

武夷岩茶酸性茶多糖对 2 型糖尿病大鼠胆汁酸的调节作用机制

吴 仲^{1,2} 杨江帆²

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002)

摘要: [目的] 研究从武夷岩茶黄片中提取的一种酸性茶多糖对高血糖大鼠胆汁酸的影响。[方法] 通过体外试验评价茶多糖对胆酸盐的结合能力; 通过液质联用仪测定大鼠盲肠内容物中胆汁酸组成, 并检测大鼠肝脏、胰腺的胆汁酸受体法尼醇 X 受体 FXR、G 蛋白偶联胆汁酸受体 TGR5 mRNA 的相对表达量; Western Blot 法检测结肠组织胰高血糖素样肽-1 的表达水平。[结果] 茶多糖对结合型和游离型的胆酸盐均有一定的结合能力, 并且对结合型胆酸盐具有更好的结合能力, 当茶多糖质量浓度为 2.00 mg/mL 时, 其对胆酸钠的结合率仅为同浓度下甘氨酸酸钠和牛磺胆酸钠结合率的 57.59%, 62.62%。茶多糖的干预对大鼠盲肠内容物中胆汁酸水平的影响主要表现为初级胆汁酸鹅去氧胆酸水平的增加, 以及次级胆汁酸脱氧胆酸、石胆酸水平的降低。此外, 其对大鼠肝脏、胰腺胆汁酸受体 FXR、TGR5 的 mRNA 表达具有上调作用; 对胰高血糖素样肽-1 表达水平无显著性影响。[结论] 茶多糖干预可改变大鼠初级胆汁酸/次级胆汁酸的比率, 而疏水性更高的次级胆汁酸在肠肝循环中吸收性更差。

关键词: 武夷岩茶; 黄片; 酸性茶多糖; 2 型糖尿病; 胆汁酸; 作用机制

The regulatory mechanism of acidic tea polysaccharides from Wuyi rock tea on bile acids in type 2 diabetic rats

WU Zhong^{1,2} YANG Jiangfan²

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;
2. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to investigate the effects of an acidic tea polysaccharide extracted from Wuyi Rock tea "yellow slice" on bile acids in hyperglycaemic rats. [Methods] *In vitro* experiments simulating artificial gastric and intestinal fluids were conducted to evaluate the binding capacity of tea polysaccharides to bile salts. The composition of bile acids in the cecal contents was analyzed using Liquid Chromatography with Mass Spectrometry (LC-MS); The relative mRNA expression of bile acid receptors FXR and TGR5 in rat liver and pancreas of rats were measured, along with Western blot analysis of colonic tissues. [Results] The *in vitro* experiments demonstrated that tea polysaccharides possess a significant binding capacity for both bound and free bile salts, with stronger affinity for bound bile salts. At 2.00 mg/mL, the binding rate of the tea polysaccharides to sodium cholate were found to be 57.59% and 62.62% for sodium glycylocholate and sodium taurocholate, respectively. In the cecal contents of rats, intervention with tea polysaccharides primarily increased the level of secondary bile acids, including deoxycholic acid and lithocholic acid. Additionally, the treatment upregulated the mRNA expression of bile acid receptor FXR and TGR5 in the liver and pancreas, with no significant change observed in the expression of GLP-1. [Conclusion] The intervention with acidic tea polysaccharides from Wuyi rock tea led to an increased ratio of primary bile acids to secondary bile acids. This suggests that the more hydrophobic secondary bile acids are less effectively absorbed in the enterohepatic circulation.

Keywords: Wuyi rock tea; yellow slice; acidic tea polysaccharides; type 2 diabetes mellitus; bile acids; mechanism of action

通信作者: 吴仲 (1981—), 男, 福建中医药大学讲师, 博士。E-mail: wzrenwz@foxmail.com

收稿日期: 2024-01-25 改回日期: 2024-08-27

胆汁酸是在肝脏由胆固醇氧化产生,并被肠道微生物进一步转化为次级胆汁酸,而这有利于胆汁酸经粪便排泄,进而有利于阻断胆汁酸的肠肝循环。体内胆汁酸的减少,解除了 7α -羟化酶对胆汁酸合成的反馈抑制,加速肝脏中的胆固醇持续转化为胆酸盐,从而起到降低血清胆固醇功效,缓解糖尿病等疾病。参与该过程的肠道微生物通常具有表达胆盐水解酶(BSH)的能力^[1]。有试验^[2]发现,小鼠肠道菌群 BSH 表达的增加导致体重增加减少,血浆胆固醇水平降低。因此,任何能影响肠道中具有 BSH 活性细菌增殖的膳食成分都具有调节胆汁酸稳态并影响宿主心血管健康的可能^[3]。

