普洱茶素 II 改善高脂血症 ApoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化作用机制研究

王鑫玉[1,2]，赵一慕[1,2]，高　云[1,2]，阴紫钰[1,2]，王凌潇[1,2]，马家乐[1,2]，赵云芳[1]，郑　姣[1*]，李　军[1,2*]

1. 北京中医药大学 中医药研究院中药现代研究中心，北京　102488
2. 北京中医药大学中药学院，北京　102488

摘　要：目的　研究普洱茶素 II 对高脂血症诱发动脉硬化 ApoE 基因敲除小鼠（ApoE$^{-/-}$）的治疗效果及作用机制。**方法**　ApoE$^{-/-}$小鼠通过喂养高脂饲料建立动脉粥样硬化动物模型，造模成功后将小鼠随机分为对照组、模型组、阿托伐他汀（30 mg/kg）组和普洱茶素 II 低、高剂量（50、100 mg/kg）组，给药 6 周后检测小鼠血浆总胆固醇（total cholesterol，TC）、三酰甘油（triglycerides，TG）、高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein cholesterol，HDL-C）和非高密度脂蛋白胆固醇（non-high density lipoprotein cholesterol，non-HDL-C）水平，以及主动脉流出道斑块面积等指标的差异。体外培养人脐静脉内皮细胞 HUVEC 和人外周血单核细胞 THP-1，检测普洱茶素 II 对氧化低密度脂蛋白（oxidized low density protein，ox-LDL）诱发单核与内皮细胞黏附的影响，利用 Western blotting 对蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）/核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）/血管细胞黏附因子（vascular cell adhesion molecule-1，VCAM-1）通路相关蛋白表达进行检测。**结果**　普洱茶素 II 显著抑制了高脂饮食诱导 ApoE$^{-/-}$小鼠的体质量、肝脏质量、肝脏指数、附睾脂肪质量和附睾脂肪指数（P＜0.05、0.01），降低血浆 TC、TG、non-HDL-C 水平（P＜0.05、0.01），升高 HDL-C 水平（P＜0.05），减少主动脉流出道脂质沉积。体外实验证实，普洱茶素 II 显著抑制 HUVEC 与 THP-1 细胞间的黏附（P＜0.05），抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中 VCAM-1、单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemotactic protein-1，MCP-1）和 Akt/NF-κB 通路相关蛋白表达（P＜0.05、0.01）。**结论**　普洱茶素 II 能够显著改善 ApoE$^{-/-}$小鼠的肥胖、脂代谢紊乱、主动脉斑块沉积，通过调控 Akt/NF-κB/VCAM-1 通路抑制内皮细胞与单核细胞的黏附，进而抑制动脉粥样硬化的发生与发展。

关键词：普洱茶素 II；高脂血症；ApoE$^{-/-}$；脂代谢异常；动脉粥样硬化；蛋白激酶 B/核因子-κB 通路

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)04 - 1157 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.04.015

Mechanism of puerin II on improving atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice with hyperlipidemia

WANG Xin-yu[1, 2], ZHAO Yi-mu[1, 2], GAO Yun[1, 2], YIN Zi-yu[1, 2], WANG Ling-xiao[1, 2], MA Jia-le[1, 2], ZHAO Yun-fang[1], ZHENG Jiao[1], LI Jun[1, 2]

1. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China
2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective　To study the therapeutic effect and mechanism of puerin II on ApoE$^{-/-}$ mice with hyperlipidemia induced atherosclerosis. **Methods**　ApoE$^{-/-}$ mice were fed high-fat diet to establish atherosclerotic animal models. After successful modeling, mice were randomly divided into control group, model group, atorvastatin (30 mg/kg) group and puerin II low-and high dose (50, 100 mg/kg) groups. After 6 weeks of administration, the difference of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and non-high density lipoprotein cholesterol (non-HDL-C) levels, as well as plaque area of aortic sinus were detected. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human peripheral blood mononuclear cells (THP-1) were cultured *in vitro*. The effects of puerin II on adhesion of monocytes to endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) were detected. Western blotting was used to detect protein kinase B (Akt)/nuclear factor-κB (NF-κB)/vascular cell adhesion molecule-

收稿日期：2022-10-26

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82074050）；国家重点研发计划（2018YFC1706400）

作者简介：王鑫玉（1997—），女，硕士研究生，研究方向为中药药效物质基础及作用机制。E-mail: wxywukong@163.com

***通信作者：**郑　姣，硕士生导师，副研究员，主要从事中药药理研究。E-mail: zj98v2@163.com

李　军，博士生导师，研究员，主要从事中药药效物质及作用机制研究。E-mail: drlj666@163.com

1 (VCAM-1) pathway related protein expressions was detected. **Results** Puerin II significantly inhibited the body weight, liver weight, liver index, epididymal fat weight, and epididymal fat index ($P < 0.05, 0.01$), decreased TC, TG, and non-HDLc levels in plasma ($P < 0.05, 0.01$), increased HDL-C level ($P < 0.05$), reduced lipid deposition in aortic sinus. *In vitro* experiments confirmed that puerin II significantly inhibited the adhesion between HUVEC and THP-1 cells ($P < 0.05$), inhibited VCAM-1, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and Akt/NF-κB pathway related protein expressions in HUVEC cells induced by ox-LDL ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Puerin II can significantly improve the obesity, lipid metabolism disorder, and aortic plaque deposition of $ApoE^{-/-}$ mice by regulating Akt/NF-κB/VCAM-1 pathway, inhibit the adhesion of endothelial cells and monocytes, thereby inhibiting the occurrence and development of atherosclerosis.

