

百合对高脂喂养大鼠肝脏生物钟基因 *Clock-Bmal1* 表达和糖脂代谢的改善作用

于静, 徐沛沛, 羊金玲, 孙喜贺, 陈丽*

(甘肃中医药大学公共卫生学院, 西北营养与环境相关疾病中医药防控协同创新中心, 甘肃兰州 730000)

摘要: 探讨兰州百合对高脂喂养大鼠肝脏生物钟基因 *Clock-Bmal1* 及糖脂代谢的调节及作用机制。高脂饲料喂养大鼠 8 周造模, 将其随机分为模型组、二甲双胍组、褪黑素组、百合低、中、高剂量组、联合组, 正常组普通饲料喂养, 灌胃干预 4 周, 测量空腹血糖 (FPG)、腹围、体长、肝重, 计算 Lee's 指数及肝脏湿重指数, 微板法检测血清和肝脏总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 及高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、ELISA 法检测糖化血红蛋白 (Hb Alc) 水平, RT-qPCR 和 Western blot 检测肝脏 *Clock*、*Bmal1* 基因 mRNA 及蛋白表达水平。结果显示, 与模型组相比, 百合干预组可改善高脂大鼠体态, 调节血脂水平, 降低 Hb Alc, 上调 *Clock* 和 *Bmal1* mRNA 及蛋白表达 ($P<0.05$), 其中百合中剂量腹围及 Lee's 指数减少 (8.61%, 5.04%), 血清 TC、TG、LDL-C 下降 (36.59%、29.73%、34.04%), Hb Alc 下降 24.37%, *Clock* 和 *Bmal1* mRNA 表达增加 (159.17%、228.58%) 以及蛋白表达增加 (52.09%、151.33%)。综上, 百合缓解高脂饮食引起的糖脂代谢紊乱, 可能是通过增加肝脏 *Clock* 和 *Bmal1* 基因表达来实现的, 可为百合防治营养代谢性疾病及功能性健康食品的开发利用提供理论依据。

关键词: 兰州百合; 高脂饮食; 糖代谢; 脂代谢; 生物钟基因

文章编号: 1673-9078(2025)03-63-71

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0032

Lilium davidii Improves Liver Circadian Clock *Clock-Bmal1* Gene Expression and Glucose and Lipid Metabolism in High-fat Diet Fed Rats

YU Jing, XU Peipei, YANG Jinling, SUN Xihe, CHEN Li*

(School of Public Health, Northwest Nutrition and Environmental Related Diseases Traditional Chinese Medicine Prevention and Control Collaborative Innovation Center, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To explore the regulation and mechanism of *Lilium davidii* var. *willmottiae* (LD) on the liver circadian clock gene *Clock-Bmal1* and glucose and lipid metabolism in rats on a high-fat diet. The model was established by feeding rats with high-fat diet for 8 weeks. The high-fat rats were randomly divided into the model group, metformin group, melatonin

引文格式:

于静, 徐沛沛, 羊金玲, 等. 百合对高脂喂养大鼠肝脏生物钟基因 *Clock-Bmal1* 表达和糖脂代谢的改善作用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(3): 63-71.

YU Jing, XU Peipei, YANG Jinling, et al. *Lilium davidii* improves liver circadian clock *Clock-Bmal1* gene expression and glucose and lipid metabolism in high-fat diet fed rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 63-71.

收稿日期: 2024-01-09

基金项目: 甘肃省中药原料质量监测技术服务中心建设基金资助项目 (gszyzx201904); 西北营养与环境相关疾病中医药防控协同创新中心开放基金项目 (ZYXT-20-01)

作者简介: 于静 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: yuri0049@163.com

通讯作者: 陈丽 (1981-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: 360471754@qq.com

group, low-dose LD group, medium-dose LD group, high-dose LD group, combination group, with the normal group being fed with an ordinary diet. Intragastric intervention was carried out for 4 weeks. Fasting blood glucose (FPG), abdominal circumference, body length, and liver weight were measured. Lee's index and liver wet weight index were calculated. Total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in the serum and liver were detected by the microplate method. The level of glycosylated hemoglobin (Hb Alc) was detected by ELISA. The mRNA and protein expression levels of the *Clock* and *Bmal1* genes in the liver were detected by RT-qPCR and Western blot. The results showed that compared with the model group, the LD intervention group could improve the body posture of high-fat rats, regulate the blood lipid levels, reduce Hb Alc, and upregulate the mRNA and protein expression of *Clock* and *Bmal1* ($P<0.05$). The abdominal circumference and Lee's index of the medium-dose LD group decreased (8.61%, 5.04%), with their serum TC, TG and LDL-C decreasing (36.59%, 29.73%, 34.04%), Hb Alc decreasing by 24.37%, *Clock* and *Bmal1* mRNA expression increasing (159.17%, 228.58%) and protein expression increasing (52.09%, 151.33%). In conclusion, LD alleviated glucose and lipid metabolism disorders caused by a high-fat diet, which might be achieved through the upregulation of the liver *Clock* and *Bmal1* gene expression. The results of this study provide a theoretical basis for using LD in the prevention and treatment of metabolic diseases and the development and utilization of functional health foods.