武夷岩茶黄片为岩茶精制过程中剔除出的粗老茶,黄片等副产品大约占毛茶总量的 20%~30%^[4],利用率较低,如何实现其高值化利用,颇受相关学者关注。课题组^[5]前期以武夷岩茶黄片为原料提取得到一种酸性茶多糖,其具有降糖活性。已有报道^[6]指出,岩藻多糖通过调节胆汁酸代谢,从而激活 FXR 和 TGR5,增强了结肠炎小鼠肠道屏障并抑制结肠炎症。有研究^[7]证实,普洱茶茶褐素能调节胆汁酸代谢。茶褐素是主要由多酚、多糖、蛋白等组成的褐色物质,其碳水化合物含量达 16.0%,是形成茶褐素的重要组成部分之一^[8-9]。但关于纯化茶多糖干预后大鼠胆汁酸变化的报道尚不多。

体内的胆汁酸通常会以胆酸盐的形式存在。研究拟在前期药效学观察的基础上,选择游离型胆酸盐(胆酸钠)和结合型胆酸盐(牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠)等具有代表性的胆酸盐开展茶多糖结合胆酸盐能力评价的体外研究,并进一步通过检测大鼠胆汁酸构成、胆汁酸受体 FXR、TGR5 的 mRNA 表达水平的变化等,探讨茶多糖对胆汁酸的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

武夷岩茶酸性茶多糖(WTP):提取自武夷岩茶黄片,主要由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和半乳糖醛酸组成,相对分子质量为 39 285,实验室自制;

雄性 Wistar 大鼠:6 周龄,(200±20) g,上海斯莱克实验动物有限责任公司;

总 RNA 提取试剂盒(TransZol Up Plus RNA Kit)、反转录试剂盒(TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix)、RT-PCR 试剂盒(TransStart® Tip Green qPCR SuperMix)等:北京全式金生物技术股份有限公司;

Anti-GLP1、Anti- β -Actin、Goat anti Rabbit IgG:英国 Abcam 公司;

BCA 蛋白定量试剂盒、ECL:美国 Pierce 公司;

Rabbit Anti-Chicken IgY:北京博奥森生物技术有限

公司;

BSA:美国 Sigma 公司;

胃蛋白酶(3 000 U/mg)、胰蛋白酶(2 500 U/mg)、胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠:上海源叶生物科技有限公司;

其他试剂均为国产分析纯;

恒温水浴锅:HH-4 型,常州市江南实验仪器厂;

台式离心机:TGL-16G 型,上海安亭科学仪器厂;

紫外可见分光光度计:752N 型,上海精科实业有限公司;

液质联用仪:API 4000 型,美国 AB Sciex 公司;

荧光定量 PCR 仪:CFX96 型,美国 Bio-Rad 公司;

多功能酶标仪:VARIOSKAN LUX 型,美国 Thermo 公司;

纯水系统:Milli-Q Direct 8 型,美国 Millipore 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 动物试验及分组 饲养于室温(22±2)℃,明暗交替各 12 h,相对湿度(55±10)%环境内。大鼠 5 只/笼分笼饲养,自由饮食和喝水。经过 1 周适应性饲养后,随机选出 10 只大鼠作为正常对照组(NC)并提供基础饲料,其余大鼠则提供高脂饲料诱导。4 周后所有大鼠禁食 12 h,对饲喂高脂饲料大鼠腹腔注射链脲霉素(STZ,30 mg/kg)以诱发 T2DM,造模不达标者,稳定后补注 STZ(10 mg/kg),而 NC 组大鼠则注射同等体积生理盐水。当空腹血糖超过 16.7 mmol/L 且伴随“三多一少”现象时,认定 T2DM 造模成功。50 只糖尿病大鼠被随机分为 5 组,每组 10 只。分别为阴性对照组(DC),茶多糖低、中、高剂量组(LP、TP、HP),二甲双胍阳性对照组(ME)。正常对照组(NC)继续饲以基础饲料,并灌胃生理盐水;其余 5 组则以高脂饲料喂养的同时,其中 DC 组灌胃生理盐水;ME 组以每日 200 mg/(kg·BW·d)二甲双胍的剂量进行灌胃;茶多糖干预组(LP、TP、HP)分别以 200,400,800 mg/(kg·BW·d)茶多糖的剂量进行灌胃。灌胃每天 1 次,不间断持续 40 d,其间大鼠均可自由摄食和饮水,每天按时更换新鲜的饲料、饮用水,并清理更换粪便托盘^[5]。

试验末期取大鼠肝脏、胰腺、结肠组织,盲肠内容物,分别装入离心管,-80℃冰箱内保存,备用。

1.2.2 茶多糖体外结合胆酸盐活性评价

(1)胆酸盐标准曲线绘制:分别量取不同浓度的甘氨酸胆酸钠、牛磺胆酸钠和胆酸钠标准溶液(0.015,0.030,0.045,0.060,0.075,0.090 mmol/L)2.0 mL 于试管中,加入 6.0 mL 质量分数为 60%的 H_2SO_4 溶液,于 70℃水浴锅中保温 20 min 后,取出并立即冰浴 5 min,在 387 nm 处测定吸光度,以胆酸盐浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线^[10-11]。所得标准曲线 R^2 均大于 0.99,线性关系良好。甘氨酸胆酸钠: $y=10.726x+0.0462$, $R^2=0.9951$;牛磺胆

