

大豆胰蛋白酶抑制剂对饮食肥胖小鼠的减肥作用

黄高霞, 张莉, 汪东风, 宋彦斌

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要:采用断乳 ICR 小鼠为实验动物, 第一阶段小鼠分为 2 组, 正常小鼠组 (NM) 与肥胖模型小鼠组 (FM), 建立饮食肥胖小鼠模型; 第二阶段 NM 作为肥胖预防组, FM 作为肥胖治疗组, 分别灌胃大豆胰蛋白酶抑制剂 (soybean trypsin inhibitor, SBTI)。实验结束时, 称体重, 血液离心取得血清, 测定甘油三酯 (TG)、游离脂肪酸 (FFA)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、总胆固醇 (TCH) 等指标, 研究 SBTI 对饮食肥胖小鼠的减肥作用。结果表明: 与预防对照组相比, 肥胖预防组 SBTI 高剂量组的体重极显著降低 ($P < 0.01$), TG 和 FFA 显著降低 ($P < 0.05$), HDL-C 显著升高 ($P < 0.05$); 与模型对照组相比, 肥胖治疗组 SBTI 高剂量组的体重极显著降低 ($P < 0.01$), TG 和 FFA 显著降低 ($P < 0.05$), HDL-C 显著升高 ($P < 0.05$); 2 组的 TCH 与相应对照组相比, 差异均不显著 ($P > 0.05$)。因此, SBTI 对饮食肥胖有一定的预防和作用。

关键词:大豆胰蛋白酶抑制剂 (SBTI); 高脂饮食; 肥胖; 减肥

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)02-0284-04

Soybean Trypsin Inhibitor Shows Anti-obesity Effect in High Fat Diet-Induced Obesity Mice

HUANG Gao-xia, ZHANG Li, WANG Dong-feng, SONG Yan-bin

(College of Food Science & Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China)

Abstract: One hundred and twenty weaning ICR mice were divided into 2 groups, normal mice (NM) and fat mice (FM) to establish high fat diet-induced obesity mice model. When the final weight of FM were higher than NM by 20%, NM and FM were regarded as obesity prevention and treatment group, respectively, and three dosages of SBTI were given by gavage for 42 d. At the end of the experiment, weight and triglyceride (TG), free fatty acid (FFA), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), total cholesterol (TCH) were determined to investigate the anti-obesity effect of SBTI in obesity model. The result showed that compared with prevention control group, weight, TG, FFA of the obesity prevention group with high dosage SBTI significantly decreased, HDL-C of that group significantly increased. Compared with model control group, weight, TG, FFA of the obesity treatment group with high dosage SBTI significantly decreased, HDL-C of that group significantly increased. The differences of TCH were not significant in both groups. So it suggests that SBTI is effective for obesity prevention and treatment.

Key words: Soybean trypsin inhibitor (SBTI); High fat diet; Obesity; Weight reducing

随着生活水平的不断提高及运动量的减少, 肥胖越来越成为困扰现代人的一大顽疾。世界卫生组织 (WHO) 明确认定肥胖是全球成年人面临的最大慢性疾病, 视为世界四大医学社会问题之一。据有关调查显示, 全球 2008 年起有 10% 以上的成人超重, 其中 2 亿多男性和近 3 亿女性为肥胖^[1]。肥胖者中有 95% 以上是单纯性肥胖, 即摄入过多, 能量过剩, 促进了脂肪的累积所造成的肥胖。

大豆胰蛋白酶抑制剂 (soybean trypsin inhibitor,

SBTI) 近年来已经引起了人们的重视。SBTI 具有多种生理功能, 如抗虫作用, 对棉铃虫等具有增加死亡率等效果^[2-3], 应用于转基因作物及生物农药等^[4-6]; 此外, SBTI 在抑制肿瘤及治疗艾滋病方面表现出了很好的前景^[7-8]。另外, 也有报道称生大豆粉可以使幼猪、小鸡及啮齿类动物体重增长缓慢^[9-11], 提示 SBTI 可能有减肥作用。我国大豆资源丰富, 在用大豆生产分离蛋白时要产生大量的乳清废液, 而生产 1 t 分离蛋白, 就会产生 60 ~ 80 m³ 的

收稿日期: 2012-02-22

基金项目: 山东省自然科学基金重点项目 (Z2004D05); 山东省自然科学基金项目 (Q2008D11); 教育部博士点基金立项课题 (20110132110007)。

