

洋葱皮黄酮抑制脂肪细胞生成作用

Study on the inhibitory effect of onion peel flavonoids on adipocyte production

韩英¹ 林墨² 刘昊明² 许美娜² 徐红艳^{2,3} 李官浩^{2,3}

HAN Ying¹ LIN Mo² LIU Hao-ming² XU Mei-na² XU Hong-yan^{2,3} LI Guan-hao^{2,3}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130000; 2. 延边大学食品研究中心, 吉林 延吉 133000;

3. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133000)

(1. Processing and Storage of Agriculture Products of Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130000, China;

2. Food Research Center of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China;

3. Agricultural College of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China)

摘要:以乙醇提取洋葱皮中黄酮类化合物,通过正交试验优化提取工艺,验证实验显示洋葱皮黄酮提取率为 21.58%。通过制备液相分离黄酮类化合物单体,作用于 3T3-L1 前脂肪细胞,测定了洋葱皮黄酮类单体诱导分化第 8 天的 3T3-L1 前脂肪细胞中脂肪分化相关基因 FAS 的 mRNA 表达量。结果表明:槲皮素对 3T3-L1 前脂肪细胞分化抑制效果最好,加药处理组 FAS 的 mRNA 相对表达量都低于对照组的基因表达量,且槲皮素处理组基因表达量下调极为显著 ($P < 0.01$),说明洋葱皮中通过制备分离的黄酮类单体化合物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化具有抑制效果,抑制效果大小为槲皮素 > 山奈酚 > 芦丁。

关键词:洋葱皮;黄酮;抗肥胖;3T3-L1 前脂肪细胞;基因表达

Abstract: Extractions of flavonoid compounds in onion with ethanol, using the optimization factors of single factor and orthogonal design experiments, the flavonoids extraction rate of onion peel was 21.58%. The effect of quercetin on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes was best by separating the flavonoids from the liquid phase and acting on the 3T3-L1 preadipocytes. The expression of fat differentiation related gene FAS mRNA was measured in 3T3-L1 adipocytes induced by flavonoid monomers of onion skin for eighth days. The results showed that the relative expression of FAS in 3T3-L1 preadipocytes induced by mRNA in quercetin group was significantly lower than that in control group after 8D.

Keywords: Onion peel; flavonoids; anti obesity; 3T3-L1 preadipo-

基金项目:吉林省科技厅重点项目(编号:20140307011YY);中国博士后科学基金面上资助项目(编号:171950)

作者简介:韩英,女,吉林农业大学在读硕士研究生。

通信作者:李官浩(1975—),男,延边大学副教授,博士。

E-mail: ghli@ybu.edu.cn

收稿日期:2017-05-07

cytes; gene expression

洋葱(*Allium cepa* L.),又名葱头、圆葱、玉葱、球葱,为百合科葱属 2 年生草本植物,在中国分布很广^[1]。洋葱中含有硫化物、挥发油、多糖和前列腺素类等生物学活性成分,现阶段洋葱已经被开发研制成各种保健品,如洋葱汁、洋葱皮茶等。人们通过这些保健品来提高自身的免疫力,并通过改善免疫系统、新陈代谢防止自身老化、预防感冒等疾病^[2-3]。但洋葱和洋葱皮中富含的很多营养物质并没有完全开发出来,比如洋葱中黄酮(如槲皮素、山奈酚,以及花葵素、花青素和葡萄糖连接所构成的葡糖苷等)主要存在于鳞茎、叶和皮中,且洋葱鳞茎可食部分由外到内黄酮类物质含量依次降低^[4-6]。

由于不良的饮食习惯,肥胖症日益严重,临床人群也越来越年轻化。刘昊明等^[7]研究表明洋葱皮中的黄酮类物质具有抗肥胖作用。Augusti 等^[8]和 Fang 等^[9]将从大豆中提取的异黄酮,加入到肥胖大鼠的饲料里,发现肥胖大鼠体重较饲喂正常饲料的呈下减趋势。隋苗苗^[10]通过提取洋葱皮中总黄酮作用于小鼠肝脏细胞,证明洋葱皮中黄酮成分有抗肥胖作用。薛冬娜等^[11]通过灌胃小鼠试验证实了荷叶中的黄酮也是一种天然的减肥降脂成分。虽然关于黄酮类化合物对降脂减肥作用相关研究报道很多,但这些研究都主要以动物试验为主,且都以提取粗黄酮作用于肝脏及调控脂质代谢,有关制备提纯黄酮类单体化合物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化作用以及对脂合成相关转录基因研究较少。杨俊朋等^[12]研究表明,肥胖是因为脂肪细胞的分化增殖,以及脂肪细胞内的脂肪滴积聚过多所导致的。3T3-L1 前脂肪细胞是由多功能干细胞分化成充质前体细胞,再进一步发育而成的脂肪细胞,且 3T3-L1 前脂肪在适当诱导条件下,能够在体外

