

DHA 脂质体对脂代谢的改善作用

杨瑞利¹, 卢娜¹, 张慧¹, 周赛楠¹, 张青¹, 薛长湖^{1,2}, 唐庆娟¹

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

(2. 海洋国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室, 山东青岛 266237)

摘要: 为了探究 DHA 脂质体对脂代谢的调节作用。首先利用游离脂肪酸诱导 HepG2 细胞, DHA 脂质体干预后检测甘油三酯 (TG), 胆固醇 (TC) 含量, RT-PCR 检测脂肪酸合成酶 (FAS), 固醇调节元件结合蛋白 1 (SREBP-1) 的 mRNA 表达。其次将雄性 C57BL/6J 小鼠 (6 周龄) 随机分为对照组 (C)、模型组 (M)、DHA 脂乳剂组 (O-DHA)、DHA 脂质体组 (L-DHA)。12 周后, 检测脂肪酸合成酶 (FAS), 肉碱棕榈酰转移酶 1 (CPT-1) 蛋白表达量以及脂肪酸合成酶 (FAS), 苹果酸酶 (ME), 肉碱棕榈酰转移酶 1 (CPT-1), 脂蛋白酯酶 (LPL) 的酶活力。结果表明 DHA 脂质体可显著降低 HepG2 细胞的 TC, TG 含量 ($p<0.05$), 分别降低了 62.91% 和 48.73%, 且显著降低了 FAS (48.62%), SREBP-1 (38.53%) 的 mRNA 相对表达量 ($p<0.05$)。动物实验结果表明 DHA 脂质体显著降低了高脂饮食小鼠附睾脂肪含量 (14.26%) ($p<0.05$), 且显著降低了高脂饮食小鼠 FAS (74.29%) 蛋白表达量 ($p<0.05$), 显著升高了 CPT-1 (约 1.70 倍) 的蛋白表达量 ($p<0.05$)。DHA 脂质体还可显著抑制 FAS, ME 酶活力 ($p<0.05$), 分别降低了 30.33% 和 11.79%。显著促进了 CPT-1, LPL 酶活力 ($p<0.05$), 分别升高了 10.08% 和 15.12%。本研究表明 DHA 脂质体可改善高脂饮食诱导的脂代谢紊乱, 为深海鱼油的开发利用提供理论依据。

关键词: DHA 脂质体; 游离脂肪酸; HepG2 细胞; 高脂饮食; 脂代谢

文章编号: 1673-9078(2021)02-11-20

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0781

Improvement of Lipid Metabolism by DHA Liposomes

YANG Rui-li¹, LU Na¹, ZHANG Hui¹, ZHOU Sai-nan¹, ZHANG Qing¹, XUE Chang-hu^{1,2}, TANG Qing-juan¹

(1.College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China) (2.Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

Abstract: To explore the effects of DHA liposomes on lipid metabolism, HepG2 cells were induced by free fatty acids. After the intervention of DHA liposomes, the contents of TG and TC were detected. The mRNA expression of Fatty acid synthase (FAS) and Sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1) were detected by RT-PCR. Then male C57BL/6J mice (6 weeks old) were housed and randomly divided into control group (C), model group (M), TG-DHA emulsion (O-DHA), TG-DHA liposome (L-DHA). After 12 weeks, the protein expression levels of FAS, CPT-1 were determined by immunohistochemistry, the enzyme activity of Fatty acid synthase (FAS), malic enzyme (ME), carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1), lipoprotein esterase (LPL) were detected using ELISA. The results showed that DHA liposomes significantly reduced the TC and TG contents ($p<0.05$) by 62.91% and 48.73% respectively; significantly reduced the mRNA expression levels of FAS (48.62%) and SREBP-1 (38.53%) ($p<0.05$). The results of animal experiments showed that DHA liposomes significantly reduced the epididymal fat content (14.26%) of high-fat diet mice ($p<0.05$); significantly reduced the protein expression levels of FAS (74.29%) ($p<0.05$) and increased the protein expression levels of CPT-1 (1.70 folds) ($p<0.05$). DHA liposomes could significantly inhibited the activities of FAS, ME ($p<0.05$), reduced by 30.33% and 11.79% respectively; and promoted the activities of CPT-1, LPL ($p<0.05$), increased by 10.08% and 15.12% respectively. This study showed that DHA liposomes can improve lipid metabolism disorder induced by

引文格式:

杨瑞利, 卢娜, 张慧, 等. DHA 脂质体对脂代谢的改善作用[J]. 现代食品科技, 2020, 37(2): 11-20

YANG Rui-li, LU Na, ZHANG Hui, et al. Improvement of lipid metabolism by DHA liposomes [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 11-20

收稿日期: 2020-08-19

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC0311201; 2019YFC1604605); 山东省重点研发计划项目 (2019GHY112058)

作者简介: 杨瑞利 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋功能食品

通讯作者: 唐庆娟 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 海洋功能食品

high-fat diet, and provide theoretical basis for the development and utilization of deep-sea fish oil.

Key words: DHA liposome; free fatty acids; HepG2 cells; DIO-HF; lipid metabolism

脂质代谢紊乱已被认为是严重疾病的标志^[1]。脂代谢紊乱与肥胖,非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD),糖尿病,动脉粥样硬化密切相关^[2]。NAFLD的特征是肝内脂肪细胞过度沉积^[3],现已成为世界上最常见的慢性肝病,占全球总人口的1/4^[4]。近年来,随着人们生活水平的提高,其膳食结构逐渐从以植物性食物为主的饮食转变为以动物性食物为主的高热量高脂肪含量饮食^[5]。由于饮食结构的改变,NAFLD的发病率逐渐提高,对人类健康造成了极大的危险^[6]。因此改善脂代谢紊乱和肝细胞脂质沉积对预防和治疗NAFLD至关重要。

二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA)属于N-3多不饱和脂肪酸家族中的重要成员,广泛存在于鱼、虾、蟹、海藻等海洋生物中,深海鱼油中的DHA尤为丰富。DHA主要有甲酯、乙酯(Ethyl ester, EE)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、磷脂等四种类型,目前市售的DHA主要是乙酯型和甘油三酯型^[7]。TG-DHA无论是对人体代谢吸收率,生物利用率还是安全性都明显优于EE-DHA^[8]。很多文献都曾报道富含DHA的深海鱼油具有降脂减肥,调节脂代谢紊乱,抗炎,抗癌等生物活性^[9]。Kembra^[10]等人的研究表明DHA可以通过调控高脂饮食小鼠脂肪酸合成基因及脂肪酸氧化分解相关基因的表达调节脂代谢。LIU^[11]等人发现DHA可以在一定程度上改善长期高脂饮食导致的非酒精性脂肪肝。但鱼油属于脂溶性物质,难以在实验动物体内直接消化吸收。有文献报道,经乳化后的鱼油比天然更易吸收,且能显著增加血浆中的DHA含量^[12]。但乳化后的鱼油仍然有令人难以接受的腥味物质,这在很大程度上限制了鱼油产品的开发利用^[13]。目前市面上大多是DHA微胶囊,所用壁材一般为蛋白质和明胶,包埋率仅为10%左右,溶于水后仍然有鱼腥味^[14]。很多文献都曾报道,脂质体可以掩盖鱼油腥味,且消化吸收特性,抗氧化性能更佳^[15-17]。Xiaodan^[18]等人的研究表明DHA脂质体可以通过上调CPT-1的mRNA表达和蛋白表达;下调FAS的mRNA表达和蛋白表达来降低HepG2细胞甘油三酯沉积。Mengru^[19]等人的研究发现,DHA脂质体可以通过肝脏脂解和胆固醇外排抑制非酒精性脂肪肝大鼠肝脏脂质沉积。目前大多数的研究主要集中在DHA脂质体的制备,对其生物活性的探究相对较少,尤其是在动物实验水平上研究DHA脂质体对脂代谢调控的报道更是少之又少。大大影响了鱼油精深产品

