

槲皮素、EGCG 对胆固醇酯酶活性和胆固醇胶束抑制作用研究

苏建辉¹, 马朝阳¹, 杨鹿¹, 王洪新^{1,2,*}, 高传忠³, 聂荣京³

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122;

2. 江南大学国家功能食品工程技术研究中心, 江苏无锡 214122;

3. 铜陵瑞璞牡丹产业发展有限公司, 安徽铜陵 244000)

摘要:为降低胆固醇酯类水解及小肠对胆固醇的吸收, 本实验体外模拟人体小肠内环境, 研究 EGCG 和槲皮素对胆固醇酯酶活性及胆固醇胶束溶解度的抑制效果。同时比较了 9 种功能因子对胆固醇酯酶活性及胆固醇胶束溶解度的抑制效果。结果表明, 槲皮素和 EGCG 均降低了胆固醇胶束溶解度, IC_{50} 值分别是 2.2、0.08 mg/mL, 其抑制效果呈浓度依赖性; 槲皮素和 EGCG 对胆固醇酯酶活性的 IC_{50} 值分别是 0.27、1.43 mg/mL。槲皮素对胆固醇胶束溶解度的抑制效果小于 EGCG, 但是对胆固醇酯酶活性的抑制效果大于 EGCG。结果初步证明了, 槲皮素和 EGCG 延迟了餐后高胆固醇形成, 对高血脂症有一定的预防和治疗作用。

关键词:槲皮素, EGCG, 胆固醇胶束, 胆固醇酯酶, 降脂

Inhibition of pancreatic cholesterol esterase activities and cholesterol micelle of EGCG and quercetin

SU Jian-hui¹, MA Chao-yang¹, YANG Lu¹, WANG Hong-xin^{1,2,*}, GAO Chuan-zhong³, NIE Rong-jing³

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. National Engineering Research Center for Functional Food, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

3. Anhui Tongling Ruipu Peony Industry Development Co., Ltd., Tongling 244000, China)

Abstract: The aim of the present study is to investigate the effect of EGCG and quercetin on the inhibition of pancreatic cholesterol esterase activities and cholesterol micelle formation which may result in a reduced cholesterol absorption and hydrolysis of dietary cholesterol esters. The inhibition of nine functional factors on pancreatic cholesterol esterase activities and cholesterol micelle formation were compared. The results showed that both of EGCG and quercetin had obvious effect on inhibiting cholesterol micelle formation and the 50% inhibiting concentration (IC_{50} , mg/mL) of each was 0.08, 2.2 mg/mL, which was lower than chitosan. The IC_{50} of EGCG and quercetin on pancreatic cholesterol esterase was 1.2, 0.28 mg/mL. The inhibition of cholesterol micellization by quercetin was weaker than EGCG, but quercetin showed stronger pancreatic cholesterol esterase inhibitory activity. It was suggested that EGCG and quercetin may delay postprandial hypercholesterolaemia, and therefore may be applied for the prevention and treatment of hyperlipidaemia.

Key words: quercetin; EGCG; cholesterol micelle; pancreatic cholesterol esterase; hypolipidemic

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)11-0346-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.11.062

近年来, 心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 成为威胁人类健康的严重疾病之一。CVD 的主要危险因素有高血压、高血脂、糖尿病等, 其中高血脂症多发于中老年人群。高血脂对身体的损害是隐匿的、逐渐进行性和全身性的。研究认为降血脂机制通过抑制胰脂肪酶的活性降低了对外源性甘油

三酯的吸收, 降低脂肪酸合成酶的活性而减少了脂肪的合成, 加速胆固醇代谢促进胆固醇排泄来调节胆固醇代谢^[1-2]。胆固醇酯酶是催化胆固醇酯水解成胆固醇和脂肪酸的一种酶。来自胆固醇酯的胆固醇的生物利用度是由胆固醇酯酶控制的, 这与基因敲除研究的结果相符^[3]。膳食中的胆固醇在人体肠

