

云南野生余甘子鞣花酸和漆黄素的减肥降脂作用

林倩如¹, 胡海娥², 李学莉², 马瑞婷², 徐璐¹, 刘果¹, 邓晰文¹, 侯韬¹, 阚启鑫¹, 陈宇立¹, 曹庸^{1*}
(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)(2. 东鹏饮料集团股份有限公司, 广东深圳 518055)

摘要: 余甘子 (*Phyllanthus emblica*, PE) 是近年广受关注的药食两用水果, 但关于其减肥降脂功效及具体作用成分鲜有报道。该研究提取了云南野生 PE 富含的黄酮多酚物质 (Phyllanthus Emblica Extract, PEE), 发现其在小鼠前脂肪细胞 (3T3-L1) 模型中, 能够显著抑制 3T3-L1 细胞分化至成熟脂肪细胞, 减少脂滴生成量, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用时, 细胞总甘油三酯 (Triglyceride, TG)、总胆固醇 (Total Cholesterol, TC) 相对含量分别降低至 66.47%、40.87%, 这表明, 云南野生 PE 中的 PEE 具有减肥降脂潜力。通过 HPLC 分析测得, 云南野生 PE 中含有 3 030.78 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鞣花酸, 560.70 $\mu\text{g}/\text{g}$ 漆黄素。将鞣花酸和漆黄素以 5:1 的比例还原搭配成混合物 (Ellagic Acid and Fisetin, EF), 研究其对高脂饮食 (High Fat Diet, HFD) 小鼠模型的影响。结果显示, EF 能够抑制 HFD 小鼠的体质量和白色脂肪增长, 高剂量干预时, 血清 TG、TC、LDL-C 含量分别降低了 45.48%、12.06%、37.54%, HDL-C 水平提高了 18.75%; HFD 小鼠的肝脏指数、血清中 ALT 和 AST 分别降低了 7.80%、21.59%、41.64%。EF 具有减肥降脂功效, 且对肝脏具有一定的修复作用, 是云南野生 PE 减肥降脂作用的重要成分。

关键词: 云南野生余甘子; 3T3-L1 细胞; 高脂饮食小鼠; 鞣花酸; 漆黄素; 肥胖

文章编号: 1673-9078(2024)01-19-26

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.1193

Anti-obesity and Lipid-lowering Effects of Ellagic Acid and Fisetin from Yunnan's Wild *Phyllanthus emblica*

LIN Qianru¹, HU Hai'e², LI Xueli², MA Ruiting², XU Lu¹, LIU Guo¹, DENG Xiwen¹, HOU Tao¹, KAN Qixin¹,
CHEN Yuli¹, CAO Yong^{1*}

(1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2.Dongpeng Beverage Group Co. Ltd., Shenzhen 518055, China)

Abstract: *Phyllanthus emblica* (PE) is an edible and medicinal fruit that has received much attention in recent years, but little has been reported about its anti-obesity and lipid-lowering effects as well as specific functional components. In this study, the flavonol-rich polyphenols from Yunnan wild PE were extracted (*Phyllanthus emblica* Extract, PEE). It was found that in the 3T3-L1 cell model, PEE could significantly inhibit the differentiation of 3T3-L1 cells into mature adipocytes and reduce the production of lipid droplets. When PEE at 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was applied, the relative contents of total triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) in cells were reduced to 66.47% and 40.87%, respectively, suggesting that PEE in Yunnan wild PE

引文格式:

林倩如,胡海娥,李学莉,等.云南野生余甘子鞣花酸和漆黄素的减肥降脂作用[J].现代食品科技,2024,40(1):19-26.

LIN Qianru, HU Hai'e, LI Xueli, et al. Anti-obesity and lipid-lowering effects of ellagic acid and fisetin from Yunnan's wild *Phyllanthus emblica* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1):19-26.

收稿日期: 2023-01-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972078); 中国博士后面上项目 (2020M672651); 广东省功能食品活性物重点实验室项目 (2018B030322010); 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目 (2023KJ117)

作者简介: 林倩如 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: linqr@stu.scau.edu.cn

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学、天然产物化学, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

has the potential to promote weight loss and lipid reduction. HPLC analysis revealed that Yunnan wild PE contained ellagic acid (3 030.78 $\mu\text{g/g}$) and fisetin (560.70 $\mu\text{g/g}$). Ellagic acid and fisetin were mixed at a 5:1 ratio to form a mixture (EF), and the effect of EF on a high-fat diet (HFD) mouse model was examined. The results showed that EF could inhibit the growth of body weight and white fat in HFD mice, and decreased the serum TG, TC and LDL-C contents by 45.48%, 12.06% and 37.54%, respectively, while increasing the HDL-C level by 18.75%. The liver index, serum ALT and AST of the HFD mice decreased by 7.80%, 21.59% and 41.64%, respectively. EF exhibited anti-obesity and lipid-lowering effects, and could exert certain repairing functions on the liver, thus, EF are important components accounting at least partially for the anti-obesity and lipid-lowering effects of Yunnan wild PE.

