

# 绞股蓝茶皂苷对高胆碱饮食所致小鼠血管内皮损伤的保护作用

郭建军, 任道远, 李照\*

(陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119)

**摘要:** 为了探索质量分数为 3% 高胆碱饮食对小鼠血管内皮功能的损伤程度以及绞股蓝茶皂苷潜在的心血管保护作用。连续 8 周饮食 3% 高胆碱后, 小鼠血清中一氧化氮合酶(eNOS)、一氧化氮(NO)和前列腺素(PGI<sub>2</sub>)水平均显著降低( $p < 0.01$ ), 内皮素-1(ET-1)和血栓素(TXA<sub>2</sub>)水平均显著升高( $p < 0.01$ )。此外, 小鼠胸主动脉血管组织的苏木精伊红切片也表明 3% 高胆碱饮食 8 周可导致典型的血管内皮损伤。然而, 经连续 8 周的绞股蓝茶皂苷的营养干预后, 血清生化指标及血管组织病理切片均得到显著缓解( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )。结果表明, 高胆碱饮食可诱导小鼠血管内皮功能异常, 而绞股蓝茶皂苷可有效干预高胆碱饮食导致的血管内皮损伤, 是一种潜在的预防心血管损伤的营养物质。

**关键词:** 茶皂苷; 绞股蓝; 高胆碱; 血管内皮损伤

**中图分类号:** TS 201.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)11-1131-06

## Protective Effects of Tea Saponins Derived from *Gynostemma pentaphyllum* Against High Dietary Choline-Induced Endothelial Injury in Mice

GUO Jianjun, REN Daoyuan, LI Zhao\*

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

**Abstract:** This study explored the vascular endothelial damages in the mice fed high-choline diet (3%), and the possible vasoprotective effects of tea saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (TSGP). After mice fed 3% high choline water for continuous 8 weeks, the serum levels of eNOS, NO and PGI<sub>2</sub> significantly reduced ( $p < 0.01$ ), while the serum levels of ET-1 and TXA<sub>2</sub> remarkably increased ( $p < 0.01$ ). Furthermore, the further histopathological observation by conventional H&E also suggested that vascular endothelial damages vascular happened in thoracic aorta after feeding 3% high-choline diet for 8 weeks. However, the TSGP remarkably ameliorated the above serum biochemical indexes and the histological section after treating with TSGP for 8 weeks ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). This results showing that high intake of dietary choline may induce vascular endothelial dysfunction, while

收稿日期: 2015-09-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(C31171678); 农业部农产品加工重点实验室开放课题项目。

\* 通信作者: 李照(1986—), 女, 辽宁阜新人, 理学博士, 讲师, 主要从事食品安全、食品分子营养与功能性食品研究。

E-mail: lizhao0309@snnu.edu.cn

引用本文: 郭建军, 任道远, 李照, 等. 绞股蓝茶皂苷对高胆碱饮食所致小鼠血管内皮损伤的保护作用[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(11): 1131-1136.

TSGP exerted a significant protective effect on the choline-induced vascular endothelial injury and is a kind of potential nutrients to prevent cardiovascular damage.

**Keywords:** tea saponins, *Gynostemma pentaphyllum*, high choline, vascular endothelial injury

美国 S.L. Hazen 研究组相继出版在 Nature (2011)、Nature Medicine (2013) 和 New England Journal of Medicine (2013) 杂志上的惊人研究发现<sup>[1-3]</sup>, 人体必需营养素 L-肉碱、胆碱或卵磷脂在肠道内被肠生理菌群代谢为三甲胺 TMA, 而进入体循环的 TMA 进一步由肝脏黄素单加氧酶 FMO-3 代谢转化为氧化三甲胺 TMAO, 而血循环 TMAO 介导血管动脉粥样硬化的发生, 从而引发各种心血管疾病(如

