

麦角甾醇酯的酶促合成及对非酒精性脂肪肝的预防作用

何文森^{1*}, 李洁¹, 李志烁¹, 赵丽颖¹, 崔丹丹¹, 黎玲玲¹, 孙玉莹¹, 巩发永²

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江江苏 212013)

(2. 攀西特色作物研究与利用四川省重点实验室, 西昌四川 615013)

摘要: 探究了麦角甾醇亚油酸酯(简称麦角甾醇酯)的酶促合成及对非酒精性脂肪肝的预防作用。将30只雄性昆明小鼠分为四组:空白组($n=6$)、高脂组($n=8$)、麦角甾醇组($n=8$)和麦角甾醇亚油酸酯组($n=8$),持续喂养6周。测定血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平,计算LDL-C/HDL-C比值,检测肝脏和粪便脂质水平,并分析肝脏脂肪变性程度。结果显示,以*Candida* sp. 99-125脂肪酶为催化剂可以成功合成麦角甾醇亚油酸酯。麦角甾醇酯使得肝脏总脂肪酸含量降低35.3%($P<0.05$),可以有效预防高脂膳食诱导肝脏脂肪变性,并导致粪便总脂肪酸水平增加74.8%($P<0.05$)。同时,麦角甾醇酯降低了血浆LDL-C水平和LDL-C/HDL-C比值分别为24.3%($P<0.05$)和36.5%($P<0.05$),引起血浆HDL-C水平提高52.0%($P<0.05$)。以上结果表明,麦角甾醇酯能够有效预防高脂膳食诱导的非酒精性脂肪肝。该文为非酒精性脂肪肝的预防提供了一种新的干预策略。

关键词: 麦角甾醇; 亚油酸; 脂肪酶; 麦角甾醇亚油酸酯; 非酒精性脂肪肝

文章编号: 1673-9078(2024)09-1-11

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.1060

Lipase-catalyzed Synthesis of Ergosterol Ester and Its Preventive Effect on Nonalcoholic Fatty Liver Disease

HE Wensen^{1*}, LI Jie, LI Zhishuo¹, ZHAO Liying¹, CUI Dandan¹, LI Lingling¹, SUN Yuying¹, GONG Fayong²

(1.School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(2.Panxi Crops Research and Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Xichang 615013, China)

Abstract: The lipase-catalyzed synthesis of ergosterol linoleate was explored, along with its potential role in mitigating non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Thirty male Kunming mice were divided into four groups: blank ($n=6$), high-fat ($n=8$), ergosterol ($n=8$), and ergosterol linoleate ($n=8$). The mice were fed for six weeks. Plasma levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were determined. LDL-C/HDL-C ratio was calculated, and lipid levels in the liver and feces were measured, along with the degree of liver fat degeneration. The results showed that ergosterol linoleate could be successfully synthesized using

引文格式:

何文森,李洁,李志烁,等.麦角甾醇酯的酶促合成及对非酒精性脂肪肝的预防作用[J].现代食品科技,2024,40(9):1-11.

HE Wensen, LI Jie, LI Zhishuo, et al. Lipase-catalyzed synthesis of ergosterol ester and its preventive effect on nonalcoholic fatty liver disease [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 1-11.

收稿日期: 2023-09-06

基金项目: 新疆自治区区域协同创新专项-科技援疆计划(2022E02094);攀西特色作物研究与利用四川省重点实验室开放课题(SZKF2211);

食品营养与安全湖北省重点实验室开放基金(FN S-H BKL2023A01);江苏大学2023年校级大学生创新训练计划项目(202310299647X)

作者简介: 何文森(1985-),男,博士,副教授,研究方向:油脂加工与脂质营养, E-mail: wshe2013@163.com

Candida sp. 99-125 lipase as a catalyst. Ergosterol ester reduced the total fatty acid content in the liver by 35.3% ($P<0.05$), effectively preventing high-fat diet-induced liver fat degeneration, and increased fecal total fatty acid levels by 74.8% ($P<0.05$). Meanwhile, ergosterol ester decreased plasma LDL-C levels and LDL-C/HDL-C ratio by 24.3% ($P<0.05$) and 36.5% ($P<0.05$), respectively, and increased plasma HDL-C levels by 52% ($P<0.05$). These results indicate that ergosterol ester can effectively prevent high-fat diet-induced NAFLD. This study provides a new dietary intervention strategy for the prevention of NAFLD.

Key words: ergosterol; linoleic acid; lipase; ergosterol linoleate; nonalcohol fatty liver disease

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是一种最常见的慢性肝病, 其特征是非酒精因素导致肝细胞中脂肪的积聚超过 5%, 主要特征表现为肝脏脂质积聚以及由氧化应激和炎症引起的肝脏损伤。据统计, 2017 年全球 NAFLD 的发病率约为 24%, 在中国约为 20%^[1]。如果不加以控制, NAFLD 可能会进一步发展为脂肪性肝炎、纤维化、肝硬化, 严重情况下还可能导致肝癌^[1]。因此, 预防和控制 NAFLD 的发生成为当务之急。目前, 临床上尚无治疗 NAFLD 的特效药物, 现阶段的治疗方案主要为调脂和抗氧化治疗、改变饮食习惯、加强锻炼等。近年来, 大多研究集中筛选具有降脂、抗氧化等活性的天然成分来预防 NAFLD。

食物中具有降脂功效的天然成分可以预防脂质在肝脏中的积聚, 从而防止 NAFLD 的发生。植物甾醇是一类植物来源的甾醇, 其中谷物、蔬菜、水果中含量最为丰富。谷甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇和菜油甾醇是主要的植物甾醇。最新研究表明, 植物甾醇及其酯类在预防和改善高脂膳食诱导的 NAFLD 发生和发展方面具有良好效果^[2,3]。麦角甾醇, 也称为麦角固醇, 是一种存在于平菇、金针菇、香菇、茶树菇^[4-6]等食用菌中的天然活性成分, 其结构类似于植物甾醇。作为真菌中主要的甾醇成分, 麦角甾醇约占真菌甾醇总量的 80%^[7]。研究发现, 麦角甾醇具有良好的降脂、抗肿瘤、抗氧化、抗炎等生理功效^[8-10], 并且能够竞争性地抑制胆固醇在肠道的吸收^[11-13]。前期研究发现, 麦角甾醇可以显著降低高脂膳食引起的小鼠肝脏中的胆固醇和脂肪酸含量^[14], 因此理论上在预防 NAFLD 方面具有一定潜力。然而, 由于麦角甾醇的脂溶性差, 难以在油脂等食品体系中应用。从理论上讲, 利用天然脂溶性成分对其进行分子修饰, 合成相应的麦角甾醇酯可以克服这个问题。前期本研究团队以 α -亚麻酸为酰基供体, 利用 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶为生物催化剂首次合成了麦角甾醇亚麻酸酯^[15]。该方法具

有转化率高, 合成产物具有脂溶性好等优点。亚油酸是一种存在于芝麻、甜杏仁、葡萄籽等植物种子的必需脂肪酸^[16], 具有预防脂质代谢紊乱、降胆固醇等生物活性^[17,18]。虽然亚油酸与 α -亚麻酸同为必需脂肪酸, 但二者在缓解脂代谢紊乱方面的效果不同。麦角甾醇与亚油酸结合的产物麦角甾醇亚油酸酯对由脂质代谢异常引起的非酒精性脂肪肝的作用尚不清楚。截止目前, 尚无合成麦角甾醇亚油酸酯的报道出现。