分化为成熟脂肪细胞,可以认为此细胞株能较好地模拟活体脂肪组织^[13]。如果能够通过一定的方法来抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化,将有助于预防或治疗肥胖。

本试验拟用从洋葱皮黄酮类化合物制备分离出的单体化合物,诱导分化 3T3-L1 前脂肪细胞,通过观察脂肪细胞的分化和抑制脂肪沉积相关基因 *FAS* 的 mRNA 的表达量,考察洋葱皮黄酮类单体化合物对 3T3-L1 前脂肪细胞抑制效果,为研发天然降脂减肥保健品提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

洋葱皮:采集于延吉市某农贸市场;

3T3-L 前脂肪细胞:中国科学院细胞典藏中心;

甲醇、乙腈:色谱纯,迪马科技有限公司;

无水乙醇、磷酸:分析纯,科密欧化学试剂有限公司;

芦丁、槲皮素、山奈酚标准品:北京索莱宝科技有限公司;

增殖培养基:北京淘素生物科技有限公司;

胎牛血清(FBS):美国 Hy Clone 公司;

地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素:美国 Sigma 公司。

1.1.2 主要仪器与设备

电子天平:FA1104N 型,上海精密科学有限公司;

旋转蒸发器:FYFLAN-1001 型,东京理化器械株式会社;

糖度计:WY032T 型,重庆蜀江科技贸易有限公司;

高速粉碎机:FW-200 型,北京中兴伟业仪器有限公司;

旋转蒸发器:EYELAN-1001 型,东京理化器械株式会社;

冷冻干燥机:LGH-18 型,北京松源华兴科技发展有限公司;

高效液相色谱仪:LC-2010 型,日本岛津公司;

CO₂ 细胞恒温培养箱:MCO-20AIC 型,日本山洋公司;

倒置显微镜:MC20-C 型,重庆光电仪器有限公司;

台式低速离心机:TDZ5-WS 型,湖南赫西仪器装备有限公司;

-80℃ 冰箱:86-150W 型,海尔集团公司;

PCR 扩增仪:TC-96/G/H(b)C 型,杭州博日科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 洋葱皮提取物的制备 将洋葱皮擦净烘干粉碎,用乙醇提取趁热过滤,滤渣中加一定量的醇水溶液,在相同温度下萃取 30 min 后过滤,按此方法再进行一次,将 3 次滤液合并,浓缩至原体积的 1/5,冷冻干燥,采用高效分析液相测定并计算提取率。在前期单因素试验结果的基础上建立正交试验因素水平表(表 1),通过正交试验确定最佳提取工艺^[14]。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Orthogonal test of onion peel extract

水平	A 固液比 (g/mL)	B 提取温度 /°C	C 提取时间/ h	D 乙醇浓度/ %
1	1:20	80	1.0	40
2	1:30	85	1.5	50
3	1:40	90	2.0	60

1.2.2 洋葱皮黄酮类单体化合物的制备 采用 Waters Pre-HPLC 对洋葱皮黄酮类物质进行制备^[15],收集黄酮单体,色谱条件:流速为 8 mL/min,以甲醇和水作为流动相,分别选取体积比为甲醇:水=60:40、甲醇:水=55:45 以及甲醇:水=50:50 的条件下,等度洗脱 80 min,流动相在波长 270 nm 紫外吸收的出峰顺序接收单体。

1.2.3 黄酮类物质的测定方法 使用高效液相色谱仪,在色谱柱条件为 Diamonsil C₁₈ (250×4.6 mm 5 μm),选择体积比为 20:80 的乙腈—0.5% 甲酸溶液作为流动相,柱温条件 27℃,流速 0.9 mL/min,进样量 10 μL,在 370 nm 波长下测定黄酮类物质^[16-17]。