Key words: *Lilium davidii* var. *willmottiae*; high fat diet; sugar metabolism; lipid metabolism; clock genes

在现代社会中,人们普遍存在着饮食结构不合理的问题,过度摄入高脂、高糖食物,睡眠障碍以及倒班工作导致的作息颠倒和缺乏体力活动,这些因素会引发一系列代谢紊乱,如脂质代谢紊乱、血脂异常、肝脏脂质蓄积和胰岛素抵抗等,从而增加患肥胖、高脂血症、2型糖尿病、心血管疾病和癌症的风险^[1]。药物虽然在治疗代谢性疾病方面发挥着重要作用,但其副作用和依赖性也不容忽视。现代药理实验和临床研究发现,长期摄入药食同源食物有助于缓解与代谢综合征相关的慢性营养代谢性疾病及其并发症^[2]。

生物钟是生命为长期适应地球 24 h 周期环境变化而演化的内在计时机制,在细胞、组织乃至整个生物结构的层面上,生物钟与代谢活动存在着复杂的交互作用机制。生物钟分为中枢生物钟和外周生物钟,外周生物钟研究最广泛的是肝脏,肝脏作为人体代谢的中枢器官,在糖脂代谢中占据中心位置^[3]。实验研究证实,生物钟可通过参与糖脂代谢中葡萄糖、脂肪酸的合成与分解关键步骤发挥其调节作用^[4],许多来自中草药中的天然化合物可以通过影响生物钟基因的表达来调节代谢紊乱^[5]。

兰州百合 (*Lilium davidii* var. *willmottiae*, LD) 作为一种广为流传的药食同源植物,其药用价值得到广泛证实,在诸多医学典籍中都有明确记载,其中在《本草纲目》中对百合作了详细的记述:百合,味甘平、归心、肺经、养阴润肺、清心安神。现代

药理研究表明,百合提取物及百合属相关活性成分具有镇静安神、降血糖、抗氧化和抗炎、降脂等药理作用^[6]。如百合醇提取物(矢车菊素)能够改善由四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠肝损伤^[7];百合多糖能够促进胰岛素的分泌,对1型糖尿病大鼠具有降血糖的效果^[8]。越来越多的证据表明,百合可以显著改善糖脂代谢水平。而生物钟基因昼夜节律运动输出周期基因(Circadian Locomotor Output Cycles Kaput, *Clock*)和脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白1基因(Brain And Muscle Arnt-Like 1, *Bmal1*)作为异源二聚体高度参与了肝脏糖脂代谢过程,但百合是否通过生物钟基因改善糖脂代谢却尚不可知。故本研究采用高脂饲料诱导建立高脂大鼠模型,从生物钟的角度进一步探究百合提取物对高脂饮食大鼠糖脂代谢的影响,为百合应用于防治营养代谢性疾病及保健品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

体质量为180~200 g的5~6周龄SD雄性大鼠73只[实验动物许可证号:SCXK(京)2019-0010],北京斯贝福实验技术有限公司,甘肃中医药大学科研中心(伦理批准号:2023-508)。

高脂饲料(货号:HD001b),北京博泰宏达生物技术有限公司;褪黑素(货号:M5250),美

国 Sigma-Aldrich 公司；二甲双胍（批号 183290），石药集团欧意药业有限公司；戊巴比妥钠（批号 WS20130198），上海中西药业股份有限公司；总胆固醇试剂盒（Total Cholesterol, TC）、甘油三酯试剂盒（Triglyceride, TG）、低密度脂蛋白胆固醇试剂盒（Low Density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C）、高密度脂蛋白胆固醇试剂盒（High Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C）货号分别为 A111-1-1、A110-1-1、A113-1-1、A112-1-1，南京建成生物工程研究所有限公司；大鼠糖化血红蛋白试剂盒（Hemoglobin A1c, Hb A1c）货号为 YJ226553，上海酶联生物科技有限公司；小鼠抗 β -actin 单抗（TA-09）、山羊抗小鼠二抗（ZB-2305）、山羊抗兔二抗（ZB-2301），北京中杉金桥生物科技有限公司；Clock 抗体（AF0323），美国 Affinity 公司；重组 Anti-Bmal1 抗体（ab230822），美国 Abcam 公司；RNA 试剂盒、cDNA 反转录试剂盒、SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒，艾科瑞生物技术有限公司；其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

卓越金采型血糖仪，罗氏血糖健康医护公司；Bp-98Aseries 智能无创血压测定仪，日本软隆公司；SpectraMax i3x 多功能酶标仪，美国美谷公司；Sorvall ST40R 高速低温离心机、Minxer C 舒适型恒温混匀仪、NanoDrop 2000C 超微量分光光度计，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；Scientz-48 高通量组织研磨器，宁波新芝生物科技有限公司；DYCZ-24KS 垂直电泳仪、DYCZ-40K 转印电泳仪，北京六一生物科技有限公司；LightCycler@96 实时荧光定量 PCR 仪，德国 Roche 公司。

1.3 方法

1.3.1 百合提取物制备及成分分析

百合水提取液：取兰州鲜百合，恒温干燥箱干燥（50℃，3 h），粉碎，过筛（100 目），取百合粗粉适量，以蒸馏水为提取溶剂，液料比为 10:1（mL/g），采用传统加热回流提取法，连续提取 2 次，2 h/次，过滤后合并 2 次滤液，4 000 r/min 离心，弃滤渣取上清液，经浓缩至 74 mg/mL 备用。紫外可见分光光度法检测，总皂苷含量 2.91%，总多糖含量 5.39%。

1.3.2 造模、分组及给药

大鼠自由饮水，普通饲料适应性饲养 3 d 后，将 73 只 SD 大鼠随机分为正常组（CON， $n=10$ ），

模型组（MOD， $n=63$ ），模型组饲喂高脂饲料进行造模。每天对大鼠基本形态进行观察并记录食物消耗量，每周测量一次体质量。并于第 8 周，禁食不禁水 12 h 后，用快速血糖仪及配套试纸从各组大鼠尾静脉取血样测空腹血糖（Fasting Plasma Glucose, FPG），量取大鼠腹围、体长，计算 Lee's 指数^[9]；采用无创血压计测量大鼠尾动脉收缩压（Systolic Blood Pressure, SBP）及舒张压（Diastolic Blood Pressure, DBP），每只大鼠测量 3 次以上，取平均值。

