

葡萄籽原花青素降血脂药效部位筛选

刘奇, 夏正燕, 周丹英, 余琪(浙江省中药研究所有限公司, 杭州 310023)

摘要: 目的 研究葡萄籽原花青素不同流分的降血脂药效。方法 采用不同浓度乙醇渗漉提取、大孔树脂分离纯化, 制得 10%, 30%, 50%, 70%乙醇部位葡萄籽原花青素提取物, 建立大鼠高血脂模型, 分别测定各组血清甘油三酯(TG), 总胆固醇(TC), 谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST)的含量, 并计算 *Lee'S* 指数和脏器指数, 对各提取物进行药效学研究, 确定葡萄籽原花青素降血脂有效部位。结果 葡萄籽原花青素提取物 10%, 30%, 50%乙醇部位具有明显降低高血脂大鼠模型的 TG 含量的作用($P<0.01$); 同时 50%乙醇部位还可以明显降低高血脂大鼠模型的 ALT 和 AST 含量($P<0.01$); 与模型组比较, 给药后 10%乙醇部位肾脏指数显著升高($P<0.01$); 10%, 30%, 50%, 70%乙醇部位组能显著升高脾脏指数($P<0.05$); 30%乙醇部位能显著降低总脂指数($P<0.05$); 10%, 50%, 70%乙醇部位能显著降低总脂指数($P<0.01$)。结论 50%乙醇部位葡萄籽原花青素提取物为葡萄籽降血脂有效部位。

关键词: 葡萄籽原花青素; 降血脂; 药效部位筛选

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)11-1378-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.006

Screening of Grape Seed Proanthocyanidins Lowering Efficacy Site

LIU Qi, XIA Zhengyan, ZHOU Danying, YU Qi(Zhejiang Institute of Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the lipid-lowering efficacy in different components of grape seed proanthocyanidins. **METHODS** Different concentrations of ethanol percolation extraction, macroporous resin separation and purification were used to obtain 10%, 30%, 50%, 70% ethanol portion of grape seed proanthocyanidin extract. Rats hyperlipidemia model was established, and the content of glycerol triester (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) in each groups' serum were determined, *Lee'S* index and organ index were calculated as well. According to each extract pharmacodynamic study to determine the grape seed proanthocyanidins lipid-lowering effective parts. **RESULTS** Grape seed proanthocyanidin extract 10%, 30%, 50% ethanol parts could significantly reduce high cholesterol TG content in hyperlipidemia model rats($P<0.01$); while 50% ethanol part could also significantly reduce the hyperlipidemia ALT and AST content in model rats ($P<0.01$); Compared with the model group, the resulting group elution kidney index increased significantly after administration of 10% ethanol ($P<0.01$); 10%, 30%, 50%, 70% ethanol eluted income group significantly increased spleen index ($P<0.05$); eluted with 30% ethanol resulting group can significantly reduce the total lipid index ($P<0.05$); 10%, 50%, 70% ethanol eluted income group can significantly reduce the total lipid index ($P<0.01$). **CONCLUSION** The 50% ethanol part of grape seed proanthocyanidins play an effective affect in lipid-lowering efficacy of grape seed extract.

KEY WORDS: grape seed proanthocyanidins; lipid-lowering; active site selection

葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidin, GSP)是从葡萄籽中提取出来的一类天然多酚化合物, 大多数为(+)-儿茶素和(-)-表儿茶素。原花青素由不同数量的儿茶素或表儿茶素缩合而成, 这些组成单元间多以 $C_4\sim C_8$ 键相连, 也有的以 $C_4\sim C_6$ 键相连。GSP 具有多种药理作用, 有强抗氧化能力, 可以清除体内的自由基和活性氧, 能预防 80 多种因自由基引起的疾病, 被广泛应用到药物、化妆品和功能性食品等领域^[1]。近年有许多研究发现 GSP 具有降低高血脂大鼠中总胆固醇含量, 并提高高密

度脂蛋白的含量^[2-3]。GSP 具有较高的食用安全性, 急性毒性和长期毒性试验均未见不良反应^[4-5]。

基于以上情况, 本课题以葡萄籽为原料, 进行提取、分离、纯化得到 GSP 不同流分, 以高血脂模型大鼠为实验对象, 通过给予纯化后的不同 GSP 流分, 考察其降血脂作用, 为开发安全有效的降血脂保健食品或新药提供理论基础。

