,将大鼠断头处死,观察肝脏大体情况,快速分离肝脏并称其质量,计算肝指数,肝指数=肝湿质量/体质量×100。一部分肝脏立即于冰冻切片机里作冰冻切片,另一

[基金项目] 中医药重点研究计划(2012ZZ011)

[通信作者] 宋震亚,E-mail:songzy@medmail.com.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130515.1354.006.html(2013-05-15)

部分肝脏固定于10%的甲醛溶液中。收集的动脉血静置30 min后,3 000 r/min离心15 min收集血清待测。

1.4 动物血清指标的检测

血清TC、TG、HDL-C、LDL-C采用AU5400自动生化分析仪测定。

1.5 肝组织脂质测定

取100 mg标本,加入适量的抽提液(氯仿:甲醇为2:1,体积比)制成10%的匀浆(1:9,质量体积比),4 ℃、1 350×g离心15 min后取上清液,按TG、TC检测试剂盒说明操作。

1.6 肝组织病理学检测

肝组织固定,脱水,石蜡包埋,切片,HE染色,显微镜观察;油红O染色:肝组织冰冻切片10 μm,染色10 min,苏木精复染1 min。

1.7 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 16.0统计软件对数据进行分析,数据若方差齐则采用单因素方差分析,方差不齐采用秩和检验。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量、肝湿质量、肝指数的变化

与空白对照组比较,脂肪肝模型组大鼠肝湿质量和肝指数均明显升高($P<0.01$),而体质量变化没有明显差异($P>0.05$)。与脂肪肝模型组比较,普洱茶组和饮食普洱茶组大鼠体质量都明显降低($P<0.01$),而饮食控制组大鼠体质量没有明显改变($P>0.05$);普洱茶组大鼠肝湿质量与肝指数低于脂肪肝模型组,但无统计学差异($P>0.05$);饮食控制组、饮食普洱茶组大鼠肝湿质量($P<0.01$)、肝指数($P<0.01$)较脂肪肝模型组明显降低。见表1。

表1 普洱茶水提取物对大鼠体质量、肝湿质量、肝指数的影响

($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	体质量(g)	肝湿质量(g)	肝指数(%)
空白对照组	432.50±8.08	10.20±0.20	2.29±0.03
脂肪肝模型组	452.30±6.27	19.43±0.48[a]	4.27±0.11[a]
普洱茶组	361.70±10.24[b]	14.16±0.45	3.91±0.08
饮食控制组	442.00±3.56	10.42±0.12[b]	2.32±0.03[b]
饮食普洱茶组	338.20±6.12[b]	9.64±0.17[b]	2.87±0.07[b]

a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与脂肪肝模型组比较

2.2 普洱茶水提取物对大鼠血脂水平的影响

与空白对照组比较,脂肪肝模型组大鼠血清TG、LDL-C含量明显升高($P<0.01$),HDL-C含量明显降低($P<0.01$)。与脂肪肝模型组比较,普洱茶组和饮食普洱茶组大鼠血清TG含量明显降低($P<0.01$),普洱茶组、饮食控制组和饮食普洱茶组大鼠血清HDL-C含量均显著增高($P<0.01$),饮食控制组和饮食普洱茶组大鼠血清LDL-C含量明显降低($P<0.01$)。见表2。

表2 普洱茶水提取物对大鼠血清血脂水平的影响

(mol/L, $n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TG	TC	HDL-C	LDL-C
空白对照组	0.32±0.02	1.30±0.11	0.63±0.03	0.34±0.04
脂肪肝模型组	0.45±0.02[a]	1.63±0.09	0.40±0.03[a]	1.05±0.12[a]
普洱茶组	0.31±0.03[b]	2.04±0.12	1.01±0.05[b]	0.58±0.04
饮食控制组	0.41±0.03	1.22±0.07	0.61±0.02[b]	0.33±0.03[b]
饮食普洱茶组	0.32±0.02[b]	1.86±0.11	1.0±0.05[b]	0.47±0.03[b]

a:$P<0.01$, 与空白对照组比较;b:$P<0.01$, 与脂肪肝模型组比较

2.3 普洱茶水提取物对大鼠肝脂质成分的影响

脂肪肝模型组大鼠肝匀浆TG、TC含量明显高于空白对照组($P<0.01$);与脂肪肝模型组比较,普洱茶组、饮食控制组、饮食普洱茶组大鼠肝组织TG、TC含量均显著降低($P<0.01$)。见表3。

表3 普洱茶水提取物对大鼠肝组织TG、TC水平的影响

(mg/g, $n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TG	TC
空白对照组	6.19±0.43	0.48±0.03
脂肪肝模型组	19.10±0.47[a]	2.80±0.14[a]
普洱茶组	8.03±0.31[b]	1.25±0.06[b]
饮食控制组	6.70±0.52[b]	0.53±0.05[b]
饮食普洱茶组	3.16±0.11[b]	0.33±0.03[b]