模型组的体质量、腹围、Lee's 指数、SBP、DBP、FPG 值均显著高于正常对照组（ $P<0.05$ ），模型建立成功^[10-12]。

第 8 周后，将 63 只高脂大鼠按体质量随机分为模型组（MOD， $n=8$ ）、二甲双胍组（MET， $n=10$ ）、褪黑素组（MIT， $n=8$ ）、百合提取液低剂量组（LD-L， $n=10$ ）、中剂量组（LD-M， $n=10$ ）、高剂量组（LD-H， $n=10$ ）、联合组（LD-U， $n=7$ ）共 7 组进行灌胃给药。

给药剂量：二甲双胍组为 90.0 mg/kg 的剂量进行灌胃、褪黑素组为 10.0 mg/kg^[12]、百合提取液低、中、高剂量组分别按 185、370、740.0 mg/kg^[13]。联合组为百合和二甲双胍（百合 370 mg/kg+二甲双胍 90.0 mg/kg）联合用药组；正常组和模型组给予相应体积的生理盐水。干预期间正常组普通饲料喂养，其余各组高脂饲料喂养。干预 4 周后，处死大鼠并取材。

1.3.3 样品采集

末次给药后，将大鼠禁食不禁水 12 h，麻醉后，腹主动脉取血用于后续试剂盒检测；分离肝脏组织生理盐水冲洗滤纸吸干水分，液氮速冻后 -80℃ 储存。

1.3.4 大鼠基本状态及体型指标相关检测

观察大鼠皮毛的光泽程度、活动度、精神状态、进食情况及排泄物等基本情况。实验结束后，检测各组大鼠空腹血糖、腹围、体长并计算 Lee's 指数；称取肝脏质量，按（肝脏质量/体质量） $\times 100\%$ 计算肝脏湿重指数^[14]。

1.3.5 血清及肝脏组织生化指标检测

将收集的血液样本，离心（3 000 r/min，4℃）15 min 后取上层血清，用微板法测定不同组大鼠血清和肝脏组织中的 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 浓度。

1.3.6 血清糖化血红蛋白检测

用 ELISA 法测定检测血清 Hb A1c，空白孔调零，测定在加终止液 15 min 内进行 450 nm 波长测量各孔吸光度 A，代入标准曲线得出相应的质量浓度。

1.3.7 实时荧光定量反应（RT-qPCR）检测

取大鼠肝组织加入 RNA 裂解液研磨离心取上清，试剂盒提取 RNA，用 NanoDrop 2000C 检测 RNA 的纯度和浓度，将总 RNA 稀释到 1 μg/μL，按照 20 μL 总反应体积进行逆转录获得 cDNA 模板，采用两步法进行加上下游引物进行 PCR 扩增（10 μL 总反应体系），反应结束后得到各样本 Ct 值，2^{-ΔΔCt} 计算目的基因相对表达量，将各组数据进行归一化处理。引物由艾科瑞公司设计提供，具体引物序列见表 1。

表 1 PCR引物序列
Table 1 PCR primer sequences

基因名称	引物序列（5'-3'）
<i>β-actin</i>	F:5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3' R:5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'
<i>Clock</i>	F:5'-CCACGTTCACTCAGGACAGACA-3' R:5'-AGCCCTAACTTCTGCATAACTT-3'
<i>Bmal1</i>	F:5'-GTCACTAAAGTCAACGGGACCAC-3' R:5'-AGGCATCGACATGATAGACAACG-3'

1.3.8 蛋白质印迹法（Western blot）法检测

取各组大鼠肝组织，充分匀浆脂质裂解后，离心 5 min（14 000 r/min，4 ℃）取上清，用 BCA 蛋白试剂盒检测蛋白浓度，确定上样量。配置 SDS-PAGE 凝胶（8%，10%）将蛋白进行分离，电泳（80 V，30 min 转为 120 V，1 h），湿转（300 mA，45 min）将蛋白转移至 PVDF 膜，加入 5% 的脱脂奶粉摇床上室温封闭 2 h，分别加入 *Clock*、*Bmal1*、*β-actin* 抗体 4 ℃ 孵育过夜，膜在 TBS（T）中洗涤 3 次 5 min，随后室温孵育相应的二抗 1 h，ECL 曝光显影。用 Image J 分析软件读取相应条带的灰度值，计算各组蛋白相对表达量，将数据进行归一化处理。

1.3.9 统计学分析

用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行分析，Graphpad prism 8 软件制图。实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间的比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），采用 *LSD-t* 法和 *Dunnett-t* 法进行多重比较，*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 高脂喂养动物一般情况

通过观察，高脂饲料喂养大鼠粪便软黏、尿液呈赤黄色、排泄物散发异味，但未出现明显的腹泻

症状；其整体活动较少，体型肥胖，嗜睡，毛发粗糙、发黄且无光泽。相比之下，普通饲料组的大鼠在喂养期间毛色光滑，大小便正常。正常组大鼠喂养期间毛色光滑，精神状态好，大小便正常。由表 2 可知，高脂组（210.09 g）与正常组（209.30 g）大鼠的始重无统计学差异（*P* > 0.05），在饲喂 8 周后，高脂组大鼠相较于正常组体重增长了 30.65%（*P* < 0.01），腹围、Lee's 指数均明显升高 10.48%，7.14%（*P* < 0.01），高脂组收缩压 SBP 及舒张压 DBP 均显著升高（*P* < 0.01）；且空腹血糖 FPG 值有统计学意义（*P* < 0.05），表明造模成功。

