

富含羟基酪醇橄榄油对高血脂小鼠的影响

叶文斌¹, 陈文东¹, 王 昱¹, 张 凯¹, 黄新异², 邸多隆²

(1.陇南师范高等专科学校农林技术学院, 甘肃 成县 742500; 2.中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 研究富含羟基酪醇橄榄油 (olive oil rich in hydroxyl tyrosol, OHT) 对高血脂小鼠血糖和血脂的影响。以脂肪乳剂和75% (体积分数) 的蛋黄乳灌胃构建小鼠高血糖高血脂模型, 将建模成功的小鼠随机分为高血脂模型组, OHT高、中、低剂量 (200、100、50 mg/kg m_b) 组, 普通橄榄油 (olive oil, OL) 组, 菲勒贝特阳性对照 (philbert, PL) 组, 以生理盐水为CK(0)组。连续灌胃给药28 d, 分析OHT对高血脂小鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、糖化血红蛋白 (glycated hemoglobin, HbA1c)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、总胆汁酸 (total bile acid, TBA)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、 γ -氨基转移酶 (gamma-ammonia acyltransferase, GGT)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 水平的影响, 并对OHT开展急性慢性毒理研究。结果显示, 与模型组相比, OHT能有效降低高血脂小鼠的FBG、TC、TG、LDL、TBIL、TBA浓度及HbA1c相对含量, 提高HDL浓度, 对ALT、AST、GGT和ALP活性具有很好的抑制作用, 能够改善血糖血脂代谢紊乱, 还具有降低体质量的效果, 且呈剂量效应关系。OHT对正常小鼠无急性慢性毒理作用, 能提高小鼠血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活力, 降低丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 浓度, 提高小鼠的抗氧化能力, 控制小鼠体质量。综上, OHT对高血脂小鼠具有降血糖、血脂作用, 且无毒。本研究结果可为利用橄榄油开发降血脂产品提供参考。

关键词: 羟基酪醇; 橄榄油; 高血脂小鼠; 降血糖; 降血脂; 急性和慢性毒理

Effect of Olive Oil Rich in Hydroxyl Tyrosol on Hyperlipidemic Mice

YE Wenbin¹, CHEN Wendong¹, WANG Yu¹, ZHANG Kai¹, HUANG Xinyi², DI Duolong²

(1. Technique College of Agriculture and Forestry, Longnan Teachers College, Chengxian 742500, China;

2. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: This study was undertaken in order to study the effect of olive oil rich in hydroxyl tyrosol (OHT) on blood glucose and lipids in hyperlipidemic mice. Mice with hyperglycemia and hyperlipidemia induced by intragastric administration of lipid emulsion and 75% egg yolk in water were randomly divided into six groups: hyperlipidemia model, OHT at high, middle and low dosages (200, 100, and 50 mg/kg m_b), olive oil (OL) and philbert (PL) as a positive control. Normal mice given normal saline was used as a control group. After continuous administration for 28 days, the effect of OHT on fasting blood glucose (FBG), glycated hemoglobin (HbA1c), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), total bilirubin (TBIL), total bile acid (TBA), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-ammonia acyltransferase (GGT) and alkaline phosphatase (ALP) in mice in each group were analyzed, and the acute and chronic toxicity of OHT was evaluated. The results showed that compared to the model group, OHT effectively decreased the levels of FBG, HbA1c, TC, TG, LDL, TBIL and TBA, increased the level of HDL, and inhibited the activities of ALT, AST, GGT and ALP. It significantly improved glucose and lipid metabolic disorders, and reduced body mass in a dose-dependent fashion. OHT had no acute or chronic toxicity to normal mice and

收稿日期: 2022-10-28

基金项目: 2021年甘肃省科技重大专项 (21ZD4NK045); 2021年甘肃省自然科学基金项目 (21JR7RK912);

2022年甘肃省重点研发计划项目 (22YF7FK220)

第一作者简介: 叶文斌 (1982—) (ORCID: 0000-0002-2952-0590), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为天然产物化学与动物药理、果蔬保鲜及功能食品。E-mail: lnszywb@163.com

could significantly increase the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the serum, reduce the level of malondialdehyde (MDA), improve the antioxidant capacity, and control the body mass of mice. In summary, OHT has hypoglycemic and lipid-lowering effects in hyperlipidemic mice, and is non-toxic. This study can provide a reference for the development of lipid-lowering products using olive oil.

Keywords: hydroxytyrosol; olive oil; hyperlipidemic mice; hypoglycemic; hypolipidemic; acute and chronic toxicology

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221028-298

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)01-0144-07

引文格式:

叶文斌, 陈文东, 王昱, 等. 富含羟基酪醇橄榄油对高血脂小鼠的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(21): 144-150.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221028-298. <http://www.spkx.net.cn>

YE Wenbin, CHEN Wendong, WANG Yu, et al. Effect of olive oil rich in hydroxyl tyrosol on hyperlipidemic mice[J]. Food Science, 2023, 44(21): 144-150. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221028-298. <http://www.spkx.net.cn>

