

研究报告

裂殖壶藻藻油 DHA 对高脂饮食诱导肥胖小鼠的影响

于金慧^{1,3} 王瑜² 彭振英³ 边斐³ 贾文斌¹ 刘园园² 石帅³ 丁汉凤^{1*} 毕玉平^{3*}

(1. 山东省农业科学院 山东省农作物种质资源中心 山东 济南 250100)

(2. 山东大学生命科学学院 山东 济南 250100)

(3. 山东省农业科学院生物技术研究中心 山东 济南 250100)

摘要:【目的】肥胖症是一种慢性代谢类疾病,具有较高的发病率和高危后果。研究表明, n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 Polyunsaturated fatty acids, n-3 PUFAs),特别是二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA)对与肥胖症相关疾病有较好的防治效果,对体内脂质代谢有重要的调节作用。探讨裂殖壶藻(*Schizochytrium* sp.)藻油 DHA 对高脂饮食诱导肥胖小鼠体重、脂肪组织重量、血脂、肝和脂肪组织病理形态和脂质代谢相关基因表达的影响。【方法】通过高脂饮食建立小鼠肥胖模型,以体重增幅 15%为标准分出肥胖小鼠。试验共分五组:(1) 低脂对照组;(2) 高脂模型组;(3) 高脂+低剂量藻油组(50 mg DHA/kg);(4) 高脂+中剂量藻油组(100 mg DHA/kg);(5) 高脂+高剂量藻油组(200 mg DHA/kg)。其中,藻油处理组灌服相应剂量藻油,低脂对照组和高脂模型组灌胃同等体积玉米油。处理 9 周后,腹腔麻醉,摘眼球取血并分离血清,测血清中甘油三酯、胆固醇和高密度脂蛋白含量;之后处死小鼠,分离附睾、肾周和肠系膜脂肪组织及肝脏,称重;附睾脂肪和肝组织切片进行 HE 染色,观察病理变化情况;利用 RT-PCR 检测附睾脂肪组织中激素敏感脂酶(Hormone sensitive lipase, HSL)基因的 mRNA 表达情况。【结果】藻油处理组小鼠体重没有显著下降,但是腹部脂肪重量显著降低、脂肪细胞体积明显小于高脂模型组;同时血清中甘油三酯、胆固醇含量显著降低,肝组织异位脂肪堆积明显减少;脂肪组织中 HSL 基因的表达水平显著提高。【结论】裂殖壶藻藻油 DHA 处理能显著降低高脂饮食导致的小鼠腹部脂肪积累并改善血脂,可能有利于肥胖症的防治。

关键词: 裂殖壶藻藻油, 二十二碳六烯酸, 高脂饮食, 抗肥胖, 血脂

Foundation item: Shandong Academy of Agriculture Sciences Fund for Young Scholars (No. 2015YQN32); The Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System in Shandong Province (No. SDAIT-26-09); International Science & Technology Cooperation Program of China (No. 2012DFA30450)

***Corresponding authors:** DING Han-Feng: Tel: 86-531-83178332, E-mail: dinghf2005@163.com
BI Yu-Ping: Tel: 86-531-83178227; E-mail: yupingbi@vip.sina.com

Received: May 10, 2017; **Accepted:** August 07, 2017; **Published online** (www.cnki.net): August 28, 2017

基金项目: 山东省农业科学院青年科研基金(No. 2015YQN32); 山东省现代农业产业技术体系建设专项资金(No. SDAIT-26-09); 国家国际科技合作专项项目(No. 2012DFA30450)

***通讯作者:** 丁汉凤: Tel: 86-531-83178332; E-mail: dinghf2005@163.com

毕玉平: Tel: 86-531-83178227; E-mail: yupingbi@vip.sina.com

收稿日期: 2017-05-10; **接受日期:** 2017-08-07; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-08-28

Effects of docosahexaenoic acid from *Schizochytrium* sp. on high fat diet induced obesity in mice

YU Jin-Hui^{1,3} WANG Yu² PENG Zhen-Ying³ BIAN Fei³ JIA Wen-Bin¹
LIU Yuan-Yuan² SHI Shuai³ DING Han-Feng^{1*} BI Yu-Ping^{3*}

(1. Shandong Centre of Crop Germplasm Resources, Shandong Academy of Agricultural Sciences,
Jinan, Shandong 250100, China)

(2. Shandong University, College of Life Science, Jinan, Shandong 250100, China)

(3. Biotechnology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: [Objective] As a metabolic syndromes disease, obesity has become an epidemic hazard and a major problem for health care systems worldwide. It is well documented that n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs), especially docosahexaenoic acid (DHA), could effectively prevent and treat obesity and related diseases. Aim to study the effect of DHA from *Schizochytrium* sp. on high-fat-induced obesity in male C57BL/6J mice, including the weight of body and adipose tissue of the mice and the content of blood lipid, pharmacological changes in liver and fat tissue, and the expression level of lipid metabolism related gene. [Methods] Mice were fed with high fat diet for nine weeks, and mice whose weight gain was 15% higher than the control were selected for the follow-up experiment. Mice were divided into five groups: (1) low fat diet as the control; (2) high fat diet as the model control; (3) high fat diet + microalgal oil with 50 mg DHA/kg body weight; (4) high fat diet + microalgal oil with 100 mg DHA/kg body weight; (5) high fat diet + microalgal oil with 200 mg DHA/kg body weight. Mice in groups of (1) and (2) were gavaged with isovolumetric corn oil, and mice in groups of (3), (4) and (5) were gavaged with microalgal oil with different dosage adjusted by corn oil. After nine weeks treatment, the mice were anesthetized, and blood samples were obtained from venous plexus of fundus oculi. The total triglyceride, total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in the serum were measured. Body, adipose tissue and liver of the mice were weighted, and the morphological changes of fat and liver were observed and the lipid metabolism related gene was examined. [Results] Microalgal oil DHA from *Schizochytrium* sp. significantly decreased the abnormal fat accumulation and blood lipid levels of the obesity mice, improved liver and fat tissue morphology, and promoted the expression of hormone sensitive lipase gene in white tissue fat. [Conclusion] Microalgal oil DHA from *Schizochytrium* sp. might have prospective applications in obesity therapy.