表 2 造模指标
Table 2 Model indicators ($\bar{x} \pm s$)

项目	CON (<i>n</i> =10)	MOD (<i>n</i> =63)
始重 BW/g	209.3 ± 8.00	210.09 ± 10.21
末重 BW/g	431.29 ± 31.76	563.46 ± 54.13**
Lee's 指数/%	314.89 ± 10.17	337.37 ± 14.71**
腹围/cm	21.09 ± 0.82	23.30 ± 1.46**
血糖/(mmol/L)	5.41 ± 0.48	5.72 ± 0.58*
SBP/(mm Hg)	119.10 ± 9.78	142.45 ± 17.76**
DBP/(mm Hg)	71.17 ± 12.57	96.30 ± 15.47**

注：与 CON 比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01。

2.2 大鼠体质量、腹围、Lee's 指数及摄食量的变化

体质量反映了机体整体的代谢水平，并且 Lee's 指数与腹围结果趋势是判断机体腹型肥胖的重要指标。百合干预 4 周后，模型组大鼠体质量升高，增长量明显高于正常组（*P* < 0.05）（图 1a）。与模型组相比，百合低、中、高剂量组及联合组体质量增长变缓，增长量低于模型组（*P* < 0.01）。各组间的摄食量的无差异（*P* > 0.05）（图 1d）。模型组大鼠腹围较正常组增加 14.96%（*P* < 0.01），百合中剂量组、联合组、褪黑素组、二甲双胍组腹围相较于模型组减少 8.61%、9.65%、10.46%、8.24%（*P* < 0.01，*P* < 0.05）。而各组大鼠 Lee's 指数结果（图 1c）趋势与腹围变化趋势（图 1b）一致，百合中剂量组、联合组、褪黑素组、二甲双胍组 Lee's 相较于模型组降低 5.04%、4.78%、5.71%、5.43%（*P* < 0.01，*P* < 0.05）。这与陈靓等^[15]的研究结果相似。体质量、腹围及 Lee's 指数结果共同说明百合可有效改善高脂诱导的大鼠体态变化，但不是通过减少能量摄入的方式发挥减重效果。

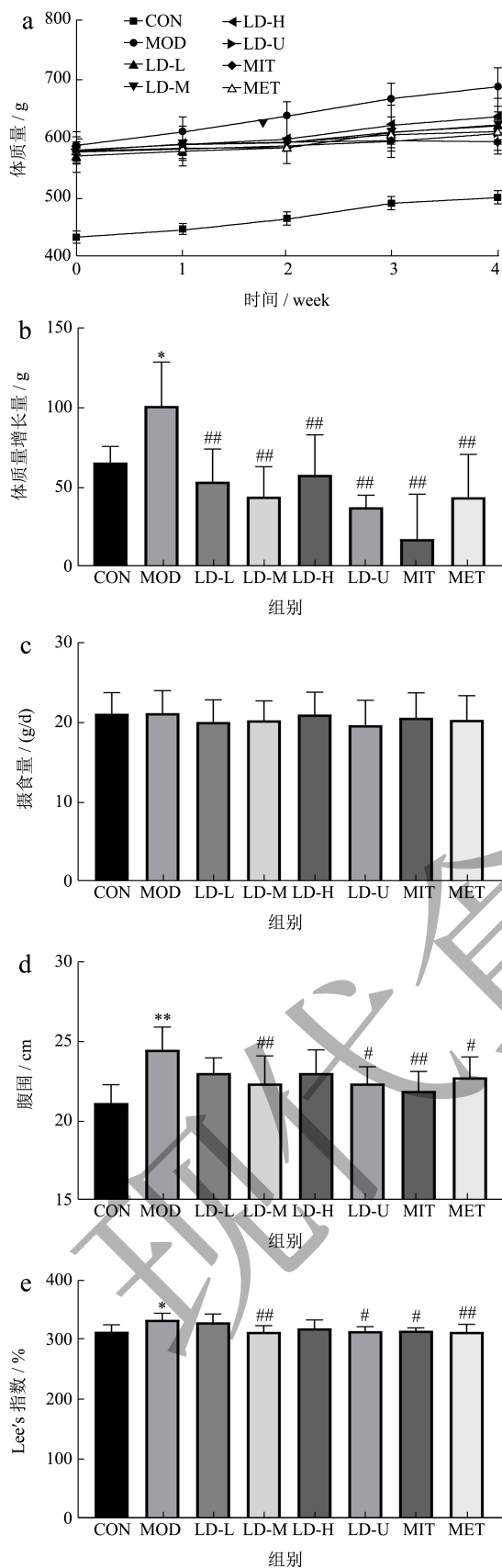


图1 各组大鼠体型变化

Fig.1 Changes in body size of rats ($\bar{x} \pm s$)

注: 与 CON 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MOD 比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。下图同。

2.3 大鼠肝脏湿重指数、肝脏TC、TG的变化

肝脏作为机体重要的代谢中心, 代谢性疾病影响肝脏, 反映为肝脏脂质堆积及质量变化^[16], 在本研究中(表3), 模型组大鼠肝脏湿重指数(4.13%)和组织中TC、TG水平(1.89 mmol/g, 2.38 mmol/g)较正常组均显著增加($P < 0.01$)。与模型组相比, 联合剂量组肝脏质量及肝脏湿重指数下降($P < 0.01$), 各干预组的肝脏组织中TC、TG水平显著降低约17.99%~39.08%($P < 0.01$, $P < 0.05$), 这与Zhang等^[17]的实验研究结果相符, 结果表明百合能够降低高脂喂养大鼠的肝脏脂质蓄积。

