

核桃粕酶解物抑制脂质积累的机制

白玉英^{1,2}, 解静¹, 彭麟杰^{1,2}, 毛家英^{1,2}, 李世俊^{1*}, 田洋^{2,3*}

(¹ 云南农业大学食品科学技术学院 昆明 650201

² 云南农业大学 云南省生物大数据重点实验室 昆明 650201

³ 云南农业大学 食药同源资源开发与利用教育部工程中心 昆明 650201)

摘要 利用分化的 3T3-L1 脂肪细胞和高脂饮食(HFD)诱导的肥胖 C57BL/6 小鼠模型,研究核桃粕酶解物的抗肥胖作用。采用油红 O 脂肪染色法检测脂肪细胞脂质积累情况,采用试剂盒检测细胞甘油三酯(TG)、甘油(Gly)和游离脂肪酸(FFA)含量,采用实时荧光定量 PCR(PCR RT-qPCR)检测脂肪合成相关基因(mRNA)的表达水平。结果表明,核桃粕酶解物显著降低脂肪细胞内脂滴聚积,显著降低脂肪细胞内 TG 和 FFA 的含量,增加细胞上清液中 Gly 含量,同时核桃粕酶解物显著降低脂肪细胞中脂肪合成相关基因 *PPAR-γ* 和 *C/EBPα* mRNA 表达水平;当核桃粕酶解物的质量浓度达到 50 μg/mL 时, TG 和 FFA 分别降低了 40.14%和 39.50%, Gly 水平增加了 35.12%;*PPAR-γ*和 *C/EBPα* 的 mRNA 表达水平分别降低了 31.42%和 55.25%。此外,核桃粕酶解物显著降低 HFD 小鼠的体质量、脂肪组织质量和食物摄入量。研究表明,核桃粕酶解物可以抑制 3T3-L1 脂肪细胞脂质积累,其作用机制与抑制脂质合成相关基因表达相关。此外,还具有抑制 HFD 脂质积累的作用。

关键词 核桃粕酶解物; 3T3-L1 脂肪细胞; 脂质积累; 高脂饮食小鼠

文章编号 1009-7848(2024)07-0193-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.019

肥胖是一种严重的代谢性疾病,由内分泌失调、环境因素和遗传易感性等多种因素引起^[1],已成为威胁全球公共卫生的主要问题之一。目前医学上常用的抗肥胖药物包括奥利司他、氯卡色林和缓释芬特明等,这些药物在临床上具有良好的疗效,然而也存在一些副作用^[2-3]。从天然产物中寻找安全有效的降脂活性成分,以抑制或延缓肥胖的发生和发展,对于解决肥胖防治问题具有重要意义^[4-5]。

核桃(*Juglans regia*)属于胡桃科,富含多种营养和药理成分,具有很高的营养价值和多种健康益处,包括减轻炎症,改善内皮功能和抗癌等^[6]。在营养学研究中,坚果,尤其是核桃,对心血管健康有显著的影响。相关研究表明,核桃能够降低高脂饮食(HFD)喂养的小鼠肝脏甘油三酯含量,这主

要是通过调节肝脏脂肪酸代谢和降低脂肪组织炎症来实现^[7]。

核桃粕是从核桃仁中提取油后的副产品,富含蛋白质,是一种优质的蛋白质来源。核桃粕主要用作肥料和饲料,利用率低,资源浪费严重^[8-9]。目前,关于核桃粕蛋白质的研究虽然较多,但是大多集中在其抗氧化活性上,对于其降血脂活性的研究较少^[10-11]。本研究以核桃粕酶解物为试验材料,通过分化的 3T3-L1 脂肪细胞和高脂饮食(HFD)诱导的肥胖 C57BL/6 小鼠模型,探讨其对脂质积累的抑制作用,旨在为核桃蛋白的深加工提供理论基础,提高核桃的附加值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

核桃粕,云南摩尔农庄生物科技有限公司; C57BL/6J 雄性小鼠,4 周龄(许可证号 SCXK(辽)2015-0001),成都达硕实验动物有限公司; 3T3-L1 前脂肪细胞,中国科学院昆明动物研究所; 高糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM),Hyclone 公司; 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS),BI 公司; 油红 O 脂肪染色液,天津市

收稿日期: 2023-07-06

基金项目: 云南省科技厅重大科技专项计划项目(202002A A100005,202102AE090027-2); 云南省科技厅云南绿色食品国际合作研究中心项目(2019ZG 00905)