Keywords: Microalgal oil from *Schizochytrium* sp., Docosahexaenoic acid, High fat diet, Anti-obesity, Serum lipid

裂殖壶藻(*Schizochytrium* sp.), 又称裂殖壶菌, 隶属于破囊壶菌科, 是一种类似微藻但因缺乏叶绿体而无法进行光合作用的海洋原生生物。裂殖藻可以通过异养发酵培养, 其油脂含量可占细胞干重的 40%以上, 其中二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA)含量可达 50%以上, 是工业化生产 DHA 的优良藻种^[1]。2010 年, 《中华人民共和国食品安全法》和《新资源食品管理办法》批准 DHA 藻油为新资源食品, 并将裂殖壶藻列为其来源之一。

大量研究表明, n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 Polyunsaturated fatty acids, n-3 PUFAs)对与肥胖症相关疾病有较好的治疗效果, 对体内脂质代谢有重要调节作用。众所周知, 肥胖症是一种慢性代谢类疾病, 具有较高的发病率和高危后果, 目前已成为全球蔓延速度最快、最严重的公共卫生问题之一^[2]。然而, 至今还没有治疗肥胖症的理想药物, 西医减肥药物多是基于抑制食欲或脂肪类物质吸收的机理来研发的, 副作用较为明显; 控制饮食和体育运动等方式较为健康但往往难以持

久, 减肥效果易反弹^[3]。近年来, 天然来源的膳食营养成分用于防治肥胖症的效果也已经得到了广泛认可^[4-5]。DHA 作为一种 n-3 PUFAs, 在肥胖症等代谢综合症方面的作用也有诸多报道, 但大多为来源于深海鱼油的 DHA^[6]。微藻中的油脂也富含 n-3 PUFAs, 因藻种的不同其种类和含量有所差异。有些微藻以产 DHA 为主, 有些以产二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)为主, 有些二者含量相当^[7]。微藻中的 n-3 PUFAs 以糖脂和磷脂的形式存在, 具有更高的稳定性和生物利用率, 而且藻油中还含有其他营养附加成分, 如类胡萝卜素、植物甾醇等^[7]。

目前, 商品化的深海鱼油和藻油均是以 n-3 PUFAs 为主要功效成分的产品。其中, 深海鱼油中的 n-3 PUFAs 为 EPA 和 DHA^[8]; 藻油中的 n-3 PUFAs 以 DHA 为主。近年来, 有关海洋微藻来源 DHA 的研究多集中在培养条件优化以提高产量上^[9-12], 虽然也有微藻油生物安全评价^[13-14]和抗炎、降脂、保护心血管、抗肥胖等方面的相关报道^[15-20], 但还未见裂殖壶藻来源 DHA 抗肥胖的研究报道。因此, 本研究旨在明确来源于裂殖壶藻的藻油 DHA 对高脂饮食诱导小鼠肥胖的治疗作用, 并初步揭示其抗肥胖机制, 以期为裂殖壶藻藻油 DHA 的开发利用提供参考和借鉴, 同时也为肥胖症的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

裂殖壶藻藻油, 江苏天凯生物技术有限公司, 后经过纯化获得 DHA 纯度为>90%; 医药级玉米油, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 其脂肪酸组成见表 1; 低脂饲料(10% Fat)和高脂饲料(45% Fat), 江苏美迪森生物医药有限公司, 饲料成分见表 2; 总甘油三酯(TG)测定试剂盒、总胆固醇(TC)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; RNA 提取试剂, Invotrogen (Invotrogen Bio. Inc., 美国)公司; 反转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit)和

表 1 玉米油和藻油脂肪酸组成
Table 1 Fatty acids composition of corn and microalgal oils (g/100 g total fatty acids)

脂肪酸组成 Fatty acid composition	玉米油 Corn oil	微藻油 Microalgal oil
C6:0	0.02	—
C12:0	0.02	—
C14:0	0.04	—
C15:0	0.01	—
C16:0	12.22	0.05
C16:1	0.08	—
C17:0	0.07	—
C18:0	1.56	0.02
C18:1n9c	27.21	0.02
C18:2n6c	56.97	0.03
C18:3n6	0.02	0.15
C18:3n3	0.71	—
C20:0	0.39	—
C20:1	0.27	—
C21:0	0.06	—
C20:2	0.01	—
C20:4n6	—	0.06
C20:5n3	0.01	1.07
C22:0	0.12	—
C22:1n9	0.04	—
C23:0	0.01	0.84
C24:0	0.14	—
C22:6n3	—	97.76
SUM	100.00	100.00
ΣSFAs	14.68	0.90
ΣMUFAs	27.60	0.02
Σn-6 PUFAs	56.99	0.24
Σn-3 PUFAs	0.73	98.83

Note: —: No such ingredients. SFAs: Saturated fatty acids; MUFAs: Monounsaturated fatty acids; n-6 PUFAs: n-6 Polyunsaturated fatty acids; n-3 PUFAs: n-3 Polyunsaturated fatty acids.