2.4 大鼠血清血脂的变化

肝脏是内源性脂质合成的主要部位, 血脂四项是评估脂质变化水平的重要参数, TC通过TG的分解产生脂肪酸供给能量, 低密度脂蛋白运输和TG合成之间不平衡的导致机体脂肪酸不能被正常代谢, 进而造成脂肪堆积。如表4所示, 与正常组相比, 模型组大鼠血清TC、TG和LDL-C含量升高、HDL-C含量降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组相比, 经过百合中、高剂量及联合组干预后, 血清TC显著降低分别为36.59%、31.30%、31.30%; TG含量分别下降29.73%、25.68%、29.73%; LDL-C含量分别下降34.04%、29.79%、34.04%($P < 0.01$, $P < 0.05$), HDL-C含量升高差异但无统计学意义($P > 0.05$), 血脂异常得到改善, 解王晶^[18]的研究同样发现百合鳞茎可改善脂质代谢与血脂水平。

2.5 大鼠血清FPG和Hb Alc的变化

如表5所示, 与正常组相比, 模型组空腹血糖值、糖化血红蛋白升高且具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 药物干预后, 各干预组空腹血糖无统计学意义($P > 0.05$), 但百合中、高剂量、联合组Hb Alc均显著降低24.37%、17.00%、16.89%($P < 0.05$, $P < 0.01$), Hb Alc表示近1~2个月内平均血糖控制情况。空腹血糖和Hb Alc的共同结果显示高脂饮食可致大鼠糖代谢紊乱, 而百合对其具有较好的调节作用。

2.6 肝脏Clock、Bmal1基因mRNA表达

q-PCR结果显示(图2)相较于正常组, 模型组肝脏中Clock、Bmal1的mRNA相对表达量均显著下调75.11%、88.36%($P < 0.01$), 与Ye等^[19]的研究同样证实了这一点, 高脂饮食能够抑制肝脏组织中Clock、Bmal1 mRNA的表达水平; 与模型组相比, 百合中、高剂量及联合Clock基因mRNA相对表达量均升高159.17%、112.22%、275.44%($P < 0.05$, $P < 0.01$); Bmal1基因mRNA相对表达量均升高228.58%、188.51%、310.83%($P < 0.05$, $P < 0.01$), 百合可上调Clock、Bmal1基因mRNA相对表达量。

表 3 各组大鼠肝脏湿重指数、肝脏TC、TG变化

Table 3 Changes in liver index, liver TC and TG of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	肝脏质量/g	体质量/g	肝脏湿重指数/%	TC/(mmol/g)	TG/(mmol/g)
CON	10	15.79 ± 1.86	471.12 ± 36.75	3.36 ± 0.38	0.99 ± 0.13	1.42 ± 0.13
MOD	8	27.53 ± 3.96**	668.33 ± 94.72**	4.13 ± 0.37**	1.89 ± 0.28**	2.38 ± 0.40**
LD-L	10	22.68 ± 3.21	597.78 ± 38.46	3.79 ± 0.42	1.55 ± 0.17 [#]	1.76 ± 0.36 [#]
LD-M	10	22.08 ± 3.32	597.93 ± 76.02	3.70 ± 0.30	1.33 ± 0.16 ^{##}	1.45 ± 0.36 ^{##}
LD-H	10	23.07 ± 3.56	614.68 ± 95.77	3.74 ± 0.36	1.44 ± 0.15 ^{##}	1.48 ± 0.37 ^{##}
LD-U	7	21.00 ± 3.60 ^{##}	586.27 ± 71.81	3.57 ± 0.28 [#]	1.32 ± 0.17 ^{##}	1.49 ± 0.56 ^{##}
MIT	8	20.50 ± 2.43 ^{##}	563.73 ± 56.43	3.61 ± 0.12	1.30 ± 0.15 ^{##}	1.57 ± 0.22 ^{##}
MET	10	20.87 ± 2.35 ^{##}	584.76 ± 62.87	3.56 ± 0.32 [#]	1.21 ± 0.23 ^{##}	1.49 ± 0.11 ^{##}

注：与 CON 比较，** $P<0.01$ ；与 MOD 比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。下同。

表 4 各组大鼠血清血脂变化 (mmol/L)

Table 4 Changes in serum lipid levels of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
CON	10	1.24±0.06	0.45±0.05	0.89±0.15	0.47±0.22
MOD	8	2.46±0.46**	0.74±0.19**	0.51±0.11**	0.94±0.18**
LD-L	10	2.02±0.40	0.58±0.18	0.63±0.24	0.77±0.23
LD-M	10	1.56±0.44 ^{##}	0.52±0.09 ^{##}	0.75±0.28	0.62±0.18 ^{##}
LD-H	10	1.69±0.62 [#]	0.55±0.13 [#]	0.67±0.17	0.66±0.11 [#]
LD-U	7	1.69±0.43 [#]	0.52±0.09 ^{##}	0.73±0.19	0.62±0.17 ^{##}
MIT	8	1.76±0.30 [#]	0.52±0.14 ^{##}	0.82±0.20	0.57±0.16 ^{##}
MET	10	1.59±0.41 ^{##}	0.50±0.06 ^{##}	0.88±0.20 [#]	0.57±0.16 ^{##}

