

板栗壳色素通过 AMPK 信号通路改善肥胖小鼠的脂代谢紊乱

张晓云^{1,2}, 梅晓宏^{1,2*}

¹ 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083

² 农业农村部农业转基因生物安全评价(食用)重点实验室 北京 100083)

摘要 目的:探讨板栗壳色素(CSP)对肥胖小鼠脂代谢紊乱的改善作用及其分子机制。方法:将雄性 C57BL/6J 小鼠分为正常饮食(N)组、高脂饮食(HFD)组、高脂饮食+20 mg/kg CSP(HFD-L)组、高脂饮食+50 mg/kg CSP(HFD-H)组、高脂饮食+20 mg/kg 儿茶素(HFD-C)组,每周测量小鼠体质量和进食量,14 周后检测小鼠肝脏和附睾脂肪质量、血清血脂水平,进行脂肪与肝脏形态学分析,检测肝脏中脂肪代谢关键蛋白的表达等。结果:与 HFD 组相比,HFD-L 和 HFD-H 组小鼠体质量增长量分别降低 28.67%和 39.16%;附睾脂肪质量分别降低 23.63%和 42.80%;CSP 能减少进食量、脂肪细胞的扩大和肝脏脂肪的积累,降低血清 TG、TC、LDL-C、ALT 和 AST 水平,升高 HDL-C,显著升高小鼠肝脏组织中 p-AMPK/AMPK、p-ACC/ACC、PPAR α 的表达量,显著降低 SREBP-1c 和 HMGCR 的表达量,且作用效果比单一儿茶素效果好。结论:板栗壳色素具有改善肥胖小鼠脂代谢的作用,此作用与激活 AMPK 信号通路相关。

关键词 板栗壳色素; 高脂饮食; 肥胖; 脂代谢; 腺苷酸活化蛋白激酶

文章编号 1009-7848(2023)07-0177-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.019

目前肥胖已成为全球公共健康问题^[1]。2016 年,超过 19 亿 18 岁及以上的成年人患有肥胖症^[2]。据估计,到 2025 年,世界范围内的肥胖人口将增加 50%以上,中国将会有 46%的成年人和 15%的儿童超重或肥胖^[3]。而肥胖又是多种疾病的主要诱因,如心血管疾病、糖尿病、高血脂、高血压、脂肪肝等^[4]。快节奏的生活方式使得通过运动来预防肥胖并非易事,而长期使用减肥药物会对人体产生毒副作用,因此,人们更偏向于从植物性食物或药物中提取对人体无害的天然活性成分,通过食用这些天然的产物来达到预防肥胖或减肥的目的。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是一种 AMP 依赖性蛋白激酶,是生物能量代谢调节的关键分子,参与肥胖、脂代谢异常、糖尿病、肿瘤、炎症以及阿尔茨海默病等多种疾病的发生^[5],因此近年来逐渐成为研究代谢相关疾病的核心。激活 AMPK 可增强组织对胰岛素、葡萄糖摄取和脂肪酸氧化的敏感性,抑制糖异生、胆固醇和甘油三酯的产生,在能量代谢调节方面起到关键性作用^[6]。一些天然的活性成分通过激活

AMPK 来达到调节机体代谢的作用,如米糠酚提取物能通过激活肝脏中 AMPK,进而促进 ACC 磷酸化和抑制 HMGCR 蛋白表达来改善高脂饲料喂养的小鼠脂代谢受损^[7]。富含原儿茶酸、咖啡酸和鞣花酸等酚类化合物的莲子酚提取物能显著降低 3T3-L1 细胞内脂质积累,抑制 HFD 饲养小鼠体质量的增加,改善血脂水平,增加 AMPK 的磷酸化,同时下调脂肪合成相关基因 *SREBP-1c*、*ACC1*、*FAS* 等的表达,上调脂肪分解相关基因 *PGC-1 α* 、*Sirt1*、*CPT1 α* 和脂联素的表达,表明莲子结合酚类物质可能通过调节 AMPK 信号通路来减轻肥胖^[8]。紫玉米花青素可以下调 *SREBP-1c* 基因表达,上调 *PPAR α* 、*PGC1 α* 等基因的表达,促进肝脏 AMPK 活性,抑制脂质合成关键酶 ACC 活性,具有预防肥胖的潜力^[9]。

据美国粮食及农业组织报道,2017 年中国的板栗产量占全球的 83%以上,是全球最大的板栗生产国^[10]。板栗加工过程中产生了大量的废料,包括内壳和外壳,约占整个板栗质量的 15%~20%^[11]。板栗壳色素(Cheatnut shells pigment, CSP)是从板栗壳提取的一种天然棕色色素,富含酚类和黄酮类物质,具有抗氧化、抗菌、抗高血糖以及癌症等多种生物活性^[12-15],然而目前对 CSP 的研究仅局限于体外生物活性,对其体内生理活性功

收稿日期: 2022-07-25

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX0801102B-002)

第一作者: 张晓云,女,硕士生

通信作者: 梅晓宏 E-mail: mxh@cau.edu.cn

能的研究报道较少。

本实验通过饲喂高脂饲料构建 C57BL/6J 小鼠肥胖模型,研究 CSP 对肥胖小鼠的脂代谢紊乱的改善作用,并探究 CSP 对 AMPK 及其相关通路的调控机制。本研究旨在为进一步扩大板栗壳废弃物应用领域提供理论基础,同时为肥胖和脂代谢紊乱的预防和治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 板栗壳色素 本实验室前期成功提取、分离、纯化得到板栗壳色素冻干粉,并鉴定出 13 种酚类物质,分别为儿茶素、原花青素 B₂、*p*-羟基苯甲酸、花青素、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、表儿茶素没食子酸酯、花旗松素、异鼠李素-3-*O*-半乳糖苷、橙皮苷、棕矢车菊素、黄芩素 4'-甲基醚、异鼠李素、百里香酚- β -*D*-葡萄糖苷,此外,还鉴定出 2 种生物碱(千里光碱、辛可宁碱)和 1 种萜类化合物(积雪草酸)。