橄榄油是木犀科木犀榄属的一种常绿经济乔木油橄榄 (*Olea europaea* L.) 鲜果经过冷榨离心工艺得到的产物, 由于保存了天然营养成分, 被誉为“液体黄金”, 因其富含可降低胆固醇和血脂的油酸及人体必需的维生素和微量元素^[1-4], 是世界公认营养价值最高的植物油。而且它还是一种不干性食用油, 人体消化吸收率高达90%以上, 是食用油脂中最有益于人体健康的植物油之一, 同时橄榄油中还富含三萜类、甾醇类、多酚类、酚类化合物和类胡萝卜素和其他色素成分^[3-8], 长期食用橄榄油能增强消化系统功能、预防心脑血管疾病和神经退行性疾病、降低癌症发生率、促进骨骼发育^[9-13], 尤其在改善一些心血管风险因子如血脂、血糖代谢、内皮功能和炎症反应方面具很好的效果^[7-8,14-16], 对人体健康具有重要作用。羟基酪醇是一种存在于油橄榄叶和树皮中的多酚类化合物, 具有很强的抗氧化活性和药理学效果^[17], 羟基酪醇的自由基清除能力强, 表现出独特的生物活性, 如抗氧化、抗菌、抗炎、改善心脏的冠脉血流^[17]等, 还可以通过阻滞肿瘤细胞的增殖及诱发其凋亡, 起到很好的抗癌活性, 同时能有效防治小鼠生殖系统的损伤^[18-20], 而且无明显毒性反应, 其在医药与食品行业的应用前景近年来受到广泛关注^[21-22]。目前, 国内外对橄榄油保健功效的研究比较深入, 而对橄榄油保健食品的研究较少^[14], 在国内存在一些以胶囊、片剂、粉剂为主的橄榄油保健产品, 但其在保健品的市场影响都比较小。随着我国居民对健康的重视水平不断提高以及国内橄榄油消费量的快速攀升, 国内对橄榄油保健食品功效的研究将会更加重视。

本实验采用脂肪乳剂和体积分数为75%的蛋黄乳诱导高血脂小鼠模型, 研究富含羟基酪醇橄榄油 (olive oil rich in hydroxyl tyrosol, OHT) 对高血脂小鼠的影响, 以期开发无毒无副作用的降脂降糖橄榄油保健食品提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

PFKM小鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所, 雌雄各半, 体质量 (22.00±0.45) g, 生产许可证号: SCXK(甘)2020-0002。

普通橄榄油由甘肃时光油橄榄科技有限公司提供, 羟基酪醇含量为0.25 mg/100 g; 富含羟基酪醇橄榄油由中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室自制, 羟基酪醇含量为20 mg/100 g。

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 北京索莱宝科技有限公司; 糖化血红蛋白、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 检测试剂盒 南京建成生物工程研究所有限公司; 动物专用全自动生化分析仪专用综合24项生理指标检查盘片 天津微纳芯科技有限公司; 菲勒贝特江苏恩华药业股份有限公司; 胆固醇、胆酸钠 美国Sigma公司; 丙基硫氧嘧啶片、聚山梨酯-80、1,2-丙二醇 南京天一生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

HH-6数显恒温水浴锅 上海千载科技有限公司; TGL-16G高速台式离心机 上海安亭科学仪器厂; UV759紫外-可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; Pointcare V3动物专用全自动生化分析仪 天津微纳芯科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 富含羟基酪醇橄榄油制备

取新鲜的油橄榄果, 清洗、粉碎至80目, 加入6倍鲜果质量的45℃纯净水, 搅拌。用高速剪切机以转速16 000 r/min对果肉中细胞组织进一步破碎提取, 提取时间为10 min, 每提取2 min间隔0.5 min, 再用搅拌器

在45℃下加热保温搅拌形成果浆。在常温下对果浆以20 000 r/min离心5 min后,果浆固液分离,分离果渣后,对油-水混合液进一步用400目的滤膜过滤,在过滤后的油-水混合液中加入其质量为10%的硫酸钠,搅拌使得硫酸钠完全溶解。静置25 min后油-水分离,得到富含羟基酪醇橄榄毛油和果水。富含羟基酪醇橄榄毛油静置24 h,得富含羟基酪醇特级初榨橄榄油,即本实验所用的实验材料——OHT。用高效液相色谱法测定OHT中羟基酪醇的含量为20 mg/100 g。检测条件:色谱柱:SinoChrom ODS-BP(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相:0.10%甲酸溶液(溶剂为V(水):V(乙腈)=86:14),流速:1.0 mL/min,柱温:30℃,进样体积:20 μL;二极管阵列检测器(diode array detector, DAD);检测波长:280 nm。

1.3.2 脂肪乳剂和体积分数75%蛋黄乳配制

参考郝艳丽等^[23]的方法制备脂肪乳剂,取80 g猪油置于500 mL烧杯中加热融化后,加入40 g胆固醇继续溶解,再加入8 g胆酸钠和4 g丙基硫氧嘧啶片,充分搅匀,然后加入适量的蒸馏水及聚山梨酯-80、1,2-丙二醇各80 mL,不断搅匀加热,再加双蒸水至400 mL并充分混匀,即配制成含100 g/L胆固醇、200 g/L猪油、20 g/L胆酸钠和10 g/L丙基硫氧嘧啶的脂肪乳剂,将脂肪乳剂放入4℃冰箱保存备用,使用时加热融化。

取新鲜鸡蛋黄用蒸馏水配制成体积分数为75%的蛋黄乳,即用即配。

1.3.3 高血脂小鼠动物模型建立

参考叶文斌等^[24]的方法,将正常PFKM小鼠适应性喂养7 d,随机取10只小鼠作为正常对照组,将其余60只小鼠(模型组)按10 mL/kg m_b 的剂量,早上灌胃脂肪乳剂,下午灌胃75%的蛋黄乳,每天1次,连续灌服6周,在末次灌胃后禁食12 h,不禁水后眼眶取血,模型组的总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)含量比正常对照组高3~4倍即造模成功。

1.3.4 富含羟基酪醇橄榄油对高血脂小鼠的影响实验

取建模成功的高血脂KM小鼠60只,随机分为6组:模型组,菲勒贝特药物对照组(philbert, PL),橄榄油(olive oil, OL)组,OHT高、中、低剂量(HOHT、MOHT和LOHT)组。PL组、OL组均按200 mg/kg m_b 剂量每天分别灌胃菲勒贝特药物、橄榄油1次;HOHT、MOHT和LOHT组,按照200、100、50 mg/kg m_b 的剂量每天灌胃1次OHT。连续灌胃28 d。小鼠自由饮食和饮水,取10只正常小鼠,以灌胃相同体积的生理盐水为CK(0)组。灌胃期间,每7 d称量体质量,末次给药后12 h眼眶静脉丛采血,用肝素抗凝管收集,4℃、3 000 r/min离心5 min后,收集血清,用动物专用全自动生化分析仪测定小鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、

