

# 马钱苷对胎牛血清诱导的 L02 细胞脂肪变性的抑制作用

刘淑敏, 孙嘉蔚, 陈小丹, 潘毅, 王标诗

(岭南师范学院食品科学与工程学院, 广东湛江 524048)

**摘要:** 为了探究马钱苷对细胞脂肪变性的抑制作用及相关机制, 以 50%胎牛血清诱导 L02 细胞建立脂肪变性模型, 通过 MTT 法和油红 O 染色法测定了马钱苷对脂变细胞增殖的抑制情况, 并采用相应试剂盒测定了实验细胞上清液中谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 酶活、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglycerides, TG) 水平以及细胞内 TC、TG 和硫代巴比妥酸反应物 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 水平。MTT 结果显示, 与模型组相比, 马钱苷各浓度组可显著抑制脂变细胞增殖 ( $p < 0.05$ ), 抑制率为 14.6%~26.91%; 油红 O 观察发现, 马钱苷处理能够剂量依赖性减少胞浆内脂滴累积; 与模型组相比, 马钱苷处理组细胞外 AST、ALT 和 LDH 酶活分别下降 26.70%~52.58%、24.83%~61.23% 和 14.53%~28.83%, 胞外 TC 和 TG 水平分别下降 50.46%~68.76% 和 32.51%~53.37%, 胞内 TC 和 TG 水平分别下降 11.48%~32.79% 和 10.50%~18.30%, 胞内 TBARS 水平下降 40.33%~60.10%, 呈现明显剂量-效应关系, 且效果均强于自然恢复组。实验结果表明, 马钱苷能够显著减少因脂质代谢紊乱和脂质过氧化引起的 L02 细胞损伤, 抑制胎牛血清诱导的 L02 细胞脂肪变性。

**关键词:** 马钱苷; 脂肪变性; 高血脂; L02 细胞; 抑制作用

文章编号: 1673-9078(2021)03-16-22

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.3.0819

## Inhibition Effects of Loganin on Fetal Bovine Serum-induced Steatosis in Human Liver Cell Line L02

LIU Shu-min, SUN Jia-wei, CHEN Xiao-dan, PAN Yi, WANG Biao-shi

(College of Food Science and Engineering, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China)

**Abstract:** In this research, 50% fetal bovine serum (FBS)-induced steatosis in human liver cell line L02 cell was used as model to investigate the therapeutic effects of loganin on cellular steatosis. The inhibitive effect of loganin on cell proliferation was detected with MTT method and Oil red O staining method. The enzymatic activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) and levels of total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) in cell supernatant, as well as the intracellular levels of TC, TG and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined with corresponding assay kits. MTT results showed that compared with the model group, different concentrations of loganin could significantly inhibit the growth of steatosis L02 cells ( $p < 0.05$ ), the inhibitory rate was 14.6%~26.91%. Oil red O staining showed that the accumulation of hepatic lipid in the loganin treatment groups was significantly decreased with the increase in concentration. Compared with the model group, the extracellular enzyme activities of AST, ALT and LDH in loganin treatment groups were reduced by 26.70%~52.58%, 24.83%~61.23% and 14.53%~28.83%, respectively; extracellular levels of TC and TG were reduced by 50.46%~68.76% and 32.51%~53.37%, respectively; intracellular levels of TC and TG were reduced by 11.48%~

引文格式:

刘淑敏, 孙嘉蔚, 陈小丹, 等. 马钱苷对胎牛血清诱导的 L02 细胞脂肪变性的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(3): 16-22

LIU Shu-min, SUN Jia-wei, CHEN Xiao-dan, et al. Inhibition effects of loganin on fetal bovine serum-induced steatosis in human liver cell line L02 [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(3): 16-22

收稿日期: 2020-09-01

基金项目: 广东省普通高校青年创新人才项目 (2017KQNCX126); 岭南师范学院人才专项项目 (ZL1803)

作者简介: 刘淑敏 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 绿色食品化学

通讯作者: 王标诗 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 绿色食品化学

32.79% and 10.50%~18.30%, respectively; intracellular levels of TBARS were reduced by 40.33%~60.10%. These inhibitory effect of loganin treatment groups on cellular steatosis was dose-dependent and better than that of spontaneous recovery group. The results indicated that loganin could inhibit FBS-induced cellular steatosis in L02 cells via effectively reducing lipid metabolic disorders and lipid peroxidation in L02 cells.