1.1.2 实验动物 50 只 4 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,北京市维通利华有限公司(许可证号:SCXK(京)2021-0006)。

1.1.3 试剂 没食子酸标品(HPLC \geq 98%)、儿茶素(\geq 98%),索莱宝公司;甘油三酯(Total triglycerides, 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)、丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase, AST)试剂盒,深圳雷杜生命科学股份有限公司;腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(*p*-AMPK (Thr172))、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶(*p*-ACC (Ser79))、过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR α)、甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGCR)、固醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)一抗抗体,Cell Signaling Technology 有限公司;内参 β -Tubulin 和二抗抗体,碧云天生物技术有限公司。小鼠基础饲料(3.40 kcal/g,脂肪供能占比 12%)、60%高脂饲料(5.24 kcal/g,脂肪供能占比 60%),

北京科澳协力饲料有限公司。

1.2 设备与仪器

Centrisart D-16C 高速离心机,德国 Eppendorf 公司;DM2500 显微镜,德国 Laica 公司;KZ-II 高速组织研磨仪,Servicebio 公司;FA1004B 分析天平,上海越平科学仪器有限公司;UNIQUE-R20 纯水仪,厦门锐思捷生命科学有限公司;-80 °C 超低温冰箱,日本 SANYO 公司;TU-1901 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 实验方法

1.3.1 CSP 多酚含量的测定 采用福林酚测定总酚含量^[6]。取 10 μ L 1 mg/mL 的 CSP 水溶液,加入一定量超纯水进行稀释,然后依次加入 1 mL 福林酚试剂和 1 mL 10%Na₂CO₃ 溶液,超纯水定容至 4 mL。在 50 °C 下避光反应 5 min,于波长 765 nm 处测吸光度。以没食子酸作为标准品,计算 CSP 中总酚含量。

1.3.2 动物实验 小鼠饲养在 SPF 级动物房中,每笼 4 只,12 h 黑夜,12 h 光照,温度 20~25 °C,湿度 45%~65%,适应性喂养 1 周后开始实验。小鼠随机分成 5 组,每组 10 只。对照组(N 组)饲喂基础饲料,其它组饲喂 60%高脂饲料(High fat diet, HFD),分别为高脂饮食对照组(HFD 组)、高脂饮食+低剂量组(HFD-L 组)、高脂饮食+高剂量组(HFD-H 组)和高脂饮食+儿茶素组(HFD-C 组),HFD-L、HFD-H 和 HFD-C 组在饲喂高脂饲料基础上每日灌胃剂量分别为 20,50 mg CSP/kg 和 20 mg 儿茶素/kg,N 组和 HFD 组灌胃等体积的超纯水。实验期间,每周称量记录小鼠体质量和饮水量。CSP 处理 14 周后,小鼠禁食 1 夜,并从眶静脉采集血样,将全血置于 4 °C 静置 2 h,1 000 \times g 条件下离心 15 min,分离血清备用。取肝和附睾脂肪(Epididymal fat, EP),用生理盐水冲洗、称重,部分肝脏和 EP 用于制作病理组织切片,另外一部分肝脏在-80 °C 冷冻备用。所有实验程序均由中国农业大学实验动物福利和动物实验伦理委员会批准(批准编号 AW72101202-4-5)。

1.3.3 血清生化指标测定 根据试剂盒说明,测定血清样品中的 TG、TC、LDL-C、HDL-C、ALT、AST 含量,以及肝组织中 TG 含量。

1.3.4 病理组织切片分析 为更方便观察组织细

胞的形态学变化,采用苏木精-伊红(H&E)染色法对组织进行染色观察:取小鼠肝脏和附睾脂肪组织,用 10%福尔马林固定液固定后,乙醇脱水,石蜡包埋,切片(5~10 μm 厚),苏木精伊红染色。染色切片在光学显微镜下放大 200 倍,进行细胞形态观察和图像分析。

1.3.5 蛋白质印迹(Western blots, WB)实验 称取一定量的小鼠肝组织,按 1:10 的比例加入 RIPA 裂解液和蛋白酶-磷酸酶抑制剂混合物(50:1)。冰浴研磨,4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 $\times g$ 离心 10 min,吸取上清液。用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度,牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)作为标品。

用 SDS-PAGE 凝胶分离含有负载上样缓冲液的蛋白样品,将分离好的蛋白条带转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用 5%的牛奶封闭 2~4 h,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用孵育一抗过夜,AMPK、p-AMPK (Thr172)、ACC、p-ACC (Ser79)、PPAR α 、HMGCR、SREBP-1c 的抗体稀释 1:1 000 使用。然后,用 TBS-Tween 20 缓冲液洗涤 4 次,每次 5 min;室温下孵育二抗(1:1 000)1 h,然后用 TBS-Tween 20 缓冲液洗涤 4 次,每次 5 min 后,用增强化学发光(ECL)底物显示蛋白条带,采用 Odyssey 成像系统扫描并通过图像分析软件进行分析,并对抗原-抗体复合物的光密度进行量化, β -Tubulin 作为内参。

1.4 数据分析

实验结果采用 SPSS Statistics 17.0 软件进行统计分析,数据用“平均值 \pm 标准误差($\bar{x} \pm s$)”表示,采用单因素方差分析(One-way analysis of variance, ANOVA)中的 Duncan 多重比较分析组间差异性。

