

油脂营养

初榨葡萄籽油对高脂膳食诱导的小鼠肥胖和糖脂代谢调节作用

朱建鸿¹, 张 晖¹, 肖俊勇², 丛仁怀², 钱海峰¹, 王 立¹, 齐希光¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 无限极(中国)有限公司, 广州 510000)

摘要:采用气相色谱(GC)测定玉米油(CO)、初榨葡萄籽油(GSO)和猪油(Lard)的脂肪酸组成, 高效液相色谱(HPLC)法和Folin-Ciocalteu比色法测定CO和GSO的 V_E 和多酚含量。48只C57BL/6J小鼠随机分为4组, 即正常对照组(ND)、45%高脂玉米油组(CO45%)、45%高脂初榨葡萄籽油组(GSO45%)和45%高脂猪油组(Lard45%), 每周测定小鼠体重, 高脂饲料干预小鼠在12周和14周分别测定小鼠的糖耐量(GTT)和胰岛素耐量(ITT), 小鼠处死后测定小鼠血清的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、游离脂肪酸(FFA)以及肝组织白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)炎症因子水平。结果表明:CO、GSO和Lard中多不饱和脂肪酸含量分别为58.70%、74.15%和13.76%;CO中 V_E 含量为254.06 mg/kg, 以 α -生育酚和 γ -生育酚为主, GSO中 V_E 含量为697.42 mg/kg, 以 α -生育酚, α -生育三烯酚和 γ -生育三烯酚为主;GSO中多酚含量为43.813 mg/kg, CO中的多酚未检出;与CO45%、Lard45%组相比, GSO45%组小鼠体重净增长、血清中的LDL、FFA水平、肝组织的IL-6和TNF- α 炎症因子水平均显著降低($p < 0.05$);与Lard45%组相比, GSO45%组小鼠血清中的TC、TG显著降低($p < 0.05$), 但各组小鼠之间血清的HDL水平无显著性的差异($p > 0.05$);与CO45%、Lard45%组相比, GSO45%组小鼠均显示更好的糖耐量和胰岛素耐量, 胰岛素敏感性提高。

关键词:初榨葡萄籽油; 多不饱和脂肪酸; V_E ; 多酚; 高脂膳食; 炎症因子; 胰岛素敏感性

中图分类号:TS225; TS201.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)08-0068-08

Effect of virgin grape seed oil on obesity and glycolipid metabolism in mice induced by high fat diet

ZHU Jianhong¹, ZHANG Hui¹, XIAO Junyong², CONG Renhui², QIAN Haifeng¹, WANG Li¹, QI Xiguang¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. INFINITUS(China) Co., Ltd., Guangzhou 510000, China)

Abstract: The fatty acid compositions of corn oil(CO), virgin grape seed oil(GSO) and lard(Lard) were determined by gas chromatography(GC). The contents of V_E and polyphenols in CO and GSO were determined by high performance liquid chromatography(HPLC) and Folin-Ciocalteu. Forty-eight C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: normal control group(ND), 45% high fat corn oil group(CO45%), 45% high fat virgin grape seed oil group(GSO45%) and 45% high fat lard group(Lard45%). The body weights of mice were measured every week. The glucose tolerance(GTT) and insulin tolerance(ITT) of mice were measured in the 12th week and the 14th week respectively. The serum levels of total cholesterol(TC), triglyceride(TG), high density lipoprotein(HDL), low density lipoprotein(LDL), free fatty acid(FFA), liver levels of interleukin-6(IL-6) and

收稿日期:2017-12-19; 修回日期:2018-04-23

作者简介:朱建鸿(1992),男,硕士研究生,主要从事粮食与油脂功能性食品的研究(E-mail)1746960198@qq.com。

通信作者:张 晖,教授,博士(E-mail)zhanghui@jiangnan.edu.cn。

and insulin tolerance(ITT) of mice were measured in the 12th week and the 14th week respectively. The serum levels of total cholesterol(TC), triglyceride(TG), high density lipoprotein(HDL), low density lipoprotein(LDL), free fatty acid(FFA), liver levels of interleukin-6(IL-6) and

tumor necrosis factor- α (TNF- α) inflammatory factors were measured after mice were sacrificed. The results showed that the content of polyunsaturated fatty acids in CO, GSO and Lard were 58.70%, 74.15% and 13.76% respectively. The content of V_E in CO was 254.06 mg/kg, which was mainly α -tocopherol and γ -tocopherol. The content of V_E in GSO was 697.42 mg/kg, which was α -tocopherol, α -tocotrienol and γ -tocotrienol. Polyphenol content in GSO was 43.813 mg/kg, however, the polyphenols in CO were not detected. Animal experiments showed that compared with CO45% and Lard45%, the net body weight of mice, the serum levels of LDL and FFA, the liver levels of IL-6 and TNF- α inflammatory factors in GSO45% decreased significantly($p < 0.05$). Compared with Lard45%, the serum levels of TC and TG in GSO45% decreased significantly($p < 0.05$). However, there was no significant difference in serum level of HDL among different groups($p > 0.05$). Compared with CO45% and Lard45%, GSO45% showed better glucose tolerance and insulin resistance, which could improve insulin sensitivity.

