

黄皮新肉桂核酰胺 B 对 C57BL/6 小鼠的降血脂作用

郭晓敏¹, 李环通², 许泽文³, 尹朝春¹, 陈丹妮¹, 王赛男¹, 肖苏尧^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

(2. 广东茂名农林科技职业学院食品工程系, 广东茂名 525024) (3. 华润怡宝饮料(中国)有限公司, 广东深圳 518055)

摘要: 从黄皮核中提取分离, 得到单体黄皮新肉桂酰胺 B (Lansiumamide B, LB), 并进行结构鉴定, 通过细胞和小鼠实验验证, LB 具有较强的体内外降脂效果。结果表明: LB 能高效抑制 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的活性, IC_{50} 分别为 18.43、15.27 和 0.16 mg/mL; 作用于油酸 (OA) 诱导的高脂 HepG2 细胞, 浓度为 5 μ g/mL 时, 甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、丙二醛 (MDA) 分别降低了 30.77%、30.00%、58.33%、39.97%、38.84% 和 43.90%, 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、过氧化氢酶 (CAT) 以及低密度脂蛋白受体 (LDLR) 分别提高了 83.33%、253.37%、60.97%; LB 饲喂于高脂小鼠 6 周后, 体重都有明显的降低, 与高脂组有明显差异 ($P < 0.05$); 血清中的血脂四项, 给药剂量为 60 mg/kg 时, TC、TG 和 LDL-C 分别降低了 29.18%、23.69%、70.27%, HDL-C 升高了 50.51%, 说明高脂小鼠的体重和血脂四项指标都得到了很好的控制。该研究初步表明 LB 具有较好的细胞和活体降血脂作用, 是一种潜在的膳食降脂成分。

关键词: 黄皮果核; 黄皮新肉桂酰胺 B; 降脂活性

文章编号: 1673-9078(2023)04-39-48

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0471

Hypolipidemic Effect of Lansiumamide B Obtained from Wampee Seeds in C57BL/6 Mice

GUO Xiaomin¹, LI Huangtong², XU Zenwen³, YIN Zhaochun¹, CHEN Danni¹, WANG Sainan¹, XIAO Suyao^{1*}

(1. College of Food Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Department of Food Engineering, Guangdong Maoming Agriculture & Forestry Technical College, Maoming 525024, China)

(3. China Resources C'estbon Beverage (China) Co. Ltd., Shenzhen 518055, China)

Abstract: The monomer lansiumamide B (LB) was obtained from wampee seeds by extraction, separation, and structural identification. It was demonstrated through cell and mouse experiments that LB has a strong hypolipidemic effect *in vivo* and *in vitro*. The results showed that: LB could effectively inhibit the activities of α -amylase, α -glucosidase, and pancreatic lipase, with IC_{50} values of 18.43, 15.27, and 0.16 mg/mL, respectively. Acting on oleic acid (OA)-induced high-fat HepG2 cells, when the LB dose was 5 μ g/mL, triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and malondialdehyde (MDA) contents decreased by 30.77%, 30.00%, 58.33%, 39.97%, 38.84%, and 43.90%, respectively. However, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), catalase (CAT), and low-density lipoprotein receptor (LDLR) contents increased by 83.33%, 253.37%, and 60.97%, respectively. After 6 weeks of feeding high-fat mice with LB, their body weight significantly decreased compared with that of the high-fat control group ($P < 0.05$). When a 60 mg/kg LB dose was provided, TC, TG, and LDL-C contents decreased by 29.18%, 23.69%, and 70.27%, respectively, and HDL-C content increased by 50.51%. The results showed that the four indices of body weight and blood lipids of high-fat mice were all well-controlled. These results suggest that LB is effective at reducing

引文格式:

郭晓敏, 李环通, 许泽文, 等. 黄皮新肉桂核酰胺 B 对 C57BL/6 小鼠的降血脂作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(4): 39-48.

GUO Xiaomin, LI Huangtong, XU Zenwen, et al. Hypolipidemic effect of lansiumamide B obtained from wampee seeds in C57BL/6 mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 39-48.

收稿日期: 2022-04-18

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金面上项目 (2022A1515010907)

作者简介: 郭晓敏 (1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 天然产物活性功能, E-mail: 1179010675@qq.com

通讯作者: 肖苏尧 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物活性功能, E-mail: xiaosy@scau.edu.cn

blood lipids in cells and *in vivo*, and is a potential dietary hypolipidemic compound.

Key words: wampee seeds, lansiumamide B, hypolipidemic activity

高脂血症 (Hyper-Lipidemia, HLP) 是一种由于体内脂质代谢异常紊乱引起的病症^[1], 主要表现为血浆中的胆固醇 (Cholesterol, TC)、甘油三酯 (Triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (Low Density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C) 水平过高, 和高密度脂蛋白胆固醇 (High Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C) 水平过低的各种血脂成分异常^[1], 是诱发动脉粥样硬化、心血管疾病及脂肪肝的等慢性代谢疾病, 预防和控制高脂血症对防治代谢疾病和保障公共健康有重要意义。近些年来, 人们越来越倾向于通过膳食来防控高血脂, 而药食同源果蔬的降脂效果得到了越来越多的关注。

黄皮 [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] 是一种药食同源水果^[2], 被称为“岭南佳果”, 在岭南地区深受民众喜爱, 黄皮副产物黄皮核中富含高活性的酰胺类物质, 具有开发价值。黄皮核约占黄皮果质量的 30%, 化学成分丰富, 以酰胺类物质含量最多^[3], 主要由 7 种不同酰胺成分组成^[4], 其中黄皮新肉桂酰胺 B 含量最为丰富^[4], 且具有很强的生物活性^[5,6]。黄皮新肉桂酰胺 B 属于桂皮酰胺衍生物, 从近几年发表的论文来看, 桂皮酰胺及其衍生物是一类具有多种生理活性的较稳定的苯乙烯基酰胺, 具有抑制酪氨酸酶活性^[7-9]、促进细胞凋亡^[8]、降低血压、增强免疫^[1]、降血糖^[10]等多种生物活性^[11]。Matsuit 等^[12]与杨华^[13]则发现黄皮新肉桂酰胺 B 可显著降低 TNF- α 的表达, 具有较强的细胞炎症抑制活性^[14,15]。另有研究者发现地骨皮中酰胺类生物碱衍生物可改善人肝癌细胞株 HepG2 细胞脂质代谢^[16]。

本文从黄皮核中提取到高纯黄皮新肉桂酰胺 B, 对其进行结构鉴定, 然后进行体外消化酶抑制实验, 再将其作用于高脂 HepG2 细胞, 考察其细胞降脂效果; 最后以 C57BL/6 小鼠为动物模型, 通过高脂饲喂后作为高脂小鼠试验对象, 饲喂一定量的黄皮新肉桂酰胺 B, 检测物质的小鼠体重和血脂等指标, 初步评估黄皮新肉桂酰胺 B 的小鼠降脂功效。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄皮购买于广东省广州市番禺区, 为芸香科黄皮属细叶鸡心黄皮, 用清水清洗表面, 沥干, 取出果核, 洗净置于太阳底下晒干, 放置 -20 °C 冷藏备用; 人肝癌细胞株 HepG2 细胞, 中国科学院上海细胞库提供; 健康 SPF 级