的开发利用。

本实验主要通过体外细胞实验和动物实验,以DHA脂乳剂作对照,综合探究DHA脂质体对脂代谢的调节作用,为深海鱼油高附加值产品的开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

10/70 TG-DHA 金枪鱼油,浙江舟山新诺佳生物技术有限公司;98%大豆磷脂酰胆碱(98% PC),西安艾诺医药科技有限公司;人肝癌HepG2细胞,上海生工生物工程有限公司;SPF级6周龄雄性C57BL/6J小鼠,济南朋悦实验动物繁育有限公司(许可证号:SPXY2019042001);甘油三酯(Triglyceride, TG)、总胆固醇(Total Cholesterol, TC)试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司;脂肪酸合成酶(FAS)、苹果酸酶(ME)、肉碱棕榈酰转移酶(CPT-1)、脂蛋白酯酶(LPL)ELISA试剂盒,武汉优尔生商贸有限公司;猪胆盐,索莱宝生物科技有限公司;油酸(OA)、棕榈酸(PA),美国Sigma公司;TRIZOL试剂,美国Invitrogen公司;RNA纯化试剂盒,天根生化科技有限公司;5X All-In-One RT裂解反转录一体试剂盒,abm;EvaGreen Express 2X qPCR MasterMix, abm;10%低脂饲料(饲料代码TP23522)、45%高脂饲料(饲料代码TP23220),南通特洛菲饲料科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

RE-2000A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;Model680型酶标仪,美国BioRAD产品;Agilent7820型气相色谱仪,美国Agilent科技公司;19091N-113型HP-INNOWAX石英毛细管柱,美国Agilent科技公司;TGL-16G型台式离心机,上海安亭科学仪器厂;IQ5 Realtime PCR仪,美国Bio-RAD;NIKON/Ni-E电子荧光显微镜,南京伊若达仪器设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 DHA脂质体及DHA脂乳剂的制备

将一定比例的10/70 TG-DHA金枪鱼油和98%大豆磷脂酰胆碱溶解于95%食用酒精中,将其放置在磁力搅拌器上直至大豆磷脂酰胆碱完全溶解。然后在

40 ℃, 100 r/min 条件下旋转蒸发、减压浓缩除有机试剂。室温冷却 30 min, 加超纯水洗膜, 最后过 200 nm 聚碳酸酯膜, 得到的白色乳状液体即为 DHA 脂质体乳状液。

向适量 10/70 TG-DHA 金枪鱼油中加入超纯水, 之后加入 0.5% 猪胆盐作为乳化剂, 然后不断振荡混匀, 超声细胞破碎仪均质 2 min, 制成均一的牛奶状乳液, 即为 DHA 脂乳剂^[20]。

1.3.2 脂肪酸组分检测

前处理 (甲酯化): 分别取 5 mg 脂质体/脂乳剂样品和 500 μg 十九碳酸甘油三酯标准品置于甲酯化试管中, 用氮气吹干试管中的有机试剂。向试管中加入 2 mL HCl: 甲醇 (1:5 V/V) 溶液, 充入氮气立即拧紧管口, 然后将试管置于 90 ℃ 金属浴中加热 1 h。将其冷却至室温, 向其中加入 2 mL 正己烷, 充分混匀, 室温静置直至液体分层。取上层溶液 1 μL 进行气相色谱分析^[21]。

GC 分析: 载气为高纯氮气, 进样口采用分流模式 (20:1) 所用柱子为 Supelcowax 石英毛细管柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm)。柱箱初温 170 ℃, 以 5 ℃/min 的速度升温至 240 ℃, 平衡时间为 1 min。检测器为火焰离子化检测器 (flame ionization detector, FID), 进样口温度为 260 ℃, 检测器温度为 260 ℃, 氢气流量 30 mL/min, 空气流量 400 mL/min, 氮气尾吹流量: 25 mL/min^[22]。

GC 数据分析: 根据脂肪酸甲酯混标的出峰时间定性分析样品中脂肪酸组分。采用面积归一法, 定量计算样品脂肪酸组分百分比。

1.3.3 细胞培养及分组

本实验选用人肝癌 HepG2 细胞, 培养基选用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 在含 5% CO₂, 湿度为 100% 的 37 ℃ 恒温培养箱中正常培养。当 12 孔板细胞密度长满 70%~80% 时, 将其分为四组: 空白对照组: DMEM 培养基培养, 模型组: 含有 1 mmol/L 游离脂肪酸 (油酸 (OA): 棕榈酸 (PA) = 2:1) 混合

物的 DMEM 培养基培养 24 h, 然后转移至正常 DMEM 培养基培养 48 h^[23]; DHA 脂乳剂组: 含有 1 mmol/L 游离脂肪酸混合物的 DMEM 培养基培养 24 h 后, 使用浓度为 40 μg/mL 的 DHA 脂乳剂干预 48 h; DHA 脂质体组: 含有 1 mmol/L 游离脂肪酸混合物的 DMEM 培养基培养 24 h 后, 使用浓度为 40 μg/mL 的 DHA 脂质体干预 48 h。

1.3.4 油红 O 染色观察肝细胞脂质蓄积情况

等到各组细胞消化后, 收集细胞。4% 多聚甲醛固定液固定 20 min, PBS 洗 2 次, 双蒸水漂洗 3 次后空气晒干; 待切片干燥后, 将切片置于油红工作液中染色 1 h; 70% 乙醇漂洗 3 次; 在光学显微镜下观察油红染色后的阳性细胞。

1.3.5 HepG2 细胞 TG、TC 含量测定

等到各组细胞消化后, 收集细胞。试剂盒法检其 TG、TC 含量, 具体方法按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.6 Real-Time PCR 检测脂代谢相关基因的 mRNA 表达量