1 材料

1.1 实验药物

葡萄籽(浙江绍兴东灵保健食品有限公司, 批

基金项目: 浙江省科技厅公益技术研究社会发展项目(2014C33227)

作者简介: 刘奇, 男, 硕士, 助理工程师 Tel: (0571)87037436

E-mail: liui_08@126.com

号: 20130122)。阳性药: 非诺贝特(浙江国镜药业有限公司, 批号: 20140121)。

1.2 试剂

血清甘油三酯(TG)试剂盒、总胆固醇(TC)试剂盒、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒、谷草转氨酶(AST)试剂盒(批号分别为: 112342、102112、110116、121207, 南京建成生物工程研究所)。其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD 大鼠, 清洁级, ♂, 体质量: 180~190 g, 4~6 周龄, 购自浙江省医学科学研究所, 许可证号: SCXK(浙)2008-0033, 饲养: 清洁级动物房, 自由进食与饮水, 温度: (25±2)°C, 湿度: 40%~60%。基础饲料: 由浙江省医学科学研究所实验动物中心提供, 执行标准 GB14924.1-2001; 高脂饲料: 维持饲料中添加 20.0%蔗糖、15.0%猪油、1.2%胆固醇、0.2%胆酸钠, 适量的酪蛋白、磷酸氢钙、石粉等。

1.4 仪器

7020 型全自动生化仪(日本日立公司); ME-204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

2 方法

2.1 供试样品制备

将葡萄籽粉碎成粗粉, 以 8 倍量 70%乙醇浸泡 72 h 后, 以 6 mL·min⁻¹ 的速度渗漉提取, 提取液经浓缩、离心后, 吸附于 XDA-6 树脂, 去离子水洗柱后, 分别用 10%, 30%, 50%, 70%乙醇梯度洗脱, 洗脱液浓缩干燥, 制得各流分的浸膏粉, 备用。

2.2 动物分组、给药

采用经典的高脂血症的造模方法, 取 SD 大鼠 80 只, 适应性饲养 1 周, 饲喂基础饲料。实验第 2 周, 空白组饲喂基础饲料, 其他组饲喂高脂饲料。喂食 1 周后测其血清中 TC、TG 含量并记录体质量, 选取 TC 和 TG 含量达到高血脂标准, 同时体质量增重明显的大鼠 60 只(另外 20 只大鼠, 血脂未达到高血脂水平, 或增重较少的, 剔除), 按体质量随机分成 6 组, 每组 10 只, 即模型组、阳性组(20 mg·kg⁻¹)、10%乙醇组(生药 20 g·kg⁻¹)、30%乙醇组(生药 20 g·kg⁻¹)、50%乙醇组(生药 20 g·kg⁻¹)和 70%乙醇组(生药 20 g·kg⁻¹)。除空白组饲喂基础饲料外, 其余各组均给予高脂饲料。连续饲养 4 周后, 开始给予相应药物, 连续给药 14 d。

2.3 血脂指标与脏器指数测定

末次给药 1 h 后, 用乙醚轻度麻醉, 称体质量

(g), 测体长(鼻尖到肛门的长度)(cm), 计算 Lee'S 指数; 眼眶取血, 分离血清, 测血脂指标; 颈椎脱臼法处死大鼠, 解剖取肝脏、肾脏、脾脏、皮下脂肪和睾丸周围脂肪, 称重(g), 计算脏器指数。分析不同流分原花青素降血脂作用。

血脂指标测定方法: 以血清中 TC、TG、ALT、AST 水平为评价指标, 按照试剂盒说明书上的方法进行各指标的测定。

Lee'S 指数计算方法: Lee'S 指数是目前评价成年大鼠肥胖程度方面的有效指数, 根据公式:

$$Lee'S = \sqrt[3]{\text{体质量(g)} \times 10^3 / \text{体长(cm)}} \text{ 计算。}$$

脏器指数计算方法: 实验大鼠解剖后的器官(肝脏、肾脏、脾脏)湿重与体质量的比值为对应的脏器指数。总脂系数=皮下脂肪系数+睾丸周围脂肪系数。

2.4 数据处理与统计

实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件处理并进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用方差分析, 给药组间比较采用 *q* 检验。

