

# 山腊梅叶提取物对小鼠脂肪组织的干预作用

陈兰, 李广楠, 贺磊, 李晓斐, 丁虹

(武汉大学药学院药理学实验室, 湖北武汉 430071)

**摘要:** 本文探究了山腊梅叶提取物对小鼠脂肪的干预作用及其可能的作用机制。体外脂肪合酶抑制剂的筛选实验结果表明山腊梅叶的醇提取物和挥发油对该酶有抑制作用。在体内试验中, 将小鼠分为正常组, 能量限制组, 醇提高剂量组, 醇提低剂量组以及挥发油组, 每隔两天记录一次体重和进食量。饲养 30 d 后处死小鼠, 测量一系列肥胖指标, 计算 Lee's 指数, 脂肪指数和各脏器指数, 脂肪组织 HE 染色。结果表明, 山腊梅醇提取物和挥发油对小鼠脂肪的合成有干预作用, 并且其可能机制是抑制脂肪合酶的活性, 减少脂肪堆积。醇提高剂量组和挥发油组的 Lee's 指数均显著低于正常组 (分别下降了 7.19%、6.96%), 总脂肪指数有下降趋势 (分别下降了 42.04%、36.73%), 并显著降低血清甘油三酯 (分别下降 41.34%、32.96%) 和总胆固醇 (分别下降 20.83%、14.58%) 含量。此外, 脏器指数的结果表明山腊梅叶醇提取物对小鼠无明显毒性。

**关键词:** 山腊梅叶; 提取物; 小鼠; 脂肪; 减肥; 降脂

文章编号: 1673-9078(2014)6-13-17

## Intervention Effect of *Chimonanthus nitens* Oliv. Leaf Extract on the Adipose Tissue of Mice

CHEN Lan, LI Guang-nan, HE Lei, LI Xiao-fei, DING Hong

(Department of Pharmacology, Pharmacy College of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** The *in vitro* screening experiment found that *Chimonanthus nitens* Oliv. leaf alcohol extract and volatile oil significantly inhibited the activity of fatty acid synthase (FAS). During the *in vivo* experiments, mice were divided into normal group, intake-control group, high-dose of alcohol extract group, low-dose of alcohol extract group and volatile oil group whose weight and food intake were recorded every two days. The mice were killed after 30 days and a series of obesity indicators were measured to calculate Lee's index, fat index and index of each viscera. The fat in mice was studied through hematoxylin-eosin staining. Results indicated that *Chimonanthus nitens* Oliv. leaf extract affected the synthesis of body fat, which probably due to the inhibition of FAS and interference in the accumulation of fat. High-dose of alcohol extract group and volatile oil group greatly decreased by 7.19% and 6.96% respectively compared with normal group, fat index decreased by 42.04% and 36.73% respectively, TG decreased by 41.34% and 32.96% respectively, and TC decreased by 20.83% and 14.58% respectively. Moreover, the visceral index showed that the extracts had no significant toxic effects to the mice.

**Key words:** *Chimonanthus nitens* Oliv. leaf; extract; mice; fat; weight control; lipid-lowering

山腊梅 (*Chimonanthus nitens* Oliv.), 属蕨类植物门, 蕨纲, 真蕨目, 蜡梅科, 蜡梅属。国内分布在江苏省, 安徽省, 浙江省, 江西省, 福建省, 湖北省, 湖南省, 广西壮族自治区, 贵州省, 云南省。多生长于沟边, 山坡, 山坡林缘, 山坡路边灌丛, 山坡疏林中, 石灰岩山坡, 疏林中, 阴地。山腊梅以叶入药, 微苦、辛、凉。近十年来的研究表明, 山腊梅有消毒抑菌<sup>[1]</sup>、镇痛、镇咳、祛痰<sup>[2]</sup>、抗炎解热<sup>[3]</sup>等药理作用。且有研

收稿日期: 2014-01-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273523)