因此, 本研究首先以亚油酸为疏水修饰剂, 利用非水相脂肪酶催化技术合成了麦角甾醇亚油酸酯。然后, 采用雄性昆明小鼠作为实验动物, 通过膳食干预研究麦角甾醇亚油酸酯对高脂膳食诱导的肝脏脂质积聚、肝脏脂肪变性、血浆脂质以及粪便脂质变化的影响, 进一步明确麦角甾醇亚油酸酯对 NAFLD 的保护作用, 为开发应用麦角甾醇及其酯类提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

麦角甾醇 (>95%), 西安百川生物科技有限公司; 亚油酸、异氟烷和肝素钠, 百灵威科技有限公司; 三氟化硼甲醇溶液和十七烷酸标准品, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 浓盐酸、甲酸、无水乙醇、正己烷、甲苯、三氯甲烷、氯化钠、氢氧化钾, 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇 (色谱级), 美国 TEDIA 公司; 总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

LC-20AD 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; ZAM 4000 蒸发光散射检测器, 德国珊贝克公司; DL-5-B 离心机, 上海安亭科学仪器厂; B040234 全自动酶标仪, Thermo 公司。

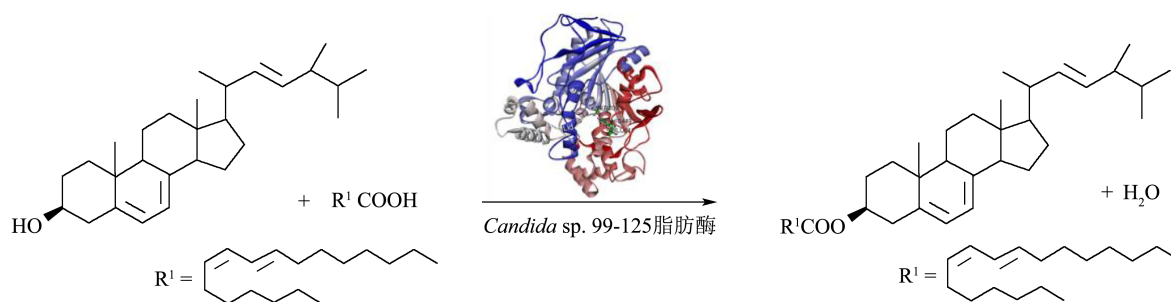


图1 脂肪酶催化麦角甾醇亚油酸酯合成反应式

Fig.1 Reaction formula for lipase-catalyzed synthesis of ergosterol linoleate

1.3 试验方法

1.3.1 脂肪酶催化合成麦角甾醇酯

在前期研究中, 成功利用 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶合成了麦角甾醇亚油酸酯。因考虑到亚油酸与亚油酸结构相似, 二者与麦角甾醇的合成规律相近。因此, 本文参考了前期研究中最优的酶法合成工艺^[15], 并将工艺参数扩大至 25 倍以制备大量的目标产物。具体的反应式如图 1 所示, 制备过程及参数如下: 首先将麦角甾醇 (7.4 g, 18.7 mmol)、亚油酸 (6.5 g, 23.2 mmol)、*Candida* sp. 99-125 脂肪酶 (10 g)、3Å 分子筛和 250 mL 异辛烷依次加入 500 mL 反应瓶中。然后, 经过超声预处理 10 min 后, 将反应瓶置于 45 °C、150 r/min 气浴振荡器中反应 12 h。

1.3.2 麦角甾醇酯的萃取分离

反应液经旋转蒸发后于无水乙醇中充分溶解, 置于 -20 °C 冰箱处理 6 h, 抽滤得析出物。将析出物重溶于正己烷中, 置于 -20 °C 冰箱静置 6 h, 抽滤, 收集上清液经旋转蒸发得麦角甾醇亚油酸酯。

1.3.3 麦角甾醇酯的定量分析

取 100 μL 反应液溶于 2 mL 无水乙醇: 正己烷 (1:1, V/V) 稀释, 经 0.45 μm 滤膜过滤后装入液相小瓶。样品的定量分析在 LC-20AD 型高效液相色谱仪上完成。色谱柱为 Symmetry C18 色谱柱 (5 μm, 4.6 mm×150 mm, Waters), 流动相为甲醇: 异丙醇: 正己烷 (7.8:1.1:1.1, V/V/V), 流量 1 mL/min。检测器采用 Schambeck ZAM 4000 蒸发光散射检测器, 漂移管温度为 50 °C, 氮气为载气, 压力为 0.05 MPa。

采用归一化法进行定量计算, 具体公式如下:

$$\alpha = \frac{A_0}{A_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

α ——转化率, %;

A_0 ——麦角甾醇酯峰面积;

A_1 ——未反应麦角甾醇的峰面积。

1.3.4 麦角甾醇酯的结构表征

1.3.4.1 红外光谱分析

产物的红外光谱分析采用 Nicolet iS50 傅立叶变换红外光谱仪。制样方法: 全反射衰减法; 扫描次数: 32 次; 分辨率: 4 cm⁻¹, 扫描范围 4 000~600 cm⁻¹。

1.3.4.2 超高效液相-质谱联用分析

产物的质谱分析采用 Waters MaldiSynapt Q-ToF 质谱仪, 进样方式为直接进样, 离子源为 ESI+, 毛细管电压为 3.0 kV, 离子源温度为 100 °C, 脱溶剂温度为 400 °C, 脱溶剂气流速为 500 L/h, 锥孔电压为 80 V, 碰撞能量为 6 V, 检测器电压为 1 800 V, 质量范围为 100~1 000 m/z。

1.3.4.3 核磁共振波谱分析

将分离纯化的产物经充分真空干燥处理后, 溶于氘代氯仿进行核磁共振分析。采用瑞士 Bruker Avance II 400 MHz 核磁共振仪, 以四甲基硅烷为内标, ¹H 谱频率为 400 MHz, ¹³C 谱频率为 100 MHz, 以 CDCl₃ 为溶剂。

1.3.5 油溶性的测定

根据 He 等^[15]方法, 测定麦角甾醇和麦角甾醇亚油酸酯在葵花籽油中的溶解度。

1.3.6 动物分组与喂养

选用 30 只 SPF 级健康昆明雄性小鼠, 重约 15~17 g。小鼠由江苏大学动物实验中心提供, 其合格证编号为 NO.201913985, 生产许可证编号 SCXK (苏) 2018-0012。整个实验操作严格按照江苏大学实验动物管理和使用委员会规定执行, 许可证号为 UJS-IACUC-201828634。

将小鼠基于体质量均匀随机分为四组, 分别为空白组 (n=6)、高脂组 (n=8)、麦角甾醇组 (n=8) 和麦角甾醇亚油酸酯 (亚油酸酯) 组 (n=8)。小鼠

在 SPF 环境中喂养, 在 12 h 光照-12 h 黑暗下循环, 其中温度为 23~27 °C, 相对湿度为 45%~55%, 可以自由饮水, 且每天更换新鲜饲料。经过一周的基础饲料适应喂养后, 空白组喂食低脂饲料, 高脂组喂食高脂饲料, 麦角甾醇组和亚油酸酯组分别饲喂添加麦角甾醇和亚油酸酯(纯度>95%)的高脂饲料, 饲料配方如表 1 所示。饲料喂养为期 6 周, 且定期观察小鼠生长状态。

