

油菜花粉提取物对高脂诱导小鼠非酒精性脂肪肝病的预防作用

黄小强, 赵礼涛, 王婧婧, 贾永一, 郭晓娜, 黄涛, 贾安*

(黄河科技学院医学院 郑州 450063)

摘要 目的:研究油菜花粉提取物对高脂诱导小鼠非酒精性脂肪肝病的预防作用。方法:通过 DPPH 和羟基自由基法测定油菜花粉提取物的抗氧化活性。将 60 只小鼠随机分为正常组、模型组、二甲双胍组(200 mg/kg)、油菜花粉提取物低、中、高剂量组(2,4,8 g/kg)。除正常组给予正常饲料,其它各组给予高脂饲养,同时每天给药 1 次,连续饲养 10 周后,检测小鼠血清、肝脏中相关生化指标及 p-AMPK 和 AMPK 蛋白表达,HE 染色法观察肝脏组织的病理变化。结果:油菜花粉提取物具有较强的抗氧化能力,经过干预后,与模型组相比,高剂量组小鼠肝脏质量显著性降低;所有干预组小鼠血清中 AST、ALT、TG、TC 和 LDL-C 水平及肝脏组织中 TG、TC 和 MDA 水平均显著降低,血清中 HDL-C 和肝脏组织中 SOD 水平均显著增加,肝组织中 p-AMPK 蛋白表达水平显著上调,并改善肝组织病理损伤症状。结论:油菜花粉提取物对高脂诱导小鼠非酒精性脂肪肝病具有预防作用,其机制可能与调控 AMPK 信号通路有关。

关键词 油菜花粉;非酒精性脂肪肝;AMPK

文章编号 1009-7848(2023)04-0136-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.014

非酒精性脂肪肝病 (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是代谢综合征中最常见的慢性肝病之一,肝脏脂肪代谢异常和脂质过度堆积是其重要的发病因素^[1-2]。NAFLD 如得不到及时治疗,可发展为非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化和肝硬化^[3]。近年来,NAFLD 发病率和死亡率都居高不下,已严重威胁到人类生命健康^[4]。

油菜花粉是我国最常见的蜂花粉之一,不仅具有低脂肪、高蛋白的特点,而且含有人体所需要的多种营养物质,是一种珍贵的天然保健食品^[5]。有研究报道油菜花粉具有抗氧化,降血糖,降低血脂和改善 CCl₄ 诱导急性肝损伤作用^[6-8]。然而,目前关于油菜花粉提取物对 NAFLD 的防治作用尚未报道。本研究采用高脂诱导小鼠建立 NAFLD 动物模型,探讨油菜花粉提取物对 NAFLD 的预防作用,为以油菜花粉为原料开发具有预防 NAFLD 的新产品提供一定理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 油菜花粉,河南蜜乐源养蜂专业合作社提供;二甲双胍,上海源叶生物科技有限公司;谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)生化试剂盒,南京建成生物工程研究所;高脂饲料和普通饲料,广州实验动物中心;一抗 p-AMPK、AMPK、 β -actin,美国 Santa 公司;二抗羊抗鼠和羊抗兔,美国 CST 公司;其它试剂均为国产分析纯级。

1.1.2 实验动物 60 只清洁级 8 周龄 C57BL/6j 雄性小鼠,体质量(20 \pm 2) g,上海史莱克实验动物有限公司提供,生产许可证:SCXK(沪)2018-0006,饲养条件温度 21~23 °C,相对湿度 55%~75%,自然光照。

1.1.3 设备与仪器 多功能酶标仪,奥地利 Infinite 公司;高速台式冷冻离心机,美国赛默飞世而科技有限公司;垂直电泳槽、多功能成像系统,美国 Bio-Rad 公司;紫外可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;光学显微镜,OLYMPUS 公司;RM2125 型石蜡切片机,德国 Leica 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 油菜花粉提取物的制备 参考文献[9-10]

收稿日期:2022-04-10

基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20191519);郑州市医药创新科技服务平台(YXCXPT2016);河南省大学生创新创业训练项目(s202011834003)

第一作者:黄小强,男,硕士,讲师

通信作者:贾安 E-mail: 869955076@qq.com

报道,对油菜花粉进行破壁处理,并过筛,称取 100 g,按照料液比为 1:10(g/mL)加入 80%乙醇,采用超声波提取法进行提取,功率 200 W 温度 60 °C,60 min 后,抽滤收集上清液,滤渣重新提取 1 次,合并 2 次滤液,浓缩至无液体滴出,真空冷冻干燥后,-20 °C 保存,备用。采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法^[11-12],以芦丁作为对照品,波长 510 nm 处测吸光度为纵坐标,芦丁标准溶液浓度为横坐标,绘制工作曲线,其工作曲线为 $Y=0.0094X+0.0104$, $R^2=0.9993$,测定油菜花粉提取物中含总黄酮 17.81%。

1.2.2 油菜花粉提取物抗氧化活性测定 精密称取一定量的油菜花粉提取物,配制成不同浓度的待测溶液。按照试剂盒操作说明分别检测油菜花粉提取物清除 DPPH 和羟基自由基的能力。