RT-PCR 定量分析相关试剂 SYBR Green, TaKaRa (TaKaRa Bio. Inc., 日本)公司。

台式冷冻离心机 ST16R、超低温-80 °C 冰箱 900Series, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 电子天平 JA5003, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 酶标仪 ELX800, 美国 Bio-Tek 公司; 正置显微镜 BX51, 日本 Olympus 公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 上海申贤恒温设备厂; 脱水机 TP1020、包埋机 EG1150H、自动切片机 RM2126、摊片机 HI1210、染色机 Autostainer XL, 德国 Leica 公司; 电泳仪 DYY-8C 型, 北京六一仪器厂; PCR 仪, 日本 TaKaRa 公司; 荧光定量 PCR 仪 ABI7500, 美国 ABI 公司。

表 2 饲料成分组成表
Table 2 Composition of the diets (g/100 g)

组分 Composition	低脂饲料 Low fat diet (10%, MD12031)	高脂饲料 High fat diet (45%, MD12032)
酪蛋白 Casein	200.0	200.0
L-胱氨酸 L-cystine	3.0	3.0
玉米淀粉 Corn starch	315.0	72.8
麦芽糊精 Maltodextrin	35.0	100.0
蔗糖 Saccharose	350.0	172.8
纤维素 Cellulose	50.0	50.0
大豆油 Soybean oil	25.0	25.0
猪油 Lard oil	20.0	177.5
复合矿物质 Composite minerals	45.0	45.0
复合维生素 Vitamin complex	10.0	10.0
酒石酸氢胆碱 Choline bitartrate	2.0	2.0
能量 Energy (%)		
蛋白质 Protein	19.2	24.0
碳水化合物 Carbohydrate	67.3	41.0
脂肪 Fat	4.3	24.0

1.2 动物处理与分组

动物实验在山东大学动物实验中心完成, 选择 4 周龄 SPF 清洁级雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只。适应一周后分组进行相关试验。首先, 分为两组, 一组为低脂对照组(10 只), 另一组为高脂建模组(50 只)。采用高脂饮食诱导建立肥胖模型, 为期 9 周。待模型建立后进行药物干预, 为期 9 周。将建模成功的小鼠分为 4 组(每组 8–12 只), 分别为高脂模型对照组、高脂模型低剂量 DHA 藻油组(50 mg/kg, 以 DHA 含量计算)、高脂模型中剂量 DHA 藻油组(100 mg/kg, 以 DHA 含量计算)、高脂模型高剂量 DHA 藻油组(200 mg/kg)。用玉米油作为溶剂将药物配制成相应浓度。低脂对照组和高脂模型组灌胃相应体积的玉米油。其中, 低脂对照组给予低脂饲料(10% Fat), 其他组给予高脂饲料(45% Fat)。实验期间自由饮食和饮水, 每周称一次体重。

1.3 组织取材及处理

小鼠用戊巴比妥钠(2%, 40 mg/kg)腹腔注射进行麻醉, 摘眼球取血。全血静置后使用台式冷冻离心机于 4 °C、3 500 r/min 离心 15 min 后, 分离血清并分装后置 -80 °C 备用。分离肝脏及附睾白色脂肪、肾周白色脂肪和肠系膜白色脂肪重。所取组织均迅速用生理盐水清洗, 吸水纸吸除多余水分后称量并记录湿重。其中, 肝和附睾脂肪的部分组织(尽量取同一部位)放入 4%多聚甲醛固定液中固定保存, 其余组织置冻存管中液氮速冻后 -80 °C 保存备用。

1.4 血脂测定

按总甘油三酯测定试剂盒(TG, A110-1)、总胆固醇测定试剂盒(TC, A111-1)、高密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(HDL-C, A112-1)说明书操作, 使用酶标仪测定血清中 TG、TC 和 HDL-C 的含量。

1.5 组织 HE 染色

取部分肝和附睾脂肪组织, 经过水洗、脱水透明、浸蜡、包埋, 得到肝和脂肪组织石蜡切片。经组织切片机处理后, 得到 5 μm 组织切片。通过苏木素-伊红(HE)染色, 采用正置显微镜观察不同处理条件下肝和脂肪组织细胞形态学变化。其中, 每个处理选择 8–10 张脂肪组织切片(400×), 采用 Adobe Photoshop CS2 计算脂肪组织切片中细胞的数量、直径和周长。

1.6 脂肪组织中 HSL mRNA 表达的测定

以冻存附睾脂肪为材料, 取 150 mg 左右组织样品置 1 mL Trizol 提取试剂中匀浆, 然后按照分子生物学相关方法^[21]提取总 RNA。获得的总 RNA 经过浓度测定和完整性验证, 取 800 μg 反转录成 cDNA。按照 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书进行, 反应体系总体积为 20 μL, 具体反应体系如下。RT-PCR 反应体系(20.0 μL): SYBR Premix ExTaq (2×) 10.0 μL, ROX reference dye (50×) 0.4 μL, 上游引物 PCR F (10 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物 PCR R (10 μmol/L) 0.8 μL, 去 RNA 酶水 RNase free H₂O 6.0 μL, 模板 cDNA 2.0 μL。PCR 反应

条件为: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。采用 RT-PCR 方法检测附睾脂肪组织中激素敏感脂酶(Hormone sensitive lipase, HSL)基因的表达, HSL 引物序列: 正向 5'-GATGACACAGTCGCTGGTGACA-3', 反向 5'-TGCCACACCAACAGTTGGCCT-3'。以 β -actin 为内参, β -actin 引物序列: 正向 5'-AGATGACCCAGATCATGTTTGAAG-3'; 反向 5'-TGGTACGACCAGAGGCATACA-3'。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算^[22]。

1.7 数据分析

实验数据以平均值 \pm 标准差的形式表示。采用 IBM SPSS 19.0 进行数据统计分析, 不同组间结果比较用单因素方差的最小显著性差异分析, 统计结果 $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 高脂饮食诱导小鼠肥胖模型的建立

高脂饮食是建立小鼠营养性肥胖模型的经典方法, 这种模型与人类过度食肥甘厚味所致的高血脂症及其并发症的临床表现相似。能量摄入过量会导致体内脂质代谢紊乱, 脂肪过度积累从而引发肥胖等病症^[23]。如图 1 所示, 高脂饮食组小鼠的体重自第一周开始便高于低脂对照组($P < 0.05$),