表 1 各组小鼠饲料营养成分

Table 1 Nutrition composition of diet for mice in each group

营养成分/(g/kg 饲料)	空白	高脂	麦角甾醇	亚油酸酯
酪蛋白	200.00	200.00	200.00	200.00
蔗糖	172.80	172.80	172.80	172.80
纤维素	50.00	50.00	50.00	50.00
大豆油	25.00	25.00	25.00	25.00
柠檬酸钾	16.50	16.50	16.50	16.50
维生素混合物	10.00	10.00	10.00	10.00
矿物质混合物	10.00	10.00	10.00	10.00
磷酸氢钙	13.00	13.00	13.00	13.00
碳酸钙	5.50	5.50	5.50	5.50
L- 胱氨酸	3.00	3.00	3.00	3.00
胆碱酒石酸氢盐	2.00	2.00	2.00	2.00
玉米淀粉	452.20	72.80	72.80	72.80
猪油	20.00	177.50	177.50	177.50
麦芽糊精	75.00	100.00	100.00	100.00
胆固醇	/	8.70	8.70	8.70
胆酸钠	/	1.70	1.70	1.70
麦角甾醇/(mmol/L)	/	/	10.92	/
亚油酸酯/(mmol/L)	/	/	/	10.93
能量密度/(kcal/g)	3.85	4.67	4.64	4.62
总计	1 055.00	868.50	868.52	868.53

1.3.7 常规数据和样本采集

喂养结束后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 异氟烷呼吸麻醉后, 进行眼眶静脉采血, 颈椎脱臼处死。解剖分离肝脏、心脏、肾脏、睾丸、肾周脂肪和附睾脂肪组织, 用 PBS 缓冲液清洗干净、滤纸吸干、称重、分析脏器指数。所有样品于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。脏器指数计算如下:

$$B = \frac{C}{D} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B —脏器指数, %;

C —脏器质量, g;

D —体质量, g。

1.3.8 血浆生化指标测定

眼眶静脉取血后, 血液存放于加有肝素钠的离心管中。在 3 000 r/min 下离心 10 min, 取上层血浆于离心管, 于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。血浆 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 的测定严格按照对应试剂盒说明书进行操作。

1.3.9 小鼠肝脏组织形态观察

解剖时选取小鼠肝脏的同一部位, 剪下一小块新鲜组织, 用 PBS 洗净, 固定于 $\phi=10\%$ 福尔马林溶液; 然后经过一系列不同体积分数乙醇(80%、90%、95%、100%)进行脱水、二甲苯透明、石蜡进行包埋、切片、脱蜡、苏木素-伊红染色、树胶封固处理; 最后将制得的肝脏切片在 400 \times 光学显微镜下对小鼠肝脏组织形态进行观察。

1.3.10 肝脏和粪便总脂肪酸测定

肝脏和粪便总脂肪酸的测定参考 He 等^[14]方法。简言之, 将 0.1 g 肝脏于 5 mL 三氯甲烷: 甲醇(2:1, V/V) 溶液进行萃取, 在 15 000 r/min 充分匀浆; 随后加入 1 mL 生理盐水, 混匀、静置 2 h, 3 000 r/min 离心 10 min。取 1 mL 萃取液于具塞玻璃管中, 氮气吹干。肝脏提取物经三氟化硼衍生化后, 利用气相色谱进行分析。对最后一周粪便进行收集, 并对其进行冷冻干燥处理至恒重。干燥后粪便进行粉碎, 并利用 40 目筛网进行过筛处理。称取处理后的粪便 0.3 g, 随后加入 15 mL 三氯甲烷: 甲醇(2:1, V/V) 溶液萃取对其进行萃取处理, 其余步骤如上所述, 进行气相色谱分析。

气相色谱条件: DB-FFAP 毛细管柱(1 $\mu\text{m} \times 0.53 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$); FID: 温度 280 °C, 氢气流速 30 mL/min, 空气流量 300 mL/min, 氮气流量 30 mL/min; 载气: 高纯氮气, 进样量 2 μL , 压力 25 kPa, 进样口温度 250 °C; 柱温采用程序升温方式: 150 °C, 保持 1 min; 以 6 °C/min 的速率升温到 220 °C, 保持 33 min。

1.3.11 数据统计学处理

实验数据均以平均值 \pm 标准差表示。利用 SPSS 22.0 软件单因素方差分析(ANOVA)比较组间显著性差异。不同字母标记(a、b、c、d)表示差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 产物的高效液相色谱分析、纯度及制备

图2a是反应液的高效液相色谱图。由图2a可知, 2.3 min 和 3.2 min 分别为亚油酸和麦角甾醇的色谱峰, 9.2 min 为新产物的色谱峰, 新产物的色谱峰面积远大于麦角甾醇。通过计算, 麦角甾醇的转化率达 75%。

文献中 *Candida sp.* 99-125 脂肪酶催化麦角甾醇与亚麻酸酯化的转化率高达 90%, 而本文中 *Candida sp.* 99-125 脂肪酶催化麦角甾醇与亚油酸酯化的转化率降低至 75%。这种差异主要归因于酰基供体及实验规模不同。前期文献中酰基供体为亚麻酸, 而本文中为亚油酸。本文虽采用了文献中的最适参数, 但反应量扩大了 25 倍。图 2b 是反应物经萃取分离后的色谱图。由图 2b 可知, 产物纯度大于 98%。表明利用萃取分离方法可以实现产物的有效分离纯化。综上, 利用前期文献中的最适参数及萃取分离方法可以得到高纯度产物。通过重复试验, 制得满足后续动物实验所需的样品。

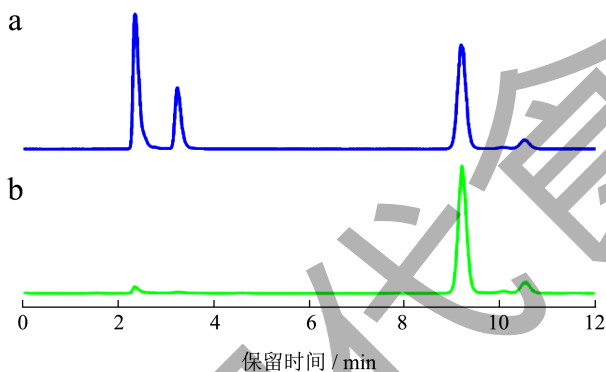


图 2 反应液 (a) 和纯化产物 (b) 的高效液相色谱图
Fig.2 HPLC chromatography of reaction mixture (a) and the purified product (b)

2.2 麦角甾醇酯的结构表征

2.2.1 红外光谱

图 3a 是麦角甾醇的红外光谱图。由图 3a 可知, 3 422 和 3 301 cm^{-1} 宽峰为游离羟基 $-\text{OH}$ 的伸缩振动吸收, 3 054 cm^{-1} 为 $-\text{C}=\text{C}-\text{H}-$ 的非对称伸缩振动吸收, 2 952 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_3$ 的非对称伸缩振动吸收, 2 869 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_2-$ 的对称伸缩振动吸收, 1 657 cm^{-1} 为 $-\text{C}=\text{C}-$ 的伸缩振动吸收, 1 456 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_2-$ 的弯曲振动吸收, 1 381 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_3-$ 的弯曲振动吸收, 1 066 cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{O}$ 的部分伸缩振动吸收。

图 3b 是亚油酸的红外光谱图。由图 3b 可知,

2 400~3 500 cm^{-1} 之间的宽峰为羧基 $-\text{COOH}$ 的特征吸收, 3 008 cm^{-1} 为 $-\text{C}=\text{C}-\text{H}-$ 的非对称伸缩振动吸收, 2 954 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_3$ 的非对称伸缩振动吸收, 2 924 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_2-$ 的非对称伸缩振动吸收, 2 854 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_2-$ 的对称伸缩振动吸收, 1 707 cm^{-1} 为羧基 $-\text{COOH}$ 上羰基 $-\text{C}=\text{O}-$ 的伸缩振动吸收, 1 412 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_2-$ 的弯曲振动吸收, 722 cm^{-1} 为多个亚甲基 $-(\text{CH}_2)_n-$ ($n \geq 4$) 中 $\text{C}-\text{H}$ 的吸收。