1.3 油菜花粉提取物对非酒精性脂肪肝作用的影响

1.3.1 实验分组及给药 将 60 只 C57BL/6j 雄性小鼠适应性饲养 1 周后,随机分 6 组:正常组、模型组、二甲双胍组(200 mg/kg)、油菜花粉提取物低、中和高剂量组(2、4 和 8 g/kg,生药量),每组 10 只,正常组小鼠给予普通饲料,其它各组给予高脂饲料,每天灌胃给药 1 次,给药体积为 0.2 mL/10 g 体质量,正常组和模型组灌胃相应体积的空白溶剂,连续饲养 10 周,每 2 周称重 1 次,并记录。

1.3.2 实验动物取材 小鼠禁食、不禁水 12 h,眼球采血,脱臼处死,然后快速取小鼠肝脏,称重,超低温保存,备用。

1.3.3 血清中生化指标的测定 取血后,4 °C 低温离心 10 min,转速 3 500 r/min,取上清,按照试剂盒说明书操作,测定小鼠血清中 AST、ALT、TG、TC、HDL-C 和 LDL-C 水平。

1.3.4 肝脏组织中生化指标的测定 取适量肝脏组织,称重,加入 9 倍体积预冷后的生理盐水,并在冰水浴中充分研磨,4 000 r/min 离心 10 min,取上清,按照试剂盒说明书操作,测定小鼠肝脏组织匀浆液中 TC、TG、SOD 和 MDA 水平。

1.3.5 肝脏组织切片观察 切取黄豆大小肝脏组织,置于 4%多聚甲醛中固定 16 h,经乙醇梯度脱水,石蜡包埋、切片、HE 染色、中性树胶封片、晾干后在光学显微镜下观察,并拍片。

1.3.6 肝组织中 p-AMPK 及 AMPK 蛋白水平的表达 称取 100 mg 肝脏组织置于无菌研磨器中,利用液氮研磨成粉末,加入 10 倍量混有蛋白酶磷酸酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液,充分涡旋 5 min,冰上静置 10 min,4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清,即肝脏总蛋白,采用 BCA 法对蛋白样品进行定量,然后加热变性制备蛋白上样样品,取变性后蛋白样品 40 μg,电泳分离 100 min,转膜 60 min,脱脂奶粉封闭 2 h,TBST 洗膜 10 min×3 次,4 °C 孵育一抗过夜(1:1 000),TBST 洗膜 5 min×3 次,常温孵育二抗 2 h(1:2 000),TBST 洗膜 10 min×3 次,均匀滴加 ECL 化学发光液后,采用多功能成像系统曝光、显影、拍照,以 β-actin 为内参,利用 Image Lab 软件进行灰度值分析。

1.4 数据统计分析

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析,结果以“平均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用单因素方差分析,利用 GraphPad5.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 油菜花粉提取物体外抗氧化活性

由图 1a 可知,油菜花粉提取物对 DPPH 自由基具有较强的清除能力,其清除能力随着质量浓度的增加而不断增强,与 VC 相比,其清除能力仍较弱,当油菜花粉提取物质量浓度达到 0.5 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率超过 80%,然后缓慢增加,经计算其 IC_{50} 值为 0.3767 mg/mL。由图 1b 可知,油菜花粉提取物对羟基自由基也有一定的清除能力,其清除能力随质量浓度的增加而不断增强,然而弱于 VC,当油菜花粉提取物质量浓度达到 2 mg/mL 时,对羟基自由基的清除率超过 60%,经计算其 IC_{50} 值为 0.9531 mg/mL。实验结果表明,油菜花粉提取物具有较强的抗氧化能力。

2.2 油菜花粉提取物对小鼠体质量、肝脏质量及肝脏指数的影响

实验期间各组小鼠生命体征正常、活动正常,无死亡,体质量均增加。由表 1 可知,饲养第 10 周,与正常组相比,模型组小鼠体质量明显大于正常组($P<0.01$);与模型组相比,各给药组小鼠体质量均小于模型组,其中油菜花粉提取物的中剂量和高剂量组小鼠体质量显著低于模型组($P<0.05$,

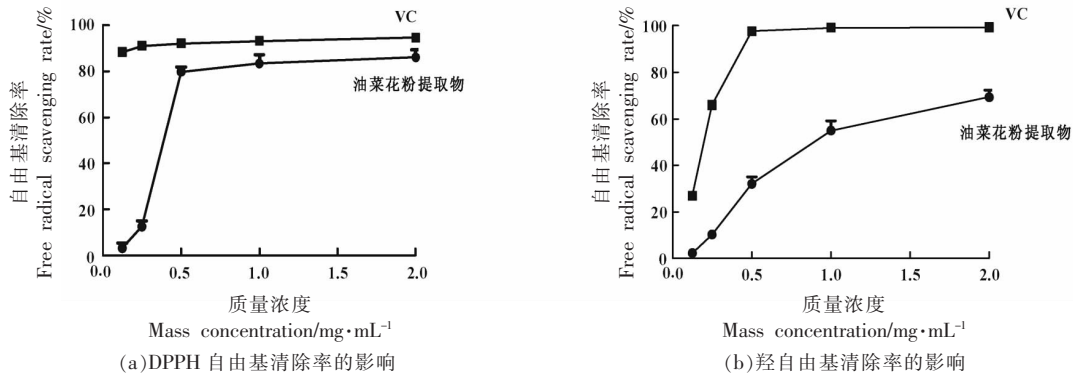


图1 油菜花粉提取物体外抗氧化活性

Fig.1 Antioxidant activity of rape pollen extract *in vitro*

$P < 0.01$)。实验结果表明,油菜花粉提取物具有减肥的作用。

由图2可知,与正常组比较,模型组小鼠肝脏质量显著性大于正常组($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肝脏质量均小于模型组,其中高剂