Key words: virgin grape seed oil; polyunsaturated fatty acid; V_E ; polyphenols; high fat diet; inflammatory factor; insulin sensitivity

随着经济发展和生活水平提高,人们的饮食结构和生活方式发生了改变,肥胖症成为危害人们健康的主要杀手之一,肥胖通常与过量的内脏脂肪组织和低度炎症状态有关^[1]。过量的脂肪摄入增加体内血浆内毒素的浓度,容易引起代谢性疾病如胰岛抵抗和非胰岛素依赖型糖尿病^[2]。目前,人们已经开发了一系列治疗肥胖相关的 II 型糖尿病的药物疗法,但这些药物往往都有一定副作用,易产生耐药性以及对于并发症没有治疗效果^[3]。相比于药物治疗和整形手术方法,天然药用植物通常含有多种有效活性成分,如黄酮、皂甙、生物碱、多糖和不饱和脂肪酸等,可以安全有效地改善胰岛素敏感性、减轻肥胖及肥胖相关疾病的产生^[4]。

我国每年生产的葡萄为 140 万 t,其中 80% 用于酿酒,每年生产数以万计的葡萄废弃物,这些葡萄废弃物主要包括葡萄皮渣、籽、梗等,富含以植物多酚为主的生物活性物质,具有很大的开发和利用价值^[5]。其中,葡萄籽的活性成分最为丰富,研究表明葡萄籽提取物中的原花青素具有抗氧化、抗辐射、预防白内障、降血糖、调控人体抗氧化酶系统的作用,成为人们研究的热点^[6]。初榨葡萄籽油是葡萄籽通过物理压榨得到的食用植物油,其不饱和脂肪酸含量高达 90% 左右,其中主要是多不饱和脂肪酸,同时还富含 V_E (生育酚和生育三烯酚)、植物甾醇、角鲨烯和多酚等功能活性物质^[7]。研究表明初榨葡萄籽油具有显著地降血脂^[8]、抗氧化^[9]等功能,然而关于初榨葡萄籽油的减肥和改善胰岛抵抗及其机理研究甚少。因此,本文研究初榨葡萄籽油对高脂饲料诱导小鼠肥胖和糖脂代谢调节作用及

其机理,以期为进一步加大葡萄籽资源的综合应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

初榨葡萄籽油,由河北晨光生物科技有限公司提供;玉米油、猪油,购自无锡市欧尚蠡湖超市;37 种脂肪酸甲酯混标,购自美国 Supelco 公司; α -、 γ -、 δ -生育酚和 α -、 γ -、 δ -生育三烯酚标准品,购自美国 Sigma-Aldrich 公司;血糖仪、血糖试纸,购自罗氏诊断产品(上海)有限公司;来得时甘精胰岛素注射液,购自无锡市中医院;TC、TG、HDL、LDL 生化试剂盒以及 IL-6 和 TNF- α 酶联免疫检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。无水乙醇、氢氧化钾、抗坏血酸、正己烷、没食子酸等,分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司,正己烷、无水甲醇等,色谱纯,购自百灵威有限公司。

1.1.2 仪器与设备

GC-2014 气相色谱仪,日本岛津公司;PEG-20M 毛细管柱(30 m \times 0.32 mm,0.25 μ m),北京泰克美科技有限公司;高效液相色谱仪,美国安捷伦有限公司;酶标仪,美国 Biotek 公司;旋转蒸发仪,瑞士 Buchi 公司;Forma 900 系列超低温冰箱,美国 Thermo 公司。

1.1.3 试验动物和饲料配方

5 周龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 48 只,购于上海斯莱克实验动物有限公司。正常对照组饲料配方参照美国营养学会推荐的 AIN-93G^[10] 试验动物饲料配方配制而成,高脂饲料配方参照 D12451^[11] 配制而成,分别用玉米油、初榨葡萄籽油和猪油替换

D12451 饲料配方中的动植物油,得到相应的 CO45%、GSO45% 和 Lard45% 组的高脂饲料。

1.2 试验方法

1.2.1 玉米油、初榨葡萄籽油和猪油脂肪酸组成测定

1.2.1.1 脂肪酸甲酯化

参照王超群^[12]的方法,准确称取玉米油、初榨葡萄籽油和猪油各 30 mg,加入 0.5 mol/L NaOH - CH₃OH 溶液 2 mL,振荡均匀,65℃水浴加热至油样完全溶解,静置冷却,加入 25% 的 BF₃ - CH₃OH 溶液 2 mL,振荡,在 65℃水浴条件下酯化 20 min,静置冷却,加入 1.9 mL 正己烷,充分振荡后加入 2 mL 饱和 NaCl 溶液,然后以 3 000 r/min 离心 15 min,取上层有机相于干燥样品瓶中,加入少量无水 Na₂SO₄ 除去少量的水,-4℃条件下保存,供气相色谱分析使用。

1.2.1.2 气相色谱分析条件

PEG-20M 毛细管柱(30 m × 0.32 mm, 0.25 μm);载气:纯度为 99.999% 的 N₂;吹扫流量 3 mL/min;进样量 1 μL;分流比 100:1;进样口温度 250℃;升温程序:初始温度 80℃,保持 3 min,以 15℃/min 升温至 215℃后恒温保持 16 min。

1.2.1.3 脂肪酸的定性和定量分析

以 37 种脂肪酸甲酯标准品在气相色谱图中的保留时间为对照,定性分析样品中的脂肪酸组成,根据峰面积归一化法计算样品中不同脂肪酸的相对含量。

1.2.2 玉米油和初榨葡萄籽油 V_E 和多酚含量测定

1.2.2.1 玉米油和初榨葡萄籽油 V_E 含量的测定

样品皂化处理参照 NY/T 1598—2008,采用反相 HPLC 法测定玉米油和初榨葡萄籽油中 V_E 组分和含量。V_E 各标准品的线性方程和回归系数如表 1 所示。