第一作者: 白玉英,女,硕士生

通信作者: 李世俊 E-mail: lsj7783@126.com

田洋 E-mail: tianyang1208@163.com

风船化学试剂科技有限公司;甘油三酯(TG)、甘油(Gly)、游离脂肪酸(FFA)含量测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;Prime Script RT reagent kit with gDNA,TaKaRa公司。

1.2 仪器与设备

多功能酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;细胞恒温培养箱,苏州贝茵医疗器械有限公司;细胞计数仪,Invitrogen有限公司;倒置荧光显微镜,蔡康光学有限公司;Z36HK型高速台式冷冻离心机,德国Hermle Labortechnik GmbH公司;紫外可见分光光度计,北京德泉兴业商贸有限公司。

1.3 方法

1.3.1 核桃蛋白酶解 依据实验室的方法制备核桃粕酶解物。称取定量核桃粕,加入超纯水搅拌均匀,用NaOH溶液调节pH值为9.0,搅拌、过滤、离心(4 000 r/min,4℃,25 min),取上清;再用HCl调节上清液pH值为4.5,室温下静置2 h,再离心(4 000 r/min,4℃,15 min)取其沉淀,将沉淀用少许超纯水溶解,混匀调pH值为7.0,最后冷冻干燥备用;将得到的核桃蛋白溶于超纯水中,充分混合得到底物质量浓度为20 g/L的溶液,添加2%的碱性蛋白酶,用NaOH溶液调节混合液的pH值为9.0,水解3 h;完成后将混合物在100℃加热10 min将酶灭活,冷却至室温,离心(4 000 r/min,4℃,20 min)收集上清液并冻干,将得到的核桃酶解物冻干,备用。

1.3.2 细胞培养、传代与分化生长 细胞传代:将3T3-L1前脂肪细胞置于37℃,5%CO₂的恒温培养箱中培养,当细胞贴壁生长至90%左右时进行传代培养。

细胞分化:当细胞生长至80%左右时,融合4~5 d,然后依次用含有MDI和INS的诱导培养基培养3 d,最后用10%FBS+DMEM培养基培养。显微镜下观察,当细胞90%表现为成熟脂肪细胞的形态,并且出现明显脂滴时,即可进行后续的干预试验。

1.3.3 油红O(ORO)染色 用含有不同浓度核桃粕酶解物(0,25,50 μg/mL)的10%FBS+DMEM培养基处理成熟的脂肪细胞48 h。按照使用说明书配制油红O工作液,并按步骤进行染色。用倒置显

微镜以10,20,40倍放大倍率拍摄染色后脂质的图像。

1.3.4 3T3-L1脂肪细胞甘油三酯、游离脂肪酸和甘油含量的测定 将分化成功的脂肪细胞按照1.3.2节的方式干预处理48 h,收集细胞,低温、低速(1 000 r/min,4℃,10 min)离心除杂,收集培养上清液。按照使用说明书测定上清液中的甘油(Gly)含量。用PBS洗涤细胞2次,匀浆后按BCA法测定蛋白含量,并按照试剂盒说明书测定甘油三酯(TG)及游离脂肪酸(FFA)的含量。

1.3.5 RT-qPCR法测定细胞中脂肪合成基因mRNA的表达 将分化成功的脂肪细胞,按1.3.2节的方式干预处理细胞48 h,收集细胞,按照试剂盒试验方法提取细胞内总RNA。按照试剂盒说明书进行逆转录,合成cDNA。qPCR按照20 μL的反应体系进行。采用相对定量法(2-ΔΔC_q法)进行数据分析。每个基因cDNA样本平行扩增3次,并取C_t值均数,按照公式(1)计算目的基因的表达量:

$$F= \frac{2^{\frac{\text{检测样品基因的 } C_t \text{ 值}-\text{检测样品中持家基因的 } C_t \text{ 值}}}{2^{\frac{\text{空白样品基因的 } C_t \text{ 值}-\text{空白样品中持家基因的 } C_t \text{ 值}}} \tag{1}$$

本研究中PPAR-γ,C/EBPα引物序列如表1所示;引物序列由上海捷瑞公司负责合成。

表1 RT-PCR 特异基因引物序列表	
Table 1 RT-PCR specific gene primer sequence list	
基因名称	引物序列
β-actin	TTGTAACCAACTGGGACGATATGG GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG
PPAR-γ	TTGATTTCTCCAGCATTTTC TTCAATCGGATGGTTCTT
C/EBPα	GGTTTGTCTCTGATTCTTGCC CGAAAAAACCCAAACATCCC