酸钠: $y=12.963x+0.020$, $R^2=0.999$; 胆酸钠: $y=3.8476x+0.0038$, $R^2=0.992$ 。

(2) 茶多糖对胆酸盐吸附动力学试验: 20.0 mg 茶多糖及 1.0 mL 蒸馏水加入试管内摇匀, 再分别加入 1.0 mL 0.01 mol/L 的盐酸溶液和 3.0 mL 10.0 mg/mL 的胃蛋白酶溶液加入后, 置于 37 °C 恒温水浴锅振荡消化 1 h (模拟胃消化环境); 取出试管将 pH 值调至 6.3, 随即加入 5.0 mL 10.0 mg/mL 的胰蛋白酶溶液, 于 37 °C 继续恒温振荡消化 1 h 后 (模拟肠道环境); 分别加入 0.3 mmol/L 牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠和胆酸钠 5.0 mL, 在 37 °C 分别恒温振荡 15, 30, 45, 60, 75, 90 min 后; 取出 4 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液 2.0 mL, 加入 6.0 mL 60% H_2SO_4 溶液, 70 °C 水浴 20 min, 冰浴冷却, 387 nm 处测定吸光值, 计算上清液胆酸盐含量, 所加胆酸盐总量减去其值即为茶多糖吸附量^[10-12]。

(3) 茶多糖对胆酸盐等温吸附试验: 20.0 mg 茶多糖及 1.0 mL 蒸馏水加入试管内摇匀, 模拟胃、肠道消化后; 每个样品中分别加入 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 mL 0.3 mmol/L 的牛磺胆酸钠溶液、甘氨酸胆酸钠溶液、胆酸钠溶液, 体积不足者补齐至 15.0 mL; 37 °C 恒温振荡 1 h; 4 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液 2.0 mL, 加入 6.0 mL 60% H_2SO_4 溶液, 70 °C 水浴 20 min, 冰浴冷却, 387 nm 处测定吸光值, 计算上清液胆酸盐含量, 确定胆酸盐吸附量^[10-11]。

(4) 茶多糖对胆酸盐的结合试验: 分别称取 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 mg 茶多糖于试管中, 加入 1.0 mL 蒸馏水混合均匀, 模拟胃、肠道消化后; 每个样品中加入 5.0 mL 0.3 mmol/L 牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠或胆酸钠溶液, 37 °C 恒温水浴继续振荡 1 h; 随即取出 4 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液 2.0 mL, 加入 6.0 mL 60% H_2SO_4 溶液, 70 °C 水浴 20 min, 冰浴冷却, 387 nm 处测定吸光值, 计算上清液胆酸盐含量^[10-12]。所加入的胆酸盐总量减去溶液剩余胆酸盐含量所得到的差值与总量的比值即为茶多糖与胆酸盐的结合率。

1.2.3 液质联用仪测定盲肠内容物中胆汁酸组成 从 -80 °C 冰箱中取冷冻盲肠内容物, 准确称取 200.0 mg 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1.0 mL 甲醇超声处理至均匀分散, 10 000 r/min 离心 10 min, 再静置 15 min。取上清液经 0.45 μ m 膜过滤至 2 mL 进样瓶中冷藏待测, 测试时额外稀释 50 倍。

以离子扫描模式进行检测, 选择的离子为: m/z 407.30 (胆酸, CA)、 m/z 391.30 (脱氧胆酸, DCA)、 m/z 391.20 (鹅脱氧胆酸, CDCA) 以及 m/z 375.20 (石胆酸, LCA)。色谱及质谱条件参照文献[13]。

1.2.4 组织 RNA 提取与表达 按照 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 的提取。RNA 样品分别于 260, 280 nm 处采用

紫外光度法检测吸光值, 当 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 2$ 时表示纯度合格, 则取 3.0 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 无降解情况, 取 5.0 μ L 准备进行 cDNA 的转录。反转录程序按反转录试剂盒 (TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix) 说明书进行。试验中所用器材均提前灭菌。

根据 Primer 3 设计引物 (表 1), 由上海生物工程有限公司合成。以 cDNA 为模板, 荧光定量 PCR 扩增反应按 RT-PCR 试剂盒 (TransStart® Tip Green qPCR SuperMix) 说明书进行, 设置 3 个重复。试验采用 RT-PCR 试剂盒所提供的反应体系。反应结束后, 以 β -actin 基因为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 算法计算相对表达量。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequences for real-time RT-PCR