Key words: puerin II; $ApoE^{-/-}$; hyperlipidemia; abnormal lipid metabolism; atherosclerosis; protein kinase B/nuclear factor-κB

动脉粥样硬化是由于胆固醇、脂肪及其他物质在动脉内、外壁积聚形成斑块的病理过程，是心脑血管疾病最重要的诱发因素之一[1]。动脉粥样硬化的病因复杂，涉及血管内皮细胞、单核巨噬细胞和血管平滑肌细胞等多种细胞的参与。其中血管内皮细胞与血液循环中的单核巨噬细胞的黏附被认为是诱发动脉粥样硬化发生与发展的关键因素[2]。血液中的低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein cholesterol，LDL-C）富含胆固醇并极易被氧化修饰为氧化低密度脂蛋白（oxidized low density protein，ox-LDL）。血液中积累的 ox-LDL 刺激血管内皮细胞产生炎症反应，进而增加细胞黏附因子如血管细胞黏附因子-1（vascular cell adhesion molecule-1，VCAM-1）与单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemotactic protein-1，MCP-1）的表达。血液循环中的单核细胞受到内皮黏附因子的招募后，与血管内皮细胞发生黏附并侵入到血管内皮下成为巨噬细胞，巨噬细胞吞噬 ox-LDL 成为泡沫细胞，泡沫细胞不断累积成为动脉粥样硬化斑块[3]。因此，抑制 ox-LDL 诱发的单核细胞与内皮细胞的黏附是抑制动脉粥样硬化发生和发展的关键因素之一。

普洱茶是以云南特产的普洱茶 *Camellia assamica* (Mast.) Chang 的干燥嫩叶为原料，加工而成的微生物后发酵茶。其茶叶经过酶解、揉捻、晒干和轧制，然后在蒸煮、压制和后发酵（自然陈化或堆积发酵）中成型。后发酵过程中，微生物和微生物酶将碳水化合物和酚类化合物进行生物转化，使普洱茶形成独特的口感和风味[4]。研究表明，普洱茶具有改善糖脂代谢紊乱、调血脂、抗动脉粥样硬化、抗炎、抗氧化等多种生物活性[5-7]。普洱茶富含黄酮类、儿茶素类、酚酸类黄烷醇聚合物、嘌呤类生物碱、可水解鞣质等多种活性成分[8-10]。特别是在高温高湿的后发酵过程中，普洱茶嫩叶中的主要成分茶多酚发生各种反应，形成多种儿茶素和有机酸类似物。本课题组前期对普洱茶进行了系统的化学成分研究，分离鉴定了 35 个化合物，获得多个新化合物，并证实新化合物普洱茶素 I～IV 是普洱茶后发酵过程中微生物的代谢产物[5,11-12]。为了深入研究普洱茶改善脂代谢紊乱及动脉粥样硬化的药效物质和作用机制，选择含量较高的特征性成分普洱茶素 II，利用体内和体外模型探讨其作用机制，为普洱茶的开发和应用提供理论支持。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 背景 $ApoE^{-/-}$小鼠，6～8 周龄，体质量（20±2）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2016-0011。SPF 级高脂饲料于北京科奥协力公司定制，饲料配方为基础饲料添加 0.2%胆固醇，15%猪油。实验期间实验环境室温保持在 21～24 ℃，相对湿度保持在 40%～60%，12 h 明暗交替。动物实验经北京中医药大学动物实验伦理审查委员会批准（批准号 No.BUCM-4-2016040301-2001）。

1.2 细胞

人脐静脉内皮细胞 HUVEC 和人外周血单核细胞 THP-1 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

1.3 药品与试剂

普洱茶素 II 由药明康德公司合成，其结构的光谱数据（^{1}H NMR 和 ^{13}C NMR）与文献报道数据[7]比较得到验证，质量分数＞98%；DMEM 细胞基础培养液（批号 18721015）购自美国 Corning 公司；RPMI 1640 细胞基础培养液（批号 8122261）、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS，批号 12483020）、0.25%胰酶（批号 25200072）、双抗（批号 15140163）均购自美国 Gibco 公司；ox-LDL（批号 2018-10-25）购自广州奕源生物科技有限公司；DAPI（批号 190821）购自北京索莱宝科技有限公司；磷酸化蛋