雄性 4 周龄 C57BL/6 小鼠, 体重 15~18 g, 广东省医学实验动物中心, 实验动物合格证明编号: 44007200098041, 实验动物使用许可证号: SCXK (粤) 2018-0002, 于 SPF 级动物实验室饲养 (饲养条件: 温度 (22 \pm 2) °C, 相对湿度 40%~70%, 昼夜间断照明), 实验周期为 12 周, 实验动物期间自由进食和饮水。

甲醇 (色谱纯), 天津星马科技发展有限公司; AB-8 大孔树脂, 天津波鸿树脂科技有限公司; Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶, 北京杰辉博高生物技术有限公司; 四甲基偶氮唑蓝 (Methyl Thiazolyl Tetrazolium, MTT)、阿拉伯树胶粉、阿卡波糖、奥利司他、4-硝基苯棕榈酸酯 (PNPP) 对硝基苯基- β -D 吡喃葡萄糖苷 (PNPG)、胰脂肪酶、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶、脱氧胆酸钠、油酸、二甲基亚砜 (DMSO), 上海源叶生物科技有限公司; 氘代甲醇-D4, 上海麦克林生化科技有限; 高糖培养基 (DMEM)、磷酸缓冲液 (PBS)、双抗 (链霉素和青霉素)、胎牛血清 (FBS)、胰酶, Gibco 公司; 所用试剂盒均为南京建成生物工程研究所; 所有分离用有机溶剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Enspire2300 多功能酶标仪, 美国 PE 公司; BDS 200 倒置显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; CCL-170B-8 二氧化碳培养箱, 新加坡艺思高科技有限公司; JY 92-IIID 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; ME204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; LC-10A 高效分析液相色谱仪, 日本岛津公司; LC-8A 制备液相色谱仪, 日本岛津公司; 超高压液相色谱/四级杆串联飞行时间质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司; AVANCE NEO 600 超导核磁共振谱仪, 瑞士 Bruker Biospin AG; TYSP-100 高速多功能粉碎机, 浙江省永康市红太阳机电有限公司; RE-52A 旋转蒸发器, 上海荣亚生化仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 黄皮核酰胺富集及单体制备

黄皮核酰胺提取及制备根据文献^[17]做相应操作的修改: 黄皮果干燥、粉碎, 采用 $\phi=75\%$ 乙醇水溶液提取黄皮果核粉, 提取液旋蒸浓缩, 浓缩液采用乙酸乙酯萃取, 萃取液旋蒸干燥得萃取物, 萃取物用甲醇水溶液溶解。用高效液相色谱分析萃取物, 色谱条件为: ECOSIL 120-5-C18 EPS (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动

相 0.1%甲酸水 (A), 甲醇溶液 (B), 进行梯度洗脱 (0~5 min, 50%~70% B; 5~20 min; 70%~90% B; 20~25 min, 90%~95% B), 流速 0.6 mL/min, 色谱柱温度 30 °C, 进样量 10 μ L。以不同体积分数甲醇作为洗脱剂, 最终选取 90% 甲醇对先后对样品使用 AB-8 大孔树脂、Sephadex LH20 葡聚糖凝胶进行纯化, 再制备液相色谱进行纯化。色谱条件为: 色谱柱为岛津 Shim-pack ODS 型 C18 柱 (250 mm \times 20 mm, 5 μ m); 以 0.1%甲酸水 (A), 甲醇溶液 (B) 为流动相, 洗脱程序: 0~5 min, 70% B; 5~10 min; 70%~80% B, 10~15 min, 85% B, 检测波长 280 nm, 体积流量为 10 mL/min, 进样量为 3 mL。制备得到足够量黄皮核酰胺单体用于后续的结构检测和活性研究。

1.3.2 黄皮核酰胺单体结构鉴定

1.3.2.1 超高效液相色谱-质谱分析

色谱条件: 用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱, 流动相 0.1%甲酸水溶液 (A)-甲醇溶液 (B) 梯度洗脱 (0~5 min, 70% B; 5~10 min, 70%~80% B; 10~15 min, 85% B), 流量 0.2 mL/min, 色谱柱温度 30 °C, 进样量 2 μ L。质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子全扫描模式, 干燥气温度 320 °C, 干燥气流量 10 L/min, 鞘气温度 350 °C, 雾化气电压 255.12 kPa, 毛细管电压 4 kV (ESI⁺) 和 3.5 kV (ESI⁻), 碎裂电压 165 V, 扫描采集范围均为 m/z 50~1 000。

1.3.2.2 核磁共振氢谱分析

取 10.0 mg 的样品, 以氘代甲醇为溶剂, 在 300 K 的操作温度下进行核磁共振氢谱表征。

1.3.3 黄皮核酰胺单体的体外消化酶抑制效果检测

α -淀粉酶抑制: 采用刻度试管进行实验, 0.4 mL 的 α -淀粉酶溶液与 0.3 mL 样液溶液在 37 °C 预混合 10 min, 随后加入 0.3 mL 淀粉溶液在 37 °C 混合 15 min。最后, 加入 2 mL DNS 试剂煮沸 10 min。冷却后, 用酶标仪在 540 nm 处测定各组的吸光度值 (式 1)。 α -葡萄糖苷酶抑制: 采用 96 孔板反应体系, 向孔板内加入一定量的不同浓度的活性样品, 加入 1 U/mL 酶溶液和抑制剂在 37 °C 下反应 10 min 后加入 7.5 mmol/L PNPG 在 37 °C 下反应 25 min。阿卡波糖为阳性对照。用酶标仪测定各反应体系在 405 nm 处的吸光度值 (式 2)。胰脂肪酶抑制: 将 25 μ L 样品溶液与 25 μ L 胰胰脂肪酶溶液于 96 孔板中混合均匀, 胰脂肪酶用 Tris-HCl 缓冲液溶解, 孵育 10 min 后, 取出 96 孔板, 加入 50 μ L 0.5 mg/mL 4-硝基苯棕榈酸酯底物溶液, 充分混匀, 于 37 °C 反应 30 min, 于 405 nm 处测定其吸光值, 计算各样品对胰脂肪酶的抑制率 (式 3)。

$$R_1 = \left(1 - \frac{As_1 - Ac_1}{Ac_2}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R_1 —— α -淀粉酶活性抑制率, %;

As_1 ——0.3 mL 的样品溶液和样品溶液的吸光值;

Ac_1 ——0.4 mL 的蒸馏水和 0.3 mL 的样品溶液的吸光值;

Ac_2 ——0.3 mL 的蒸馏水和 0.4 mL 的酶溶液的吸光值。

$$R_2 = \left(1 - \frac{As_2 - Ac_3}{Ac_4}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R_2 —— α -葡萄糖苷酶活性抑制率, %;

As_2 ——50 μ L 的各个浓度样品溶液和 100 μ L 的 α -葡萄糖苷酶溶液的吸光值;

Ac_3 ——100 μ L 的缓冲液和 50 μ L 的各个浓度样品溶液的吸光值;