收稿日期: 2014-07-24

作者简介: 苏建辉 (1981-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品营养与功能因子。

* 通讯作者: 王洪新 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与功能因子。

基金项目: 国家 125 项目 (2012BAD33B05); 功能食品设计及制造关键技术与产品; 安徽铜陵瑞璞牡丹产业发展有限公司合作项目。

道中,溶于胆固醇胶束才能被人体吸收。抑制饮食中的胆固醇吸收是降低血液中胆固醇的有效方法^[4]。近几年,国内外大量报道证实茶多酚具有降血脂作用^[5-7],儿茶素占茶叶中茶多酚总量的60%~80%,表没食子儿茶素没食子酸(EGCG)含量最高。槲皮素是一种天然黄酮类化合物,多以苷的形式存在于植物的花、叶、果实中,研究证实槲皮素具有扩张血管、降血压、降血脂、降低毛细血管通透性和脆性、防治冠心病等药理活性^[8-10]。本实验比较分析了EGCG和槲皮素对胆固醇酯酶活性和胆固醇胶束溶解度的影响,为EGCG和槲皮素降血脂研究提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

表没食子儿茶素没食子酸(EGCG)、槲皮素,绞股蓝皂甙、苦瓜素、丹皮酚、魔芋多糖、葛根素纯度为98%,枸杞多糖、玉竹多糖,纯度为80%以上。以上均购于南京景竹生物科技有限公司;牛磺胆酸钠(STC),胆固醇,猪胰腺胆固醇酯酶(pCE)和底物对硝基苯基丁酸酯(PNPB) Sigma公司;胆固醇检测试剂盒 南京建成;其他试剂 国产分析纯。

UV-2100 UNIC 紫外可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司;BS-1E 恒温振荡培养箱 金坛市瑞华仪器有限公司;TGL-16C 离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 胆固醇酯酶的抑制活性测试 参照文献^[11],略修改,测试温度保持在(25.0±0.2)℃。所有的反应在含有NaCl(0.1mol/L)、对硝基苯基丁酸酯 PNPB(0.2mmol/L)、牛磺胆酸钠 STC(5.16mmol/L)的磷酸钠缓冲液(0.1mol/L, pH7.04)中进行。pCE 预先溶解在高纯水中;底物 PNPB 和抑制剂预先溶解在乙醇中,在-20℃保存。加入猪胰腺胆固醇酯酶启动反应,25.0℃反应5min,在405nm 紫外可见分光光度计检测。

表1 胆固醇酯酶活性测定反应体系

Table 1 Reaction system of cholesterol esterase activity

项目	酶液 (μL)	抑制剂 (μL)	PNPB (μL)	缓冲液 (mL)
空白管	50.0	-	10.0	1.0
空白对照管	-	-	10.0	1.0
抑制剂管	50.0	25	10.0	1.0
背景对照管	-	25	10.0	1.0

注:-加入等体积蒸馏水。

酶抑制活性的计算公式如下

$$\text{抑制率}(\%) = 100 \times [A - B - (C - D)] / (A - B) \quad \text{式(1)}$$

式中:A:空白管在405nm的吸光度值;B:空白对照管在405nm的吸光度值;C:抑制剂管在405nm的吸光度值;D:背景对照管在405nm的吸光度值。

1.2.2 胆固醇胶束溶解度的测定 其中1mL胶束溶液中含有10mmol/L牛磺胆酸钠,2mmol/L胆固醇,

5mmol/L油酸,132mmol/L NaCl,15mmol/L磷酸缓冲液(pH7.4)。100W,40min超声波均质进行制备。37℃隔夜静置。将空白对照,一定量的EGCG、槲皮素和壳聚糖样品分别加入到胶束溶液中,然后将混合溶液在37℃振荡培2h,并在16000r/min离心20min,收集上清液用试剂盒测定胶束中胆固醇含量^[12]。