等到各组细胞消化后, 收集各组细胞。Trizol 法提取细胞中的总 RNA, 琼脂糖凝胶检测 RNA 完整性。通过测定溶液吸光值 A₂₆₀ nm/A₂₈₀ nm 比值确定所得 RNA 的纯度, 比值 1.8~2.0 时用于下一步实验。按照 5X All-In-One RT 裂解反转录一体试剂盒进行反转录, 将 RNA 反转成 cDNA, 具体方法按照试剂盒说明书进行操作。按照 EvaGreen Express 2X qPCR MasterMix 试剂盒说明书在冰上配置 20 μL 反应体系, 该体系包括 2×MasterMix 10 μL, PCR Forward、Reverse Primer 各 0.6 μL, cDNA 溶液 4 μL, 无菌水 4.8 mL。设置 3 个复孔, 使用 IQ5 型荧光定量 PCR 仪进行测定, 扩增条件: 95 ℃, 10 min; 95 ℃, 15 s, 60 ℃, 20 s, 95 ℃, 15 s (45 个循环); 65 ℃ 升温至 95 ℃ (0.5 ℃/10 s), 内参基因为 GAPDH, mRNA 相对表达量用 2^{-ΔΔCT} 法计算^[24]。引物由上海生工生物工程有限公司合成; 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Fas	GACATCGTCCATTCGTTTG	CGGATCACCTTCTTGAGCTCC
CPT-1	ACGCCATCCATGCCATCCTG	ACTGAGCGGAGCAGAGTGGA
SREBP-1c	CGACATCGAAGACATGCTTCAG	GGAAGGCTTCAAGAGAGGAGC
PPAR-α	ACACGGAAAGCCCACTCTGC	TGCCGGGGACCACAGGATAA
GAPDH	GCGGGGCTCTCCAGAACATC	TCCACCACTGACACGTTGGC

1.3.7 动物饲养与分组

30 只 SPF 级的雄性 C57BL/6J 小鼠暂养一周后,

按体重随机分为四组, 对照 (C) 组, 模型 (M) 组, DHA 脂乳剂 (O-DHA) 组, DHA 脂质体 (L-DHA)

组,除C组喂饲10%低脂饲料,其他组均喂饲45%高脂饲料。4周后开始灌胃,O-DHA组灌胃DHA脂乳剂,L-DHA组灌胃DHA脂质体,C组和M组均灌胃生理盐水作对照,灌胃剂量1000 mg/(kg·bw)。饲养环境为普通环境,单笼单只,室温23±2℃,湿度55%~58%,12 h/12 h光暗循环,饲养期间所有动物均自由摄食和饮水。12周后,摘眼球取血脱颈椎处死小鼠,取小鼠肝脏、脂肪等组织称重并于-80℃冰箱保存。

1.3.8 小鼠生长指标测定

$$BMI = \frac{\text{体重}(kg)}{\text{身高}(m)^2}$$

1.3.9 免疫组化测定蛋白表达量

取上述脂肪组织切片,全自动脱水浸蜡处理,将浸好蜡块的组织于包埋机内进行包埋,将修整好的蜡块用石蜡切片机切成厚4 μm的切片。石蜡切片脱蜡至水,置于盛满柠檬酸抗原修复缓冲液(pH 6.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。血清封闭,加入一抗,二抗,DAB显色,复染细胞核,梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片,电子荧光显微镜下观察。

蛋白表达量的测定使用Image-Pro Plus 6.0软件选取蛋白阳性染色区域,计算面密度:面密度=IOD/待测区域组织面积(IPP)。

1.3.10 肝脏脂代谢相关酶活力测定

取各组小鼠肝脏溶于生理盐水中,匀浆、离心取上清液。试剂盒法检测各组小鼠脂肪合成酶(FAS)、苹果酸酶(ME)、脂蛋白酯酶(LPL)、肉碱棕榈酰转移酶(CPT-1)等肝脏脂代谢相关酶活力,具体步骤按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计分析

所有实验均重复3次以上,结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示;所有实验数据均用SPSS 25.0软件进行统计分析,组间差异采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),以 $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 DHA脂质体和DHA脂乳剂中脂肪组分检测

由表2可以看出,与DHA脂乳剂相比,DHA脂质体中的C16:0、C17:0、C18:0、C18:1、C18 2n-6等显著增多($p < 0.05$)。而C20 4n-6, EPA, C23:0, C24:0, DHA等显著减少($p < 0.05$)。但两种鱼油的总饱和脂

肪酸与总不饱和脂肪酸并无显著性差异($p > 0.05$)。气相色谱法检测到TG-DHA脂乳剂中的DHA含量高达76.87%,而TG-DHA脂质体中的DHA含量为73.74%,因此在灌胃时根据两种形式鱼油中的DHA含量控制了实验小鼠的灌胃剂量,保证O-DHA组与L-DHA组小鼠摄入DHA量一致。

表2 两种形式DHA脂肪酸组分检测

Table 2 Determination of fatty acid components in two forms of

组分	DHA	
	DHA 脂乳剂/%	DHA 脂质体/%
C _{14:0}	0.21±0.01	0.21±0.01
C _{16:0}	0.60±0.02	1.26±0.07**
C _{16:1}	0.49±0.01	0.48±0.00
C _{17:0}	0.14±0.01	0.21±0.02*
C _{18:0}	0.22±0.04	0.39±0.03**
C _{18:1}	0.73±0.01	1.12±0.04**
C _{18:2n-6}	0.09±0.00	3.16±0.41**
C _{20:4n-6}	0.50±0.02	0.27±0.09*
EPA	8.39±0.09	7.94±0.05**
C _{22:1}	0.87±0.04	0.82±0.01
C _{22:2}	0.27±0.10	0.37±0.09
C _{23:0}	1.61±0.01	1.56±0.01**
C _{24:0}	9.00±0.04	8.48±0.21*
DHA	76.87±0.06	73.74±0.25**
SFA	11.79±0.04	12.11±0.15
USFA	88.21±0.04	87.89±0.15
MUFA	2.09±0.05	2.42±0.04**
PUFA	86.13±0.08	85.47±0.17*

注:SFA:饱和脂肪酸;USFA:不饱和脂肪酸;MUFA:单不饱和脂肪酸;PUFA:多不饱和脂肪酸;* $p < 0.05$;** $p < 0.01$ 。

2.2 DHA脂质体对游离脂肪酸诱导的HepG2

细胞脂质沉积的影响

最新研究表明,NAFLD的发生和发展是由肝细胞脂质蓄积、氧化应激、胰岛素抵抗等多种因素造成的^[25,26]。其中脂质蓄积是NAFLD形成的危险诱因^[27]。Lu^[28]等人的研究表明,DHA-PC可显著降低游离脂肪酸可诱导HepG2细胞TG、TC含量的升高,降低HepG2细胞脂质沉积。由图1a/b可见,与空白(C)组相比,模型(M)组细胞内脂质和细胞内TC(增约4.75倍),TG(增约16.41倍)含量显著增加($p < 0.05$)。油红O染色是观察肝细胞脂质沉积的经典方法之一,由图1c可见,与C组相比,M组细胞内红色脂滴聚集显著增多。与M组比较,L-DHA组细胞内脂质和