Ac_4 ——50 μ L 的缓冲液和 100 μ L 的 α -葡萄糖苷酶溶液的吸光值。

$$R_3 = \left(1 - \frac{A_1 - A_0}{B_1 - B_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

R_3 ——脂肪酶活性抑制率, %

A_0 ——用 Tris-HCl 缓冲液替代胰脂肪酶溶液, 样品空白组的吸光值;

A_1 ——添加 Tris-HCl 缓冲液和胰脂肪酶溶液, 不加样品组的吸光值;

B_1 ——对照组的吸光值;

B_0 ——不加样品、酶的空白对照组的吸光值。

1.3.4 黄皮核酰胺对油酸诱导细胞的降脂效果实验

1.3.4.1 油酸的配制

取 0.316 mmol 油酸, 溶于 3.06 mL 0.1 mmol/L NaOH 中, 配成 10 mmol/L 油酸造模剂。用滤膜过滤除菌, 置于 -20 °C 冻存储用。在实验前, 置于 37 °C 水浴锅解冻 15 min, 用培养基将其分别稀释为 0、200、400、600、800、1 000 μ mol/L。

1.3.4.2 油酸诱导 HepG2 细胞脂质堆积模型的建立

取对数生长期的细胞, 加入完全培养基 (含 10% FBS 的 DMEM) 制成单细胞悬液, 按照血细胞计数法调整细胞密度为每毫升 5×10^4 个。将细胞接种到 12 孔板中, 每孔 1 mL, 常规培养 24 h。配制 100 mmol/L 油酸储备液; 和 10% 的牛血清白蛋白溶液; 55 °C 水浴条件下将上述储备液逐滴加入 10% BSA 溶液中, 吹打均匀, 配得油酸浓度为 10 mmol/L 的造模剂溶液, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌保存备用。10 mmol/L 油酸造模剂, 使用含完全培养基稀释成 0、200、400、600、800、1 000 μ mol/L。从二氧化碳培养箱中取出 12 孔板, 显微镜观察细胞生长情况。将孔板放入生物安全柜中, 吸取旧的培养基。使用 PBS 轻柔洗涤一遍。加入不同浓度的 1 mL 油酸造模剂, 轻柔晃动

孔板,使培养基分布均匀,继续培养 24 h。

将造模成功的细胞从二氧化碳培养箱中取出,吸弃旧的培养基,每孔用 0.5 mL PBS 清洗两次后稍微晾干,按照试剂盒的操作进行染色,待孔板晾干后显微镜观察染色结果并拍照。

1.3.5 LB 对 HepG2 细胞的降脂功效

1.3.5.1 细胞培养

将对数生长的细胞悬液调至每毫升 5×10^4 个,分别加入各孔,每孔 200 μ L,培养过夜。将样品稀释至不同的浓度,每孔加 200 μ L,空白组和对照组加等量的培养液,每组设 6 个复孔,将培养板移入 37 $^{\circ}$ C、 $\phi=5\%$ CO₂ 细胞培养箱中孵育 24 h。孵育结束后,在无菌条件下于各孔加入 150 μ L 5 mg/mL MTT 溶液,在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h 终止培养。终止培养后,移去细胞上清液,再加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解后,在 490 nm 波长的酶标仪上测定各孔吸光度值。

$$C = \frac{A_{\text{试验}}}{A_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

C——细胞存活率, %;

$A_{\text{试验}}$ ——试验组的吸光度;

$A_{\text{空白}}$ ——对照组的吸光度。

1.3.5.2 药物处理以及分组

以上述方法培养细胞 24 h,先通过油酸培养细胞 24 h,洗掉油酸,换完全培养基,将培养好的细胞分成 4 组,分别加入样品浓度为 0、1.25、2.5、5 μ g/mL,于培养箱孵育 24 h,然后通过油红 O 染色,显微镜观察、拍照,评估。

1.3.5.3 HepG2 细胞 TG、TC、HDL-C、LDL-C、AST、ALT、MDA、CAT 的含量的测定

待细胞经药物处理结束后,吸弃 6 孔板中的培养基,用 PBS 洗涤 2 次以确保残留的培养基和复合物清洗干净,用细胞刮刀或刮铲将孔板中贴壁的细胞轻轻刮下后,每孔加入 200 μ L 的 PBS 冲洗,收集细胞悬液。将细胞悬液转移至 2 mL 离心管中,冰浴状态下使用尺寸为 $\phi 2$ 的变幅杆,进行超声破碎处理,超声参数:总时长 4 min,工作时间 3 s,间歇时间 12 s,超声功率 25%。根据试剂盒方法测定细胞样液中的 TG、TC、HDL-C、LDL-C、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT) 的含量。

1.3.5.4 HepG2 细胞中低密度脂蛋白受体 LDLR 的含量的测定

待细胞经药物处理结束后,吸弃 6 孔板中的培养基,用 PBS 洗涤 2 次以确保残留的培养基和复合物清洗干净,用细胞刮刀或刮铲将孔板中贴壁的细胞轻轻刮下后,每孔

加入 200 μ L 的 PBS 冲洗,收集细胞悬液。根据试剂盒方法测定细胞样液中 LDLR 的含量。

1.3.6 黄皮核酰胺的高脂小鼠降脂效果评估

以 C57BL/6 小鼠为试验动物,高脂饮食饲养 12 周,模型组体重比对照组体重多 20% 以上造模成功,造模成功后模型组分成 4 组,每组 12 只,分别饲喂样品量为:0、20、40、60 mg/kg,通过灌胃于小鼠 6 周,记录小鼠的体重变化和日常活动情况,试验结束后取血、称重、解剖等,根据试剂盒法测定血清中 TG、TC、HDL-C、LDL-C 的含量。

1.3.7 数据处理

采用 Mathtype 软件进行公式插入,Microsoft Office 2016、Origin 2016 和 IBM SPSS 22.0 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 黄皮核酰胺分离纯化及结构鉴定

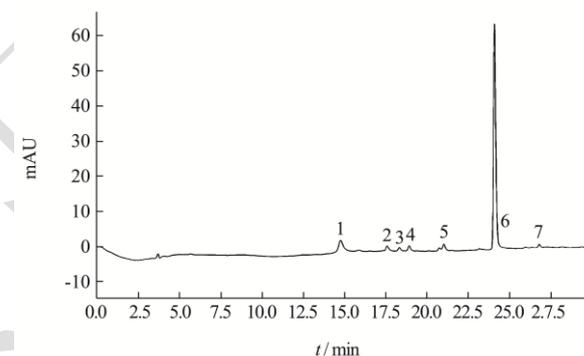


图1 核酰胺结晶体液相图

Fig.1 Liquid chromatogram of wampee seeds

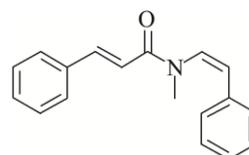


图2 六号峰结构式

Fig.2 Structural formula of 6[#] peak

注: N-甲基-N-苯乙酰基桂皮酰胺,黄皮新肉桂酰胺 B。

提取出黄皮核酰胺,并采用液相色谱和分析,利用“面积归一化法”得出其纯度为 96.7%。如图 1 所示,核酰胺结晶体的液相图显示有 7 个主要成分,这与文献报道^[18]相一致。将液相图上的 5 号峰分离纯化得到单体,得率为 0.30% 左右;对其进行质谱和核磁检测,结果显示,6 号峰为 N-甲基-N-苯乙酰基桂皮酰胺,淡黄色晶体 (CH₃OH); ESI-MS m/z : 264.1[M+H]⁺; 分子式为 C₁₈H₁₇NO; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.78~7.59 (m, 1H), 6.84 (d, J=8.06 Hz, 1H), 6.71~6.63 (m, 1H), 6.47 (dd, J=65.86, 8.63 Hz, 6H), 6.17 (d, J=8.43