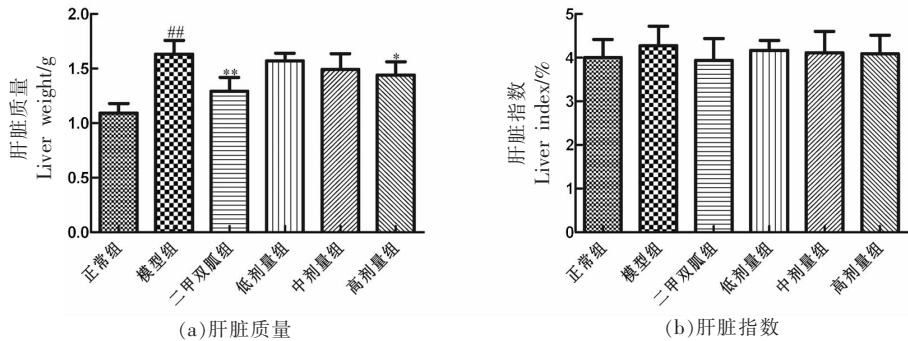
量组具有显著性差异($P < 0.05$),降低 10.55%;同时比较发现,各组小鼠肝脏指数无显著性差异。实验结果表明,油菜花粉提取物能够减缓小鼠肝脏质量增加,对小鼠肝脏指数无影响。

表1 油菜花粉提取物对小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of rape pollen extract on body weight of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	第0周	第2周	第4周	第6周	第8周	第10周
正常组	18.77 ± 0.88	20.23 ± 0.78	21.92 ± 0.81	24.08 ± 0.69	36.34 ± 0.69	27.95 ± 0.77
模型组	18.58 ± 0.54	24.05 ± 0.29 ^{##}	27.23 ± 0.46 ^{##}	30.37 ± 0.85 ^{##}	34.35 ± 0.54 ^{##}	36.95 ± 0.74 ^{##}
二甲双胍组	18.54 ± 0.63	22.17 ± 0.85 ^{**}	24.83 ± 0.91 ^{**}	26.79 ± 0.46 ^{**}	28.71 ± 0.46 ^{**}	32.31 ± 0.89 ^{**}
低剂量组	18.58 ± 1.06	24.19 ± 0.66	26.85 ± 0.48	29.61 ± 0.55	33.56 ± 0.67	35.88 ± 0.74
中剂量组	18.50 ± 0.91	23.37 ± 1.07	26.23 ± 1.14	28.58 ± 0.72 [*]	32.25 ± 0.71 ^{**}	33.87 ± 1.06 ^{**}
高剂量组	18.62 ± 0.96	22.20 ± 0.62 ^{**}	25.09 ± 0.38 ^{**}	28.50 ± 0.77 ^{**}	30.17 ± 0.62 ^{**}	32.56 ± 0.85 ^{**}

注:与正常组比较,##. $P < 0.01$;与模型组组比较,*. $P < 0.05$,**. $P < 0.01$ 。



注:与正常组比较,##. $P < 0.01$;与模型组组比较,*. $P < 0.05$,**. $P < 0.01$ 。

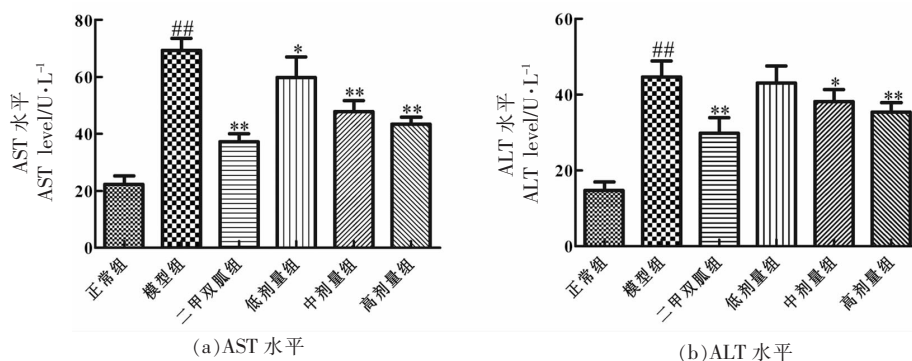
图2 油菜花粉提取物对小鼠肝脏质量和肝脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig.2 Effects of rape pollen extract on liver quality and liver index in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.3 油菜花粉提取物对小鼠血清中 AST 和 ALT 水平的影响

由图 3 可知,与正常组比较,模型组小鼠血清中 AST 和 ALT 水平显著升高($P<0.01$),表明模型组小鼠肝功能发生了异常;与模型组比较,各给药组小鼠血清中 AST 和 ALT 水平均有不同程度降

低,其中 AST 水平在各给药组均显著性降低($P<0.05, P<0.01$),分别降低 13.85%,31.01%,37.58%,油菜花粉提取物的中剂量组和高剂量组小鼠血清中 ALT 水平均显著降低($P<0.05, P<0.01$),分别降低 14.45%,20.59%。实验结果表明,油菜花粉提取物具有一定的保肝作用。



注:与正常组比较,##. $P<0.01$;与模型组比较,*. $P<0.05$,**. $P<0.01$ 。

图 3 油菜花粉提取物对 AST 和 ALT 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig.3 Effect of rape pollen extract on AST and ALT levels ($\bar{x} \pm s, n=10$)