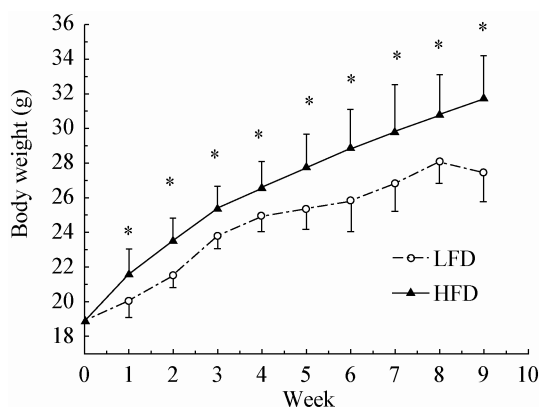


图 1 建模期间小鼠体重变化情况

Figure 1 Body weight changes during model establishing

注: LFD: 低脂组, $n=10$; HFD: 高脂组, $n=50$; 数据为平均值 \pm 标准差($n=8-10$). *: $P < 0.05$.

Note: LFD: Low fat diet, $n=10$; HFD: High fat diet, $n=50$; Data represent means \pm standard error ($n=8-10$). *: $P < 0.05$.

至第 9 周时体重超过正常对照组的 15% 以上。按照建模评定标准, 即 C57BL/6J 小鼠体重超过正常对照组体重均数+2 倍标准差便认为达到肥胖的标准。

2.2 不同剂量藻油处理对高脂饮食肥胖小鼠体重的影响

建模成功后, 开始进行不同剂量藻油 DHA 处理, 共处理 9 周, 各组小鼠体重变化如图 2 所示。0-4 周体重有下降趋势可能与灌胃有关, 待小鼠适应灌胃后体重稳中有升。其中, 正常对照组(LFD 组)的体重维持在 25 g 左右。高脂模型组(HFD 组)的体重持续保持最高。藻油不同剂量处理组(HFD+LD、HFD+MD、HFD+HD)小鼠的体重略低于高脂模型组, 但是至处理末期, 不同剂量藻油处理的高脂饮食的各组小鼠体重无显著差异。

2.3 不同剂量藻油处理对高脂饮食肥胖小鼠脂肪和肝脏重量的影响

待藻油处理 9 周后, 对各组小鼠肾周、肠系膜和附睾白色脂肪组织以及肝组织重量进行比较, 如图 3 所示。高脂模型组的各部位脂肪组织重量显著高于正常对照组($P < 0.05$), 肝组织重量虽高于正

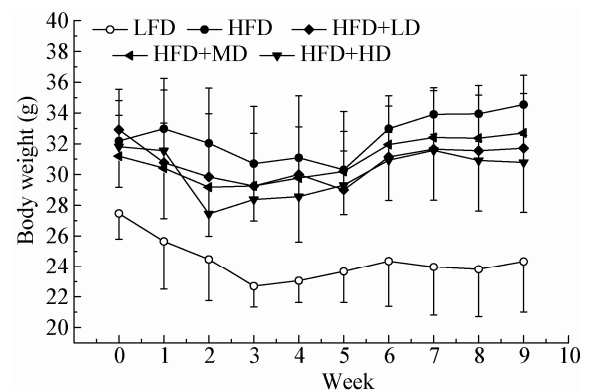


图 2 不同剂量藻油处理对肥胖小鼠体重的影响

Figure 2 Effects of microalgal oil DHA on body weight of high fat diet-induced obesity mice

注: LFD: 低脂对照组; HFD: 高脂组模型; HFD+LD: 低剂量(50 mg DHA/kg BW); HFD+MD: 中剂量(100 mg DHA/kg BW); HFD+HD: 高剂量(200 mg DHA/kg BW); 数据为平均值 \pm 标准差($n=8-10$).

Note: LFD: Low fat diet; HFD: High fat diet; HFD+LD: HFD+low dosage (50 mg DHA/kg BW); HFD+MD: HFD+middle dosage (100 mg DHA/kg BW); HFD+HD: HFD+high dosage (200 mg DHA/kg BW); Data represent means \pm standard error ($n=8-10$).

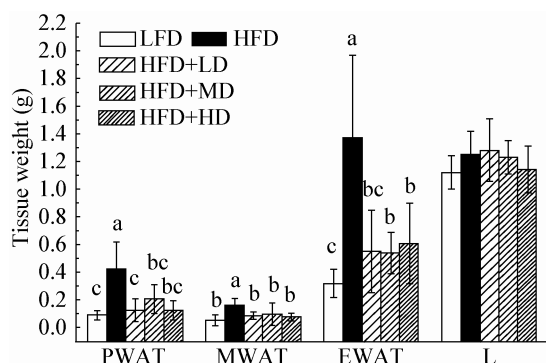


图 3 微藻油对高脂饮食肥胖小鼠各部位脂肪和肝脏重量的影响

Figure 3 Effects of microalgal oil DHA on tissue weight of high fat diet-induced obesity mice

注: PWAT: 肾周白色脂肪组织; MWAT: 肠系膜白色脂肪组织; EWAT: 附睾白色脂肪组织; L: 肝组织; LFD: 低脂对照组; HFD: 高脂组模型; HFD+LD: 低剂量(50 mg DHA/kg BW); HFD+MD: 中剂量(100 mg DHA/kg BW); HFD+HD: 高剂量(200 mg DHA/kg BW); 数据为平均值±标准差(n=8-10). 不同字母表示差异显著, $P < 0.05$.

Note: PWAT: Perinephric white tissue fat; MWAT: Mesenteric white tissue fat; EWAT: Epididymal white tissue fat; L: Liver; LFD: Low fat diet; HFD: High fat diet; HFD+LD: HFD+low dosage (50 mg DHA/kg BW); HFD+MD: HFD+middle dosage (100 mg DHA/kg BW); HFD+HD: HFD+high dosage (200 mg DHA/kg BW); Data represent means±standard error (n=8-10). Different letter means significantly different ($P < 0.05$).