Hz, 1H), 3.91~3.75 (m, 1H), 3.47~3.25 (m, 3H), 2.31~2.23 (m, 1H), 1.37~1.23 (m, 1H), 0.89 (s, 1H), 0.00 (d, J=3.08 Hz, 1H)。以上数据与文献^[19]报道的一致,为黄皮新肉桂酰胺B,如图2。

2.2 黄皮新肉桂酰胺B的消化酶抑制活性

检验了LB对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的活性影响,结果如图3所示,黄皮新肉桂酰胺B对三种消化酶具有明显的抑制作用,且呈剂量依赖关系。

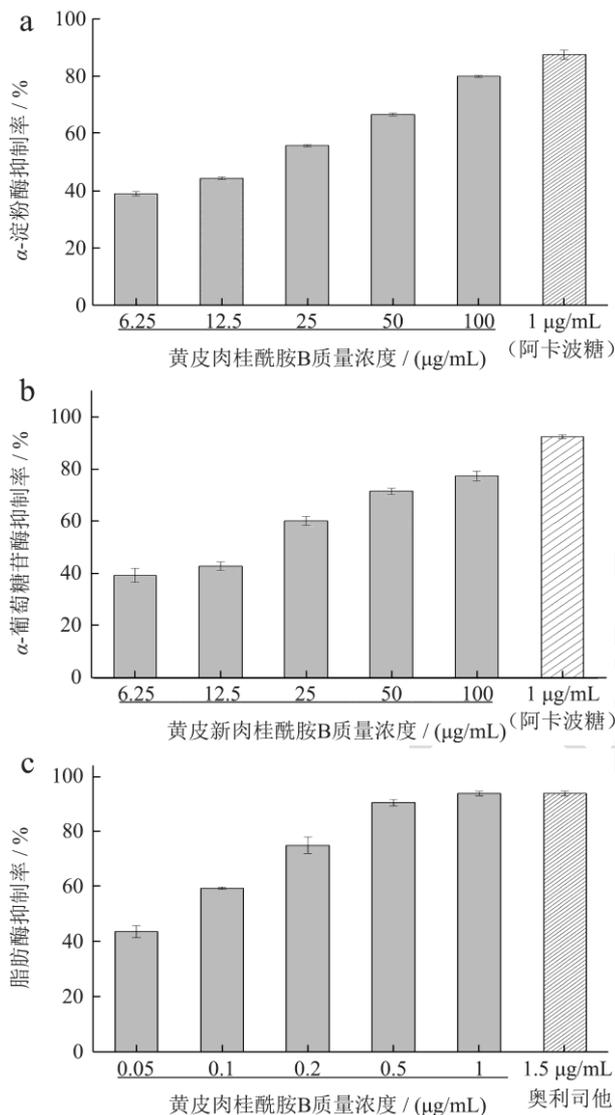


图3 黄皮新肉桂酰胺B对3种酶抑制活性的影响

Fig.3 Effects of lansiumamide B on the inhibitory activities of three enzymes

注:数据以均数 \pm 标准误表示($n=3$); a、b、c分别为黄皮新肉桂酰胺B对 α -淀粉酶活性、 α -葡萄糖苷酶活性、胰脂肪酶活性的抑制作用。

LB对 α -淀粉酶具有一定的抑制作用,其 IC_{50} 为 $18.43 \mu\text{g/mL}$,且抑制酶的能力随着浓度的增大而增强。有研究表明,物质分子中的酰基有利于抑制 α -淀粉酶的

活性^[20],而LB含酰基取代基的基团可能起到了主要的 α -淀粉酶抑制作用。

LB对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 $15.27 \mu\text{g/mL}$,且有一定的剂量关系,抑制酶的能力随着浓度的增大而增强。与范玉娇^[17]从黄皮种子中酰胺类生物碱对 α -葡萄糖苷酶抑制效果相似。有研究报道,黄皮果实分离出的咪唑生物碱^[21]、肉桂酰胺类化合物皆具有强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性^[22],本文的活性物LB属于肉桂酰胺类物质。 α -葡萄糖苷酶是小肠肠道细胞膜上关键酶,具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的物质可有效的缓解餐后血糖升高,能预防和控制糖尿病、高血脂的相关性疾病发生。

黄皮新肉桂酰胺B对胰脂肪酶的 IC_{50} 为 0.16 mg/mL ,在 0.20 mg/mL 黄皮新肉桂酰胺B对胰脂肪酶的抑制率为75.6%,具有明显的抑制作用。有研究表明酰胺化合物中氢键可与胰脂肪酶的受体结合能力增加,其中的氮原子可增强其抑制胰脂肪酶的活性^[23]。膳食中90%脂肪都是由混合型的甘油三酯组成,在消化过程中,胰脂肪酶可以水解50%~70%的脂肪^[24],因此抑制胰脂肪酶的活性可以减少人体对于脂肪的吸收,减少甘油三酯的堆积,从而有一定的调节血脂作用^[25]。

2.3 黄皮新肉桂酰胺B的细胞降脂活性检测

2.3.1 黄皮新肉桂酰胺B对HepG2细胞的安全浓度范围测定

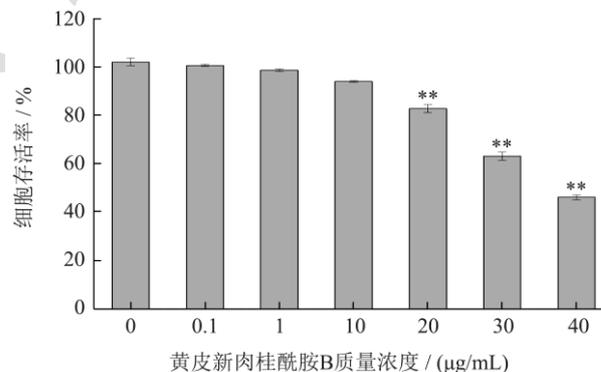


图4 黄皮新肉桂酰胺B对HepG2细胞存活率的效果

Fig.4 Effect of lansiumamide B on survival rate of HepG2 cells

注:数据以均数 \pm 标准误表示($n=6$)*表示其他处理组与空白组相比有显著差异($P<0.05$),**表示其他处理组与空白组相比有极显著差异($P<0.01$)。图5同。

为了确定黄皮新肉桂酰胺B对HepG2肝癌细胞的安全作用浓度,试验选取质量浓度为0、0.1、1、10、20、30和40 $\mu\text{g/mL}$ 的药物组,用噻唑蓝(MTT)法测定细胞的存活率,结果如图4所示,在质量浓度为0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ 时,与空白组相比,存活率无明显差异($P>0.05$),表明在20 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度以内对细胞无毒副作用,而到20 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率低于90%,由