TC、TG、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、γ-氨基酰基转移酶(gamma-ammonia acyltransferase, GGT)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)水平;依照试剂盒方法测定糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c)相对含量及HDL和LDL浓度;解剖小鼠取心脏、脑、肝、脾、肾,称取质量并按下式计算脏器指数。

$$\text{脏器指数}/\% = \frac{\text{脏器质量}/\text{g}}{\text{小鼠体质量}/\text{g}} \times 100$$

1.3.5 小鼠毒理学分析

1.3.5.1 急性毒理实验

选取40只PFKM小鼠,随机分成4组,其中1组小鼠喂生理盐水(CK(0)组),剩余3组小鼠进行OHT口服(灌胃)急性毒理实验,分为OHT高、中、低剂量组(HOHT、MOHT、LOHT组),灌服剂量分别为30 000、25 000 mg/kg m_b 和20 000 mg/kg m_b ,给药后每天早、中、晚各观察1次,连续观察7 d,观察小鼠皮毛是否光亮,眼角膜是否有血丝、红肿现象,小鼠活动是否有异常行为^[24],并对小鼠称质量。末次给药后12 h眼眶静脉丛采血,用肝素抗凝管收集,4℃、3 000 r/min离心5 min,收集血清,依照试剂盒方法测定SOD、CAT、GSH-Px活力和MAD浓度,对小鼠进行颈椎脱臼处死并解剖,对重要脏器进行病理检查。

1.3.5.2 慢性毒理实验

选取20只PFKM小鼠,随机分成2组,其中1组小鼠进行OHT口服(灌胃)慢性毒理实验,具体实验过程参考《保健食品及其原料安全性毒理学检验与评价技术指导原则(2020年版)》,灌服剂量为200 mg/kg m_b ,另外1组小鼠灌胃等体积的生理盐水,计为CK(0)组,每天灌胃1次,连续灌胃90 d。每30 d对小鼠称质量,实验结束时进行颈椎脱臼处死,进行重要脏器病理检查,按1.3.5.1节方法取血清,测定SOD、CAT、GSH-Px活力和MDA浓度。

1.4 数据处理与统计

实验结果均以平均值±标准误表示,数据分析采用SPSS 27.0软件进行,组间数据的差异显著性分析采用单因素方差分析(One-way ANOVA)中的Tukey's多重比较进行, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 OHT对高血脂小鼠血糖、血脂的影响

由表1可知,给药28 d后,模型组小鼠血清中TC、

TG、FBG浓度和HbA1c相对含量极显著高于其他6组 ($P < 0.01$)。HOHT对小鼠血清中TC、TG、FBG和HbA1c浓度的降低作用明显强于OL, 但与PL相比降糖降脂能力较温和, HOHT组与PL组相比除TG浓度无显著性差异外, TC、FBG浓度和HbA1c含量均呈极显著或显著差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。随OHT剂量增加, TC、TG、FBG浓度及HbA1c相对含量降低, 说明OHT对高血脂小鼠降血糖、血脂的作用呈现剂量效应关系, 富含高剂量的羟基酪醇橄榄油对高血脂小鼠降血糖、血脂的作用较强。综上, OHT可以有效调节高血脂小鼠血糖血脂水平。

表1 OHT对高血脂小鼠血糖与血脂的影响

Table 1 Effect of OHT on blood glucose and lipids in hyperlipemic mice

组别	TC浓度/(mmol/L)	TG浓度/(mmol/L)	FBG浓度/(mmol/L)	HbA1c相对含量/%
CK(0)组	1.41±0.29 ^{##▲▲}	1.56±0.15 ^{##▲▲}	9.41±0.13 ^{##▲▲}	5.65±0.79 ^{##▲▲}
模型组	10.61±0.27 ^{*#▲▲▲▲}	3.92±0.29 ^{*#▲▲▲▲}	15.27±0.82 ^{*#▲▲▲▲}	14.96±0.81 ^{*#▲▲▲▲}
PL组	1.78±0.05 ^{c▲▲▲}	0.73±0.22 ^{*#▲▲}	3.42±0.29 ^{*#▲▲}	6.49±0.77 ^{*#▲▲}
OL组	3.24±0.05 ^{c*#▲▲▲}	2.02±0.5 ^{*#▲▲}	8.45±0.24 ^{*#▲▲}	10.98±0.96 ^{*#▲▲}
HOHT组	2.14±0.09 ^{*#▲▲▲}	1.49±0.18 ^{0#▲}	7.83±0.14 ^{*#▲▲}	7.84±0.98 ^{*#▲▲}
MOHT组	4.23±0.12 ^{*#▲▲▲▲}	2.48±0.59 ^{*#▲▲}	8.08±0.34 ^{*#▲▲}	9.37±0.59 ^{*#▲▲}
LOHT组	5.52±0.22 ^{*#▲▲▲▲}	2.62±0.38 ^{*#▲▲}	10.39±0.19 ^{##▲▲▲}	12.95±0.87 ^{*#▲▲▲}

注: 与CK组相比, * . 差异显著 ($P < 0.05$); ** . 差异极显著 ($P < 0.01$)。与模型组相比, # . 差异显著 ($P < 0.05$); ## . 差异极显著 ($P < 0.01$)。与PL组相比, Δ . 差异显著 ($P < 0.05$); ΔΔ . 差异极显著 ($P < 0.01$)。与OL组相比, ▲ . 差异显著 ($P < 0.05$); ▲▲ . 差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