Key words: Yunnan wild *Phyllanthus emblica*; 3T3-L1 cell; high fat diet mice; ellagic acid; fisetin; obesity

随着生活水平提高和饮食习惯改变,全球肥胖人数逐年增多。据世界卫生组织统计,2016年,18岁及以上的成年人中逾19亿人超重,超过6.5亿人肥胖。肥胖是会损害机体健康的过量脂肪累积情况,是引发非酒精性肝损伤(NonAlcoholic Liver Injury, NAFLD)、心血管疾病(Cardiovascular Disease, CVD)、2型糖尿病(Type 2 Diabetes, T2DM)等疾病的危险因素^[1,2],已经是不容忽视的慢性疾病。科学预防和及时治疗是有效解决肥胖的措施,而利用具有减肥降脂的天然产物是近年来被广泛关注的重要手段之一。

研究发现,含有余甘子(*Phyllanthus emblica*, PE)的“四味余甘子方”能够改善高脂血症大鼠的血脂水平^[3],PE的水提物可以通过保护肠道微生物群改善NAFLD^[4]。PE具有减肥降脂作用,但关于其具体作用成分鲜有报道。本团队在前期研究中发现,云南野生PE富含黄酮多酚物质,尤其是鞣花酸,而黄酮多酚物质被证实可以通过调节机体的肠道菌群、抗炎达到减肥降脂的效果^[5,6]。同时,本团队发现余甘子中的黄酮物质——漆黄素,具有抗炎活性,能够显著抑制巨噬细胞产生一氧化氮(Nitric Oxide, NO)等炎症因子($P < 0.05$)^[7]。基于该背景,提取云南野生PE的黄酮多酚物质(*Phyllanthus emblica* Extract, PEE),研究其对3T3-L1细胞分化和成脂作用的影响,并利用HFD小鼠模型,研究鞣花酸和漆黄素(Ellagic Acid and Fisetin, EF)的减肥降脂作用。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与设备

云南野生余甘子,采摘于云南滇西干热河谷区域(101°E, 25°N),由东鹏饮料(集团)股份有限公司提供;3T3-L1细胞,由中国科学院干细胞库提供;胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS,

10270106)、新生牛血清(New-born Calf Serum, NCS, 26010074)、DMEM培养基(11965092)、抗生素(10 000 U/mL, 15140163)、胰酶(25200056),购自Invitrogen Gibco;无水乙醇(AR)、异丙醇(AR),购自上海泰坦科技股份有限公司;鞣花酸(HPLC \geq 98%)、漆黄素(HPLC \geq 98%)、羧甲基纤维素钠(Carboxymethylcellulose Sodium, CMC, CP, 黏度300~800)、胰岛素(Insulin, RI, 猪胰腺, \geq 27 USP units/mg)、地塞米松(Dexamethasone, DEX, BR, 99%)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-Isobutyl-1-Methylxanthine, IBMX, \geq 99%),购自上海源叶生物科技有限公司;总甘油三酯(Triglyceride, TG)、总胆固醇(Total Cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(Low Density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(High Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C)、谷丙转氨酶(Alanine Transaminase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate Aminotransferase, AST)测定试剂盒,购自南京建成生物工程研究所有限公司;改良油红O染液,购自上海碧云天生物技术有限公司。

超声机(JM-38D-80),洁盟;冻干机(LL3000), Thermo;超净工作台(LVG-4AG-S8)、二氧化碳培养箱(CCL-170-B-8), ESCO; EnSpire多功能酶标仪, PerkinElmer;倒置生物显微镜,重庆奥特光学仪器有限责任公司;分析性高效液相(LC-10ATvp plus),日本岛津;反向C18色谱柱(250 nm \times 4.6 mm \times 5 μm), DiKMA。

1.2 方法

1.2.1 云南野生PE鞣花酸、漆黄素定量分析

参考前期研究^[7,9],称取1g云南野生PE,切碎后冻干处理,加入70%(V/V)乙醇,物料比为1:7(m/V),50 $^{\circ}\text{C}$,80kHz超声浸提1h后过滤,重复2次,合并滤液,定容至100mL。参考文献^[10,11],利用高效

液相色谱进行分析。色谱柱: DiKMA 反向 C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm×5 μm); 检测波长: 273 nm; 进样体积: 20 μL; 流动相: 一级水 (A, 0.1% 甲酸)、甲醇 (B); 洗脱程序: 0~6 min, 5%~7% B; 6~16 min, 7%~30% B; 16~31 min, 30%~80% B; 31~40 min, 80%~90% B。根据鞣花酸和漆黄素的标准曲线算出两者在 PE 中的含量。

1.2.2 PEE提取

重复 1.2.1 步骤, 提取 1 kg 云南野生 PE, 滤液 50 °C 减压浓缩, 回收乙醇, 剩余浓缩物冻干处理得到 PEE, 得率为 5.79%, 用于后续实验。

1.2.3 PEE对3T3-L1细胞降脂的影响

1.2.3.1 试剂配置

完全培养基 1: DMEM, 10% NCS (V/V), 1% 抗生素 (V/V);

完全培养基 2: DMEM, 10% FBS (V/V), 1% 抗生素 (V/V);

诱导分化培养基 1: DMEM, 10% NCS (V/V), 1% 抗生素 (V/V), 0.5 mmol/L IBMX, 1 μmol/mL DEX, 10 μg/mL IR;