1.3.6 动物实验 将63只4周龄的C57BL/6J小鼠,每笼4只圈养在(22±2)℃环境下,进行12 h的明暗循环,并允许其随意进食和饮水,饲喂基础饲料适应1周。饮食干预期间,将小鼠分为正常饮食(NCD)组和高脂饮食(HFD)组。HFD组进一步分为4组:HFD组,HFD+0.125 g/kg核桃粕酶解物组,HFD+0.25 g/kg核桃粕酶解物组,HFD+0.50 g/kg核桃粕酶解物组。核桃粕酶解物通过灌胃的

方式饲喂,NCD 对照组和 HFD 组灌胃饲喂等量的灭菌水,持续 12 周。每天测量小鼠体质量,每 2 d 记录各组小鼠的摄食量和饮水量,并进行摄食量监测实验。实验前将各组小鼠进行禁食处理,具体流程:将小鼠禁食 6 h(在 11:00 取出食物),17:00 灌胃核桃粕酶解物,然后继续禁食 1 h。在 18:00 允许小鼠进食。分别在 0 h(18:00)、1 h(19:00)、4 h(22:00)、14 h(8:00)和 24 h(18:00)测量食物摄入量 and 体质量。

1.4 数据统计

采用 Graphpad prism 6.01 等软件对数据进行统计分析,各项指标均以“平均值 \pm 标准差”表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),试验重复 3 次,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表

示 $P<0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 核桃粕酶解物对 3T3-L1 脂肪细胞脂质积累的影响

为了研究核桃粕酶解物对脂肪细胞脂质积累的影响,采用油红 O 染色法评估脂肪细胞内脂滴的积累情况。结果如图 1 所示,相较于对照组,经过核桃粕酶解物处理的脂肪细胞,油红 O 染色面积和细胞内脂滴显著减少。随着核桃粕酶解物处理质量浓度的增加,脂滴的数量和大小也逐渐减小。这些结果表明,核桃粕酶解物能有效抑制脂肪细胞的脂质积累。

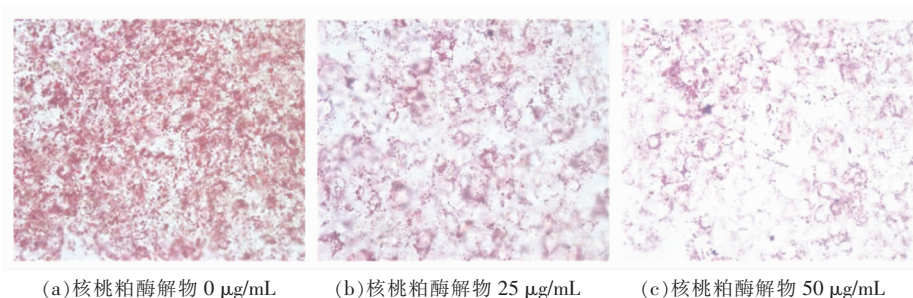


图 1 不同质量浓度核桃粕酶解物对 3T3-L1 脂肪细胞脂质积累的影响(油红 O 染色,200 \times)

Fig.1 Effect of different mass concentrations of walnut hydrolysate on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes (oil red O staining, 200 \times)

2.2 核桃粕酶解物对 3T3-L1 脂肪细胞内 TG、FFA 和 Gly 的影响

为了研究核桃粕酶解物对 3T3-L1 脂肪细胞脂质代谢的影响,测定了 3T3-L1 脂肪细胞内的 TG 含量及其水解产物的水平。如图 2 所示,结果显示,核桃粕酶解物显著降低了脂肪细胞内的 TG 含量以及培养上清液中的 FFA 水平。此外,核桃粕酶解物处理后的细胞培养上清液中的 Gly 水平显著增加。当核桃粕酶解物的质量浓度达到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,TG 和 FFA 水平较对照组分别降低了 40.14% ($P<0.01$) 和 39.50% ($P<0.05$),Gly 水平较对照组显著增加了 35.12% ($P<0.05$)。这些结果表明,核桃粕酶解物能显著促进 3T3-L1 脂肪细胞中甘油三酯的水解,从而改善脂肪细胞的脂质代谢。

2.3 核桃粕酶解物对 3T3-L1 脂肪细胞脂肪合成相关基因表达水平的影响

为深入研究核桃粕酶解物抑制 3T3-L1 脂肪细胞脂质积累的机制,评估了脂肪细胞中与脂质代谢相关基因的表达水平。结果如图 3 所示,3T3-L1 脂肪细胞在通过不同质量浓度的核桃粕酶解物处理后,*PPAR- γ* 和 *C/EBP α* 的表达水平显著降低。与对照组相比,当核桃粕酶解物的质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,*PPAR- γ* 的 mRNA 表达水平显著降低了 31.42% ($P<0.05$);此外,当核桃粕酶解物的质量浓度分别为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,*C/EBP α* 的 mRNA 表达水平显著降低了 52.40% ($P<0.01$) 和 55.25% ($P<0.01$)。结果表明,核桃粕酶解物可能通过抑制脂肪合成相关基因的表达来抑制脂质积累。