常对照组但是并不显著。不同剂量藻油处理均显著降低了各部位脂肪组织的重量($P < 0.05$), 但是对肝组织的重量无显著影响。由此可见, 藻油 DHA 能够显著降低腹部白色脂肪的积累, 各处理剂量的效果相当。

2.4 微藻油对高脂饮食肥胖小鼠血脂的影响

机体能量摄入过多通常会导致血脂升高。对不同处理组小鼠的血脂情况进行测定, 结果如图 4 所示。高脂模型组的甘油三酯、总胆固醇和高密度脂蛋白含量显著升高($P < 0.05$), 而藻油处理显著降低了血脂各指标($P < 0.05$), 其中以中高剂量降低的幅度较大。

2.5 微藻油对高脂饮食肥胖肝组织和附睾脂肪组织形态的影响

当能量摄入过多, 异位脂肪大量堆积从而导致一系列代谢类疾病^[23], 而肝和脂肪组织是储存过量脂肪的重要场所。如图 5 所示, 低脂对照组小

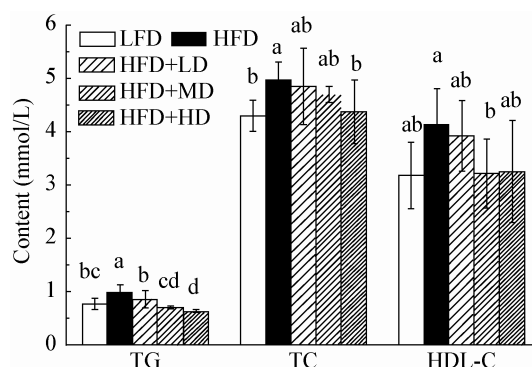


图 4 微藻油对高脂饮食肥胖小鼠血清中甘油三酯、总胆固醇和高密度脂蛋白含量的影响

Figure 4 Effects of microalgal oil DHA on triglyceride, total cholesterol, high-density lipoprotein of high fat diet-induced obesity mice in serum

注: TG: 总甘油三酯; TC: 总胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白; LFD: 低脂对照组; HFD: 高脂组模型; HFD+LD: 低剂量(50 mg DHA/kg BW); HFD+MD: 中剂量(100 mg DHA/kg BW); HFD+HD: 高剂量(200 mg DHA/kg BW). 数据为平均值±标准差(n=8-10). 不同字母表示差异显著, $P < 0.05$.

Note: TG: Triglyceride; TC: Total cholesterol; HDL-C: High-density lipoprotein; LFD: Low fat diet; HFD: High fat diet; HFD+LD: HFD+low dosage (50 mg DHA/kg BW); HFD+MD: HFD+middle dosage (100 mg DHA/kg BW); HFD+HD: HFD+high dosage (200 mg DHA/kg BW); Data represent means±standard error (n=8-10). Different letter means significantly different ($P < 0.05$).

鼠的肝组织结构正常。高脂饮食可导致小鼠肝组织内脂滴大量积累, 肝细胞水样变性。不同剂量藻油 DHA 处理后, 肝组织形态明显好转。其中, 低剂量处理组肝组织切片中脂滴显著减少, 但仍可见肝细胞水样变性, 而中高剂量组织切片中脂滴几乎不可见, 肝细胞结构也趋于正常。

由图 6 可见, 低脂对照组小鼠的附睾脂肪细胞横切面积较小, 大小较为一致。高脂饮食处理可导致小鼠脂肪组织细胞内脂滴堆积, 细胞不同程度增大。与高脂对照组相比, 不同剂量藻油 DHA 处理后脂肪细胞明显变小。

对不同处理的脂肪组织切片进行脂肪数量和大小进行统计, 结果如图 7 所示。相对低脂对照组, 高脂模型组每张组织切片(400×)的细胞数量显著下降($P < 0.05$), 细胞直径和周长显著增长($P < 0.05$)。而不同剂量藻油处理后, 细胞数量显著增加($P < 0.05$), 细胞直径和周长也明显下降($P < 0.05$),

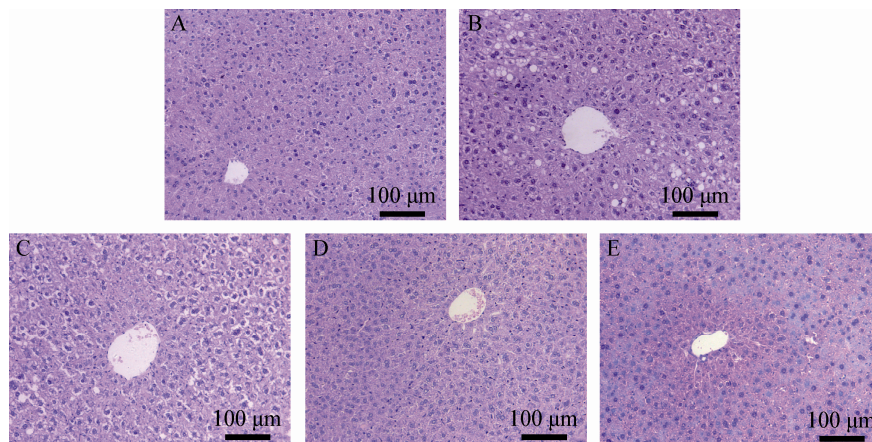


图 5 微藻油对高脂饮食肥胖小鼠肝组织形态的影响(200×)

Figure 5 Hematoxylin-eosin staining of the liver tissue of mice fed with high fat diet and microalgal oil (200×)

注: A: LFD, 低脂对照组; B: HFD, 高脂模型组; C: HFD+LD, 低剂量处理组(50 mg DHA/kg BW); D: HFD+MD, 中剂量处理组(100 mg DHA/kg BW); E: HFD+HD, 高剂量处理组(200 mg DHA/kg BW).