1.2.4 洋葱皮黄酮类单体化合物对 3T3-L1 前脂肪细胞的影响 制备分离的芦丁、槲皮素、山奈酚用分化前期培养基(成分:50 mL 增殖培养基+5 μL 地塞米松+250 μL 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)配成 70 μg/mL 的浓度作用于 3T3-L1 前脂肪细胞 48 h 后,当细胞回合度达到 90% 以上时,用磷酸盐缓冲液清洗 2 次后,再用配置浓度为 70 μL/mL 的芦丁组、槲皮素组、山奈酚组的分化后期培养基(成分:1 mL 增殖培养基+1 μg 胰岛素)每 2 d 更换一次分化培养基,在分化诱导第 8 天,用显微镜观察对照组与加药处理组的脂肪滴沉积现象,并加入解离液刮板提取分化诱导第 8 天时 3T3-L1 前脂肪细胞 RNA,用荧光定量法(PCR 试剂盒)测出 *FAS* 的 mRNA 基因表达量。

1.2.5 统计分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 洋葱皮提取黄酮正交试验结果与分析

由表 2、3 可知,影响洋葱皮黄酮提取率的因素主次依次为固液比、提取时间、提取温度、乙醇浓度;各因素对洋葱皮黄酮得率均有极显著影响;最优提取工艺为 A₃B₃C₂D₁。而正交表中的最优组也为 A₃B₃C₂D₁,故洋葱皮提取黄酮类化合物的最优条件为固液比 1:40 (g/mL)、提取时间 1.5 h、提取温度 90℃、乙醇浓度 40%。

2.2 黄酮类化合物单体对 3T3-L1 前脂肪细胞的分化抑制效果

由图 1 可知,芦丁、槲皮素、山奈酚处理组的脂肪滴明显少于对照组的脂肪滴,说明从洋葱中提取的黄酮单体化合物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化有抑制作用,抑制效果槲皮素>山奈酚>芦丁。

表 2 洋葱皮提取异黄酮 L₉ (3⁴) 正交试验设计及方差分析

Table 2 Orthogonal design and analysis of isoflavones L₉ (3⁴) by onion peel

序号	A	B	C	D	黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	17.36
2	1	2	2	2	17.78
3	1	3	3	3	17.62
4	2	1	2	3	19.57
5	2	2	3	1	19.40
6	2	3	1	2	19.25
7	3	1	3	2	20.83
8	3	2	1	3	20.39
9	3	3	2	1	21.58

k ₁	0.175 9	0.192 5	0.190 0	0.194 5	
k ₂	0.194 1	0.191 9	0.196 4	0.192 9	
k ₃	0.209 3	0.194 8	0.192 8	0.191 9	
R	0.033 5	0.002 9	0.006 4	0.002 6	
因素主次	A	C	B	D	

表 3 方差分析表[†]

Table 3 Variance analysis table

来源	III 型平方和	自由度	均方	F 值	显著性
校正模型	54.697 ^a	8	6.837	1 895.311	* *
截距	10 043.339	1	10 043.339	2 784 087.758	* *
A	51.725	2	25.863	7 169.344	* *
B	0.607	2	0.303	84.086	* *
C	2.129	2	1.065	295.100	* *
D	0.236	2	0.118	32.714	* *

误差	0.065	18	0.004		
总计	10 098.101	27			
校正的总计	54.762	26			

† * * 表示影响极显著, P<0.01; a 为小数点后数比较多软件自动生成。

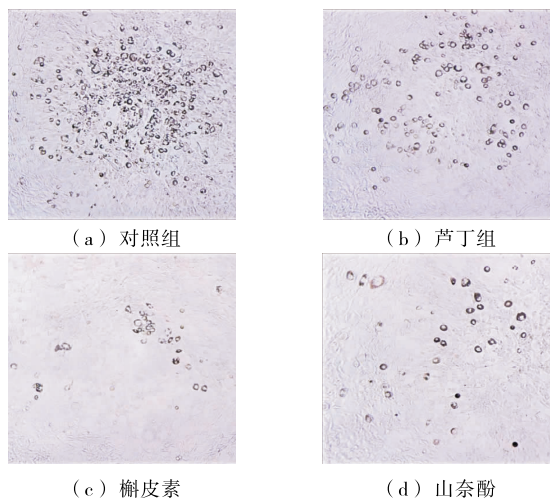


图 1 洋葱皮提取物芦丁、槲皮素、山奈酚以 70 μg/mL 作用于 3T3-L1 前脂肪细胞的分化影响(×200)

Figure 1 The fermentation of onion peel extract rutin, quercetin, kaempferol in 70 μg/mL on 3T3-L1 adipocyte differentiation effect

