

参考文献

- [1] Dennis M H. US FDA “redbook II” immunotoxicity testing guidelines and research in immunotoxicity evaluations of food chemicals and new food proteins [J]. *Toxicologic Pathology*, 2000,28:467-478.
- [2] United States Environmental Protection Agency. Health effects test guidelines OPPTS 870.7800 immunotoxicity [S]. Washington: USEPA, 1998:1-11.
- [3] Luster M I, Munson A E, Thomas P T, et al. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: national toxicology program’s guidelines for immunotoxicity evaluation in mice[J]. *Fund Appl Toxicol*, 1988,10:2-19.
- [4] Luster M I, Portier C, Pait D G, et al. Risk assessment in immunotoxicology: I. sensitivity and predictability of immune tests [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1992,18:200-210.
- [5] Pelaez B, Campillo J A, Lopez-Asenjo J A, et al. Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing tumor cell growth by a nitric oxide-dependent mechanism [J]. *J Immunol*, 2001,166:6608-6615.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范食品安全性毒理学评价程序和方法(2003版)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [7] 周华, 王培训, 刘良, 等. 环磷酰胺对小鼠 Peyer’s 结和肠道粘膜相关淋巴细胞的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2000,17(4): 186-189.
- [8] Harrington C F. The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography [J]. *Trends Anal Chem*, 2000,19:167-179.
- [9] Vallant B, Kadnar R, Goessler W. Development of a new HPLC method for the determination of inorganic and methylmercury in biological samples with ICP-MS detection [J]. *J Anal Spectrom*, 2007,22:322-325.
- [10] 周顺长, 史宵燕, 辛华雯, 等. 不同途径给以环磷酰胺诱发 BALB/c 小鼠免疫低下的结果比较 [J]. *实验动物与比较医学*, 2006,26(1):38-39.
- [11] Stephen AM, Judith ED. Effects of cyclophosphamide on murine candidiasis [J]. *Infect Immunity*, 1980,27:376-386.
- [12] 齐丽娟, 宋雁, 王伟, 等. 用环磷酰胺建立小鼠免疫抑制动物模型 [J]. *卫生研究*, 2010,39(3):313-315.
- [13] 赵弋清, 罗霞, 陈东辉, 等. 不同剂量环磷酰胺诱导正常小鼠免疫抑制的对比研究 [J]. *免疫学杂志*, 2005,21(3):122-124, 128.
- [14] 中华人民共和国卫生部. GB 15193—2003 食品安全性毒理学评价程序和方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

论著

蜂胶黄酮及其功效成分对脂代谢的调节作用

李卫, 张岭, 刘冬英, 来伟旗, 陈建国, 傅颖, 梅松, 刘臻, 王茵
(浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013)

摘要:目的 研究蜂胶黄酮及其功效成分对脂质代谢紊乱的调节作用及机制。方法 建立高脂血症大鼠模型, 研究蜂胶黄酮对大鼠血脂水平及脂质代谢关键酶活性的影响; 同时, 在体外观察蜂胶黄酮功效成分对胰岛素抵抗的改善作用。结果 蜂胶黄酮可显著降低高脂血症大鼠的血清甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)水平($P < 0.05$); 在体外试验中, 蜂胶黄酮可上调肝脂酶(HL)和 7α -羟化酶(7CYP7A1)的活性水平($P < 0.05$); 在胰岛素抵抗的 L6 肌管细胞中, 蜂胶黄酮功效成分 7-甲基白杨素、槲皮素-3-O-新橙皮糖苷和咖啡酸可明显提高细胞对葡萄糖的消耗($P < 0.05$); 7-甲基白杨素 $0.4 \mu\text{g/ml}$ 以及槲皮素-3-O-新橙皮糖苷 $10 \mu\text{g/ml}$ 能显著降低 L6 肌管细胞对游离脂肪酸(FFA)的摄取。结论 蜂胶黄酮可有效改善脂质代谢紊乱, 其作用机制可能是增强脂质代谢关键酶活性以及改善胰岛素抵抗状况。

关键词: 蜂胶; 黄酮; 脂质紊乱

中图分类号: R151.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)03-0225-05

Effect of propolis flavonoids and its effective component on the regulation of lipid metabolism