Note: A: LFD, low fat diet; B: HFD, high fat diet; C: HFD+LD, HFD+low dosage (50 mg DHA/kg BW); D: HFD+MD, HFD+middle dosage (100 mg DHA/kg BW); E: HFD+HD, HFD+high dosage (200 mg DHA/kg BW).

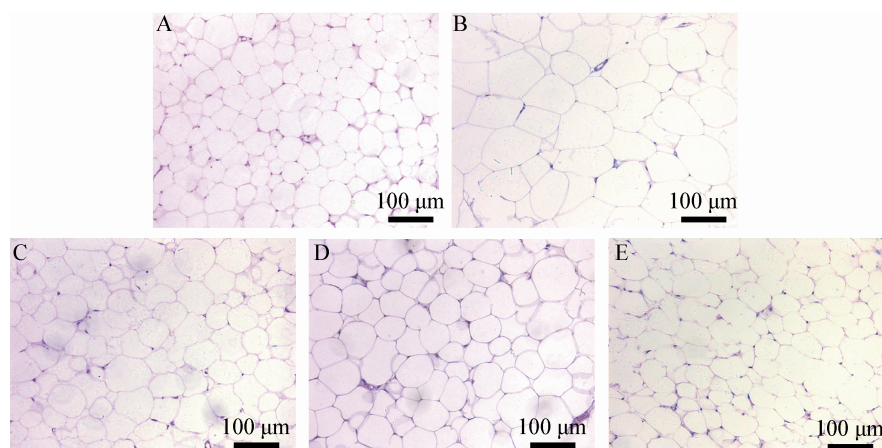


图 6 微藻油对高脂饮食肥胖小鼠附睾脂肪组织形态的影响(200×)

Figure 6 Hematoxylin-eosin staining of the epididymal white tissue fat tissue of mice fed with high fat diet and microalgal oil (200×)

注: A: LFD, 低脂对照组; B: HFD, 高脂模型组; C: HFD+LD, 低剂量处理组(50 mg DHA/kg BW); D: HFD+MD, 中剂量处理组(100 mg DHA/kg BW); E: HFD+HD, 高剂量处理组(200 mg DHA/kg BW).

Note: A: LFD, low fat diet; B: HFD, high fat diet; C: HFD+LD, HFD+low dosage (50 mg DHA/kg BW); D: HFD+MD, HFD+middle dosage (100 mg DHA/kg BW); E: HFD+HD, HFD+high dosage (200 mg DHA/kg BW).

趋于正常, 其中, 低、中剂量效果相当, 高剂量效果更佳显著。

2.6 微藻油对高脂饮食肥胖小鼠脂肪组织 HSL 基因表达的影响

HSL 是动物脂肪分解的关键酶。实验检测了

各处理组小鼠附睾脂肪组织中的 HSL 表达情况, 如图 8 所示。单纯的高脂饮食处理该基因的表达有所降低, 但与正常对照差异不显著, 藻油处理则显著提高了该基因的表达($P<0.05$), 中、高处理组显著高于正常对照组($P<0.05$)。

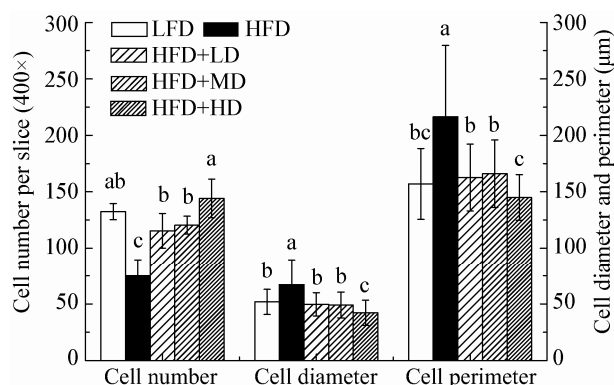


图 7 微藻油对高脂饮食肥胖小鼠附睾脂肪组织细胞数量及大小的影响

Figure 7 Effect of microalgal oil on cell number and size of high fat diet-induced obesity mice in the epididymal white fat tissue

注: LFD: 低脂对照组; HFD: 高脂模型组; HFD+LD: 低剂量处理组(50 mg DHA/kg BW); HFD+MD: 中剂量处理组(100 mg DHA/kg BW); HFD+HD: 高剂量处理组(200 mg DHA/kg BW)。数据为平均值±标准差(n=8-10)。不同字母表示差异显著, $P<0.05$ 。
Note: LFD: Low fat diet; HFD: High fat diet; HFD+LD: HFD+low dosage (50 mg DHA/kg BW); HFD+MD: HFD+middle dosage (100 mg DHA/kg BW); HFD+HD: HFD+high dosage (200 mg DHA/kg BW). Data represent means±standard error (n=8-10). Different letter means significantly different ($P<0.05$).

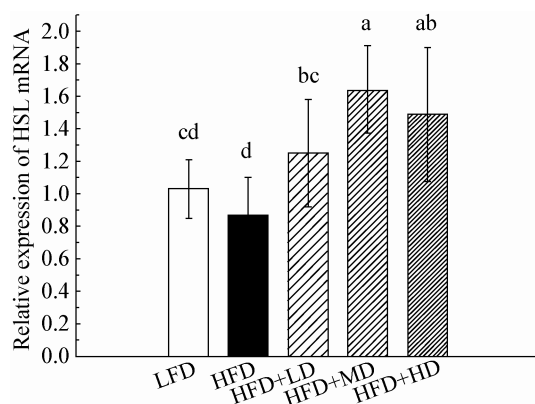


图 8 微藻油对高脂饮食肥胖小鼠脂肪组织中 HSL mRNA 表达水平的影响

Figure 8 Effects of microalgal oil DHA on HSL mRNA expression of high fat diet-induced obesity mice

注: HSL: 激素敏感脂肪酶; LFD: 低脂对照组; HFD: 高脂模型组; HFD+LD: 低剂量处理组(50 mg DHA/kg BW); HFD+MD: 中剂量处理组(100 mg DHA/kg BW); HFD+HD: 高剂量处理组(200 mg DHA/kg BW); 数据为平均值±标准差(n=4-6)。不同字母表示差异显著, $P<0.05$ 。

Note: HSL: Hormone sensitive lipase; LFD: Low fat diet; HFD: High fat diet; HFD+LD: HFD+low dosage (50 mg DHA/kg BW); HFD+MD: HFD+middle dosage (100 mg DHA/kg BW); HFD+HD: HFD+high dosage (200 mg DHA/kg BW); Data represent means±standard error (n=4-6). Different letter means significantly different ($P<0.05$).