2 结果与分析

2.1 CSP 的多酚含量

没食子酸标准曲线的回归方程为 $y=12.605x-0.1111$,回归系数 R^2 为 0.9992,表明回归方程具有可靠性。通过计算得到 CSP 粉末中总酚含量为 75.92% \pm 1.40%。

2.2 CSP 对肥胖小鼠体质量、脂肪组织质量及组织切片的影响

如图 1a 所示,小鼠适应性喂养 1 周后,平均

体质量为 19.8 g,在喂养高脂饲料 2 周后,小鼠体质量开始增加,第 5 周时,与 N 组比较,HFD 组小鼠体质量显著升高($P<0.05$),显示肥胖模型造模成功。实验结束时与 N 组小鼠体质量增加量 [(6.98 \pm 0.79)g] 相比,HFD 组小鼠的体质量增加量 [(12.87 \pm 0.54)g] 显著升高($P<0.001$)。与 HFD 组相比,HFD-L 组(9.18 \pm 1.12)g、HFD-H 组(7.83 \pm 0.81)g 和 HFD-C 组 (10.4 \pm 0.43)g 小鼠体质量增加量均显著降低,且 HFD-H 组比 HFD-L 组效果更好,说明 CSP 降低体质量具有剂量依赖性,在合理给药浓度范围内,剂量越高降低体质量的效果越好。

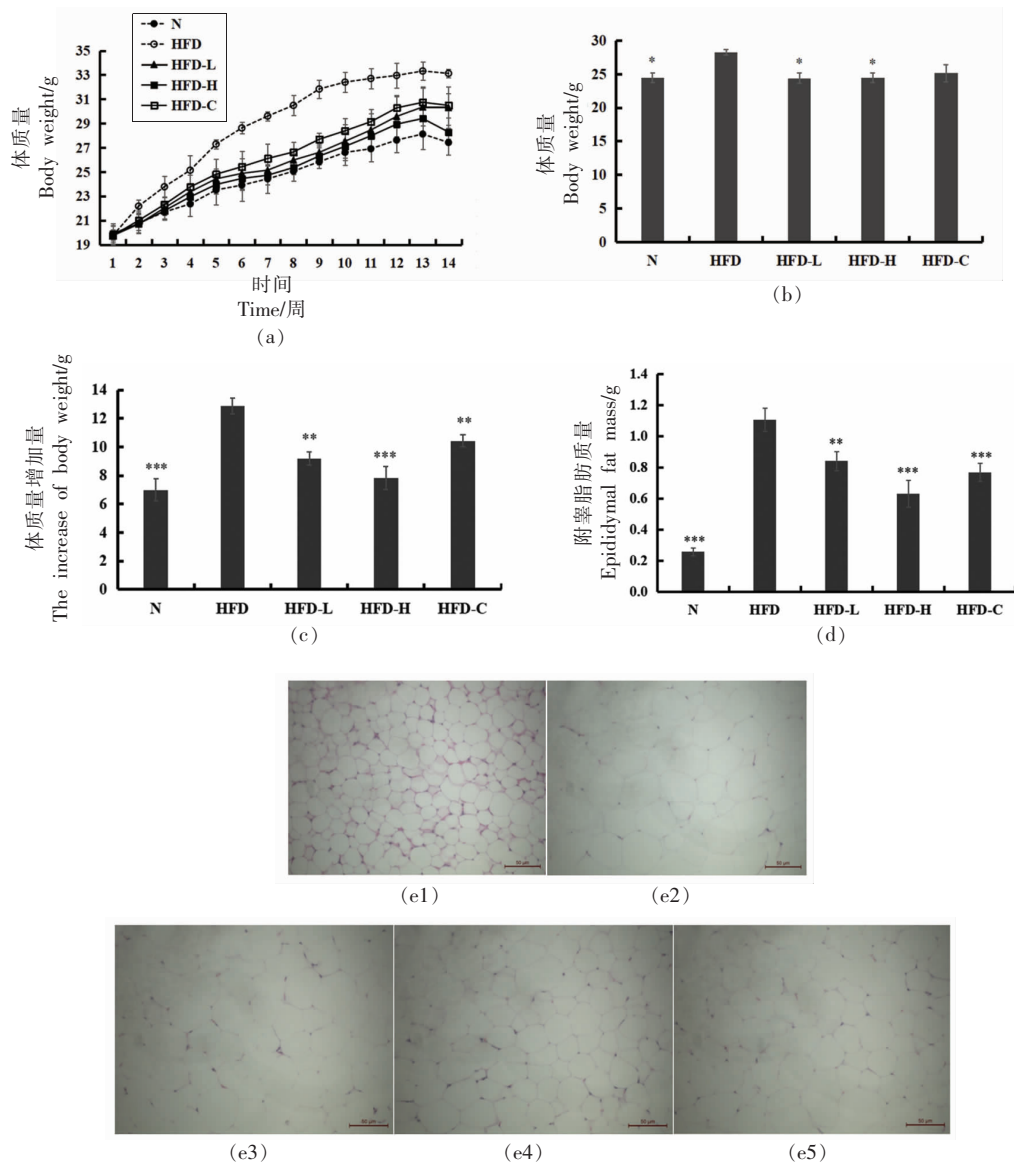
肥胖通常伴随着白色脂肪质量的增加,而 EP 是典型的白色脂肪。由图 1d 可以看出,与 N 组相比,HFD 组小鼠的 EP 质量显著升高($P<0.001$)。与 HFD 组相比,HFD-L、HFD-H 和 HFD-C 组 EP 质量均显著降低($P<0.05$),这与减轻小鼠体质量增长结果相一致。