表 1 V_E 各标准品的线性方程和回归系数

V _E	线性方程	回归系数 R ²
α-生育酚	$y = 7.559 3x + 34.193$	0.999 4
γ-生育酚	$y = 8.915 2x + 53.232$	0.999 3
δ-生育酚	$y = 7.080 9x - 1.987 9$	0.999 1
α-生育三烯酚	$y = 7.069 5x + 23.309 1$	0.999 5
γ-生育三烯酚	$y = 8.253 8x + 31.505 1$	0.999 4
δ-生育三烯酚	$y = 9.078 8x - 3.373 6$	0.997 9

1.2.2.2 玉米油和初榨葡萄籽油多酚含量的测定

参照 Lamuela - Raventós 等^[13]的测定方法,用无水甲醇 3 次萃取得到植物油中的多酚提取物,采用 Folin - Ciocalteu 比色法测定玉米油和初榨葡萄籽油多酚的含量。标准曲线制作,用 70% 的甲醇配制 100 μg/mL 的没食子酸标准溶液。将标准溶液

稀释成 10 ~ 80 μg/mL 的工作液,吸取不同质量浓度的工作液 1 mL 与福林酚反应。以 70% 甲醇作为空白对照,以吸光度对没食子酸质量浓度绘制标准曲线。

1.2.3 动物试验

48 只健康雄性 C57BL/6J 小鼠(16 g ± 2 g)用普通饲料先适应性饲养 5 d,然后根据小鼠体重将小鼠随机分成正常对照组(ND)、45% 高脂玉米油组(CO45%)、45% 高脂猪油对照组(Lard 45%)、45% 高脂葡萄籽油组(GSO45%)4 组,每组 12 只。饲养期间 ND 组小鼠给予 AIN-93G 普通饲料,CO45%、Lard45% 和 GSO45% 组小鼠给予等热量的高脂饲料,每组小鼠的喂食时间为早上 8:30 ~ 9:00,每天 1 次,自由饮食。

1.2.4 小鼠糖耐量(GTT)试验和胰岛素耐量(ITT)试验

在小鼠接受饲料干预 12 周时,对小鼠进行葡萄糖耐量试验。小鼠在隔夜禁食不禁水 16 h 后,测定小鼠极限空腹血糖作为 0 min 时空腹血糖,腹腔注射 1 g/kg^[14] 的葡萄糖溶液,用血糖仪测定小鼠在腹腔注射葡萄糖溶液后 30、60、90、120 min 时的尾静脉血糖。在小鼠接受饲料干预 14 周时,对小鼠进行胰岛素耐量试验。小鼠禁食 6 h,测定小鼠尾静脉空腹血糖,腹腔注射 0.5 U/kg^[15] 的胰岛素溶液,测定小鼠腹腔注射胰岛素后 30、60、90、120 min 时的尾静脉血糖。

1.2.5 生化指标测定

喂食 15 周后小鼠隔夜禁食 12 h,摘眼球采血,3 500 g 离心 10 min 后取血清,小鼠处死后迅速解剖取出肝脏,放冰冷生理盐水中洗净,用滤纸吸干后称重。取肝组织 100 mg 加入 9 倍量的生理盐水,冰浴匀浆后离心(4℃,12 000 g,10 min),取上清液,4℃冰箱保存。其余肝组织切成小块迅速用液氮冷冻,然后放 -80℃冰箱冻存备用^[16]。严格按照试剂盒说明书测定小鼠血清 TC、TG、HDL、LDL 以及肝组织 IL-6、TNF-α 炎症因子水平。

1.2.6 数据分析

所有试验结果以“平均值 ± 标准差”表示(n = 12),采用数据分析软件 SPSS23.0 进行单因素方差分析,两组均数间差异采用 t 检验,p < 0.05 认为差异具有统计学意义,采用 Graphpad prism7 软件作图。

2 结果与分析

2.1 玉米油、初榨葡萄籽油和猪油的脂肪酸组成(见表 2)

由表 2 可知,玉米油和初榨葡萄籽油含量最高

的均是亚油酸,其次为油酸和棕榈酸,而猪油中含量最高的是油酸,其次为棕榈酸和亚油酸。其中,初榨葡萄籽油中的多不饱和脂肪酸含量为74.15%,均高于玉米油和猪油中的58.70%和13.76%。

表2 玉米油、初榨葡萄籽油和猪油的脂肪酸组成 %

脂肪酸	CO	GSO	Lard
棕榈酸	12.30 ± 0.063	6.36 ± 0.042	24.49 ± 0.000
硬脂酸	1.42 ± 0.012	3.27 ± 0.013	11.99 ± 0.043
油酸	25.80 ± 0.045	15.38 ± 0.091	45.03 ± 0.013
亚油酸	58.70 ± 0.044	73.00 ± 0.053	13.10 ± 0.042
α-亚麻酸	-	1.15 ± 0.012	0.66 ± 0.001
饱和脂肪酸(SFA)	13.72 ± 0.019	9.63 ± 0.028	36.48 ± 0.013
不饱和脂肪酸(UFA)	84.50 ± 0.024	89.53 ± 0.064	58.79 ± 0.089
单不饱和脂肪酸(MUFA)	25.80 ± 0.042	15.38 ± 0.098	45.03 ± 0.023
多不饱和脂肪酸(PUFA)	58.70 ± 0.034	74.15 ± 0.068	13.76 ± 0.045