作者简介: 陈兰 (1993-), 女, 本科生, 研究方向为药理学; 李广楠、贺磊为并列第一作者

通讯作者: 丁虹 (1964-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为药理学

究表明山腊梅挥发油、石油醚和正丁醇提取液可减缓小鼠的体重增长、抑制食欲和降低体脂<sup>[4]</sup>。

肥胖病, 是人体体重超常的疾病, 是当今社会的常见和多发性疾病, 也是世界卫生组织确定的疑难性疾病之一, 在我国城市有 10%~15% 左右的发病率, 而且有逐年增高和年轻化倾向。从专业数据库中整理的 2008 年 1 月到 2013 年 4 月的所有有关肥胖的调查发现, 在拉丁美洲, 5 岁以下孩子中有肥胖趋势的占了 7.1%, 5~11 岁孩子的比例是 18.9%~36.9%, 12~19 岁青少年的比例是 16.6%~35.8%<sup>[5]</sup>。与肥胖相关联的疾病包括 II 型糖尿病、脂肪肝、高血压<sup>[6]</sup>等。因此, 控制肥胖人体重的增长、降低体脂和降低血清甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白是非常迫切的

必要的。

目前关于肥胖的治疗仍没有有效且副作用少的药物,如西布曲明会增大心脑血管疾病发生率<sup>[7]</sup>,减少肠道中脂质吸收的药物则会导致脂溶性维生素的吸收障碍,抑制食欲的药物又易导致营养失衡。因而目前最安全的减肥方式是控制饮食和加强锻炼<sup>[8]</sup>。本实验通过观察山腊梅叶提取物对小鼠体脂的干预和血脂含量的影响,探讨传统药用植物山腊梅作为减肥茶的效果,并进行了体外脂肪合酶抑制实验,初步探究其降低体脂的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

昆明鼠 40 只,均为雄鼠,体重 18~22 g,由武汉大学实验动物中心提供,许可证号 scxk(鄂)-2008-0004。

### 1.2 供试品与试剂

山腊梅叶,购于江苏婺源县;乙醇,武汉欣申试化工有限公司;甘油三酯含量测定试剂盒,上海名典生物工程有限公司;总胆固醇含量测定试剂盒,上海名典生物工程有限公司;高密度脂蛋白含量测定试剂盒,上海名典生物工程有限公司;NADPH、乙二胺四乙酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、碳酸氢钾、 $\beta$ -巯基乙醇,以上试剂均由 sigma 公司分装提供。

### 1.3 仪器

离心机,飞鸽牌系列;分析天平(HANGPING FA1004);超声仪,厦门华益通超声设备有限公司;恒温水浴装置(TB-85型),日本岛津公司;酶标仪(KHB ST-360),上海科华。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 山腊梅叶醇提液及其挥发油的制备

##### 1.4.1.1 山腊梅醇提液制备方法

山腊梅叶用粉碎机粉碎,称取 100 g,加入 300 mL 的 95%乙醇,80 °C 回流提取 2 h,抽滤,留下滤渣,再加入 300 mL 的 95%乙醇,80 °C 回流提取 2 h,抽滤,合并再次滤液,用旋转蒸发器浓缩至固体浸膏。用 5 mL 蒸馏水溶解浸膏,得到 5 g 生药量/mL 的山腊梅醇提液。

##### 1.4.1.2 山腊梅叶挥发油的制备方法

按山腊梅叶:蒸馏水=1:5 混合,搅拌均匀,使药

物充分润湿,浸泡一段时间,用挥发油提取器回流 2 h,所得挥发油用蒸馏水定容至 0.4 g 生药/mL,加入 5% 的吐温-80 助溶,用超声仪超声 20 min 得乳白色均一液体,即为山腊梅挥发油提取液。

#### 1.4.2 山腊梅叶提取物的体外抑制脂肪合酶实验

##### 1.4.2.1 粗酶液的制备

取大鼠肝脏,按 1:1.8 比例加入抽提缓冲液,冰浴匀浆至液体均匀,无大块组织,转入离心管内,4 °C 离心,10000 g,30 min。离心后液体分为三层,上层为脂质,中层为清液,下层为组织碎片沉淀。小心移取中层清液于另一干净离心管中,4 °C 离心,10000 g,30 min。离心后小心吸取中层清液,分装在 1.5 mL EP 管中,置于 -20 °C 备用。抽提缓冲液为 0.1 M 磷酸钾缓冲液 pH 7.8, 0.07 M  $\text{KHCO}_3$ , 1m MEDTA, 1 mM 巯基乙醇。