脂肪切片显示,正常小鼠的附睾脂肪细胞小且排列紧密,与 N 组比较,HFD 组小鼠脂肪细胞体积增大,同一视野范围内脂肪细胞数量大大减少,说明脂质沉积显著增加;与 HFD 组相比,HFD-L、HFD-H 和 HFD-C 组小鼠脂肪组织细胞体积有所减小,同一视野范围内脂肪细胞数量增加,且 HFD-H 组效果比 HFD-L 组更加明显。表明 CSP 可有效预防高脂饮食诱导的肥胖小鼠白色脂肪组织增多和脂肪细胞增大,进而阻止了脂肪组织膨胀及肥胖的发展进程,可能原因是 CSP 中富含的酚类物质抑制了脂肪细胞中甘油三酯的合成,同时刺激脂肪分解,导致脂肪细胞大小和数量的减少^[17]。

与此同时,儿茶素(20 mg/kg)也体现出减肥的作用,这与前人的报道相一致^[18],而 CSP 中也富含儿茶素,因此,儿茶素可能是 CSP 抑制高脂饲料喂养小鼠体质量增长的有效成分之一。然而,等剂量儿茶素的作用效果比等剂量的 CSP 稍差,可能原因是 CSP 提取物含有多种有效活性成分,由于物质之间的降脂具有协同作用,其效果比单一的儿茶素作用效果更好。

2.3 CSP 对肥胖小鼠饮食量和能量摄入的影响

摄食量会严重影响体重的增减,因此控制饮



注:(a)小鼠体质量增长曲线;(b)第5周时小鼠体质量;(c)小鼠体质量增加量;(d)附睾脂肪质量;(e)附睾脂肪组织切片,其中,(e1)N组;(e2)HFD组;(e3)HFD-L组;(e4)HFD-H组;(e5)HFD-C组。与HFD组相比,* $P<0.05$ 具有显著差异,** $P<0.01$ 具有极显著差异,** $P<0.001$ 具有极显著差异,下同。

图1 CSP对肥胖小鼠体质量、附睾脂肪组织质量及组织切片的影响

Fig.1 Effects of CSP on body weight, epididymal adipose tissue weight and tissue section of obese mice

食量,抑制食欲是减肥的重要举措。本实验通过检测小鼠的日常摄食量和能量摄入,探究CSP对肥胖小鼠减肥作用是否与抑制其食欲有关。如图2所示,N组小鼠的每日摄食量最大,为 (2.13 ± 0.11) g,而总能量的摄入却最少,为 (4.58 ± 0.15) kcal。HFD组饲养高脂饲料,小鼠每日摄食量降低至 (1.18 ± 0.07) g且与N组相比具有显著性差异($P<$

0.05),而能量摄入却最高,为 (6.19 ± 0.24) kcal,主要是因为与维持饲料相比,高脂饲料的能量大大增加,较少量的高脂饲料就能满足小鼠每日所需,饱腹感较强,故摄入量较少而摄入能量增加;HFD-L、HFD-H和HFD-C组小鼠的日常摄食量与HFD组相比,虽略有降低,但不具有显著性差异($P>0.05$),表明CSP可以在一定程度上起到抑

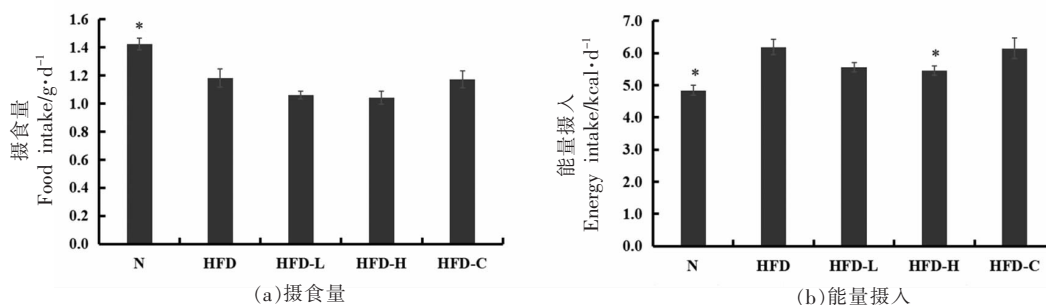


图 2 CSP 对肥胖小鼠饮食量和能量摄入的影响

Fig.2 Effects of CSP on food intake and energy intake of obese mice

制肥胖小鼠食欲的作用。从能量摄入的角度看,只有 HFD-H 组能显著抑制肥胖小鼠的能量摄入 ($P<0.05$)。以上结果表明 CSP 可以减少肥胖小鼠的膳食和能量摄入,从而起到减肥的作用。

2.4 CSP 对肥胖小鼠血脂的影响

有研究表明,肥胖会导致血清中 TG、TC、LDL-C 含量升高, HDL-C 含量降低^[9],而血脂代谢紊乱是高脂饮食诱导的肥胖小鼠的显著特征。如表 1 所示,与 N 组比较, HFD 组小鼠血清 TC、

TG、LDL-C 水平极显著升高 ($P<0.01$), HDL-C 水平显著降低 ($P<0.05$), 表明肥胖小鼠的血脂代谢发生紊乱。与 HFD 组相比, HFD-L 组肥胖小鼠血清的 LDL-C 水平显著降低 ($P<0.05$), 然而对其它血脂指标没有显著性的影响 ($P>0.05$); 提高 CSP 灌胃剂量 (50 mg/kg), 可显著降低 TC、TG、LDL-C 水平, 升高 HDL-C 水平; 而儿茶素的处理能显著降低 TC 和 LDL-C 水平, 升高 HDL-C 水平, 然而对 TG 的降低程度不具有显著性差异 ($P>0.05$)。