抑制率(%) = (空白溶液的胆固醇溶解度 - 样品溶液的胆固醇溶解度) / 空白溶液的胆固醇溶解度

1.3 数据处理

所有测定指标的数据平行测定3次后取平均值,应用Excel和SPSS17.0软件进行数据处理,应用Origin8.6软件进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 九种功能因子对胆固醇酯酶活性的抑制效果

图1比较了浓度为0.5mg/mL的九种功能因子对胆固醇酯酶活性的抑制效果。由图可以看出,槲皮素对胆固醇酯酶活性抑制作用最强为92%,EGCG对酯酶的活性较弱为27%,已有动物实验研究表明绞股蓝皂甙有较好的降血脂效果^[13],Yang Yuehui研究发现绞股蓝皂甙可以降低高脂大鼠血清内谷胱甘肽过氧化物酶及超氧化物歧化酶活性,同时还发现肝脏内甘油三酯及胆固醇含量降低^[14],本研究发现其对胆固醇酯酶活性有较强的抑制作用,也许对胆固醇酯酶活性的作用效果也是其降脂机制的一方面。由图1还可以看出牡丹籽油对胆固醇酯酶也有较好的抑制活性,牡丹籽油富含亚麻酸、亚油酸等多不饱和脂肪酸^[15]。科学家对于富含多不饱和脂肪酸的鱼油降脂效果研究较多^[16],Takuya Mori研究发现鱼油影响了脂类代谢相关酶的活性,小鼠体内的脂肪酸氧化及苹果酸脱氢酶的活性也发生了变化。然而对于牡丹籽油的降血脂效果目前还没人研究,实验发现富含多不饱和脂肪酸的牡丹籽油降低了胆固醇酯酶活性,也许这也是多不饱和脂肪酸的降脂途径。

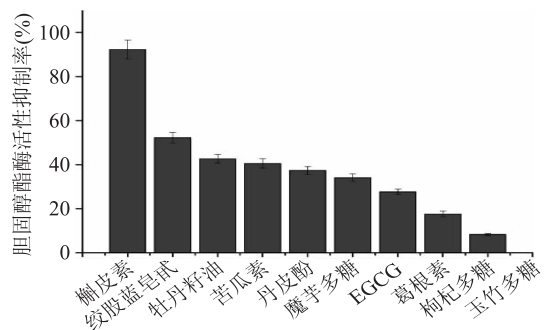


图1 九种功能因子对胆固醇酯酶活性抑制率

Fig.1 Effect of nine functional factors on the inhibition of pancreatic cholesterol esterase activities

2.2 九种功能因子对胆固醇胶束溶解度的抑制效果

体外模拟人体小肠内的环境,图2比较了浓度为1mg/mL的九种功能因子对胆固醇胶束溶解度的抑制效果。由图中可以看出EGCG降低了胆固醇在胶束溶液中的溶解度,其作用效果在九种功能因子

中最好。国内外已有文献资料表明苦瓜素和槲皮素对高脂动物的降脂效果^[17-18]。本研究从另一方面阐述了苦瓜素和槲皮素的降脂机制,其胆固醇的结合力稍弱于 EGCG,但是也可以降低小肠内胆固醇胶束溶解度,抑制小肠对胆固醇的吸收,实现降脂目的。由图 2 可以看出牡丹籽油降低了胆固醇胶束的溶解度,植物油含有富的甾醇类物质^[19],FRED H 研究发现植物甾醇可以降低胆固醇胶束的溶解度,从而减少小肠对胆固醇的吸收。由此可以推测也许是牡丹籽油中的甾醇类物质降低了胆固醇胶束的溶解度^[20]。

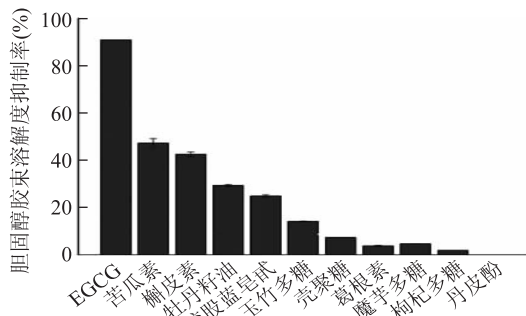


图 2 九种功能因子对胆固醇胶束溶解度抑制率
Fig.2 Effect of nine functional factors on the inhibition of cholesterol micelle