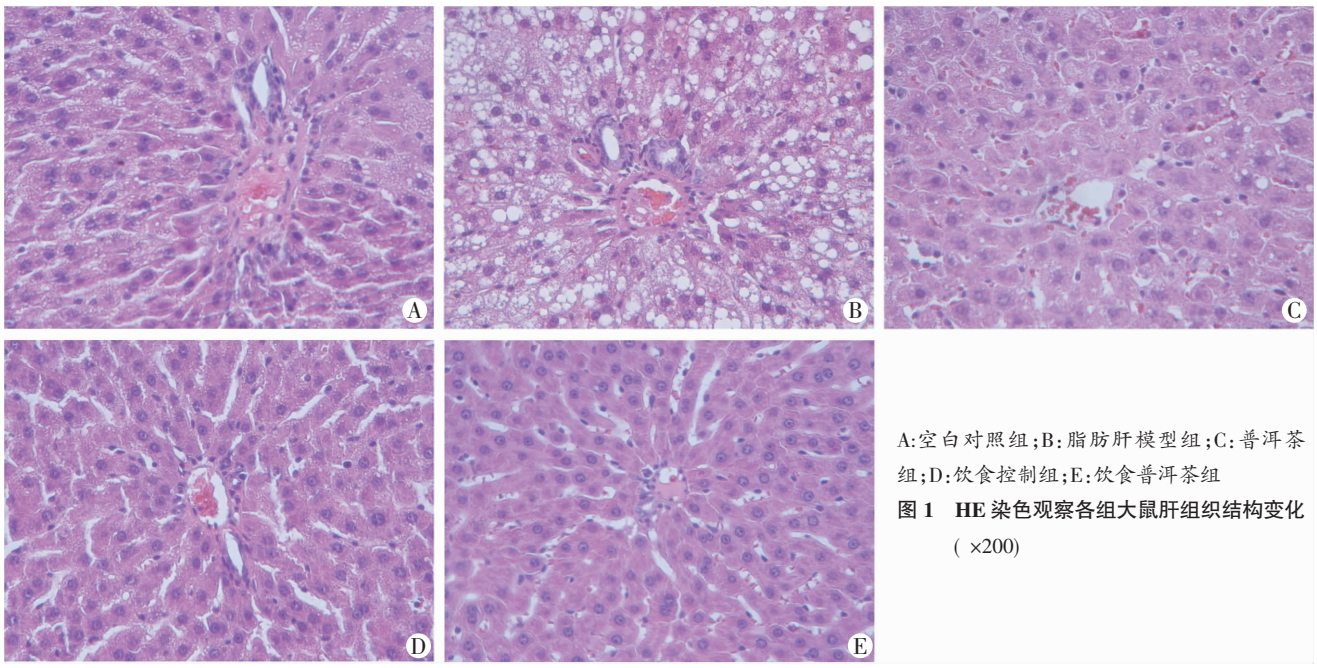
a: $P<0.01$,与空白对照组比较;b: $P<0.01$,与脂肪肝模型组比较

2.4 普洱茶水提取物对大鼠肝脏的影响

HE染色(图1):空白对照组大鼠肝小叶结构清晰、细胞质致密均匀、未见脂肪变性细胞;脂肪肝模型组大鼠肝细胞显著发生脂肪变性,肝细胞肿大变圆,内含有较大的脂肪滴,肝小叶中央静脉周围肝细胞呈典型大的脂滴空泡样改变,有的细胞内脂滴将细胞核挤向胞膜边缘。普洱茶组大鼠肝细胞脂肪变性明显改善,脂滴数量明显减少,仅少量的肝细胞"小泡"样脂肪变。饮食控制组与饮食普洱茶组大鼠肝结构均恢复正常。油红染色(图2):脂肪肝模型组肝细胞脂滴呈颗粒状、弥漫性堆积,脂滴明显增大,细胞质脂滴堆积将细胞核挤向一侧。与脂肪肝模型组比较,普洱茶组大鼠肝组织有少量脂滴,散在稀疏,脂滴体积较小,脂肪变明显改善。饮食控制组大鼠肝结构与空白对照组相似。饮食普洱茶组大鼠肝组织几乎没有脂滴存在,干预效果最显著。