表 5 各组大鼠血清FPG和Hb Alc变化

Table 5 Changes in serum FPG and Hb Alc of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	FPG/(mmol/L)	Hb Alc/(ng/mL)
CON	10	4.57 ± 0.42	351.94 ± 49.23
MOD	8	5.41 ± 0.44**	477.62 ± 34.94**
LD-L	10	4.91 ± 0.41	421.70 ± 44.72
LD-M	10	5.12 ± 0.65	364.29 ± 38.86 ^{##}
LD-H	10	5.33 ± 0.42	396.40 ± 46.48 ^{##}
LD-U	7	4.83 ± 0.34	396.94 ± 42.42 ^{##}
MIT	8	4.88 ± 0.40	372.62 ± 39.13 ^{##}
MET	10	5.00 ± 0.58	395.18 ± 39.60 ^{##}

2.7 肝脏Clock、Bmal1基因蛋白表达

Western Blotting 结果显示（图 3）模型组相较于正常组 *Clock*、*Bmal1* 基因蛋白表达量均显著降低 44.74%、64.43% ($P<0.01$)，高脂饮食可导致 *Clock*、*Bmal1* 基因 mRNA 及蛋白表达水平均降低^[19]。本研究中，百合中剂量、联合 *Clock* 基因蛋白表达量相较于模型组升高 52.09%、68.08% ($P<0.05$ 、 $P<0.01$)；与模型组相比，各干预组 *Bmal1* 基因蛋白表达量均显著升高 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$)，百合中剂量组与其余干预组相比 *Clock*、*Bmal1* 基因蛋白表

达量均无统计学差异 ($P>0.05$)。百合能够上调高脂饮食大鼠肝脏组织中 *Clock*、*Bmal1* 蛋白表达量。

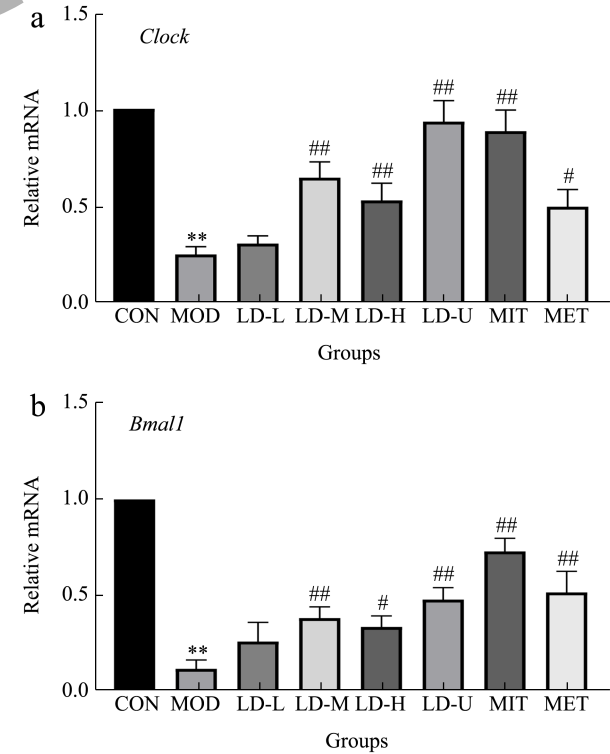
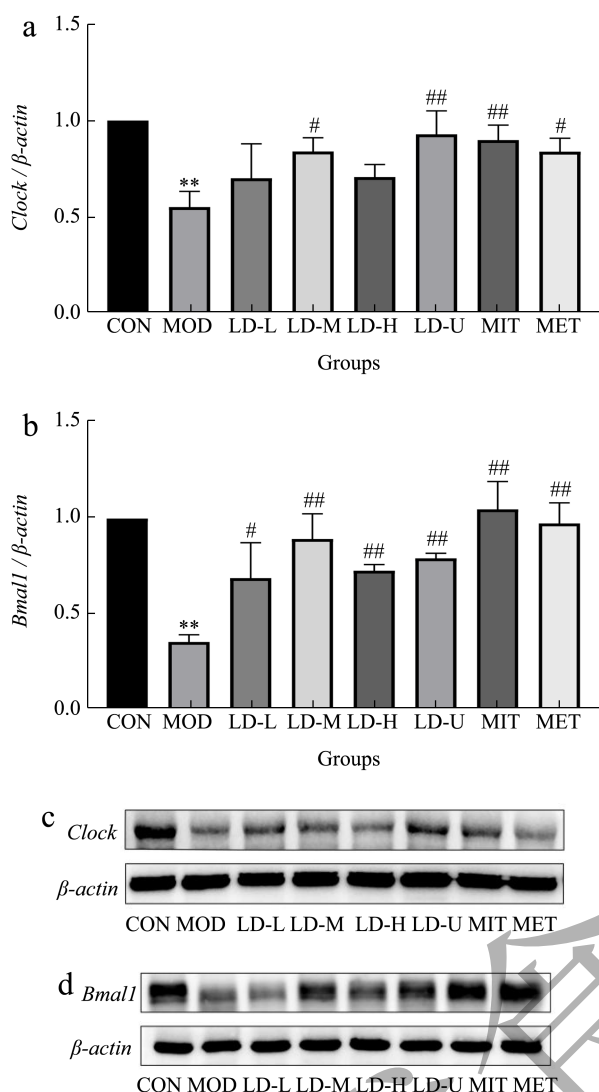


图 2 各组大鼠 *Clock*、*Bmal1* mRNA 表达比较
Fig.2 Comparison of *Clock* and *Bmal1* mRNA expression ($\bar{x}\pm s$)

图3 各组大鼠 *Clock*、*Bmal1* 蛋白表达比较Fig.3 Comparison of *Clock*, *Bmal1* protein expressions ($\bar{x} \pm s$)