图 1 所示)。因此,除作为机体必须营养素外,胆碱还是一种潜在的食品有害成分。正确认识胆碱的生物作用及深入研究胆碱对血管内皮损伤的机理,对干预其危害和构建合理的胆碱膳食指南具有重要的科学意义。近年来,饮食介导调节各种心血管疾病越来越引起人们的关注。研究表明食物中的植物素具有一定的血管保护作用,比如多糖,黄酮类,皂苷等<sup>[4-6]</sup>。

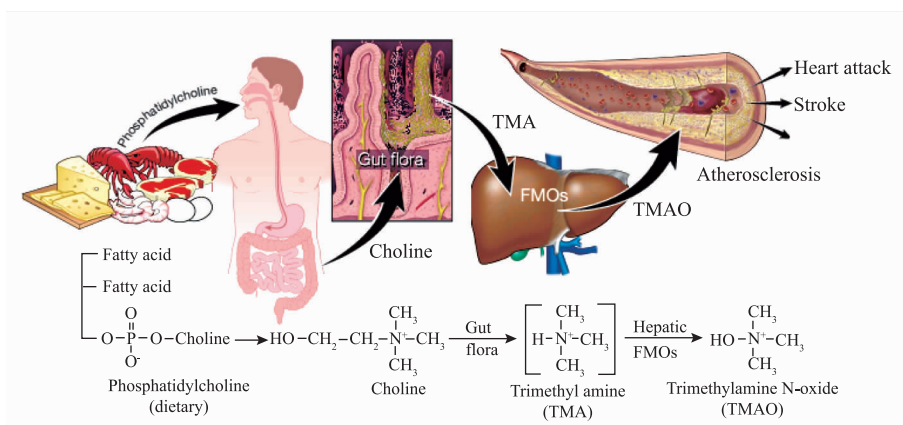


图 1 胆碱在机体内代谢通路

Fig. 1 Choline metabolic pathways in body

绞股蓝,属于葫芦科的一种多年生藤本植物,是一种知名的药食两用的植物,通常也被加工成一种草本茶,即绞股蓝茶<sup>[7-8]</sup>。和绿茶一样,绞股蓝茶也具有多种健康功效,像抗氧化性,抗癌活性,调节血压,增强免疫,降低胆固醇等<sup>[7-9]</sup>。绞股蓝皂苷(Gypenosides)是绞股蓝全草的有效成分,具有显著降血脂、抗缺氧、抗衰老、提高免疫功能等多种功能<sup>[10-11]</sup>。绞股蓝茶皂苷作为主要的活性物质,近年来用来预防和治疗新陈代谢的和心血管疾病<sup>[12-13]</sup>。

因此,我们选择饮食氯化胆碱作为胆碱来源,在前期实验的基础上,继续深入探究高剂量饮食氯化胆碱对小鼠的血管内皮的损伤情况,并用天然提取药物绞股蓝茶皂苷干预,以期达到预防和改善血管内皮细胞损伤,从而达到食源性药物预防和改善心血管疾病。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 动物** 实验昆明小鼠(体重 $(18\pm 2)$  g),动物许可证 XJYYLL-2015689,由第四军医大学提供。

**1.1.2 药物试剂和仪器** 绞股蓝茶:平利县兴强富硒茶叶有限公司产品;食用胆碱:济南亚西亚药业有限公司产品;一氧化氮合酶(eNOS)、一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)、血栓素(TXA<sub>2</sub>)、前列腺素(PGI<sub>2</sub>):南京建成生物公司提供;伊红、苏木素:西安医科生物产品;MILLI-Q超纯水仪:美国MILLIPORE公司产品;F6/10-10G匀浆机:上海弗鲁克设备有限公司产品;Megafuge1.0R冷冻离心机:美国Thermo公司产品;AL104电子天平:MettlerToledo公司产品;手术器械等:广东医疗器械