诱导分化培养基 2: DMEM, 10% FBS, 1% 抗生素, 10 μg/mL IR。

1.2.3.2 细胞培养

3T3-L1 细胞在完全培养基 1 中培养, 放入 37 °C、5% CO₂ (V/V) 的培养箱中静置培养。当细胞长至对数期时进行传代。

1.2.3.3 细胞毒性

将细胞培养至对数期, 以每毫升 1×10⁵ 个细胞的密度接种至 96 孔板, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 放入培养箱中培养过夜。弃去 96 孔板中培养基, 样品组加入 100 μL 质量浓度为 50~1 000 μg/L 的 PEE 溶液, PEE 使用完全培养基 1 溶解稀释, 同时设置不添加样品的空白组, 不添加样品和细胞的调零组, 每组设置 6 个复孔。培养 24 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 100 μL 完全培养基 1 和 10 μL 的 CCK-8 染色液, 培养箱中孵育 2 h。于 450 nm 处测定各孔光密度 (OD) 值, 并按式 (1) 计算样品干预后细胞的存活率。

$$F = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_3 - OD_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

F—细胞存活率, %;

OD₁—样品组的 OD 值;

OD₂—调零组的 OD 值;

OD₃—空白组的 OD 值。

1.2.3.4 PEE对3T3-L1细胞分化的影响

先使用完全培养基 2 将 3T3-L1 细胞以每毫升 1×10⁵ 个细胞的密度接种于 12 孔板, 每孔 1 mL。细胞融合 48 h 后, 更换含有样品的诱导分化培养基 1 刺激分化 48 h。然后更换含有 PEE 的诱导分化培养基 2, 继续诱导分化 48 h。之后更换含有样品的完全培养基 2 继续培养 48 h。对细胞进行油红 O 染色, 并在显微镜下观察和拍照。拍照完毕后, 每孔加入 1 mL 异丙醇溶解出染色的油红 O 染料, 酶标仪检测 570 nm 处的吸光度值, 分析细胞的相对脂滴含量。

1.2.3.5 TG、TC含量测定

3T3-L1 细胞同 1.2.2.3 步骤分化后, 收集细胞, 超声破碎, 检测其 TG、TC 含量。

1.2.4 EF对HFD小鼠的影响

1.2.4.1 动物实验分组

健康雄性 C56BL/6J 小鼠 (20±2) g, 40 只, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司 (SCXK (浙) 2019-0001), 合格证编号为 20220228Abzz0619000297, 饲养于华南农业大学实验动物中心 SPF 级动物实验室 (SYXK 2014-0136)。适应性喂养 1 周后, 随机分为 5 组 (n=8), 具体分组及处理见表 1。饲料购自南通特洛菲饲料科技有限公司, 正常饮食饲料为标准饲料 (TP23302), 高脂饮食饲料脂肪供能比为 60% (TP23300)。小鼠每笼 4 只, 群养, 饲养温度 23~26 °C, 相对湿度: 40%~70%, 采用 10 h:14 h 昼夜间断照明。试验期间, 每天对试验动物灌胃一次, 各组动物自由饮水, 8 周后, 对小鼠禁食 12 h (不禁水) 麻醉解剖。

表 1 小鼠分组及饲养方式

Table 1 Groups and feeding methods of mice

分组	数量/只	日常饮食	灌胃处理
ND	8	正常饮食+水	0.4% CMC
HFD	8	高脂饮食+水	0.4% CMC
EF-L	8	高脂饮食+水	0.4% CMC, 10 mg/kg EF
EF-M	8	高脂饮食+水	0.4% CMC, 20 mg/kg EF
EF-H	8	高脂饮食+水	0.4% CMC, 30 mg/kg EF

1.2.4.2 生化指标测定

(1) 小鼠摄食量、体质量

灌胃开始后, 每天固定时间记录小鼠摄食量, 每周同一时间称量小鼠体质量。

(2) 血清指标

小鼠麻醉后, 心脏取血, 静置 4 h 后, 常温离心 8 min, 转速为 5 000 r/min, 血清转移至洁净的离心

管中，放置于 -80 °C 中冻存待测。利用试剂盒对小鼠血清生化指标含量进行测定。

(3) 肝脏指数

小鼠取血后，断颈处死，解剖摘取肝脏，棉球去除多余血液后称质量记录，按公式 (2) 计算脏器指数，称质量后贮藏于 -80 °C 待进一步分析。

$$A = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

A——肝脏指数，%；

m_1 ——肝脏质量，g；

m_2 ——小鼠处死前体质量，g。

(4) 脂肪指数

小鼠麻醉解剖，摘取脏器的同时，摘取附睾脂肪、肾周脂肪和棕色脂肪，称质量，按公式 (3) 计算脂肪指数，称质量后贮藏于 -80 °C 待进一步分析。

$$B = \frac{m_3}{m_2} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

B——脂肪指数，%；

m_3 ——脂肪质量，g；

m_2 ——小鼠处死前体质量，g。

1.2.5 数据分析

所有试验均重复 3 次或以上。数据表示为平均值 ± 标准差 (SD)。使用 SPSS 23.0 软件进行统计分析， $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。使用 Prism 8.0.2 制作图表。

2 结果与分析

2.1 云南野生PE鞣花酸、漆黄素定量分析

鞣花酸的标曲为： $y = 1E^7x + 3769.5$ ， $R^2 = 0.9998$ ；漆黄素的标曲为： $y = 2E^7x + 286193$ ， $R^2 = 0.9984$ 。图 1 为云南野生 PE 的 HPLC 分析图谱，F1、F2 分别为鞣花酸和漆黄素，利用面积归一化法，计算出 PE 中鞣花酸含量为 3030.78 $\mu\text{g/g}$ ，漆黄素含量为 560.70 $\mu\text{g/g}$ 。