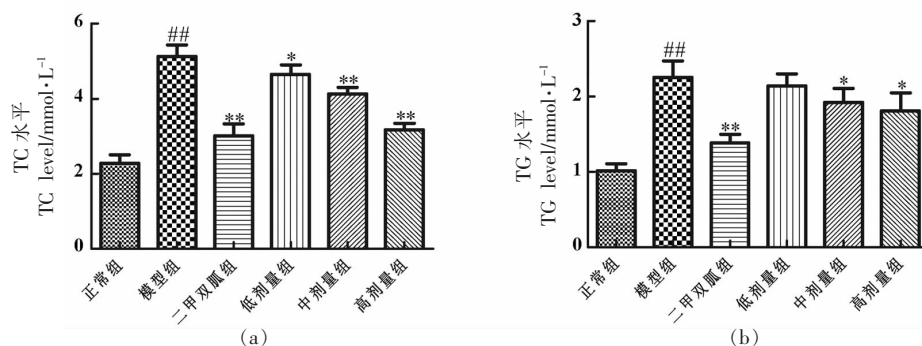
2.4 油菜花粉提取物对小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平的影响

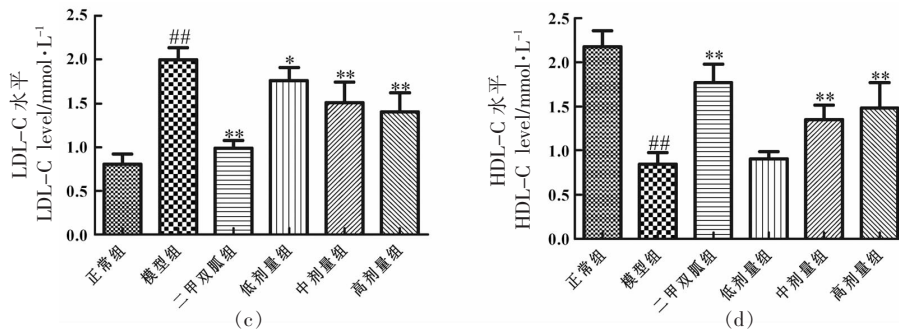
由图 4 可知,与正常组比较,模型组小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平均显著升高($P<0.01$),HDL-C 水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,油菜花粉提取物各剂量组小鼠血清中 TC 和 LDL-C 水平均显著降低($P<0.05, P<0.01$),TC 分别降低 9.22%,19.45%,38.03%,LDL-C 分别降低 11.92%,24.25%,29.56%,中剂量组和高剂量组血清中 TG 水平显著降低($P<0.05, P<0.01$)分别降低 13.85%,19.54%,HDL-C 水平在中、高剂量组均显著增加($P<0.01$),分别增加 59.81%,74.94%。实验结果表

明,油菜花粉提取物具有一定的调节血脂的作用。

2.5 油菜花粉提取物对小鼠肝脏组织中 SOD 和 MDA 水平的影响

由图 5 可知,与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织中 SOD 水平显著降低($P<0.01$),然而 MDA 水平显著增加($P<0.01$);与模型组比较,各组小鼠肝脏组织中 SOD 水平均有一定程度升高,其中,中剂量和高剂量组分别增加 19.65%和 43.93%,而 MDA 水平均有一定程度降低,其中,中剂量和高剂量组分别降低 11.88%和 32.39%。实验结果表明,油菜花粉提取物具有调节机体氧化应激的作用。

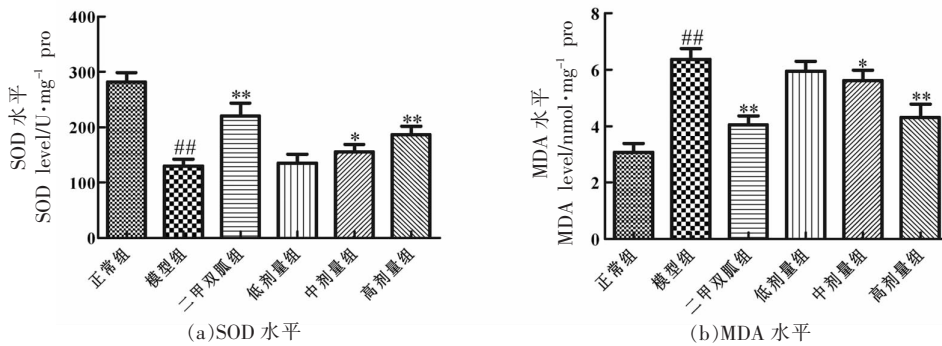




注:与正常组比较,##. $P < 0.01$;与模型组比较,*, $P < 0.05$,**, $P < 0.01$ 。

图4 油菜花粉提取物对 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig.4 Effects of rape pollen extract on TC, TG, LDL-C and HDL-C levels ($\bar{x} \pm s, n=10$)



