

文章编号: 1004-4353(2021)02-0160-05

## 东莨菪内酯对高脂饲料诱导的肥胖小鼠 脂质代谢的影响

金亮华<sup>1</sup>, 刘官成<sup>2</sup>, 王龄鹤<sup>3,4</sup>, 闫姿安<sup>3,4</sup>, 许唱<sup>2,3</sup>, 元海丹<sup>2,3\*</sup>

( 1. 延边神圣制药有限公司; 2. 延边大学 药学院; 3. 延边大学长白山天然药物研究教育部重点实验室;  
4. 延边大学 融合学院: 吉林 延吉 133002 )

**摘要:** 为了探讨东莨菪内酯对高脂饲料(HFD)-诱导的肥胖小鼠脂肪积蓄的抑制作用,将 40 只 ICR 小鼠随机分为正常对照组(CON)、模型组(HF)、东莨菪内酯高剂量组(20 mg/kg, HFH)、东莨菪内酯低剂量组(10 mg/kg, HFL)和阳性对照组(30 mg/kg 水飞蓟素, HFS). CON 组用 10 kcal% 的饲料喂养,其他组均用 45 kcal% 的 HFD 喂养,共喂养 13 周. 从喂养第 10 周开始,对各组小鼠给予(灌胃)相应剂量的药物. 灌药喂养后,经血液指标检测显示东莨菪内酯剂量依赖性地降低了小鼠的血脂水平,经组织形态学观察显示东莨菪内酯显著地减少了小鼠的肝脏组织、肩胛骨脂肪组织和白色附睾丸脂肪组织的脂肪积蓄,经 RT-PCR 检测显示东莨菪内酯可显著降低小鼠附睾丸脂肪中的 SREBP-1 $\alpha$ 、FAS、SCD1、PPAR- $\gamma$  和 aP2 等基因的表达,即表明东莨菪内酯对 HFD-诱导的肥胖小鼠的脂肪积蓄具有良好的抑制作用.

**关键词:** 东莨菪内酯; 固醇调节元件结合蛋白-1 $\alpha$ ; 过氧化物酶体增殖活化受体- $\gamma$ ; 高脂饲料

中图分类号: R966

文献标识码: A

## Effect of scopoletin on lipid metabolism in high-fat diet-induced obese mice

JIN Lianghua<sup>1</sup>, LIU Guancheng<sup>2</sup>, WANG Linghe<sup>3,4</sup>, YAN Zi'an<sup>3,4</sup>, XU Chang<sup>2,3</sup>, YUAN Haidan<sup>2,3\*</sup>

( 1. Yanbian Shensheng Pharmacy Company Limited; 2. College of Pharmacy, Yanbian University;  
3. Key Laboratory for Natural Medicine of Changbai Mountain (Yanbian University), Ministry of Education;  
4. College of Integration, Yanbian University; Yanji 133002, China )

**Abstract:** In order to investigate the inhibitory effect of scopoletin on fat accumulation in high-fat diet (HFD)-induced obese mice. Mice were randomly divided into normal control group (CON), model group (HF), scopoletin high-dose group (20 mg/kg, HFH) and low-dose group (10 mg/kg, HFL), positive control group (30 mg/kg sylimarin, HFS). The CON group mice were fed with 10 kcal% diet, and the other groups were fed with 45 kcal% HFD for 13 weeks. From the 10<sup>th</sup> week, mice in each group were given the corresponding dose of drugs by oral gavage. The results of blood index showed that scopoletin reduce the blood lipid levels in a dose-dependent manner. The histological observation showed that scopoletin significantly reduced the fat accumulation in liver, scapular brown adipose and epididymal white adipose tissue. Scopoletin markedly inhibited the expressions of sterol regulatory element binding protein-1 $\alpha$  (SREBP-1 $\alpha$ ), fatty acid synthase (FAS), stearyl CoA desaturase-1 (SCD1), peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) and adipocyte type fatty acid binding protein (aP2) in epididymal white adipose tissue. In summary, these results suggest that scopoletin has an inhibitory effects on lipid accumulation in HFD-induced mice, and its possible interven-

收稿日期: 2021-04-21

\* 通信作者: 元海丹(1975—),女,副教授,研究方向为中药药理.