Li wei, Zhang Ling, Liu Dongying, Lai Weiqi, Chen Jianguo, Fu Ying, Mei Song, Liu Zhen, Wang Yin
(ZheJiang Academy of Medical Science, Zhejiang Hangzhou 310013, China)

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of propolis flavonoids and its effective component on the

收稿日期: 2013-02-20

基金项目: 食品营养与人体健康效应研究(2011F20038); 浙江省医药卫生平台重点资助计划(2011ZDA001); 浙江省重点科技创新团队建设(2009R50028)

作者简介: 李卫 女 硕士生 研究方向为营养与食品卫生学 E-mail: 542930722liwei@sina.com

通信作者: 王茵 女 研究员 研究方向为生物活性成分与人体健康关系 E-mail: wy3333@163.com

regulation of lipid metabolism. **Methods** The effect of propolis flavonoids on serum lipids (TG, TC and HDL-C) and the key enzyme in lipid metabolism (HL and 7CYP7A1) were tested in hyperlipidemia rat model and primary cell line (hepatocyte and adipocyte) respectively; and the effect of the active component from propolis flavonoids on insulin resistance was observed in vitro as well. **Results** The levels of TG and TC in propolis flavonoids group were significantly decreased compared with the group of hyperlipidemia model ($P < 0.05$). The levels of HL and 7CYP7A1 were significantly increased compared with the group of hyperlipidemia model ($P < 0.05$) in vitro. The effective component of propolis flavonoids, including 7-methylchrysin, quercetin-3-O-neohesperidin and caffeic acid, increased the glucose consumption in L6 myotubes ($P < 0.05$). Moreover, 7-methylchrysin in the dose of 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and quercetin-3-O-neohesperidin in the dose of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ could significantly reduce free fatty acids absorption in L6 myotubes. **Conclusion** The mechanism of propolis flavonoids on the regulation of lipid disorders might be depend on the regulation of the key enzyme in lipid metabolism and the insulin resistance.

Key words: Propolis; flavonoids; lipid disorders

脂质代谢紊乱是代谢综合征的一个重要组分,也被认为是心血管疾病的一个独立危险因素^[1]。与脂质代谢紊乱密切相关的各种心血管疾病严重威胁着人类的健康,其发病率和病死率已超过肿瘤性疾病跃居第一位^[2]。临床实践证明,长期服用降脂药物会引起复杂的毒副作用,如肝细胞脂肪病变和肝功能损害。因此,从食物中探索具有调节脂质紊乱功能的有效成分将具有重要意义。蜂胶被称为“紫色黄金”,具有免疫调节、抗氧化、调节血脂、血压、血糖等保健功能^[3-4],引起了国内外学者的关注。本研究拟采用体内与体外相结合的方法,研究蜂胶黄酮及其功效成分对脂质代谢的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF级雄性SD大鼠由浙江省医学科学院提供[许可证号:SCXK(浙)2008-0033],饲养于浙江省医学科学院SPF级动物房[许可证号:SYXK(浙)2011-0166]。蜂胶黄酮由本课题组在前期研究中提取所得,纯度为60%,动物毒性试验显示,大鼠经口喂入蜂胶黄酮4.8 g/(kg·d)和1 g/(kg·d),28 d,进行急性和亚急性毒性试验均无毒性;L6肌管细胞(上海细胞库);胰岛素和棕榈酸(Sigma公司);胎牛血清(FBS,Gibco公司);DMEM高糖培养液、磷酸盐缓冲液(PBS)和胰酶溶液(杭州吉诺公司);葡萄糖氧化酶法测定试剂盒(上海荣盛公司);肝酯酶(HL)试剂盒(南京建成生物工程研究所);大鼠7 α -羟化酶(7CYP7A1)ELISA试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 脂代谢紊乱动物模型建立及蜂胶黄酮预防性干预试验

6周龄SD大鼠60只,体重180~210 g,基础饲

料喂养7 d后,乙醚麻醉,内眦取血,测定血清中甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。随机分为4组,分别为正常对照组(喂养基础饲料)、高血脂模型组(喂养高脂饲料)、蜂胶黄酮低剂量组(PF-L组,高脂饲料+蜂胶黄酮625 mg/kg BW)和蜂胶黄酮高剂量组(PF-H组,高脂饲料+蜂胶黄酮1 250 mg/kg BW)。高脂饲料配方参照《保健食品功能学评价程序和检验方法》,具体配方为基础料80.5%、胆固醇2%、蛋黄粉10%、猪油7%以及胆盐0.5%。试验期间各组大鼠均自由进食与饮水,每周称体重1次,为期9周。试验结束前禁食16 h,乙醚麻醉,内眦取血,分离血清,全自动生化仪测定各组血清中TG、TC和HDL-C水平。