2.2 玉米油和初榨葡萄籽油 V_E 的含量(见表3)

V_E 共有8种组分,包括4种生育酚(α -、 β -、

表3 玉米油和初榨葡萄籽油 V_E 的含量

植物油	α -生育酚	(β + γ)-生育酚	δ -生育酚	α -生育三烯酚	γ -生育三烯酚	δ -生育三烯酚	V_E 总量
CO	89.33 ± 10.73	141.74 ± 11.67	4.47 ± 0.43	13.97 ± 0.66	4.55 ± 0.17	-	254.06 ± 12.64
GSO	103.21 ± 11.83	14.62 ± 3.55	1.79 ± 0.52	348.04 ± 17.69	216.83 ± 14.58	12.93 ± 2.07	697.42 ± 15.38

2.3 玉米油和初榨葡萄籽油多酚含量

在本法确定的试验条件下,得出没食子酸的线性回归方程为 $y = 0.009 6x + 0.028 7$, 相关系数 $R^2 = 0.999 3$ 。测得初榨葡萄籽油中的多酚含量为 (43.813 ± 1.724) mg/kg, 玉米油中的多酚未检出, 主要由于玉米油是市售精炼油, 精炼过程中多酚成分大部分被破坏。葡萄籽含有丰富的多酚化合物, 然而在压榨油提取过程中也只有少量的酚类物质转移到油中, 主要取决于葡萄籽油加工工艺以及葡萄籽的品种。研究表明初榨葡萄籽油的多酚主要是儿茶素、表儿茶素、反式白藜芦醇、类胡萝卜素和单宁等酚类化合物^[19]。

2.4 初榨葡萄籽油对高脂膳食诱导小鼠体重的影响

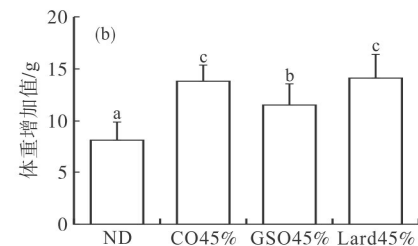
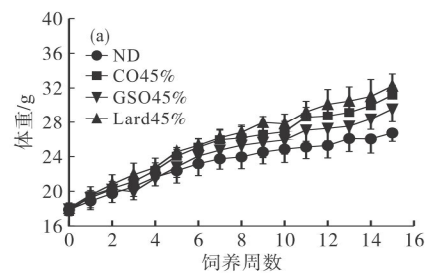
体重是衡量小鼠肥胖的最重要的指标, 从高脂饲料干预后每周固定时间称量小鼠体重, 记录小鼠体重增长情况, 结果如图1所示。

由图1a可知, 分组时各组小鼠体重无显著性差异 ($p > 0.05$), 由于ND组喂食脂肪含量较低的普通饲料, 体重增长比较平缓, 而高脂组小鼠体重增长速率明显比ND组快。从6周开始, 喂食初榨葡萄籽油组的小鼠体重增长速率显著低于CO45%和Lard45%组 ($p <$

γ -、 δ -生育酚)和4种生育三烯酚(α -、 β -、 γ -、 δ -生育三烯酚)。本文采用反相液相色谱法测定玉米油和初榨葡萄籽油 V_E 的含量, 相比正相液相色谱法, 不能把 β -生育酚和 γ -生育酚同时分开, 但玉米油和初榨葡萄籽油中的 β -生育酚含量很低, 几乎可以忽略不计, 所以不影响测试结果。同时, 反相液相色谱具有灵敏度高, 可重复性高等优点被人们广泛使用^[17]。

由表3可知, 玉米油 V_E 总量为 254.06 mg/kg, 其中以 α -生育酚和 γ -生育酚为主; 而初榨葡萄籽油 V_E 总量为 697.42 mg/kg, 其中以 α -生育酚、 α -生育三烯酚和 γ -生育三烯酚为主。虽然初榨葡萄籽油的生育酚含量大约只有玉米油的一半, 但生育三烯酚含量为 577.8 mg/kg, 远高于玉米油的 18.52 mg/kg, 这和 Sen 等^[18]报道的结果一致。植物油通常都含有生育酚, 但很少含有生育三烯酚, 生育三烯酚仅存在少数植物油中, 比如米糠油、红棕榈油和葡萄籽油。

0.05)。由图1b可知, 不同组小鼠体重的增长值, 相比于ND组, CO45%和Lard45%组有14g左右的体重增长, 远高于ND组8g左右的增长 ($p < 0.05$), 而初榨葡萄籽油组的小鼠体重增长在11.5g左右, 显著低于CO45%和Lard45%组 ($p < 0.05$)。



注: a 图为小鼠体重增长趋势, b 图为小鼠饲喂 15 周的体重增长值。图中不同的字母之间表示显著性差异, 下同。

图1 初榨葡萄籽油对高脂膳食诱导小鼠体重的影响

2.5 初榨葡萄籽油对高脂膳食诱导小鼠血脂和游离脂肪酸(FFA)的影响(见表4)

由表4可知,喂食15周高脂膳食后,Lard45%和CO45%组小鼠的TC、TG水平较ND组显著升高($p < 0.05$),而GSO45%组小鼠的TG水平与ND组没有显著性的差异($p > 0.05$)。各组小鼠血清的HDL水平没有显著性的差异。与ND组相比,高脂饲料组小鼠血清的LDL水平均有显著性的升高