**Key words:** loganin; steatosis; hyperlipidemia; human liver cells; inhibition effects

随着人类生活水平的提高及饮食结构、生活方式的转变,高脂血症(hyperlipidemia, HLP)已经成为威胁现代人健康的十大隐形杀手之一<sup>[1]</sup>。当体内脂质代谢紊乱,过高的脂质会在位于脂质代谢中心环节的肝脏细胞内堆积,发生脂肪变性<sup>[2,3]</sup>。非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以肝细胞脂肪变性及脂质蓄积为特征的肝脏疾病,大量临床和动物实验证实其发生与高脂血症密切相关<sup>[4-6]</sup>,其最明显的特点就是细胞内甘油三酯(triglycerides, TG)含量的显著升高<sup>[7,8]</sup>。鉴于目前没有直接评价生物活性物质降血脂能力的离体细胞模型,研究其对NAFLD的预防和治疗作用成为越来越多研究者评价生物活性物质降血脂能力的选择<sup>[9,10]</sup>。NAFLD细胞模型建立常用的诱导剂包括软脂酸、油酸、高浓度胎牛血清和脂肪乳,所用细胞通常为人肝癌细胞株(liver cancer cell line, HepG2)、人正常肝细胞(human liver cell line, L02)、小鼠3T3-L1前脂肪细胞(mouse 3T3-L1preadipocytes)等<sup>[11,12]</sup>。其中,L02细胞实验结果更接近于正常肝细胞发展而来的NAFLD在体模型特点,是体外脂质代谢调控研究较为理想的模型<sup>[13]</sup>。

相较于化学类降血脂药物,以天然植物及其有效成分为原料开发的降血脂药物,具有毒副作用少、作用温和、可长期服用等优点。山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)是我国常见的药食两用型中药材,马钱苷(Loganin)是山茱萸主成分环烯醚萜苷类的主要效应成分,研究表明其具有抑制神经退行性病变<sup>[14]</sup>、降血糖<sup>[15]</sup>、抗炎<sup>[16]</sup>、抗血栓<sup>[17]</sup>等作用,但是对其是否能够降血脂尚无报道。

本实验以马钱苷为原料,通过高浓度胎牛血清诱导人肝L02细胞发生脂肪变性,研究了马钱苷对细胞脂肪变性的抑制作用,初步探讨了马钱苷的细胞降血脂效果和作用机制。实验结果有助于揭示和阐明马钱苷的降血脂效果和相关机理,为马钱苷相关降血脂保健品和药物等的开发提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

马钱苷(≥98%),成都曼思特生物科技有限公司;人正常肝细胞(human liver cell line, L02),中山大学

肿瘤研究所;高糖DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)培养基、0.25%胰蛋白酶溶液、PBS(phosphate-buffered saline)缓冲液(pH 7.4)、6孔和96孔细胞培养板,美国Gibco公司;胎牛血清(heat-inactivated fetal bovine serum, FBS),杭州四季青生物工程材料有限公司;双抗(青霉素-链霉素溶液, 100X)、噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、曲拉通(Triton X-100),碧云天生物技术研究所;总蛋白定量试剂盒、油红O检测试剂盒、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒、甘油三酯(triglycerides, TG)测定试剂盒、微量丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒,南京建成生物工程研究所。

Varioskan Flash 荧光酶标仪、Hepa Class 100 CO<sub>2</sub> 培养箱,美国Thermo公司;BX51 倒置荧光显微镜,日本Olympus 光学工业株式会社;XW-80A 旋涡混合器,上海精科实业有限公司;BSA124S-CW 电子分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;THZ-C 台式恒温振荡器,苏州培英实验设备有限公司;JW-3021 HR 高速冷冻离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 实验分组及模型建立