1.2.2 肝脏脂酶(HL)、7 α -羟化酶(CYP7A1)活性测定

无菌环境下取大鼠肝脏,剪碎后用胶原蛋白酶IV消化,用200目的细胞筛进行过滤后,在5% CO₂、37℃、饱和湿度条件下用10% FBS的DMEM高糖培养液进行培养。按2×10⁴个/ml的密度接种于25 cm²的细胞培养瓶中,待细胞融合到60%时,加入蜂胶黄酮使其浓度分别为1、10和50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,培养24 h后,收集细胞,按照试剂盒说明书,测定细胞中HL和7CYP7A1的活性。

1.2.3 L6细胞培养、诱导分化及干预

L6细胞株用含10% FBS的DMEM高糖培养液于5% CO₂、37℃、饱和湿度条件下传代培养。按2×10⁴个/ml的密度接种于24孔板,待细胞融合到70%~80%时,用含2% FBS的DMEM高糖培养液进行诱导分化,隔天换液,直到诱导出肌管^[4]。L6肌管细胞在血清饥饿4 h后,除空白对照孔外,其余各个孔均加入棕榈酸,使其终浓度为250 $\mu\text{mol}/\text{L}$,并孵育24 h用于诱导胰岛素抵抗模型^[5-7]。除胰岛素抵抗模型组外,其余孔分别加入7-甲基白杨素、

槲皮素-3-O-新橙皮糖苷和咖啡酸 0.4、2、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培养 24 h, 100 nmol/L 胰岛素给予急性刺激 30 min 之后收集细胞上清液进行葡萄糖以及游离脂肪酸的测定, 设空白对照组、胰岛素抵抗模型组以及各个药物组。

1.2.4 葡萄糖消耗测定

用葡萄糖氧化酶法测定对照组 (control)、胰岛素抵抗模型组 (FA) 以及 7-甲基白杨素、槲皮素-3-O-新橙皮糖苷和咖啡酸 0.4、2、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组的葡萄糖消耗, 按照试剂盒说明书进行操作, 在 505 nm 波长下检测各个孔的吸光度值 (OD)。计算葡萄糖消耗量时, 以 DMEM 培养液为空白对照, 分别计算出 control、FA、FA + 0.4、FA + 2 和 FA + 10 组的细胞 24 h 葡萄糖消耗量。计算公式如下: 葡萄糖消耗量 = 空白对照培养液中的葡萄糖含量 - 各剂量组培养液中的葡萄糖含量。

1.2.5 脂肪酸消耗量的检测

分别在 7-甲基白杨素、槲皮素-3-O-新橙皮糖苷和咖啡酸 0.4、2、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的剂量下培养细胞 24 h 后, 收集细胞上清液, 用气相色谱法检测细胞上清液中游离脂肪酸 (FFA), 反应细胞摄取脂肪酸的水平。以棕榈油酸甲酯 (C16:1) 为标准品, 以十七烷酸 (C17:0) 为内标, 以 C16:1 含量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 为横坐标, 标准品与内标的曲线下面积比值为纵坐标绘制标准曲线, 由标准曲线计算待测样品的游离脂肪酸含量。计算公式如下: FFA 消耗量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = FFA

空白对照组 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) - FFA 处理组 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)。

1.3 统计学分析

采用统计软件 SPSS 13.0 行统计学分析, 每次试验独立重复 3 次, 定量数据用 \bar{x} 表示, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蜂胶黄酮对高脂血症模型的干预作用