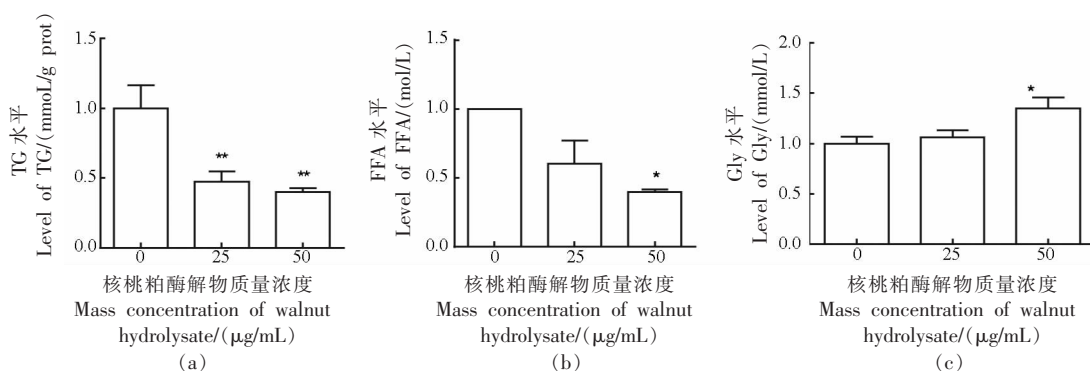


图2 核桃粕酶解物对 3T3-L1 脂肪细胞内 TG(a)、FFA(b)和 Gly(c)水平的影响

Fig.2 The effect of walnut hydrolysate on the levels of TG (a), FFA (b) and Gly (c) in 3T3-L1 adipocytes

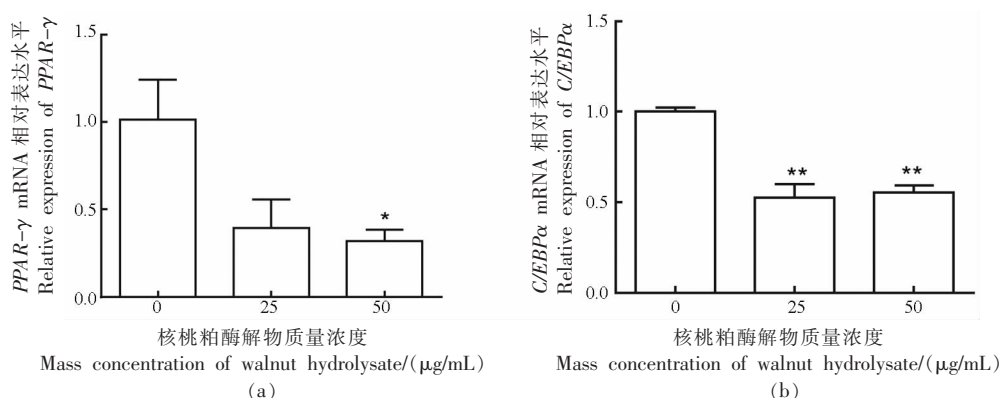


图3 核桃粕酶解物对 3T3-L1 脂肪细胞中 PPAR-γ(a)和 C/EBPα(b)mRNA 表达水平的影响

Fig.3 The effects of walnut hydrolysate on the expression levels of PPAR-γ (a) and C/EBPα (b) mRNA in 3T3-L1 adipocytes

2.4 核桃粕酶解物对 HFD 小鼠生理指标的影响

为研究核桃粕酶解物在体内是否具有抑制脂质积累的作用,对高脂饮食(HFD)小鼠进行 12 周的干预,使用的核桃粕酶解物质量浓度分别为 0, 0.125, 0.250, 0.500 g/kg。结果如图 4 所示,与正常饮食(NCD)组相比, HFD 组小鼠的体质量显著增加($P<0.001$),这表明高脂饮食会导致小鼠体质量异常增加;然而,与 HFD 组相比,摄入高质量浓度核桃粕酶解物的小鼠体质量显著降低($P<0.001$),说明核桃粕酶解物能够有效减缓 HFD 小鼠体质量的增加。此外,与 NCD 组相比, HFD 组小鼠的附睾脂肪、腹股沟脂肪和肾周脂肪质量显著增加($P<0.001$);而与 HFD 组相比,摄入高质量浓度核桃粕酶解物的小鼠在附睾脂肪、腹股沟脂肪和肾周脂肪质量上均显著降低($P<0.01$),这表明核桃粕酶