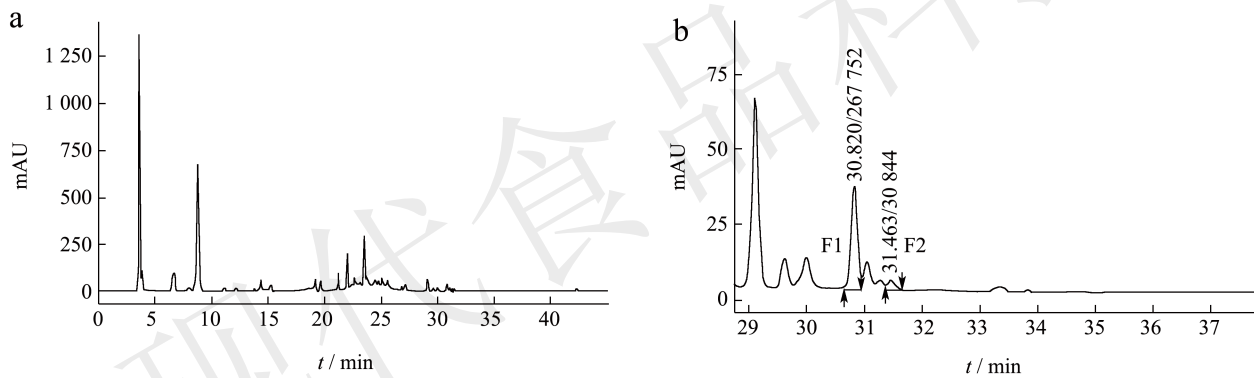


图 1 云南野生 PE 的 HPLC 分析图谱

Fig.1 HPLC analysis profiles of Yunnan wild PE

注：(a) 完整图谱；(b) 鞣花酸和漆黄素细节图。

2.2 PEE对3T3-L1细胞的影响

2.2.1 细胞毒性

如图 2 所示，control 组为不加药物组，与其比较，PEE 作用质量浓度为 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 时，3T3-L1 细胞存活率无显著性差异 ($P > 0.05$)；质量浓度达到 500 $\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率显著下降至 90.66% ($P < 0.05$)。研究表明，当细胞存活率 $> 90\%$ ，作用药物对细胞无毒害作用^[12]。因此，PEE 在 10~500 $\mu\text{g/mL}$ 作用质量浓度范围内对细胞无毒害作用，后续实验选择 100、200、300 $\mu\text{g/mL}$ 分别作为低、中、高剂量，分别记为 PEE-L、PEE-M、PEE-H。

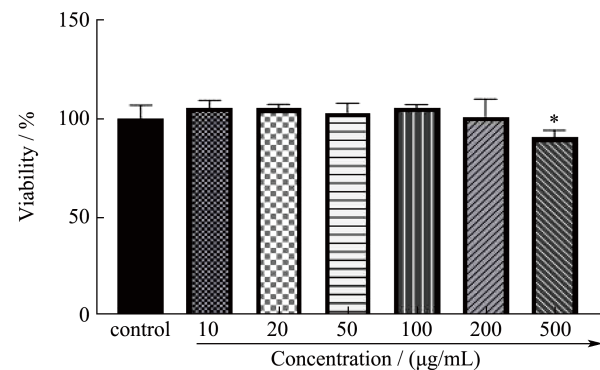


图 2 PEE 对 3T3-L1 细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of PEE extract on the survival rate of 3T3-L1 cell

注：* 表示与 control 组相比，差异显著 $P < 0.05$ 。

2.2.2 PEE对3T3-L1细胞分化的影响

3T3-L1 细胞经过“鸡尾酒法”培养，能够在较短时间内分化成成熟的脂肪细胞^[13]，在分化过程中细胞会产生“指环状”脂滴，这些脂滴能够与油红 O 染液特异性结合，表示 3T3-L1 细胞的分化情况^[14]。如图 3a~3d 所示，染色后，与 control 组比较，PEE 干预的 3T3-L1 细胞脂滴密度更低。利用异丙醇溶解结合的油红 O 染液，于 450 nm 测量其 OD 值表示细胞产生的脂滴含量，发现 PEE 组脂滴含量相对于 control 组，呈浓度依赖性显著下降（图 3e），300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度时，脂滴相对含量为 92.67%。说明 PEE 能够显著抑制 3T3-L1 细胞分化，减少脂滴生成（ $P < 0.05$ ）。

