

The Regulation of Pu-erh Tea on Blood Lipids in apoE-Gene Knocked Mice*

Xinfeng Jiang¹, Wanfang Shao^{2#}, Caixia Liu¹, Chunhua Cheng³, Jihong Yang³

¹Jiangxi Sericulture and Tea Research Institute, Nanchang

²College of Longrun Pu-erh Tea, Yunnan Agricultural University, Kunming

³Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming

Email: jiangxinyue003@163.com, #shaowf38@vip.sina.com

Received: Jan. 4th, 2013; revised: Jan. 7th, 2013; accepted: Jan. 30th, 2013

Abstract: This study aimed to investigate the effects of Pu-erh tea on blood lipids in apoE-knockout mice. So we selected 4-week-old male apoE-gene knocked mice, and they were randomly divided into four groups: atherosclerosis group, fermenting Pu-erh Tea group, fermented Pu-erh Tea group and drug group. The all mice were used as the control. All mice were fed with normal chow diet. After 90 days, Vessels blood was collected for serum lipid, using automatic biochemical analyzed measuring serum the total clesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein (LDL-C), high-density lipoprotein (HDL-C), and other hyperlipidemia indicators. The result is that Pu-erh Health (cooked) tea cansignificantly increase control of body weight ($P < 0.05$); reduce the high fat mice serum TG, LDL-C content, increased HDL-C in ($P < 0.05$); And cooked Pu-erh tea can significantly reduce the high fat rat serum TC, TG, LDL-C in ($P < 0.05$). These results suggested that Pu-erh tea may play a role in anti-atherosclerosis in apoE-knockout mice.

Keywords: Pu-erh Tea; Atherosclerosis; The Mice of apoE-Gene Knocked

普洱茶调节 apoE 基因敲除小鼠血脂水平的研究*

江新风¹, 邵宛芳^{2#}, 刘彩霞¹, 程春华³, 杨继红³

¹江西省蚕桑茶叶研究所, 南昌

²云南农业大学龙润普洱茶学院, 昆明

³云南省天然药物药理重点实验室, 昆明

Email: jiangxinyue003@163.com, #shaowf38@vip.sina.com

收稿日期: 2013 年 1 月 4 日; 修回日期: 2013 年 1 月 7 日; 录用日期: 2013 年 1 月 30 日

摘要: 为了验证普洱茶对 apoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的作用; 本研究选取了 40 只 4 周龄雄性 apoE 基因敲除小鼠, 按照体重随机分成降脂药组、模型组、生茶组、熟茶组 4 组外加 10 只正常对照组。用普洱茶汤进行干预性试验 90 天后, 空腹 12 小时, 摘眼球采血, 采用全自动生化仪测血清中的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)等血脂指标; 试验结果显示: 普洱茶(生、熟)均可显著控制小鼠体重增长($P < 0.05$); 普洱生茶可显著降低小鼠血清中 TG、LDL-C 的含量, 升高 HDL-C 的含量($P < 0.05$), 可显著降低 AI 系数; 因此可判定, 普洱茶对 apoE 基因敲除小鼠的抗动脉粥样硬化有一定的调节作用。

关键词: 普洱茶; 动脉粥样硬化; apoE 基因敲除小鼠

1. 引言

载脂蛋白 E(apolipoprotein E, apoE)是血浆中重要

*基金项目: 国家现代农业(茶叶)产业技术体系建设专项(CARS-23)。

#通讯作者。

的载脂蛋白之一。apoE 主要在肝脏合成、分泌和代谢, 参与脂质的运输、储存及排泄, 有修复组织、抑制血小板聚集、免疫调节等作用^[1]。载脂蛋白(apolipoprotein E, apoE)是清除乳糜微粒和极低密度脂蛋白的受体的

配体, 因此, 缺乏 apoE 则会导致血液循环中富含胆固醇的物质积累而更加容易引起动脉粥样硬化(AS)病灶形成。apoE 基因敲除小鼠亦称 apoE 基因缺陷小鼠, 由美国洛克菲勒大学生化遗传与代谢实验室和北卡罗莱那大学病理遗传实验室应用胚胎干细胞基因敲除(gene knockout)技术于 1992 年培育成功; 这种小鼠无论正常或高脂血症及 AS 的发病机理和治疗措施等方面做了很多卓有成效的研究^[2]。

本研究将以不同加工工艺的普洱茶为原料, 选取 apoE 基因敲除小鼠作为试验对象, 在造模的同时, 受试物经口灌胃 90 天后, 测定其血脂指标, 从而验证普洱茶是否具有抗动脉粥样硬化的作用, 为普洱茶的保健功效提供科学理论依据, 为消费者健康饮用普洱茶提供参考, 从而促进普洱茶产业的健康发展。