白激酶 B（phosphorylated protein kinase B，p-Akt）抗体（批号 9271T）、磷酸化核因子-κB（phosphorylated nuclear factor-κB，p-NF-κB）抗体（批号 3033P）、NF-κB 抗体（批号 8242P）购自美国 CST 公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（批号 HRP-60004）、Akt 抗体（批号 10176-2-AP）购自美国 Proteintech 公司；MCP-1 抗体（批号 22115）购自美国 Novus 公司；VCAM-1 抗体（批号 EPR5047）购自英国 Abcam 公司；HRP 标记的羊抗鼠二抗（批号 7076P2）、HRP 标记的羊抗兔二抗（批号 7074P2）购自美国 Santa 公司；三酰甘油（triglycerides，TG）测定试剂盒（批号 218081）、总胆固醇（total cholesterol，TC）测定试剂盒（批号 212072）购自北京中生北控生物科技股份有限公司；其他化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.4 仪器

MCO-18AIC 型 CO_2 细胞培养箱、SIM-F140AY65 型制冰机（日本 Sanyo 公司）；5810R 型离心机（德国 Eppendorf 公司）；EnSpire 型多模式微孔板检测仪（美国 PerkinElmer 公司）；Mini PROTEAN 型电泳仪、电转仪（美国 Bio-Rad 公司）；FACSCanto II 型流式细胞仪（美国 BD 公司）；FV1000 型倒置荧光显微镜（日本 Olympus 公司）；ICC50HD 型光学显微镜、CM1950 型冷冻切片机（德国 Leica 公司）。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 造模、分组及给药 小鼠适应性饲养 1 周后随机分为对照组（6 只）、模型组（8 只）、阿托伐他汀（30 mg/kg）组（7 只）和普洱茶素 II 低、高剂量（50、100 mg/kg）组（各 7 只）。除对照组给予正常饲料外，其他各组用高脂饲料喂养 2 周造成高脂模型后，开始 ig 相应药物，1 次/d，连续 6 周，给药同时维持高脂饮食。

2.1.2 小鼠体质量、肝质量、附睾脂肪质量的测定及主动脉流出道取材 各组小鼠给药 6 周后，禁食不禁水 6 h，称定小鼠质量、眼眶取血，全血肝素抗凝后 4000 r/min 离心 10 min，取上清血浆备用。小鼠麻醉后将其四肢固定于操作板，打开胸腔使心脏暴露，右心房剪小角，灌流针头稍插入心尖处，经左心室逆行灌流 PBS 缓冲液，心脏充盈后右心耳剪孔使血液流出。灌流结束后摘取肝脏和附睾脂肪称定质量。从头臂干主动脉起剥至髂总动脉分叉处整体剥离心脏及整个腹主动脉，于 4%多聚甲醛中固定。肝脏/附睾脂肪指数以肝脏/附睾脂肪和体质量的比值计算。

2.1.3 血浆中血脂水平的测定 小鼠血浆 TC 和 TG 按照 TC 和 TG 检测试剂盒说明书测定，血浆高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein cholesterol，HDL-C）利用聚乙二醇沉淀法[13]进行测定，非高密度脂蛋白胆固醇（non-high density lipoprotein cholesterol，non-HDL-C）含量由 TC 扣除 HDL-C 的含量计算得到。

2.1.4 心主动脉流出道切片油红 O 染色 将心脏的冰冻包埋块固定于冰冻切片机上，从心底向主动脉开口方向进行连续切片，至出现主动脉瓣膜，以 7 μm 厚度收集连续切片，至主动脉瓣膜消失，每间隔 10 张切片进行油红 O 染色，细胞核用苏木素复染，显微镜采集图像后对主动脉流出道的动脉粥样硬化病变进行组织学观察，用 Image J 软件对斑块面积进行测量。

2.2 体外实验

2.2.1 内皮细胞与单核细胞的黏附实验 取处于对数生长期的 HUVEC 细胞接种于 96 孔板，于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 至细胞融合度达到 70%～80%，用含 2%胎牛血清的 DMEM 完全培养基饥饿细胞 24 h。设置对照组、模型组和给药组。对照组用含 2%胎牛血清的 DMEM 完全培养基培养，模型组及各给药组以添加 50 μg/mL ox-LDL 的含 2%胎牛血清的 DMEM 完全培养基刺激细胞，给药组以 100 μL 不同浓度（50、100 μmol/L）的普洱茶素 II 处理细胞 24 h。THP-1 细胞用含 2.5 μmol/L 的 BCECF AM 荧光染料的 RPMI 1640 基础培养基（不含血清）进行标记，37 ℃恒温避光孵育 30 min，1000 r/min 离心 5 min，弃去上清，PBS 洗涤细胞 3 次去除未标记 BCECF AM 荧光染料，调节细胞密度为 5×10^5 个/mL。将已标记的 THP-1 细胞 20 μL 轻柔加入至上述用于实验的 HUVEC 细胞中，于 37 ℃共孵育 30 min 后吸去上清，用 PBS 轻柔清洗 2 次以除去未黏附于 HUVEC 细胞上的 THP-1 细胞。荧光倒置显微镜下观察 HUVEC 细胞与 THP-1 细胞的黏附情况。每个样品孔随机取 10 个视野进行拍照，每个实验组设 3 个复孔，实验重复 3 次，利用 Image J 软件对其黏附程度进行定量分析。