3 结论与讨论

随着生活水平的不断提高, 肥胖人群的数量也越来越多, 成为影响人们健康的重要病症之一。膳食营养调控作为安全有效的干预手段正在获得关注。DHA 是人体自身无法合成的一类 n-3 多不饱和脂肪酸, 其传统来源为深海鱼油。近年来微藻油 DHA 因具有成分简单、无鱼腥味、生产操作可控性强、可持续利用等优势受到了人们的广泛关注, 目前用于生产 DHA 的微藻种类有隐甲藻、破囊壶藻、吾肯氏壶藻、裂殖壶藻等, 其中裂殖壶藻生长速度快、DHA 含量高, 是工厂化生产 DHA 的潜力菌株^[24]。前人的研究明确了深海鱼油对肥胖症的缓解作用^[25-26]。破囊壶藻藻油的抗肥胖作用也有相关报道^[15]。Komprda 等证实裂殖壶藻藻油能够降低血清中胆固醇含量, 并且能够缓解高脂饮食诱导的慢性低度炎症^[16-17]。因此, 明确裂殖壶藻藻油 DHA 的抗肥胖作用是一项非常有意义的工作, 不仅能为开发利用裂殖壶藻藻油提供理论依据和参考, 同时也为肥胖症的防治提供新的思路。

本研究实验结果显示来源于裂殖壶藻的藻油 DHA 虽然没有能够显著降低高脂饮食导致的体重增加, 却显著降低了腹部白色脂肪组织的积累, 降低了血清中甘油三酯和胆固醇的含量, 改善了血脂。值得一提的是, n-3 多不饱和脂肪酸对高密度脂蛋白的作用存在不同的结论, 有些研究表明 n-3 PUFAs 能够增加高密度脂蛋白水平^[27], 而有的结果则显示 n-3 PUFAs 能够降低 HDL-C, 主要原因是 n-3 PUFAs 能够增加肝组织中 SR-B1 的表达, 进而促进了 HDL-C 从外周组织向肝组织的逆向转运^[28]。本研究的结果表明藻油 DHA 降低了血清中 HDL-C 的含量, 可能也是与肝组织中 SR-B1 的表达有关。

肝组织和白色脂肪组织是维持机体能量代谢平衡的重要器官^[29-30]。当能量摄入过量导致异位脂肪积累, 肝组织内脂滴堆积、脂肪组织则是细胞增大。本研究的病理组织切片显示, 与低脂对

照组相比, 高脂饮食模型组肝组织内已有大量脂滴形成, 附睾脂肪组织中的细胞也增大, 细胞数量显著下降, 说明高脂饮食造成的能量摄入明显过剩。由藻油 DHA 处理的效果来看, 不同剂量藻油 DHA 均能较好地缓解高脂饮食造成的异位脂肪堆积, 通过分析不同处理脂肪组织中 HSL 基因 mRNA 的表达来看, 这一效果可能部分是通过促进脂肪分解来实现的。HSL 是一种胞内中性脂肪酶, 能够水解三酰基甘油、二酰基甘油、单酰甘油、胆固醇酯, 以及其他脂类和水溶性底物^[31]。前人研究表明, 在高脂饮食条件下, 不同比例 DHA/EPA 能够提高 HSL 的表达进而促进脂肪分解, 以单独使用 DHA 效果最佳^[32]。Sun 等研究表明 DHA 在正常饮食条件下也会促进 HSL 的表达, 但是与剂量无依赖关系^[33], 这与我们在高脂饮食条件下的研究结果一致。然而也有报道表明 n-3 PUFAs 对不同部位脂肪中 HSL 的作用各异, 比如会降低腹膜后脂肪 HSL 基因的表达, 增强皮下脂肪 HSL 基因的表达^[34]。总之, 还需进一步地研究以深入揭示不同来源 n-3 PUFAs 抗肥胖的分子机制。

综上所述, 本研究表明裂殖壶藻藻油对于高脂饮食导致的腹部脂肪堆积具有较好的改善作用, 或能够为防治肥胖症提供新的思路。裂殖壶藻藻油富含 n-3 PUFAs, 在食品添加、功能性食品或医药保健品的开发中具有极大的应用潜力, 本研究的结果支持其在肥胖症防治方面的效果。因此, 有必要深入开展裂殖壶藻藻油抗肥胖活性及其药理机制的研究, 从而更合理和科学地开发利用裂殖壶藻资源, 为肥胖人群的健康饮食提供膳食营养调控方案, 同时还能进一步提高该产业的经济效益和社会效益。