表 1 CSP 对肥胖小鼠血脂的影响

Table 1 Effect of CSP on lipid of obese mice

组别	TC/mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹
N	3.12 ± 0.21***	0.32 ± 0.05**	0.80 ± 0.04**	2.18 ± 0.10*
HFD	6.01 ± 0.24	0.54 ± 0.06	1.14 ± 0.14	1.81 ± 0.10
HFD-L	5.46 ± 0.11	0.39 ± 0.03*	1.16 ± 0.12	1.99 ± 0.06
HFD-H	5.12 ± 0.25**	0.32 ± 0.03**	0.93 ± 0.03*	2.13 ± 0.12*
HFD-C	5.15 ± 0.40*	0.34 ± 0.03*	1.09 ± 0.10	2.11 ± 0.07*

注:与 HFD 组相比, * $P<0.05$ 具有显著差异, ** $P<0.01$ 具有极显著差异, *** $P<0.001$ 具有极显著差异, 下同。

2.5 CSP 对肥胖小鼠肝功能的影响

肥胖会导致肝脏脂代谢发生紊乱, 主要表现为肝脏因脂肪的堆积而肿大。与 N 组相比, HFD 组小鼠肝脏质量极显著增加 ($P<0.01$), 表明高脂饮食会诱导肝脏脂肪的积累, 导致肝损伤。对肝脏中的 TG 进行定量测定, 发现 HFD 组小鼠肝脏 TG 含量与 N 组相比显著升高, CSP 和儿茶素均能显著降低 TG 的含量。与 HFD 组相比, HFD-L ($P<0.05$)、HFD-H ($P<0.01$) 和 HFD-C ($P<0.05$) 组均能降低肝脏质量和 TG 含量。ALT 和 AST 是检验肝脏功能的重要指标。肝功能受损时, 细胞膜通透性下降, 分布于细胞胞浆中的 ALT 和线粒体中的 AST 会发生异常外流^[20]。由表 2 可以看出, 高脂饲

养会使血清中 ALT 显著增加 ($P<0.01$), 然而 AST 不会升高, 表明 14 周的高脂饮食处理, 不足以损伤肝细胞中的线粒体, 使得 AST 外流。与 HFD 组相比, HFD-L 和 HFD-H 组会修复损伤的肝细胞, 显著减少 ALT ($P<0.05$) 外流。

2.6 肝脏切片病理观察

在肥胖的发展过程中, 过多的脂肪热量超过脂肪组织储存的缓冲能力和效率, 导致在肝脏等其它组织沉积, 形成脂肪空泡。如图 3 所示, N 组小鼠肝细胞肝索排列规则, 肝细胞胞浆均匀, 几乎无空泡样变性和炎症细胞。HFD 组小鼠肝脏脂肪变性明显, 有较多的空泡样变性, 而 3 个处理组均能有效减少脂肪空泡情况。

表 2 CSP 对肥胖小鼠肝功能的影响

Table 2 Effects of CSP on liver function of obese mice

组别	肝脏质量/g	TG/mg·g ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹
N	0.91 ± 0.04**	10.45 ± 1.26**	116.77 ± 11.93	25.34 ± 0.71**
HFD	1.22 ± 0.04	18.39 ± 0.56	113.82 ± 7.91	35.04 ± 1.30
HFD-L	1.05 ± 0.05*	15.28 ± 1.27*	118.98 ± 10.78	30.01 ± 1.74*
HFD-H	0.93 ± 0.08**	11.36 ± 0.54**	117.12 ± 8.01	29.28 ± 1.40*
HFD-C	1.08 ± 0.05*	11.86 ± 1.49*	115.18 ± 12.67	33.71 ± 2.14

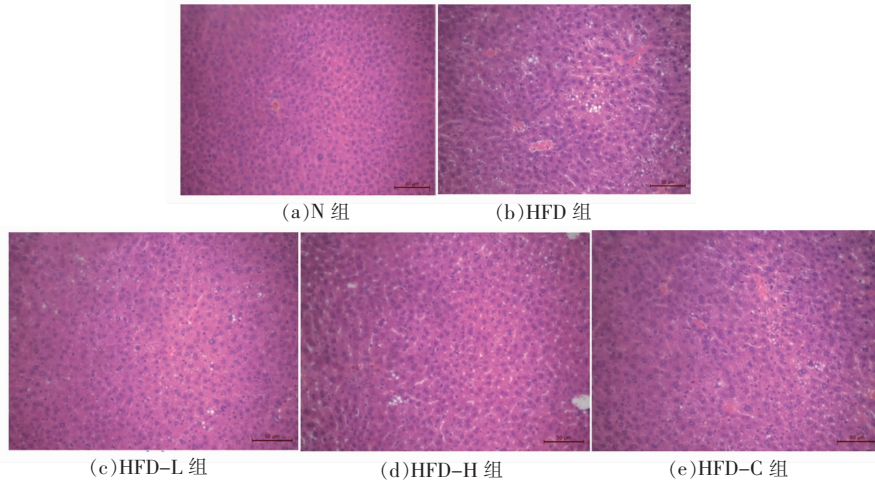


图 3 肝脏 H&E 染色

Fig.3 H&E staining of liver

2.7 CSP 对小鼠肝组织 AMPK 信号通路蛋白表达量的影响

AMPK 作为一种重要的脂质代谢调节因子,是预防或治疗肥胖的潜在靶点^[9]。因此,对肝脏中 AMPK、p-AMPK、ACC、p-ACC、SREBP-1c、PPAR α 、HMGCR 的表达量进行检测。Western blot 结果表明,与 N 组相比,长期高脂饲料饲喂使小鼠肝脏 p-AMPK/AMPK 水平极显著降低 ($P < 0.01$),同时 p-ACC/ACC 蛋白表达极显著下降 ($P < 0.001$),