($p < 0.05$)。其中,Lard45%组小鼠血清的LDL水平最高,相比于Lard45%与CO45%组,GSO45%组小鼠血清的LDL水平有显著性的降低($p < 0.05$)。和ND组相比,高脂膳食组小鼠血清游离脂肪酸水平均有显著性的提高($p < 0.05$),与Lard45%、CO45%组相比,GSO45%组小鼠血清游离脂肪酸水平显著性降低($p < 0.05$)。

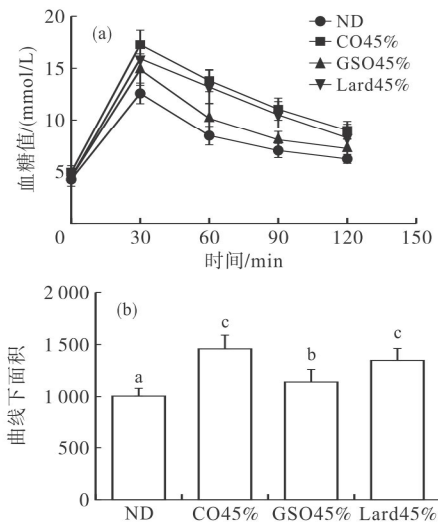
表4 小鼠血清中的脂质和FFA水平($n=12$)

组别	TC	TG	HDL	LDL	FFA
ND	5.640 ± 0.635 ^a	1.197 6 ± 0.253 6 ^a	5.085 ± 0.652	0.599 5 ± 0.095 9 ^a	0.166 7 ± 0.439 5 ^a
CO45%	7.446 ± 1.159 ^{bc}	1.616 8 ± 0.406 9 ^{bc}	5.264 ± 0.883	0.906 7 ± 0.182 1 ^c	0.330 0 ± 0.047 4 ^c
GSO45%	6.953 ± 0.722 ^b	1.332 6 ± 0.338 7 ^{ab}	5.268 ± 0.627	0.778 5 ± 0.182 6 ^b	0.245 6 ± 0.023 8 ^b
Lard45%	7.824 ± 0.762 ^c	1.759 1 ± 0.255 8 ^c	5.065 ± 0.882	1.096 7 ± 0.100 4 ^d	0.438 7 ± 0.076 5 ^d

注:表中同列不同的字母之间表示显著性差异($p < 0.05$)。下同。

2.6 初榨葡萄籽油对高脂膳食诱导小鼠葡萄糖耐量(GTT)的影响

为了测定不同组别小鼠胰岛素对葡萄糖的敏感性,干预小鼠12周给不同组别小鼠腹腔注射1 g/kg的葡萄糖溶液,观察不同时刻小鼠的血糖变化情况,结果如图2所示。



注:图a为不同组小鼠在不同时刻的血糖值,图b为喂食12周时不同组小鼠曲线下面积。

图2 初榨葡萄籽油对高脂膳食诱导小鼠葡萄糖耐量(GTT)的影响

由图2a可知,与Lard45%和CO45%组相比,GSO45%组的小鼠在不同时刻下的血糖趋势更加稳定,说明GSO45%组对葡萄糖有更好的耐受能力,GSO45%组小鼠在30 min时的血糖明显低于CO45%组($p < 0.05$),在60、90 min和120 min处的血糖明显低于Lard45%和CO45%组($p < 0.05$)。

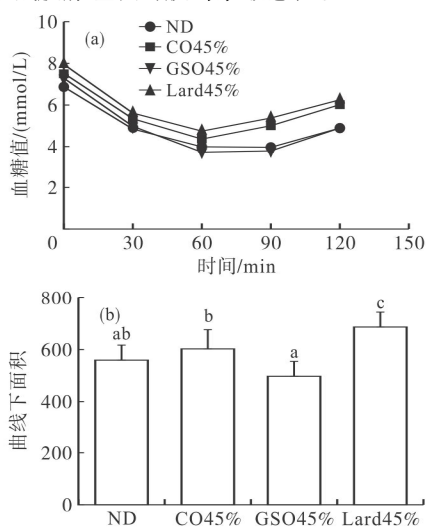
对不同组小鼠不同时刻血糖值的曲线下区域面积的统计,能从另一个方面说明不同组小鼠对于葡萄糖的耐受状况。曲线下区域面积越低,本组小鼠的胰岛素敏感性越好。由图2b可知,相比于高脂饲料组小鼠,ND组小鼠曲线下面积最低,说明ND组小鼠的胰岛素敏感性最好。和正常组小鼠相比,高脂饲料组小鼠曲线下面积均有显著性增加($p < 0.05$),相比Lard45%和CO45%组,GSO45%组小鼠曲线下区域面积显著降低($p < 0.05$)。

2.7 初榨葡萄籽油对高脂膳食诱导小鼠胰岛素耐量(ITT)的影响

为了测定小鼠胰腺组织对胰岛素敏感性,干预小鼠14周给不同组别的小鼠腹腔注射0.5 U/kg的胰岛素溶液,观察不同时刻小鼠的血糖变化情况,结果如图3所示。

由图3a可知,ND组和GSO45%组都显示出了明显好于Lard45%和CO45%组的胰岛素敏感性。可以看出腹腔注射胰岛素溶液后的30 min和60 min,ND组小鼠和GSO45%组小鼠的血糖值都迅速下降,而Lard45%和CO45%组小鼠的血糖值下降缓慢,呈现出较差的胰岛素敏感性。90 min后Lard45%和CO45%组小鼠的血糖值又开始呈现出快速上升的趋势,而ND组和GSO45%组在90 min后的血糖值呈现缓慢的增长趋势。相比Lard45%和CO45%组,ND组和GSO45%组小鼠在90 min和120 min的血糖值有显著性的降低($p < 0.05$)。由图3b可知,Lard45%组小鼠曲线下面积最高。相比于Lard45%和CO45%组,ND组和GSO45%组小鼠曲线下面积都降低,且GSO45%显著性降低($p < 0.05$),GSO45%组小鼠曲线下面积比ND组低,但