参 考 文 献

- [1] Guo DS, Ji XJ, Ren LJ, et al. Development of a real-time bioprocess monitoring method for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 216: 422-427
- [2] Atkinson RL. Current status of the field of obesity[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2014, 25(6): 283-284
- [3] Hou RF, Tao F, Lu H, et al. Progress of traditional Chinese medicinal research on obesity[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2015, 33(8): 1959-1962 (in Chinese)
侯瑞芳, 陶枫, 陆灏, 等. 肥胖的中医治疗进展[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(8): 1959-1962
- [4] Dwyer JT, Allison DB, Coates PM. Dietary supplements in weight reduction[J]. *Journal of the American Dietetic Association*, 2005, 105(5): 80-86
- [5] Sun NN, Wu TY, Chau CF. Natural dietary and herbal products in anti-obesity treatment[J]. *Molecules*, 2016, 21(10): 1351-1365
- [6] Arnoldussen IA, Kiliaan AJ. Impact of DHA on metabolic diseases from womb to tomb[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(12): 6190-6212
- [7] Ryckebosch E, Bruneel C, Termote-Verhalle R, et al. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil[J]. *Food Chemistry*, 2014, 160: 393-400
- [8] Yi T, Li S, Fan JY, et al. Comparative analysis of EPA and DHA in fish oil nutritional capsules by GC-MS[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2014, 13: 190
- [9] Fu J, Chen T, Lu H, et al. Enhancement of docosahexaenoic acid production by low-energy ion implantation coupled with screening method based on Sudan black B staining in *Schizochytrium* sp.[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 221: 405-411
- [10] Lee CK, Nichols CM, Blackburn SI, et al. Comparison of *Thraustochytrids* *Aurantiochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp., and *Ulkenia* sp. for production of biodiesel, long-chain omega-3 oils, and exopolysaccharide[J]. *Marine Biotechnology* (NY), 2014, 16(4): 396-411
- [11] Liu B, Liu J, Sun PP, et al. Sesamol enhances cell growth and the biosynthesis and accumulation of docosahexaenoic acid in the microalga *Cryptocodinium cohnii*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(23): 5640-5645
- [12] Gong YM, Liu J, Jiang ML, et al. Improvement of omega-3 docosahexaenoic acid production by marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* using rapeseed meal hydrolysate and waste molasses as feedstock[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e125368
- [13] Fedorova-Dahmsa I, Maroneb PA, Bailey-Hall E, et al. Safety evaluation of algal oil from *Schizochytrium* sp.[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(1): 70-77
- [14] Lewis KD, Huang WF, Zheng XH, et al. Toxicological evaluation of arachidonic acid (ARA)-rich oil and docosahexaenoic acid (DHA)-rich oil[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, 96: 133-144
- [15] Go RE, Hwang KA, Park GT, et al. Effects of microalgal polyunsaturated fatty acid oil on body weight and lipid accumulation in the liver of C57BL/6 mice fed a high fat diet[J]. *Journal of Biomedical Research*, 2016, 30(3): 234-242
- [16] Komprda T, Škultéty O, Křížková S, et al. Effect of dietary *Schizochytrium* microalga oil and fish oil on plasma cholesterol level in rats[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Berl), 2015, 99(2): 308-316
- [17] Komprda T, Sládek Z, Škultéty O, et al. Effect of dietary *Schizochytrium* microalga oil on selected markers of low-grade inflammation in rats[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Berl), 2016, 6(100): 1169-1178

- [18] Yook JS, Kim KA, Park JE, et al. Microalgal oil supplementation has an anti-obesity effect in C57BL/6J mice fed a high fat diet[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2015, 20(4): 230-237
- [19] Xiao M, Li QS. Analysis of hemp seed and algal oil mixture on dietary obese rats[J]. Journal of Hubei University of Chinese Medicine, 2016, 18(4): 12-15 (in Chinese)
萧闵, 李全胜. 火麻仁油与藻油混合物对营养肥胖大鼠的降脂减肥作用研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2016, 18(4): 12-15
- [20] Haimeur A, Mimouni V, Ulmann L, et al. Fish oil and microalga omega-3 as dietary supplements: a comparative study on cardiovascular risk factors in high-fat fed rats[J]. Lipids, 2016, 51(9): 1037-1049
- [21] Shen HX. Protocols and Techniques of Molecular Biology[M]. Guangzhou: Sum Yat-Sen University Press, 2010: 143,379 (in Chinese)
申煌煌. 分子生物学实验方法与技巧[M]. 广州: 中山大学出版社, 2010: 143,379
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [23] Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome[J]. Nature, 2006, 14(444): 881-887
- [24] Hu XC, Ren LJ, Chen SL, et al. The roles of different salts and a novel osmotic pressure control strategy for improvement of DHA production by *Schizochytrium* sp.[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(11): 2129-2136
- [25] Bargut TC, Silva-E-Silva ACAG, Souza-Mello V, et al. Mice fed fish oil diet and upregulation of brown adipose tissue thermogenic markers[J]. European Journal of Nutrition, 2016, 55(1): 159-169
- [26] da Cunha De Sá RDC, Crisma AR, Cruz MM, et al. Fish oil prevents changes induced by a high-fat diet on metabolism and adipokine secretion in mice subcutaneous and visceral adipocytes[J]. Journal of Physiology, 2016, 594(21): 6301-6317
- [27] Bernstein AM, Ding EL, Willett WC, et al. A meta-analysis shows that docosahexaenoic acid from algal oil reduces serum triglycerides and increases HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in persons without coronary heart disease[J]. Journal of Nutrition, 2012, 142(1): 99-104
- [28] le Morvan V, Dumon MF, Palos-Pinto A, et al. n-3 FA increase liver uptake of HDL-cholesterol in mice[J]. Lipids, 2002, 37(8): 767-772
- [29] Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, et al. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders[J]. Frontiers in Endocrinology, 2016, 7: 30
- [30] Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic and clinical implications[J]. Hepatology, 2010, 51(2): 679-689
- [31] Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis[J]. Journal of Lipid Research, 2002, 43(10): 1585-1594
- [32] Shang TT, Liu L, Zhou J, et al. Protective effects of various ratios of DHA/EPA supplementation on high-fat diet-induced liver damage in mice[J]. Lipids in Health and Disease, 2017, 16: 65
- [33] Sun C, Wei ZW, Li Y. DHA regulates lipogenesis and lipolysis genes in mice adipose and liver[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(2): 731-737
- [34] Raclot T, Groscolas R, Langin D, et al. Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues[J]. Journal of Lipid Research, 1997, 38(10): 1963-1972