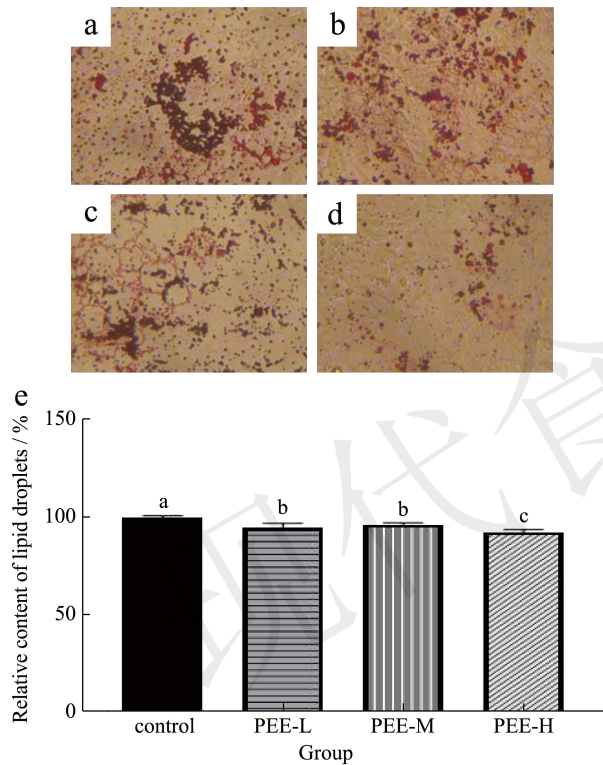


图 3 PEE 对 3T3-L1 细胞分化的影响

Fig.3 Effect of PEE on differentiation of 3T3-L1 cell

注：a~d 为油红 O 染色结果，4 \times 。a~d 分别表示 control 组视野 1、2，PEE-H 视野 1、2，e 为相对脂滴含量。图 e 中柱上字母不同表示具有显著性差异， $P < 0.05$ 。

2.2.3 PEE对成熟的3T3-L1细胞的影响

如图 4a、b 所示，PEE 能够显著减少成熟的 3T3-L1 细胞产生的 TG、TC（ $P < 0.05$ ），且都具有浓度依赖性。作用质量浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，TG、TC 的相对含量分别为对照组的 66.47%、40.87%，具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

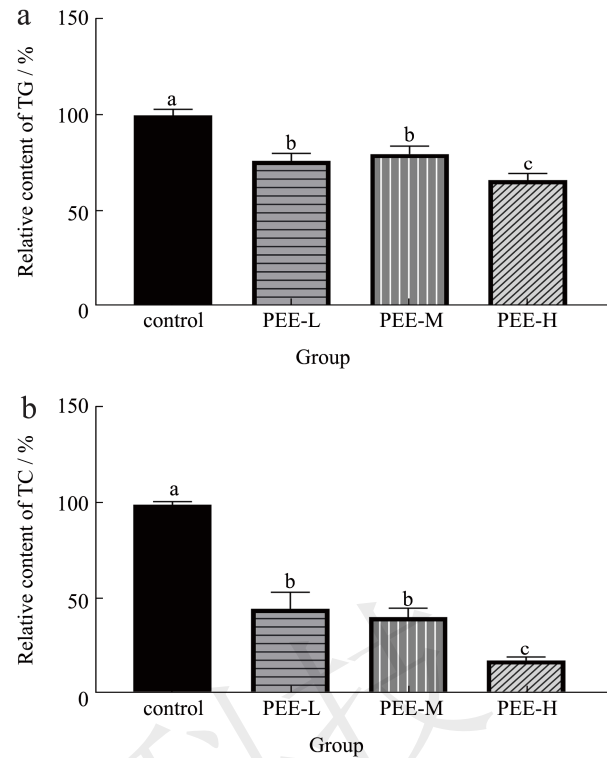


图 4 PEE 对成熟的 3T3-L1 细胞产生 TG、TC 的影响
Fig.4 Effect of PEE on TG and TC production in mature 3T3-L1 cells

注：(a) TG 相对含量；(b) TC 相对含量。字母不同表示具有显著性差异， $P < 0.05$ ，下同。

Woo 等^[15]发现鞣花酸能够阻滞细胞在 G0/G1 期来抑制细胞周期进程，同时在蛋白水平下调成脂标志物，减少脂肪堆积，成脂标志物的降低与 TG 合成酶的下调密切相关。而漆黄素也被证实能够抑制 3T3-L1 细胞前期的分化，并诱导 *Sirt1* 表达，抑制细胞中脂质积累，下调 *PPAR γ* 的表达^[16]。推测 PEE 具有良好的降脂活性与鞣花酸、漆黄素有关。为验证假设，将鞣花酸与漆黄素以 5:1 的比例还原搭配成混合物 EF，研究其对 HFD 小鼠的影响。

2.3 EF对HFD小鼠的影响

2.3.1 EF对HFD小鼠体质量、摄食量的影响

如表 2 所示，实验进行 8 周后，HFD 小鼠体质量、增重极显著提高，分别是 ND 小鼠的 144.23%、281.68%，肥胖模型造模成功。而 EF 干预的小鼠体质量虽然显著高于 ND 小鼠（ $P < 0.05$ ），但体质量是 HFD 小鼠的 84.96%~87.43%，增重是 HFD 小鼠的 71.67%~79.96%，具有显著性差异（ $P < 0.05$ ），EF 能够有效抑制高脂饲料对小鼠体质量的增加，且各组小鼠摄食量无显著差异（ $P > 0.05$ ），EF 不会抑

制小鼠食欲。这与 Huang 等^[17]的研究结果相似，喂食了余甘子水提物的 HFD 大鼠体质量也显著性低于 HFD 大鼠，且饮水量无显著性差异。

表 2 各组小鼠的体质量、摄食情况

Table 2 Body weight and food intake of mice in each group

组别	初始体质量/g	最终体质量/g	增重/g	摄食量/g
ND	22.12 ± 0.68 ^a	27.47 ± 1.07 ^a	5.35 ± 1.15 ^a	3.30 ± 0.22 ^a
HFD	24.55 ± 0.79 ^a	39.62 ± 2.07 ^c	15.07 ± 1.66 ^c	2.78 ± 0.38 ^a
EF-L	23.30 ± 0.46 ^a	34.64 ± 2.23 ^b	11.35 ± 1.92 ^b	2.75 ± 0.31 ^a
EF-M	22.36 ± 0.73 ^a	34.40 ± 1.73 ^b	12.05 ± 1.58 ^b	2.55 ± 0.21 ^a
EF-H	22.87 ± 0.81 ^a	33.66 ± 2.12 ^b	10.80 ± 1.68 ^b	2.74 ± 0.21 ^a