2.2 OHT对高血脂小鼠脂蛋白、胆红素和胆汁酸的影响

如表2所示, 给药28 d后, 与CK(0)组相比, 高血脂模型组小鼠血清中HDL、TBIL和TBA的浓度极显著升高 ($P < 0.01$), LDL浓度极显著降低 ($P < 0.01$); 与高血脂模型组小鼠相比, PL、OL、HOHT组小鼠血清中HDL、TBIL和TBA的浓度显著或极显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), LDL浓度显著或极显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与HOLT组相比, PL组小鼠血清以上指标更接近CK(0)组, 说明HOLT处理与PL处理相比恢复血脂能力稍弱。随OHT剂量的增加, 各OHT处理组恢复小鼠血清中HDL、LDL、TBIL和TBA浓度的能力逐渐增加, 说明OHT恢复小鼠血脂指标的能力具有剂量效应关系。

表2 OHT对高血脂小鼠HDL、LDL、TBIL和TBA浓度的影响

Table 2 Effect of OHT on HDL, LDL, TBIL and TBA concentrations in hyperlipemic mice

组别	LDL浓度/(mmol/L)	HDL浓度/(mmol/L)	TBIL浓度/(μmol/L)	TBA浓度/(μmol/L)
CK(0)组	0.49±0.09 ^{##▲▲}	0.58±0.12 ^{##▲▲}	4.41±0.49 ^{##▲▲▲}	9.58±0.95 ^{##▲▲▲}
模型组	0.95±0.25 ^{*#▲▲▲▲}	0.33±0.18 ^{*#▲▲}	17.39±1.85 ^{*#▲▲▲}	27.92±2.21 ^{*#▲▲▲}
PL组	0.56±0.23 ^{*#▲}	0.51±0.11 ^{##}	8.65±0.64 ^{*#▲▲}	14.73±0.22 ^{*#▲▲}
OL组	0.79±0.05 ^{*#▲▲▲}	0.38±0.05 ^{*#▲▲}	14.87±0.85 ^{*#▲▲}	21.87±2.53 ^{*#▲▲}
HOHT组	0.63±0.16 ^{*#▲▲}	0.47±0.03 ^{*#▲▲}	10.29±0.69 ^{*#▲▲}	16.21±1.18 ^{*#▲▲}
MOHT组	0.71±0.05 ^{*#▲▲▲}	0.39±0.12 ^{*#▲▲}	14.23±1.12 ^{*#▲▲}	20.47±1.28 ^{*#▲▲}
LOHT组	0.82±0.22 ^{*#▲▲}	0.35±0.16 ^{*#▲▲}	16.52±0.22 ^{*#▲▲}	25.69±2.38 ^{*#▲▲}

2.3 OHT对高血脂小鼠血清中4种关键酶的影响

由表3可知, 给药28 d后, 高血脂模型小鼠血清

中ALT、AST、GGT和ALP活力极显著高于其他6组 ($P < 0.01$); HOHT组小鼠血清中ALT、AST、GGT和ALP活力极显著低于OL组 ($P < 0.01$), 与PL组相比对高血脂小鼠4种关键酶的活力降低能力较弱。与模型组相比, HOHT组在灌胃给药28 d后小鼠血清中4种关键酶的活力虽然极显著降低 ($P < 0.01$), 但仍然极显著高于CK(0)组 ($P < 0.01$)。随OHT剂量的增加, 其降低高血脂小鼠血清中4种关键酶活力的能力逐渐增强, 说明OHT降低高血脂小鼠血清4种关键酶活力具有剂量效应关系。以上结果说明OHT对高血脂小鼠的4种关键酶具有很好的抑制作用, 但作用效果比较温和。

表3 OHT对高血脂小鼠4种关键酶活力的影响

Table 3 Effect of OHT on four key enzyme activities in hyperlipemic mice

组别	ALT活力/(U/mL)	AST活力/(U/mL)	GGT活力/(U/mL)	ALP活力/(U/mL)
CK(0)组	89.65±2.29 ^{##▲▲▲}	76.69±3.15 ^{##▲▲▲}	5.41±1.32 ^{##▲▲▲}	156.23±3.15 ^{##▲▲▲}
模型组	265.61±3.27 ^{*#▲▲▲▲}	392.36±3.29 ^{*#▲▲▲▲}	19.61±1.37 ^{*#▲▲▲}	392.29±3.29 ^{*#▲▲▲}
PL组	168.85±2.95 ^{*#▲▲▲}	129.28±4.22 ^{*#▲▲}	6.68±0.55 ^{*#▲▲}	213.89±2.22 ^{*#▲▲}
OL组	224.25±2.84 ^{*#▲▲}	263.64±3.53 ^{*#▲▲}	12.24±3.65 ^{*#▲▲}	272.65±0.53 ^{*#▲▲}
HOHT组	176.63±3.19 ^{*#▲▲▲}	149.69±3.18 ^{*#▲▲▲}	9.14±2.09 ^{*#▲▲▲}	249.36±2.18 ^{*#▲▲▲}
MOHT组	213.56±3.12 ^{*#▲▲▲}	248.61±2.59 ^{*#▲▲}	11.93±2.12 ^{*#▲▲}	268.36±2.59 ^{*#▲▲}
LOHT组	239.23±4.22 ^{*#▲▲}	332.97±3.38 ^{*#▲▲}	15.52±3.22 ^{*#▲▲}	362.32±3.38 ^{*#▲▲}

2.4 OHT对高血脂小鼠体质量与脏器指数的影响

如表4所示, 在脂肪乳剂和75%的蛋黄乳诱导高血脂小鼠模型成功后, 模型组小鼠与CK(0)小鼠相比饮水和进食明显增加, 活动量减少, 体质量极显著增加 ($P < 0.01$)。在给药过程中, HOHT、MOHT、LOHT组小鼠体质量整体上逐渐增加, 但与模型组相比增加缓慢, 小鼠活动与精神状态逐渐好转, HOHT组与PL组相比小鼠体质量无显著差异 ($P > 0.05$), 且低于OL组。随着OHT剂量的增加, 其降低高血脂小鼠体质量的作用也逐渐增强, 说明OHT降低高血脂小鼠体质量的作用具有剂量效应关系。结果表明OHT可有效控制高血脂小鼠的体质量。如表5所示, 高血脂模型小鼠心脏、脑、肝、肾、脾等重要脏器指数与其他各组相比均无显著差异 ($P > 0.05$), 这说明用脂肪乳剂和75%的蛋黄乳诱导构建高血脂小鼠模型的方法稳定可靠。