采用本实验室已经报道的方法<sup>[18]</sup>进行。L02细胞常规培养于DMEM正常培养基(含10%FBS和1%双抗)中,并置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。待细胞密度长至约瓶壁80%时,取对数生长期细胞于6孔板(2 mL/孔,接种浓度 $1 \times 10^5$ 个/mL)或96孔板(100 μL/孔,接种浓度 $5 \times 10^4$ 个/mL)上,CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h后,弃培养基,分成以下8组:正常组、模型组、自然恢复组、马钱苷对照组(150 μmol/L)、药物对照组(辛伐他汀,50 μmol/L)、马钱苷处理组(包括马钱苷低、中、高剂量组,浓度分别为50、100、150 μmol/L)。正常组与马钱苷对照组于正常培养基中培养,其余组于高FBS培养基(含50%FBS和1%双抗)中培养,以构建脂肪变性细胞模型。

24 h 后, 弃培养基, 正常组与自然恢复组加入正常培养基, 马钱苷处理组和马钱苷对照组加入含马钱苷的正常培养基, 药物对照组加入含辛伐他汀的正常培养基, 模型组加入高 FBS 培养基, 继续培养 24 h。

### 1.2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率

取分组培养后的 96 孔板, 弃上清液, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 弃上清液并在每孔中加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO, 37  $^{\circ}\text{C}$  震荡 10 min 后, 酶标仪于 570 nm 处测定吸光度 OD 值, 按下式计算细胞增殖抑制率:

$$\text{细胞增殖抑制率}/\% = \frac{\text{模型组OD值}-\text{实验组OD值}}{\text{模型组OD值}} \times 100\%$$

### 1.2.3 油红 O 染色观察增殖抑制效果

6 孔板预先覆盖无菌盖玻片, 按照 1.3.1 操作处理后, 取出无菌盖玻片, PBS 冲洗 2 次后, 按照油红 O 检测试剂盒说明书操作进行染色、复染、封片, 然后置于倒置显微镜下观察并拍照。采用 Image Pro Plus 6.0 软件对图片进行分析。

### 1.2.4 细胞上清液指标测定

取分组培养后的 6 孔板, 收集细胞上清液, 按照相应测试盒说明书操作, 采用酶标仪检测上清液中 AST、ALT 和 LDH 酶泄漏量以及 TC 和 TG 水平。酶泄漏量测定结果以每升上清液中含有的酶活力单位量 (U/L) 表示, TC 和 TG 测定结果以每分升上清液含量 (mg/dL) 表示。

### 1.2.5 细胞内指标测定

用 PBS 清洗收集上清液后的 6 孔板, 加入 0.25% 胰蛋白酶 (1 mL/孔), 消化并收集细胞。收集后的细胞用 PBS 清洗, 离心后加入 1.5% Triton X-100 (200  $\mu\text{L}$ , PBS 配制), 于 4  $^{\circ}\text{C}$  裂解 30 min, 得到细胞裂解液。按照相应测试盒说明书操作, 采用酶标仪检测裂解液中 TC 和 TG 水平以及硫代巴比妥酸反应物 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 含量。TC 和 TG 测定结果以每分升裂解液含量 (mg/dL) 表示, TBARS 含量采用 MDA 测试盒测定, 测定结果以每升裂解液中 MDA 摩尔质量当量 (mmol MDA eq/L) 表示。

## 1.3 数据处理

所有数据至少 3 次重复, 实验结果为平均值 $\pm$ 标准偏差。采用 Origin 9.0 软件作图, SPSS 17.0 软件的 One-Way ANOVA 进行单因素方差分析, LSD 检验进行显著性分析 ( $p < 0.05$  时差异显著,  $p < 0.01$  时差异极显著)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 马钱苷对脂肪变性 L02 细胞增殖的抑制作用

MTT 法测定的不同分组细胞增殖抑制结果如表 1 所示。由表可知, 马钱苷对照组与正常组 OD 值无显著差异 ( $p > 0.05$ ), 表明在实验浓度范围内马钱苷对 L02 细胞无毒性作用。与模型组相比, 马钱苷处理组、辛伐他汀药物对照组和自然恢复组均对脂变细胞增殖有明显的抑制作用 ( $p < 0.05$ ), 抑制率分别为 14.60%~26.91%、18.94%和 12.15%。自然恢复组结果表明, 脂肪变性是一种可逆性损伤, 随着时间延长, 细胞具有一定的自然恢复能力, 但是恢复效果远弱于马钱苷和药物作用效果。马钱苷高浓度组 (150  $\mu\text{mol/L}$ ) 对脂变细胞的增殖抑制作用显著高于药物对照组 ( $p < 0.05$ ), 同浓度马钱苷 (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 的增殖抑制率略低于辛伐他汀, 但无显著差别 ( $p > 0.05$ )。马钱苷中、高浓度处理组对脂变细胞的增殖抑制作用高于自然恢复组, 且抑制作用呈现明显的剂量依赖性关系, 表明马钱苷对脂变细胞增殖有一定的调控作用, 能够通过抑制脂肪肝细胞增殖, 抑制细胞脂肪变性。