2.8 讨论

本研究通过高脂饲料喂养法建立高脂大鼠模型。在对比干预前后体态指标差异发现,与模型组相比,百合各剂量组降低大鼠体质量增长量,中剂量组及联合剂量组可减少 Lee's 指数及腹围的增长,表明百合可改善高脂大鼠体态,抑制体质量增长。百合中剂量组相较于模型组,肝脏质量及肝脏湿重指数下降,虽然差异无统计学意义,但肝脏组织 TC、TG 水平显著下降,百合可有效控制高脂饮食导致的肝脏脂质蓄积。在对血脂 4 项的影响上,百合提取物中、高剂量组可显著降低 TC、TG、LDL-C 的浓度,在对血糖的影响上,百合提取物中、高剂量组与模型组相比能明显降低 Hb A1c。本实验显示百合能够改善高脂饮食造成的糖脂代谢紊乱。RT-qPCR 和 Western blot 结果表明,高脂

诱导下的大鼠肝脏 *Clock* 和 *Bmal1* 表达均明显下降,高脂饮食会使大鼠的生物钟发生紊乱;百合提取物干预后能一定程度上恢复肝脏 *Clock-Bmal1* 基因的表达,其中百合中剂量组干预效果最佳,说明百合可增强肝脏生物钟基因 *Clock-Bmal1* 基因的表达。

Clock 和 *Bmal1* 组成的异二聚体是生物钟系统不可或缺的组成成分^[20]。既往研究表明,核心生物钟基因 *Clock* 和 *Bmal1* 异二聚体作为转录因子参与调控机体脂质代谢和糖代谢^[19]。*Clock-Bmal1* 二聚体可通过过氧化物酶体增殖物激活受体- α (Peroxisomal Proliferator Activated Receptor α , *PPAR α*) 调节循环中的脂肪酸 (TC、TG) 水平^[21],通过激活 *PPAR α* 可促进肝脏摄取脂肪酸,并抑制 TG 的合成,减少 TG 的脂蛋白堆积^[22]。前期实验证实^[23],百合多糖可改善高脂饮食小鼠的肝脂肪变性,促进脂质氧化基因 *PPAR α* 表达,从而降低 TG 的含量。此外 LDL-C 作为载体,将胆固醇与 LDL 受体 (Recombinant Low Density Lipoprotein Receptor, *LDLR*) 结合转运到各组织中。肝脏生物钟基因 *Clock* 和 *Bmal1* 通过 Tribbles 假激酶 1 (Tribbles Homolog 1, *Trib1*) 介导的前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 9 型 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9, *PCSK9*),以 *PCSK9/LDLR* 轴调控胆固醇稳态,*Trib1* 是一个非节律性表达的时钟调节基因,它以 *PCSK9/LDLR* 轴为靶点,控制肝脏 *LDLR* 蛋白表达和血浆 LDL 胆固醇水平。当肝脏生物钟基因 *Bmal1* 缺陷时,会导致 *PCSK9/LDLR* 调节轴被破坏,进而血浆 LDL/VLDL 胆固醇水平升高^[24],姜伟^[25]通过体外实验证实百合皂苷可抑制细胞内源性胆固醇合成,通过抑制 *PCSK9* mRNA 转录,阻碍 *PCSK9* 对 *LDLR* 的降解,导致细胞表面 *LDLR* 数量增多,从而降低血浆 LDL-C 含量。结合本研究结果由此推测百合提取物调节脂代谢可能的机制是上调 *Clock-Bmal1* 表达,影响脂肪生成及氧化分解相关基因的表达,从而降低 TC、TG、LDL-C,减少脂肪堆积。

研究发现, *Clock-Bmal1* 二聚体能够增强胰岛 β 细胞内胰岛素表达,促进胰岛素快速向胞外分泌^[26]。肝脏中 *Bmal1* 的缺失会破坏糖代谢基因如葡萄糖转运蛋白 2 (Glucose Transporter 2, *GLUT2*) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (Phosphoenolpyruvate Carboxy Kinase, *PEPCK*) 的表达,从而导致糖异生增加,葡萄糖利用率减少,血糖升高^[27]。研究发现,百合多糖能促进胰岛 β -细胞增殖和胰岛素分

泌功能^[28]。推测百合可能通过上调 *Clock-Bmal1* 基因表达, 促进胰岛素分泌, 影响相关糖代谢基因的表达, 从而调节糖代谢。之后需要进一步探索糖代谢相关基因通路的关系, 以证实百合通过生物钟基因达到降血糖的作用机制。生物钟对糖脂代谢的影响, 除了 *Clock* 和 *Bmal1* 发挥重要作用外, 研究表明负反馈环节关键基因周期基因 (period, *Per*) 及隐花色素基因 (Cryptochromes, *Cry*) 在调控糖原代谢方面起着关键作用, 此外核受体亚家族 1 组 D 成员 1 (Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D Member 1, *Nr1d1* 又称 *REV-ERBa*) 也被发现可以调控胆固醇、胆汁酸的代谢^[29]。后续我们将进一步研究百合通过对生物钟负反馈环节表达的影响对探索对糖脂代谢的调节作用。

3 结论

本研究通过动物实验探究百合对高脂饲料喂养的大鼠糖脂代谢紊乱的调节作用, 并从肝脏生物钟的角度初步探讨了百合对大鼠糖脂代谢调节作用。百合对高脂饮食引起的体态肥胖、糖脂代谢紊乱有明显的改善作用, 推测可能增加肝脏生物钟基因 *Clock* 和 *Bmal1* 表达, 达到调节糖脂代谢的作用。本研究为百合应用于营养代谢性疾病防治及功能性健康食品的开发, 提供了一定实验科学依据, 而其更深入的分子作用机制有待今后进一步研究。