由图 3c 产物的红外谱图可知, 3 042 cm^{-1} 为 $-\text{C}=\text{C}-\text{H}-$ 的非对称伸缩振动吸收, 2 954 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_3$ 的非对称伸缩振动吸收, 2 926 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_2-$ 的非对称伸缩振动吸收, 2 853 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_3-$ 的对称伸缩振动吸收, 1 734 cm^{-1} 强的吸收峰为羰基 $-\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动吸收, 1 648 cm^{-1} 为 $\text{C}=\text{C}$ 双键的伸缩振动吸收, 1 457 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_2-$ 的弯曲振动吸收, 1 371 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_3$ 的弯曲振动吸收, 1 169 cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{O}$ 的伸缩振动吸收, 722 cm^{-1} 为多个亚甲基 $-(\text{CH}_2)_n-$ ($n \geq 4$) 中 $\text{C}-\text{H}$ 的吸收。

与麦角甾醇和亚油酸相比, 图 3c 产物红外光谱中没有亚油酸中游离羧基 (2 400~3 500 cm^{-1}) 和麦角甾醇中游离羟基 (3 422 cm^{-1} 和 3 301 cm^{-1}) 的特征吸收, 而且 $\text{C}=\text{O}$ 的特征吸收也发生了变化 (从 1 707 cm^{-1} 到 1 734 cm^{-1}), 由此说明形成酯键。初步判定, 产物可能为麦角甾醇亚油酸酯。

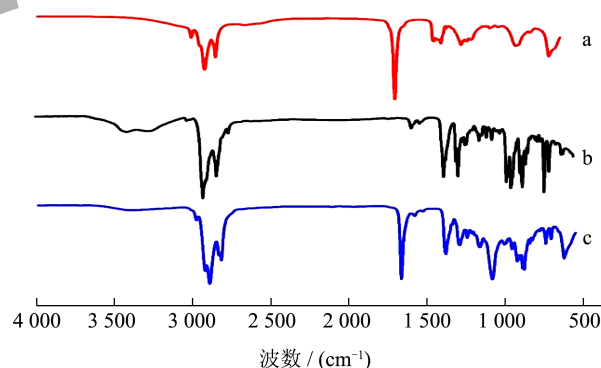


图 3 麦角甾醇 (a)、亚油酸 (b) 和产物 (c) 的红外光谱图

Fig.3 FT-IR spectra of ergosterol (a), linoleic acid (b) and the product (c)

2.2.2 质谱

图 4 是纯化产物的质谱图。目标产物麦角甾醇亚油酸酯的相对分子量是 658。在图 4 中可见明显的 m/z 379、 m/z 659 和 m/z 681。其中, m/z 659 和 m/z 681 分别是麦角甾醇亚油酸酯的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 信号, m/z 379 是碎片 $[\text{M}-\text{亚油酸}+\text{H}]^+$ 信号。由此表明, 产物很可能为目标产物麦角甾醇亚油酸酯。

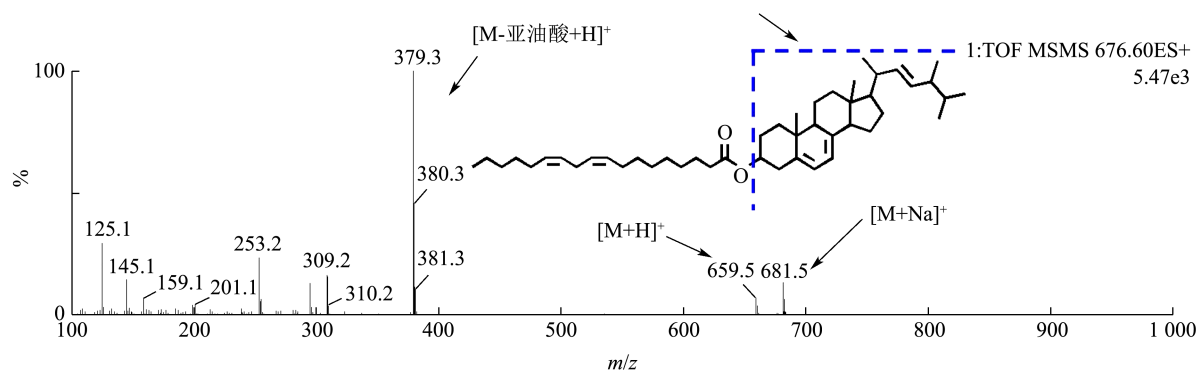


图4 产物的质谱图

Fig.4 The mass spectra of the product

2.2.3 核磁共振波谱

产物的 ^1H 谱结果如下： ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)： $\delta=0.63$ (3H, s), 0.83 (6H, t, $J=6.4$ Hz), 0.87~0.93 (6H, m), 0.95 (3H, s), 1.04 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 1.28~1.38 (24H, m), 1.58~1.66 (6H, m), 2.02~2.08 (9H, m), 2.24~2.32 (4H, m), 2.46~2.54 (1H, m), 4.66~4.76 (1H, m, 3-H), 5.14~5.24 (2H, m), 5.30~5.38 (6H, m)。

产物的 ^{13}C 谱结果如下： ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3)： $\delta=12.05$ (CH_3), 14.06 (CH_3), 16.18 (CH_3), 17.60 (CH_3), 19.64 (CH_3), 19.95 (CH_3), 21.03 (CH_2), 21.10 (CH_3), 22.57 (CH_2), 22.99 (CH_2), 25.04 (CH_2), 25.63 (CH_2), 27.19 (CH_2), 27.20 (CH_2), 28.28 (CH_2), 29.11 (CH_2), 29.17 (CH_2), 29.35 (CH_2), 29.59 (CH_2), 29.70 (CH_2), 31.53 (CH_2), 33.09 (CH), 34.38 (CH_2), 34.69 (CH_2), 36.70 (CH_2), 37.11 (10, 13-C), 37.94 (CH_2), 39.04 (CH_2), 40.43 (CH), 42.82 (CH), 46.05 (CH), 54.53 (CH), 55.72 (CH), 72.49 (3-CH), 116.32 (7-CH), 120.16 (6-CH), 127.91 (12'-CH), 128.04 (10'-CH), 130.04 (9'-CH), 130.20 (13'-CH), 131.98 (22-CH), 135.57 (23-CH), 138.62 (5-C), 141.46 (8-C), 173.26 (1'-C=O)。

2.3 麦角甾醇亚油酸酯的油溶性

结果显示, 麦角甾醇在葵花籽油中的溶解度不足 1.0 g/100 mL, 而麦角甾醇亚油酸酯的溶解度超过 15 g/100 mL。这表明麦角甾醇与亚油酸酯化后, 其油溶性显著提升。由此可见, 麦角甾醇亚油酸酯更容易在油脂体系中溶解, 因此更方便应用于油脂及富含油脂食品体系。

综上所述, 由红外光谱、质谱和核磁共振波谱的结果可知, *Candida* sp. 99-125 脂肪酶可以成功地

催化麦角甾醇与亚油酸酯发生酯化反应, 合成麦角甾醇亚油酸酯, 且其油溶性较麦角甾醇提高了至少 15 倍。虽然在大量制备时的转化率为 75%, 但通过萃取分离后可以将纯度提高至 98%。通过重复进行 10 余次的合成和分离过程, 即可制备出后续动物实验所需的样品。