第一作者简介: 黄高霞 (1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆胰蛋白酶抑制剂。E-mail: huanggaox@126.com。

通讯作者: 汪东风 (1956-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品化学与营养。E-mail: wangdf@ouc.edu.cn。

乳清废液,而乳清废液中含有大量的 SBTI。该文研究了从大豆乳清中分离出的 SBTI 对饮食肥胖小鼠的减肥作用,以期防治肥胖和乳清废液的高值化利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 动物与饲料 雄性断乳 1 周龄 ICR 小鼠(体重 17.3 ± 0.05 g),青岛市实验动物和动物实验中心提供;重酒石酸胆碱,甲硫氨酸等均为国产分析纯;淀粉,蔗糖,大豆油等饲料成分均为食品级。

1.1.2 试剂 牛血清白蛋白(BSA),sigma 公司;栽培大豆,购于青岛南山批发市场;雅塑·奥利司他(orlistat)胶囊,重庆植恩药业有限公司;甘油三酯(TG)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒、总胆固醇(TCH)测定试剂盒,游离脂肪酸(FFA)测定试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供。

1.1.3 仪器 PHS-25 型酸度计,上海精密仪器厂;UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计,尤尼柯上海仪器有限公司;FD-1D 冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;电动搅拌器,金城国胜实验仪器厂;Gene5 Power-Wave XS2 酶标仪,基因有限公司;雷勃尔 LD5-10 低速离心机,北京雷勃尔离心机有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SBTI 的提取 参照 Zhang 等^[12]的分离提取方法,得到 SBTI 粗品,粗品比活力 $9.5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,用于动物实验。

1.2.2 实验设计 饲料分为基础饲料与高脂饲料,基础饲料由酪蛋白、大豆油、淀粉、纤维素、矿物质、维生素、甲硫氨酸、重酒石酸胆碱等制成,高脂饲料为基础饲料加入猪油及蔗糖制成,基础饲料总热量 $3850 \text{ kJ} \cdot \text{kg}^{-1}$,脂肪提供的热量占总热量的 11.7%,高脂饲料总热量 $4850 \text{ kJ} \cdot \text{kg}^{-1}$,脂肪提供的热量占总热量的 48.5%。

雄性断乳 ICR 小鼠 120 只,实验分为 2 个阶段,第一阶段为建立肥胖模型,小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 2 组,一组为正常小鼠组(NM),饲喂基础饲料;另一组为肥胖模型小鼠组(FM),饲喂高脂饲料;肥胖模型组比正常小鼠组体重超出 20% 即认为肥胖模型造模成功,造模成功后进行第二阶段实验。

第二阶段为 SBTI 对小鼠肥胖的影响,分为肥胖预防实验与肥胖治疗实验。将 NM 组分为 NM1、NM2 和 NM3,作为肥胖预防组:NM1 共 8 只,饲喂基础饲料,灌胃生理盐水,作为空白对照组;NM2 共 13 只,饲喂高脂饲料,灌胃生理盐水,作为预防对照组;NM3 共 39 只,饲喂高脂饲料,灌胃 SBTI,作为肥胖预防组,其中 SBTI 剂量又分为低(NM3-1)、中(NM3-2)、高(NM3-3)3 个剂量,每个剂量组 13 只小鼠,低剂量组为 $45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,中剂量组为 $112 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,高剂量组为 $225 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。FM 组又分为 FM1、FM2、FM3,作为肥胖治疗组:FM1 共 8 只,饲喂基础饲料,灌胃生理盐水,作为模型对照组;FM2 共 13 只,饲喂基础饲料,灌胃 orlistat,作为阳性药对照组,阳性药 orlistat 的剂量为 $60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;FM3 共 39 只,饲喂基础饲料,灌胃 SBTI,作为肥胖治疗组,其中 SBTI 剂量又分为低(FM3-1)、中(FM3-2)、高(FM3-3)3 个剂量,每个剂量组 13 只小鼠,低剂量组为 $55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,中剂量组为 $137 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,高剂量组为 $275 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

每天上午 9:00 灌胃,3 d 称 1 次体重,实验持续 42 d,实验结束时,禁食 12 h,解剖小鼠,眼球取血,脱颈椎处死,3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 得到血清,立即保存于 -60°C ,用于后续检测 TG、TCH、HDL-C 及 FFA,均采用试剂盒检测。饲养期间所有小鼠自由摄食及饮水。