基因	登录号	引物序列
β -actin	NM_031144.3	F: ACAGGATGCAGAAGGAGATTAC R: ACAGTGAGGCCAGGATAGA
FXR	NM_021745.1	F: CAGATCTCCTCCTCGTCTATT R: GCATTCGCCTGAGTTCATAGA
TGR5	NM_177936.1	F: GCTATGGAATAGGAGCCATCAG R: CAAGCAGGGAGAGGAAACAA

1.2.5 Western Blot 检测蛋白表达水平 Wistar 大鼠结肠组织样本选择 NC、DC、ME、TP 4 组, 每组各 6 个样本。样本加入裂解液匀浆后, 超声处理, 离心后吸取上清, 以 BCA 法 (562 nm) 测定蛋白浓度后, 按流程制胶、上样, 90 V 电压下进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 当 Marker 分离、条带平时, 120 V 恒压电泳至指示剂距离底部 1 cm 时停止。依次小心操作转膜, 封闭, 加入一抗孵育 (4 °C 过夜, 其中一抗稀释浓度为: Anti-GLP-1 1:1 000、Rabbit Anti-Chicken IgY 1:1 000、Anti- β -actin 1:3 000), 洗膜, 加入酶标二抗 (室温反应 1 h), 洗膜, 显色, 进行 Western Blot 检测。

1.3 统计学分析

质谱图用 Origin 7.5 软件绘制。所有数据取 3 次平行重复, 使用 GraphPad Prism 5 软件进行处理。以平均值 $\pm$ 标准偏差 (mean $\pm$ SD) 表示, 采用 t 检验进行统计分析, 当 $P < 0.05$ 时, 表示差异显著, 当 $P < 0.01$ 时, 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 茶多糖体外结合胆酸盐活性

2.1.1 茶多糖对胆酸盐吸附动力学分析 如图 1 所示, 茶多糖对 3 种胆酸盐均具有较高的吸附速率, 30 min 左右便基本达到了吸附平衡点, 表明茶多糖对结合型和游离型的胆酸盐均具有较好的快速结合能力。其中, 茶多糖对

甘氨酸胆酸钠的平衡吸附量最高,而对胆酸钠的吸附量最少。这是因为作为结合型胆酸盐,牛磺胆酸钠分子上的磺酸基和甘氨酸胆酸钠分子上的羧基比游离型胆酸钠侧链末端的羧基的酸性更强,也因此更易离子化,更易暴露活性基团^[10,14]。Story 等^[15]及华梅等^[16]研究认为,膳食纤维较难吸附牛磺胆酸钠,且对牛磺胆酸钠吸附能力强的膳食纤维往往对人体内含量更高的甘氨酸胆酸钠表现出更高的结合能力。试验中,牛磺胆酸钠和甘氨酸胆酸钠的吸附差异印证了这一论断。

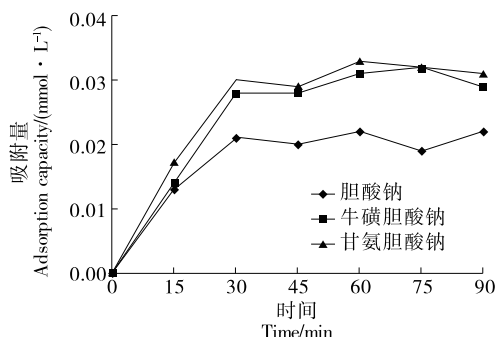


图1 茶多糖对胆酸盐吸附动力学曲线

Figure 1 The adsorption kinetic curve of tea polysaccharide on bile salts

2.1.2 茶多糖结合胆酸盐等温吸附曲线分析 如图2所示,茶多糖对胆酸盐的吸附量与胆酸盐的初始浓度呈正相关,且对结合型胆酸盐牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠的吸附量明显高于游离型的胆酸钠($P < 0.01$)。分析原因,可能是结合型胆酸盐的侧链基团的强极性使其在溶液中离子化程度更高,与茶多糖结合能力更好,而游离型的胆酸钠侧链基团离子化能力较弱,抑制了其与茶多糖的结合。

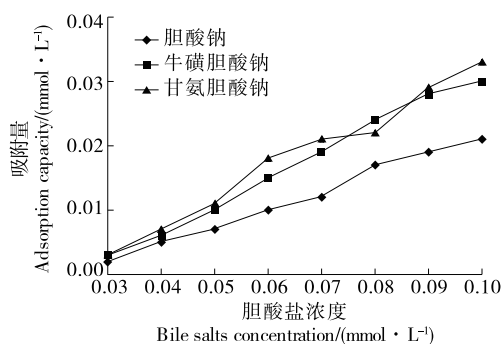


图2 胆酸盐等温吸附曲线

Figure 2 The isotherm adsorption curve of bile salts

2.1.3 茶多糖结合胆酸盐能力 如图3所示,茶多糖对胆酸盐的结合率随着茶多糖质量浓度的增加而增加,当茶多糖质量浓度达1.67 mg/mL后,与胆酸钠结合率趋于稳定。茶多糖质量浓度为0.33~2.00 mg/mL时,与牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠的结合率呈量效关系。以2.00 mg/mL茶多糖的结合率作比较,茶多糖对胆酸钠的结合率相当于其