2.4 小鼠体质量及摄食量

各组小鼠日摄食量和体质量变化见表 2。各组小鼠初始体质量、体质量增量无显著性差异。与空白组相比, 其它三组的日摄食量均显著降低。这是由于空白组喂养的低脂饲料能量密度低, 在机体所需能量一致的情况下, 消耗的饲料更多, 但换算后各组小鼠每日能量摄入并无显著差异。与空白组相比, 高脂组小鼠的最终体质量显著增加 14.6%, 这是由于后者饲喂了高脂饲料, 更容易引起小鼠体质量增加。麦角甾醇和亚油酸酯的加入并不会影响小鼠的日摄食量及体质量增量。类似地, 在前期的研究中发现麦角甾醇不会影响大鼠的日摄食量及体质量增量^[19]。

2.5 小鼠脏器指数及脂肪系数

表 3 为各组小鼠脏器指数及脂肪系数。各组之间心脏指数、肝脏指数和肾脏指数无显著差异, 表明补充麦角甾醇和亚油酸酯不会影响小鼠的心脏指数、肝脏指数和肾脏指数。与空白组相比, 其余三组均显著降低了睾丸指数。与高脂组相比, 麦角甾醇和亚油酸酯均不会引起显著变化。类似地, 与高脂组相比, 麦角甾醇组和亚油酸酯组肾周脂肪指数、附睾脂肪指数以及肾周 + 附睾脂肪指数无显著性差异。

表 2 各组小鼠日摄食量和体质量变化

Table 2 Changes in daily food intake and body weight of mice in each group

项目	空白	高脂	麦角甾醇	亚油酸酯
初始体质量/g	15.12 ± 1.02	15.03 ± 1.13	15.01 ± 1.03	15.19 ± 1.24
最终体质量/g	39.87 ± 4.41 ^b	45.82 ± 4.80 ^a	46.19 ± 6.62 ^a	45.82 ± 6.31 ^a
体质量增量/g	24.78 ± 5.13	30.82 ± 5.31	31.22 ± 7.01	30.71 ± 6.73
摄食量/[g/(d·只)]	6.49 ± 0.14 ^a	5.34 ± 0.12 ^b	5.27 ± 0.32 ^b	5.14 ± 0.32 ^b
能量摄入/[kcal/(d·只)]	25.08 ± 0.42	24.58 ± 0.52	24.47 ± 1.50	23.53 ± 1.22

注: 同行右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。表 3 同。

表 3 各组小鼠脏器指数及脂肪系数 (%)

Table 3 Organ index and fat coefficient of mice in each group

项目	空白	高脂	麦角甾醇	亚油酸酯
心脏指数	0.58 ± 0.07	0.54 ± 0.11	0.52 ± 0.03	0.50 ± 0.07
肝脏指数	4.51 ± 0.50 ^{ab}	4.22 ± 0.52 ^b	4.77 ± 0.90 ^a	4.42 ± 0.44 ^{ab}
肾脏指数	1.43 ± 0.14	1.38 ± 0.22	1.30 ± 0.14	1.37 ± 0.13
睾丸指数	0.62 ± 0.08 ^a	0.51 ± 0.07 ^b	0.52 ± 0.04 ^b	0.54 ± 0.07 ^b
肾周脂肪指数	1.02 ± 0.72	1.48 ± 0.70	1.38 ± 0.92	1.03 ± 0.59
附睾脂肪指数	2.71 ± 1.63	4.37 ± 1.68	3.92 ± 2.24	3.38 ± 1.61
肾周 + 附睾脂肪指数	3.68 ± 2.32	5.89 ± 2.31	5.32 ± 3.04	4.42 ± 2.14

2.6 小鼠血脂水平

各组小鼠的血浆脂质水平如图 5 所示。与空白组相比, 高脂组血浆 TC、LDL-C 和 LDL-C/HDL-C 含量均显著增加, 分别增加了 31.5% ($P < 0.05$)、73.9% ($P < 0.05$)、124.2% ($P < 0.05$), 表明长期高脂膳食引起小鼠脂代谢紊乱, 成功建立了高脂模型。

由图 5a 可知, 与高脂组相比, 麦角甾醇组和亚油酸酯组 TC 水平没有显著差异。Calpe-Berdiel 等^[20]发现, 在喂养 C57BL/6J 小鼠不同含量的植物甾醇 (0.5%、1%、2%) 的高脂饲料 4 周后, 小鼠血浆 TC 浓度并不受植物甾醇的影响。另外, Weingartner 等^[21]发现, 将 2% 植物甾醇添加到 C57BL/6J 小鼠的饮食中并不影响其 TC 含量。由图 5b 可知, 与空白组相比, 高脂组小鼠 TG 水平非显著性降低, 但最终体重却显著增加 (表 2), 表明小鼠从高脂饲料中摄取的能量主要贮藏在脂肪、肝脏等。与高脂组相比, 麦角甾醇组和亚油酸酯组血浆 TG 水平虽然显著增加, 但肾周脂肪和附睾脂肪总量降低。

LDL-C 水平与心血管疾病 (CVD) 的风险呈

线性正相关, 是动脉粥样硬化形成的重要原因之一^[22]。由图 5c 可知, 与高脂组相比, 麦角甾醇组 LDL-C 含量无显著性差异, 亚油酸酯组 LDL-C 含量显著降低 24.3%。表明麦角甾醇对小鼠血浆 LDL-C 水平无影响, 亚油酸酯可显著降低 LDL-C 浓度。研究发现, 分别补充硬脂酸甾醇酯、油酸甾醇酯和乙酸甾醇酯 LDL-C 含量较高脂组分别下降 27.3%、42.9% 和 44.8%^[23]。降低的程度不同可能归因于所用食物类型、研究持续时间和脂质水平的昼夜调节等因素有关。

HDL-C 有助于抑制动脉粥样硬化, 是临床上诊断冠心病的重要指标^[24]。由图 5d 可知, 与高脂组相比, 亚油酸酯组 HDL-C 水平显著增加 52%; 麦角甾醇组无显著性差异, 但呈增加趋势。Hu 等^[25]发现, 富含麦角甾醇的榆黄蘑提取物可使仓鼠血浆 HDL-C 浓度上升, 在 0.08、0.2、0.5 g/kg 灌胃饲养 49 d, HDL-C 分别提高 82.6%、88.5% 和 92.9%。表明麦角甾醇和亚油酸酯可改善由高脂膳食引起的 HDL-C 水平降低。

LDL-C/HDL-C 比值是判定动脉粥样硬化的重要指标^[26], 由图 5e 可知, 麦角甾醇组与亚油酸酯组 LDL-C/HDL-C 水平较高脂组分别降低 1.8%

和 36.5%。王玉等^[27]发现高于 75 mg/(kg·d) 植物甾醇酯可明显降低 LDL-C/HDL-C 水平，其中 150 mg/(kg·d) 植物甾醇酯剂量组降低幅度最大较高脂组降低了 58%。由此说明，亚油酸酯可有效降低 LDL-C/HDL-C 比值，从而降低动脉粥样硬化的患病风险。