1.3 数据分析

数据分析应用 SPSS 19.0 统计软件进行 t 检验,数据以平均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s$)表示。

2. 结果与分析

2.1 建立肥胖模型

由图 1 可知,FM 组与 NM 组开始体重差别并不大,为 23 ~ 26 g,FM 组饲喂高脂饲料后,体重增长

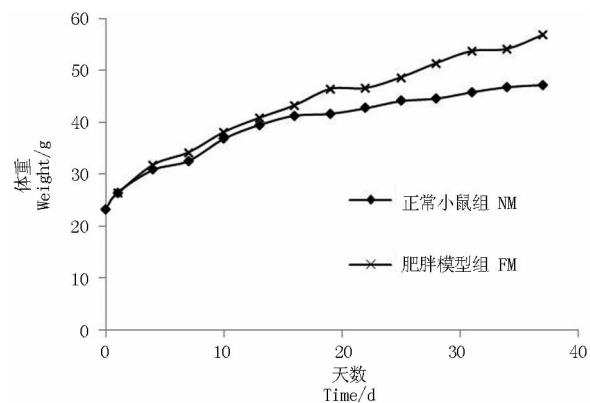


图 1 肥胖造模实验小鼠体重变化

Fig. 1 Changes of mice weight during obesity modeling

较快,造模结束时,FM组体重达到了57 g左右,而NM组为47 g左右,FM组终体重比NM组终体重高出20%,显著高于NM组,说明小鼠肥胖模型成功建立,可用于下一步实验。

2.2 SBTI 对小鼠饮食肥胖的预防作用

2.2.1 体重 如表1所示,各组的初始体重相差不

表1 肥胖预防实验小鼠体重变化

Table 1 Changes of mice weight in prevention experiment

组别 Groups	初体重 Initial weight/g	终体重 Final weight/g
NM1	47.6 ± 0.8	47.8 ± 0.8
NM2	47.8 ± 0.5	56.8 ± 0.7 **
NM3-1	47.4 ± 0.8	43.3 ± 0.5 *
NM3-2	46.2 ± 0.9	40.7 ± 0.8 *
NM3-3	47.2 ± 1.1	40.8 ± 1.6 *

*代表与NM2终体重相比差异极显著($P < 0.01$);**代表与NM1终体重相比差异极显著($P < 0.01$)。

* represents that compared with final weight of NM2, the difference is very significant ($P < 0.01$); ** represents that compared with final weight of NM1, the difference is very significant ($P < 0.01$).

表2 SBTI对肥胖预防实验小鼠血脂的影响

Table 2 Effect of SBTI on the serum lipid parameters of mice in the prevention experiment ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别 Groups	甘油三酯 TG	总胆固醇 TCH	高密度脂蛋白 HDL-C	游离脂肪酸 FFA
NM1	1.73 ± 0.15	2.95 ± 0.49	1.56 ± 0.13	0.63 ± 0.1
NM2	2.21 ± 0.21	5.56 ± 0.86	1.41 ± 0.12	2.29 ± 0.11
NM3-1	1.90 ± 0.1	6.02 ± 0.87	1.57 ± 0.14	1.99 ± 0.09
NM3-2	1.58 ± 0.1 *	5.46 ± 0.42	1.65 ± 0.11	1.54 ± 0.16 *
NM3-3	1.40 ± 0.07 *	4.92 ± 0.48	1.98 ± 0.10 *	0.67 ± 0.06 *

*代表与NM2相比差异显著($P < 0.05$)。

* represents that compared with NM2, the difference is significant ($P < 0.05$).