解物能够减少 HFD 小鼠的脂质积累。

2.5 核桃粕酶解物对 HFD 小鼠摄食量的影响

为研究核桃粕酶解物对 HFD 小鼠摄食量的影响,对其摄食量进行监测,结果如图 5a 所示。研究发现,与 NCD 组相比, HFD 组小鼠的摄食量没有变化;与 HFD 组相比,高浓度核桃粕酶解物组小鼠的摄食量显著降低($P<0.05$)。为进一步明确核桃粕酶解物对小鼠摄食行为的影响,进行短期摄食监测实验,结果如图 5b 所示。研究发现,与 NCD 组相比,在 14 h 后, HFD 组小鼠的摄食量显著降低($P<0.05$);与 HFD 组相比,在 24 h 后,中、高剂量核桃粕酶解物组小鼠的摄食量也显著降低。结果表明,核桃粕酶解物对 HFD 小鼠的摄食行为具有一定的调控作用。

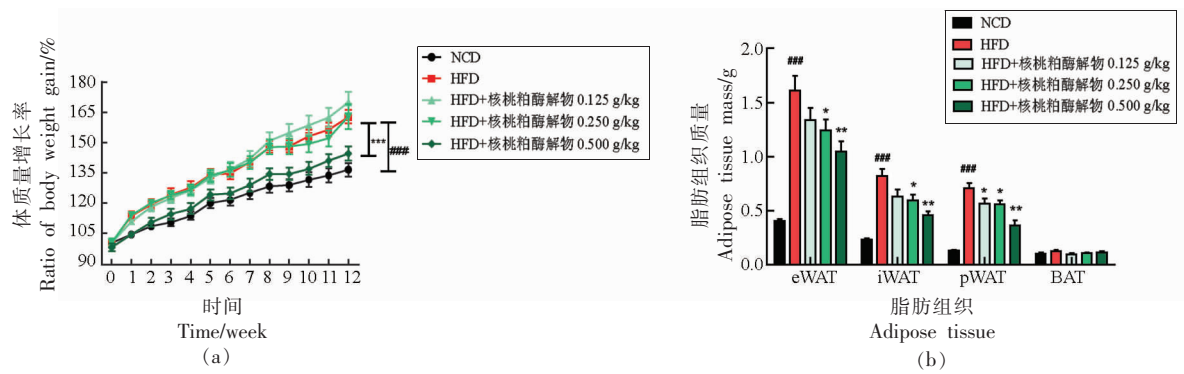


图 4 核桃粕酶解物对高脂饮食诱导的 HFD 小鼠体质量增长率(a)和脂肪组织质量(b)的影响

Fig.4 The effects of walnut hydrolysate on the ratio of body weight gain (a) and adipose tissue mass (b) of high-fat diet-induced HFD mice

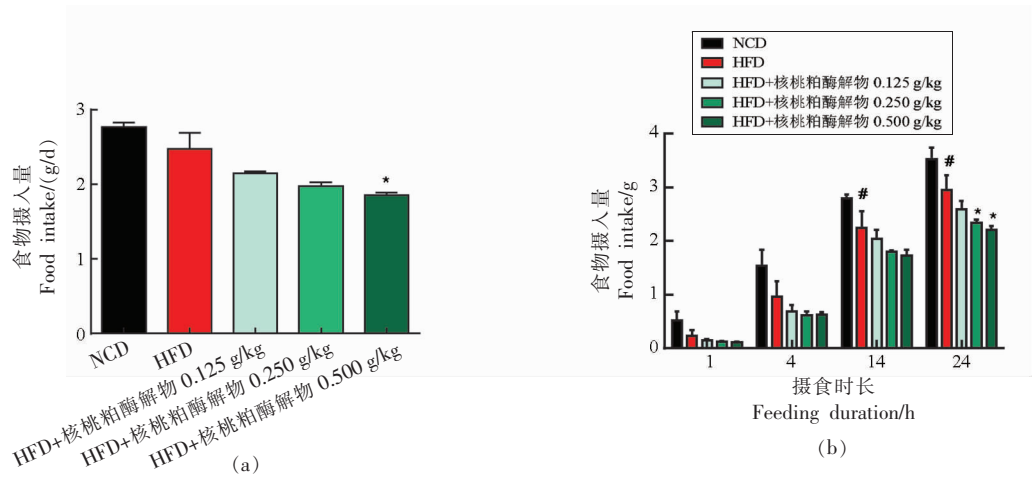


图 5 核桃粕酶解物对高脂饮食诱导的 HFD 小鼠的长期摄食量(a)和短期摄食量(b)的影响

Fig.5 The effects of walnut hydrolysate on long-term food intake (a) and short-term food intake (b) of high-fat diet-induced HFD mice