对其对甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠结合率的57.59%,62.62%,表明茶多糖对结合型胆酸盐具有更好的结合能力。茶多糖与胆酸盐结合后,促进了胆酸盐的排泄,减少了参与肝肠循环的胆汁酸。由此也促使肝脏中胆固醇不断转化为胆汁酸以维持其在肝肠循环中的动态平衡,也因此起到了降低体内胆固醇含量的作用^[10]。

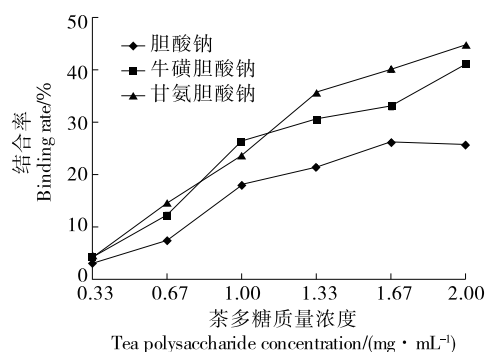


图3 不同质量浓度茶多糖对胆酸盐的结合能力

Figure 3 Binding capacity of bile salts by different concentrations of tea polysaccharide

2.2 各组大鼠盲肠内容物胆汁酸组成

胆汁酸质谱图见图4。如表2所示,茶多糖的干预对大鼠盲肠粪便中胆汁酸水平的影响主要表现为初级胆汁酸中鹅去氧胆酸水平的增加,以及次级胆汁酸脱氧胆酸、石胆酸水平的降低。有报道^[17]指出,T2DM人群脱氧胆酸浓度增加,其机制可能与胰岛素抵抗时FXR及TGR5受抑制有关。试验过程中也发现,胆汁酸出现类似的变化,造模成功后脱氧胆酸含量显著提升,茶多糖干预后回落,提示茶多糖可能通过调节胆汁酸代谢,对T2DM产生积极的影响。另有研究^[7]表明,普洱茶等通过影响能表达BSH酶肠道微生物的相对丰度从而干预胆汁酸代谢。肠道菌群的活动影响胆汁酸代谢的机制是因为其可以通过7 α -羟化酶将初级胆汁酸转化为次级胆汁酸,再通过BSH酶在回肠远端进一步将其转化为未结合形式。因此,提示茶多糖可能对肠道菌群产生影响,改变了其中的BSH菌群,从而发挥生理活性。

2.3 大鼠肝脏FXR、TGR5 mRNA表达的变化

胆汁酸受体主要包括FXR和TGR5。FXR在胆汁酸、葡萄糖和脂质平衡中发挥着重要作用^[18]。研究^[19]发现,鹅去氧胆酸能扭转T2DM模型大鼠肝脏组织样本中FXR的mRNA和蛋白表达水平的下调。图5显示,DC组T2DM模型大鼠肝脏FXR mRNA表达水平较NC组显著降低($P < 0.01$),经二甲双胍干预后,FXR mRNA表达水平有所提升,而茶多糖干预组中LP组略有下降,TP组及HP组略