表4 OHT对高血脂小鼠体质量的影响

Table 4 Effect of OHT on body mass of hyperlipemic mice

组别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
CK(0)组	31.37±0.27 ^{##}	34.45±0.14 ^{##▲}	37.65±0.34 ^{##▲}	45.21±0.19 ^{##▲}	49.27±0.79 ^{##▲}
模型组	35.39±0.89 ^{**}	44.28±0.33 ^{*#▲▲}	48.21±0.80 ^{*#▲▲}	58.42±0.27 ^{*#▲▲}	62.59±0.39 ^{*#▲▲}
PL组	35.63±0.85 ^{**}	34.38±0.65 ^{##▲}	38.98±0.55 ^{##▲}	48.19±0.27 ^{##▲}	51.15±0.41 ^{##▲}
OL组	35.55±0.25 ^{**}	40.20±0.15 ^{*#▲▲}	43.37±0.71 ^{*#▲▲}	53.47±0.33 ^{*#▲▲}	57.33±0.79 ^{*#▲▲}
HOHT组	35.28±0.35 ^{**}	35.88±0.27 ^{##}	37.23±0.47 ^{##}	46.07±0.65 ^{##▲}	51.47±0.85 ^{##▲}
MOHT组	35.59±2.73 ^{**}	36.12±0.19 ^{##▲}	40.19±0.79 ^{##▲}	51.51±0.79 ^{##▲}	55.59±0.93 ^{##▲}
LOHT组	35.47±3.88 ^{**}	42.02±0.11 ^{*#▲▲}	46.09±0.81 ^{*#▲▲}	55.42±0.45 ^{*#▲▲}	59.15±0.83 ^{*#▲▲}

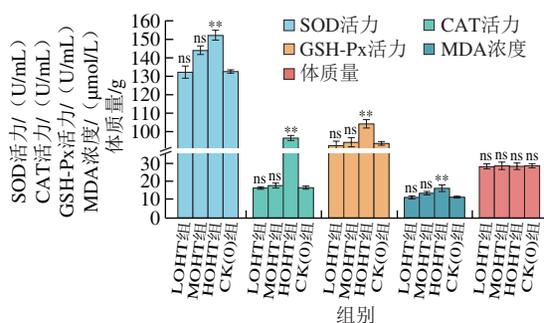
表5 OHT对高脂小鼠重要脏器指数的影响

Table 5 Effect of OHT on major organ coefficients of hyperlipemic mice

组别	心脏指数/%	脑指数/%	肝指数/%	肾指数/%	脾指数/%
CK(0)组	0.518±0.008	1.085±0.061	5.985±0.090	1.391±0.068	0.255±0.016
模型组	0.517±0.021	1.091±0.014	5.994±0.021	1.392±0.059	0.256±0.001
PL组	0.519±0.022	1.080±0.012	5.991±0.120	1.387±0.023	0.258±0.013
OL组	0.519±0.007	1.091±0.028	5.973±0.020	1.388±0.018	0.255±0.004
HOHT组	0.518±0.015	1.088±0.018	5.976±0.130	1.389±0.048	0.257±0.023
MOHT组	0.518±0.025	1.090±0.016	5.997±0.026	1.386±0.020	0.259±0.010
LOHT组	0.519±0.025	1.080±0.020	5.991±0.012	1.385±0.023	0.258±0.003

2.5 小鼠OHT急性毒理实验结果

小鼠口服(灌胃)急性毒性实验中,一次性灌服OHT剂量分别为20 000、25 000 mg/kg m_b 和30 000 mg/kg m_b ,给药后依据叶文斌等^[24]的方法笼边观察7 d,发现给药后各组小鼠外观毛色光亮,无窜动跳跃、竖毛扭体等异常反应现象,小鼠活动自如,摄食、进水、大小便正常,未出现死亡,半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)未检出,根据毒理学评价标准,LD₅₀>10 000 mg/kg m_b 属于无毒物质^[24-25],本研究中一次性灌服OHT的最大剂量为30 000 mg/kg m_b ,结果说明OHT对小鼠无急性毒性。如图1所示,各组小鼠体质量无显著差异($P>0.05$)。对小鼠进行颈椎脱臼处死,进行重要脏器病理检查,均未观察到明显病理变化。对于SOD、CAT、GSH-Px活力及MDA浓度,HOHT组与CK(0)组有显著性差异($P<0.05$ 、 $P<0.01$),MOHT组、LOHT组与CK(0)组相比均无显著性差异($P>0.05$)。