PPAR α 极显著降低 ($P < 0.01$),而 SREBP-1c ($P < 0.001$)和 HMGCR ($P < 0.01$)表达量显著升高。CSP 干预后,与 HFD 相比,HFD-H 组小鼠肝脏组织中 p-AMPK/AMPK ($P < 0.05$)、p-ACC/ACC ($P < 0.01$)、PPAR α ($P < 0.01$)的表达均显著上调,SREBP-1c 和 HMGCR 的表达均显著降低 ($P < 0.01$)。由此可见,CSP 可能通过调控肝脏 AMPK 信号通路来改善脂代谢紊乱。

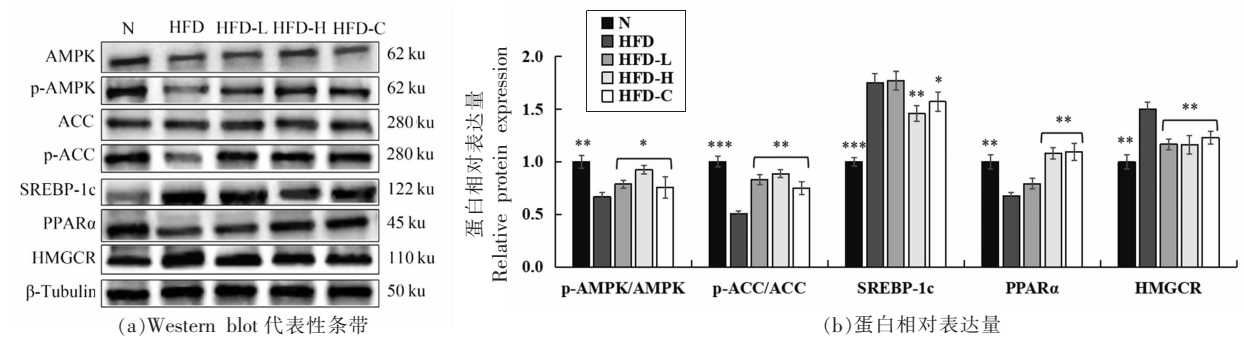


图 4 CSP 对肝脏 AMPK 通路的影响

Fig.4 Effect of CSP on AMPK pathway in the liver

3 讨论与结论

肥胖的特点是脂肪组织在体内过度积累,可导致机体患慢性疾病的风险增加,而植物多酚已被证明可以发挥抗肥胖作用,然而,富含酚类物质的 CSP 对脂肪合成和代谢的作用尚未见报道。本实验发现 CSP 饮食干预,可以抑制高脂饮食诱导的小鼠体质量、脂肪组织质量的增加,改善了因高脂饮食造成的脂肪细胞肥大及血脂异常,此外,还可以通过促进 AMPK 磷酸化,抑制脂肪酸合成,促进脂肪酸氧化,改善肝脏能量代谢从而改善机体肥胖和脂代谢紊乱。

据报道,植物源的儿茶素和原花青素均具有减肥、降脂的功效,如儿茶素被人体摄入后,能抑制胰、胃脂肪酶,降低脂肪乳化从而起到降脂的作用^[21],并且茶叶中的儿茶素能通过激活 AMPK,调控葡萄糖生成与分解、脂肪酸合成与分解代谢^[22]。杨梅原花青素也可以通过激活 AMPK 信号通路来调节 HepG2 细胞脂质代谢紊乱^[23]。因此,CSP 能改善肥胖小鼠的脂代谢紊乱,可能因为 CSP 富含儿茶素、原花青素等生物活性成分,从而起到很好的减肥降脂效果。肝脏是人体主要的代谢器官,HFD 诱导的肥胖与白色脂肪细胞中脂滴的积累有关^[24],甚至在肝细胞中积累脂滴,这可能会导致肝脏脂肪变性,影响肝脏正常的脂代谢功能。本研究发现高脂饮食会导致小鼠肝脏中 TG 含量显著升高,这与肝脏 H&E 染色的结果相一致,结合肝脏 ALT 和 AST 指标,表明高脂饮食会导致一定程度的肝损伤,而 CSP 能显著修复高脂饮食导致的肝损伤。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)被称为“细胞能

量调节器”,是细胞一级能量平衡的主传感器和调节因子^[6]。多项研究表明,肥胖小鼠肝脏中 AMPK 活性会被抑制^[25]。本实验中,高脂饮食会显著抑制肝脏 AMPK 活性,这与之前的报道相一致,而 CSP 可通过促进 AMPK 在 Thr172 位点的磷酸化而逆转抑制作用,使得 p-AMPK/AMPK 的比值升高,促进能量的分解代谢抑制合成代谢。ACC 能催化乙酰 CoA 羧化成丙二酰 CoA,被认为是脂肪酸合成过程中的限速酶^[26]。AMPK 通过调节下游 ACC 的磷酸化,在脂肪酸合成和氧化过程中起重要作用。由 ACC 催化生成的丙二酰辅酶 A 不仅可作为脂肪酸合成的前体,也是线粒体脂肪酸摄取关键酶 CPT-1 的内源性抑制剂^[27-28]。CSP 能磷酸化 AMPK 使其活化,然后能激活 ACC 第 79 位上的丝氨酸磷酸化位点使其失去活性,进而使体内丙二酰辅酶 A 合成减少,不仅降低了脂肪的合成也激活 CPT-1,增强了脂肪酸 β -氧化作用^[29-30],进而改善脂质代谢。此外,AMPK 还能通过介导 SREBP-1c 调节脂肪酸合成和脂肪酸氧化^[31-32]。AMPK 活化后能抑制 SREBP-1c 的表达,被抑制的 SREBP-1 又进一步降低 ACC 的表达,进而抑制脂肪酸的合成。AMPK 也可以调节胆固醇稳态。HMGCR 是胆固醇从头合成的限速酶,可以被 AMPK 磷酸化所抑制^[33]。CSP 能显著抑制 HFD 诱导小鼠 HMGCR 的蛋白表达,这与降低血清中 TC 的结果保持一致。PPAR α 通过调节脂肪酸转运和 β -氧化以及以脂肪酸和各种脂肪酸衍生物作为内源性配体保持血浆脂质谱来控制肝脏中的脂质通量^[26],本研究发现,CSP 能上调 PPAR α ,从而增强脂质氧化,降低血浆中 TG、TC、LDL-C 水平,升高 HDL-C 水