基金项目: 国家自然科学基金(82060674);吉林省教育厅科学技术研究项目(JJKH20210587KJ)

tion mechanism is through SREBP-1 $\alpha$ /PPAR- $\gamma$  signaling pathway.

**Keywords:** scopoletin; SREBP-1 $\alpha$ ; PPAR- $\gamma$ ; high-fat diet

肥胖是一种由多因素引起的慢性代谢性疾病,通常表现为脂肪在体内分布异常或堆积过多,进而导致体重增加.研究表明,肥胖容易导致高脂血症、心血管疾病以及糖尿病等代谢疾病,现已成为全球重大公共卫生问题之一<sup>[1-2]</sup>.东莨菪内酯(6-甲氧基-7-羟基香豆素)是存在于多种植物(如丁公藤(*Erycibe obtusifolia* Benth.)<sup>[3]</sup>、紫花地丁(*Viola philippica*)<sup>[4]</sup>、茵陈蒿(*Artemisia capillaris*)<sup>[5]</sup>、白芷(*Angelicae dahuricae* Radix)<sup>[6]</sup>、诺丽果<sup>[7]</sup>、红薯<sup>[8]</sup>等)中的一种活性物质,具有抗炎<sup>[9]</sup>、抗肿瘤<sup>[10]</sup>、抗氧化<sup>[11]</sup>、降血压<sup>[12]</sup>和降血糖<sup>[4]</sup>等多种药理作用.目前,关于东莨菪内酯对调节脂肪代谢方面的研究较少,如东莨菪内酯对脂肪肝的抑制作用虽已被证实,但其相关作用机制尚不完全清楚<sup>[13-15]</sup>.为了进一步阐明东莨菪内酯对小鼠脂肪代谢的调节机制,本文利用由45 kcal%高脂饲料(HFD)-诱导的肥胖小鼠模型探究东莨菪内酯对肥胖小鼠脂肪积蓄的抑制作用及其机制.

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验材料

40只雄性ICR(institute of cancer research)小鼠(4周龄,体重为18~20 g),长春亿斯实验动物技术有限公司;东莨菪内酯,东京化成工业株式会社;水飞蓟素、羧甲基纤维素钠、中性甲醛固定液、油红O、苏木素(hematoxylin, H)、伊红(eosin, E)、三羟甲基氨基甲烷、乙二醇四乙酸、溴化乙锭、异氟烷, Sigma-aldrich公司;O.C.T(optimal cutting temperature compound)冷冻切片包埋剂, Tissue Tek公司;中性树胶、甘油明胶, Merck公司;甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所;总RNA提取试剂盒, iNtRON公司;M-MLV第一链cDNA合成试剂盒, Promega公司;ExTaq酶, 大连宝生物工程有限公司;SREBP-1 $\alpha$ 、FAS、SCD1、PPAR- $\gamma$ 和aP2引物, 上海Bioneer公司;琼脂糖凝胶, Bio-rad公司;甲醇、乙醇、异丙醇、二甲苯、乙醚等均为分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司.

### 1.2 实验仪器

分析天平, 上海精天电子仪器有限公司;低速离心机, Eppendorf公司;多功能酶标仪, Tecan公司;组织匀浆机, 上海弗鲁克流体机械制造有限公司;冰冻切片机, Leica公司;倒置显微镜, Olympus公司;恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器厂;酸度计, 上海奥豪斯仪器有限公司; -80℃超低温冰箱, Sanyo公司;电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司;凝胶成像仪, UVP公司.

## 2 实验方法

### 2.1 实验动物分组与给药方法

将40只适应环境1周后的小鼠随机分为5组(正常对照组(CON)、模型组(HF)、东莨菪内酯高剂量组(HFH)、东莨菪内酯低剂量组(HFL)和阳性对照组(水飞蓟素, HFS)), 每组8只. 正常组饲以10 kcal%饲料, 其他组均饲以45 kcal% HFD. 共喂养小鼠13周, 且在最后4周中每天灌胃给药1次, 其中CON组和HF组为质量分数为0.5%的羟甲基纤维素钠溶液, HFH组和HFL组分别为20 mg/kg和10 mg/kg的东莨菪内酯, HFS组为30 mg/kg的水飞蓟素. 喂食前, 东莨菪内酯和水飞蓟素分别用质量分数为0.5%的羟甲基纤维素钠溶液溶解.