##### 1.4.2.2 全反应活性测定(快结合抑制)

测定方法参照文献方法<sup>[9]</sup>制定。具体步骤如下:以 6  $\mu\text{mol/L}$  乙酰辅酶 A, 12  $\mu\text{mol/L}$  丙二酰辅酶 A, 40  $\mu\text{mol/L}$  NADPH 为底物,反应体系为含有 1 mmol/L 的 EDTA, 1 mmol/L 的  $\beta$ -巯基乙醇的 0.1 mol/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.0) 缓冲液。将山腊梅醇提浸膏用 0.1 mol/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.0) 缓冲液配成 900 mg/L 的溶液,分别稀释成不同浓度(0、7.5、15、30、100  $\mu\text{g/mL}$ ),将 0.4 g 生药/mL 山腊梅挥发油用 0.1 mol/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.0) 缓冲液稀释至不同浓度(10、40、100 mg 生药/mL),37 °C 温育,加入底物和 40  $\mu\text{g}$  的酶液后,再加入 NADPH 启动反应。混匀后立即用紫外-可见分光光度计监测 340 nm 波长下吸光度的变化,以 1 min 内吸光度的变化反应脂肪合酶的活性,反应总体积 2 mL。

#### 1.4.3 小鼠体内实验

##### 1.4.3.1 动物分组与饲养

40 只实验小鼠随机分为正常组,能量限制组,醇提液高浓度组(5 g/mL),醇提液低浓度组(1 g/mL),挥发油组(0.4 g/mL),每组各 8 只。适应性饲养 9 d,之后开始按生药量 50 g/kg 灌胃给药。正常组和能量限制组给生理盐水,其余三组给各受试药。所有小鼠同室分笼饲养,除能量限制组的食物量有控制,其余组均正常饮食、进水,室温(25 $\pm$ 2) °C。每隔一天进行体重和食量的测量和记录。饲养 30 d,于最后一次灌胃后 24 h 后处死小鼠,进行眼球取血,每只小鼠约取 1 mL 血液,常温 4000 r/min 离心 10 min,留取上清液,于 4 °C 冰箱保存备用。每只小鼠处死测量体长,

计算 Lee's 指数, 解剖小鼠, 称量各脏器及内脏脂肪、皮下脂肪质量, 计算小鼠各脏器指数, 以及总脂肪质量, 计算小鼠总脂肪指数。

$$\text{进食量指数} = \text{进食量 (g)} / \text{体重 (g)} \times 10$$

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量 (g)} / \text{体重 (g)} \times 100\%$$

$$\text{Lee's 指数} = \sqrt[3]{(\text{体重 (g)} \times 1000) / \text{体长 (cm)}}$$

$$\text{脂肪指数} = \text{脂肪质量 (g)} / \text{体重 (g)} \times 100\%$$

### 1.4.3.2 生化指标的测定

按照试剂盒的说明书测定血清中甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白的含量。

### 1.4.3.3 脂肪组织切片观察

取部分小鼠腹部脂肪组织于 4% 的多聚甲醛中固定, 并不时摇动, 使脂肪固定完全、充分。石蜡包埋切片, HE 染色, 光学显微镜下观察脂肪细胞形态。用 IPP 软件计算脂肪细胞面积, 单位为像素。

### 1.4.4 数据处理

数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理和显著性分析, 数据结果以平均值±标准差 (x±s) 表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脂肪合酶反应活性测定