注：同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。下表同。

2.3.2 EF对HFD小鼠脂肪指数的影响

如表 3 所示，与 HFD 小鼠比较，EF 干预后，棕色脂肪指数 (Brown Fat Index, BFI) 显著增长 ($P < 0.05$)，低剂量干预的效果最佳，BFI 增长了 43.75%。同时，EF 对抑制白色脂肪组织 (White Adipose Tissue, WAT) 堆积具有积极作用，低剂量干预的小鼠附睾脂肪指数 (Epididymal Fat Index, EFI)、

肾周脂肪指数 (Perirenal Fat Index, PFI) 显著性减小 ($P < 0.05$)，分别是 HFD 小鼠的 54.34%、57.31%。

表 3 各组小鼠的脂肪指数

Table 3 Fat index of mice in each group

组别	EFI/%	PFI/%	BFI/%
ND	1.68 ± 0.62 ^a	0.43 ± 0.20 ^a	0.62 ± 0.04 ^a
HFD	5.65 ± 0.89 ^d	1.71 ± 0.41 ^d	0.32 ± 0.04 ^c
EF-L	3.07 ± 0.92 ^b	0.98 ± 0.32 ^b	0.46 ± 0.16 ^b
EF-M	4.42 ± 0.48 ^c	1.41 ± 0.21 ^{cd}	0.46 ± 0.09 ^b
EF-H	4.62 ± 0.58 ^c	1.37 ± 0.14 ^c	0.42 ± 0.08 ^{bc}

WAT 是机体储存能量的主要器官，肥胖会使过多的能量以甘油三酯的形式在 WAT 中过度沉积；而棕色脂肪组织 (Brown Adipose Tissue, BAT) 是机体的产热器官，在机体能量平衡中起着重要作用^[18]。据报道，运动会诱导 WAT 棕色化；机体产热时，BAT 会诱导 WAT 脂解以提供能量物质，BAT 对减肥具有积极意义^[19,20]。研究发现，喂食鞣花酸的 HFD 大鼠的 EFI 减少了 12.97%，BFI 增长了 65.79%^[21]，与本实验结果相似。EF 能够减少 HFD 小鼠的 WAT 堆积，并增加 BAT 的生成。