表 1 马钱苷对脂肪变性 L02 细胞增殖的抑制作用

Table 1 Inhibition effect of loganin against the growth of steatosis L02 cells

组别	OD 值	抑制率/%
正常组	1.37 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	33.78
模型组	2.06 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	
马钱苷 50 $\mu\text{mol/L}$	1.76 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	14.66
马钱苷 100 $\mu\text{mol/L}$	1.64 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	20.38
马钱苷 150 $\mu\text{mol/L}$	1.51 $\pm$ 0.07 <sup>cd</sup>	26.91
马钱苷对照组	1.42 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	31.38
药物对照组 (50 $\mu\text{mol/L}$ )	1.67 $\pm$ 0.11 <sup>bc</sup>	18.94
自然恢复组	1.81 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	12.15

注: 同列肩标不同字母代表样品间的显著差异 ( $p < 0.05$ )。下表同。

### 2.2 马钱苷对脂肪变性 L02 细胞胞浆内脂滴累积的抑制作用

细胞胞浆内脂滴累积的油红 O 染色结果如图 1 所示。由图可知, 正常组和马钱苷对照组 L02 细胞边缘清晰, 胞浆内未见明显的红色脂滴。模型组细胞边界棱角模糊, 胞浆内存在大量绕核分布的红色脂滴, 脂变几乎累及所有细胞。通过 Image Pro Plus 6.0 软件对各组细胞平均光密度进行统计分析, 结果如图 2 所示。

由图可知,与模型组相比,马钱苷处理组、药物对照组和自然恢复组细胞胞浆内脂滴含量均有不同程度的减少,且马钱苷中、高浓度处理组胞浆内脂滴减少程度明显高于自然恢复组( $p<0.05$ )。马钱苷处理组胞浆内脂滴呈现剂量依赖性减少,表明马钱苷能够通过抑制脂肪肝细胞胞浆内脂滴累积,抑制细胞脂肪变性。戴冰等<sup>[19]</sup>通过油红 O 染色法观察了马钱苷对大鼠前脂肪细胞分化过程中脂肪聚积的影响,结果表明,32  $\mu\text{mol/L}$  和 16  $\mu\text{mol/L}$  马钱苷各时段(48、72、96 h)均能显著抑制大鼠前脂肪细胞分化过程中的脂肪聚积,同样证实一定浓度的马钱苷具有改善脂肪细胞分化异常,进而改善脂质代谢紊乱的作用。王福兴<sup>[20]</sup>利用高胰岛素诱导 HepG2 细胞建立胰岛素抵抗模型,并采用马钱苷(512  $\mu\text{mol/L}$ )处理细胞,24 h 后通过异丙醇对细胞脂滴进行溶解并测定 OD 值,结果表明,马钱苷可以极显著降低细胞脂滴含量( $p<0.01$ ),抑制细胞脂质合成。以上研究结果与本文在马钱苷处理浓度上差异较大,可能与所用模型以及处理时长有关。