细胞内 TC、TG 含量均显著降低 ($p<0.05$), 分别降低了 62.91% 和 48.73%。且与 O-DHA 组相比, L-DHA 显著降低了细胞内的 TC 含量 (降低约 49.56%) ($p<0.05$)。相比于 DHA 脂乳剂, DHA 脂质体改善细胞脂质沉积的作用更加显著。

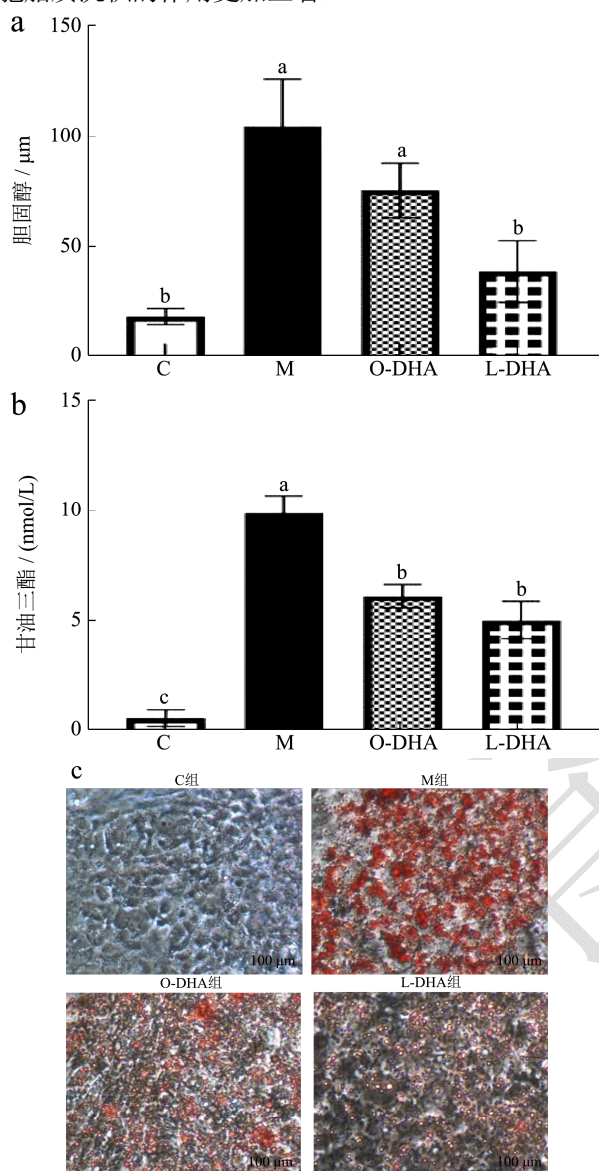


图1 DHA 脂质体对 HepG2 细胞脂质沉积的影响

Fig.1 DHA liposomes on lipid deposition in HepG2 cells

注: a: 胆固醇; b: 甘油三酯; c: 油红 O 染色; 不同字母代表组间具有显著性差异 ($p<0.05$)。

2.3 DHA 脂质体对游离脂肪酸诱导的 HepG2

细胞脂代谢相关基因的影响

FAS 是细胞内催化脂肪酸合成的关键酶, SREBP-1 是脂质代谢重要的核转录因子。Kembra^[29] 等人发现 n-3 PUFA 可通过降低 FAS, PPAR- α 等与脂肪酸合成相关的 mRNA 表达改善游离脂肪酸诱导的

HepG2 细胞脂代谢紊乱。各组细胞中脂代谢关键基因的 mRNA 表达水平检测结果显示, 与 C 组比较, M 组细胞 FAS (增加约 7.32 倍), SREBP-1 (增加约 13.22 倍) 的 mRNA 表达水平显著升高 ($p<0.05$) (见 2a/b)。与 M 组相比, L-DHA 组 FAS (48.62%), SREBP-1 (38.53%) 的 mRNA 相对表达量均显著降低 ($p<0.05$)。且与 O-DHA 组比较, L-DHA 组 FAS (39.76%), SREBP-1 (33.77%) 的 mRNA 表达水平也均显著降低 ($p<0.05$)。表明相比于 DHA 脂乳剂, DHA 脂质体对游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂代谢紊乱的改善作用更加显著。

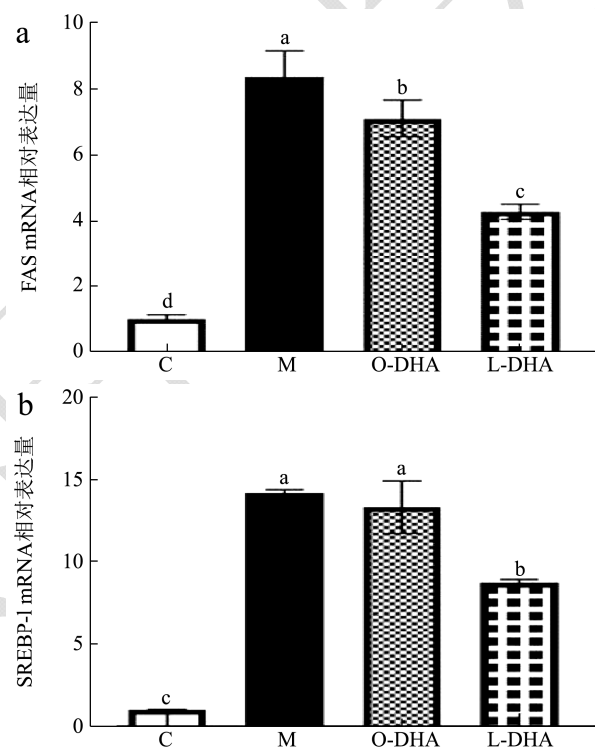


图2 DHA 脂质体对 HepG2 细胞脂代谢相关基因的影响

Fig.2 DHA liposomes on lipid metabolism related genes in HepG2 cells

注: a: 脂肪酸合成酶; b: 固醇调节元件结合蛋白 1; 不同字母代表组间具有显著性差异 ($p<0.05$)。

2.4 DHA 脂质体对高脂饮食小鼠体质量的影响

体外细胞实验表明 DHA 脂质体改善游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂质沉积的作用更加显著。长期高脂饮食会导致机体的能量摄入大于能量消耗, 多余的能量会以脂肪的形式贮存在体内, 最终导致脂代谢紊乱^[30]。接着我们通过动物实验进一步探究 DHA 脂质体对脂代谢的调节作用。各组小鼠 1~12 周体质量如图 3a 所示, 在第 72~84 d, M 组小鼠体重显著高于 C