2.3.3 EF对高脂饮食小鼠血脂水平的影响

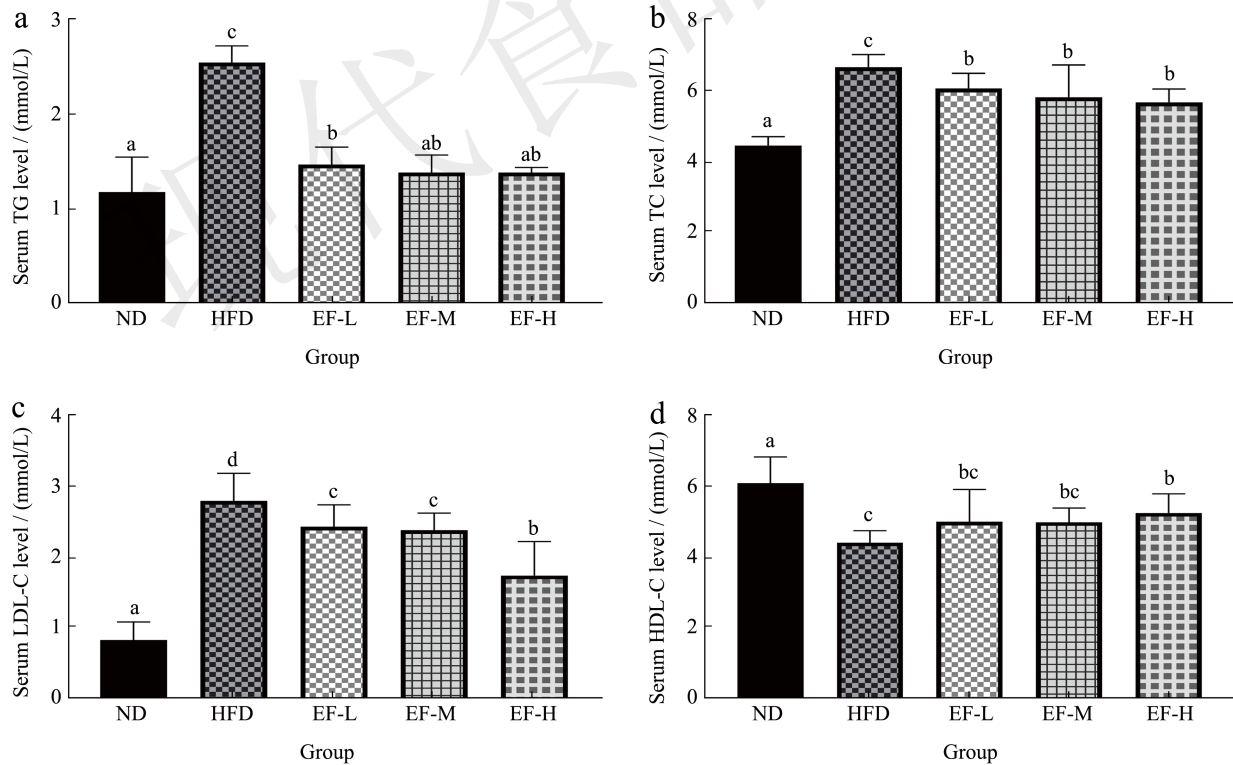


图 5 EF 对 HFD 小鼠血脂水平的影响

Fig.5 Effect of EF on lipid levels in HFD mice

肥胖会导致血清 TG、TC、LDL-C 含量上升、HDL-C 含量降低,进而引发高脂血症、T2DM、CVD 等疾病。Kim 等^[11]发现富含鞣花酸的红莓提取物主要是通过下调肝脏中成脂基因 *PPAR* γ 、*C/EBP* α 、*SREBP-1c* 等的表达,降低 HFD 小鼠血清中的 TC、TG、LDL-C 含量并提高 HDL-C 含量,以达到减肥降脂的目的。而富含漆黄素的漆树提取物则被证实能加快 HFD 小鼠尾部毛细血管的血流速率,改善血液循环状态,减少肥胖带来的血管损伤^[22]。

实验进行 8 周后,与 HFD 小鼠比较,EF 显著降低了高脂饮食小鼠血清的 TG、TC、LDL-C 水平 ($P < 0.05$),且具有浓度依赖性,高剂量作用时分别降低了 45.48%、12.06%、37.54%。同时,高剂量 EF 干预显著提高 HDL-C 水平 ($P < 0.05$),提高了 18.75%。这说明 EF 能有效改善高脂饮食引发的血脂水平紊乱。

2.3.4 EF对高脂饮食小鼠肝脏影响

肝脏指数常常被用于表征肝脏损伤,肥胖易导致甘油三酯淤积于机体肝脏中,导致肝脏肥大。如图 6a 所示,HFD 小鼠肝脏指数显著高于 ND 小鼠 ($P < 0.05$),而 EF 中、高剂量干预后小鼠的肝脏指数显著小于 HFD 小鼠 ($P < 0.05$),都减少了 8.07%,说明 EF 能够改善高脂饮食导致的肝脏肿大现象。这与冯孔龙等^[23]的实验结果相似,同是黄酮物质的川陈皮素可以减小 HFD 大鼠的肝脏指数,比 HFD 大鼠的肝脏指数小 17.41%,效果与奥利司他无显著性差异 ($P > 0.05$)。

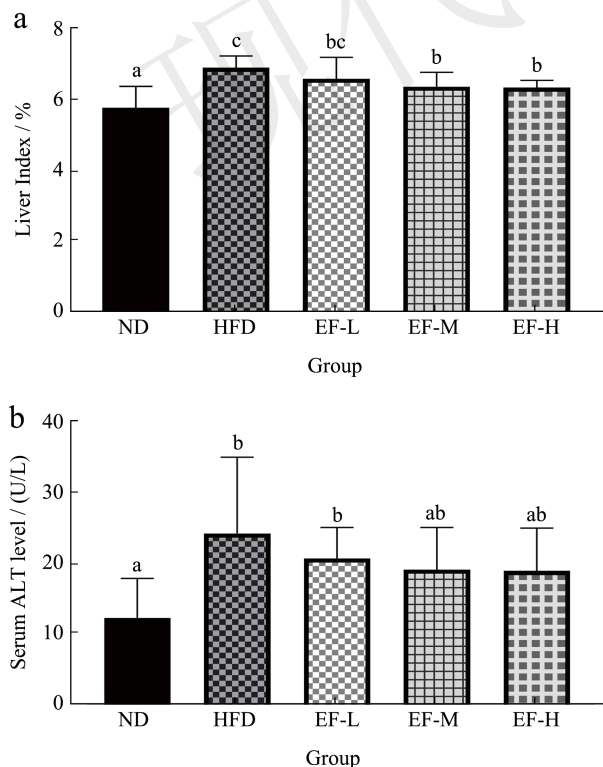


图 6 EF 对 HFD 小鼠肝脏的影响

Fig.6 Effects of EF on liver of HFD mice

肥胖还会影响肝脏代谢功能,易引发炎症,使得肝细胞变形、坏死,细胞内的 ALT 和 AST 释放入血,导致血清中的转氨酶含量升高^[24],因此 ALT 和 AST 是肝细胞损伤的敏感指标。如图 6b、c 所示,EF 干预的 HFD 小鼠血清中的 ALT 和 AST 均呈浓度依赖性降低,虽然 ALT 含量与 HFD 小鼠无显著性差异 ($P > 0.05$),但 AST 含量显著下降 ($P < 0.05$),并恢复至 ND 小鼠水平,这进一步说明 EF 能够修复高脂饮食导致的肝损伤,对预防和治疗肥胖相关的 NAFLD 具有重要意义。