没有显著性的差异,说明初榨葡萄籽油可以显著地改善小鼠胰腺组织对胰岛素敏感性。



注:图 a 为不同组小鼠在不同时刻的血糖值,图 b 为喂食 14 周不同组小鼠曲线下面积。

图 3 初榨葡萄籽油对高脂膳食诱导小鼠胰岛素耐量 (ITT) 的影响

2.8 初榨葡萄籽油对高脂膳食诱导小鼠肝脏炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的影响 (见表 5)

表 5 小鼠肝脏炎症因子水平 ($n=12$) ng/L

组别	IL-6	TNF- α
ND	41.73 \pm 4.28 ^a	76.53 \pm 7.33 ^a
CO45%	61.28 \pm 9.44 ^c	120.10 \pm 13.24 ^c
GSO45%	53.69 \pm 8.92 ^b	106.30 \pm 10.76 ^b
Lard45%	70.03 \pm 8.53 ^d	143.10 \pm 14.84 ^d

由表 5 可知,与 ND 组相比,高脂膳食组小鼠肝脏的 IL-6 和 TNF- α 水平均有显著性的升高 ($p < 0.05$),其中 Lard45% 组 IL-6 和 TNF- α 水平最高;与 Lard45% 和 CO45% 组相比,GSO45% 组小鼠的 IL-6 和 TNF- α 水平均有显著性的降低 ($p < 0.05$),说明初榨葡萄籽油可以部分抑制小鼠肝脏炎症因子水平产生,改善小鼠胰岛素抵抗。

3 讨论

肥胖是由遗传因素和环境因素共同作用的结果,饮食作为最主要的环境因素之一,可以诱导肥胖和肥胖相关性疾病的生成^[20]。目前,高脂膳食诱导小鼠肥胖成为人们研究肥胖和肥胖相关性疾病的主要的手段之一,可以更真实地模拟人类单纯性肥胖的相关状况^[21]。本文试验结果显示与 ND 组小鼠相比,高脂膳食组小鼠体重均有显著性的增加,说明高脂膳食可以诱导小鼠肥胖。与猪油组、玉米油组相比,初榨葡萄籽油可以显著地降低高脂膳食诱导

小鼠的体重、降低血清 TC、TG 和 LDL 的含量,可能与初榨葡萄籽油的功能性成分有关。相比猪油、玉米油,初榨葡萄籽油含有大量的多不饱和脂肪酸,主要是亚油酸,约占总脂肪酸的 75%。研究结果表明,多不饱和脂肪酸通过影响机体代谢变化,比如:刺激肝组织脂质过氧化、抑制肝组织脂肪生成^[22]以及促进脂肪酸在肌肉中的氧化^[23]等,可以减少机体脂肪的堆积。长链多不饱和脂肪酸还可以抑制胆固醇合成的主要限速酶 HMG-CoA 还原酶的活性,减少机体内胆固醇的合成^[24]。

胰岛素抵抗是一种由于遗传或环境因素而导致胰岛素功能下降的现象,其特点是胰岛素敏感性降低,血糖利用率低^[25]。高脂膳食诱导的脂质代谢紊乱是胰岛素抵抗的主要原因,如果及时调节和改善,可有效减少和延缓胰岛素抵抗引起的代谢性疾病如糖尿病和心血管疾病的发生。研究结果表明血清中的游离脂肪酸浓度可能与胰岛素抵抗密切相关^[26],高脂膳食诱导小鼠脂质代谢紊乱,过量 FFA 储存在血液中,严重影响胰岛 β 细胞功能,抑制胰岛素的分泌,最后导致糖异生增加,引起机体的胰岛素抵抗^[27]。本文试验结果显示与 ND 组相比,高脂膳食诱导的小鼠血清中的 FFA 均有显著性的增加,说明高脂膳食可以诱导小鼠产生胰岛素抵抗。其中和猪油组、玉米油组相比,初榨葡萄籽油组血清中的 FFA 浓度最低,GTT 和 ITT 均显示初榨葡萄籽油组的小鼠对腹腔注射葡萄糖和胰岛素具有更好的耐受能力,提示可能是由于摄入初榨葡萄籽油,导致小鼠血清中低浓度游离脂肪酸,改善胰岛素敏感性。这可能和初榨葡萄籽油的多不饱和脂肪酸和极具抗氧化性的伴随物如生育三烯酚和多酚有关。多不饱和脂肪酸可以通过激活 PPAR α 和 AMPK 基因通路,增强肝脏、脂肪和骨骼肌组织的脂肪酸 β 氧化,抑制脂肪酸代谢中间产物的产生,增强胰岛素敏感性水平,改善小鼠胰岛素抵抗^[28]。本文试验结果显示初榨葡萄籽油中的 V_E 含量为 697.42 mg/kg,其中主要以 α -生育酚, α -生育三烯酚和 γ -生育三烯酚为主,和 Crews 等^[29]研究来自西班牙、法国和意大利 30 个不同品种的葡萄籽油,测得的生育酚和生育三烯酚总含量为 1 208 mg/kg,其中主要为 α -生育三烯酚和 γ -生育三烯酚报道的结果一致。Zhao 等^[30-31]研究表明圆叶葡萄籽油的 γ -生育三烯酚不仅可以激活 AMP 激酶,增加自噬作用,减少人体前脂肪细胞 hASCs 的形成,还可以通过抑制 MAP 激酶活性和 NF- κ B 的基因通路,有效地抑制脂肪炎症和 M1 巨噬细胞的生成,改善高脂膳食诱