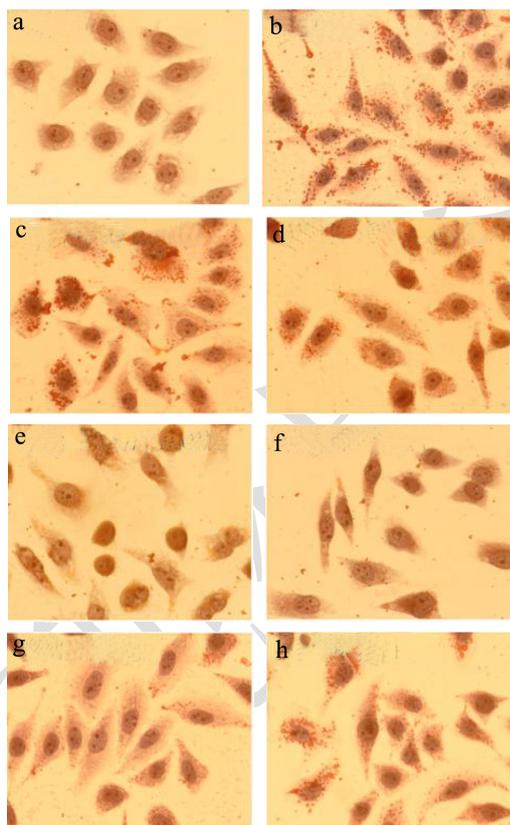


图1 马钱苷对脂肪变性 L02 细胞胞浆内脂滴累积的作用效果图 (×200)

Fig.1 Effect of loganin on accumulation of lipid droplets in steatosis L02 cells

注: a: 正常组; b: 模型组; c: 马钱苷 50  $\mu\text{mol/L}$ ; d: 马钱苷 100  $\mu\text{mol/L}$ ; e: 马钱苷 150  $\mu\text{mol/L}$ ; f: 马钱苷对照组; g: 药物对照组; h: 自然恢复组。

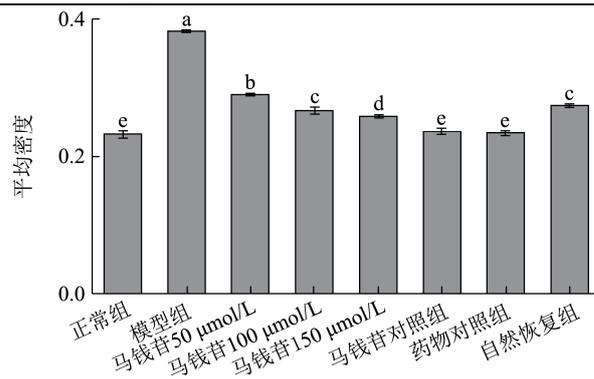


图2 各组细胞油红 O 染色的平均光密度值统计分析

Fig.2 Statistical analysis of the average optical density of cells stained by Oil Red O staining

注: 不同字母代表样品间的显著差异 ( $p<0.05$ ), 下同。

### 2.3 马钱苷对脂肪变性 L02 细胞胞外 AST、ALT 和 LDH 酶活的影响

作为肝脏中重要的转氨酶, 谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 分别分布于肝细胞线粒体和胞浆内, 是临床肝脏疾病诊断中常用的检查项目<sup>[21]</sup>。乳酸脱氢酶 (LDH) 广泛存在于人体所有组织细胞中, 是人体组织和器官受损的标志物, 也是评价肝细胞受损的常用指标<sup>[22]</sup>。当肝细胞受损时, 细胞膜通透性增加, AST、ALT 和 LDH 泄露, 导致上清液中这三种酶的酶活增加, 且其泄露量随肝细胞损伤的加重而增高<sup>[23]</sup>。不同分组细胞上清液中 AST、ALT 和 LDH 酶活结果如表 2 所示。

由表 2 可知, 与正常组相比, 模型组上清液中三种酶活均显著升高 ( $p<0.05$ ), 而马钱苷对照组与正常组酶活无显著差别 ( $p>0.05$ ), 提示模型组对 L02 细胞造成损伤, 而实验浓度范围内马钱苷对 L02 细胞无损伤作用。与模型组相比, 马钱苷处理组三种酶活显著下降 ( $p<0.05$ ), 分别降低了 26.70%~52.58%、24.83%~61.23%和 14.53%~28.83%, 呈现明显的剂量依赖性, 且中、高浓度组下降水平显著高于自然恢复组 ( $p<0.05$ ), 表明马钱苷可以通过剂量依赖性减少 AST、ALT 和 LDH 泄露量而减少脂变引起的 L02 细胞损伤。南美娟等<sup>[24]</sup>采用对乙酰氨基酚制备小鼠急性药物性肝损伤模型, 研究了山茱萸对小鼠的保肝作用, 结果发现, 山茱萸果肉、果核和全果提取物中高剂量组小鼠血清中 AST、ALT 水平显著均降低 ( $p<0.05$  或  $p<0.01$ )。来丽娜等<sup>[25]</sup>研究了山茱萸不同活性部位对小鼠急性肝损伤的保护作用, 结果表明, 总甘部位血清 ALT、AST 含量均显著降低 ( $p<0.05$  或  $p<0.01$ ), 并呈剂量相关性。虽然目前尚无马钱苷对细胞或动物