### 2.2 血液指标的测定

给药过程结束后, 用异氟烷对小鼠进行麻醉, 并以心脏穿刺法取全血. 全血离心15 min (3 000 r/min, 4℃)后取血清, 然后再分别按照TG、TC试剂盒的操作说明进行操作.

### 2.3 组织病理学观察

解剖小鼠, 采集肝脏、肩胛骨棕色脂肪及白色附睾丸脂肪组织后, 再取适当大小的组织分别用冷冻切片包埋剂包埋;用冷冻切片机将组织切成5  $\mu$ m厚度的切片, 然后对切片进行H&E染色和油红O染色;完成染色后, 在光学显微镜下观察各染色切片组织的病理学变化.

#### 2.3.1 肝脏组织和脂肪组织的H&E染色

分别将切好的肝脏组织切片和附睾丸中的白色脂肪组织切片放入乙醚-乙醇溶液(V(乙醚):

V (乙醇) = 1 : 1) 中固定 1 min, 然后水洗 (1 min)、H 染色 (肝脏组织 1 min, 附睾丸白色脂肪组织 20 s); 水洗 3 min 后进行 E 染色 (肝脏组织 2 min, 附睾丸白色脂肪组织 40 s); 自来水冲洗 10 min 后用梯度乙醇 (体积分数分别为 70%、80%、90%、95%) 进行脱水, 然后用二甲苯溶液浸泡 3 min 后用中性树胶封片。

2.3.2 脂肪组织的油红 O 染色

将切好的肝脏组织切片在室温下用体积分数为 10% 的中性甲醛固定液固定 5 min, 然后用水冲洗 10 min; 在体积分数为 60% 的异丙醇溶液中浸泡 5 min 后用油红 O 溶液染色 5 min, 然后再用体积分数为 60% 的异丙醇调色 3 min; 自来水冲洗 3 min 后进行 H 染色 (3 s), 然后再用自来水冲洗 5 min 后用甘油明胶封片。

2.4 RT-PCR 实验

首先, 采用 Trizol 一步法<sup>[16]</sup>提取小鼠白色附睾丸脂肪组织中的总 RNA, 并采用 M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒完成逆转录反应。然后, 以合成的 cDNA 为模板, 按照 RT-PCR 操作步骤对 cDNA 进行 PCR 扩增。PCR 的反应条件: 95 °C 预变性 60 s, 30 个循环 (每个循环为 95 °C 变性 5 s), 50 °C (FAS)、55 °C (PPAR-γ)、56 °C (SCD1,

SREBP-1α)、57 °C (CPN)、60 °C (aP2) 退火 30 s, 72 °C 下延伸 30 s。在 72 °C 下继续反应 10 min, 然后将样品在 4 °C 下放置 1 h。在 100 V 恒定电压下用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶 (含 0.01% 溴化乙锭) 对样品进行电泳, 并用凝胶成像系统对凝胶进行扫描和拍摄。RT-PCR 的引物序列见表 1。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析。实验数据以均数 ± 标准偏差 (mean ± S.D) 表示, 两组样本比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 东莨菪内酯对小鼠血液指标的影响

表 2 为 ICR 小鼠的血液指标。由表 2 可以看出: 与 CON 组相比, HF 组小鼠的 TG 和 TC 水平分别增高了 98.8% 和 38.6%; 与 HF 组相比, HFH 组和 HFL 组的 TG 水平呈剂量依赖性地显著降低了 47.0% 和 26.2%, TC 的水平呈剂量依赖性地降低了 17.0% 和 5.3%。以上结果说明, 东莨菪内酯对 HFD-诱导的小鼠血脂水平具有良好的改善作用。