2.2.2 Western blotting 检测 Akt/NF-κB/VCAM-1 通

路相关蛋白表达　HUVEC 细胞接种于 12 孔板，培养 24 h 后至细胞融合度达到 80%。按照细胞黏附实验 ox-LDL（50 μg/mL）刺激与普洱茶素 II（10、50、100 μmol/L）处理 HUVEC 细胞后，用预冷的 PBS 轻柔清洗细胞 3 次，加入预冷的细胞裂解液 200 μL，待细胞裂解后于 95 ℃将蛋白变性，离心取上清置于−80 ℃冰箱保存备用。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后分别加入 VCAM-1、MCP-1、p-Akt、Akt、p-NF-κB、NF-κB、GAPDH 抗体，TBST 洗涤后，加入二抗孵育，用 ECL 增强化学发光液曝光条带，显影后用 Image J 软件对条带进行定量分析。

2.3　统计学分析

利用 Graphpad Prism 6.0 软件对数据进行统计分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。One-way ANOVA 用于多组之间显著性差异比较，Student's *t*-test 用于两组之间的显著性差异比较。

3　结果

3.1　普洱茶素 II 对 ApoE$^{-/-}$小鼠体质量、肝脏与附睾脂肪质量及指数的影响

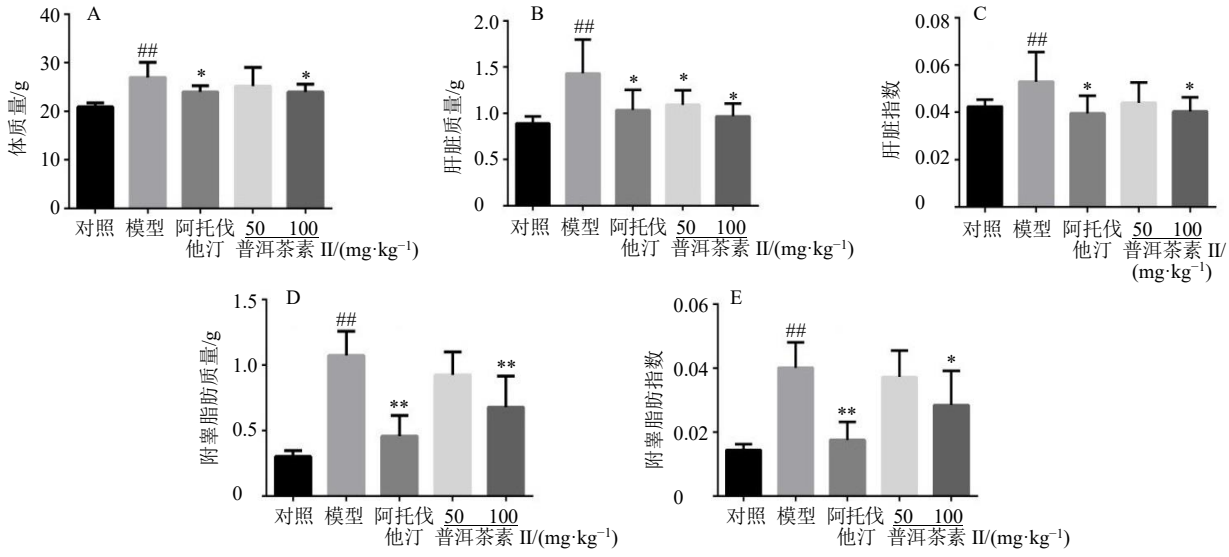
脂代谢紊乱与肥胖、脂肪肝等疾病密切相关。如图 1 所示，与对照组比较，模型组小鼠的体质量、肝脏质量、肝脏指数、附睾脂肪质量和附睾脂肪指数均显著升高（P＜0.01）；与模型组比较，普洱茶素 II 高剂量组和阿托伐他汀组小鼠体质量、肝脏质量与指数、附睾脂肪质量与指数均显著降低（P＜0.05、0.01），普洱茶素 II 低剂量组小鼠肝脏质量显著降低（P＜0.05）。表明普洱茶素 II 能够显著抑制高脂血症小鼠体质量、肝质量及体脂含量。

3.2　普洱茶素 II 对 ApoE$^{-/-}$小鼠血脂的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠血浆 TC、TG、non-HDL-C 水平均显著升高（P＜0.01），HDL-C 水平显著降低（P＜0.01）；与模型组比较，各给药组小鼠血浆 TC、TG、non-HDL-C 水平均显著降低（P＜0.05、0.01），普洱茶素 II 高剂量组和阿托伐他汀组 HDL-C 水平显著升高（P＜0.05），表明普洱茶素 II 能够显著改善脂代谢异常。