3 讨论

本研究利用分化的 3T3-L1 脂肪细胞和高脂饮食(HFD)小鼠模型,探讨了核桃粕酶解物对脂质积累的抑制作用及其相关机制。

脂肪分化,称为脂肪细胞分化,是前体细胞转化为成熟脂肪细胞的过程^[12-13]。脂肪细胞在进入分化后,细胞开始增殖^[14]、体积增大^[15]、细胞质中逐渐出现脂滴^[16-17]。脂肪细胞数量和体积的增加伴随更多甘油三酯(TG)的积累^[18-19]。脂肪组织作为机体主要的能量储存场所,在正常生理状态下,脂肪细胞内的 TG 在激素敏感性脂肪酶(HSL)和脂肪组织甘油三酯水解酶(ATGL)的作用下,被水解成游离脂肪酸(FFA)和甘油(Gly),并释放到外周参与

血液循环,从而在机体能量平衡的调控和维持中起重要作用^[20-22]。本研究结果显示,核桃粕酶解物显著减少了细胞内脂滴的积累;同时显著降低了 3T3-L1 脂肪细胞中的 TG 和 FFA 含量,显著增加了 Gly 的释放。这些结果表明,核桃粕酶解物通过减少脂质积累,有望发挥显著的减肥作用。

脂肪生成,即由脂肪前体细胞转化为成熟脂肪细胞的过程,受到精确调控,由激活大量脂肪生成基因的转录因子所控制^[23]。PPAR- γ 和 C/EBP α 这两种因子在脂肪生成过程中扮演关键角色。因此,针对与脂肪生成相关的基因进行干预,可视为预防肥胖的有效策略之一。本研究利用不同质量浓度的核桃粕酶解物处理分化后的脂肪细胞,结

果显示,*PPAR- γ* 和*C/EBP α* 的mRNA表达水平显著下降。在脂肪细胞分化过程中,*C/EBP α* 和*PPAR- γ* 具有相互激活和转录调控的机制,其表达的抑制会阻碍脂肪细胞的分化^[24]。结果表明,核桃粕酶解物可以有效抑制*PPAR- γ* 和*C/EBP α* 这两种关键转录因子的表达,从而阻断脂肪细胞的分化过程,达到了抑制脂肪生成的作用。

通过调节食欲和能量平衡,是预防肥胖及其相关疾病的有效策略^[25-26]。本研究表明,核桃粕酶解物干预显著降低了高脂饮食(HFD)诱导的小鼠的摄食量。为深入探讨核桃粕酶解物对HFD小鼠摄食量调控是否与食欲有关,本研究进行24 h的短期摄食监测。结果发现,核桃粕酶解物处理后,小鼠的食物摄入量显著减少。这表明核桃粕酶解物可能通过影响小鼠的摄食行为来抑制其体质量增加,然而其具体的调控机制仍需进一步研究。

核桃粕酶解物能够显著抑制3T3-L1脂肪细胞的分化,并减少高脂饮食引起的小鼠体质量、脂肪组织质量和食物摄入量的增加。核桃粕酶解物对3T3-L1细胞脂肪生成具有较强的抑制作用,其在体内的抗肥胖效果还需进一步研究。未来研究需要评估核桃粕酶解物中生物活性抗肥胖分子的效力和生物利用度,并确定其中可能的活性化合物。核桃粕有潜力成为开发新型抗肥胖药物的参考。