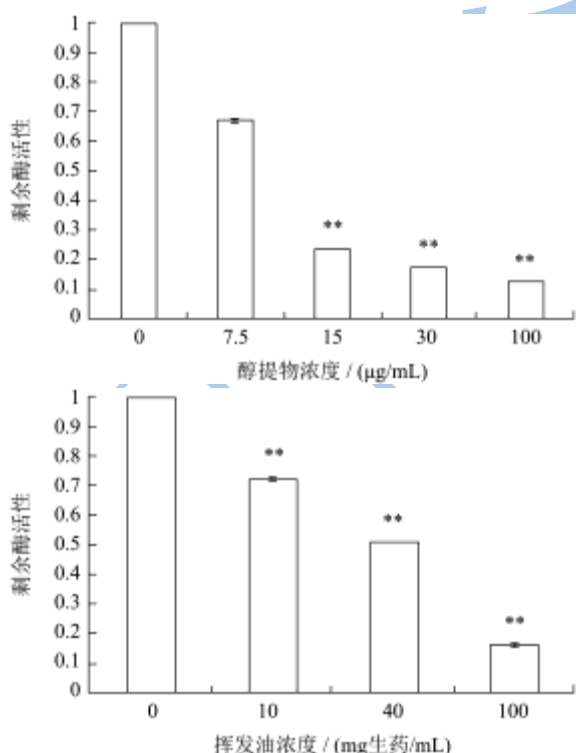


图 1 山腊梅提取物对脂肪合酶活性的影响 (n=3)

Fig.1 The effect of *Chimonanthus nitens Oliv.* leaf extract on the activity of FAS

注: \*\*P<0.01。

如图 1 所示, 山腊梅醇提取物与挥发油对 FAS 活性均有快速抑制作用, 抑制能力呈现出剂量性。醇提取物浓度大于等于 15 µg/mL 时, 酶活性有十分显著的下降; 给药浓度达到 15 µg/mL 时, 即可抑制 50% 以上的酶活性, 剂量为 150 µg/mL 时, 酶活性仅为空白对照组的 6.9%, 几乎完全抑制了酶活性。挥发油浓度为大于等于 10 mg 生药/mL 时, 酶活性有十分显著的下降; 浓度达到 40 mg 生药/mL 时, 能够抑制 50% 的酶活性。

### 2.2 山腊梅叶提取物干预脂肪实验检测指标

#### 2.2.1 进食量

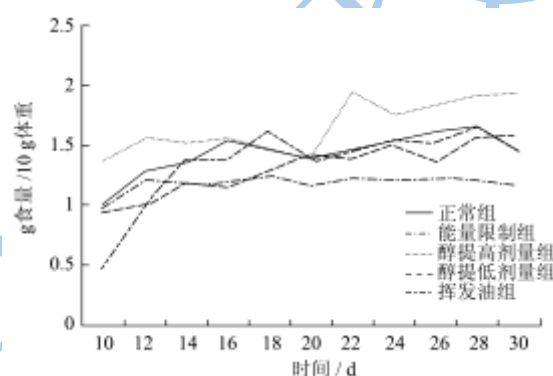


图 2 各组小鼠进食量变化

Fig.2 Changes in food intake of mice in each group

实验期间每组小鼠平均进食量变化如图 2 所示。正常组与三组给药组进食量均随时间缓慢增加, 但是无显著差异, 说明, 山腊梅醇提取物和挥发油对小鼠食欲没有显著影响。

#### 2.2.2 Lee's 指数、总脂肪指数

实验第 30 d, 称量小鼠的体重、总脂肪质量和测量小鼠的体长, 计算 Lee's 指数和总脂肪系数, 反映小鼠的肥胖程度。由表 1 可知能量限制组和挥发油组 (0.4 g/mL) 的 Lee's 指数均低于正常组, 且有十分显著的差异 (P<0.01), 均下降了 6.96%。醇提高剂量组 (5 g/mL) 的 Lee's 指数也低于正常组, 有显著差异 (P<0.05), 下降了 7.19%。醇提低剂量组 (1 g/mL) 有降低 Lee's 指数的趋势。说明 5 g/mL 的醇提取物及 0.4 g/mL 的挥发油对降低小鼠肥胖程度有显著的效果。能量限制组小鼠的体重下降了 19.35%, 有明显差异 (P<0.05), 给药组下降趋势不明显, 但是各给药组和能量限制组的总脂肪系数与正常组相比均有下降的趋势, 醇提高剂量组、醇提低剂量组、挥发油组分别下降了 42.04%、16.15%、36.73%, 能量限制组与正常组比下降了 28.76%。说明醇提取物和挥发油干预了体脂, 但是对肌肉无影响, 因此对体重没有显著影响。