3.3　普洱茶素 II 对 ApoE$^{-/-}$小鼠心脏主动脉流出道斑块面积的影响

ApoE$^{-/-}$小鼠经过高脂饲料喂养后可自发产生动脉粥样硬化。主动脉流出道连续切片定量是评估动脉粥样硬化程度的标准方法之一，因此采用流出道斑块沉积的比较，验证普洱茶素 II 对动脉粥样硬化的治疗作用。如图 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠心脏主动脉流出道斑块面积显著增加（P＜0.01）；与模型组比较，各给药组小鼠主动脉流出道斑块面积均显著减少（P＜0.05、0.01）。表明普洱茶素 II 能够显著抑制高血脂诱发的动脉粥样硬化。



与对照组比较：$^{\#\#}P$＜0.01；与模型组比较：$^{*}P$＜0.05　$^{**}P$＜0.01，下图同

$^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* control group; $^{*}P$ < 0.05　$^{**}P$ < 0.01 *vs* model group, same as below figures

图 1　普洱茶素 II 对 ApoE$^{-/-}$小鼠体质量 (A)、肝脏质量 (B)、肝脏指数 (C)、附睾脂肪质量 (D) 及附睾脂肪指数 (E) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 6～8)

Fig. 1　Effect of puerin II on body weight (A), liver weight (B), liver index (C), epididymal weight (D) and epididymal fat index (E) in ApoE$^{-/-}$ mice ($\bar{x} \pm s$, n = 6—8)

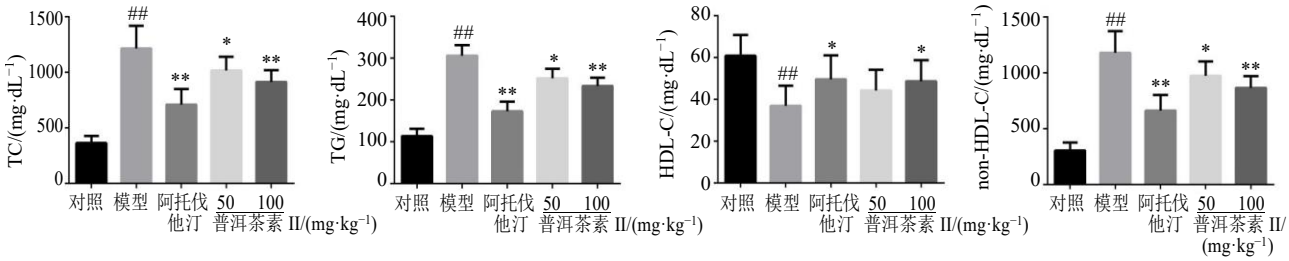


图 2　普洱茶素 II 对 ApoE$^{-/-}$小鼠血浆 TC、TG、HDL-C 和 non-HDL-C 水平的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 6～8）

Fig. 2　Effect of puerin II on levels of TC, TG, HDL-C and non-HDL-C in plasma of ApoE$^{-/-}$ mice ($\bar{x} \pm s$, n = 6—8)

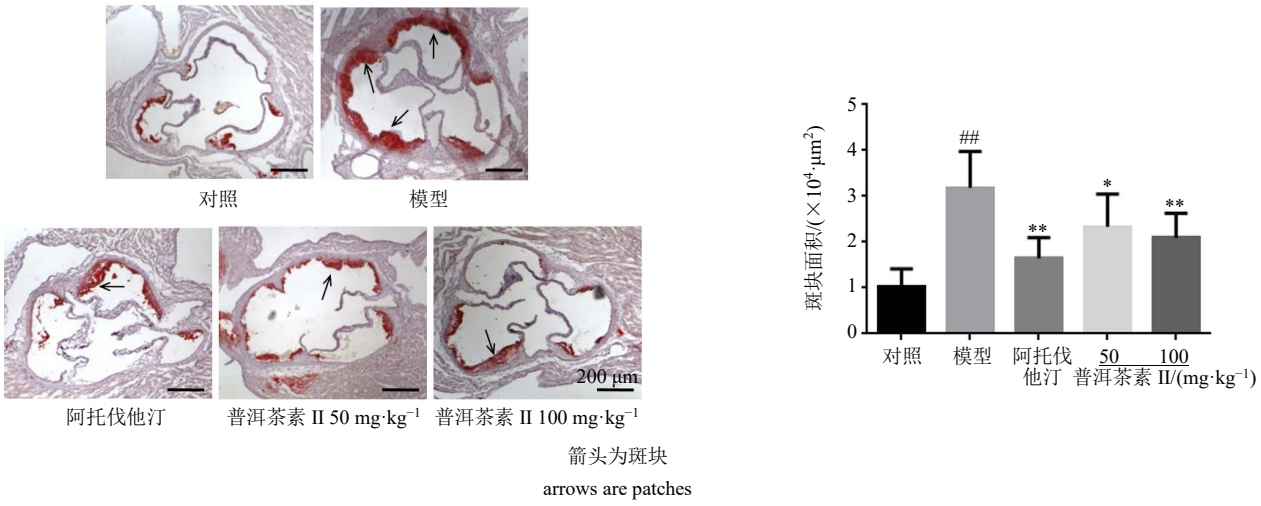


图 3　普洱茶素 II 对 ApoE$^{-/-}$小鼠心脏主动脉流出道斑块面积的影响

Fig. 3　Effect of puerin II on atherosclerotic lesions area in aortic sinus of ApoE$^{-/-}$ mice