与CK(0)组比较,*差异显著($P<0.05$);**差异极显著($P<0.01$);ns,无显著差异($P>0.05$)。

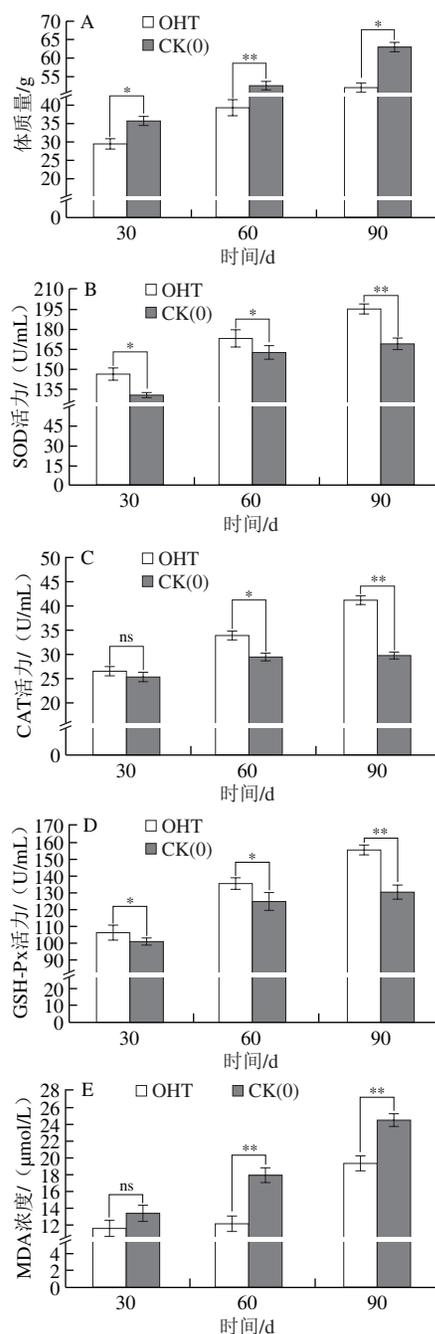
图1 OHT对小鼠急性毒理生理指标的影响

Fig. 1 Effect of OHT on acute toxicological physiological indexes in mice

2.6 小鼠OHT慢性毒理实验结果

OHT对小鼠口服(灌胃)慢性毒理实验中,连续灌胃90 d后小鼠外观毛色正常,无异常反应,摄食、进水、大小便等均无明显异常,小鼠活动自如。在灌胃过程中,小鼠重要脏器均无明显病理变化。由图2可知,2组小鼠体质量均随时间的延长而增长,但CK(0)组小鼠体质量均显著或极显著高于OHT组($P<0.05$ 、 $P<0.01$),说明OHT具有降低体质量的功效。随时间延长,2组小鼠血清中SOD、CAT和GSH-Px的活力均升高,且CK(0)组小鼠血清中以上指标均高于OHT组,其中

在60 d时两组差异显著($P<0.05$),90 d时差异极显著($P<0.01$),说明OHT具有提高小鼠血清中SOD、CAT和GSH-Px活力的功能,能够提高小鼠的抗氧化能力。随着时间的延长,2组小鼠血清中的MDA浓度均升高,CK(0)组小鼠体内血清中的MDA浓度高于OHT组,30 d时两组MDA浓度无显著性差异($P>0.05$),60、90 d时差异极显著($P<0.01$),说明OHT具有降低小鼠体内血清中MDA浓度的作用。综上,OHT属于慢性无毒物质,而且具有一定的降低体质量、提高抗氧化能力的功效。



A.体质量; B. SOD活力; C. CAT活力; D. GSH-Px活力; E. MDA浓度。*差异显著($P<0.05$);**差异极显著($P<0.01$);ns,差异不显著($P>0.05$)。

图2 OHT对小鼠慢性毒理生理指标的影响

Fig. 2 Effect of OHT on chronic toxicological physiological indexes in mice

3 讨论

高血脂主要是由脂代谢紊乱引起, 会引发高血糖和高血压, 还可导致脂肪肝、心血管疾病、冠心病、胰腺炎及动脉粥样硬化等疾病, 是对人体生命健康产生威胁的主要原因之一^[26], 降脂药物主要包括他汀和贝特类, 长期口服具有肝损害等不良反应^[23]。而橄榄油具有很好的预防心脑血管疾病作用, 尤其在改善心血管风险因子如血脂、血糖代谢、内皮功能和炎症反应方面具有很好的效果^[7-15], 有关羟基酪醇的生物功能研究很多^[17-22], 但是有关OHT对高血脂小鼠的血糖血脂代谢影响的报道较少。高血脂是以TC、TG、LDL浓度升高, HDL浓度降低为主要临床特征的一类疾病^[27], 本研究发现, OHT能降低高血脂小鼠的TC、TG、LDL水平, 提高HDL水平, 对高血脂小鼠的代谢紊乱有较好的调节与治疗作用, 其中HOHT作用显著。

BIL和TBA浓度的升高是临床上判断肝胆功能异常和肝细胞病变的重要现象, TBIL是亚铁血红素的分解终产物, 绝大多数来源于红细胞血红蛋白的分解^[28], 其异常会引发胆红素代谢障碍性肝病, 影响肝细胞对胆红素的摄取、运输、酯化及排泄等过程^[29], 过多的胆红素还会扩散进入组织、大部分内脏器官和体液, 引发Dubin-Johnson综合征、Rotor综合征、Gilbert综合征和Crigler-Najjar综合征^[29-31]。TBA由肝脏产生后进入肠道, 作为激活法尼醇X受体(farnesoid X receptor, FXR)和G蛋白偶联胆汁酸受体5(the G-protein-coupled bile acid receptor-5, TGR5)的信号分子可影响肠道激素的合成与分泌, 并参与葡萄糖代谢的调节, TBA异常会加剧动物的糖脂代谢紊乱^[32-33], 本研究发现, OHT能降低高血脂小鼠的TBIL和TBA浓度, 降低糖脂代谢紊乱, 且HOLT作用效果显著。

高血脂模型小鼠血清中的ALT和AST活力水平与脂肪在肝脏表面堆积有关, 高脂影响了肝细胞的正常代谢、导致肝细胞损害, 是反映肝脏损伤程度的敏感指标^[34], 本研究表明在OHT灌胃治疗28 d后, 高血脂小鼠血清ALT和AST活力极显著降低, 这说明OHT可清除高血脂小鼠堆积在肝脏的脂肪, 减轻其对肝脏的损伤。GGT是 γ -谷氨酰循环的关键酶, 既能够分解谷胱甘肽及其S结合物, 又能够促进细胞内谷胱甘肽的重新合成, GGT还能氧化谷胱甘肽产生一系列自由基, 诱导脂质过氧化和氧化损伤, 促进细胞病变^[35]。ALP是在人与动物组织中广泛表达的一种胞外核苷酸酶, 其水平是用于诊断肝癌、肝硬化及其他肝胆系统疾病的重要指标, 与ALT、AST活力可共同反映肝细胞的受损程度^[36]。本研究中, 低、中、高剂量的OHT对高血脂小鼠的ALT、AST、GGT和ALP水平均具有极显著的抑制作用, 可降低肝细胞的脂质过氧化和氧化损伤, 对肝脏起到很好的保护作用。