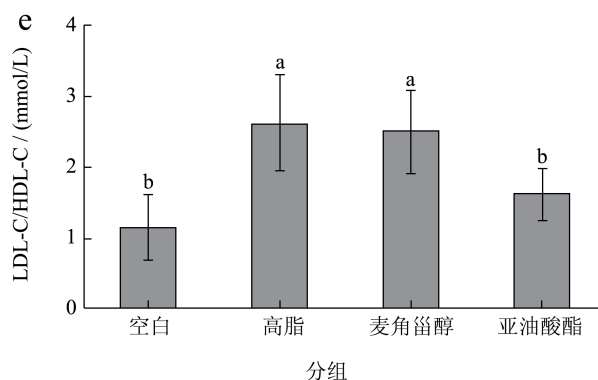
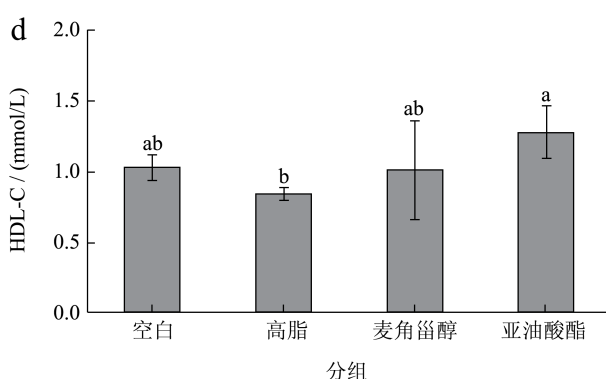
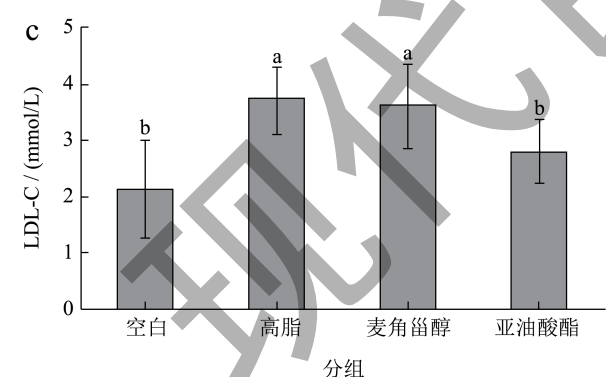
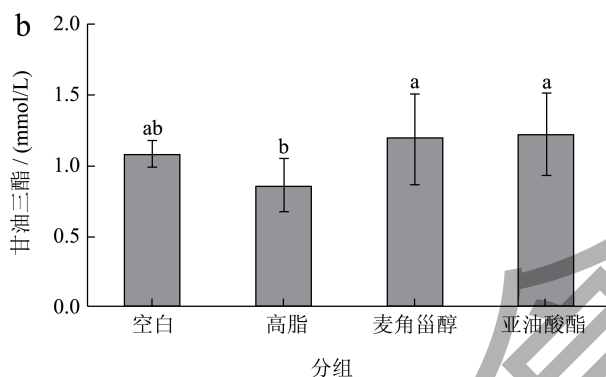
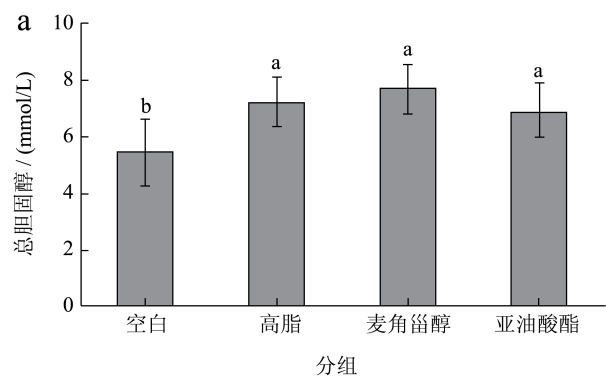


图 5 各组小鼠血浆 TC (a)、TG (b)、LDL-C (c)、HDL-C (d) 和 LDL-C/HDL-C (e) 水平
Fig.5 Plasma TC (a), TG (b), LDL-C (c), HDL-C (d) and LDL-C/HDL-C (e) of mice in each group

注：柱上不同组别标记不同小写字母 (a、b) 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.7 小鼠肝脏脂质水平

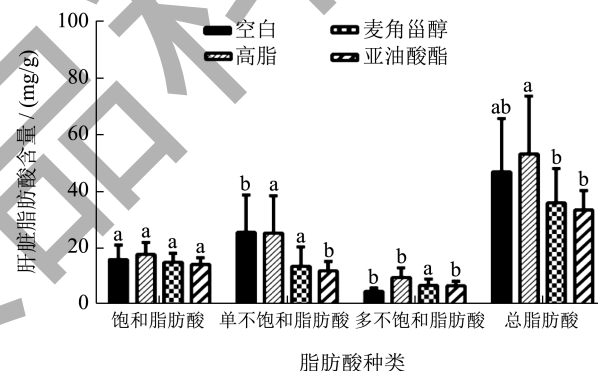


图 6 各组小鼠肝脏脂肪酸水平

Fig.6 Liver fatty acid of mice in each group

注：同一类脂肪酸中标记不同小写字母 (a、b) 组别之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 6 为各组小鼠肝脏脂肪酸含量。脂肪酸是甘油三酯的水解产物，肝脏中的脂肪聚集情况可由肝脏脂肪酸的含量得出。肝脏脂肪酸分为饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸。如图可知，相比于空白组，高脂组小鼠肝脏饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸含量没有显著差异；多不饱和脂肪酸、总脂肪酸水平分别增加了 47.9% 和 17.8%，表明高脂饮食导致小鼠肝脏脂质堆积。与高脂组相比，麦角甾醇组和亚油酸酯组饱和脂肪酸无显著性差异；单不饱和脂肪酸含量均显著性降低，分别降低 29.4% 和 30.8%；多不饱和脂肪酸含量分别显著降低 29.4% 和 30.8%；小鼠总脂肪酸水平分别显著降低 31.1% 和 35.3%。Laos 等^[28]发现在高脂饮食中添加 1% 的植物甾醇能够降低仓鼠肝脏的甘油三酯

水平。Song 等^[29]发现植物甾醇酯显著降低大鼠肝脏甘油三酯(-31%, $P<0.05$)和游离脂肪酸(-51%, $P<0.05$)含量。这些结果表明, 麦角甾醇、麦角甾醇亚油酸酯可以有效缓解高脂膳食导致的肝脏脂质聚集。

2.8 小鼠肝脏组织形态的影响

各组小鼠的肝脏病理切片结果如图 7 所示。其中, 空白组小鼠肝脏细胞呈现有序排列和规则形状, 未见病理变化; 高脂组小鼠出现大量的白色空泡, 为脂肪液滴, 细胞排列松散, 脂肪变性严重, 表明对小鼠进行的连续五周高脂饲料喂养使得非酒精性脂肪肝模型诱导成功。与高脂组相比, 麦角甾醇组小鼠肝脏没有出现大量的白色空泡, 细胞排列整齐且形状规则; 亚油酸酯组的小鼠肝细胞形态有明显的改善, 未出现脂肪液滴, 与空白组接近。