注:与正常组比较,##. $P < 0.01$;与模型组比较,*, $P < 0.05$,**, $P < 0.01$ 。

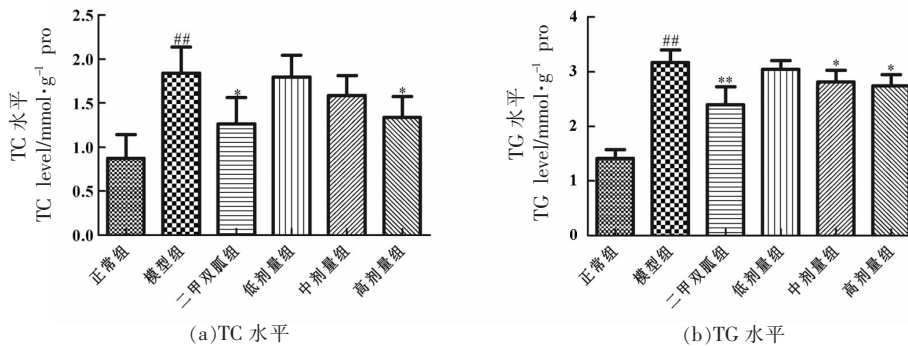
图5 油菜花粉提取物对小鼠肝脏组织中 SOD 和 MDA 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig.5 Effect of rape pollen extract on SOD and MDA activity in liver tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.6 油菜花粉提取物对小鼠肝脏组织中 TC 和 TG 水平的影响

由图6可知,与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织中 TG 和 TC 水平均显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肝脏组织中 TG 和 TC 水

平均有不同程度降低,中剂量和高剂量组 TG 水平均显著降低 ($P < 0.05$),分别降低 11.08% 和 13.53%,TC 水平在高剂量组显著降低 ($P < 0.05$),降低 27.95%。实验结果表明,油菜花粉提取物能够降低肝脏组织中 TC 和 TG 水平。



注:与正常组比较,##. $P < 0.01$;与模型组比较,*, $P < 0.05$,**, $P < 0.01$ 。

图6 油菜花粉提取物对小鼠肝脏组织中 TC 和 TG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig.6 Effect of rape pollen extract on TC and TG levels in liver tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.7 油菜花粉提取物对小鼠肝脏组织病理形态学的影响

由图 7 可知,正常组小鼠的肝脏细胞结构完整,未发生较为明显变化。模型组小鼠肝脏细胞形态损伤严重,例如肝细胞出现大量大小不等的气泡样脂肪空泡,细胞核被挤一侧,脂肪变性严重。

与模型组比较,各给药组小鼠肝脏细胞脂肪变性减轻,脂肪空泡数量减少,体积变小,其中油菜花粉提取物的中、高剂量组缓解较为明显。实验结果表明,油菜花粉提取物具有改善肝脏细胞脂肪变性的作用。

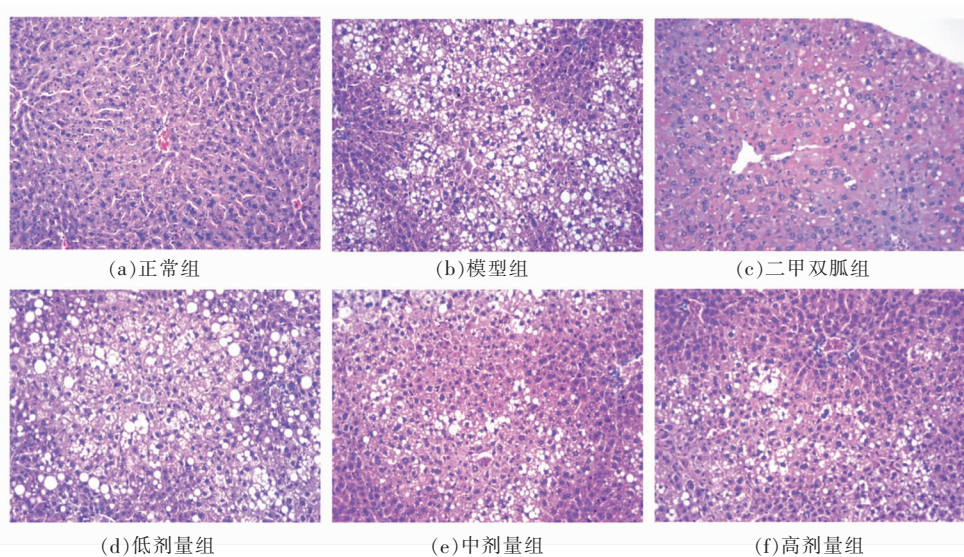


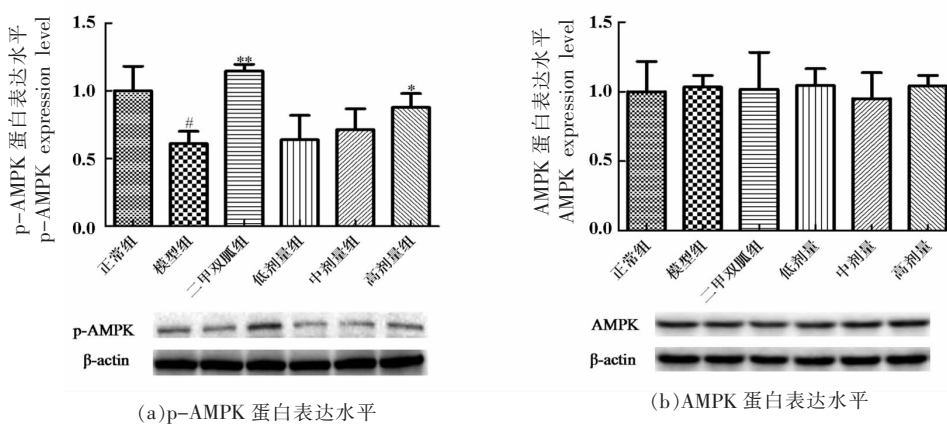
图 7 油菜花粉提取物对小鼠肝脏组织病理形态学的影响

Fig.7 Effect of rape pollen extract on liver histopathology in mice

2.8 油菜花粉提取物对肝脏组织中 p-AMPK 和 AMPK 蛋白表达的影响

由图 8 可知,与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织 p-AMPK 蛋白显著降低 ($P < 0.05$),与模型组比较,各给药组小鼠肝脏组织中 p-AMPK 蛋白表