SOD是细胞内负责清除超氧阴离子自由基的重要内源性抗氧化剂, 其活力是反映机体抗氧化能力的敏感指标^[23,37], H_2O_2 在细胞内大量存在时也会对细胞造成损伤, CAT可以将 H_2O_2 分解成氧和水, 降低细胞内的 H_2O_2 水平^[23,38]。GSH-Px可以清除由活性氧和自由基诱发的脂质过氧化物, 保护细胞膜结构和功能的完整性^[23,39], 过多的活性氧会导致脂质过氧化产生MDA, 因此MDA浓度可以直接反映机体脂质过氧化和组织过氧化损伤程度^[23,40-41]。对正常小鼠进行急慢性毒理学分析发现, OHT能提升小鼠血清中的SOD、CAT和GSH-Px的活力, 降低MDA水平, 证明OHT可以通过调节氧化酶活力和降低脂质过氧化, 进而维持氧化和抗氧化之间的平衡, 改善小鼠肝组织的氧化损伤程度, 且具有一定的控制体质量的作用。

与CK(0)组相比, 高血脂模型小鼠血清的FBG、TC、TG、LDL、TBIL、TBA浓度, HbA1c相对含量, ALT、AST、GGT、ALP活力极显著增加, HDL浓度极显著降低, 经过28 d的HOHT、MOHT和LOHT灌胃治疗, 小鼠血清中以上指标得到不同程度恢复, 其中HOHT的效果最显著, 其以上作用效果不如PL治疗组, 但却强于OL组。在小鼠急慢性毒理研究中一次性灌服OHT最大剂量为30 000 mg/kg m_b , 远远大于毒理学评价标准, 说明OHT对小鼠属于急性无毒物质; 在小鼠慢性毒理研究中, 连续灌胃OHT 90 d后进行重要脏器病理检查, 均无明显病理变化, 且OHT能提高小鼠血清中SOD、CAT和GSH-Px活力, 降低MDA浓度, 提高小鼠的抗氧化能力和降低体质量, 所以OHT对小鼠属于慢性无毒物质。虽然OHT的降血糖血脂作用不如口服降血脂药物菲勒贝特强烈, 但其作用比较温和、无副作用, 是具有很好辅助治疗作用的橄榄油保健食品。

参考文献:

- [1] 钟诚, 薛雅琳, 王兴国, 等. 初榨橄榄油风味化合物研究进展[J]. 中国油脂, 2013, 38(8): 89-92. DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2013.08.024.
- [2] GRIGORIADOU D, ANDROULAKI A, PSOMIADOU E, et al. Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil[J]. Food Chemistry, 2007, 105(2): 675-680. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.12.065.
- [3] 王成章, 高彩霞, 姜成英, 等. 油橄榄的化学组成和加工利用[J]. 林业科技开发, 2006, 20(2): 1-4. DOI:10.3969/j.issn.1000-8101.2006.02.001.
- [4] 孔维宝, 张锋, 杨晓龙, 等. 油橄榄果渣油的提取工艺及其脂肪酸组成研究[J]. 中国油脂, 2011, 36(10): 12-15.
- [5] 张东, 薛雅琳, 朱琳, 等. 我国陇南地区初榨橄榄油多酚类化合物组成研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(4): 37-40. DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2016.04.009.
- [6] LUKI M, LUKI L, KRAPAC M, et al. Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening[J]. Food Chemistry, 2013, 163: 251-258. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.08.005.