2.3 EGCG 和槲皮素对胆固醇酯酶活性抑制效果研究

由图 3 可以看出,槲皮素和 EGCG 对胆固醇酯酶的抑制效果表现出剂量依赖性,随着浓度的增加,其抑制效果越来越强。槲皮素浓度在小于 0.4mg/mL 时,其对胆固醇酯酶的抑制效果随浓度增加,增长很快,0.4mg/mL 以后抑制效果对浓度的依赖性减弱,在 0.5mg/mL 时,抑制率达到 92.3%,其 IC_{50} 为 0.27mg/mL。Piotr 研究槲皮素对高胆固醇血细胞的影响,发现其有很高的抗氧化性同时降低了高胆固醇血细胞细胞膜的胆固醇含量^[13]。本研究发现槲皮素可以很强的抑制胆固醇酯酶活性。相比于槲皮素,EGCG 对胆固醇酯酶活性的抑制效果明显较弱,其对酶活性的抑制效果也是呈现剂量关系,在 1.5mg/mL 后逐渐出现平台期,在 2.0mg/mL 时其抑制率为 59.6%, IC_{50} 为 1.43mg/mL。现有研究较多的是 EGCG 和槲皮素黄酮类物质对胰脂肪酶活性的研究,EGCG 对胰脂肪酶有较强的抑制活性,抑制了小肠对脂肪的吸收^[21]。Chan 等研究发现茉莉花茶儿茶素可以剂量依赖性地降低仓鼠血清 TC 水平,且排泄物中中性固醇和酸性固醇的浓度很高,但胆固醇合成的限速酶 3-羟-3-甲戊二酸单酰辅酶 A 还原酶和乙酰辅酶 A 胆固醇酰基转移酶的活性未改变^[22]。目前对胆固醇酯酶活性的研究较少,Li 研究了磷香豆素对胆固醇酯酶活性的抑制效果^[11],比较了不同单体的 IC_{50} 。目前还没有 EGCG 和槲皮素黄酮类对胆固醇酯酶活性的研究的报道,其不同的作用效果也许是因为不同位点羟基官能团。具体机制还有待研究。

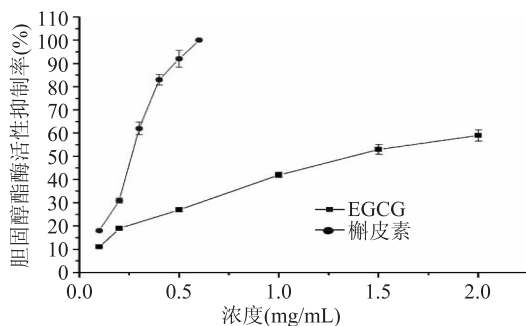


图 3 EGCG 和槲皮素对胆固醇酯酶活性的抑制效果
Fig.3 Effect of EGCG and quercetin on the inhibition of pancreatic cholesterol esterase activities