此, 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄皮新肉桂酰胺 B 对 HepG2 细胞属于安全质量浓度范围。本研究的预实验显示, 黄皮新肉桂酰胺 B 质量浓度在 1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时就有明显的降脂效果, 因此认为, 在实验质量浓度下黄皮新肉桂酰胺 B 对细胞无毒副作用。

2.3.2 油酸造模浓度范围的测定以及脂质堆积模型的构建

为了确定油酸 (Oleic Acid, OA) 造模剂对 HepG2 肝癌细胞的安全作用浓度范围, 试验选取 0、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的油酸模型组, 用 MTT 法测定细胞的存活率, 结果如图 5 所示, 油酸浓度在 0~400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 范围以内, 细胞存活率均在 90% 以上, 属于安全浓度范围。染色后由显微镜观察 (图 6), 空白组的细胞内有少量脂滴, 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 油酸组的细胞内出现红色圆形脂滴的堆积, 说明脂肪堆积模型构建成功。选取 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的油酸为 HepG2 细胞油酸造模浓度。

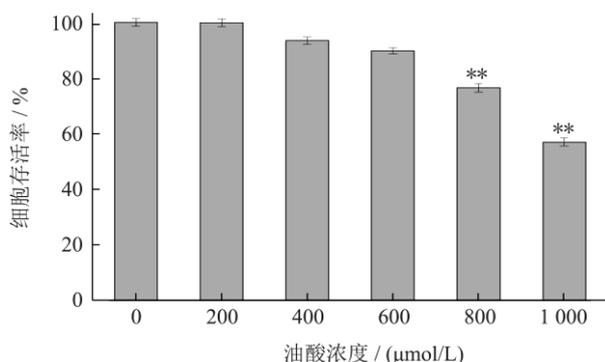


图5 细胞油酸造模浓度的效果

Fig.5 Effect of cell oleic acid modeling concentration

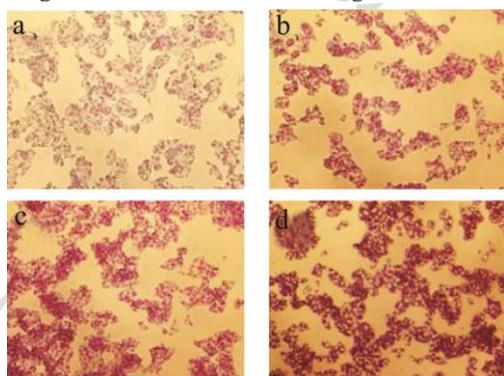


图6 不同浓度油酸培养 24 h 后油红 O 染色图

Fig.6 Oil red O staining after 24 h culture with different concentration of oleic acid

注: a 为空白组, b 为 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 油酸, c 为 400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 油酸, d 为 600 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 油酸。放大倍数 10 \times 。

2.3.3 黄皮新肉桂酰胺 B 有效减轻 HepG2 细胞油脂堆积

采用 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 油酸先培养 24 h, 后加入 LB 培养 24 h, 再对细胞进行油红 O 染色, 细胞内脂肪滴会被染

成红色, 细胞的其他基质不变色, 通过显微镜观察, 结果如图 7 所示, 可明显看出, 空白组脂肪堆积很少, 而模型组的细胞脂肪堆积非常明显, 细胞基本都呈红色, 而在 1.25~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下, 随着药物浓度的增大, 细胞内的油红脂质堆积逐渐减弱, 细胞内红色减少, 白色间隔越来越多, 表明油脂堆积在减少, 由此初步说明药物能一定程度上减轻细胞内的脂质堆积。

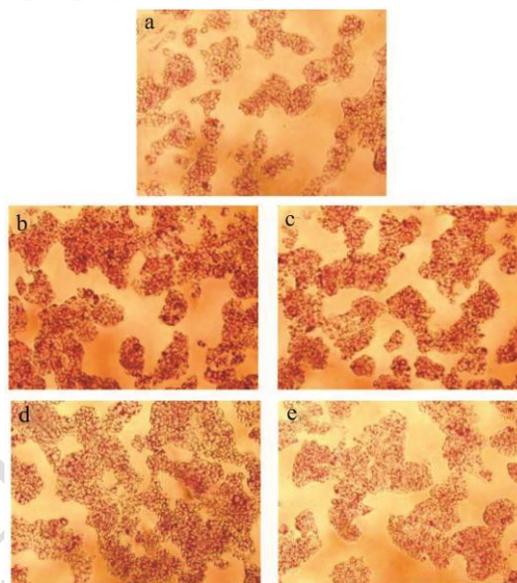


图7 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 油酸与 HepG2 细胞共培养 24 h 后油红 O 染色图

Fig.7 Oil red O staining of HepG2 cells cocultured with 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ oleic acid for 24 h

注: a: 空白组; b: 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 油酸; c: 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LB; d: 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LB; e: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LB。放大倍数 10 \times 。

2.3.4 黄皮新肉桂酰胺 B 作用于高脂 HepG2 细胞的 TG、TC、LDL-C、HDL-C 含量的测定

选取 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的油酸为 HepG2 细胞油酸造模 24 h 后, 分成 4 组, 再分别给予黄皮新肉桂酰胺 B 质量浓度为 0、1.25、2.5、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四个实验组培养 24 h, 然后检测各组细胞中 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 含量, 结果如图 8 所示, 模型组的 TG、TC、LDL-C 的含量都明显 ($P < 0.01$) 高于空白组, 而 HDL-C 含量均低于空白组, 说明模型构建成功。在将酰胺 B 给予细胞培养 24 h 后, 在 1.25~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下, 与模型组相比, TG、TC、LDL-C 水平分别降低 30.77%、30.00%、58.33%, HDL-C 水平升高 83.33%, 且在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, LDL-C 含量均能恢复到接近空白组的水平, 而 HDL-C 含量逐渐恢复到空白组的水平, 由此可见, 黄皮新肉桂酰胺 B 对高脂细胞具有明显的降低血脂指标的效果。LB 可能通过抑制脂肪酸合成和脂肪酸酯化生成 TG^[26], 同时 OA 促进细胞内 TG 分泌^[27]。白茶显著下调 TG 合成基因, 减少细胞内 TG 积累, 再通过下调载脂蛋白 B 和微粒体甘油三酯, 以及转移蛋白的表达, 从而降低 LDL-C 的产生^[28]。

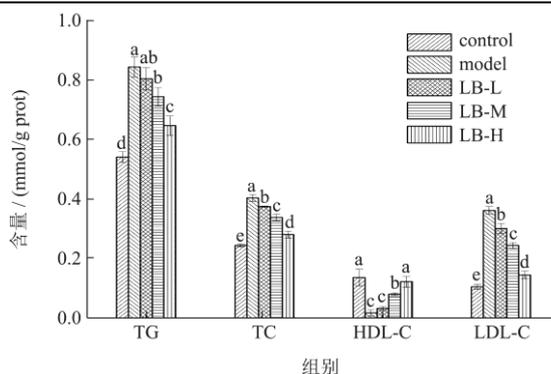


图8 HepG2 细胞的 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 含量

Fig.8 TG, TC, LDL-C and HDL-C contents in HepG2 cells

注：数据以均数±标准误表示 (n=3)，基于单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 的结果，不同字母的柱状图显示差异有统计学意义 (P<0.05)，而相同字母的柱状图显示差异无统计学意义 (P>0.05)。