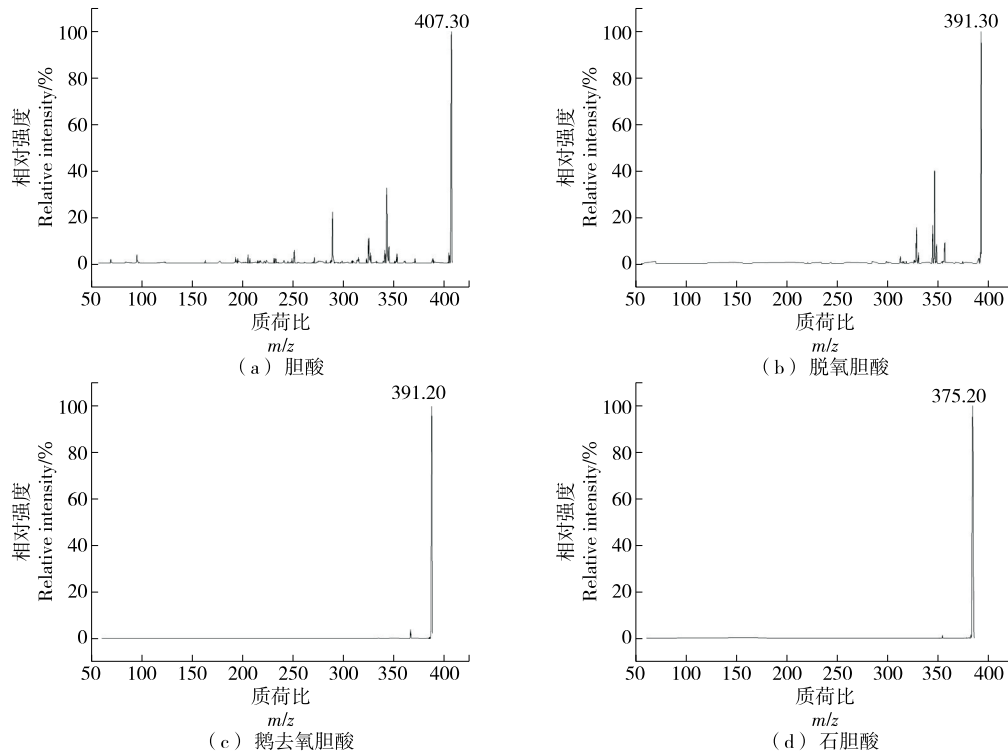


图4 胆汁酸质谱图

Figure 4 Mass spectra of bile acids

表2 茶多糖对盲肠内容物胆汁酸的影响[†]

Table 2 Effect of tea polysaccharide on bile acids in cecum contents

μg/g

组别	胆酸	鹅去氧胆酸	脱氧胆酸	石胆酸	总胆酸
NC	0.286±0.024	0.277±0.007	0.266±0.028	0.067±0.010	0.896±0.046
DC	0.231±0.035 ^Δ	0.275±0.015	0.562±0.082 ^{ΔΔ}	0.290±0.085 ^{ΔΔ}	1.359±0.117 ^{ΔΔ}
ME	0.350±0.021 ^{**}	1.387±0.205 ^{**}	0.355±0.010 ^{**}	0.077±0.007 ^{**}	2.169±0.215 ^{**}
LP	0.253±0.035	0.512±0.110 ^{**}	0.364±0.012 ^{**}	0.136±0.017 [*]	1.265±0.138
TP	0.260±0.030	0.800±0.082 ^{**}	0.378±0.012 ^{**}	0.125±0.020 [*]	1.563±0.072 [*]
HP	0.242±0.045	0.459±0.045 ^{**}	0.383±0.015 ^{**}	0.174±0.023 [*]	1.257±0.058

[†] Δ表示DC组与NC组具有显著差异($P<0.05$); ΔΔ表示DC组与NC组具有极显著差异($P<0.01$); *表示ME、茶多糖组与DC组具有显著差异($P<0.05$); **表示ME、茶多糖组与DC组具有极显著差异($P<0.01$)。

有提升,但差异均不大。说明茶多糖干预对肝脏 FXR mRNA 无明显影响。

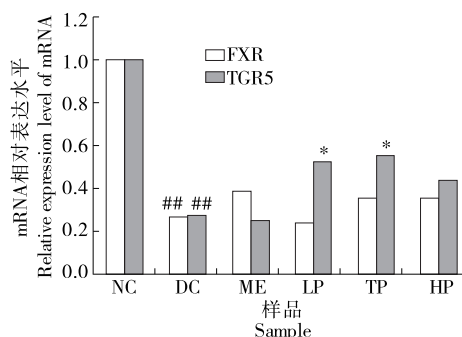
一项研究^[20]发现,主要由次级胆汁酸触发的胆汁酸受体 TGR5 可促进 GLP-1 的分泌,并使糖尿病模型小鼠对富含 Tithonia 皂苷的提取物产生胰岛再生反应。TGR5 越来越被认为是葡萄糖稳态的关键调节因子^[21]。图 5 显示,与正常对照 NC 组相比,DC 组 T2DM 模型大鼠的肝脏 TGR5 mRNA 的水平显著降低($P<0.01$),经茶多糖干预后,TGR5 mRNA 的表达水平均有所回升,显示出潜在的抗炎作用,其中 TP 组的提升幅度最高($P<0.05$)。

2.4 大鼠胰腺 FXR、TGR5 mRNA 的表达

胰岛作为糖代谢调控的重要器官,也存在 FXR、TGR5 受体。通过肝脏 mRNA 表达水平的分析,发现胆汁酸受体在茶多糖的干预下有被激活的可能,所以进一步分析胆汁酸受体在胰腺的表达情况。由图 6 可知,与 NC 组相比,FXR、TGR5 在 DC 组的 mRNA 表达水平均下调($P<0.05$);经茶多糖干预后,表达水平有不同程度的提高;其中 LP、TP 组显著回升($P<0.05$),HP 组则变化不显著。