2. 试验材料

2.1. 试验动物

SPF 级 C57B/6J8 周龄雄性小鼠 10 只, 购入时体重 20 ± 2 g, 生产许可证号: SCXK(渝)2007-0008。来源于第三军医大学大坪医院。

SPF 级 apoE(-/-)小鼠 4 周龄雄性 40 只, 购入时体重 20 ± 2 g, 生产许可证号 SCXK(京)2006-0008。来源于北京大学实验动物中心。

2.2. 试验材料

1) 茶叶原料: 普洱茶(生茶)、普洱茶(熟茶): 由云县天龙生态茶叶有限责任公司生产; 生产日期: 2007 年 6 月; 卫生许可证号: [2006]第 530922-000132;

2) 市售对照品: 某市售调节血脂中药(XZK), 购于药店;

3) 饲料: 鼠用全价颗粒饲料, 高压灭菌, 常温贮存。饲料生产许可证 SCXK(滇)2005-2009。

2.3. 实验试剂

总胆固醇(TCHO)、甘油三脂(TG)购于北京中生物工程技术公司; 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), 购于温州东区生物工程公司。

2.4. 主要仪器

RE-52AA 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; TMS-1024 全自动生化分析仪, 日本京都; Leica RM-2145 石蜡包埋切片机, 德国制造; Leica EG1160 包埋机; 德国制造; Leica APS200 组织脱水机; 德国制造。

2.5. 茶汤及药的制备

2.5.1. 茶汤制备方法^[3]

普洱茶 100 g→沸水浸提三次(各次茶水比为 1:20; 1:20; 1:10; 浸提时间分别为 20 min、20 min、10 min)→脱脂棉过滤→合并三次浸提茶汤→滤液减压浓缩至 100 mL(浓缩温度 60℃)装瓶灭菌备用。(其茶汤浓度为 1 克茶/毫升茶汤的提取液)。茶汤一周浓缩一次, 浓缩后的茶汤低温冷藏(4℃), 灌胃前充分摇匀, 现配现用。

2.5.2. 药的制备

准确称取 2 g 市售降脂药研钵内研细, 放入烧杯中, 加入蒸馏水搅拌溶解后移入 50 mL 容量瓶中定容至刻度, 即为 4%市售对照药溶液, 现配现用。

2.6. 动物分组及试验方法

2.6.1. 动物分组

40 只雄性 apoE(-/-)小鼠随机分为 apoE(-/-)对照组(10 只), apoE(-/-)普洱生茶组(10 只), apoE(-/-)普洱熟茶组(10 只), apoE(-/-)市售品组(10 只)。10 只 C57BL/6J 小鼠为 apoE(+/+)对照组。见表 1。

2.6.2. 试验方法

1) 动物检疫

适应性饲养 7 天后, 未发现异常体征和体重偏大或偏小的动物。所有动物外观发育正常, 无畸形, 无外伤, 皮肤无污染物。头部端正, 眼部无分泌物, 鼻

Table 1. Grouping and dosage design of experimental mice
表 1. 动物分组及剂量设计

组别	受试物	剂量
apoE(+/+)对照组	蒸馏水	-
apoE(-/-)对照组	蒸馏水	-
apoE(-/-)普洱生茶组	普洱茶生茶	30 mg/kg·bw
apoE(-/-)普洱熟茶组	普洱茶熟茶	30 mg/kg·bw
apoE(-/-)降脂药组	降脂药	10 mg/kg·bw

无豁液流出, 口腔无出血, 耳无外伤。营养良好, 饮食和粪便正常, 行动迅速, 反应灵敏。

2) 动物识别方法

用饱和苦味酸被毛染色, 挂笼卡标识, 注明课题编号、课题负责人、笼号、动物号、试验起止时间。

3) 动物饲养和管理

环境条件: SPF 级动物实验室, 温度: 20°C~25°C(日温差 $\leq 3^\circ\text{C}$); 湿度: 40%~70%; 换气次数: 10~11次/h; 气流速度: 0.1~0.2 m/s; 压强梯度: 20 Pa; 空气洁净度: 10000 级; 落下菌数(静态): 直径 9 cm 培养皿开开放置 30 min, 置 37°C 温箱培养 48 h, ≤ 3 个/皿; 照明: 12 h: 12 h 明暗交替, 照度: 150~300 lx; 噪音: ≤ 60 dB。实验动物使用许可证: SYXK(滇)2005-0003。