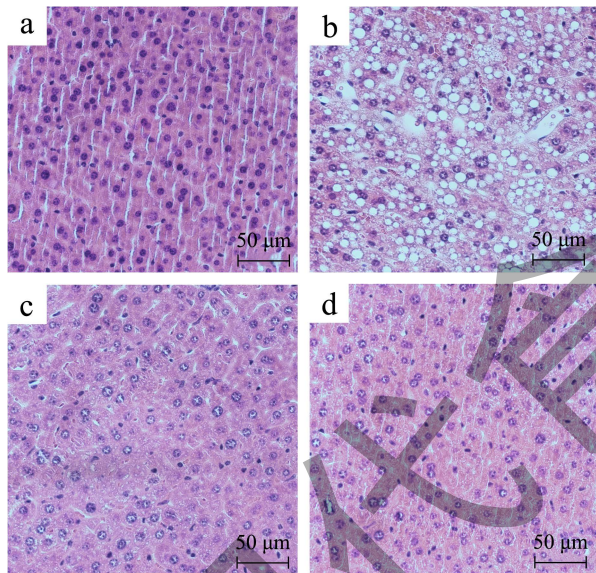


图 7 各组小鼠肝脏病理切片

Fig.7 Liver pathological sections of mice in each group

注: (a) 空白; (b) 高脂; (c) 麦角甾醇; (d) 亚油酸酯。

这些结果与肝脏脂质水平高度吻合。Feng 等^[30]给 C57BL/6 小鼠补充豆甾醇和谷甾醇均可通过减少肝脏甘油三酯积聚, 从而有效预防非酒精性脂肪肝形成。Hao 等^[31]发现植物甾醇亚麻酸酯可以缓解高脂饮食诱导 ApoE-KO 小鼠形成非酒精性脂肪肝。这些研究结果表明, 麦角甾醇、麦角甾醇亚油酸酯均可预防由高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝形成。

2.9 小鼠粪便脂质水平

各组小鼠粪便脂肪酸水平如图 8 所示。其中,

高脂组饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸、总脂肪酸水平与空白组相比, 分别增加 558.8%、528.6%、69.7%、341.1%, 这是由于低脂与高脂饲料脂质水平不同导致的。与高脂组相比, 麦角甾醇组和亚油酸酯组饱和脂肪酸水平无显著性差异, 单不饱和脂肪酸水平分别增加 122.9% 和 157.7%, 麦角甾醇组多不饱和脂肪酸水平无显著性差异, 亚油酸酯组多不饱和脂肪酸含量显著上升 223.1%, 总脂肪酸含量分别显著增加 21.8% 和 74.8%。粪便中脂肪酸的含量在一定程度上反映了其在小肠中的吸收情况。麦角甾醇组、亚油酸酯组与高脂组均摄入等能量密度的高脂饲料, 麦角甾醇组合亚油酸酯组排泄物中单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸和总脂肪酸均有不同程度增加。表明麦角甾醇和亚油酸酯可以抑制肠道脂肪酸的吸收, 进而促进脂肪酸的排泄。进一步分析表明, 亚油酸酯抑制肠道脂肪酸吸收、促进脂肪酸排泄的能力显著优于麦角甾醇。Rideout 等^[32]研究表明, 高脂饮食中添加 2% 植物甾醇可增加 C57BL/6J 小鼠中粪便棕榈酸和硬脂酸的含量, 且增加量均大于 50%。

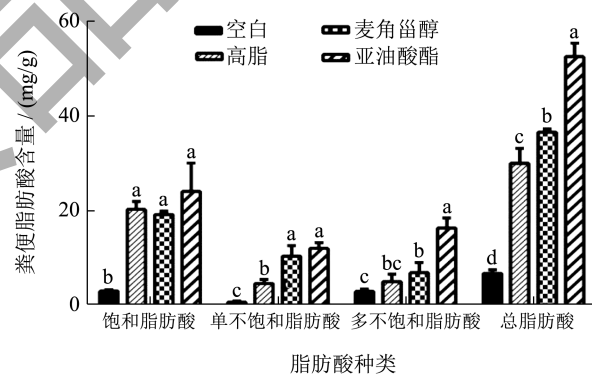


图 8 各组小鼠粪便脂肪酸水平

Fig.8 Feces fatty acid of mice in each group

注: 同一类脂肪酸中标记不同小写字母 (a、b、c、d) 组别之间有显著性差异 ($P<0.05$)。

研究表明, 在大鼠和仓鼠等试验动物中, 植物甾醇主要表现为降低胆固醇的作用, 其作用机理是通过抑制小肠对胆固醇的吸收, 并促进胆固醇的排泄^[33-35]。最近的研究发现植物甾醇和甾醇酯可以降低小鼠血浆和肝脏中甘油三酯的水平, 对胆固醇没有显著影响。前期研究也发现, 麦角甾醇能够显著抑制高脂饮食诱导的 C57BL/6J 小鼠肝脏中的脂质积聚, 使肝脏胆固醇含量降低 33.6%, 并有效预防脂肪肝的形成。同时, 它还促进了粪便中脂肪酸的排泄^[14], 这表明麦角甾醇具有预防高脂饮食诱导的

非酒精性脂肪肝的潜力。

本研究在脂肪酶催化合成麦角甾醇亚油酸酯的基础上,以昆明小鼠为试验动物,进一步比较了麦角甾醇和麦角甾醇亚油酸酯在预防非酒精性脂肪肝方面的作用。脂质代谢是诱导非酒精性脂肪肝的重要原因,降低血浆脂质水平将有助于减轻非酒精性脂肪肝的发生及发展。与高脂组相比,麦角甾醇对高脂饮食诱导的血浆 TC、TG、LDL-C 和 LDL-C/HDL-C 并没有表现出降低效果。相比之下,麦角甾醇亚油酸酯可以显著降低血浆 LDL-C 和 LDL-C/HDL-C,并显著增加血浆 HDL-C 水平,且对血浆 TC 水平有非显著性降低。由此表明,麦角甾醇亚油酸酯降血脂功效优于麦角甾醇,这可能与其中的酰基供体亚油酸具有降脂活性有关。肝脏是脂质代谢的主要器官,机体内胆固醇和甘油三酯的代谢与转化均在肝脏完成。结果表明,麦角甾醇和麦角甾醇亚油酸酯组肝脏总脂肪酸含量均显著降低,且肝脏脂肪变性得到有效缓解,这些指标的改善与血浆脂质水平下降有关。体内脂质水平不仅与外源膳食摄入相关,也与机体自身合成有关。粪便中脂质水平能在一定程度上反映机体对外源脂质的吸收情况。结果显示,麦角甾醇和麦角甾醇亚油酸酯组粪便中的总脂肪酸含量显著增加,表明二者可能通过促进粪便中脂质排泄、抑制肠道脂质吸收降低血浆脂质水平,进而减少脂质在肝脏的聚集,缓解高脂饮食导致的脂肪肝。然而,相比之下,麦角甾醇亚油酸酯在降低肝脏脂质积聚、抑制肠道脂肪酸吸收和促进粪便脂肪酸排泄方面表现更为突出。

目前,尽管已经发现麦角甾醇亚油酸酯对非酒精性脂肪肝具有良好的预防作用,但非酒精性脂肪肝的病因十分复杂,麦角甾醇亚油酸酯对非酒精性脂肪肝保护的作用机制尚不清楚,需要进一步深入研究。

3 结论

本研究利用 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶为催化剂可以成功地催化麦角甾醇与亚油酸酯发生酯化反应,合成麦角甾醇亚油酸酯。动物实验表明麦角甾醇亚油酸酯不但可以降低肝脏总脂肪酸水平,有效预防高脂膳食诱导的肝脏脂肪变性,抑制肠道脂肪酸的吸收,促进粪便脂肪酸排泄,而且还能降低血浆 LDL-C、LDL-C/HDL-C 浓度,提高 HDL-C 水平。因此,麦角甾醇亚油酸酯可以有效预防高脂膳食诱导的非酒精性脂肪肝形成,为 NAFLD 的膳食干预