2.5 结肠 GLP-1 的表达

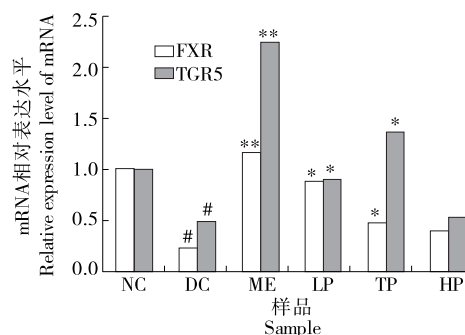
研究^[22]发现, GLP-1 对 T2DM 有良好的调控作用,



##表示DC组与NC组之间差异极显著($P<0.01$);*表示茶多糖组与DC组之间差异显著($P<0.05$)

图5 茶多糖对大鼠肝脏FXR、TGR5 mRNA水平的影响
Figure 5 Effects of tea polysaccharide on FXR & TGR5 mRNA levels in rat liver

GLP-1能刺激胰岛素、抑制胰高血糖素的分泌、减缓胃排空。24例大鼠结肠组织样本,提取蛋白后,Western Blot检测GLP-1表达水平,结果如图7所示,从趋势上看,各組间GLP-1表达无显著性差异。由肠道L细胞分泌的GLP-1



#表示DC组与NC组之间差异显著($P<0.05$);*表示ME、茶多糖组与DC组之间差异显著($P<0.05$);**表示ME、茶多糖组差异极显著($P<0.01$)

图6 茶多糖对大鼠胰腺FXR、TGR5 mRNA水平的影响
Figure 6 Effects of tea polysaccharide on FXR & TGR5 mRNA levels in rat pancreas

是通过激活TGR5启动表达的,而TGR5最强大的配体是次级胆汁酸DCA和LCA。茶多糖干预后次级胆汁酸浓度降低,可能对其激活产生影响。

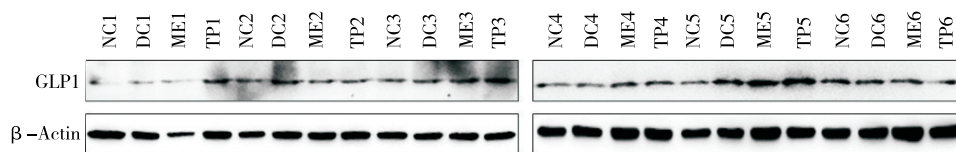


图7 Western Blot检测GLP-1

Figure 7 GLP-1 detection by Western Blot

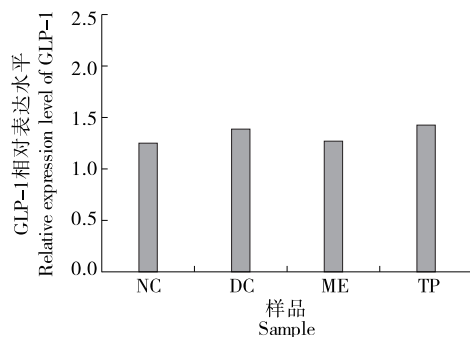


图8 灰度统计(GLP-1)

Figure 8 Grey-scale statistics (GLP-1)

3 结论

体外试验发现,茶多糖与胆酸盐结合30 min达到吸附平衡,其中与甘氨酸胆酸钠的结合能力最强。动物试验发现,饲喂茶多糖改变了大鼠盲肠内容物中胆汁酸的构成,抑制了初级胆汁酸向次级胆汁酸的转化,主要表现为初级胆汁酸中鹅去氧胆酸水平的增加,以及次级胆汁酸脱氧胆酸、石胆酸水平的降低,表明茶多糖的干预能促进胆固醇、胆汁酸的排泄。肝脏、胰腺FXR、TGR5 mRNA表

达上调,推测茶多糖可能具有通过胆汁酸—胆汁酸受体途径发挥辅助降血糖作用的功效。综上,茶多糖干预可改变大鼠初级胆汁酸/次级胆汁酸的比率,而疏水性更高的次级胆汁酸不仅更具细胞毒性、在肠肝循环中吸收性也更差。

参考文献

- [1] WAHLSTRÖM A, SAYIN S I, MARSCHALL H U, et al. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism[J]. Cell Metabolism, 2016, 24(1): 41-50.
- [2] JOYCE S A, MACSHARRY J, CASEY P G, et al. Regulation of host weight gain and lipid metabolism by bacterial bile acid modification in the gut[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(20): 7 421-7 426.
- [3] PUSHPASS R A, ALZOUFAIRI S, JACKSON K G, et al. Circulating bile acids as a link between the gut microbiota and cardiovascular health: impact of prebiotics, probiotics and polyphenol-rich foods[J]. Nutrition Research Reviews, 2022, 35 (2): 161-180.
- [4] 石玉涛,李照莹,周巧芳,等.武夷岩茶副产品黄片再加工工