厂产品。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 绞股蓝茶总皂苷的制备** 绞股蓝茶总皂苷样品的制备参照先前的实验获得<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 动物实验的设计** 实验昆明小鼠随机分组5组(10只/组),即:正常组(Normal)、模型组(Model)、绞股蓝茶皂苷药物低、中、高3个剂量组(200、400 mg/kg和800 mg/kg)。其中,Normal组动物给予平常实验用的鼠粮和自来水,Model和绞股蓝茶皂苷干预组都给予质量分数为3%的胆碱水溶液代替普通的饮水进行饲喂。绞股蓝茶皂苷营养干预组小鼠每天每一只按照不同浓度茶皂苷进行灌胃(0.4 mL/只)。Normal和Model给予0.4 mL/只质量分数为0.9%氯化钠溶液。所有小鼠在适宜条件下饲养2个月,在处理前一天,小鼠采取禁食但不禁水的12 h后,腹腔注射戊巴比妥钠(50 mL/kg)使小鼠昏迷,通过眼眶静脉丛取血法采集血液,并迅速离心取上清液(4 000 g,20 min),于-80℃保存以备后续测定<sup>[14]</sup>。取小鼠胸主动脉血管约2 cm于质量分数为4%的多聚甲醛固定,于4℃保存以备后续组织病理学分析。

**1.2.3 动物血清生化指标的测定** 反映血管内皮功能的指标,一氧化氮合酶(eNOS)、一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)、血栓素(TXA<sub>2</sub>)、前列腺素(PGI<sub>2</sub>)通过试剂盒说明进行测定。

**1.2.4 动物组织病理学分析** 将固定于质量分数为4%多聚甲醛的小鼠胸主动脉血管用石蜡固定后用切片机切成5~6 μm的厚度进行H&E染色分析<sup>[15]</sup>。

**1.2.5 统计学分析** 所有测试指标均进行3次重复后取平均数,试验结果用mean ± SD(标准差)来表示,用DPS统计学软件对得到的结果进行显著性的分析和单因素的方差分析。显著性差异( $p < 0.05$ ),极显著性差异( $p < 0.01$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 绞股蓝茶总皂苷的制备

绞股蓝茶总皂苷经工艺优化提取,D101大孔吸附树脂纯化后,采用香草醛-高氯酸比色法测定其质量分数为83%<sup>[7]</sup>。

### 2.2 绞股蓝茶皂苷对血清eNOS,NO和ET-1水平的影响

NO与ET-1可以协调控制血管的张力,NO可以扩展血管,活化血小板、抑制血小板凝聚,以及抗

炎症反应得等功能,而NO由eNOS催化合成的<sup>[16-17]</sup>。ET-1具有强烈的收缩血管的作用,损伤的血管内皮细胞可释放大量ET,可损伤血管和心肌组织<sup>[18]</sup>。

如图2所示,小鼠血清中的eNOS活性和NO水平显著降低( $p < 0.01$ ),ET-1水平显著升高( $p < 0.01$ )。与正常组相比,模型组小鼠eNOS活性和NO水平分别降低了25.9%( $p < 0.01$ ,图2(a))和59.0%( $p < 0.01$ ,图2(b)),而ET-1水平升高了32.0%( $p < 0.01$ ,图2(c))。通过药物绞股蓝茶皂苷(400 mg/kg和800 mg/kg)营养干预后,eNOS活性和NO水平的降低以及ET-1水平的升高可以得到显著性抑制( $p < 0.05$ , $p < 0.01$ ),而200 mg/(kg·bw)干预的eNOS活性和ET-1水平没有显著性的变化( $p > 0.05$ )。