导小鼠的肥胖和胰岛素抵抗。此外,初榨葡萄籽油的儿茶素、表儿茶素、反式白藜芦醇、类胡萝卜素和单宁等多酚类化合物也可以显著改善机体炎症反应和胰岛素抵抗^[32]。这些伴随物主要是通过上调 IRS1 酪氨酸磷酸化以及 PI3K 和 AKT 酶的活性,抑制 GLUT4 的转位,促进葡萄糖的吸收以及糖原的合成,增强胰岛素敏感性水平,减少机体氧化应激,改善胰岛素抵抗^[33]。

机体长期处于低度炎症状态是产生肥胖和胰岛素抵抗最重要因素之一,本文试验结果表明与 ND 组相比,高脂膳食诱导的小鼠肝脏中的 TNF- α 、IL-6 炎症因子水平均有显著性的增加,说明高脂膳食可以诱导小鼠产生炎症因子。与猪油、玉米油相比,初榨葡萄籽油可以显著降低高脂膳食诱导小鼠肝组织 TNF- α 、IL-6 炎症因子的水平,减少胰岛素抵抗的生成,可能也和初榨葡萄籽油的多不饱和脂肪酸和极具抗氧化性的伴随物有关。研究表明初榨葡萄籽油中的多不饱和脂肪酸可以通过其衍生产物 protectins 和 resolvins,和 GPR120(G 蛋白偶联受体 120)结合,抑制脂肪巨噬细胞 NF- κ B 和 JNK 信号通路,起到抗炎作用,降低了肝脏和脂肪组织 IL-6 和 TNF- α 等促炎因子基因表达^[34]。此外,初榨葡萄籽油的伴随物如 V_E 和多酚,也可以通过抑制 JNK 通路和 IRS1 酪氨酸磷酸化,抑制炎症因子的生成,改善小鼠胰岛素的敏感性^[35]。

4 结 论

初榨葡萄籽油可以降低高脂膳食诱导小鼠的体重,降低小鼠血清 TC、TG、LDL 水平及肝组织的 IL-6 和 TNF- α 炎症水平,改善小鼠糖耐量和胰岛素耐量,提高胰岛素敏感性,这可能与初榨葡萄籽油中的多不饱和脂肪酸和极具抗氧化性的伴随物如生育三烯酚和多酚化合物有关。关于初榨葡萄籽油功能成分改善小鼠肥胖、糖脂代谢和炎症因子的作用机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] CLÀRIA J, GONZÁLEZPÉRIZ A, LÓPEZVICARIO C, et al. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and fatty liver disease: modulation by endogenous *omega*-3 fatty acid-derived lipid mediator [J]. *Front Immuno*, 2011, 2(9):49.
- [2] CANI P D, AMAR J, IGLESIAS M A, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56(7):1761-1772.
- [3] CARPINO P A, GOODWIN B. Diabetes area participation analysis: a review of companies and targets described in the 2008-2010 patent literature [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2010, 20(12):1627-1651.
- [4] 王玉梅,胡艳芬,肖怀.天然药物中降糖成分及作用机理的研究进展 [J]. *中国民族民间医药*, 2008, 17(7):15-17.
- [5] 伊丽孜拉·吐尔干.葡萄籽原花青素的纯化及体外降血糖作用 [D]. 乌鲁木齐:新疆大学, 2014.
- [6] MAIER T, SCHIEBER A, KAMMERER D R, et al. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants [J]. *Food Chem*, 2009, 112(3):551-559.
- [7] ASSUMPCAO C F, NUNES I L, MENDONÇA T A, et al. Bioactive compounds and stability of organic and conventional vitislabrusca grape seed oils [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2016, 93(1):115-124.
- [8] KIM D J, JEON G, SUNG J, et al. Effect of grape seed oil supplementation on plasma lipid profiles in rats [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2010, 19(1):249-252.
- [9] SHINAGAWA F B, SANTANA F C D, TORRES L R O, et al. Grape seed oil: a potential functional food? [J]. *Food Sci Technol*, 2015, 35:1-8.
- [10] REEVES P G, NIELSEN F H, FAHEY G C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet [J]. *J Nutr*, 1993, 123(11):1939-1951.
- [11] WANG T, ZHU X, DAI F, et al. Effects of a standard high-fat diet with or without multiple deficiencies on bone parameters in ovariectomized mature rat [J]. *Plos One*, 2017, 12(9):e0184983.
- [12] 王超群.基于脂肪酸组成对燕麦-小麦复配粉中燕麦粉的定量分析 [D]. 江苏 无锡:江南大学, 2016.
- [13] LAMUELA-RAVENTÓS R M, SINGLETON V L, ORTHOFER R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [J]. *J Wiley Sons*, 1999, 299(2):152-178.
- [14] OWYANG A M, MAEDLER K, GROSS L, et al. XOMA 052, an anti-IL-1 β monoclonal antibody, improves glucose control and β -cell function in the diet-induced obesity mouse model [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(6):2515-2527.
- [15] KARANDREA S, YIN H, LIANG X, et al. Thymoquinone ameliorates diabetic phenotype in diet-induced obesity mice via activation of SIRT-1-dependent pathways [J]. *Plos One*, 2017, 12(9):e0185374.
- [16] WONG C K, BOTTA A, PITHER J, et al. A high-fat diet rich in corn oil reduces spontaneous locomotor activity and induces insulin resistance in mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(4):319-326.
- [17] ORTIZ C M L, MOYA M S P, NAVARRO V B. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of β -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils [J]. *J Food Compos Anal*, 2006, 19(2):141-149.