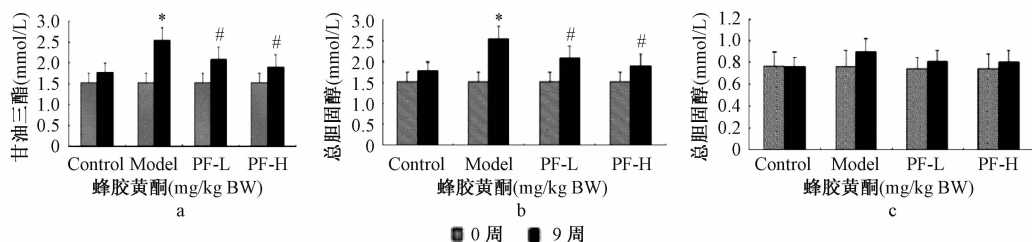
在高脂饲料喂养 9 周后, 高脂模型组的 TG 和 TC 水平明显高于对照组图 1, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明高脂血症模型建立成功; 而给予蜂胶黄酮大鼠的血清 TG、TC 水平明显降低, 与高脂模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中 TG 接近正常水平, 但 HDL-C 水平无明显变化。由此说明, 蜂胶黄酮具有辅助降血脂功能。

2.2 蜂胶黄酮对脂质代谢关键酶活性的影响

HL 和 7CYP7A1 是脂质代谢的关键酶。图 2 中 b 表示随着蜂胶黄酮剂量的增加, HL 活力明显增加, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 图 2 中 a 表示蜂胶黄酮在 10 和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量下, 7CYP7A1 活性明显升高, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 蜂胶黄酮功效成分改善 L6 肌管细胞胰岛素抵抗

由上述试验可知, 蜂胶黄酮具有调节脂质代谢作用, 但是具体哪个成分起主要作用及其机制尚未

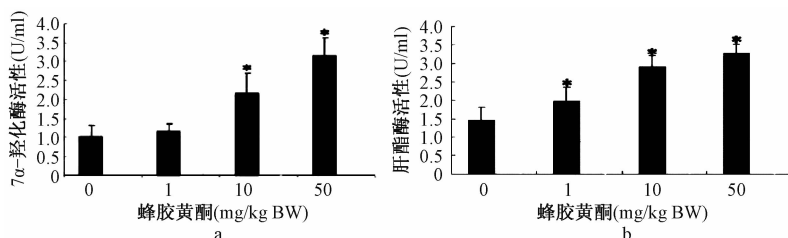


注: 图中 a、b、c 分别为正常对照组、高血脂模型组、PF-L 以及 PF-H 的血清中 TG、TC 以及 HDL-C 水平。

* 表示与对照组比较 $P < 0.05$, # 表示与高脂模型组比较 $P < 0.05$ 。

图 1 蜂胶黄酮对高脂血症模型的干预作用。

Figure 1 Effect of propolis flavonoids on hyperlipidemic rats.



注: a、b 分别代表蜂胶黄酮对大鼠肝细胞 7 α -羟化酶和肝脂酶活性的影响。* 表示与对照组相比 $P < 0.05$ 。

图 2 蜂胶黄酮对脂质代谢关键酶活性的影响。

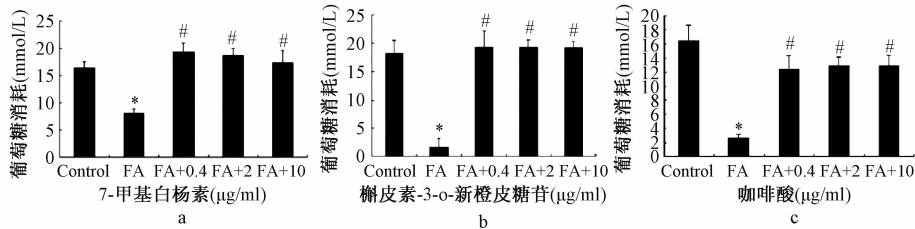
Figure 2 Effect of propolis flavonoids on the key enzyme of the lipid metabolism.

知,因此对蜂胶黄酮分离纯化进行进一步研究。利用硅胶层析进行单体分离纯化,共获得9种化合物,经波谱鉴定分别为:丁香醛、香草酸、咖啡酸、白杨素、7-甲基白杨素、二氢高良姜素、高良姜素、槲皮素、槲皮素-3-O-新橙皮糖苷。在参考理化性质与研究现状的基础上,我们对其中3个单体(7-甲基白杨素、槲皮素-3-O-新橙皮糖苷和咖啡酸)进行了功效研究。