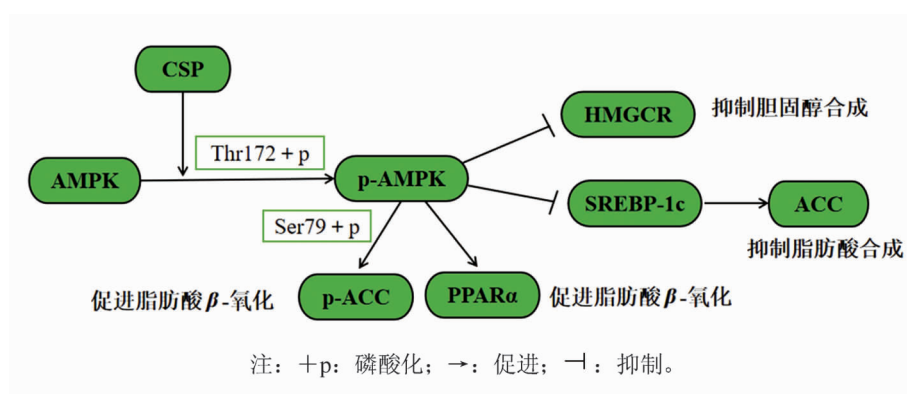


图 5 CSP 通过 AMPK 信号通路调控 HFD 小鼠脂代谢紊乱

Fig.5 CSP regulated lipid metabolism disorders in HFD mice through AMPK signaling pathway

平,改善肝脏脂肪的积累导致的损伤。

如图5所示,推测CSP可以靶向作用于AMPK,从而调节肝脏脂质代谢。基于此,研究认为CSP具有预防肥胖的潜力。同时,CSP是从农业废弃的板栗壳中提取的天然色素,本研究的结果提供了一种有效的食物辅助预防高脂饮食肥胖的方法,为通过膳食补充来维持代谢综合征患者体内能量平衡提供可能性。

参 考 文 献

- [1] MATTHIAS, BLUHER. Obesity: Global epidemiology and pathogenesis[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019, 15(5): 288-298.
- [2] WHARTON S, LAU D, VALLIS M, et al. Obesity in adults: A clinical practice guideline[J]. *Canadian Medical Association Journal*, 2020, 192(31): 875-891.
- [3] ZHANG J, WANG H, WANG Z, et al. Prevalence and stabilizing trends in overweight and obesity among children and adolescents in China, 2011-2015 [J]. *BMC Public Health*, 2018, 18(1): 571.
- [4] LUKE W, MAJID E, BAGHER L, et al. The challenge for global health systems in preventing and managing obesity [J]. *Obesity Reviews*, 2019, 20(S2): 185-193.
- [5] RANA S, BLOWERS E C, NATARAJAN A. Small molecule adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) modulators and human diseases [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 58(1): 2-29.
- [6] YAN Y, ZHOU X E, XU H E, et al. Structure and physiological regulation of AMPK[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3534.
- [7] ZHANG R, MA Q, TONG X, et al. Rice bran phenolic extract supplementation ameliorates impaired lipid metabolism in high-fat-diet fed mice through AMPK activation in liver[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 73: 104131.
- [8] LIN S L, WANG Z Y, LIN Y L, et al. Bound phenolics from fresh lotus seeds exert anti-obesity effects in 3T3-L1 adipocytes and high-fat diet-fed mice by activation of AMPK[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 58: 74-84.
- [9] XU H Y, LIU M H, LIU H M, et al. Anthocyanins from purple corn ameliorated obesity in high fat diet-induced obese mice through activating hepatic AMPK[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 84: 104582.
- [10] PINTO D, VIEIRA E F, PEIXOTO A F, et al. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology[J]. *Food Chemistry*, 2021, 334: 127521.
- [11] VELLA F M, LARATTA B, CARA F L, et al. Recovery of bioactive molecules from chestnut (*Castanea sativa Mill.*) by-products through extraction by different solvents [J]. *Natural Product Research*, 2017, 32(9): 1022-1032.
- [12] ZHU T, SHEN Q N, XU Y J, et al. Ionic liquid and ultrasound-assisted extraction of chestnut shell pigment with good hair dyeing capability[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022, 335: 130195.
- [13] 金黎明, 陈苛蒙, 包艳春, 等. 板栗壳棕色素的提取、纯化及应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(20): 320-323.
- [14] JIN L M, CHEN K M, BAO Y C, et al. Progress in extraction, purification and application of brown pigment from chestnut shell[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(20): 320-323.
- [14] 李云雁, 宋光森. 板栗壳色素抑菌性的研究[J]. *湖北农业科学*, 2004(5): 63-65.
- [14] LI Y Y, SONG G S. Study on antibacterial activity of pigment from chestnut shell[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2004(5): 63-65.
- [15] 李莉, 顾欣, 崔洁, 等. 板栗壳棕色素抗氧化性研究与红外光谱分析[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(3): 41-45.
- [15] LI L, GU X, CUI J, et al. Study on antioxidant activity of brown pigment in chestnut shell and IR spectrum analysis[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(3): 41-45.
- [16] WANG L, LUO Y, WU Y, et al. Fermentation and complex enzyme hydrolysis for improving the total soluble phenolic contents, flavonoid aglycones contents and bioactivities of guava leaves tea[J]. *Food Chemistry*, 2018, 264: 189-198.
- [17] WANG S, MOUSTAID-MOUSSA N, CHEN L, et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014, 25