4 结论

核桃粕酶解物在抑制3T3-L1脂肪细胞脂质积累方面表现出显著作用,其机制与抑制相关脂质合成基因表达有关。此外,核桃粕酶解物在减少高脂饮食小鼠体内脂质积累方面也表现出显著效果。这些研究结果为进一步深度加工核桃蛋白提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 王焯,于欣平,毕焯,等.大数据时代超重肥胖社会防控的新战略[J].中国食物与营养,2020(2):5-9.
WANG Y, YU X P, BI Y, et al. New strategies for the prevention and control of overweight and obesity in the era of big data[J]. Food and Nutrition in China, 2020(2): 5-9.
- [2] LANYARD G S, HARUTYUNYAN H S, AGHA-JANOV M I, et al. Neurochemical regulators of food behavior for pharmacological treatment of obesity: Current status and future prospects[J]. Future Medicinal Chemistry, 2020, 12(20): 1865-1884.
- [3] SU M L, HUANG W D, ZHU B H, et al. Acetylshikonin from Zicao prevents obesity in rats on a high-fat diet by inhibiting lipid accumulation and inducing lipolysis[J]. Plos One, 2016, 11(1): e0146884.
- [4] FENG Y X, WANG Z C, CHEN J X, et al. Separation, identification, and molecular docking of tyrosinase inhibitory peptides from the hydrolysates of defatted walnut (*Juglans regia* L.) meal[J]. Food Chemistry, 2021, 353(10): 129471.
- [5] YANG X Y, ZHONG D Y, WANG G L, et al. Effect of walnut meal peptides on hyperlipidemia and hepatic lipid metabolism in rats fed a high-fat diet[J]. Nutrients, 2021, 13(5): 1410.
- [6] GUASCH-FERRÉ M, LI J, HU F B, et al. Effects of walnut consumption on blood lipids and other cardiovascular risk factors: An updated meta-analysis and systematic review of controlled trials [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2018, 108(1): 174-187.
- [7] 金子纯,张润光,韩军岐,等.核桃饼粕蛋白质及其开发利用[J].食品与发酵工业,2016,42(6):265-270.
JIN Z C, ZHANG R G, HAN J Q, et al. Walnut cake meal protein and its development and utilization[J]. Food and Fermentation Industry, 2016, 42(6): 265-270.
- [8] 王纪辉,耿阳阳,侯娜,等.影响单酶法制备核桃多肽的因素研究[J].中国酿造,2017,36(12):68-71.
WANG J H, GENG Y Y, HOU N, et al. Factors influencing the preparation of walnut polypeptides by the single-enzyme method [J]. Chinese Brewing, 2017, 36(12): 68-71.
- [9] 门德盈,代佳和,汤木果,等.核桃肽制备及生物活性的研究进展[J].食品科学,2022,43(23):367-376.
MEN D Y, DAI J H, TANG M G, et al. Preparation and bioactivity of walnut peptides: A review[J]. Food Science, 2022, 43(23): 367-376.
- [10] 郭琰,马雅鸽,张希,等.基于网络药理学研究核