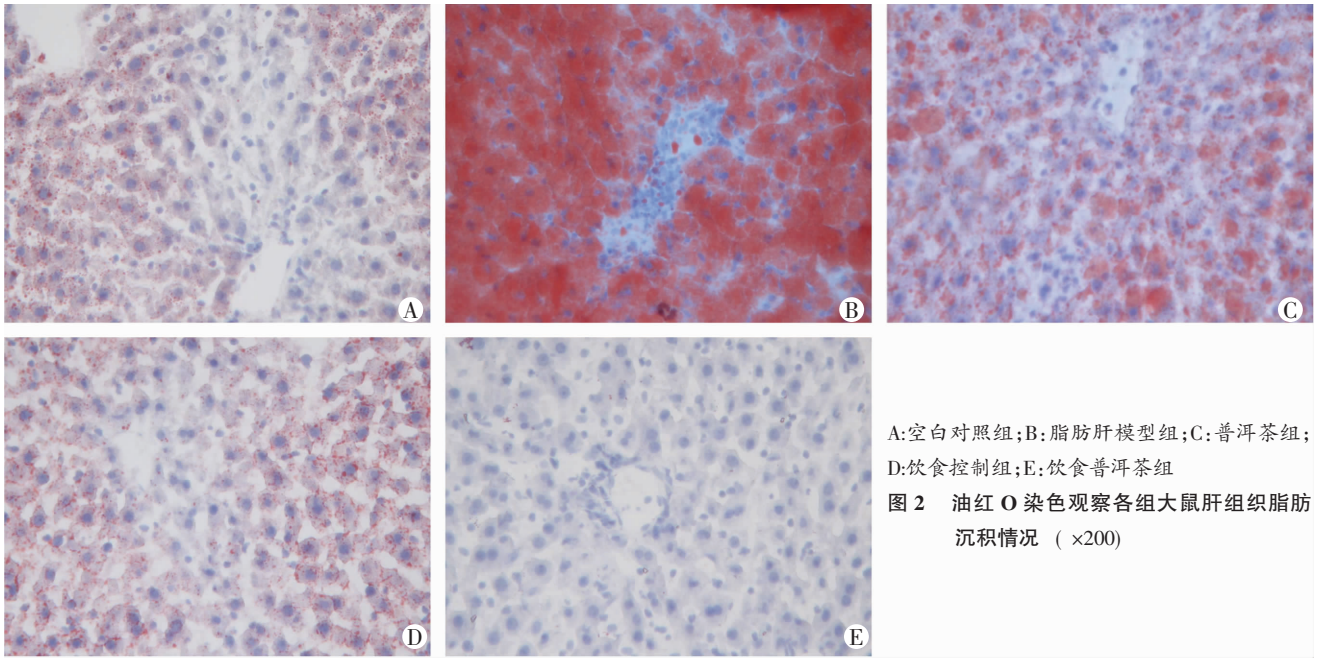
3 讨论

肝内甘油三酯聚集是NAFLD的特征,肝内甘油三酯大量聚集引起肝脂肪变性为"一次打击",脂肪肝受"二次打击"将导致肝损、炎症、纤维化[9]。因此,减少肝内脂质聚集是脂肪肝治疗的关键。从本研究结果看,饮食控制组大鼠肝脂质水平、肝脂肪变程度均基本接近正常,说明在脂肪肝早期诊治中,饮食控制等生活方式干预是治疗NAFLD的一项有效措施[9],但NAFLD患者往往无法严格控制饮食,致使治疗效果差。



A:空白对照组;B:脂肪肝模型组;C:普洱茶组;D:饮食控制组;E:饮食普洱茶组

图1 HE染色观察各组大鼠肝组织结构变化 (×200)



A:空白对照组;B:脂肪肝模型组;C:普洱茶组;D:饮食控制组;E:饮食普洱茶组

图2 油红O染色观察各组大鼠肝组织脂肪沉积情况 (×200)

普洱茶有良好的减肥、降脂功效[10]。本研究探索普洱茶水提取物对高脂引起的NAFLD的干预作用,结果表明:在普洱茶组,普洱茶水提取物能明显降低大鼠体质量、肝质量,具有良好的减肥效果;改善血脂水平,明显降低血清TG、LDL-C,升高HDL-C水平;显著降低肝TG、TC含量,明显改善肝脂肪变。说明普洱茶具有明显的减肥、降脂、改善NAFLD的作用。饮食普洱茶组大鼠肝脏TG、TC含量比空白对照组还要少,肝脏病理切片显示肝内几乎没有脂肪沉积,比空白对照组肝结构情况还要好,说明健康人群适当饮用普洱茶可以作为一项有效的预防脂肪肝,降低血脂的措施。

研究[11]表明普洱茶中的主要成分茶褐素能增加肝组织激素敏感脂肪酶(hormone sensitive lipase, HSL)mRNA表达。HSL是一个细胞内脂肪酶,可催化细胞内甘油三酯、甘油二酯、单酰甘油等脂质水解。研究[12]发现肝HSL过度表达可改善肝脏脂肪变性,促进脂肪酸氧化,有助于NAFLD的改善。普洱茶在人肝癌HepG2细胞中通过LKB1通路激活AMP活化蛋白激酶(AMPK),减少脂肪酸合成酶(FAS)的表达和抑

制乙酰辅酶A羧化酶(ACC)的活性,抑制脂肪合成[13]。因此,普洱茶改善NAFLD的部分机制可能是减少肝脏FAS表达,抑制ACC活性来抑制脂肪合成;增加肝HSL表达,促进肝内脂质分解。普洱茶改善NAFLD的具体机制还需要进一步研究。

参考文献:

[1] Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, *et al*. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(34): 4539-4550.