3 结论

本研究发现,云南野生 PE 的黄酮多酚提取物 PEE 能够显著抑制 3T3-L1 细胞分化成脂肪细胞,并显著降低细胞的脂滴、TG、TC 含量 ($P < 0.05$),云南野生 PE 具有良好的降脂作用。而云南野生 PE 的黄酮多酚中,鞣花酸和漆黄素的比率为 5:1。按比例复配的鞣花酸和漆黄素混合物 EF 在不影响 HFD 小鼠食欲的前提下,能够显著抑制 HFD 导致的体质量增加,并抑制 WAT 堆积,促进 BAT 生长 ($P < 0.05$);并能够改善高脂饮食导致的血脂紊乱、修复高脂饮食导致的肝脏损伤,改善肝脏肿大的现象。综上所述,云南野生余甘子中鞣花酸和漆黄素具有减肥降脂作用,这为充分开发利用余甘子资源提供了理论依据。

参考文献

- [1] GEORGE A BRAY, KIM K K, JOHN WILDING, et al. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the world obesity federation [J]. Obesity Review, 2017, 18(7): 715-723.
- [2] YU CHUNGCHOOI, DING CHERLYN, FAIDON MAGKOS. The epidemiology of obesity [J]. Metabolism,

- 2019, 92: 6-10.
- [3] 周盼盼. 四味余甘子方对高脂血症模型大鼠干预作用的研究[D]. 西宁: 青海大学, 2020.
- [4] LUO XIAOMIN, ZHANG BOYU, PAN YEHUA, et al. *Phyllanthus emblica* aqueous extract retards hepatic steatosis and fibrosis in NAFLD mice in association with the reshaping of intestinal microecology [J]. *Frontiers in Pharmacol*, 2022, 13: 893561.
- [5] MEENAKSHI SUDHAKARAN, ANDREA I DOSEFF. The targeted impact of flavones on obesity-induced inflammation and the potential synergistic role in cancer and the gut microbiota [J]. *Molecules*, 2020, 25(11): 2477.
- [6] SONG DAN, CHENG LU, ZHANG XIN, et al. The modulatory effect and the mechanism of flavonoids on obesity [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(8): e12954.
- [7] LI WEI, ZHU HUAWEI, CHEN YUNJIAO, et al. Bioactivity-guided isolation of anti-inflammatory components from *Phyllanthus emblica* [J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(6): 2670-2679.
- [8] 李伟, 张小英, 叶嘉宜, 等. 余甘子不同溶剂提取物体外抗氧化活性及对H₂O₂诱导RAW264.7细胞损伤的保护作用[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(16): 62-69.
- [9] 李伟, 朱华伟, 陈运娇, 等. 余甘子不同溶剂提取物抗炎活性的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(3): 418-424, 443.
- [10] GAO QIAN, XIANG HAIYING, CHEN WEI, et al. Two new isobenzofuranone derivatives from *Phyllanthus emblica* and their bioactivity [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2019, 55(5): 847-850.
- [11] KIM KYEONG JO, JEONG EUI SEON, LEE KI HOON, et al. Unripe *Rubus coreanus* miquel extract containing ellagic acid promotes lipolysis and thermogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 5954.
- [12] KELLY L. WOLIFE, LIU RUIHAI. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(22): 8896-8907.
- [13] KATJA ZEBISCH, VALERIE VOIGT, MARTIN WABITSCH, et al. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes [J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 425(1): 88-90.
- [14] 张凯艺, 朱文娟, 谢宁, 等. 一种自发胰岛素抵抗的3T3-L1脂肪细胞模型构建[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(7): 1475-1485.
- [15] WOO MI SEON, CHOI HYEON SON, SEO MIN JUNG, et al. Ellagic acid suppresses lipid accumulation by suppressing early adipogenic events and cell cycle arrest [J]. *Phytotherapy Research: PTR*, 2015, 29(3): 398-406.
- [16] KIM SANG CHON, KIM YOO HOON, SON SUNG WOOK, et al. Fisetin induces *Sirt1* expression while inhibiting early adipogenesis in 3T3-L1 cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 467(4): 638-644.
- [17] HUANG CHENGZE, TUNG YUTANG, HSIA SHIH MIN, et al. The hepatoprotective effect of *Phyllanthus emblica* L. fruit on high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in SD rats [J]. *Food & Function*, 2017, 8(2): 842-850.
- [18] 吕迎兰, 程龙, 石璐, 等. 芦丁促进3T3-L1前脂肪细胞棕色化及其机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(5): 137-143.
- [19] 陈炜, 刘佳琪, 刘禹熙, 等. 棕色脂肪组织内分泌功能的最新研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2022, 44(5): 933-939.
- [20] 徐樱溪, 孔瑞琴, 孔娟. 脂肪组织棕色化及产热相关机制的研究进展[J]. *中国医科大学学报*, 2022, 51(7): 648-651, 655.
- [21] ADÉLA KÁBELOVÁ, HANA MALÍNSKÁ, IRENA MARKOVÁ, et al. Ellagic acid affects metabolic and transcriptomic profiles and attenuates features of metabolic syndrome in adult male rats [J]. *Nutrients*, 2021, 13(3): 804.
- [22] WON KYUN IM, PARK HYUN JUNG, LEE KWANG SOO, et al. Fisetin-rich extracts of *Rhus verniciflua* stokes improve blood flow rates in mice fed both normal and high-fat diets [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2016, 19(2): 120-126.
- [23] 冯孔龙, 朱晓艾, 陈彤, 等. 川陈皮素对高脂膳食诱导大鼠的降脂减肥及预防脂肪肝形成作用[J]. *食品科学*, 2018, 39(1): 213-20.
- [24] 周新峰, 刘国清, 白建红. 超重肥胖儿童非酒精性脂肪肝与内脏脂肪指数的相关性研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(2): 254-258.