动物管理: C57BL/6J 小鼠和 apoE 基因敲除小鼠在 SPF 级动物房中饲养, 自由饮食饮水。每周更换垫料 1 次, 笼具 1 次。笼具除去污物, 用清水洗净晾干, 用 0.1% 优氯净消毒。每天实验操作结束后及时除去笼架和实验场地的污物, 用 0.1% 优氯净擦拭不锈钢架, 工作车、拖地。记录动物饲养室温度和湿度。配好的药物和其他试验用具经传递窗紫外线照射 15 min 进入洁净区。

4) 干预方法及处理

采用经口灌胃, 每天早上(9:00~11:00)干预一次, 连续给予 3 个月。受试物干预容量均为 0.2 mL/10 g, 干预剂量参考孙敬修编著的试验动物方法学^[4]。本试

验周期为 3 个月每周测体重一次, 根据体重变化调整动物干预容量。

经处理 3 个月后, 所有动物禁食不禁水过夜, 次日牺牲动物, 收集全血 2~3 mL。将收集的血样置于 5 mL 离心管中, 以 3000 rpm/min 离心 15 min, 制备血清, -20°C 冻存待用。

测定小鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LD-C)。

根据 Plum 等发表的方法^[5], 用公式 $AI = (TC - HDL-C)/HDL-C$ 计算动脉硬化指数。

2.7. 统计学处理

计量资料试验数据以 $\bar{x} \pm SE$ 表示, 用 SPSS17.0 统计软件包对数据进行统计分析, 多组均数比较用单因素方差分析, 两组均数比较用 q 检验。以 $P < 0.05$ 作为差异显著性标准。

3. 结果与分析

3.1. 普洱茶对 apoE 基因敲除小鼠血清指标的影响

从表 2 可以看出, 普洱生茶组和模型组及降脂药组的 TC 含量均较正常对照组含量大幅上升, 差异呈现极显著水平, 而熟茶组与 apoE(-/-)对照组相比, 下降达到极显著水平, 与降脂药组相比, 下降达到显著

Table 2. Effect of Pu-erh tea on blood lipid level of apoE-knockout mice: ($\bar{x} \pm SE$)

表 2. 普洱茶对 apoE 基因敲除小鼠血清血脂水平的影响: ($\bar{x} \pm SE$)

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)
apoE(+/+)对照组	2.60 \pm 0.39▲▲	0.76 \pm 0.35▲▲
apoE(-/-)对照组	46.75 \pm 6.52**	2.50 \pm 0.71**
降脂药组	14.76 \pm 7.12**/▲▲	1.08 \pm 0.43▲▲
普洱熟茶组	23.44 \pm 4.97**/▲▲	0.84 \pm 0.53▲▲
普洱生茶组	21.25 \pm 6.99**/▲▲	1.23 \pm 0.72▲▲
组别	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)
apoE(+/+)对照组	1.93 \pm 0.17▲▲	0.67 \pm 0.32▲▲
apoE(-/-)对照组	7.61 \pm 0.82**	39.07 \pm 5.78**
降脂药组	4.21 \pm 1.27**/▲▲	10.55 \pm 5.91**
普洱熟茶组	5.25 \pm 0.38**/▲▲	17.18 \pm 3.83**/▲▲
普洱生茶组	5.39 \pm 1.39**/▲▲	15.84 \pm 5.76**/▲▲

水平($P < 0.05$)；普洱生(熟)茶各组较 apoE(-/-)对照组及降脂药组均可使 TG 含量明显下降，差异达极显著水平。普洱茶可明显抑制血清中 TG 含量，并使其达到正常水平，但对 TC 的抑制效果则不明显；普洱熟茶则对 TG 的抑制作用较明显，均可使试验小鼠血清中的 TG 含量达到正常水平；而且，普洱茶对 TG 的抑制效果均明显优于降脂药物。

普洱生茶可明显升高 HDL-C 含量，差异均较 apoE(+/+)对照组、apoE(-/-)对照组呈现极显著水平，与 apoE(-/-)对照组达到显著水平，熟茶有所上升，但差异不明显。而普洱熟茶各组可明显降低 LDL-C 含量，差异较 apoE(-/-)对照组及 apoE(+/+)对照组呈现极显著水平，而与降脂药组相比，差异显著($P < 0.05$)，生茶较 apoE(-/-)对照组及降脂药组，有所下降差异呈现显著水平($P < 0.05$)。

普洱生(熟)茶均可使试验小鼠血液中的 LDL-C 含量下降，HDL-C 含量上升，普洱生茶对升高 HDL-C 的含量，作用明显，而普洱熟茶对降低 LDL-C 的含量，作用明显，且普洱茶对降低小鼠血液中 LDL-C 含量及升高 HDL-C 含量的作用，明显优于降脂药物。