2.4 EGCG 和槲皮素对胆固醇胶束溶解度的抑制效果分析

对于壳聚糖的降血脂机制目前研究较多的是其与胆固醇、胆酸盐的物理性吸附^[23-25],本实验体外模拟人体小肠条件,以壳聚糖为对照,比较了 EGCG、槲皮素与胆固醇结合能力。由图 4 可以看出,三者与胆固醇的结合力呈现剂量依赖性,随着样品浓度增加,胆固醇在胶束中的溶解度逐渐降低。三者都可以降低胆固醇在胶束溶液中的溶解度,比较三者与胆固醇的结合力发现,EGCG 与胆固醇结合力最强,0~0.1mg/mL 时作用效果最强,0.1mg/mL 后抑制速率减慢,1mg/mL 时达到 100%。其 IC_{50} 为 0.08mg/mL。由图中可以看出槲皮素与胆固醇的结合力弱于 EGCG,2mg/mL 时对胆固醇胶束的溶解度抑制率是 56.9%,以后抑制速率逐渐减慢,4mg/mL 时为 73.5%, IC_{50} 为 2.2mg/mL。本实验研究发现低浓度壳聚糖与胆固醇的结合力小于 EGCG 和槲皮素,其 IC_{50} 大于 5.0mg/mL,壳聚糖与胆固醇结合力的大小,也许是和壳聚糖的脱乙酰程度或者是壳聚糖的粒径有关^[25]。Mariosa 研究发现茶黄素降低了胆固醇在胶束溶液中的溶解度,通过粒径大小分析和透射电镜观察发现胶束溶液中加入茶黄素后,形成了大颗粒^[26]。EGCG 和槲皮素也许是和胆固醇结合形成了大颗粒不能溶于胶束溶液,降低了其在胶束溶液中的溶解度,具体机制还有待研究。

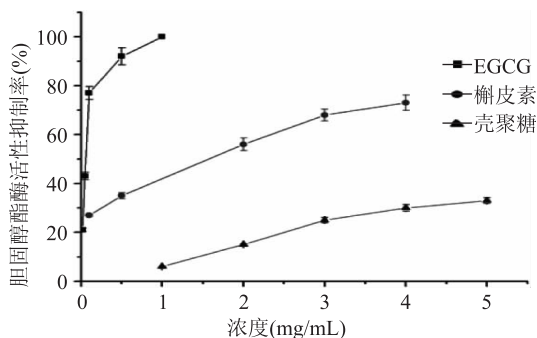


图 4 EGCG 和槲皮素对胆固醇胶束溶解度的抑制效果
Fig.4 Effect of EGCG and quercetin on the inhibition of cholesterol micelle

3 结论

比较了 9 种功能因子对胆固醇酯酶和胆固醇胶

束溶解度的影响,研究发现槲皮素、皂甙和牡丹籽油对胆固醇酯酶活性有较好的抑制效果。EGCG 和苦瓜素可以很明显的降低胆固醇在胶束中的溶解度。然而,多糖类物质对胆固醇酯酶和胆固醇胶束溶解度的作用效果较弱。槲皮素和 EGCG 一方面抑制胆固醇酯分解为游离的胆固醇,另一方面降低胆固醇在胶束溶液中的溶解度,抑制了小肠对胆固醇的吸收,起到了降脂的目的。