- [7] 王安华, 龙国清, 王东东, 等. 油橄榄果渣中多酚提取及活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(5): 219-224. DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2021.05.037.
- [8] REZAEI S, AKHLAGH M, SASANI M R, et al. Olive oil lessened fatty liver severity independent of cardiometabolic correction in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial[J]. Nutrition, 2019, 57(1): 154-161. DOI:10.1016/j.nut.2018.02.021.
- [9] SÁNCHEZ F S, VILLEGAS I, APARICIO S M, et al. Effects of dietary virgin olive oil polyphenols: hydroxytyrosyl acetate and 3,4-dihydroxyphenylglycol on DSS-induced acute colitis in mice[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2015, 26(5): 513-520. DOI:10.1016/j.jnutbio.2014.12.001.
- [10] INCANI A, SERRA G, ATZERI A, et al. Extra virgin olive oil phenolic extracts counteract the pro-oxidant effect of dietary oxidized lipids in human intestinal cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2016, 90: 171-180. DOI:10.1016/j.fct.2016.02.015.
- [11] ALONSO R G, MARTINEZ M A. Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experiment evidence[J]. Public Health Nutrition, 2006, 9(2): 251-257. DOI:10.1079/PHN2005856.
- [12] ESTRUCH R, ROS E, SALAS S J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet[J]. The New England Journal of Medicine, 2013, 368(12): 79-90. DOI:10.1056/NEJMoa1800389.
- [13] NOTARNICOLA M, PISANTI S, TUTINO V, et al. Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells[J]. Genes Nutrition, 2011, 6(1): 63-69. DOI:10.1007/s12263-010-0177-7.
- [14] 郑恒光, 翁敏劼, 汤葆莎, 等. 橄榄油保健和疾病预防功效研究进展[J]. 食品科技, 2019, 44(10): 196-199. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2019.10.033.
- [15] HERNÁEZ A, CASTAÑER O, ELOSUA R, et al. Mediterranean diet improves high-density lipoprotein function in high-cardiovascular-risk individuals a randomized controlled trial[J]. Circulation, 2017, 135(7): 633-643.
- [16] ROBLES A M, PULIDO M M, MORENO F. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications[J]. Food Research International, 2018, 105: 654-667. DOI:10.1016/j.foodres.2017.11.053.
- [17] 唐娟, 刘琳, 李承蔓, 等. 羟基酪醇的药理作用和药代动力学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 241-250. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20210317.
- [18] 原姣姣, 叶建中, 王成章, 等. 油橄榄羟基酪醇的生物合成及其衍生物研究进展[J]. 林产化学与工业, 2015, 35(2): 154-162. DOI:10.3969/j.issn.0253-2417.2015.02.024.
- [19] 岳慧娟, 杨述祯, 殷程程, 等. 橄榄油中羟基酪醇的研究进展[J]. 食品工业, 2019, 40(12): 260-264.
- [20] 李楠, 李瑞婷, 赵兴文, 等. 滇橄榄叶羟基酪醇对CS₂致小鼠睾丸组织损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(17): 410-416. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2021120020.
- [21] JEZIEŃSKA D A, ROSENZWEIG S A, NEUMANN C A. Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression[J]. Advances in Cancer Research, 2013, 119: 107-125. DOI:10.1016/B978-0-12-405205-5.00001-5.
- [22] VERA R L, SANCHEZ R P, RAMIREZ M C, et al. Oxidative stress status in metastatic breast cancer patients receiving palliative chemotherapy and its impact on survival rates[J]. Free Radical Research, 2012, 46(1): 2-10. DOI:10.3109/10715762.2011.635658.
- [23] 郝艳丽, 赵峻秀, 陈响, 等. 没食子酸对高脂血症小鼠的保护作用[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(2): 79-83.
- [24] 叶文斌, 樊亮. 纹党多糖对四氧嘧啶诱导糖尿病大鼠血糖血脂的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 359-363. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.20.065.
- [25] 王静, 蒋万, 何生虎, 等. 自制中药复方片剂对小鼠的急性毒性实验[J]. 动物医学进展, 2015, 36(2): 120-124. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2015.02.030.
- [26] 马全鑫, 陈姣姣, 郁晨, 等. 一种新型高脂血症易感大鼠的血脂水平与心血管并发症[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 25-31. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.01.005.
- [27] 李想, 董文婷, 张旭, 等. 玉米须对高脂血症大鼠肝组织保护作用研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 84-90. DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2021.04.011.
- [28] 吕金龙. 血清总胆汁酸、白蛋白、胆碱酯酶水平变化与肝类肝硬化患者Child-Pugh分级的关联性[J]. 实用中西医结合临床, 2021, 21(15): 113-114. DOI:10.13638/j.issn.1671-4040.2021.15.056.
- [29] MEMON N, WEINBERGER B I, HEGYI T, et al. Inherited disorders of bilirubin clearance[J]. Pediatric Research, 2016, 79(3): 378-386. DOI:10.1038/pr.2015.247.
- [30] CREEDEN J F, GORDON D M, STEC D E, et al. Bilirubin as a metabolic hormone: the physiological relevance of low levels[J]. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2021, 320(2): E191-E207. DOI:10.1152/ajpendo.00405.2020.
- [31] 宋焱, 贾思雨, 武丽娜, 等. 遗传性胆红素代谢障碍与胆汁淤积NGS方法的建立及应用[J]. 生物技术进展, 2022, 12(4): 591-599. DOI:10.19586/j.2095-2341.2022.0128.
- [32] 贾敏杰, 冯波. 胆汁酸代谢与2型糖尿病的研究进展[J]. 同济大学学报(医学版), 2019, 40(5): 644-649. DOI:10.16118/j.1008-0392.2019.05.021.
- [33] 张娟, 邓泽元, 吴信. 胆汁酸对代谢性疾病的调控[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(4): 399-403. DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2019.04.08.
- [34] Liu Zhengtao, Que Shuping, Xujing, et al. Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review[J]. International Journal of Medical Sciences, 2014, 11(9): 925-935. DOI:10.7150/ijms.8951.
- [35] 黎灵锋, 韦慧萍, 刘桂荣, 等. 门冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶与γ谷氨酰基转移酶在肝硬化患者中的变化及临床意义[J]. 中国当代医药, 2022, 29(6): 110-113. DOI:10.3969/j.issn.1674-4721.2022.06.031.
- [36] 欧志强. 碱性磷酸酶(ALP)在妊娠晚期的监测和变化分析[J]. 医学检验与临床, 2017, 28(8): 43-44. DOI:10.3969/j.issn.1673-5013.2017.08.013.
- [37] OWOJUYIGBE O S, LARBIE C, FIREMPONG C K, et al. *Hura crepitans* stem bark extract: a potential remedy to sub-acute liver damage[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 284: 114768. DOI:10.1016/j.jep.2021.114768.
- [38] 毕司英, 齐涛, 顾甜甜, 等. 过氧化氢酶作为新型抗氧化剂的应用及研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 2021, 42(12): 56-59. DOI:10.3969/j.issn.1007-1733.2021.12.019.
- [39] HUANG D, LI C, CHEN Q, et al. Identification of polyphenols from *Rosa roxburghii* Tratt pomace and evaluation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2022, 377: 131922. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131922.
- [40] LI C X, SHEN L R. New observations on the effect of camellia oil on fatty liver disease in rats[J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2020, 21(8): 657-667. DOI:10.1631/jzus.B2000101.
- [41] 叶文斌, 何玉鹏, 宫嵘嵘, 等. 纹党和红芪加工废弃物活性多糖对衰老小鼠的抗氧化作用[J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47(6): 887-893. DOI:10.13610/j.cnki.1672-352x.20210112.022.