3.2. ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化指数影响

apoE(+/+)对照组与 apoE(-/-)对照组、降脂药组、普洱熟茶组、普洱生茶组均有极显著性差异，可见抗动脉粥样硬化建模成功；apoE(-/-)对照组与普洱茶组(生、熟)差异呈极显著水平，普洱茶组 AI 值显著降低，可见普洱茶有明显的抗动脉粥样硬化效果；普洱生茶组与熟茶组之间差异无显著性差异(见表 3)。

4. 讨论

普洱生茶和普洱熟茶有降低高脂血症的作用。其降血脂的作用可能与普洱茶中所含茶多酚及握堆过程中产生的他汀类物质有关。普洱生茶和普洱熟茶可降低动脉粥样硬化指数，提示二者有抗动脉粥样硬化的作用，其具体作用机制还不甚清楚，除与抗脂质过

氧化外，可能还与抗炎症有关。

云南普洱茶必须以云南大叶种为原料，才能加工出真正意义上的普洱茶。由于云南大叶种有不同与中小叶的品质特点，尤其在生化成分方面如茶多酚、儿茶素、咖啡碱等方面都高于中小叶种。使得云南大叶种成为驰名中外的优良茶树品种，加上特殊的加工工艺使茶叶中对人体有益的茶多酚、咖啡碱等物质充分氧化，形成了普洱茶优异的品质基础，才能使它的保健功效得以充分的体现。其次，握堆是普洱茶形成的关键环节。普洱茶握堆的实质是以晒青毛茶的内含成分为基质，在微生物分泌的胞外酶的酶促作用、微生物呼吸代谢产生的热量和茶叶水分的湿热协同下，发生的茶多酚氧化、缩合、蛋白质和氨基酸的分解、降解，碳水化合物分解以及各产物之间的湿热、缩合等一系列反应，从而形成普洱茶特有的品质。

脂质代谢紊乱是 AS 主要危险因素之一。郑青山等人利用鹤鹑高脂模型测定了茶多酚的降血脂作用结果显示：茶多酚具有较强的降低血清 TC、TG 和 LDL-C 水平的作用，TC/HDL-C 比值变化小，对 HDL-C 水平影响不大。沈新南等还对茶多酚降血脂抗血栓作用进行了研究发现茶多酚能有效地降低高脂血症大鼠血清中 TC 和 TG 的含量，其在降低血清 TC 时，还能提高 HDL-C 的含量^[6]。本试验利用 apoE 基因敲除小鼠高脂血症模型测定普洱茶的降血脂作用，结果显示：与 apoE(-/-)对照组相比，普洱生茶和普洱熟茶组 TC、TG 和 LDL-C 的水平均明显降低，差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示普洱茶有降低血脂中 TC、TG 和 LDL-C 的作用；与降脂药组相比，普洱生茶与熟茶降低甘油三酯的能力与降脂药作用相当。但生茶与熟茶在降低总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇上，作用要弱于降脂药($P < 0.05$)。生茶与熟茶在降低总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇方面作用相当 ($P > 0.05$)。

根据推测，普洱茶中含量丰富的他汀类物质很可能来源于普洱茶后发酵过程中产生的优势菌群。普洱茶由生茶发酵为熟茶的过程中，主要优势菌群为：黑曲

Table 3. Effect of Pu-erh tea on AI of apoE-knockout mice: ($\bar{x} \pm SE$)

表 3. 普洱茶对 apoE 基因敲除小鼠 AI 系数的影响: ($\bar{x} \pm SE$)

组别	apoE(+/+)对照组	apoE(-/-)对照组	降脂药组	普洱熟茶组	普洱生茶组
AI	0.35 ± 0.16▲▲	5.14 ± 0.50**	2.2 ± 1.00**	3.43 ± 0.65**/▲▲	2.84 ± 0.85**/▲▲

霉、青霉属、根霉属、灰绿曲霉、酵母属等。这些菌属在适当的湿度、温度和气候土质等特定环境下可以产生他汀类物质。这就为普洱茶的降脂功效找到了确切有力的证据。

参考文献 (References)

- [1] 张新波, 王绿娅, 陈保生. 载脂蛋白 AI 的抗动脉粥样硬化功能研究的进展[J]. 中国动脉粥样杂志, 2007, 15(3): 233-236.
- [2] 彭旷. 载脂蛋白 E 及基因敲除小鼠的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2006, 27: 74-78.
- [3] 刘勤晋, 陈文品, 白文祥. 普洱茶急性毒性安全性评价研究报告[J]. 茶叶科学, 2003, 23(2): 141-145.
- [4] 孙敬修. 实验动物方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [5] A. S. Plum, Jonathan D. Smith, Tony Hayek, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in EC cells. CELL, 1992, 71(10): 343-353.
- [6] L. Park, K. G. Raman, K. J. Lee, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. Nature Medicine, 1998, 4(9): 1025-1031.