组和 L-DHA 组。BMI 作为身体质量指数,通过用来衡量机体胖瘦程度以及是否健康的一个指标^[31]。如图 3b 所示,与 C 组相比, M 组小鼠 BMI (增约 18.22%) 显著升高 ($p<0.05$),而 DHA 脂乳剂和 DHA 脂质体的摄入,显著降低了高脂饮食导致的实验小鼠 BMI 升高 ($p<0.05$),分别降低约 11.10%和 10.40%。从图 3a 饲养期间实验小鼠体重变化来看,相比于 DHA 脂乳剂, DHA 脂质体降低高脂饮食小鼠体质量的作用更加明显。

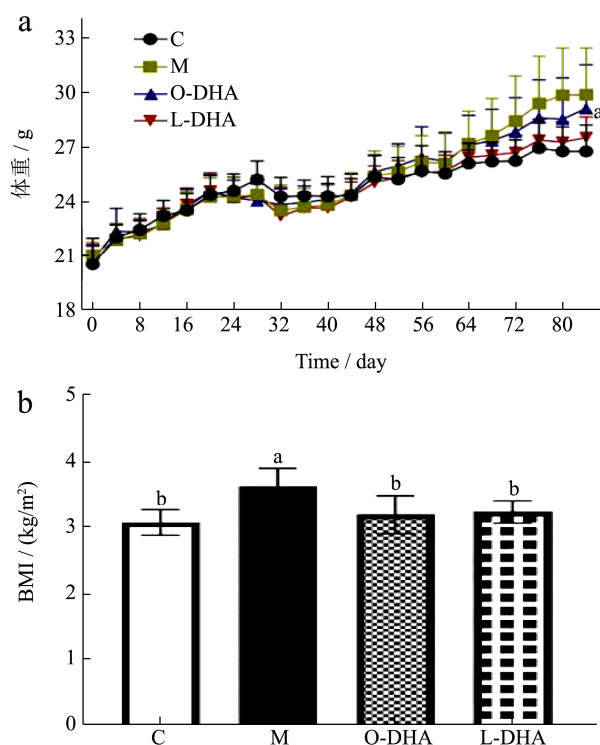


图3 DHA 脂质体对高脂饮食小鼠体质量的影响

Fig.3 DHA liposomes on body weight of high fat diet mice (n=10)

注: a: 体重; b: BMI; 不同字母代表组间具有显著性差异 ($p<0.05$)。

2.5 DHA 脂质体对高脂饮食小鼠内脏脂肪堆积的影响

长期高脂饮食会导致脂代谢紊乱,造成体重增加,脂肪堆积^[32]。由图 4 可见,高脂饮食饲养的 M 组(其中附睾脂肪增约 34.43%,肾周脂肪增约 68.50%小鼠的内脏脂肪含量显著高于正常组 ($p<0.05$)。与 M 组相比, DHA 脂乳剂和 DHA 脂质体的摄入均降低了高脂饮食小鼠内脏脂肪含量,其中 DHA 脂质体显著降低了高脂饮食小鼠附睾脂肪含量 14.26% ($p<0.05$)。

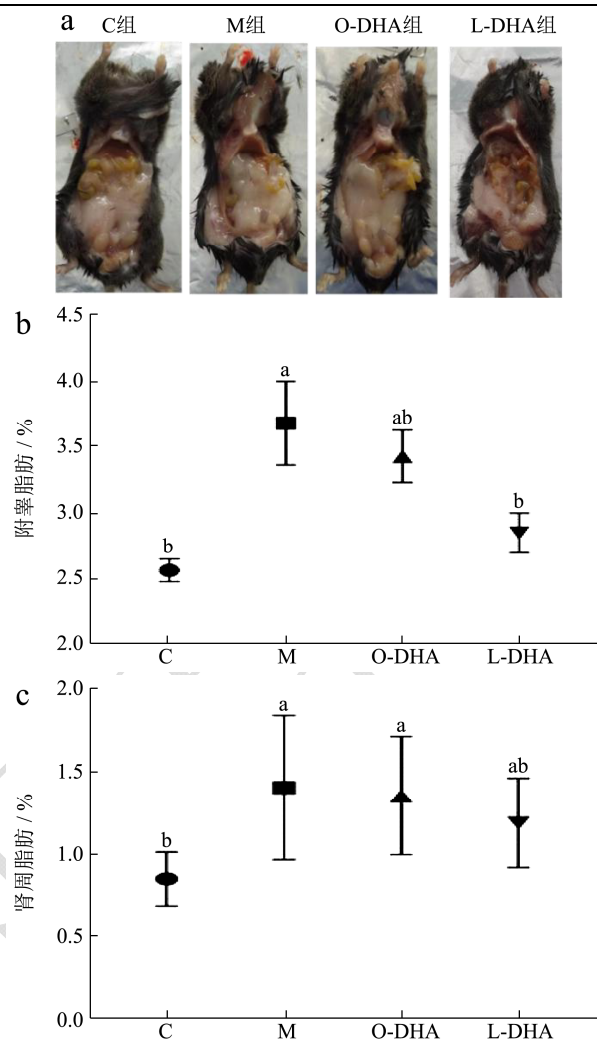


图4 DHA 脂质体对高脂饮食小鼠内脏脂肪堆积的影响

Fig.4 DHA liposomes on visceral fat accumulation in mice fed with high-fat diet

注: a: 各组小鼠代表性腹腔解剖图; b: 附睾脂肪指数; c: 肾周脂肪指数; 不同字母代表组间具有显著性差异 ($p<0.05$)。

2.6 DHA 脂质体对高脂饮食小鼠脂代谢相关蛋白的影响

前期我们检测了各组实验小鼠脂质代谢相关基因的表达,发现 DHA 脂质体和 DHA 脂乳剂均可以下调高脂饮食小鼠 FAS 的 mRNA 表达,上调 CPT-1 的 mRNA 表达。因此我们又检测了这两种酶的蛋白表达。

免疫组织化学染色法通常用来检测蛋白表达量,如图 5a/b 所示,与 C 组相比, M 组小鼠 FAS 蛋白大量表达,增加了约 87.57%。而 DHA 脂质体和 DHA 脂乳剂的摄入均显著降低了 FAS 的蛋白表达量 ($p<0.05$),分别降低了 74.29%和 47.10%。由图 5a/c