参考文献

- [1] SAKLAYEN M G. The global epidemic of the metabolic syndrome [J]. Current Hypertension Reports, 2018, 20(2): 12.
- [2] PAN Y, KONG L D. High fructose diet-induced metabolic syndrome: Pathophysiological mechanism and treatment by traditional Chinese medicine [J]. Pharmacological Research, 2018, 130: 438-450.
- [3] MUKHERJI A, BAILEY S M, STAELS B, et al. The circadian clock and liver function in health and disease [J]. Journal of Hepatology, 2019, 71(1): 200-211.
- [4] STAELS B. When the clock stops ticking, metabolic syndrome explodes [J]. Nature Medicine, 2006, 12(1): 54-55.
- [5] MI Y, QI G, GAO Y, et al. EGCG ameliorates insulin resistance and mitochondrial dysfunction in HepG2 cells: Involvement of Bmal1 [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(12): 1700440.
- [6] ZHOU J, AN R, HUANG X. Genus *lilium*: A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 270: 113852.
- [7] 肖静, 彭安林. 卷丹百合矢车菊素对CCl4所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 15-20.
- [8] 吴雄. 百合多糖对I型糖尿病大鼠的降血糖作用研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2013.
- [9] OTHMAN Z A, ZAKARIA Z, SULEIMAN J B, et al. Bee bread ameliorates vascular inflammation and impaired vasorelaxation in obesity-induced vascular damage rat model: The role of eNOS/NO/cGMP-signaling pathway [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(8): 4225.
- [10] 胡慧明, 朱彦陈, 朱巧巧, 等. 实验性高脂血症动物模型比较分析[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3709-3714.
- [11] 刘伟, 李鸿雁, 颜克松, 等. 代谢综合征大鼠模型的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(5): 1218-1221.
- [12] SINGHANAT K, APAIJAI N, SUMNEANG N, et al. Therapeutic potential of a single-dose melatonin in the attenuation of cardiac ischemia/reperfusion injury in prediabetic obese rats [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2022, 79(6): 300.
- [13] SI Y, WANG L, LAN J, et al. *Lilium davidii* extract alleviates *p*-chlorophenylalanine-induced insomnia in rats through modification of the hypothalamic-related neurotransmitters, melatonin and homeostasis of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis [J]. Pharmaceutical Biology, 2020, 58(1): 915-924.
- [14] PAN J, OUYANG X, JIN Q, et al. Hypolipidemic effect of ethanol extract from *Chimonanthus nitens* Oliv. leaves in hyperlipidemia rats via activation of the leptin/JAK2/STAT3 pathway [J]. Molecular Medicine, 2022, 28(1): 159.
- [15] 陈靓, 田星, 邹雅倩, 等. 青钱柳水提取物对果糖诱导的代谢综合征大鼠糖脂代谢的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(18): 232-241.
- [16] DING X Q, WU W Y, JIAO R Q, et al. Curcumin and allopurinol ameliorate fructose-induced hepatic inflammation in rats via miR-200a-mediated TXNIP/NLRP3 inflammasome inhibition [J]. Pharmacological Research, 2018, 137: 64-75.
- [17] ZHANG T, GAO J, JIN Z Y, et al. Protective effects of polysaccharides from *Lilium lancifolium* on streptozotocin-induced diabetic mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 65: 436-440.
- [18] 解王晶. 百合鳞茎酚类物质抗氧化及调节脂质代谢作用研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [19] YE C, ZHANG Y, LIN S, et al. Berberine ameliorates metabolic-associated fatty liver disease mediated metabolism disorder and redox homeostasis by upregulating clock genes: *Clock* and *Bmal1* expressions [J]. Molecules (Basel,

- Switzerland), 2023, 28(4): 1874.
- [20] YE Y, ABU EL HAJJA M, Obeid R, et al. Gastric bypass alters diurnal feeding behavior and reprograms the hepatic clock to regulate endogenous glucose flux [J]. JCI Insight, 2023, 8(6): e166618.
- [21] CHEN P, ZHANG R, MOU L, et al. An impaired hepatic clock system effects lipid metabolism in rats with nephropathy [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 42(5): 2720-2736.
- [22] SHIMBA S, OGAWA T, HITOSUGI S, et al. Deficient of a Clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (*Bmal1*), induces dyslipidemia and ectopic fat formation [J]. PloS One, 2011, 6(9): e25231.
- [23] KAN J, HUI Y, XIE W, et al. Lily bulbs' polyphenols extract ameliorates oxidative stress and lipid accumulation *in vitro* and *in vivo* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(12): 5038-5048.
- [24] MA D, LIU T, CHANG L, et al. The liver clock controls cholesterol homeostasis through trib1 protein-mediated regulation of pcsk9/low density lipoprotein receptor (*LDLR*) axis [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(52): 31003-31012.
- [25] 姜伟.百合总皂苷提取及其对低密度脂蛋白代谢调控作用研究[D].合肥:安徽农业大学,2023.
- [26] ZHAO R, GAO X, ZHANG T, et al. Effects of Lycium barbarum. polysaccharide on type 2 diabetes mellitus rats by regulating biological rhythms [J]. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2016, 19(9): 1024-1030.
- [27] FENG D, LAZAR M A. Clocks, metabolism, and the epigenome [J]. Molecular Cell, 2012, 47(2): 158-167.
- [28] 李玉萍,皮小芳,刘成梅,等.百合多糖降糖作用机理的体外研究[J].时珍国医国药,2012,23(8):1964-1966.
- [29] GRÉCHEZ-CASSIAU A, FEILLET C, GUÉRIN S, et al. The hepatic circadian Clock regulates the choline kinase α gene through the Bmal1-REV-ERB α axis [J]. Chronobiology International, 2015, 32(6): 774-784.