2.3.1 蜂胶黄酮功效成分对L6肌管细胞葡萄糖消

耗的影响

加入不同剂量的7-甲基白杨素、槲皮素-3-O-新橙皮糖苷和咖啡酸可明显提高胰岛素抵抗L6肌管细胞的葡萄糖消耗量且呈剂量依赖性。如图3所示模型组与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明胰岛素抵抗模型建立成功,而各个药物组与模型组比较差异也具有统计学意义($P < 0.05$),说明蜂胶黄酮功效成分能明显改善L6肌管细胞胰岛素抵抗状况。



注:a、b、c 分别代表7-甲基白杨素、槲皮素-3-o-新橙皮糖苷以及咖啡酸对胰岛素抵抗L6肌管细胞的葡萄糖消耗的影响。

*表示与对照组比较 $P < 0.05$,#表示与模型组比较 $P < 0.05$ 。

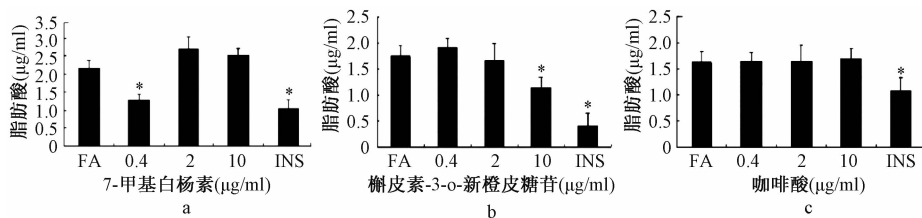
图3 蜂胶黄酮功效成分对L6肌管细胞胰岛素抵抗的影响。

Figure 3 Effect of propolis flavonoids's effective component on glucose consumption in L6 myotubes.

2.3.2 蜂胶黄酮功效成分对L6肌管细胞游离脂肪酸摄取的影响

细胞对脂肪酸的摄入量($P < 0.05$),且槲皮素-3-O-新橙皮糖苷对L6细胞摄入脂肪酸的抑制作用呈剂量依赖性,而咖啡酸对其无影响。

如图4所示,7-甲基白杨素0.4 µg/ml以及槲皮素-3-O-新橙皮糖苷10 µg/ml可明显降低L6肌管



注:a、b、c 分别代表7-甲基白杨素、槲皮素-3-O-新橙皮糖苷以及咖啡酸对胰岛素抵抗L6肌管细胞的游离脂肪酸消耗的影响。

*表示与模型组比较 $P < 0.05$ 。

图4 蜂胶黄酮功效成分对L6肌管细胞游离脂肪酸摄取的影响。

Figure 4 Effects of propolis flavonoids and its effective component on free fatty acids absorption in L6 myotubes.

3 讨论

喂养蜂胶黄酮的高脂血症大鼠,其血清TG、TC水平降低($P < 0.05$),说明蜂胶黄酮具有辅助降脂作用。脂质代谢相关酶是维持体内脂质水平稳定的重要调节因子,其活性的改变可导致体内脂质代谢紊乱,引发高脂血症^[8]。HL是血液循环中与内源性TG代谢有关的参与脂蛋白代谢的关键酶之一,由肝实质细胞合成,主要代谢LDL、HDL等小颗粒脂蛋白,并调节胆固醇从周围组织转移至肝脏,从而防止肝外组织中过量胆固醇的累积^[9-10]。转移至肝脏的胆固醇在7CYP7A1的催化作用下,分解为胆汁酸排出体外。7CYP7A1是胆汁酸合成经典途径的限速酶,人体内近50%的胆固醇在其催化作用下转为胆汁酸排出体

外,防止胆固醇在肝脏中累积^[11-12]。本研究发现蜂胶黄酮可增强HL和7CYP7A1的活性,这可能是其调节血脂水平的机制之一。

胰岛素抵抗是代谢综合征的中心环节,一系列研究表明血脂代谢紊乱导致胰岛素抵抗,而胰岛素抵抗可进一步加重脂质代谢紊乱,形成恶性循环^[13-15]。本试验发现,在FFA诱导胰岛素抵抗肌管细胞中,蜂胶黄酮功效成分可显著提高葡萄糖的消耗水平,提示蜂胶黄酮功效成分可改善胰岛素抵抗状况,这可能就是蜂胶黄酮发挥其改善脂质代谢紊乱功能的一个重要途径。已有研究表明,FFA通过特异性地阻断胰岛素的信号传导通路,在IR(胰岛素抵抗)发病机制中起着关键性的作用^[16-17]。本试验进一步研究发现