- 艺优化[J]. 武夷学院学报, 2018, 37(9): 17-21.
- SHI Y T, LI Z Y, ZHOU Q F, et al. Optimization of the reprocessing technology for byproduct of Wuyi rock-essence tea [J]. Journal of Wuyi University, 2018, 37(9): 17-21.
- [5] WU Z, ZENG W Z, ZHANG X, et al. Characterization of acidic tea polysaccharides from yellow leaves of Wuyi rock tea and their hypoglycemic activity via intestinal flora regulation in rats [J]. Foods, 2022, 11(4): 617-647.
- [6] LIU X X, ZHANG Y H, LI W H, et al. Fucoidan ameliorated dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by modulating gut microbiota and bile acid metabolism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(47): 14 864-14 876.
- [7] 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]. Nature Communication, 2019, 10(1): 1-17.
- [8] 代丽凤, 蒋洁琳, 官兴丽, 等. 茶褐素理化性质及生物学活性研究进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(6): 227-233, 240.
- DAI L F, JIANG J L, GUAN X L, et al. Research progress on physicochemical properties and biological activity of theabrownin[J]. Food & Machinery, 2023, 39(6): 227-233, 240.
- [9] XIAO Y, LI M Y, WU Y P, et al. Structural characteristics and hypolipidemic activity of theabrownins from dark tea fermented by single species *eurolium cristatum* PW-1[J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 204.
- [10] 纪秀凤, 刘海春, 吕长鑫, 等. 红树莓籽原花青素提取及其结合胆酸盐能力评价[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(7): 90-97.
- JI X F, LIU H C, LU C X, et al. Extraction of proanthocyanidin from red raspberry seed and evaluation of its capacities of binding bile salts[J]. Food Research and Development, 2019, 40(7): 90-97.
- [11] 刘爽爽, 刘东超, 孙凡越, 等. 粗毛纤孔菌总三萜的纯化及对胆酸盐结合能力分析[J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(5): 104-113.
- LIU S S, LIU D C, SUN F Y, et al. Purification of total triterpenoids from *Inonotus hispidus* and analysis on bile salt binding ability[J]. Journal of China Agricultural University, 2020, 25(5): 104-113.
- [12] 曾桥, 韦承伯, 缙会莉, 等. 杜仲叶茯砖茶多糖提取工艺优化及抗氧化降血脂活性[J]. 食品科技, 2018, 43(8): 184-192.
- ZENG Q, WEI C B, GOU H L, et al. Optimization of the extraction process and evaluation of antioxidant activities and hypolipidemic effects of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves Fu brick tea[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(8): 184-192.
- [13] 王猛猛, 俞蕴莉, 屈昱晨, 等. LC-MS/MS测定大鼠血清中15种胆汁酸成分[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1 030-1 034.
- WANG M M, YU Y L, QU Y C, et al. Determination of fifteen bile acids concentration in rats' serum by LC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2020, 37(9): 1 030-1 034.
- [14] FENG Z Q, DOU W, ALAXI S, et al. Modified soluble dietary fiber from black bean coats with its rheological and bile acid binding properties[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 62(3): 94-101.
- [15] STORY J, KRITCHEVSKY D. Comparison of the binding of various bile acids and bile salts in vitro by several types of fiber[J]. Journal of Nutrition, 1976, 106(9): 1 292-1 294.
- [16] 华梅, 樊美玲, 卢佳希, 等. 七种药食两用中药膳食纤维体外抗氧化及胆酸盐结合能力研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 314-320.
- HUA M, FAN M L, LU J X, et al. Study on the in vitro antioxidant and bile salts binding activity of the dietary fibers from seven edible traditional Chinese medicines[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(11): 314-320.
- [17] CARIOU B, CHETIVEAUX M, ZAIR Y, et al. Fasting plasma chenodeoxycholic acid and cholic acid concentrations are inversely correlated with insulin sensitivity in adults[J]. Nutrition & Metabolism, 2011, 8(1): 48-53.
- [18] TIAN S Y, CHEN S M, PAN C X, et al. FXR: structures, biology, and drug development for NASH and fibrosis diseases [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2022, 43(5): 1 120-1 132.
- [19] ZHANG H M, WANG X, WU Z H, et al. Beneficial effect of farnesoid X receptor activation on metabolism in a diabetic rat model[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 13(3): 2 135-2 142.
- [20] EJELONU O C, ELEKOFEHINTI O O, ADANLAWO I G, et al. TGR5 potentiates GLP-1 secretion and cause pancreatic islet regeneration in response to *Tithonia diversifolia* saponin-rich extract in diabetic model mice[J]. Phytomedicine Plus, 2022, 2(1): 1-7.
- [21] HOLTER M M, CHIRIKJIAN M K, GOVANI V N, et al. TGR5 signaling in hepatic metabolic health[J]. Nutrients, 2020, 12(9): 2 598-2 612.
- [22] KOH A, VADDER D F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. Cell, 2016, 165(6): 1 322-1 345.