- [18] SEN C K, KHANNA S, ROY S. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family [J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28(5/6):692-728.
- [19] MAIER T H, SCHIEBER A, KAMMERER D R, et al. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants [J]. *Food Chem*, 2009, 112:551-559.
- [20] WANG X, CHENG M, ZHAO M, et al. Differential effects of high-fat diet rich in lard oil or soybean oil on osteopontin expression and inflammation of adipose tissue in diet-induced obese rats [J]. *Eur J Nutr*, 2013, 52(3):1181-1189.
- [21] LIMA E A, SILVEIRA L S, MASI L N, et al. Macadamia oil supplementation attenuates inflammation and adipocyte hypertrophy in obese mice [J]. *Mediat Inflamm*, 2014, 2014:870634.
- [22] LAPILONNE A, CLARKE S D, HEIRD W C. Polyunsaturated fatty acids and gene expression [J]. *Curr Opin Clin Nutr*, 2004, 7(2):151.
- [23] FLACHS P, HORAKOVA O, BRAUNER P, et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce *beta*-oxidation in white fat [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(11):2365-2375.
- [24] SIMOPOULOS A P. *Omega*-3 fatty acids in health and disease and in growth and development [J]. *Am J Clin Nutr*, 1991, 54(3):438-463.
- [25] WILCOX G. Insulin and insulin resistance [J]. *Clin Biochem Rev*, 2005, 26(2):19-39.
- [26] KOVACS P, STUMVOLL M. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver [J]. *Best Pract Res Clin En*, 2005, 19(4):625-635.
- [27] BODEN G, SHULMAN G I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and *beta*-cell dysfunction [J]. *Eur J Clin Invest*, 2002, 32(s3):14-23.
- [28] KALUPAHANA N S, CLAYCOMBE K J, MOUSTAID-MOUSSA N. (*n*-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights [J]. *Adv Nutr*, 2011, 2(4):304-316.
- [29] CREWS C, HOUGH P, GODWARD J, et al. Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(17):6261-6265.
- [30] ZHAO L, YAGIZ Y, XU C, et al. Muscadine grape seed oil as a novel source of tocotrienols to reduce adipogenesis and adipocyte inflammation [J]. *Food Funct*, 2015, 6(7):2293-2302.
- [31] ZHAO L, KANG I, FANG X, et al. *Gamma*-tocotrienol attenuates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting adipose inflammation and M1 macrophage recruitment [J]. *Int J Obesity*, 2015, 39(3):438-446.
- [32] SHI J, YU J, POHORLY J E, et al. Polyphenolics in grape seeds - biochemistry and functionality [J]. *J Med Food*, 2003, 6(4):291-299.
- [33] CHUANG C C, MCINTOSH M K. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases [J]. *Annu Rev Nutr*, 2011, 31(1):155-176.
- [34] OH D Y, TALUKDAR S, BAE E J, et al. GPR120 is an *omega*-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects [J]. *Cell*, 2010, 142(5):687-698.
- [35] GUILHERME A, VIRBASIS J V, PURI V, et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2008, 9(5):367-377.
-
- (上接第67页)
- [12] 石金娥, 王莹, 王庆峰, 等. GC-MS测定藻油中角鲨烯含量 [J]. *中国油脂*, 2015, 40(4):90-94.
- [13] HU A, ZHANG Z, ZHENG J, et al. Optimizations and comparison of two supercritical extractions of adlay oil [J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2012, 13(1):128-133.
- [14] JUN J, WARDA P, MU H, et al. Characteristics of mango kernel fats extracted from 11 China-specific varieties and their typically fractionated fractions [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2016, 93(8):1115-1125.
- [15] CUI Y, HAO P, LIU B, et al. Effect of traditional Chinese cooking methods on fatty acid profiles of vegetable oils [J]. *Food Chem*, 2017, 233:77-84.
- [16] ZHANG Q, SALEH A S, SHEN Q. Monitoring of changes in composition of soybean oil during deep-fat frying with different food types [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2016, 93(1):1-13.
- [17] WU T T, CHARLES A L, HUANG T C. Determination of the contents of the main biochemical compounds of Adlay (*Coxi lachrymal-jobi*) [J]. *Food Chem*, 2007, 104(4):1509-1515.
- [18] SIMONSEN A C, BAGATOLLI L A, DUELUND L, et al. Effects of seaweed sterols fucosterol and desmosterol on lipid membranes [J]. *Chem Phys Lipids*, 2009, 96(3):606.
- [19] HAMDAN I J, CLAUMARCHIRANT L, GARCIALLATAS G, et al. Sterols in infant formulas: validation of a gas chromatographic method [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2017, 68(6):695.
- [20] DUKE J A. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants [M]. Florida: CRC Press, 1992: 218.
- [21] HE Z, ZHU H, LI W, et al. Chemical components of cold pressed kernel oils from different *Torreya grandis* cultivars [J]. *Food Chem*, 2016, 209:196-202.