2.3.5 黄皮新肉桂酰胺 B 作用于高脂 HepG2 细胞的 ALT、AST、CAT、MDA 含量的测定

检测了 HepG2 细胞的 ALT、AST、CAT、MDA 含量，结果如图 9 所示，相较于对照组，模型组的 ALT、AST 及 MDA 含量均显著提高 (P<0.05)，CAT 活性则显著降低 (P<0.01)，而 LB 实验组的上述结果均有极大的改善，当浓度为 5 μg/mL 时，细胞中 ALT 活力为 10.73 U/g prot，AST 活力为 29.10 U/g prot，MDA 的含量为 8.69 mmol/g prot，CAT 活性为 7.38 U/g prot，与模型组相比前三者分别下降了 39.97%、38.84% 和 43.90%，而 CAT 则提高了 253.37%。

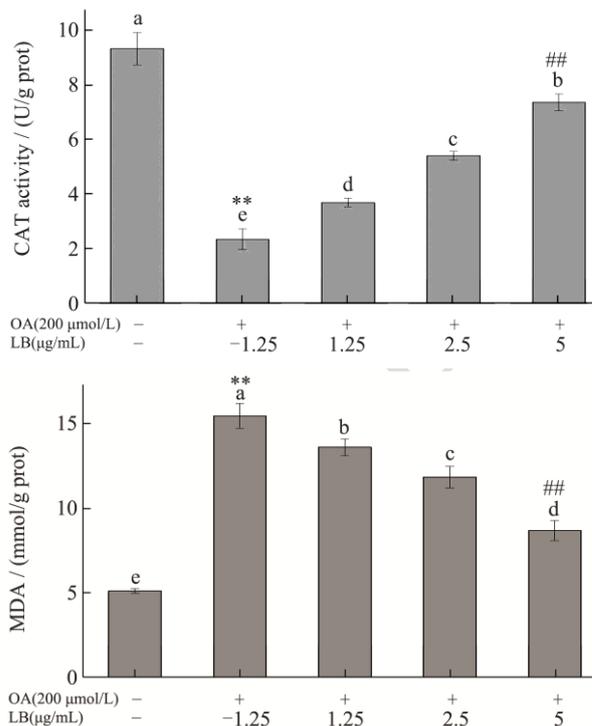
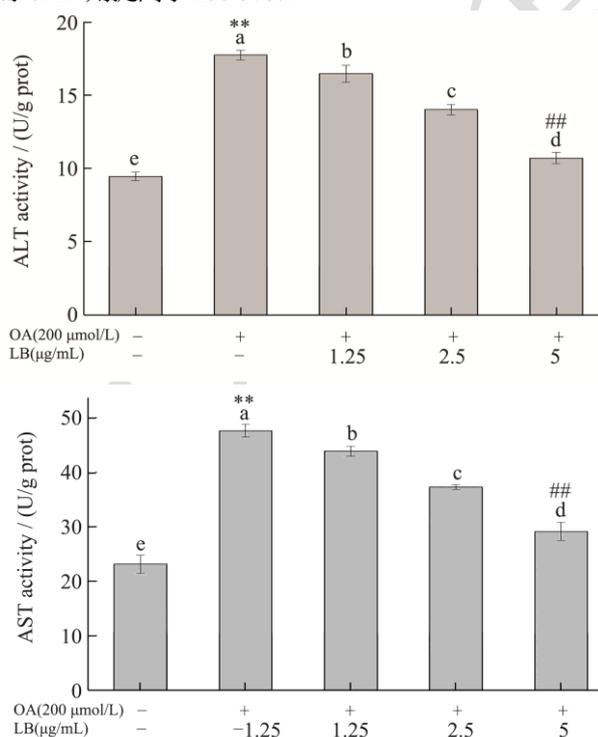


图9 HepG2 细胞的 ALT、AST、CAT 和 MDA 含量变化

Fig.9 ALT, AST, CAT and MDA contents in HepG2 cells

注：与正常组相比，**表示差异极显著 (P<0.01)。与模型组相比，##表示差异极显著 (P<0.01)。图 10 同。

血清转氨酶、谷丙转氨酶和谷草转氨酶常被认为是肝脏损伤的敏感标志物。慢性高脂饮食习惯常导致肝脏脂质积累，导致肝脏抗氧化能力降低，肝脏氧化应激指数升高。ALT 主要存在于细胞中，其中肝细胞含量最多。ALT 是诊断病毒性肝炎、中毒性肝炎的重要指标。处于正常情况时候，血清中的 AST 含量较低，但相应细胞受损时，由于细胞膜通透性增加，使得胞浆内 AST 的释放，从而引起血清中 AST 浓度升高。LB 能降低高脂细胞内 ALT、AST 含量，表明 LB 能减轻 OA 对细胞的损伤^[29]，可能是激活 STAT3 缓解 OA 诱导的细胞损伤^[30]。

过氧化氢酶 (CAT)，是一种能将过氧化氢分解成氧和水的酶，存在于动、植物体内的酶类物质。CAT 是过氧化物酶体的标志酶，可直接与超氧阴离子和过氧化羟基相互作用，清除机体内的氧自由基，抑制脂质过氧化，从而减少氧化损伤^[31]。可能是 LB 具备清除自由基的能力，从而一定程度上抑制了细胞内脂质过氧化，增强了细胞的抗氧化系统^[32]。

丙二醛 (MDA) 是脂质过氧化产物的稳定代谢物，因为它可以通过破坏细胞膜中的不饱和脂肪酸，从而导致细胞损伤，因此可通过测定 MDA 水平，反映脂质过氧化和细胞损伤的程度^[32]。LB 能降低细胞内 MDA 含量，表明 LB 可通过抑制肝脏脂肪生成以及增强肝脏抗氧化

能力来调节脂质积累^[33]。LB 减少细胞内 MDA 水平,还可增加提高酶系统的 CAT 活力,减轻氧化应激对细胞的影响^[34]。刘云等^[35]从黄皮中分离出来的黄皮酰胺,能有效抑制小鼠机体内由于酒精诱导的脂质过氧化作用,降低了 MDA 的表达,也使得脑组织和肝组织浆液中谷胱甘肽过氧化物酶的活力显著增强。

2.3.6 黄皮新肉桂酰胺 B 作用于高脂 HepG2 细胞的 LDLR 含量的测定

对高脂 HepG2 细胞的 LDLR 含量进行了测定,结果如图 10 所示,相较于对照组,OA 培养 HepG2 细胞 24 h 后的高脂模型组细胞的 LDLR 含量极显著降低 ($P<0.01$),表明高脂抑制了 LDLR 的表达;给予 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 培养 24 h,细胞内 LDLR 表达量提升了 60.97%,几接近于正常细胞水平,表明 LB 可提高细胞膜上低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的表达。