模型 AST、ALT 和 LDH 酶活影响的研究报道,但作为山茱萸主成分环烯醚萜苷类的主要效应成分,南美娉<sup>[24]</sup>和来丽娜等<sup>[25]</sup>的研究结果能够从侧面证实马钱苷对转氨酶酶活的影响。

## 2.4 马钱苷对脂肪变性 L02 细胞胞外和胞内

### TC、TG 水平的影响

肝脏是机体脂肪代谢最重要的场所,一旦发生脂质代谢紊乱,会导致肝脏中总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)过度蓄积,发生脂肪变性,诱发脂肪肝病发生,因此 TC 和 TG 含量变化可以直接反映肝脏的病变情况<sup>[26,27]</sup>。不同分组细胞内外 TC 和 TG 水平结果如表 3 所示。由表可知,与正常组相比,模型组细胞内外 TC 和 TG 水平均显著升高( $p<0.05$ ),提示高 FBS 进入细胞,使得 L02 细胞功能紊乱,TC 和 TG 蓄积增多。马钱苷对照组与正常组无显著差别( $p>0.05$ ),表明实验浓度范围内马钱苷不会造成 L02 细胞功能紊乱。与模型组相比,马钱苷处理组、药物对照组和自然恢复组细胞内外 TC 和 TG 水平均有不同程度的降

低,但自然恢复组降低作用显著弱于马钱苷处理组和药物对照组,表明脂变 L02 细胞能够自身逆转并改善脂肪变性,但效果有限。随着马钱苷处理浓度的增加,脂变细胞内外 TC 和 TG 水平逐渐降低,与模型组相比,胞外 TC 和 TG 水平分别下降 50.46%~68.76%和 32.51%~53.37%,胞内 TC 和 TG 水平分别下降 11.48%~32.79%和 10.50%~18.30%,表明马钱苷可以剂量依赖性减少脂变细胞中 TC 和 TG 的蓄积,改善 L02 细胞脂质沉积,改善肝脏病变情况,从而起到降血脂效果。王福兴<sup>[20]</sup>研究结果也表明,马钱苷(512  $\mu\text{mol/L}$ )可以极显著减少胰岛素抵抗 HepG2 细胞胞内 TC 和 TG 含量( $p<0.01$ )。刘洪等<sup>[28]</sup>以高脂饲养结合链脲佐菌素腹腔注射造模,观察山茱萸环烯醚萜总苷(ICO)对 2 型糖尿病心脏病变大鼠血脂含量的影响,结果表明,ICO 组大鼠 TG、CHOL、LDL-C 含量均明显降低( $p<0.05$  或  $p<0.01$ ),提示 ICO 能改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗,调节血脂水平。以上研究报道提示马钱苷对于细胞或动物 TC 和 TG 水平有很好的调节作用,与本实验结果一致。

表 2 马钱苷对脂肪变性 L02 细胞胞外 AST、ALT 和 LDH 酶活的影响

Table 2 Effect of loganin on enzyme activities of AST, ALT and LDH in steatosis L02 cells

组别	酶活/(U/L)		
	AST	ALT	LDH
正常组	7.04±0.23 <sup>e</sup>	2.98±0.38 <sup>e</sup>	132.91±10.47 <sup>d</sup>
模型组	13.94±0.57 <sup>a</sup>	7.17±0.56 <sup>a</sup>	191.54±10.25 <sup>a</sup>
马钱苷 50 $\mu\text{mol/L}$	9.80±0.37 <sup>c</sup>	5.39±0.54 <sup>b</sup>	163.70±2.78 <sup>b</sup>
马钱苷 100 $\mu\text{mol/L}$	8.30±0.41 <sup>d</sup>	3.87±0.39 <sup>c</sup>	148.33±4.23 <sup>c</sup>
马钱苷 150 $\mu\text{mol/L}$	6.61±0.27 <sup>e</sup>	2.78±0.18 <sup>e</sup>	136.32±5.49 <sup>cd</sup>
马钱苷对照组	7.00±0.20 <sup>e</sup>	3.11±0.26 <sup>de</sup>	136.11±4.37 <sup>cd</sup>
药物对照组 (50 $\mu\text{mol/L}$ )	7.09±0.36 <sup>e</sup>	3.68±0.15 <sup>cd</sup>	142.14±18.30 <sup>cd</sup>
自然恢复组	10.84±0.49 <sup>b</sup>	5.92±0.54 <sup>b</sup>	167.92±12.16 <sup>b</sup>