3.4　普洱茶素 II 抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞与单核细胞黏附

ox-LDL 诱发的血管内皮细胞与单核细胞的黏附，是动脉粥样硬化的最重要诱因之一。因此，本研究利用血管 HUVEC 细胞和单核 THP-1 细胞构建体外模型，探讨普洱茶素 II 对动脉粥样硬化的作用机制。如图 4 所示，ox-LDL 刺激后 HUVEC 细胞与 THP-1 细胞的黏附作用显著增加（P＜0.01）；与模型组比较，普洱茶素 II 显著抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞与 THP-1 细胞的黏附（P＜0.05），且呈剂量相关性。表明普洱茶素 II 对 ox-LDL 诱导的单核与内皮细胞黏附有显著的抑制作用。

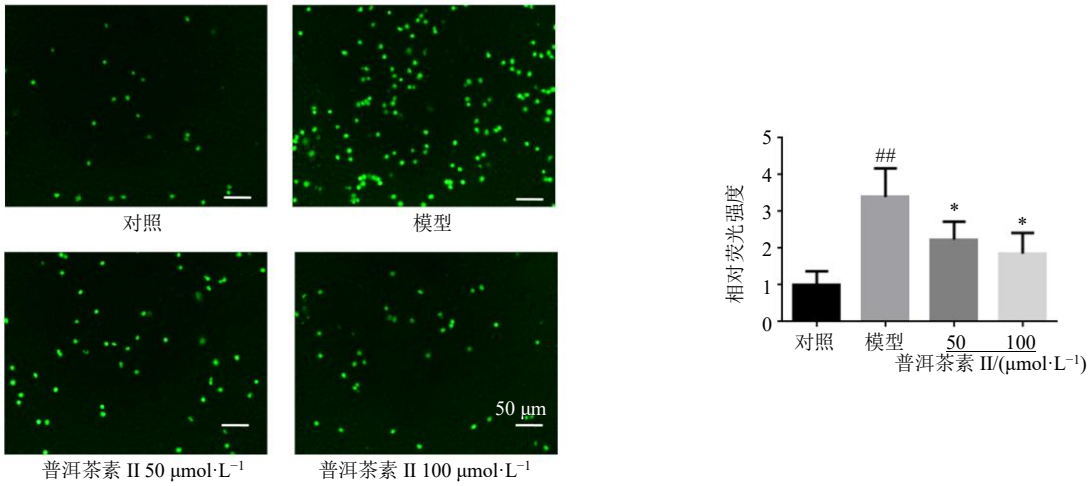


图 4　普洱茶素 II 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞与 THP-1 细胞黏附的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 6）

Fig. 4　Effect of puerin II on ox-LDL induced adhesion between HUVEC cells and THP-1 cells ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

3.5　普洱茶素 II 对 ox-LDL 诱导细胞黏附因子蛋白表达的影响

ox-LDL 通过诱导内皮细胞表达黏附分子和趋化因子，募集单核细胞向内皮细胞黏附进而形成动脉粥样硬化。如图 5 所示，ox-LDL 刺激 HUVEC 细胞 24 h 后，HUVEC 细胞中 VCAM-1 和 MCP-1 蛋白表达水平均显著升高（P＜0.01），普洱茶素 II（50、100 μmol/L）显著抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中 VCAM-1 和 MCP-1 蛋白表达水平（P＜0.05、0.01）。表明普洱茶素 II 可能是通过抑制 VCAM-1 和 MCP-1 的表达来抑制内皮细胞与单核细胞的黏附。

3.6　普洱茶素 II 对 HUVEC 细胞 Akt/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

ox-LDL 诱导的内皮功能障碍在心血管疾病尤其是动脉粥样硬化的发生发展中起着重要作用，而炎症引起的内皮损伤是内皮功能障碍的主要诱因。如图 6 所示，ox-LDL 刺激后 Akt 和 NF-κB 的磷酸化水平显著升高（P＜0.01），100 μmol/L 普洱茶素 II 显著抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞 Akt 和 NF-κB 的磷酸化水平（P＜0.01），50 μmol/L 普洱茶素 II 显著抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞 NF-κB 的磷酸化水平（P＜0.05），表明普洱茶素 II 通过 Akt/NF-κB 通路抑制内皮细胞炎症反应。