可见,与C组相比,CPT-1在M组小鼠体内蛋白表达量减少(减少约35.39%)($p>0.05$),而DHA脂质体

的摄入显著增加了CPT-1(增加约1.7倍)蛋白表达($p<0.05$)。

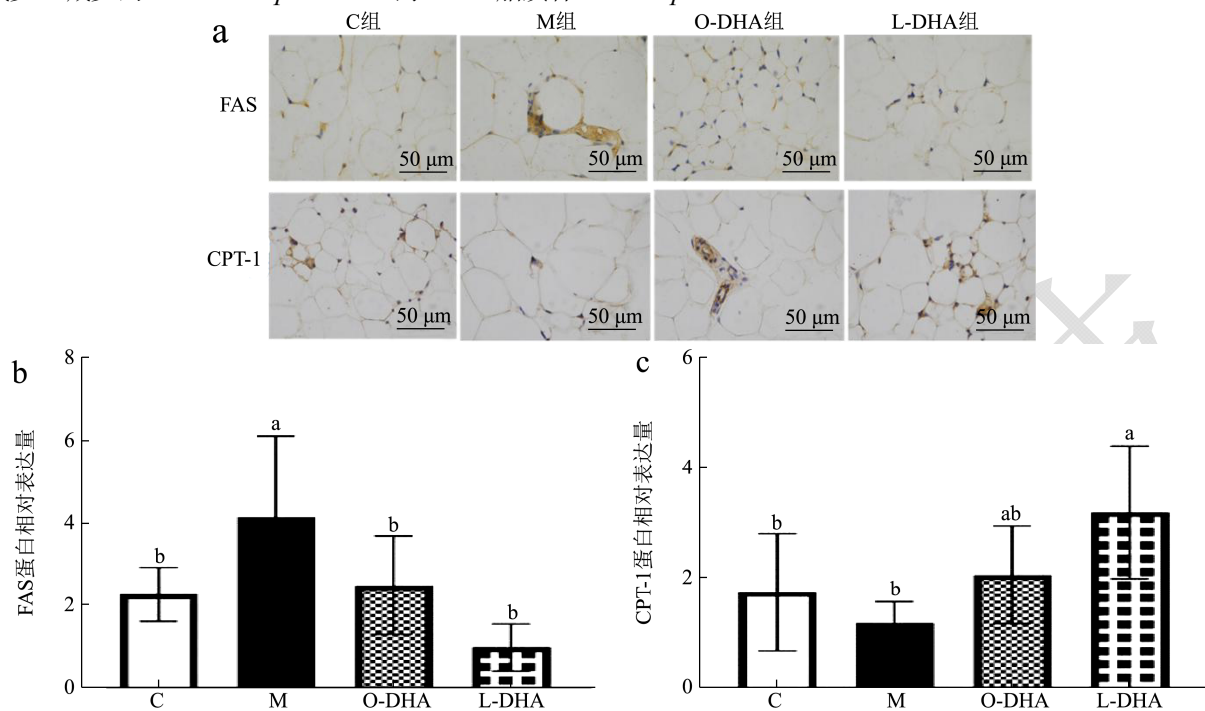


图5 DHA脂质体对高脂饮食小鼠脂代谢相关蛋白的影响

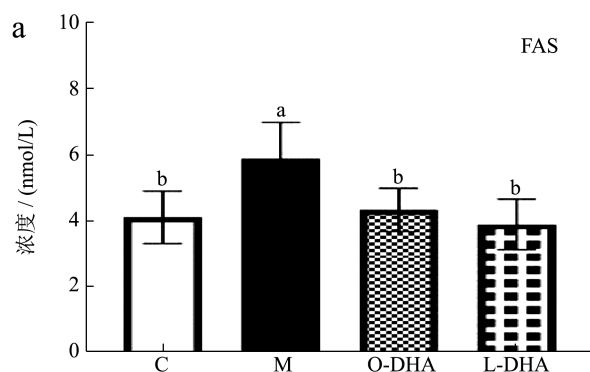
Fig.5 DHA liposomes on lipid metabolism related proteins in mice fed with high-fat diet (n=10)

注: a: 免疫组织化学染色; b: 脂肪酸合成酶蛋白表达量; c: 肉碱棕榈酰转移酶蛋白表达量; 不同字母代表组间具有显著性差异($p<0.05$)。

2.7 DHA脂质体对高脂饮食小鼠脂代谢相关酶活力的影响

肝脏是人体内脂肪合成的重要场所。脂肪酸合成酶是脂肪酸合成过程中的限速酶,苹果酸酶是催化苹果酸生成丙酮酸的酶,这两种都是促进脂肪酸合成的酶^[33]。由图6a/b可见,与C组相比,M组小鼠FAS(58.50%)、ME(11.92%)酶活性显著升高($p<0.05$),而DHA脂质体和DHA脂乳剂的摄入均显著降低了高脂饮食导致的FAS(DHA脂质体降低约30.33%,DHA脂乳剂降低约24.28%)、ME(DHA脂质体降低约11.79%,DHA脂乳剂降低约9.24%)酶活力的升高($p<0.05$)。肉碱棕榈酰转移酶是脂肪酸 β -氧化过程中的限速酶。脂蛋白酯酶是促进脂肪酸分解成甘油三酯的酶^[34]。由图6c/d可见,与C组相比,高脂饮食会抑制M组实验小鼠CPT-1(2.58%)、LPL(0.43%)酶活力,而DHA脂质体和DHA脂乳剂的摄入均促进了这两种酶的活力($p<0.05$)。其中DHA脂质体升高

高脂饮食小鼠肝脏内CPT-1,LPL的浓度分别约10.08%,15.12%,DHA脂乳剂升高高脂饮食小鼠肝脏内CPT-1,LPL的浓度约18.95%,7.02%。Liu X, Joseph等人也发现DHA可以通过调节小鼠肝脏中脂肪酸合成和氧化分解相关酶活力,从而调节脂代谢相关基因与蛋白的表达来调节脂代谢^[35,36]。本实验结果表明,DHA脂质体和DHA脂乳剂均可以通过抑制脂肪酸合成相关酶活力,升高脂肪酸分解和 β 氧化相关酶活力,改善高脂饮食诱导的脂质代谢紊乱。