#### 2.2.3 脏器指数

由图 3 可知, 能量限制组小鼠的脑与肝脏质量与正常组有十分显著的差异 ( $P < 0.01$ ), 脑质量偏大, 肝脏偏小. 给药组的脏器与正常组相比均无显著差异,

说明山腊梅醇提取物与挥发油对小鼠脏器无不明显不良影响。

表 1 实验末各组小鼠 Lee's 指数与总脂肪指数情况 (n=8)

Table 1 Lee's index and fat index of mice in each group at the end of the experiment

组别	体重/g	体长/cm	Lee's 指数	总脂肪/g	总脂肪指数/( $\times 10^3$ )
正常组	37.21 $\pm$ 3.95	7.76 $\pm$ 0.52	4.31 $\pm$ 0.20	1.66 $\pm$ 0.78	4.52 $\pm$ 2.24
能量限制组	30.01 $\pm$ 3.16*	7.74 $\pm$ 0.18	4.01 $\pm$ 0.09**	0.97 $\pm$ 0.69	3.22 $\pm$ 2.28
醇提高剂量组	35.85 $\pm$ 6.85	8.2 $\pm$ 0.26	4.00 $\pm$ 0.18*	0.74 $\pm$ 0.74	2.62 $\pm$ 1.44
醇提低剂量组	35.97 $\pm$ 3.29	8.07 $\pm$ 0.34	4.09 $\pm$ 0.22	1.37 $\pm$ 0.72	3.79 $\pm$ 1.95
挥发油组	37.68 $\pm$ 2.78	8.36 $\pm$ 0.18	4.01 $\pm$ 0.08**	1.10 $\pm$ 0.70	2.86 $\pm$ 1.69

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

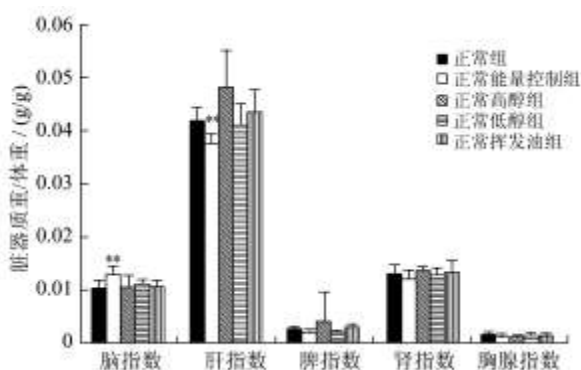


图 3 各组小鼠脏器指数变化

Fig.3 Changes in viscera index of mice in each group

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

### 2.2.4 血清 TC、TG、HDL-C 含量

表 2 各组小鼠血脂水平 (n=8)

Table 2 The blood-lipid level of the mice in each group

组别	TG/(mmol/L)	TC/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)
正常组	1.79 $\pm$ 0.15	3.36 $\pm$ 0.08	1.08 $\pm$ 0.09
能量限制组	0.41 $\pm$ 0.09**	2.49 $\pm$ 0.07**	0.80 $\pm$ 0.01**
醇提高剂量组	1.05 $\pm$ 0.06*	2.66 $\pm$ 0.05**	0.86 $\pm$ 0.02*
醇提低剂量组	1.17 $\pm$ 0.13	2.79 $\pm$ 0.11**	0.98 $\pm$ 0.06
挥发油组	1.20 $\pm$ 0.05*	2.87 $\pm$ 0.05**	0.92 $\pm$ 0.03

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

由表 2 可知, 与正常组相比, 能量限制组与三组给药组的总胆固醇含量与正常组相比均有下降, 且有十分显著的差异 ( $P < 0.01$ ), 能量限制组和三组给药组分别下降了 25.89%、20.83%、16.96%、14.58%。能量限制组甘油三酯的含量与正常组比有十分显著的差异 ( $P < 0.01$ ), 下降了 77.09%, 醇提高剂量组与挥发油组与正常组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 分别下降了 41.34%和 32.96%。醇提低剂量组有减少甘油三酯的趋势。能量限制组的小鼠高密度脂蛋白下降十分显著, 醇提高剂量组下降较显著, 醇提低剂量组与挥发油组没有明显差异。

### 2.2.5 脂肪细胞大小与病理学观测

表 3 各组小鼠脂肪细胞面积 (n=8)