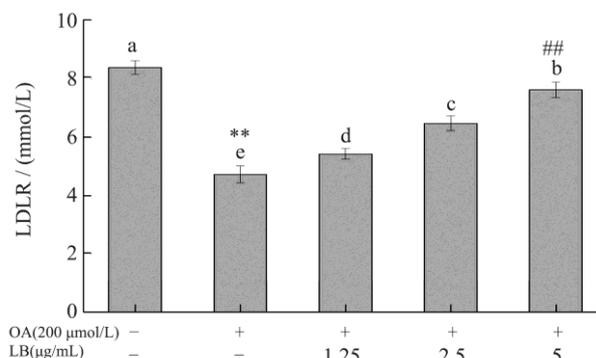


图 10 HepG2 细胞的 LDLR 含量

Fig.10 LDLR contents in HepG2 cells

LDLR 是一种在肝脏、血管内壁等组织中大量表达的膜受体蛋白,通过细胞膜表面的内吞作用结合 LDL-C 进入细胞内释放出胆固醇进行代谢,然后重新回到膜表面进入下一次循环^[36,37]。若细胞表面 LDLR 减少,就会导致 LDL-C 代谢出现障碍,LDL-C 大量滞留在血浆中^[28],造成高胆固醇血症和动脉硬化性心血管疾病风险的增加,目前公认为 LDLR 是调控 LDL 的核心所在^[38],因此 LDLR 水平的调控机制成为研究和开发降脂药物的研究热点^[39,40]。LB 能提升高脂 HepG2 细胞的 LDLR 含量,初步表明 LB 可通过提升 LDLR 含量来实现降脂功效,这为 LB 降脂活性机理研究提供了思路。

2.4 黄皮新肉桂酰胺 B 对高脂小鼠降脂效果评价

2.4.1 黄皮新肉桂酰胺 B 对高脂小鼠体重减轻效果

将黄皮新肉桂酰胺 B 饲喂于高脂小鼠 6 周,然后通过测量体重,取血液,进行检测。体重结果如图 11 所示,高脂小鼠模型组的体重远高于对照组 ($P<0.05$),具有显著性差异;而给药组与高脂组相比,体重都有明显的

降低,与高脂组有明显差异 ($P<0.05$)。从上述数据可见, LB 能有效地降低高脂小鼠的体重,具有明显的降脂效果,而且高剂量组已与对照组无显著差异 ($P>0.05$)。但是,从低中高三个剂量组比较来看,三者之间差异不显著 ($P>0.05$),可见剂量效应不是特别明显,这可能与饲喂时间不够长有一定关系。

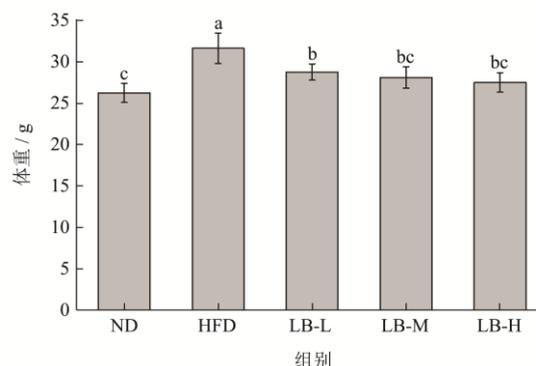


图 11 不同实验组小鼠体重比较

Fig.11 Comparison of body weight of mice in different experimental groups

注:数据以均数±标准误表示 ($n=12$)。基于单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 的结果,不同字母的柱状图显示差异有统计学意义 ($P<0.05$),相同字母的柱状图显示差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4.2 小鼠血清四项指标监测效果

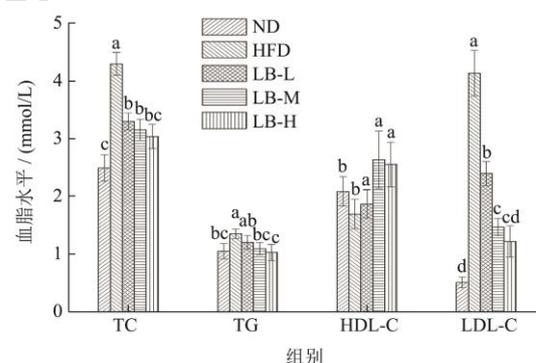


图 12 不同实验组小鼠血脂四项比较

Fig.12 Comparison of four lipid levels in mice of different experimental groups

注:数据以均数±标准误表示 ($n=12$)。基于单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 的结果,不同字母的柱状图显示差异有统计学意义 ($P<0.05$),相同字母的柱状图显示差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

小鼠血清中的血脂四项检测结果见图 12 所示,高脂组 (HFD) 的 TC、TG 和 LDL-C 都明显高于对照组 (ND 组), HDL-C 则低于对照组,表明高脂组的高脂血症现象较为明显;给药组在 60 mg/kg 的剂量下, TC、TG 和 LDL-C 分别下降了 29.18%、23.69%、70.27%, HDL-C 升高了 50.51%,尤其高剂量组 (LB-H) 的四项指标跟对

照组没有显著差异,说明在服用样品 6 周后,高脂小鼠的血脂四项指标都得到了很好的控制,结合小鼠体重的变化情况,基本说明 LB 对实验小鼠有明显的降脂效果。

3 结论

本论文的研究结果表明,黄皮新肉桂酰胺 B (LB) 作为黄皮核中主要的活性物质,对高脂细胞具有较强降脂功效,对高脂小鼠具有明显降脂减肥作用,这为黄皮果核酰胺的降脂作用提供了研究基础。关于 LB 的降脂机理,本文涉及到的主要是 LB 对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶活性具有明显抑制作用,从而降低膳食中糖类物质的水解和吸收,间接起到降脂作用;LB 提升细胞中 LDLR 的表达量,增加了 LDL-C 的代谢,直接起到降脂作用。机体代谢是一个复杂体系,需要从多方面的指标评价降脂的作用机制,后续还需进一步深入研究活体的脂肪代谢通路。