表 1 RT-PCR 的引物序列

基因名称	基因序列
SREBP-1α	sense 5'-GCGCTACCGGTCTTCTATCA-3' anti-sense 5'-TGCTGCCAAAAGACAAGGG-3'
FAS	sense 5'-GATCCTGGAACGAGAACAC-3' anti-sense 5'-AGACTGTGGAACACGGTGGT-3'
SCD1	sense 5'-CGAGGGTTGGTTGTTGATCTG-3' anti-sense 5'-ATAGCACTGTTGGCCCTGGA-3'
PPAR-γ	sense 5'-AGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTTC-3' anti-sense 5'-TGGCCACCTCTTTGCTCTTGCTC-3'
aP2	sense 5'-TCTCACCTGGCCTCTTCCTTTGGCTC-3' anti-sense 5'-TTCCATCCAGGCCTCTTCCTTTGGCTC-3'
CPN	sense 5'-ATGGTCAACCCACCGTG-3' anti-sense 5'-TTAGAGTTGTCCACAGTCGGAGA-3'

表 2 ICR 小鼠的血液指标

mmol/L

指标	血液指标值				
	CON	HF	HFH	HFL	HFS
甘油三酯	1.67±0.15	3.32±0.14 ***	1.76±0.22 ###	2.45±0.23 #	2.78±1.00
总胆固醇	2.46±0.19	3.41±0.38 ***	2.83±0.25 #	3.23±0.36	2.94±0.28

注: 与 CON 组比较, \*\*\* 表示 *P* < 0.001; 与 HF 组比较, # 表示 *P* < 0.05, ### 表示 *P* < 0.001。

3.2 小鼠脂肪组织的病理形态学观察

为了观察东莨菪内酯对 HFD-诱导的肥胖小鼠脂肪积蓄的抑制作用,对小鼠肝脏组织的冰冻切片进行 H&E 染色和油红 O 染色,对小鼠的肩胛骨棕色脂肪组织和白色附睾丸脂肪组织的冰冻切片进行 H&E 染色,结果如图 1 所示.由图 1 可以看出,在 CON 组小鼠的肝脏组织中无明显的脂滴存在,而在 HF 组小鼠的肝脏组织中存在较多的脂滴;东莨菪内酯给药组和 HFS 组小鼠肝脏组织中的脂滴数量比 HF 组小鼠肝脏组织中的脂滴数量显著减少,且东莨菪内酯给药组小鼠肝脏组织中的脂滴数量明显少于 HFS 组.上述结果说明,东莨菪内酯可剂量依赖性地抑制 HFD-诱导的肥胖小鼠的脂肪在肝脏中的积蓄.

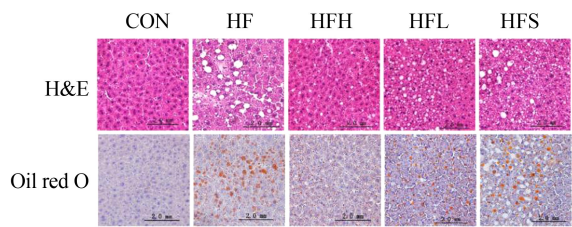
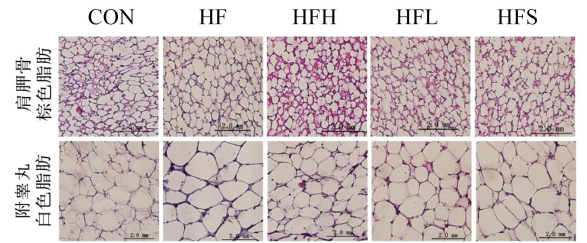


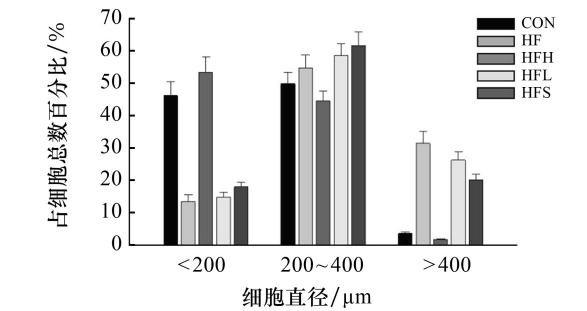
图 1 东莨菪内酯对小鼠肝脏组织的病理形态学影响(放大倍数×200)