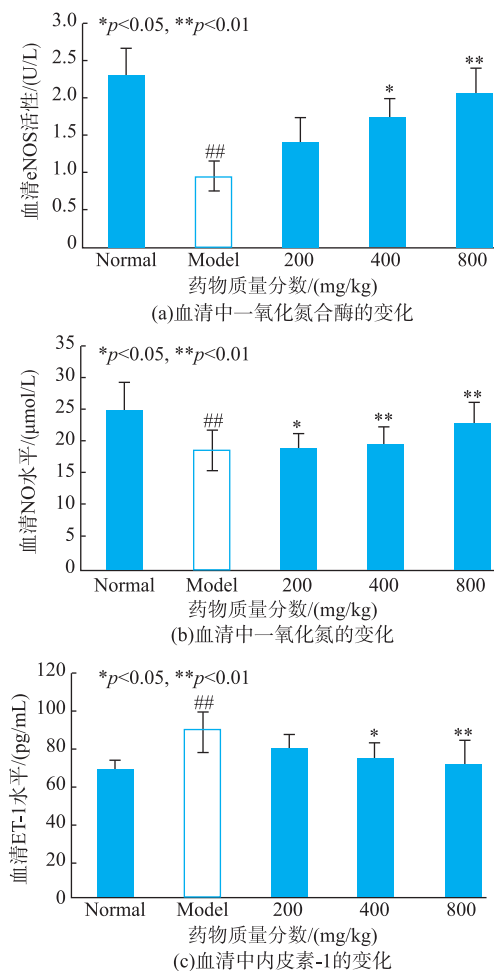


图2 血清中内皮细胞分泌物水平变化

Fig. 2 Serum levels of substances generated by endothelial cells

**2.3 绞股蓝茶皂苷对血清TXA<sub>2</sub>和PGI<sub>2</sub>水平的影响** 血栓素A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)和前列环素(PGI<sub>2</sub>)也是由血

管内细胞分泌的,它们通过在血管中改变血管的舒张和收缩来体现 VEC 的功能。它们的比值(TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>)大小能反应血管功能是否正常。当 TXA<sub>2</sub> 水平升高而 PGI<sub>2</sub> 降低则证明体内的血管内皮细胞功能损伤。也许会进一步引起动脉粥样硬化病变<sup>[19-20]</sup>。

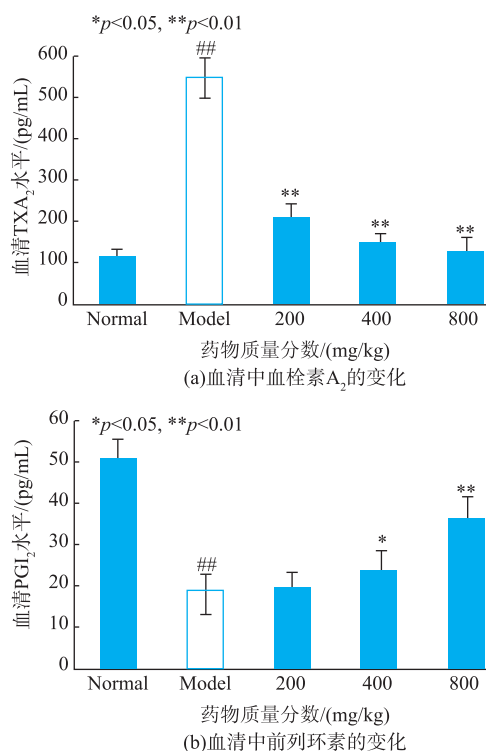


图3 血清中内皮细胞分泌物水平变化

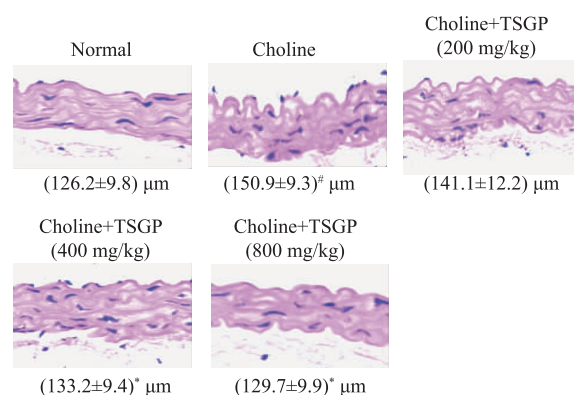
Fig. 3 Serum levels of substances generated by endothelial cells