参考文献

- [1] Nakai M, Fukui Y, Asami S, et al. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase invitro [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(11): 4593-4598.
- [2] Ikuo I, Koichi T, Yuko S, et al. Tea Catechins with a Galloyl Moiety Suppress Postprandial Hypertriacylglycerolemia by Delaying Lymphatic Transport of Dietary Fat in Rats [J]. J Nutr, 2005, 135(2): 155-159.
- [3] Howles PN, Carter CP, Hui DY. Dietary fiber and esterified cholesterol absorption in cholesterol esterase (bile salt-stimulated lipase gene)-targeted mice [J]. J Biol Chem, 1996, 271(12): 7196-7202.
- [4] Ros E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk [J]. Atherosclerosis, 2000, 151(2): 357-379.
- [5] 何冰, 陈小爱, 李娟好. 茶多酚对高血脂症动物血脂调节、脂质过氧化及血小板聚集功能的影响 [J]. 广东药学院学报, 1996, 12(1): 29-32.
- [6] 朱达泉, 沈洪兵, 黄淑仪, 等. 茶叶提取物的降血脂作用 [J]. 中国慢性病预防与控制, 1999, 7(4): 185-186.
- [7] Davies MJ, Judd JT, Baer DJ, et al. Black Tea Consumption Reduces Total and LDL Cholesterol in Mildly Hypercholesterolemic Adults [J]. J Nutr, 2003, 133(10): 3298-3302.
- [8] Piotr D, Marlena B. Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (*in vitro* study) [J]. Eur J Nutr, 2012, 519(4): 435-443.
- [9] Basarkar PW, Nath N. Hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of quercetin—a vitamin P-like compound in rats [J]. Indian Journal of Medical Research, 1983, 77: 122-126.
- [10] Brookes PS, Digemess SB, Parks DA. Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 32(11): 1220-1228.
- [11] Baojian Li, Binhua Zhou, Hailiang Lu. Phosphaisocoumarins as a new class of potent inhibitors for pancreatic cholesterol esterase [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 45(5): 1955-1963.
- [12] Jiali Zhang, Wei Zhang, Bangoura Mamadouba. A comparative study on hypolipidemic activities of high and low molecular weight chitosan in rats [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51: 504-508.
- [13] Qin R, Zhang J, Li C. Protective effects of gypenosides against fatty liver disease induced by high fat and cholesterol diet and alcohol in rats [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(7): 1241-1250.
- [14] Yuehui Yang, Jun Yang, Qinghua Jiang. Hypolipidemic effect of gypenosides in experimentally induced hypercholesterolemic rats [J]. Lipids in Health and Disease, 2013, 12(1): 1-14.
- [15] 翟文婷, 朱献标, 李艳, 等. 牡丹籽油成分分析及其抗氧化活性研究 [J]. 烟台大学学报, 2013, 26(2): 147-150.
- [16] Takuya M, Hidehiko K, Tadashi H, et al. Dietary Fish Oil Upregulates Intestinal Lipid Metabolism and Reduces Body Weight Gain in C57BL/6J Mice [J]. The Journal of Nutrition, 2004, 137(12): 2629-2634.
- [17] Piotr D, Marlena B, Anna P. Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (*in vitro* study) [J]. European Journal of Nutrition, 2012, 51(4): 435-443.
- [18] Senanayake GV, Maruyama M, Sakono M. The effects of bitter melon (*Momordica charantia*) extracts on serum and liver lipid parameters in hamsters fed cholesterol-free and cholesterol-enriched diets [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2004, 50(4): 253-257.
- [19] 于瑞祥, 杨瑞钰, 方晓明, 等. 植物油中甾醇烯类物质检测研究 [J]. 中国油脂, 2012(6): 81-85.
- [20] Fred H, Mattson RA, Volpenhein A, et al. Effect of Plant Sterol Esters on the Absorption of Dietary Cholesterol [J]. Journal of Nutrition, 2014, 107(7): 1139-1146.
- [21] 王研卉, 刘云. 茶叶儿茶素 EGCG 抑制剂对胰脂肪酶构效关系的影响 [J]. 食品科学, 2013, 34(9): 104-107.
- [22] Chan PT, Fong WP, Cheung YL, et al. Jasmine green tea epicatechins are hypolipidemic in hamsters (*Mesocricetus auratus*) fed a high fat diet [J]. J Nutr, 1999, 129: 1094-1101.
- [23] 吴雁, 王亦农, 马建标. 水溶性壳聚糖降血脂作用的化学机理 (II) 水溶性壳聚糖及其氯化衍生物对硬脂酸钠、十二烷基硫酸钠结合能力 [J]. 离子交换与吸附, 2003, 19(4): 369-373.
- [24] 吴雁, 王亦农. 水溶性壳聚糖及其衍生物对胆酸盐的结合能力研究 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(4): 757-761.
- [25] 刘静娜, 夏文水, 张家骥. 壳聚糖物化性质对其体外结合脂类和胆酸盐能力的影响 [J]. 食品科学, 2008, 29(1): 45-49.
- [26] Maria V, Theop JM. Theaflavins from Black Tea, Especially Theaflavin-3-gallate, Reduce the Incorporation of Cholesterol into Mixed Micelles [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(24): 12031-12036.