2.3 加药后分化诱导 8 d 时 3T3-L1 前脂肪细胞基因的表达量

由图 2 可知,将 70 μg/mL 芦丁、槲皮素、山奈酚作用于 3T3-L1 前脂肪细胞分化 8 d 后,可以看到 70 μg/mL 加药处理组 FAS 的 mRNA 相对表达量与对照组相比都显著降低了,其中槲皮素处理组(P<0.01)基因表达量下调极为显著。说明洋葱皮黄酮类提取物单体在以 70 μg/mL 浓度作用于 3T3-L1 前脂肪细胞可以通过调控抑制 FAS 脂肪因子表达量抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化,其中槲皮素处理组表达量下调最为显著,说明洋葱皮总黄酮抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化作用过程中,槲皮素起主要作用。

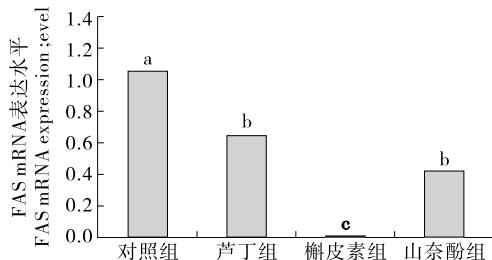


图 2 脂肪代谢相关基因的 FAS mRNA 相对表达量
Figure 2 Relative expression of FAS mRNA in fat metabolism-related genes

3 结论

本试验结果表明,洋葱皮中提取制备的黄酮类单体化合物芦丁、槲皮素、山奈酚可调控 FAS 的 mRNA 表达量抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化,且槲皮素的抑制效果最为显著。隋苗苗^{[10]17-35}的试验结果表明,洋葱皮中含量最多的黄酮类物质为槲皮素,通过动物试验测定了小鼠血脂水平及肝脏细胞形态,通过脂质代谢及是否有效抑制肝脏细胞膨大证明洋葱皮具有抗肥胖作用。本研究进一步证明了洋葱皮中黄酮类物质具有抗肥胖作用,为高效新型天然降脂减肥保健品的研发提供了理论依据,并提高了洋葱皮的附加值。

参考文献

[1] 周长久. 蔬菜种质资源概论[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1995: 98-113.

[2] SMITH E A, SHIELDS E J, NAULT B A. Onion thrips colonization of onion fields bordering crop and non-crop habitats in muck cropping systems[J]. Journal of Applied Entomology, 2017, 141(7): 574-582.

[3] CHOI S M, LEE D J, KIM J Y, et al. Volatile composition and sensory characteristics of onion powders prepared by convective drying[J]. Food Chemistry, 2017, 231(15): 386-392.

[4] 冯长根, 吴悟贤, 刘霞, 等. 洋葱的化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2003, 37(7): 63-64.

[5] 付学军. 洋葱功能成分及其应用研究[D]. 济南: 山东大学, 2006: 8-14.

[6] CHEN J H, CHEN H I, WANG J S, et al. Effects of welsh onion extracts on human platelet function in vitro.[J]. Life Sciences, 2000, 66(17): 1 571-1 579.

(下转第 43 页)