Table 3 The area of the fat of mice in each group

组别	面积/像素
正常组	165559.36 $\pm$ 46765.27
能量限制组	99904.69 $\pm$ 33321.49**
醇提高剂量组	69439.37 $\pm$ 27434.66**
醇提低剂量组	92171.91 $\pm$ 31368.21
挥发油组	71683.61 $\pm$ 40898.26**

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

由表 3 可知, 与正常组比较, 能量限制组, 醇提高剂量组与挥发油组的脂肪细胞面积均有十分显著的差异 ( $P < 0.01$ ), 分别下降了 39.66%、58.06%、56.70%。醇提低剂量组有下降趋势, 下降了 44.33%。说明山腊梅醇提取物与挥发油有抑制脂肪堆积, 减小脂肪细胞大小的作用。

## 3 结论

本实验结果表明, 山腊梅醇提取物和挥发油对小鼠脂肪的合成有干预作用, 且对肌肉和体重无明显影响。醇提高剂量组和挥发油组的 Lee's 指数均显著低于正常组 (分别下降了 7.19%、6.96%), 体重无明显下降, 总脂肪指数有下降趋势 (分别下降了 42.04%、36.73%), 并显著降低血清甘油三酯 (分别下降 41.34%、32.96%) 和总胆固醇 (分别下降 20.83%、14.58%) 含量, 对高密度脂蛋白含量的影响比控制食量的组小。HE 脂肪组织染色实验结果表明受试药可显著减少脂肪堆积, 减小脂肪细胞面积。FAS 抑制实验的结果表明山腊梅提取物干预脂肪合成的一条途径是抑制脂肪合酶的活性, 从而抑制甘油三酯的合成, 15 mg/L 醇提物和 40 mg 生药/mL 挥发油即可抑制 50% 以上的酶活性。对山腊梅醇提取物及挥发油的进一步分离分析, 确定其有效成分有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] 刁军成,伍学洲,丁舸.山腊梅叶消毒抑菌的实验研究[J].江西中医药,2002,33(6):35  
DIAO Jun-Cheng, WU Xue-Zhou, DING Ge. Research into the effects of antiseptics of *Chimonanthus nitens Oliv.* Leaves [J]. Jiangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2002, 33(6): 35
- [2] 李晓宇,何明,李萍,等.山腊梅叶镇痛、镇咳、祛痰作用的实验研究[J].中国中医药科技,1997,4(6):366  
LI Xiao-Yu, HE Ming, LI Ping, et al. Research into the effects of anti-pain, relieving cough and eliminating phlegm of *Chimonanthus nitens Oliv.* Leaves [J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 1997, 4(6): 366
- [3] 毕殿洲主编.药剂学[M].第4版.北京:人民卫生出版社, 1999: 328  
BI Dian-Zhou. Pharmaceutics [M]. 4<sup>th</sup> Edition. Bei Jing: People's Medical Publishing House, 1999: 328
- [4] 陈鹭颖,刘锡钧.山腊梅对小鼠的减肥作用[J].海峡药学,2002,14(5):30-33  
CHEN Lu-Ying, LIU Xi-Jun. Effect of *Chimonanthus nitens Oliv.* on reducing weight in mice [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2002, 14(5): 30-33
- [5] Juan ángel Rivera, Teresita González de Cossío, Lilia Susana Pedraza, et al. Childhood and adolescent overweight and obesity in Latin America: a systematic review [J]. Lancet Diabetes Endocrinol. [December 13, 2013] <http://dx.doi.org/10.1016/>
- [6] Kyriakoula Marinou, Dimitris Tousoulis, Alexio S Antonopoulos. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification [J]. International Journal of Cardiology, 2010, 138(1): 3-8
- [7] W Philip T James, Ian D Caterson, Walmir Coutinho. Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects [J]. The New England Journal of Medicine, 2010, 363(10): 905-917
- [8] Alison E Field, Jess Haines, Bernard Rosner. Weight-control behaviors and subsequent weight change among adolescents and young adult females [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2010, 91(1): 147-153
- [9] FEI Yu, JING Gao, YONG Zeng. Inhibition of Coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 119(2): 252-258