参考文献

- [1] Carlos E. Puerto Galvis V V K. Synthesis of zanthoxylamide protoalkaloids and their in silico ADME-Tox screening and in vivo toxicity assessment in zebrafish embryos [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 127: 291-299.
- [2] 林春瑶,刘功良,李南薇,等.黄皮功能成分及加工研究进展[J].*中国酿造*,2020,39(11):25-29.
- [3] Fan Y, Chena H, Mei W, et al. Nematicidal amide alkaloids from the seeds of *Clausena lansium* [J]. *Fitoterapia*, 2018, 128: 20-25.
- [4] 申文伟,李雯,王国才,等.黄皮核的化学成分[J].*暨南大学学报(自然科学与医学版)*,2012,33(5):506-509.
- [5] 张均田,段文贞,刘少林,等.(-)黄皮酰胺的抗老年痴呆作用[J].*医药导报*,2001,7:403-404.
- [6] 陈惠琴,范玉娇,蔡彩虹,等.黄皮种子的化学成分及生物活性研究[J].*中草药*,2019,50(2):324-329.
- [7] Chai W, Chong O, Ma Z, et al. Anti-alpha-glucosidase and antityrosinase activity of condensed tannins from the bark of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels with antiproliferative and apoptotic properties in B(16) mouse melanoma cells [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 86: 205-214.
- [8] Omar A M, El-Araby M E, Abdelghany T M, et al. Introducing of potent cytotoxic novel 2-(aroylamino) cinnamamide derivatives against colon cancer mediated by dual apoptotic signal activation and oxidative stress [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 101: 103953.
- [9] Ullah S, Park C, Ikram M, et al. Tyrosinase inhibition and anti-melanin generation effect of cinnamamide analogues [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 87: 43-55.
- [10] 许书慧,陈惠琴,范玉娇,等.黄皮种子中香豆素类化合物的分离、鉴定及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性和全齿复活线虫致死活性研究[J].*中国药房*,2019,30(4):518-522.
- [11] 张瑞明,万树青,赵冬香.黄皮的化学成分及生物活性研究进展[J].*天然产物研究与开发*,2012,24(1):118-123.
- [12] Matsui T, Ito C, Furukawa H, et al. Lansiumamide B and SB-204900 isolated from *Clausena lansium* inhibit histamine and TNF-alpha release from RBL-2H3 cells [J]. *Inflammation Research*, 2013, 62(3): 333-341.
- [13] 杨华.黄皮叶提取物对哮喘大鼠气道炎症的抑制及调节细胞因子 Th1/Th2 平衡的作用[D].桂林:桂林医学院,2014.
- [14] Matsui T, Ito C, Furukawa H, et al. Lansiumamide B and SB-204900 isolated from *Clausena lansium* inhibit histamine and TNF-alpha release from RBL-2H3 cells [J]. *Inflammation Research*, 2013, 62(3): 333-341.
- [15] Guihong-Huang, Juan-Li, Wanlian-Li, et al. Suppression of inflammation by ethanol extract of *Clausena lansium* via modulation of TLR4/MYD88/TRAF6 signaling pathway in RAW 264.7 macrophages [J]. *European Journal of Inflammation*. 2019, 17(UNSP 2058739219841973).
- [16] 侯颖,陈辉,袁培培,等.地骨皮中酰胺类生物碱衍生物改善 HepG2 细胞脂质代谢的作用及机制研究[J].*中国药理学杂志*,2020, 55(16):1339-1345.
- [17] 范玉娇.黄皮种子中酰胺类生物碱的分离鉴定与生物活性研究[D].海口:海南大学,2018.
- [18] 卢晓旭,黄雪松.黄皮核中 N-甲基-桂皮酰胺的提取分离与鉴定[J].*中国调味品*,2008,7:40-42.
- [19] 陈惠琴,范玉娇,蔡彩虹,等.黄皮种子的化学成分及生物活性研究[J].*中草药*,2019,50(2):324-329.
- [20] 阳春苗,郑广进,龙盛京,等.老鼠箭生物碱 A 及其衍生物对 α -淀粉酶活性的影响[J].*中国现代应用药学*,2012,29(3):205-208.
- [21] Liu Y, Li Y, Zhao Y, et al. Carbazole alkaloids from the fruits of *Clausena anisum-olens* with potential PTP1B and α -glucosidase inhibitory activities [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 110: 104775.
- [22] 蔡小华,吴英华.含肉桂酰胺类化合物的合成及 α -糖苷酶抑制活性[J].*有机化学*,2007,1:77-81.
- [23] 王雪.刺囊酸衍生物的制备及抑制胰脂肪酶活性研究[D].长春:吉林农业大学,2019.
- [24] Lowe M E. The triglyceride lipases of the pancreas [J]. *Journal of Lipid Research*, 2002, 43(12): 2007-2016.
- [25] Khlifi R, Lahmar A, Dhaouefi Z, et al. Assessment of hypolipidemic, anti-inflammatory and antioxidant properties of medicinal plant *Erica multiflora* in triton WR-1339-induced hyperlipidemia and liver function repair in rats: A comparison with fenofibrate [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2019, 107: 104404.
- [26] Jin F Y, Kamanna V S, Kashyap M L. Niacin accelerates

- intracellular ApoB degradation by inhibiting triacylglycerol synthesis in human hepatoblastoma (HepG2) cells [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999, 19(4): 1051-1059.
- [27] Zhao L, Guo X, Wang O, et al. Fructose and glucose combined with free fatty acids induce metabolic disorders in HepG2 cell: A new model to study the impacts of high-fructose/sucrose and high-fat diets *in vitro* [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, 60(4): 909-921.
- [28] Luo K, Ma C, Xing S, et al. White tea and its active polyphenols lower cholesterol through reduction of very-low-density lipoprotein production and induction of LDLR expression [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 127(110146).
- [29] Luo N, Yang C, Zhu Y, et al. Diosmetin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis through modulating lipogenesis and inflammatory response in a STAT1/CXCL10-dependent manner [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(2): 655-667.
- [30] Guo R, Nair S, Zhang Y, et al. Adiponectin deficiency rescues high-fat diet-induced hepatic injury, apoptosis and autophagy loss despite persistent [J]. *International Journal of Obesity*, 2017, 41(9): 1403-1412.
- [31] Cao J, Liu Y, Jia L, et al. Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(24): 12059-12063.
- [32] Liang R, Cheng S, Dong Y, et al. Intracellular antioxidant activity and apoptosis inhibition capacity of PEF-treated KDHCH in HepG2 cells [J]. *Food Research International*, 2019, 121: 336-347.
- [33] Kang O H, Kim S B, Seo Y S, et al. Curcumin decreases oleic acid-induced lipid accumulation via AMPK phosphorylation in hepatocarcinoma cells [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2013, 17(19): 2578-2586.
- [34] Tao J, Zhao Y, Chi C, et al. Bioactive peptides from cartilage protein hydrolysate of spotless smoothhound and their antioxidant activity *in vitro* [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(1004).
- [35] 刘云,石成璋,张均田.黄皮酰胺的抑制脂质过氧化和脑保护作用[J].*药学报*,1991,3:166-170.
- [36] Al-Naqeb G, Ismail M, Bagalkotkar G, et al. Vanillin rich fraction regulates LDLR and HMGCR gene expression in HepG2 cells [J]. *Food Research International*, 2010, 43(10): 2437-2443.
- [37] Li X, Guo J, Liang N, et al. 6-Gingerol regulates hepatic cholesterol metabolism by up-regulation of LDLR and cholesterol efflux-related genes in HepG2 cells [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9(159).
- [38] Xu S, Wang G, Peng W, et al. Corosolic acid isolated from *Eriobotrya japonica* leaves reduces glucose level in human hepatocellular carcinoma cells, zebrafish and rats [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(4388).
- [39] Li H, Li J, Zhang X, et al. Euphomin L promotes lipid clearance by dual regulation of LDLR and PCSK9 [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2021, 22(13816).
- [40] Ma N, Fan L, Dong Y, et al. New PCSK9 inhibitor miR-552-3p reduces LDL-C via enhancing LDLR in high fat diet-fed mice [J]. *Pharmacological Research*, 2021, 167(105562).