达水平均有一定程度升高,其中高剂量组显著增加 ($P < 0.05$),增加 48.85%;AMPK 蛋白表达在各组间无显著性变化。实验结果表明,油菜花粉提取物能够激活 AMPK 蛋白的表达。



注:与正常组比较,#. $P < 0.05$;与模型组比较,*. $P < 0.05$ 。

图 8 油菜花粉提取物对小鼠肝脏组织中 p-AMPK 及 AMPK 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.8 Effect of rape pollen extract on the expression of p-AMPK and AMPK in mouse liver tissue ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

在本实验中,采用80%乙醇提取制备油菜花粉提取物,总黄酮含量为17.81%,通过体外抗氧化实验表明,油菜花粉提取物对DPPH和羟基自由基的 IC_{50} 值分别为0.3767 mg/mL和0.9531 mg/mL,验证了油菜花粉具有抗氧化的能力^[13-14]。大量国内外学者报道,黄酮类含量较高的天然产物具有降脂、减肥^[15-16]、防治NAFLD发生的作用^[17-19]。目前,为深入探讨NAFLD的发病机制,建立了多种动物造模方法,包括营养失调型、转基因改良型、药物和毒物损伤型^[20]。其中,采用营养失调型进行造模,不仅具有成模率高,模型稳定的优点,而且最符合人类NAFLD的发生发展过程^[21],因此目前国内外多采用该方法。本研究采用高脂饮食诱导建立小鼠NAFLD模型,研究油菜花粉提取物对NAFLD的预防效果。研究结果发现小鼠长期摄入高脂饲料,导致小鼠体质量增加,肝功能、脂质代谢功能及氧化应激指标均异常,肝脏细胞发生脂肪变性,给予油菜花粉提取物干预后可以抑制小鼠体质量增加,调节肝功能,改善脂质代谢及氧化应激,减轻肝脏细胞脂肪变性。

长期高脂饮食能够引起血清中FFA含量的升高,破坏细胞膜的通透性,导致细胞中的AST和ALT流入血液中,因此评价肝功能损伤程度常用AST和ALT表示^[22-23]。本研究结果显示,模型组小鼠血清中AST和ALT活力明显高于正常组,药物干预组小鼠血清中的AST和ALT活力不同程度低于模型组。提示,油菜花粉提取物具有一定的保肝作用。

高脂饮食会导致机体出现高脂血症,文献研究大约有90%的高脂血症患者患有脂肪肝^[24]。因此血清中TC、TG、HDL-C和LDL-C水平的高低与脂肪肝密切相关。本研究结果显示,模型组小鼠血清中TC、TG和LDL-C水平明显高于正常组,而HDL-C水平明显低于正常组,药物干预组小鼠血清中TC、TG和LDL-C水平不同程度低于模型组,HDL-C水平高于模型组。结果表明,油菜花粉提取物具有调节血脂的作用。

脂肪合成与分解的主要器官是肝脏^[25]。高脂饮食不仅增加饮食中的热量,而且增加肝脏组织中TC、TG和FFA的生物合成,减少了肝脏组织中

TG和TC的降解以及FFA的氧化^[23]。TG、TC和FFA在肝脏中不断积累形成脂肪肝。本研究结果显示,模型组小鼠肝脏中TC和TG水平明显高于正常组,肝脏细胞脂肪性病变更明显,肝脏质量显著增加;药物干预组小鼠肝脏中TC和TG水平不同程度低于模型组,肝脏细胞脂肪性病变更有明显改善,而且肝脏质量显著降低。提示,油菜花粉提取物具有调节肝脏脂质代谢的作用。

此外,研究报道氧化应激也是NAFLD发病机制重要因素之一^[26]。SOD是细胞内天然的抗氧化物酶,能够抑制自由基产生,清除自由基及修复损伤等^[27]。MDA作为自由基参与脂质过氧化反应的最终产物,其表达升高可导致肝细胞损伤^[28]。本研究结果显示,模型组小鼠肝脏组织中SOD水平降低,MDA水平升高;药物干预组小鼠肝脏中SOD水平升高,MDA水平降低,提示,油菜花粉提取物具有调节氧化应激的作用。

AMPK作为调节细胞能量代谢的重要传感器,在调节能量代谢过程中起关键作用,被认为是治疗代谢性疾病的靶点^[29]。AMPK为细胞能量代谢的中枢,主要通过调节三大营养物质的合成与转化,维持细胞内能量代谢平衡^[30]。AMPK对脂肪代谢的调控,主要调节PPARs、SREBP-1c、FAS和ACC等转录因子表达,实现脂肪氧化和合成的调节^[31]。本研究结果显示,模型组小鼠肝脏组织中p-AMPK表达水平显著降低;药物干预组小鼠肝脏中p-AMPK表达水平显著升高。而各组间AMPK表达水平无统计学差异,结果表明,油菜花粉提取物具有调节机体能量代谢的作用。

综上所述,油菜花粉提取物对高脂诱导NAFLD具有一定的预防作用,其可能与油菜花粉提取物的保肝、改善脂质代谢紊乱,调节氧化应激及激活AMPK信号通路有关。此研究为今后油菜花粉提取物用于临床治疗脂肪肝以及开发保肝护肝药提供一定理论依据。

参 考 文 献

- [1] 赵红, 谢雯. 非酒精性脂肪性肝病的中西医结合治疗现状[J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(1): 16-18.