- 桃粕的降脂机理[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(4): 144-152.
- GUO Y, MA Y G, ZHANG X, et al. Study on the lipid-reduction mechanism of walnut meal based on network pharmacology[J]. Grain, Oil and Food Technology, 2021, 29(4): 144-152.
- [11] 缪福俊, 宁德鲁. 核桃多肽生物活性研究进展[J]. 中国油脂, 2021, 46(3): 48-51.
- MIAO F J, NING D L. Progress in the bioactivity of walnut polypeptides[J]. Chinese Grease, 2021, 46(3): 48-51.
- [12] 胡乃华. Coelin 通过调节脂肪生成和增加脂肪组织的能量消耗来改善代谢失调[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(9): 1469.
- HU N H. Coelin ameliorates metabolic dysregulation by regulating adipogenesis and increasing energy expenditure in adipose tissue[J]. Natural Products Research and Development, 2021, 33(9): 1469.
- [13] JOHN C, AROCKIASAMY S. Enhanced inhibition of adipogenesis by chrysin via modification in redox balance, lipogenesis, and transcription factors in 3T3-L1 adipocytes in comparison with hesperidin[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2022, 41(8): 758-770.
- [14] XU H, GAO H, LIU F Y, et al. Red-skin extracts of lotus seeds alleviate high-fat-diet induced obesity via regulating lipoprotein lipase activity[J]. Foods, 2022, 11(14): 2085.
- [15] LIANG X, CHEN D, CAO L J, et al. Effects of pressed degreased walnut meal extracts on lipid metabolism in postnatally monosodium glutamate-induced mice and 3T3-L1 preadipocytes[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 31: 89-96.
- [16] 李育兰. 核桃粕提取物对2型糖尿病大鼠的降糖作用及其机制研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2020.
- LI Y L. The hypoglycemic effect and mechanism of walnut meal extract in type 2 diabetic rats[D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [17] DUANSAK N, SCHMID-SCHÖNBEIN G W, SRI-SAWAT U. Anti-obesity effect of rice bran extract on high-fat diet-induced obese mice[J]. Prev Nutr Food Sci, 2022, 27(2): 172-179.
- [18] MUNKONG N, LONAN P, MUEANGCHANG W, et al. Red rice bran extract attenuates adipogenesis and inflammation on white adipose tissues in high-fat diet-induced obese mice[J]. Foods, 2022, 11(13): 1865.
- [19] SONG Y H, CAI Q L, WANG S L, et al. The ameliorative effect and mechanisms of *Ruditapes philippinarum* bioactive peptides on obesity and hyperlipidemia induced by a high-fat diet in mice[J]. Nutrients, 2022, 14(23): 5066.
- [20] 黄文钰, 李向平. 脂肪细胞三酰甘油分解代谢相关调节的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33(3): 230-234.
- HUANG W Y, LI X P. Progress in the regulation of catabolism of triacylglycerol in adipocytes[J]. The International Journal of Pathological Sciences and Clinical Studies, 2013, 33(3): 230-234.
- [21] 王捷思, 张雯. 脂肪组织功能紊乱与肥胖和糖尿病[J]. 云南师范大学学报自然科学版, 2013, 33(6): 21-28.
- WANG J S, ZHANG W. Adipose tissue dysfunction is associated with obesity and diabetes mellitus[J]. Journal of Yunnan Normal University, 2013, 33(6): 21-28.
- [22] XIA J H, YU P, ZENG Z L, et al. Effects of medium chain triglycerides on lipid metabolism in high-fat diet induced obese rats[J]. Food Funct, 2022, 13(17): 8998-9009.
- [23] WEIKART D K, INDIKURI V V, RACINE K C, et al. Effect of processing on the anti-inflammatory efficacy of cocoa in a high fat diet-induced mouse model of obesity[J]. J Nutr Biochem, 2022, 109: 109117.
- [24] MENG X Y, WANG X W, HAN Y L, et al. Protective effects of apple polyphenols on bone loss in mice with high fat diet-induced obesity[J]. Food Funct, 2022, 13(15): 8047-8055.
- [25] KIM H L, AHN Y M, LEE S M, et al. Anti-obesity effects of aqueous extracts of sunbangh-walmyung-eum in high-fat- and high-cholesterol-diet-induced obese C57BL/6J mice[J]. Nutrients, 2022, 14(14): 2929.
- [26] YAGI M, NAKATSUJI Y, MAEDA A, et al. Phenethyl isothiocyanate activates leptin signaling and decreases food intake[J]. PLoS One, 2018, 13(11): e0206748.

The Mechanism of Walnut Meal Enzymatic Hydrolysate Inhibiting Lipid Accumulation

Bai Yuying^{1,2}, Xie Jing¹, Peng Linjie^{1,2}, Mao Jiaying^{1,2}, Li Shijun^{1*}, Tian Yang^{2,3*}

(¹College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201

²National Research and Development Professional Center for Moringa Processing Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201

³Engineering Research Center of Development and Utilization of Food and Drug Homologous Resources, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract The anti-obesity effects of walnut meal enzymatic digests were investigated using a C57BL/6 mouse model of high-fat diet (HFD)-induced obesity and a differentiated 3T3-L1 adipocyte model. The accumulation of lipids in the adipocytes was identified through the use of oil red O fat staining. The levels of triglycerides (TG), glycerol (Gly), and free fatty acids (FFA) within the cells were quantified using a commercially available kit. The expression of genes involved in fat synthesis was determined through real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR RT-qPCR). The results demonstrated that the enzymatic digestion of walnut meal markedly diminished the accumulation of lipid droplets in adipocytes, notably reduced the TG and FFA content in adipocytes, and enhanced the Gly content in the cell supernatant. Concurrently, the enzymatic digestion of walnut meal significantly diminished the mRNA expression levels of adipose synthesis-related genes. The levels of free fatty acids (FFA) decreased by 40.14% and 39.50%, respectively, while the level of glycine increased by 35.12%. Additionally, the expression levels of mRNA for genes *PPAR- γ* and *C/EBP α* in adipocytes were found to be decreased by 31.42% and 55.25%, respectively, when the mass concentration of the enzymatic digest of walnut meal reached 50 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, the enzymatic digest of walnut meal was observed to significantly reduce body mass, adipose tissue mass and food intake in mice fed a high-fat diet (HFD). The study demonstrated that the enzymatic digest of walnut meal inhibited lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes, and its mechanism of action was related to the inhibition of the expression of genes related to lipid synthesis. Additionally, it was found to inhibit lipid accumulation in HFD.

Keywords walnut meal enzymatic hydrolysate; 3T3-L1 adipocytes; lipid accumulation; high-fat diet mice