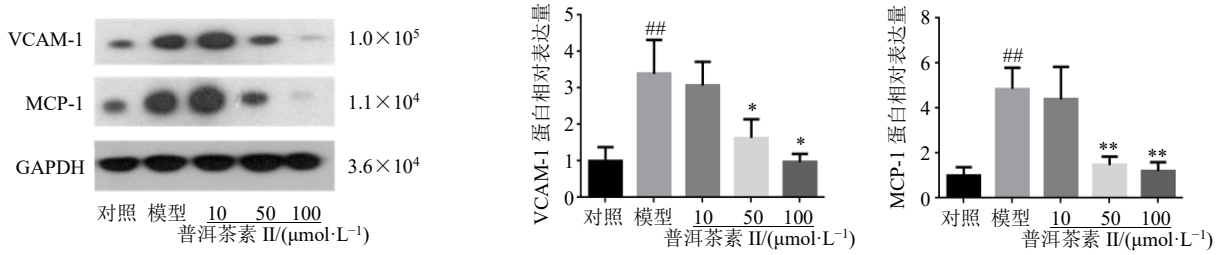


图 5　普洱茶素 II 对 ox-LDL 诱导 HUVEC 细胞中 VCAM-1、MCP-1 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 5　Effect of puerin II on VCAM-1 and MCP-1 protein expressions in ox-LDL induced HUVEC cells ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

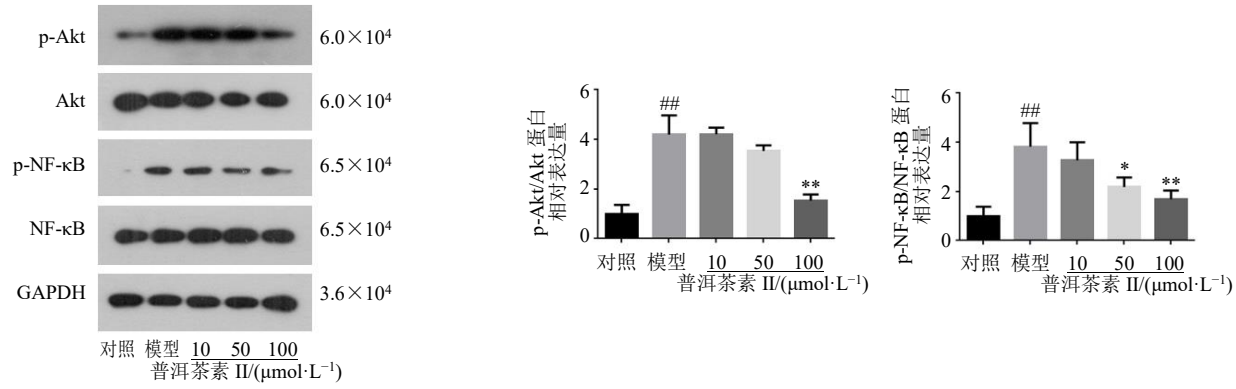


图 6　普洱茶素 II 对 ox-LDL 刺激的 HUVEC 细胞中 Akt、NF-κB 蛋白表达及其磷酸化水平的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 6　Effect of puerin II on Akt and NF-κB protein expressions and phosphorylation levels in ox-LDL induced HUVEC cells ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

4　讨论

动脉粥样硬化具有复杂的发病机制，包括脂质浸润、炎症损伤、氧化应激等方面，其主要成因是动脉壁脂代谢改变导致的脂质堆积[14]。目前普洱茶提取物对高脂血症、糖尿病的治疗作用研究已有报道。如普洱茶水提物、醋酸乙酯萃取组分对肥胖 ICR 小鼠体质量、体脂降低作用明显[15]；普洱茶水提物能够促进 Wistar 大鼠骨骼肌葡萄糖转运，改善大鼠胰岛素抵抗等[16]。但是普洱茶活性成分抗动脉粥样硬化的作用及其机制尚缺乏系统研究。本研究利用前期课题组发现的普洱茶特征性成分普洱茶素 II，系统研究其改善高脂血症诱发动脉粥样硬化的体内药效与作用机制。发现普洱茶素 II 能呈剂量相关性地降低小鼠的 TC、TG 和 non-HDL-C 水平，减少附睾脂肪质量，抑制主动脉流出道的脂质沉积，能降低其体内血脂和动脉粥样硬化水平。