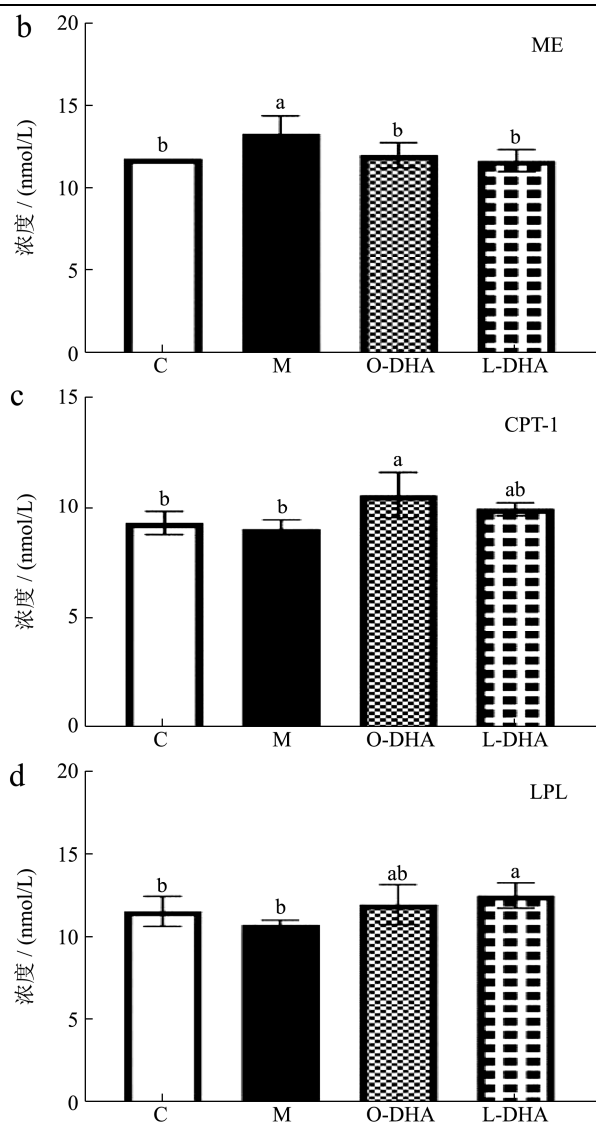


图6 DHA 脂质体对高脂饮食小鼠脂代谢相关酶活性的影响

Fig.6 DHA liposomes on activities of lipid metabolism related enzymes in mice fed with high-fat diet (n=10)

注: a: 脂肪酸合成酶; b: 苹果酸酶; c: 肉碱棕榈酰转移动酶; d: 脂蛋白酯酶; 不同字母代表组间具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

3 结论

本研究首先利用游离脂肪酸诱导 HepG2 细胞脂质沉积, 观察 DHA 脂质体和 DHA 脂乳剂对 HepG2 细胞的改善作用。结果表明 DHA 脂质体和 DHA 脂乳剂均对游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂质沉积具有一定的改善作用, 其中 DHA 脂质体的作用效果更加明显, DHA 脂质体显著降低了 HepG2 细胞 TG, TC 含量以及 FAS, SREBP-1 的 mRNA 表达。其次采用高脂饲料建立高脂饮食小鼠模型, 观察 DHA 脂质体和 DHA 脂乳剂对高脂饮食小鼠脂代谢紊乱的调节作用。结果发现, 与细胞实验一样, DHA 脂质体对高脂

饮食小鼠脂代谢紊乱的调节作用更佳。DHA 脂质体显著降低了高脂饮食小鼠体质量和内脏脂肪堆积。显著降低了 FAS 的蛋白表达, 增加了 CPT-1 的蛋白表达, 这与我们之前的基因检测结果一致。另外 DHA 脂质体显著抑制了高脂饮食小鼠 FAS, ME 等脂肪酸合成相关酶活力, 显著促进了 CPT-1, LPL 等脂肪酸氧化分解相关酶活力。综上所述, 本实验首次从体外细胞实验和体内动物实验综合探究, 比较 DHA 脂质体和 DHA 脂乳剂对脂代谢紊乱的调节作用。实验结果表明, 相比于 DHA 脂乳剂, DHA 脂质体改善脂代谢紊乱的作用更加显著。本研究有望促进鱼油精深产品的开发应用。

参考文献

- [1] Cai Y, Crowther J, Pastor T, et al. Loss of chromosome 8p governs tumor progression and drug response by altering lipid metabolism [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(5): 751-766
- [2] Pan X, Jiang X C, Hussain M M J C. Impaired cholesterol metabolism and enhanced atherosclerosis in clock mutant mice [J]. *Circulation*, 2013, 128(16): 1758-1769
- [3] Cong Jian, Shi, Wei Ju, et al. Acetaminophen aggravates fat accumulation in NAFLD by inhibiting autophagy via the AMPK/mTOR pathway [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 1871(1): 117-125
- [4] Younossi Z, Anstee Q M, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention [J]. *Nature Reviews Gastroenterology*, 2018, 15(1): 11
- [5] 唐娜. 不同油脂对高脂饮食小鼠糖脂代谢的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2019
- [6] TANG Na. Effects of different oils on glucolipid metabolism in mice induced by high-fat die [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019
- [7] 黄琰菁, 王琳, 李赛, 等. 罗汉果醇通过激活 AMPK 信号通路调控肝细胞癌 HepG2 细胞的脂代谢[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(8): 876-881
- [8] HUANG Yan-jing, WANG Lin, LI Sai, et al. Effect of mogrol on lipid metabolism of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by activating AMPK signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2019, 26(8): 876-881
- [9] 王卫飞, 马永钧, 范海星, 等. 酶法合成富含 DHA、EPA 甘油三酯的研究[J]. *中国油脂*, 2011, 2: 9-12
- [10] WANG Wei-fei, MA Yong-jun, FAN Hai-xing, et al. Enzymatic production of DHA and EPA-enriched triacylglycerols [J]. *China Oils and Fats*, 2011, 2: 9-12