3 结果

3.1 不同组分原花青素对大鼠 TC、TG、ALT、AST 的影响

与空白组相比, 模型组大鼠血清 TC、TG、AST 水平明显增高($P < 0.01$), ALT 水平也明显增高($P < 0.05$), 说明高血脂动物模型建立成功。与模型组相比, 阳性组大鼠血清 TG 和 AST 水平明显降低($P < 0.01$), TC 和 ALT 水平也出现降低($P < 0.05$)。与模型组相比, 10%, 30%, 50%乙醇组对高血脂大鼠 TG 水平具有明显的降低作用($P < 0.01$); 50%乙醇组对高血脂大鼠模型组 ALT、AST 水平都具有明显降低作用($P < 0.01$), 而对 TC 水平的影响不显著, 不具有统计学意义; 而 70%乙醇组与模型组相比对 TC、TG、ALT、AST 均无明显影响, 不具有统计学意义。结果见表 1。

3.2 不同组分原花青素对 Lee'S 指数的影响

与空白组相比, 模型组的 Lee'S 指数明显增高($P < 0.01$)。与模型组相比, 10%, 30%, 50%, 70%乙醇组都能显著降低 Lee'S 指数($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 表明乙醇洗脱所得的流分能抑制 Lee'S 指数的升高, 高血脂大鼠容易因血脂高引发肥胖现象, Lee'S 指数的降低, 对控制高血脂及其肥胖现象都有意义。结果见表 2。

表 1 不同流份原花青素对大鼠血清 TC、TG、ALT、AST 的影响(n=10)

Tab. 1 Effect of different fractions of GSP on the TC、TG、ALT、AST of the rats(n=10)

组别	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
空白组	1.71±0.25	0.83±0.23	81.52±8.17	180.38±37.05
模型组	3.43±0.41 ²⁾	1.52±0.31 ²⁾	92.25±25.92 ¹⁾	231.87±53.82 ²⁾
阳性组	2.31±0.31 ³⁾	0.95±0.16 ⁴⁾	86.21±5.57 ³⁾	190.75±31.76 ⁴⁾
10%乙醇组	3.51±0.62	0.71±0.14 ⁴⁾	94.10±7.04	223.26±35.61
30%乙醇组	3.45±0.73	0.73±0.14 ⁴⁾	95.76±11.23	235.55±54.46
50%乙醇组	3.36±0.66	0.72±0.31 ⁴⁾	76.57±7.96 ⁴⁾	196.19±33.84 ⁴⁾
70%乙醇组	3.31±0.71	1.45±0.33	94.15±13.69	227.18±42.57

注：与空白组相比，¹⁾P<0.05，²⁾P<0.01；与模型组相比，³⁾P<0.05，⁴⁾P<0.01。

Note: Compared with the control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with the model group, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01.

表 2 不同组份原花青素对 Lee'S 指数的影响(n=10)

Tab. 2 Effect of different fractions of GSP on Lee'S index of the rats(n=10)

组别	体质量/g	体长/cm	Lee'S 指数
空白组	371.6±29.9	25.1±1.0	293.647±4.674
模型组	459.7±45.5 ¹⁾	26.4±1.2	304.998±2.609 ¹⁾
阳性组	444.6±33.6 ¹⁾	26.1±0.7	299.208±5.48 ¹⁾²⁾
10%乙醇组	438.4±39.4 ¹⁾	25.9±1.0	294.759±5.915 ³⁾
30%乙醇组	429.8±22.0 ¹⁾²⁾	25.7±0.6	293.272±2.699 ³⁾
50%乙醇组	416.9±31.8 ¹⁾²⁾	25.5±0.7	291.232±5.853 ³⁾
70%乙醇组	441.6±32.1 ¹⁾	25.9±0.8	294.182±5.409 ²⁾

注：与空白组比较，¹⁾P<0.01；与模型组比较，²⁾P<0.05，³⁾P<0.01。

Note: Compared with the control group, ¹⁾P<0.01; compared with the model group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01.