如图3所示,小鼠血清中TXA<sub>2</sub>的水平从(121.0±15.1) pg/mL升高到(546.8±47.8) pg/mL( $p < 0.01$ ,图3(a)),而PGI<sub>2</sub>的水平从(50.7±5.2) pg/mL降低到(19.4±3.4) pg/mL( $p < 0.01$ ,图3(b))。通过药物绞股蓝茶皂苷营养干预后,在绞股蓝茶皂苷200 mg/(kg·bw)处理组, TXA<sub>2</sub>的水平降到了(211.5±34.8) pg/mL,而在处理400 mg/kg和800 mg/kg组, TXA<sub>2</sub>的水平以剂量依赖型的得到改善。而PGI<sub>2</sub>的水平在400 mg/kg营养干预后, PGI<sub>2</sub>的水平上升到(24.3±4.3) pg/mL( $p < 0.05$ ),处理800 mg/kg剂量可以显著性地提高PGI<sub>2</sub>的水平( $p < 0.01$ )。

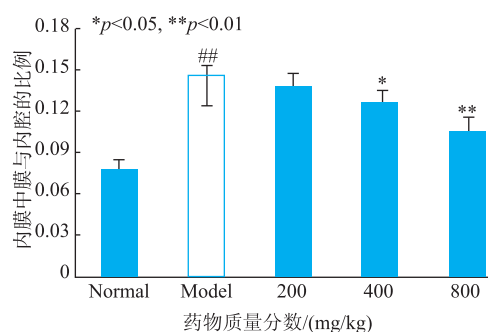
#### 2.4 小鼠胸主动脉的组织病理学观察

内皮组织的完整性可以调节血管内环境的稳定,当遇到物理或化学的损坏时,内皮细胞将表现出不正常的功能,伴随一系列的临床症状和心血管

疾病<sup>[21-23]</sup>。



(a) 胸主动脉血管壁的内皮组织在不同处理下的变化



(b) 血管内膜中膜与内腔的比例在不同处理下的变化

图4 小鼠胸主动脉 H&E 染色以及内膜中膜与内腔的厚度比例

Fig. 4 Thoracic aortas stained by H&E and intima-media/lumenratio of the thoracic aorta

如图4(a)所示,与正常组相比,模型组小鼠的胸主动脉血管壁的内皮组织发生了形态变化,表现为明显的血管壁增生,血管中膜的增厚等。然而,绞股蓝茶皂苷剂量营养干预后小鼠的胸主动脉血管壁的内皮组织逐渐恢复到原来的组织形态。图4(b)呈现了血管内膜中膜与内腔的比例,从柱形图可以看出药物绞股蓝茶皂苷可以减少饮食胆碱导致的壁厚率。与正常组相比,模型组血管内膜中膜与内腔的比例增加了91.1%,而通过茶皂苷营养干预后,200、400 mg/kg和800 mg/kg组与模型组相比分别降低了5.5%( $p > 0.05$ )、14.3%( $p < 0.05$ )和30.0%( $p < 0.01$ )。以上结果表明,药物绞股蓝茶皂苷可以改善饮食胆碱所造成的血管功能异常。

## 3 结语

胆碱通常作为一种必需的营养补充剂,而且有研究报道称缺乏饮食胆碱可能导致非酒精性肝损

伤和肌肉损伤<sup>[2,24]</sup>。然而 Wang 等<sup>[1]</sup>的报道饮食胆碱与心血管疾病的发生密切相关,这引起了人们的普遍关注。饮食胆碱可以诱导小鼠各种心血管疾病除美国 S.L. Hazen 研究组的研究报道后再无追踪到其它研究报道,因此作者通过近 3 年的追踪研究,预实验已经初步验证了高剂量饮食氯化胆碱摄入能够诱发小鼠血管内皮损伤的事实后,作者选用高剂量饮食氯化胆碱造模,诱发小鼠血管内皮损伤模型,并寻求天然药物进行营养干预。绞股蓝皂苷作为一种草本植物的提取物在降血脂、降血糖、平衡血压、抗缺氧、抗衰老、促进细胞新陈代谢、提高免疫功能、肝保护等方面已有研究报道<sup>[10-11]</sup>。绞股蓝茶是将收割后的绞股蓝茎或叶,经过净制、蒸制、炒