2.3 SBTI 对饮食肥胖小鼠的减肥治疗作用

2.3.1 体重 如表3所示,各组的初始体重相差不大,而经过42 d的处理,饲喂基础饲料的模型对照组FM1组的体重有小幅下降。饲喂基础饲料的FM2、FM3-1、FM3-2、FM3-3的体重有大幅降低,且与FM1组终体重相比,具有极显著性差异($P < 0.01$),FM3-2、FM3-3与FM2终体重差异不显著。由此可推断,SBTI对饮食肥胖小鼠的体重有明显的降低作用,且效果与阳性药相当。

2.3.2 血脂 如表4所示,与FM1组相比,灌胃SBTI及阳性药orlistat均使TG显著降低($P < 0.05$),且SBTI的效果呈现剂量依赖性。灌胃SBTI及Orlistat使TCH有所变化,但差异不显著($P > 0.05$)。灌胃SBTI中剂量及Orlistat能升高HDL-C,但差异不显著($P > 0.05$),SBTI高剂量能显著升高HDL-C($P < 0.05$)。灌胃SBTI及orlistat均使FFA

大,而经过42 d的处理,NM1体重几乎没有变化,NM2体重增长较快,且终体重与NM1相比具有极显著差异($P < 0.01$)。而灌胃SBTI的低、中、高剂量3组体重都明显下降,终体重与NM2相比具有极显著差异($P < 0.01$)。因此,SBTI具有降低高脂饮食小鼠体重过度增长的作用。

2.2.2 血脂 如表2所示,与NM1相比,NM2组的小鼠的TG、TCH和FFA值均升高,HDL-C降低。与NM2组相比,灌胃SBTI低剂量组使得TG有所降低,但差异不显著($P > 0.05$),灌胃SBTI中高剂量组都使得TG显著降低($P < 0.05$);灌胃SBTI能使TCH有所降低,但差异不显著($P > 0.05$);灌胃SBTI低中剂量组都能升高HDL-C,但差异不显著($P > 0.05$),SBTI高剂量组能显著升高HDL-C($P < 0.05$);灌胃SBTI低剂量组能降低FFA含量,但差异不显著($P > 0.05$),SBTI中高剂量组使得FFA含量显著降低($P < 0.05$)。因此,SBTI对饲喂高脂饮食的小鼠的血脂状况有明显的改善作用。

含量显著降低($P < 0.05$)。因此,SBTI对高脂饮食肥胖小鼠的血脂状况有明显的改善作用,且效果与阳性药相当。

表3 肥胖治疗实验小鼠体重变化

Table 3 Changes of mice weight in treatment experiment

组别 Groups	初体重 Initial weight/g	终体重 Final weight/g
FM1	56.5 ± 1.2	51.7 ± 0.9
FM2	56.3 ± 1.2	38.3 ± 0.8 *
FM3-1	56.2 ± 0.9	47.3 ± 0.5 *
FM3-2	56.3 ± 1.1	38.6 ± 0.7 *
FM3-3	56.3 ± 1.1	37.6 ± 0.9 *

*代表与FM1终体重相比差异极显著($P < 0.01$)。

* represents that compared with final weight of FM1, the difference is very significant ($P < 0.01$).

表 4 SBTI 对肥胖治疗实验中小鼠血脂的影响

Table 4 Effect of SBTI on the serum lipid parameters of mice in the treatment experiment(mmol·L⁻¹)

组别 Groups	甘油三酯 TG	总胆固醇 TCH	高密度脂蛋白 HDL-C	游离脂肪酸 FFA
FM1	2.51 ±0.19	3.63 ±0.66	1.35 ±0.10	2.36 ±0.10
FM2	1.29 ±0.05 *	3.41 ±0.46	1.62 ±0.13	0.86 ±0.15 *
FM3-1	1.78 ±0.10 *	3.76 ±0.50	1.29 ±0.09	1.73 ±0.11 *
FM3-2	1.58 ±0.11 *	3.88 ±0.43	1.51 ±0.11	1.29 ±0.14 *
FM3-3	1.39 ±0.14 *	2.99 ±0.43	1.73 ±0.07 *	0.64 ±0.07 *

* 代表与 FM1 相比差异显著($P < 0.05$)。

* represents that compared with FM1,the difference is significant($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

肥胖不仅使人的行动笨拙,带来生活上的不便,还会增加心脑血管疾病、糖尿病^[13]等疾病的发病率,严重威胁人们的健康。减肥的保健品、药品的研制也是热点,但效果明显的产品并不多,所以要继续寻找预防治疗肥胖的物质。SBTI 作为一种抗营养因子,长期被当作有害物质,认为它的存在降低了大豆的营养价值^[14],甚至危害人们的健康,但近年来 SBTI 的药用价值引起了极大关注,该文从 SBTI 对肥胖的影响这一全新的角度进行研究,明确了 SBTI 具有的良好的减肥效果。