图 2(A)为小鼠肩胛骨脂肪组织(棕色)和附睾丸脂肪组织(白色)的 H&E 染色结果.由图 2(A)可以看出,与 CON 组小鼠的单个脂肪细胞的面积相比,HF 组小鼠的单个脂肪细胞的面积明显增大,而东莨菪内酯给药组及 HFS 组小鼠的单个脂肪细胞的面积有所减小,且东莨菪内酯给药组小鼠的单个脂肪细胞的面积小于 HFS 组小鼠的单个脂肪细胞面积.图 2(B)为对白色附睾丸脂肪组织的细胞大小进行统计的结果.从图 2(B)可以看出:在 CON 组中,附睾丸脂肪组织的细胞直径小于 400  $\mu\text{m}$  的比例占总细胞数的 96.4%.在 HF 组中,附睾丸脂肪组织的细胞直径大于 400  $\mu\text{m}$  的比例占总细胞数的 31.5%,而直径小于 200  $\mu\text{m}$  的细胞比例低于总细胞数量的 13.5%.在 HFH 组中,附睾丸脂肪组织的细胞直径大于 400  $\mu\text{m}$  的比例低于总细胞数量的 1.8%,而直径小于 200  $\mu\text{m}$  的比例高于总细胞数量的 53.6%.在 HFL 组及 HFS 组中,附睾丸脂肪组织的细胞直径大于 400  $\mu\text{m}$  的细胞比例分别占总细胞数量的

26.3%和 30.1%,而小于 200  $\mu\text{m}$  的细胞比例分别占总细胞数量的 14.9%和 18.0%.上述结果说明,东莨菪内酯可剂量依赖性地抑制 HFD-诱导的肥胖小鼠的脂肪在肩胛骨组织和附睾丸组织中的积蓄.



(A) H&E 染色结果



(B) 细胞大小统计结果

图 2 东莨菪内酯对小鼠脂肪组织的病理形态学影响(放大倍数×200)

3.3 东莨菪内酯对小鼠附睾丸脂肪组织的基因表达影响

固醇调节元件结合蛋白-1 $\alpha$  (SREBP-1 $\alpha$ ) 是一类位于内质网上的膜连接蛋白,是参与脂肪合成的主要转录调节因子,并可以对参与脂肪酸合成的下游靶基因 FAS 和 SCD1 进行调控<sup>[17]</sup>.过氧化物酶体增殖活化受体- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) 是脂肪细胞分化的关键调控因子,它不仅使脂肪细胞数量增加,还能够促进脂肪细胞 TG 的合成;aP2 为 PPAR- $\gamma$  的下游,它与脂类储存及脂类代谢的靶基因调节相关<sup>[18]</sup>.脂肪组织中的 SREBP-1 $\alpha$ 、FAS、SCD1、PPAR- $\gamma$ 、aP2 基因表达增多说明脂肪的合成能力增强.由图 3 可以看出,与 CON 组的小鼠相比,HF 组小鼠的白色附睾丸脂肪组织中的 SREBP-1 $\alpha$ 、FAS、SCD1、PPAR- $\gamma$  及 aP2 基因表达增多,而东莨菪内酯给药组的上述基因表达明显呈剂量依赖性地减少,即东莨菪内酯能够通过下调 SREBP-1 $\alpha$ 、FAS、SCD1、PPAR- $\gamma$ 、aP2 基因的表达来减少脂肪在小鼠附睾丸组织中的积蓄.



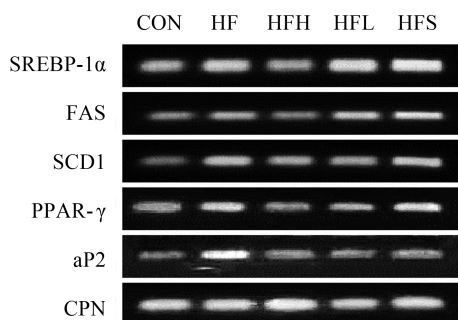


图 3 东莨菪内酯对小鼠附睾丸脂肪组织基因表达的影响

#### 4 结论

本文实验结果表明,东莨菪内酯对 HFD-诱导的肥胖小鼠的血脂及其脂肪积蓄具有良好的改善作用,同时可显著减小小鼠附睾丸脂肪组织的细胞大小.此外,东莨菪内酯还能够下调小鼠附睾丸脂肪组织中与脂肪合成有关基因(SREBP-1 $\alpha$ 、FAS、SCD1、PPAR- $\gamma$ 、aP2)的表达.本文结果可为东莨菪内酯在预防或治疗肥胖方面的药物开发提供理论基础.