表 3 不同流份原花青素对大鼠脏器系数的影响(n=10)

Tab. 3 Effect of different fractions of GSP on the viscera index of the rats(n=10)

组别	肝脏指数(×10 ²)	肾脏指数(×10 ³)	脾脏指数(×10 ³)	总脂指数(×10 ³)
空白组	2.894±0.291	7.030±0.269	3.407±0.270	3.009±0.586
模型组	3.742±0.328 ²⁾	5.544±0.431 ²⁾	2.808±0.171 ¹⁾	6.058±0.938 ²⁾
阳性组	4.797±0.685 ²⁾	6.165±0.560 ⁴⁾	3.370±0.440 ³⁾	4.938±0.903 ¹⁾⁴⁾
10%乙醇组	3.815±0.224 ²⁾	6.078±0.403 ¹⁾⁴⁾	3.354±0.275 ³⁾	4.514±0.402 ²⁾⁴⁾
30%乙醇组	3.757±0.274 ²⁾	5.930±0.539 ²⁾	3.367±0.245 ³⁾	5.164±0.508 ²⁾³⁾
50%乙醇组	3.713±0.359 ²⁾	5.670±0.368 ²⁾	3.313±0.609 ³⁾	4.460±0.513 ²⁾⁴⁾
70%乙醇组	3.626±0.117 ²⁾	5.897±0.458 ²⁾	3.426±0.341 ³⁾	4.552±0.202 ²⁾⁴⁾

注：与空白组比较，¹⁾P<0.05，²⁾P<0.01；与模型组比较，³⁾P<0.05，⁴⁾P<0.01。

Note: Compared with the control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with the model group, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01.

4 小结

本实验结果显示，给予健康成年 SD 大鼠高脂饲料 1 周后，与空白组相比，虽然体质量没有显著变化，但 TC、TG 水平均显著升高，具有统计学意义(P<0.01)，表明高血脂动物模型造模成功。

在各给药组给予药物 4 周后，阳性组 TC、ALT 水平低于模型组(P<0.05)，TG、AST 水平也明显低于模型组(P<0.01)。相对于模型组，10%乙醇组可以明显降低 TG 水平(P<0.01)，下降了 53.29%，

3.3 不同组份原花青素对大鼠脏器指数的影响

模型组的脏器指数有了显著性变化，其中肝脏指数、总脂指数升高，肾脏指数和脾脏指数降低。与模型组比较，给药后 10%乙醇部位组肾脏指数显著升高(P<0.01)；与模型组比较，10%、30%、50%、70%乙醇部位组能显著升高脾脏指数(P<0.05)；与模型组比较，30%乙醇部位组能显著降低总脂指数(P<0.05)；与模型组相比，10%、50%、70%乙醇组能显著降低总脂指数(P<0.01)。通过比较，提示 10%乙醇组对高血脂大鼠肾脏有调节作用，各个浓度乙醇组能够减少脂肪组织在体内的堆积，有助于提升 GSP 的降脂效果。结果见表 3。

而对 TC、ALT 和 AST 无明显影响；30%乙醇组可以明显降低 TG 水平(P<0.01)，相对于模型组，下降了 51.97%，而对 TC、ALT 和 AST 无明显影响；50%乙醇组可以明显降低 TG、ALT 和 AST 水平(P<0.01)，相对于模型组，分别下降了 52.63%，17.00%和 15.39%，而对 TC 无明显影响；而 70%乙醇组对 TC、TG、ALT 和 AST 无明显影响。在对高血脂大鼠 Lee'S 指数影响方面，以 30%乙醇组和 50%乙醇组相对影响较明显些，与模型组比较，

能够抑制体质量的增长。在对大鼠脏器指数影响方面,10%浓度乙醇洗脱组对高血脂大鼠肾脏有调节作用,各个浓度乙醇洗脱组能够减少脂肪组织在体内的堆积。

综合分析体内生化指标及其他指数和脏器指标结果,考虑到生化指标更加直观、灵敏,而指数和脏器指标方面存在干扰因素且有误差,初步推测葡萄籽降血脂主要药效成分集中在50%乙醇部分,但具体成分及含量还有待进一步实验进行验证分析。

5 讨论

随着经济的发展,人们生活水平的提高,饮食结构也发生着变化,高血脂症的发病率越来越高。高血脂是一种血脂代谢紊乱疾病。临床上多表现为高胆固醇血症和高甘油酯血症。高脂血症及其相关的心脑血管疾病的增多推动了降血脂药的研究和开发。目前,降血脂药以化学药为主,如他汀类、贝特类、烟酸类、多烯类等,但长期应用多有不同程度的不良反应^[6];现代研究表明,中药降血脂具有独特的优势,相对于西药具有药源丰富、药效稳定、不良反应少的优点,具有广阔的应用前景^[7]。