- ZHAO H, XIE W. Current status of treatment of nonalcoholic fatty liver disease with integrated traditional Chinese and western medicine [J]. Chinese Journal for Clinicians, 2020, 48(1): 16-18.
- [2] 张海博, 王宇. 非酒精性脂肪肝的现代研究进展[J]. 海南医学, 2017, 28(10): 1651-1653.
- ZHANG H B, WANG Y. Research progress of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hainan Medical Journal, 2017, 28(10): 1651-1653.
- [3] LI J, GONG L, LIU S, et al. Adipose HuR protects against diet-induced obesity and insulin resistance[J]. Nature Communications, 2019, 10 (1): 2375-2381.
- [4] 邹堂斌, 杨海, 唐夕岚, 等. 虾青素对高脂诱导小鼠非酒精性脂肪肝的保护作用[J]. 营养学报, 2016, 38(4): 386-390.
- ZOU T B, YANG H, TANG X L, et al. Protection of astaxanthin against high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2016, 38(4): 386-390.
- [5] 李志, 李琳, 石晓峰. 油菜花粉化学成分和药理作用的研究进展[J]. 甘肃医药, 2018, 37(5): 394-398.
- LI Z, LI L, SHI X F. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of rape pollen [J]. Gansu Medical Journal, 2018, 37 (5): 394-398.
- [6] 李姗姗, 赵鸿仁, 王伟. 破壁油菜花粉配伍的体内抗氧化活性研究[J]. 辽宁科技大学学报, 2020, 43 (3): 237-240.
- LI S S, ZHAO H R, WANG W. Antioxidant activity *in vivo* of wall-broken rape pollen and its compatibilities[J]. 2020, 43(3): 237-240.
- [7] 陈小夏, 陈冰. 油菜花粉提取物对高脂血症大鼠血脂的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 10(3): 18-19.
- CHEN X X, CHEN B. Effects of extract from rape pollen on blood lipids in experimental hyperlipidemic rats[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2004, 10(3): 18-19.
- [8] 申佳敏, 李元, 韩宁娟, 等. 油菜花粉研究概况[J]. 陕西农业科学, 2021, 67(7): 94-97, 104.
- SHEN J M, LI Y, HAN N J, et al. Review of research in rape pollen[J]. 2021, 67(7): 94-97, 104.
- [9] 杨义芳, 李永辉, 李坤. 一种破壁花粉的提取物及其提取方法和应用: CN101332218[P]. 2007-06-29.
- YANG Y F, LI Y H, LI K. An extract of wall-broken pollen and its extraction method and application: CN101332218[P]. 2007-06-29.
- [10] 杨晓萍, 余志勤. 油菜花粉破壁方法研究[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(6): 671-672.
- YANG X P, YU Z Q. Study on breaking-wall method of rape pollen[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2004, 23(6): 671-672.
- [11] 王杰, 张鹏锋, 赵小娜, 等. 响应面法优化狮头柑果皮总黄酮提取工艺[J]. 西北林学院学报, 2021, 8 (5): 118-124.
- WANG J, ZHANG P F, ZHAO X N, et al. Optimization for the extraction process of the flavonoids from the peels of citrus reticulata fruit by response surface methodology[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2018, 8(5): 118-124.
- [12] 吴进东, 董欣华, 朱旺生, 等. 霍山石斛花总黄酮微波辅助提取工艺的优化[J]. 中成药, 2021, 43 (7): 1704-1707.
- WU J D, DONG X H, ZHU W S, et al. Optimization of microwave-assisted extraction process for total flavonoids from *Dendrobidium huoshanense* flowers[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2021, 43(7): 1704-1707.
- [13] 王伟, 张晓丽, 李姗姗. 破壁油菜花粉在体抗氧化作用及量效[J]. 辽宁科技大学学报, 2020, 43(6): 478-480.
- WANG W, ZHANG X L, LI S S. Antioxidation and dosage effects of wall-broken rape pollens *in vivo*[J]. Journal of University of Science and Technology Liaoning, 2020, 43(6): 478-480.
- [14] 廖吕燕, 陈小权, 李健, 等. 油菜花粉超微粉对肉鸡免疫功能和抗氧化能力的影响[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(12): 2398-2403.
- LIAO L Y, CHEN X Q, LI J, et al. Effects of rape pollen ultramicro powder on immune function and antioxidant capacity of broiler chickens[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018, 38(12): 2398-2403.
- [15] 朱琪, 曾立, 李庚喜, 等. 金银花水提取总黄酮对高血脂小鼠的降血脂机制研究[J]. 中国预防医学杂志, 2020, 21(7): 737-743.
- ZHU Q, ZENG L LI G X, et al. Preliminary study on the mechanism of water extraction from honeysuckle total flavonoids on blood lipids in hyperlipidemic mice[J]. Chinese Preventive Medicine, 2020,