动脉粥样硬化是血管壁的慢性炎性疾病。它源于修饰的脂蛋白、免疫细胞和内皮细胞之间的相互

作用。因此内皮功能障碍和单核细胞-内皮细胞相互作用是动脉粥样硬化发生和发展的关键。LDL-C 经氧化修饰形成 ox-LDL，ox-LDL 不同于天然 LDL-C，它可激活损伤内皮细胞，促使细胞趋化因子、黏附分子和集落因子分泌，促进内皮细胞与单核细胞的黏附[17]。当内皮细胞经历炎症激活时，选择素、VCAM-1 和细胞间黏附分子-1（intercellular adhesion molecule-1，ICAM-1）的表达增加，促进单核细胞的黏附[18-19]，从而促进动脉粥样硬化斑块的形成和发展。本研究发现，普洱茶素 II 能显著抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 细胞与 HUVEC 细胞的黏附，并抑制了 ox-LDL 刺激的 HUVEC 细胞中 VCAM-1 和 MCP-1 的表达。内皮细胞中黏附因子的表达受多个通路调控，其中 Akt/NF-κB 通路是调控炎症因子刺激内皮细胞炎症因子表达的重要炎症通路[20]。本研究结果显示，普洱茶素 II 显著抑制 ox-LDL 诱导后 HUVEC 细胞中 Akt 和 NF-κB 的磷酸化激活。推测普洱茶素 II 通过 Akt/NF-κB 通路抑制内皮细胞炎症反应进而抑制黏附因子的表达与动脉粥样硬化的发生与发展。

综上，本研究表明，普洱茶素 II 作为普洱茶的特征成分能够显著改善 ApoE$^{-/-}$小鼠的肥胖、脂代谢紊乱和主动脉斑块沉积。进一步的机制研究显示，针对 ox-LDL 诱发的内皮细胞与单核细胞的黏附，普洱茶素 II 通过调控 Akt/NF-κB 炎症通路，抑制 MCP-1 与 VCAM-1 的蛋白表达，进而抑制动脉粥样硬化的发生与发展，推测普洱茶素 II 是普洱茶改善脂代谢紊乱与动脉粥样硬化的活性成分。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Tang X P, Zhang Z Y, Fang M Q, *et al*. Transferrin plays a central role in coagulation balance by interacting with clotting factors [J]. *Cell Res*, 2020, 30(2): 119-132.

[2] Fenyo I M, Gafencu A V. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis [J]. *Immunobiology*, 2013, 218(11): 1376-1384.

[3] 杨永兆, 陈鹏. 巨自噬与细胞泡沫化在动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2022, 51(9): 16-19.

[4] Wang S N, Qiu Y, Gan R Y, *et al*. Chemical constituents and biological properties of Pu-erh tea [J]. *Food Res Int*, 2022, 154: 110899.

[5] Gu X P, *et al*. Puerin III alleviates glucose and lipid metabolism disorders in high-fat high-sucrose diet-induced hyperlipidemic and hyperglycemic ApoE$^{-/-}$ mice [J]. *J Funct Foods*, 2022, 93: 105085.

[6] Huang F J, Zheng X J, Ma X H, *et al*. Theabrownin from Pu-erh tea attenuates hypercholesterolemia via modulation of gut microbiota and bile acid metabolism [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4971.

[7] Wang W N, Zhang L, Wang S, *et al*. 8-CN-ethyl-2-pyrrolidinone substituted flavan-3-ols as the marker compounds of Chinese dark teas formed in the post-fermentation process provide significant antioxidative activity [J]. *Food Chem*, 2014, 152: 539-545.

[8] 李菊, 张荣平, 郑梅. 普洱茶活性成分药理作用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(1): 21-23.

[9] 顾睿, 李瑞明, 张兰兰, 等. 普洱茶化学成分及药理研究进展 [J]. 天津药学, 2011, 23(1): 47-51.

[10] 吕海鹏, 谷记平, 林智, 等. 普洱茶的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 茶叶科学, 2007, 27(1): 8-18.

[11] 顾小盼, 吴臻, 靳凤玉, 等. 普洱茶素 I 改善糖脂代谢紊乱的药效评价及作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2339-2344.

[12] 顾小盼. 普洱茶素 II 改善 ApoE$^{-/-}$小鼠糖脂代谢紊乱及动脉粥样硬化的药效和机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.

[13] 涂向东, 胡望平. 分离高脂血标本中高密度脂蛋白胆固醇的一种有效方法 [J]. 南京部队医药, 1998(5): 29-30.

[14] Miname M H, Santos R D. Reducing cardiovascular risk in patients with familial hypercholesterolemia: Risk prediction and lipid management [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2019, 62(5): 414-422.

[15] 熊昌云. 普洱茶降脂减肥功效及作用机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.

[16] Ma X, Tsuda S, Yang X, *et al*. Pu-erh tea hot-water extract activates Akt and induces insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscle [J]. *J Med Food*, 2013, 16(3): 259-262.

[17] Kawanami D, Maemura K, Takeda N, *et al*. C-reactive protein induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB activation in vascular endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 185(1): 39-46.

[18] Szmitko P E, Wang C H, Weisel R D, *et al*. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I [J]. *Circulation*, 2003, 108(16): 1917-1923.

[19] Zheng J, Liu B L, Lun Q X, *et al*. Longxuetongluo Capsule inhibits atherosclerosis progression in high-fat diet-induced ApoE$^{-/-}$ mice by improving endothelial dysfunction [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 255: 156-163.

[20] 胡志良, 池豪, 丁水印. 龙胆苦苷对脂多糖诱导血管内皮细胞损伤的作用及机制 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 3002-3008.

[责任编辑 李亚楠]