对高脂饮食小鼠,SBTI 不仅能有效防止体重过度增长,对高脂饮食诱导的肥胖小鼠也能使其体重明显下降,对 TG、HDL-C、FFA 等血脂指标的改善作用也很明显。该文提示 SBTI 对高脂饮食诱导的肥胖有很好的预防及治疗作用,为研制新型减肥物质提供了一个新的参考,也为大豆乳清废液的高值化利用开拓了一个新途径。

参考文献

[1] 陈璐璐. 肥胖研究年度报告[R]. 武汉:华中科技大学附属协和医院,2011. (Chen L L. The annual report of obesity[R]. Wuhan: Union Hospital Huazhong University of Science and Technology, 2011.)

[2] 张莉,汪东风,张宾,等. 豆类植物蛋白酶抑制剂研究进展[J]. 大豆科学,2006,25(3):314-319. (Zhang L, Wang D F, Zhang B, et al. Advances in the study of protease inhibitors from leguminous plants[J]. Soybean Science, 2006, 25(3): 314-319.)

[3] 谢可方,董爱武,忻骅,等. 大豆 KUNITZ 型胰蛋白酶抑制剂的稳定性及抗虫性研究[J]. 复旦学报(自然科学版),2002,41(6):631-634. (Xie K F, Dong A W, Xin H, et al. A study of the stability and insect resistance of soybean Kuntiz-type trypsin inhibitor[J]. Journal of Fudan University(Nature Science Edition), 2002, 41(6): 631-634.)

[4] 郝贵霞,朱祯,朱之悌. 豇豆蛋白酶抑制剂基因转化毛白杨的研究[J]. 植物学报,1999,41(12):1276-1282. (Hao G X, Zhu Z, Zhu Z T. Transformation of populus tomentosa with insecticidal

cowpea proteinase inhibitor gene[J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(12):1276-1282.)

[5] 师校欣,王斌,杜国强,等. 根癌农杆菌介导豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转入苹果主栽品种[J]. 园艺学报,2000,27(4):282-284. (Shi X X, Wang B, Du G Q, et al. Studies on *Agrobacterium* mediated *CpTI* gene tranfer in commercial apple cultivars[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27(4): 282-284.)

[6] 高越峰,朱祯,肖桂芳,等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的分离及其在抗虫植物基因工程中的应用[J]. 植物学报,1998,40(5):405-411. (Gao Y F, Zhu Z, Xiao G F, et al. Isolation of soybean Kunitz trypsin inhibitor gene and its application in plant insect resistant genetic engineering [J]. Acta Botanica Sinica, 1998, 40(5): 405-411.)

[7] 蔡步林,李卓荣. 人类免疫缺陷病毒蛋白酶抑制剂的研究开发与展望[J]. 中国生化药物杂志,2005,26(3):179-182. (Cai B L, Li Z R. The research and development of HIV protease inhibitors and future perspectives [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2005, 26(3): 179-182.)

[8] Augustine O F, Ashutosh P B. Long-term feeding of field bean protein containing protease inhibitors suppresses virus-induced mammary tumors in mice[J]. Cancer Letters, 1997, 116(1):1-7.

[9] Garthoffa L H, Hendersona G R, Sagera A O, et al. The Autosow raised miniature swine as a model for assessing the effects of dietary soy trypsin inhibitor[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40(4):487-500.

[10] Almquist H J, Merritt J B. Effect of soybean antitrypsin on growth of the chick[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1951, 35(2):352-354.

[11] Lee S H, Park I S. Effects of soybean diet on the β -cells in the streptozotocin[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2000, 47(1):1-13.

[12] Zhang L, Zhang B, Lin H, et al. Preparation of trypsin-immobilised chitosan beads and their application to the purification of soybean trypsin inhibitor[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88(13):2332-2339.

[13] 邱伟强,陈舜胜,王建中,等. 章鱼胺对营养性肥胖小鼠减肥作用的研究[J]. 湖南农业科学,2009(12):15-17. (Qiu W Q, Chen S S, Wang J Z, et al. Weight reducing effect of octopamine on nutritional obesity mice [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2009(12): 15-17.)

[14] Bajpai S, Sharma A, Gupta M N. Removal and recovery of anti-nutritional factors from soybean flour[J]. Food Chemistry, 2005, 89(4):497-501.