- 21(7): 737-743.
- [16] 叶爱琴, 蒋剑平, 李润, 等. 衢枳壳黄酮对高脂血症金黄地鼠降血脂作用及其机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(16): 1938-1946.
- YE A Q, JIANG J P, LI R, et al. Study on hypolipidemic effect of pure total flavonoids from *quaurantii fructus* on golden hamsters of hyperlipidemia and its potential mechanism[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2020, 37(16): 1938-1946.
- [17] 马莹莹, 武改, 曹琳洁. 东风菜总黄酮对非酒精性脂肪肝大鼠的干预作用[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(4): 21-25.
- MA Y Y, WU G, CAO L J, et al. Preliminary study on the intervention effect of total flavonoids of Dongfeng vegetable on nonalcoholic fatty liver in rats [J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2021, 17(4): 21-25.
- [18] 马玉秀, 寇毅英. 银杏黄酮对非酒精性脂肪肝小鼠的影响及其机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(8): 795-797.
- MA Y X, KOU Y Y. Exploration of the intervention effect and action mechanism of ginkgo flavonoids for Non-alcoholic fatty liver disease mice[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2019, 35(8): 795-797.
- [19] 许永杰, 卢志顺, 罗洁. 大豆异黄酮减轻大鼠非酒精性脂肪肝病变的作用研究[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(2): 188-191.
- XU Y J, LU Z S, LUO J. Study on effect of soy isoflavones in reducing lesion of rat non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Journal of Modern Medicine & Health*, 2019, 35(2): 188-191.
- [20] 陈剑明, 王丙信, 伏爱国, 等. 高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝大鼠模型的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(11): 2709-2712.
- CHEN J M, WANG B X, FU A G, et al. Model rats of non-alcoholic fatty liver induced by high fat diet[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 34(11): 2709-2712.
- [21] TAKAHASHI Y, SOEJIMA Y, FUKUSATO T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(19): 2300-2308.
- [22] 徐万鹏, 梁英琴, 韦秀桂, 等. 老鼠筋生物碱 A 对大鼠非酒精性脂肪肝的改善作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2020, 31(16): 1955-1960.
- XU W P, LIANG Y Q, WEI X G, et al. Study on the improvement effect and mechanism of ilicifoliosids alkaloid a on non-alcoholic fatty liver disease in rats[J]. *China Pharmacy*, 2020, 31(16): 1955-1960.
- [23] PARK H J, JUNG U J, LEE M K, et al. Modulation of lipid metabolism by polyphenol-rich grape skin extract improves liver steatosis and adiposity in high fat fed mice [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2013, 57(2): 360-364.
- [24] ADAMS L A, ANGULO P, LINDOR K D. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Annals of Epidemiology*, 2007, 17(11): 863-869.
- [25] LIU Y H, YONG Z, ZHANG X S, et al. Medium-chain fatty acids reduce serum cholesterol by regulating the metabolism of bile acid in C57BL/6J mice [J]. *Food & Function*, 2016, 8(1): 291-298.
- [26] SHI J J, ZHAO Y, HUANG H W, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-665.
- [27] QU L L, YU B, LI Z, et al. Gastrodin ameliorates oxidative stress and proinflammatory response in nonalcoholic fatty liver disease through the AMPK/Nrf2 pathway[J]. *Phytotherapy Research*, 2016, 10(30): 402-411.
- [28] GUO Y, LIANG X, MENG M, et al. Hepatoprotective effects of Yulangsan flavone against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis in rats [J]. *Phytomedicine*, 2017, 33(17): 28-35.
- [29] DANIEL G, REUBEN J S. AMPK: Mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(6): 789-800.
- [30] CHAN A, DYCK J. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibits protein synthesis: A potential strategy to prevent the development of cardiac hypertrophy[J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2005, 83(1): 24-28.
- [31] LI Y, XU S Q, MIHAYLOVA M M, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice [J]. *Cell Metabolism*, 2011, 13(4): 376-388.

Preventive Effect of Rape Pollen Extract on Nonalcoholic Fatty Liver Mice Induced by High Fat

Huang Xiaoqiang, Zhao Litao, Wang Jingjing, Jia Yongyi, Guo Xiaona, Huang Tao, Jia An*
(Medical School, Huanghe Science & Technology College, Zhengzhou 450063)

Abstract Objective: To study the preventive effect of rape pollen extract on nonalcoholic fatty liver disease in mice induced by high-fat diet. Methods: The antioxidant activity of rape pollen extract was determined by DPPH and OH methods. Sixty mice were divided into normal group, model group, metformin group (200 mg/kg), low-, medium- and high-doses rape pollen extract (2, 4, 8 g/kg). While the normal group mice were fed with regular diet, the other groups were fed with high-fat diet, at the same time, the drug was administered once a day. After 10 weeks of continuous feeding, the related biochemical indexes in serum and liver and the expression of p-AMPK and AMPK protein were detected. The pathological changes of liver were observed by HE staining. Result: The rape pollen extract has strong antioxidant capacity. After intervention, compared with the model group, the liver weight of mice in the high-dose group decreased significantly. In all intervention groups, the levels of AST, ALT, TG, TC and LDL-C in serum and TG, TC and MDA in liver tissue were significantly decreased, while the levels of HDL-C in serum and SOD in liver tissue were significantly increased. The expression of p-AMPK protein in liver tissue was significantly up-regulated, and the symptoms of liver pathological injury were improved. Conclusion: Rape pollen extract can prevent nonalcoholic fatty liver disease induced by high fat in mice, and its mechanism may be related to the regulation of AMPK signal pathway.

Keywords rape pollen; NAFLD; AMPK