提供了一种新的策略。

参考文献

- [1] 严思思,刘翔燕,张琳玉,等.膳食油脂与非酒精性脂肪肝形成相关研究进展[J].中国油脂,2021,46:76-84.
- [2] MIRMOHAMMADALI S N, ROSENKRANZ S K. Dietary phytochemicals, gut microbiota composition, and health outcomes in human and animal models [J]. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2023: 42: 152-171.
- [3] HAN H, XUE T, LI J, et al. Plant sterol ester of α -linolenic acid improved non-alcoholic fatty liver disease by attenuating endoplasmic reticulum stress-triggered apoptosis via activation of the AMPK [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2022, 107: 109072.
- [4] NZEKOU F K, SUN Y, CAPRIOLI G, et al. Effect of the ultrasound-assisted extraction parameters on the determination of ergosterol and vitamin D-2 in *Agaricus bisporus*, *A. bisporus* Portobello, and *Pleurotus ostreatus* mushrooms [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022, 109: 104476.
- [5] NOWAK R, NOWACKA-JECHALKE N, PIETRZAK W, et al. A new look at edible and medicinal mushrooms as a source of ergosterol and ergosterol peroxide-UHPLC-MS/MS analysis [J]. *Food Chemistry*, 2022, 369: 130927.
- [6] HAMMANN S, LEHNERT K, VETTER W. Esterified sterols and their contribution to the total sterols in edible mushrooms [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, 54: 48-54.
- [7] GIL-RAMIREZ A, MORALES D, SOLER-RIVAS C. Molecular actions of hypocholesterolaemic compounds from edible mushrooms [J]. *Food & Function*, 2018, 9: 53-69.
- [8] SILLAPACHAIYAPORN C, MONGKOLOPOBSIN K, CHUCHAWANKUL A, et al. Neuroprotective effects of ergosterol against TNF- α -induced HT-22 hippocampal cell injury [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 154: 113596.
- [9] XU J J, LIN C, WANG T T, et al. Ergosterol attenuates LPS-induced myocardial injury by modulating oxidative stress and apoptosis in rats [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 48: 583-592.
- [10] KANG J H, JANG J E, MISHRA S K, et al. Ergosterol peroxide from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) exhibits anti-cancer activity by down-regulation of the β -catenin pathway in colorectal cancer [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 173: 303-312.
- [11] SCHNEIDER I, KRESSEL G, MEYER A, et al. Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans [J]. *Journal of Functional Foods*, 2011, 3: 17-24.

- [12] GIL-RAMIREZ A, RUIZ-RODRIGUEZ A, MARIN F R, et al. Effect of ergosterol-enriched extracts obtained from *Agaricus bisporus* on cholesterol absorption using an *in vitro* digestion model [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 11: 589-597.
- [13] XIONG M, HUANG Y, LIU Y, et al. Antidiabetic activity of ergosterol from *Pleurotus ostreatus* in KK-A(y) mice with spontaneous type 2 diabetes mellitus [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018, 62: 1700444.
- [14] HE W S, CUI D D, LI L L, et al. Plasma triacylglycerol-reducing activity of ergosterol linolenate is associated with inhibition of intestinal lipid absorption [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 64: 103686.
- [15] HE W S, LI L L, ZHAO J, et al. *Candida* sp. 99-125 lipase-catalyzed synthesis of ergosterol linolenate and its characterization [J]. *Food Chemistry*, 2018, 280: 286-293.
- [16] MERCOLAJ, ADAMO CRD. Linoleic Acid: A narrative review of the effects of increased intake in the standard american diet and associations with chronic disease [J]. *Nutrients*, 2023, 15: 3129.
- [17] COCCHI M, MONDO E, MINUTO C, et al. Linoleic acid: have we understood how it works in psychopathologies and ischemic cardiovascular diseases? [J]. *Progress in Nutrition*, 2020, 22: 7-11.
- [18] MARANGONI F, AGOSTONI C, BORGHI C, et al. Dietary linoleic acid and human health: Focus on cardiovascular and cardiometabolic effects [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 292: 90-98.
- [19] HE W S, CUI D, LI L, et al. Cholesterol-reducing effect of ergosterol is modulated via inhibition of cholesterol absorption and promotion of cholesterol excretion [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 57: 488-496.
- [20] CALPE-BERDIEL L, JOAN CARLES ESCOLÀ-GIA, RIBAS V, et al. Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet [J]. *Atherosclerosis*, 2005, 181: 75-85.
- [21] WEINGARTNER O, LUTJOHANN D, JI S, et al. Vascular effects of diet supplementation with plant sterols [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, 51: 1553-1561.
- [22] DUMOIL J H, RIDEOUT T C. The lipid-lowering effects and associated mechanisms of dietary phytosterol supplementation [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, 23: 5077-5085.
- [23] 陈茂彬, 黄琴, 吴谋成. 植物甾醇酯对饮食性高脂血症治疗作用研究 [J]. *食品研究与开发*, 2005, 26: 44-45, 48.
- [24] CHEN Z Y, JIAO R, MA K Y. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56: 8761-8773.
- [25] HU S H, LIANG Z C, CHIA Y C, et al. Antihyperlipidemic and Antioxidant Effects of Extracts from *Pleurotus citrinopileatus* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 2103-2110.
- [26] ENOMOTO M, ADACHI H, HIRAI Y J, et al. LDL-C/HDL-C ratio predicts carotid intima-media thickness progression better than HDL-C or LDL-C alone [J]. *Journal of Lipids*, 2011, 2011: 549137.
- [27] 王玉, 刘滨城, 任运宏, 等. 植物甾醇酯对高脂血症小鼠的降血脂作用研究 [J]. *食品科学*, 2011, 32: 326-329.
- [28] LAOS S, CAIMARI A, CRESCENTI A, et al. Long-term intake of soyabean phytosterols lowers serum TAG and NEFA concentrations, increases bile acid synthesis and protects against fatty liver development in dyslipidaemic hamsters [J]. *British Journal of Nutrition*, 2014, 112: 663-673.
- [29] SONG L H, QU D, ZHANG Q, et al. Corrigendum: phytosterol esters attenuate hepatic steatosis in rats with non-alcoholic fatty liver disease rats fed a high-fat diet [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46884.
- [30] FENG S, GAN L, YANG C S, et al. Effects of stigmasterol and β -sitosterol on nonalcoholic fatty liver disease in a mouse model: a lipidomic analysis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66: 3417-3425.
- [31] HAO H, PEI P Y, LI C, et al. Flaxseed oil containing α -linolenic acid ester of plant sterol improved atherosclerosis in apoe deficient mice [J]. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 2015, 2015: 1-17.
- [32] RIDEOUT T C, HARDING S V, JONES P J H. Consumption of plant sterols reduces plasma and hepatic triglycerides and modulates the expression of lipid regulatory genes and de novo lipogenesis in C57BL/6J mice [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54: S7-S13.
- [33] LIU D, PI J, ZHANG B, et al. Phytosterol of lotus seed core powder alleviates hypercholesterolemia by regulating gut microbiota in high-cholesterol diet-induced C57BL/6J mice [J]. *Food Bioscience*, 2023, 51: 102279.
- [34] CHEN, S W, RUI Q C, MING Y W, et al. Serum cholesterol-lowering activity of beta-sitosterol laurate is attributed to the reduction of both cholesterol absorption and bile acids reabsorption in hamsters [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68: 10003-10014.
- [35] RASMUSSEN H E, GUDERIAN D M, WRAY C A, et al. Reduction in cholesterol absorption is enhanced by stearate-enriched plant sterol esters in hamsters [J]. *Journal of Nutrition*, 2006, 136: 2722-2727.