制、揉制、烘制、包装等工艺加工而成的饮用茶<sup>[7]</sup>。本研究选取绞股蓝茶皂苷作为药物营养干预高饮食胆碱所致的小鼠血管内皮细胞损伤。通过检测反映血管内皮细胞功能指标 eNOS、NO、PGI<sub>2</sub>、ET-1、TXA<sub>2</sub> 以及胸主动脉内皮细胞的组织切片,我们发现又一次证实了高饮食胆碱可以导致血管内皮细胞功能异常,并且茶皂苷营养干预可以明显改善血管内皮细胞功能的异常。

因此,本研究的结果可以为人们对饮食胆碱的认识进一步提高理论依据和参考价值,并开启一种可能开发绞股蓝茶皂苷作为一种天然药物或一种潜在的食物补充剂来预防和治疗心血管疾病。

## 参考文献:

- [ 1 ] WANG Z, KLIPFELL E, BENNETT B J, et al. Gut flora metabolism of phosphatidyl-choline promotes cardiovascular disease[J]. **Nature**, 2011, 472(7341): 57-63.
- [ 2 ] KOETH R A, WANG Z, LEVISON B S, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis[J]. **Nature Medicine**, 2013, 19(5): 576-585.
- [ 3 ] TANG W H W, WANG Z, LEVISON B S, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk [J]. **New England Journal of Medicine**, 2013, 368(17): 1575-1584.
- [ 4 ] WANG Jingfeng, PANG Long, XUE Yong, et al. Protective effects of polysaccharides, triterpene glycosides and collagen polypeptides from *Apostichopus japonicus* on vascular endothelial cells [J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2008, 24(2): 227-232. (in Chinese)
- [ 5 ] LIU Aiqun, XIE Lu, LONG Jinglun. Effects of polysaccharide of laminaria on expression and secretion of t-PA and PAI-1[J]. **Chinese Journal Public Health**, 2008, 24(3): 334-336. (in Chinese)
- [ 6 ] HODGSON J M, CROFT K D. Dietary flavonoids: effects on endothelial function and blood pressure [J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2006, 86(15): 2492-2498.
- [ 7 ] GUO Jianjun, LEI Xiao, RED Daoyuan, et al. Study on purification and antioxidant activity of total saponins of gynostemma [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2015, 36(5): 99-102, 107. (in Chinese)
- [ 8 ] WU P K, TAI W C S, CHOI R C Y, et al. Chemical and DNA authentication of taste variants of *Gynostemma pentaphyllum* herbal tea[J]. **Food Chemistry**, 2011, 128(1): 70-80.
- [ 9 ] BAI M S, GAO J M, FAN C, et al. Bioactive dammarane-type triterpenoids derived from the acid hydrolysate of *Gynostemma pentaphyllum* saponins[J]. **Food Chemistry**, 2010, 119(1): 306-310.
- [ 10 ] SHEN Hongwei, XIAO Yanchun, CHE Renguo, et al. Extraction and content determination of the total gypenosides in *Gynostemma pentaphyllum*[J]. **Food Science and Technology**, 2004(4): 158-160. (in Chinese)
- [ 11 ] ZHANG Yusong. Health benefits of *Gynostemma pentaphyllum* tea [J]. **Agricultural Archaeology**, 2003(4): 200-201. (in Chinese)
- [ 12 ] YAN J, WU Z L, ZHAO Y L, et al. Separation of tea saponin by two-stage foam fractionation [J]. **Separation and Purification Technology**, 2011, 80(2): 300-305.
- [ 13 ] CHEOK C Y, SALMAN H A K, SULAIMAN R. Extraction and quantification of saponins: A review [J]. **Food Research International**, 2014, 59(4): 16-40.
- [ 14 ] ZHANG R J, ZHAO Y, SUN Y F, et al. Isolation, characterization, and hepatoprotective effects of the raffinose family