- [8] 陈殊贤,郑晓辉.微藻油和鱼油中 DHA 的特性及应用研究进展[J].食品科学,2013,34(21):439-444
CHEN Shu-xian, ZHENG Xiao-hui. Research progress in characteristics and applications of DHA in microalga oil and fish oil [J]. Food Science, 2013, 34(21): 439-444
- [9] 代荣阳.DHA 和 EPA 的抗炎及免疫调节功能[J].西南医科大学学报,2004,27(1):83-84
DAI Rong-yang. Anti-inflammatory and immunomodulatory functions of DHA and EPA [J]. Journal of Southwest Medical University, 2004, 27(1): 83-84
- [10] Albracht-schulte K, Gonzalez S, Jackson A, et al. Eicosapentaenoic acid improves hepatic metabolism and reduces inflammation independent of obesity in high-fat-fed mice and in HepG2 cells [J]. Nutrients, 2019, 11(3): 559
- [11] Liu L, Hu Q, Wu H, et al. Dietary DHA/EPA ratio changes fatty acid composition and attenuates diet-induced accumulation of lipid in the liver of ApoE/mice [J]. Oxidative Medicine Cellular Longevity, 2018, 12: 1-12
- [12] Garaiova I, Guschina I A, Plummer S F, et al. A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification [J]. Nutrition Journal, 2007, 25(6): 4
- [13] Chen Q, Mcgillivray D, Wen J, et al. Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins [J]. Journal of Food Engineering, 2013, 117(4): 505-512
- [14] 李鹤,胡文忠,姜爱丽,等.不同来源 DHA 提取技术及其在食品工业中的应用进展[J].食品工业科技,2017,7:348-352
LI He, HU Wen-zhong, JIANG Ai-li, et al. Advance in different sources of DHA separation and extraction technology and its application in food industry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 7: 348-352
- [15] Tamzeedul K F, Kashif G, Sahena F, et al. Microencapsulation of fish oil using supercritical antisolvent process [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(3): 654-666
- [16] Ghorbanzade T, Jafari S M, Akhavan S, et al. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt [J]. Food Chemistry, 2017, 216: 146-152
- [17] 何玉宁,王锡昌,陶宁萍,等.不同尺度鱼油脂质体对酸奶品质的影响[J].中国乳品工业,2019,8:17-21
HE Yu-ning, WANG Xi-chang, TAO Ning-ping, et al. Effects fish oil liposomes with different scales on the quality of yogurt [J]. China Dairy Industry, 2019, 8: 17-21
- [18] Xiaodan Lu, Rongbing Zhong, He Sun, et al. Inhibition effect of triglyceride accumulation by large yellow croaker roe DHA-PC in HepG2 cells [J]. Marine Drugs, 2019, 17(9): 485
- [19] Mengru Chang, Tiantian Zhang, Xiuqing Han, et al. Comparative analysis of EPA/DHA-PL forage and liposomes in orotic acid-induced nonalcoholic fatty liver rats and their related mechanisms [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(6): 1408-1418
- [20] 王佳慧,刘春花,任兵兴,等.不同脂肪酸组成磷脂对大鼠消化吸收的影响[J].中国油脂,2013,8:56-59
WANG Jia-hui, LIU Chun-hua, REN Bing-xing, et al. Effects of phospholipids with different fatty acid compositions on the digestive absorption of rats [J]. China Oils and Fats, 2013, 8: 56-59
- [21] 崔洁.不同分子形式 n-3 系列长链多不饱和脂肪酸的消化吸收特性及其对脂质代谢的影响[D].青岛:中国海洋大学, 2015
CUI Jie. The digestion and absorption characteristics and effects on lipid metabolism of different molecular forms of n-3 chain polyunsaturated fatty acids [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015
- [22] 赵英才,于竹林,李榕,等.二十二碳六烯酸营养强化鸡蛋及蛋黄粉中脂质分析[J].食品安全质量检测学报,2019,15: 5052-5057
ZHAO Ying-cai, YU Zhu-lin, LI Rong, et al. Analysis of lipids in docosahexaenoic acid fortified eggs and yolk powder [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 15: 5052-5057
- [23] 高月,黄文祥,章述军,等.人参皂苷 Rg1 对非酒精性脂肪肝 HepG2 细胞脂质摄取和氧化的影响[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(12):100-106
GAO Yue, HUANG Wen-xiang, ZHANG Shu-jun, et al. Effect of ginsenoside Rg1 on lipid uptake and oxidation in HepG2 cells of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(12): 100-106
- [24] 刘芳,曹婉秀,李兆杰,等.硫酸软骨素二糖对疲劳致小鼠肾脏炎症的改善作用[J].食品工业科技,2018,39(18):285-288
LIU Fang, CAO Wan-xiu, LI Zhao-jie, et al. Ameliorative effects of chondroitin sulfate disaccharides on the murine renal inflammation under fatigue-stressed conditions [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(18): 285-288
- [25] 余琳媛,龚莉虹,汤韵秋,等.基于 AMPK 信号通路的大黄素治疗非酒精性脂肪肝研究进展[J].中国实验方剂学杂志, 2020,26(2):203-209

- YU Lin-yuan, GONG Li-hong, TANG Yun-qiu, et al. Nonalcoholic fatty liver disease effect of emodin based on AMPK signaling pathway [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(2): 203-209
- [26] Bessone F, Razori M V, Roma M G J C. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression [J]. Cellular Molecular Life Sciences, 2019, 76(1): 99-128
- [27] Byrne C D, Targher G J J O H. Nafld: a multisystem disease [J]. Journal of Hepatology, 2015, 62(1): S47-S64
- [28] Lu X, Zhong R, Sun H, et al. Inhibition effect of triglyceride accumulation by large yellow croaker roe DHA-PC in HepG2 cells [J]. Marine Drugs, 2019, 17(9): 485
- [29] Albracht-schulte K, Gonzalez S, Jackson A, et al. Eicosapentaenoic acid improves hepatic metabolism and reduces inflammation independent of obesity in high-fat-fed mice and in HepG2 cells [J]. Nutrients, 2019, 11(3): 2-17
- [30] Yu H J S. The current situation and reason of adolescents simple obesity [J]. Science Technology Information, 2011, 29: 274, 281
- [31] 刘健敏,郑龙,张焕铃,等.肥胖易感及肥胖抵抗动物模型的建立与评价[J].科学技术与工程,2012,12(28):7344-7346
- LIU Jian-min, ZHENG Long, ZHANG Huan-ling, et al. Establishment of obesity prone and obesity resistant rats induced by high-fat diet [J]. Science Technology and Engineering, 2012, 12(28): 7344-7346
- [32] De M T S, Lima P R, Carvalho K M M B, et al. Ferulic acid lowers body weight and visceral fat accumulation via modulation of enzymatic, hormonal and inflammatory changes in a mouse model of high-fat diet-induced obesity [J]. Brazilian Journal of Medical Biological Research, 2017, 50(1): e5630
- [33] 史笑娜,黄峰,张良,等.红烧肉加工过程中脂肪降解、氧化和挥发性风味物质的变化研究[J].现代食品科技,2017,3: 263-271
- SHI Xiao-na, HUANG Feng, ZHANG Liang, et al. Changes in lipolysis, lipid oxidation, and volatile flavor compounds during the processing of red braised pork [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 3: 263-271
- [34] 朱昱哲.高含量 DHA/EPA 甘油三酯调节脂质代谢和改善胰岛素抵抗作用的研究[D].青岛:中国海洋大学,2013
- ZHU Yi-zhe. The effect on lipid metabolism and insulin resistance of high-content DHA/EPA triglyceride [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013
- [35] Liu X, Xue Y, Liu C, et al. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice [J]. Lipids in Health & Disease, 2013, 12(1): 109
- [36] Joseph V, Pierre A, Riad E K, et al. Peroxisomal acyl-CoA oxidase type 1: anti-inflammatory and anti-aging properties with a special emphasis on studies with LPS and argan oil as a model transposable to aging [J]. Oxidative Medicine Cellular Longevity 2018, 2018(12): 1-13

(上接第 35 页)

- [25] Krawisz J E, Sharon P, Stenson W F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models [J]. Gastroenterology, 1984, 87(6): 1344-1350
- [26] Bhattacharyya S, Gill R, Chen M L, et al. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NFkappaB-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(16): 10550-10558
- [27] Wu W, Zhen Z, Niu T, et al. Kappa-carrageenan enhances lipopolysaccharide-induced interleukin-8 secretion by stimulating the Bcl10-NF-kappaB pathway in HT-29 cells and aggravates *C.freundii*-induced inflammation in mice [J]. Mediators of Inflammation, 2017, 2017(1-4): 8634865-8634865
- [28] 华博高科.卡拉胶在食品工业中的应用实例[EB/OL]. (2015.10.10)[2020.08.20]<https://zhidao.baidu.com/question/1669817855931301427.html>
- Hua Bo Gao Ke. The application example of carrageenan in food industry [EB/OL]. (2015.10.10) [2020.08.20]. <https://zhidao.baidu.com/question/1669817855931301427.html>