[2] Fan J G, Farrell G C. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China [J]. J Hepatol, 2009, 50(1): 204-210.

[3] Musso G, Gambino R, Cassader M, *et al*. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2010, 52(1): 79-104.

[4] 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 [J]. 云南农业大学学报, 2011, 26(2): 260-264.

[5] Cao Z H, Gu D H, Lin Q Y, *et al*. Effect of pu-erh tea on body fat and lipid profiles in rats with diet-induced obesity [J]. Phytother Res, 2011, 25(2): 234-238.

[6] Oi Y, Hou I C, Fujita H, *et al*. Antiobesity effects of Chinese black tea (Pu-erh tea) extract and gallic acid [J]. Phytother Res, 2012, 26(4): 475-481.

[7] Hayakawa S, Kimura T, Saeki K, *et al*. Apoptosis-inducing activity of high molecular weight fractions of tea extracts [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(2): 459-462.

[8] Xu Z J, Fan J G, Ding X D, *et al*. Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats[J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(4): 931-940.

[9] Musso G, Gambino R, Cassader M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update[J]. Obes Rev, 2010, 11(6): 430-445.

[10] Hou Y, Shao W, Xiao R, *et al*. Pu-erh tea aqueous extracts lower atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model[J]. Exp Gerontol, 2009, 44(6/7): 434-439.

[11] Gong J, Peng C, Chen T, *et al*. Effects of theabrownin from pu-erh tea on the metabolism of serum lipids in rats: mechanism of action [J]. J Food Sci, 2010, 75(6): H182-H189.

[12] Reid B N, Ables G P, Otlivanchik O A, *et al*. Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis [J]. J Biol Chem, 2008, 283(19): 13087-13099.

[13] Way T D, Lin H Y, Kuo D H, *et al*. Pu-erh tea attenuates hyperlipogenesis and induces hepatoma cells growth arrest through activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human HepG2 cells [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(12): 5257-5264.

(**收稿**:2013-03-04;**修回**:2013-04-18)

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2013)18-1995-04

短篇论著

Ang Ⅱ对大鼠心肌梗死后TGF-β1表达的影响及对心室肌重构的作用

韩素霞,郭李平,常建梅,李 鹏,王 娟,吕忠英 (830000 乌鲁木齐,新疆医科大学第五附属医院心血管内科)

[**摘要**] **目的** 探讨血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ,Ang Ⅱ)对大鼠心肌梗死后心肌组织中转化生长因子-β1(transforming growth factor β1,TGF-β1)表达的影响及对梗死心肌的作用。**方法** 健康雄性SD大鼠60只(体质量180~220 g),通过结扎冠状动脉前降支建立大鼠心肌梗死模型。术后48 h将存活的36只大鼠分为4组:假手术组($n=10$)、心肌梗死组($n=9$)、小剂量AT_1受体(angiotensinⅡtype-1 receptor,AT_1R)拮抗剂氯沙坦钾干预组($n=8$)、大剂量氯沙坦钾干预组($n=9$)。4周后取大鼠心脏左心室组织,采用放射免疫法测定梗死心肌中Ang Ⅱ的含量,用免疫组化、Western blot法检测TGF-β1的表达。**结果** 心肌梗死组心室肌组织匀浆中Ang Ⅱ含量较假手术组显著增高($P<0.05$),氯沙坦钾组与心肌梗死组相比,Ang Ⅱ的水平显著降低($P<0.05$),并具有剂量依赖性。免疫组化和Western blot结果提示心肌梗死组心肌组织中TGF-β1较假手术组显著升高($P<0.05$),经氯沙坦钾干预后与心肌梗死组比较,TGF-β1表达水平呈剂量依赖性降低($P<0.05$)。**结论** Ang Ⅱ通过与AT_1R结合后可增加大鼠心肌梗死后心室肌组织中TGF-β1的蛋白表达,AT_1受体拮抗剂氯沙坦钾呈剂量依赖性抑制心肌梗死后Ang Ⅱ和TGF-β1的表达,进而改善梗死心肌的重构。

[**关键词**] 血管紧张素Ⅱ;心肌梗死;转化生长因子-β1;AT_1受体拮抗剂

[**中图法分类号**] R341;R542.22;R977.6 [**文献标志码**] A

[**通信作者**] 韩素霞,E-mail:hsx0016@163.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130625.1251.011.html(2013-06-25)