#### 参考文献:

- [1] ARROYO-JOHNSON C, MINCEY K D. Obesity epidemiology worldwide[J]. *Gastroenterology Clinics of North America*, 2016, 45(4): 571-579.
- [2] KELLY T, YANG W, CHEN C S, et al. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030 [J]. *International Journal of Obesity*, 2008, 32(9): 1431-1437.
- [3] 谭建宁,高振霞.丁公藤的研究进展[J]. *广西科学院学报*, 2008, 24(1): 49-52.
- [4] JANG J H, PARK J E, HAN J S. Scopoletin inhibits  $\alpha$ -glucosidase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in mice with diabetes[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2018, 834: 152-156.
- [5] 祝茗,张开梅,丁燕.茵陈蒿中滨蒿内酯及东莨菪素抗氧化活性的评价[J]. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33(11): 889-893.
- [6] 管雪静,余世平,廖正根,等.白芷中 10 种呋喃型香豆素对长春新碱肠道转运的影响[J]. *中草药*, 2015, 46(14): 2117-2121.
- [7] 梁寒峭,陈建国,张露,等.诺丽发酵果汁中总香豆素质量浓度的测定[J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(2): 202-205.
- [8] MATSUMOTO S, MIZUTANI M, SAKATA K, et al. Molecular cloning and functional analysis of the ortho-hydroxylases of *p*-coumaroyl coenzyme A/feruloyl coenzyme A involved in formation of umbelliferone and scopoletin in sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam[J]. *Phytochemistry*, 2012, 74: 49-57.
- [9] CHANG T N, DENG J S, CHANG Y C, et al. Ameliorative effects of scopoletin from *Crossostephium chinensis* against inflammation pain and its mechanisms in mice[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 2012: 595603.
- [10] KIM E K, KWON K B, SHIN B C, et al. Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor  $\kappa$ B and caspase-3[J]. *Life Sciences*, 2005, 77(7): 824-836.
- [11] SHAW C Y, CHEN C H, HSU C C, et al. Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum* [J]. *Phytotherapy Research*, 2003, 17: 823-825.
- [12] OJEWOLE J A, ADESINA S K. Mechanism of the hypotensive effect of scopoletin isolated from the fruit of *Tetrapleura tetraptera* [J]. *Planta Medica*, 1983, 49: 46-50.
- [13] YOO A, NARAYAN V P, HONG E Y, et al. Scopolin ameliorates high-fat diet induced hepatic steatosis in mice: potential involvement of SIRT1-mediated signaling cascades in the liver[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 2251.
- [14] LEE H I, YUN K W, SEO K, et al. Scopoletin prevents alcohol-induced hepatic lipid accumulation by modulating the AMPK-SREBP pathway in diet-induced obese mice[J]. *Metabolism*, 2014, 63(4): 593-601.
- [15] HAM J R, LEE H I, CHOI R Y, et al. Anti-obesity and anti-hepatosteatosis effects of dietary scopoletin in high-fat diet fed mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 25: 433-446.
- [16] 刘玉刚,胡旭,付建军,等.一种富含多糖的关节软骨组织总 RNA 提取方法初探[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(24): 2495-2497.
- [17] ZHOU B, ZHOU D L, WEI X H, et al. Astragaloside IV attenuates free fatty acid-induced ER stress and lipid accumulation in hepatocytes via AMPK activation[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017, 38(7): 998-1008.
- [18] LEE C W, SEO J Y, LEE J, et al. 3-O-Glucosylation of quercetin enhances inhibitory effects on the adipocyte differentiation and lipogenesis[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 95: 589-598.