近年来,葡萄籽作为研究的热点药材,原花青素的药效成分研究比较多。葡萄籽原花青素是一种有涩味的白色粉末,主要成分是水溶性极高的原花青素低聚物,溶于水、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯,不溶于乙醚、氯仿、苯等。现在天然药物化学中分离纯化方法主要有硅胶柱层析法、大孔树脂吸附法、逆流分配色谱法、离子交换色谱法、凝胶柱法、高效液相色谱法等,其中硅胶柱层析法和大孔树脂吸附法应用较为广泛,本实验采用薄层层析法进行了初步层析分离,发现葡萄籽原花青素中大部分的有效成分都是极性极强的物质,不适宜采用硅胶柱层析法。大孔树脂法具有选择性好、操作方便、容易再生等优点,可采用大孔树脂吸附法进行分离^[8]。

本实验通过对葡萄籽原花青素不同流分进行大鼠降血脂药效学研究,以10%,30%,50%,70%乙醇洗脱,随着乙醇浓度的加大,洗脱能力变强,洗脱出的成分也发生变化,处于50%乙醇层的洗脱成分颜色最深,物质最多,而10%,30%和70%乙醇层相对较少,表明XDA-6型树脂对葡萄籽原花青素具有一定选择性,能够有效的区分不同

极性化合物。在药效实验中,各流分对高血脂大鼠血TG水平具有明显的降低作用,50%乙醇洗脱所得的流分对高血脂大鼠模型组TG,ALT,AST都具有明显降低作用,而70%乙醇洗脱所得流分与模型组相比不具有统计学意义。高血脂症大鼠常伴随着体质量增加,肝脏指数增加,肾脏和脾脏指数降低,以及脂肪组织增生问题,实验中10%,30%,50%,70%乙醇组都能显著降低Lee'S指数,10%浓度乙醇组能够提高高血脂大鼠的肾脏指数,10%,30%,50%,70%乙醇组大鼠总脂系数显著降低,表明对体内脂肪的堆积起到了抑制作用,进而影响到体质量的变化和Lee'S指数降低。实验结果提示葡萄籽原花青素不同流分通过促进TG代谢,提高肝脏代谢功能,抑制大量脂质在体内沉积,拮抗动脉粥样硬化的发展,进而起到降血脂作用。

初步判断葡萄籽原花青素降血脂有效成分主要集中在50%乙醇层。50%乙醇层主要为中等极性的化合物,但具体药效成分,还有待进一步结合药效和成分鉴别实验,探讨发挥降血脂药效的成分种类及含量。本实验结果为葡萄籽原花青素在保健品和医药等方面的进一步开发、利用提供科学依据。

REFERENCES

- [1] WU Y J, LIANG Y F, DONG J N. Advances in research of grape seed proanthocyanidin [J]. J Trop Med(热带医学杂志), 2010, 10(8): 1025-1028.
- [2] LI S. Experimental study on effects of procyanidine on the plasma lipid [J]. Jilin Med J(吉林医学), 2013, 34(1): 5-6.
- [3] XIONG H J, ZHOU C Y, ZHEN X Y, et al. Study on effect of grape seed polyphenol on reducing blood lipid of hypercholesterolemic rats and its antioxidative function [J]. Acta Agricult Jiangxi(江西农业学报), 2008, 20(1): 105-107.
- [4] QUESADA H, DIAZ S, PAJUELO D, et al. The lipid-lowering effect of dietary proanthocyanidins in rats involves both chylomicron-rich and VLDL-rich fractions [J]. Br J Nutr, 2012, 108(2): 208-217.
- [5] YAMAKOSHI J, SAITO M, KATAOKA S, et al. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds [J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40(5): 599-607.
- [6] 迟家敏. 实用血脂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 11-18.
- [7] LIU C, CHAI Y F, LIU F Q. Progress on the lipid-lowering effect and mechanisms of active ingredients in traditional Chinese medicine [J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2010, 28(3): 167-169.
- [8] LIANG M, HE L N, DONG X R, et al. Separation and enrichment of anthocyanin from grape seed by macroporous resin column chromatography [J]. Chem Eng(化学工程师), 2015, 29(3): 65-69.

收稿日期: 2016-02-25