- 水产品中 18 种磺胺类药物残留量[J]. 食品科学, 2009(24): 294-298.
- [6] 仲兆金. 喹诺酮类药物的毒性[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2001(1): 31-33.
- [7] Codex Alimentarius Commission. CAC/MRL 2-2015 Maximum Residue Limits (Mrls) and Risk Management Recommendations (Rmrs) for Residues of Veterinary Drugs In Foods [S/OL]. (2015-08-12) [2017-08-20]. <http://down.foodmate.net/standard/sort/11/46551.html>.
- [8] European Union. Regulation (EC) No 470/2009 of the European parliament and of the council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council[S/OL]. (2009-06-05)[2017-08-20]. <http://down.foodmate.net/standard/sort/44/28727.html>.
- [9] 中华人民共和国农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量 中华人民共和国农业部公告第 235 号[S/OL]. (2002-12-24)[2017-08-20]. http://www.moa.gov.cn/zwl/m/tzgg/gg/200302/t20030226_59300.htm.
- [10] 张鸿雁, 崔小军, 耿金培, 等. 动物源性食品中磺胺类药物的多残留酶联免疫测定方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008(9): 181-183.
- [11] 于雪芝. 基于单链抗体的牛奶中 21 磺胺和 20 氟喹诺酮类药物残留生物发光免疫分析方法研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016: 52-74.
- [12] 吴翠琴, 雷金妹, 李韵灵, 等. 基于离子液体的分散液液微萃取-柱前荧光衍生高效液相色谱法测定水样中 8 种磺胺类药物[J]. 色谱, 2014(12): 1362-1367.
- [13] 张丽媛, 王颖, 张东杰. IL-HLLME-HPLC 法测定酸奶中磺胺类抗生素[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 71-75.
- [14] ZHANG Zhi-wen, LI Xiao-wei, DING Shuang-yang, et al. Multiresidue analysis of sulfonamides, quinolones, and tetracyclines in animal tissues by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chem, 2016, 204: 252-262.
- [15] TIAN He, WANG Jia-qi, ZHANG Yang-dong, et al. Quantitative multiresidue analysis of antibiotics in milk and milk powder by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1033-1034: 172-181.
- [16] 孟哲, 石志红, 吕运开, 等. 超高效液相色谱-高分辨四级杆飞行时间质谱法快速筛查乳制品中磺胺类与氟喹诺酮类药物[J]. 分析化学, 2014(10): 1493-1500.
- [17] 孔聪, 周哲, 汪洋, 等. 超高压液相色谱串联高分辨质谱筛查渔用投入品中禁限用药物[J]. 分析化学, 2017(2): 245-252.
- [18] WANG Jian. Development and validation of a multiclass method for analysis of veterinary drug residues in milk using ultrahigh performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole orbitrap mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(41): 9175-9187.
- [19] 林品言, 杜红梅. 酶联免疫法快速检测水产品中磺胺类药物残留[J]. 当代水产, 2016(10): 94-95.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范食品理化检测[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 27.
- [21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 21316—2007 动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定方法液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 1.
- [22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 20751—2006 鳗鱼及其制品中十五中喹诺酮类药物残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 2.
- [23] 中华人民共和国农业部. 农业部 985 号公告-12-2007 水产品中磺胺类药物残留量的测定液相色谱[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 5.
- [24] 唐炜, 李龙飞. 固相萃取-HPLC 法检测食品中四种磺胺类兽药残留[J]. 食品研究与开发, 2013(18): 62-65.
- [25] 木合他拜尔, 严华, 徐姗, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-高分辨串联质谱技术检测鸡肉中 6 种抗球虫药物[J]. 色谱, 2015(11): 1199-1204.
- [26] 刘晓丹. 中国食品安全刑法规制的实践困境与完善路径[J]. 食品与机械, 2017, 33(1): 65-67.

(上接第 33 页)

- [7] 刘昊明, 魏丹, 等. 洋葱皮提取物对营养性肥胖大鼠的减肥作用[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 160-163.
- [8] AUGUSTI K T, ARATHY S L, ASHA R. A comparative study on the beneficial effects of garlic, amla and onion on the hyperlipidemia induced by butter fat and beef fat in rats [J]. Experimental Biology, 2001, 39(8): 760-766.
- [9] FANG Wei, RUAN Jin-lan, WANG Zhong, et al. Acetylated flavanone glycosides from the rhizomes of *Cyclosorus acuminatus* [J]. Natural Products, 2006, 69(11): 1641-1644.
- [10] 隋苗苗. 洋葱皮黄酮类化合物对 C57BL/6J 小鼠抗肥胖作用的研究[D]. 延吉: 延边大学, 2014.
- [11] 薛冬娜. 荷叶总黄酮提取纯化工艺及减肥降脂作用的研究[D]. 西安: 西南大学, 2008: 33-38.
- [12] 杨俊朋. GLP-1 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响及其调控机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2013: 15-17.
- [13] 迟玉杨. LiCl 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化以及 Villin2 和 β -catenin 基因表达的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2016: 10-12.
- [14] 蒋益虹. 荷叶黄酮的乙醇提取工艺优化研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(4): 168-171.
- [15] 陈勇. 荷叶黄酮提取、分离纯化及其抗氧化活性的研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2006: 26-27.
- [16] 陆叶, 陈桢, 肖旭, 等. 高效液相色谱法测定秋鼠麴草中总黄酮的含量[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2012, 32(1): 81-83.
- [17] 吴亚林, 李小平, 傅求平, 等. RP-HPLC 测定委陵菜中槲皮素含量研究[J]. 园艺与种苗, 2013(2): 4-5.