- oligosaccharides from *Rehmannia glutinosa* Libosch[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013, 61(32):7786-7793.
- [15] GUO J J, MENG Y H, ZHAO Y, et al. Myricetin derived from *Hovenia dulcis* Thunb. ameliorates vascular endothelial dysfunction and liver injury in high choline-fed mice[J]. **Food & Function**, 2015, 6(5):1620-1634.
- [16] NING Yaxian, WANG Jianqin, WANG Xueting, et al. The effect of astragalus calycosin monomer to TNF- $\alpha$  induced human umbilical vein endothelial cells ET-1/NO [J]. **International Journal of Urology and Nephrology**, 2012, 32 (2):172-176. (in Chinese)
- [17] EDIRISINGHE I, BANASZEWSKI K, CAPPOZZO J, et al. Effect of black currant Anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in vitro in human endothelial cells[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013, 61(4):8616-8624.
- [18] XUE Jianfeng, ZHAO Chengjun, JIA Ruyi. Injury markers of blood vessel endothelium [J]. **Medical Recapitulate**, 2006, 12(8):461-463. (in Chinese)
- [19] LIN Rong, LIU Juntian, LI Xu. Protective effect of tetramethylpyrazine on vascular endothelial cell injured by hydrogen peroxide [J]. **Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology**, 2000, 14(6):425-429. (in Chinese)
- [20] HAO Hongjun, JIN Haiqiang, SUN Weiping, et al. The dynamic analysis of the level of plasma TXB2 and 6-keto-PGF1 $\alpha$  in acute cerebrovascular disease[J]. **Chinese Journal of Laboratory Diagnosis**, 2012, 16(9):1612-1615. (in Chinese)
- [21] POREDOS P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. **Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis**, 2002, 15(6):367-368.
- [22] SITIA S, TOMASONI L, ATZENI F, et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis [J]. **Autoimmunity Reviews**, 2010, 9(2):830-834.
- [23] RUSSO G, LEOPOLD J A, LOSCALZO J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis[J]. **Vascular Pharmacology**, 2002, 38(5):259-269.
- [24] HUNT P S, JACOBSON S E, KIM S. Supplemental choline does not attenuate the effects of neonatal ethanol administration on habituation of the heart rate orienting response in rats[J]. **Neurotoxicology and Teratology**, 2014, 44:121-125.

## 会 议 消 息

会议名称(中文): 中国细胞生物学学会 2018 年全国学术大会

所属学科: 动植物微生物学, 细胞生物学

开始日期: 2018-04-10

结束日期: 2018-04-13

所在城市: 江苏省 南京市

具体地点: 南京国际博览会议中心 主办单位: 中国细胞生物学学会

协办单位: 南京大学-南京生物医药研究院、江苏省细胞与发育生物学会

承办单位: 医药生物技术国家重点实验室、模式动物与疾病研究教育部重点实验室、南京大学模式动物研究所、南京江北新区/南京生物医药谷发展中心、上海博生会展有限公司

议题:

摘要截稿日期: 2017-12-31

全文截稿日期: 2018-03-05

联系电话: 021-54922856 / 54922891

E-MAIL: meeting@csb.org.cn

会议注册费: 1500

会议网站: <http://www.csb.org.cn/2018>

会议背景介绍: 为促进我国细胞生物学领域研究人员的交流与合作, 推动中国细胞生物学学科的发展, 中国细胞生物学学会决定自 2017 年起将原两年一次召开的“细胞生物学全国学术大会”更改为每年举办一次。“中国细胞生物学学会 2018 年全国学术大会·南京”将于 2018 年 4 月 10-13 日在江苏南京举行。