- (1): 1–18.
- [18] MURASE T, NAGASAWA A, SUZUKI J, et al. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: Stimulation of lipid catabolism in the liver [J]. *International Journal of Obesity*, 2002, 26(11): 1459–1464.
- [19] HWANG E Y, YU M H, JUNG Y S, et al. Defatted safflower seed extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes and improves lipid profiles in C57BL/6J ob/ob mice fed a high-fat diet[J]. *Nutrition Research*, 2016, 36(9): 995–1003.
- [20] 李飞, 陆伦根. 肝功能异常的评估及临床意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31(9): 1543–1546.
LI F, LU L G. Evaluation and clinical significance of abnormal liver function [J]. *Journal of Clinical Hepatol*, 2015, 31(9): 1543–1546.
- [21] HURSEL R, WESTERTERP –PLANTERGA M S. Catechin- and caffeine-rich teas for control of body weight in humans[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2013, 98(6): 1682–1693.
- [22] SAE –TAN S, GROVE K A, LAMBERT J D. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea [J]. *Pharmacological Research*, 2011, 64(2): 146–154.
- [23] YU Z, CHEN S, WEI C, et al. Proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves regulate lipid metabolism and glucose consumption by activating AMPK pathway in HepG2 cells [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 29: 217–225.
- [24] LEE S Y, SUNG J H. Gut-liver on a chip towards an *in vitro* model of hepatic steatosis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(11): 2817–2827.
- [25] JEON S M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2016, 48(7): e245.
- [26] BAO Y, XIAO J, WENG Z, et al. A phenolic glycoside from *Moringa oleifera* Lam. improves the carbohydrate and lipid metabolisms through AMPK in db/db mice [J]. *Food Chemistry*, 2020, 311: 125948.
- [27] ROCHA A, BOLIN A P, CARDOSO C, et al. Green tea extract activates AMPK and ameliorates white adipose tissue metabolic dysfunction induced by obesity[J]. *European Journal of Nutrition*, 2015, 55(7): 1–14.
- [28] DAVID S. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2008, 28(1): 253–272.
- [29] ZANG Y, WANG T, XIE W, et al. Regulation of acetyl CoA carboxylase and carnitine palmitoyl transferase-1 in rat adipocytes[J]. *Obesity Research*, 2012, 13(9): 1530–1539.
- [30] ZHANG Y P, DENG Y J, TANG K R, et al. Berberine ameliorates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats via activation of SIRT3/AMPK/ACC pathway[J]. *Current Medical Science*, 2019, 39(1): 37–43.
- [31] GUO Y R, CHOUNG S Y. Germacrone attenuates hyperlipidemia and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2017, 20(1): 46.
- [32] LIU H, ZHONG H, YIN Y, et al. Genistein has beneficial effects on hepatic steatosis in high fat-high sucrose diet-treated rats [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 91: 964–969.
- [33] ZHANG R, MA Q, TONG X, et al. Rice bran phenolic extract supplementation ameliorates impaired lipid metabolism in high-fat-diet fed mice through AMPK activation in liver[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 73: 104131.

Chestnut Shells Pigment Ameliorated Lipid Metabolism Disorder in Obese Mice through AMPK Signaling Pathway

Zhang Xiaoyun^{1,2}, Mei Xiaohong^{1,2*}

¹College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083

²Key Laboratory of Safety Assessment of Genetically Modified Organism (Food Safety), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100083)

Abstract Objective: To investigate the improvement effect of chestnut shells pigment (CSP) on lipid metabolism disorder

der in obese mice and its molecular mechanism. Methods: Male C57BL/6J mice were divided into normal diet group (N), high fat diet group (HFD), high fat diet +20 mg/kg CSP group (HFD-L), high fat diet +50 mg/kg CSP group (HFD-H), high fat diet +20 mg/kg catechin group (HFD-C). The body weight and food intake of mice were measured every week. After 14 weeks, the weight of liver and epididymis fat of mice and lipid levels of serum were detected. The morphology of fat and liver was analyzed and the expression of key proteins of fat metabolism in liver was detected. Results: Compared with HFD group, the gain of body mass in HFD-L and HFD-H groups decreased by 28.67% and 39.16%, respectively. Fat mass of epididymis decreased by 23.63% and 42.80%, respectively. CSP can reduced food intake and accumulation of liver fat, reduced serum TG, TC, LDL-C, ALT and AST levels, increased HDL-C. The expression levels of p-AMPK/AMPK, p-ACC/ACC and PPAR α in liver tissue were significantly increased, however, the expression levels of SREBP-1C and HMGCR were significantly decreased, which were better than those of pure catechin. Conclusion: CSP can improve lipid metabolism in obese mice, which is related to the activation of AMPK signaling pathway.

Keywords chestnut shells pigment; high fat diet; obesity; lipid metabolism; adenosine monophosphate activated protein kinase