表 3 马钱苷对脂肪变性 L02 细胞 TC 和 TG 水平的影响

Table 3 Effect of loganin on levels of TC and TG in steatosis L02 cells

组别	胞外水平/(mg/dL)		胞内水平/(mg/dL)	
	TC	TG	TC	TG
正常组	2.78±0.21 <sup>d</sup>	3.56±0.23 <sup>d</sup>	1.12±0.18 <sup>c</sup>	5.09±0.39 <sup>e</sup>
模型组	8.74±0.20 <sup>a</sup>	7.72±0.09 <sup>a</sup>	1.83±0.18 <sup>a</sup>	7.05±0.50 <sup>a</sup>
马钱苷 50 $\mu\text{mol/L}$	4.33±0.16 <sup>b</sup>	5.21±0.25 <sup>c</sup>	1.62±0.01 <sup>ab</sup>	6.31±0.57 <sup>bc</sup>
马钱苷 100 $\mu\text{mol/L}$	3.22±0.27 <sup>c</sup>	5.00±0.43 <sup>c</sup>	1.57±0.17 <sup>b</sup>	5.90±0.08 <sup>cd</sup>
马钱苷 150 $\mu\text{mol/L}$	2.73±0.10 <sup>d</sup>	3.60±0.26 <sup>d</sup>	1.23±0.05 <sup>c</sup>	5.76±0.35 <sup>cd</sup>
马钱苷对照组	2.77±0.01 <sup>d</sup>	3.44±0.16 <sup>d</sup>	1.12±0.07 <sup>c</sup>	5.46±0.28 <sup>de</sup>
药物对照组 (50 $\mu\text{mol/L}$ )	3.59±0.32 <sup>c</sup>	5.17±0.19 <sup>c</sup>	1.31±0.08 <sup>c</sup>	5.77±0.33 <sup>cd</sup>
自然恢复组	4.41±0.42 <sup>b</sup>	6.51±0.26 <sup>a</sup>	1.74±0.06 <sup>ab</sup>	6.74±0.35 <sup>ab</sup>

## 2.5 马钱苷对脂肪变性 L02 细胞胞内 TBARS

水平的影响

硫代巴比妥酸反应物 (TBARS) 是脂质过氧化的终末产物, 其含量直接反映细胞和组织脂质过氧化的水平, 而其中最重要的一种就是 MDA<sup>[29,30]</sup>。以 MDA 为标准参照物, 测定不同分组细胞内 TBARS 水平, 实验结果如图 3 所示。由图可知, 与正常组相比, 模型组细胞内 TBARS 水平显著升高 ( $p < 0.05$ ), 提示高 FBS 进入细胞, 对 L02 细胞造成损伤, 使其发生脂质过氧化反应。马钱苷对照组与正常组无显著差别 ( $p > 0.05$ ), 表明实验浓度范围内马钱苷不会对 L02 细胞造成损伤。与模型组相比, 马钱苷处理组、药物对照组和自然恢复组 TBARS 水平均显著降低 ( $p < 0.05$ ), 分别下降 40.33%~60.10%、38.66% 和 25.33%, 但自然恢复组降低效果显著弱于马钱苷中高浓度处理组和药物对照组, 表明马钱苷对脂变 L02 细胞 TBARS 水平的降低作用明显高于细胞对脂质过氧化损伤的自我修复作用。马钱苷处理组 TBARS 水平随马钱苷作用浓度的增加而减小, 表明马钱苷可以通过抑制脂质过氧化产物 TBARS 的生成, 减少因脂质过氧化而引起的细胞损伤。来丽娜等<sup>[25]</sup>研究表明, 山茱萸总苷部位能够显著降低急性肝损伤小鼠肝组织匀浆中 MDA 含量 ( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$ ), 其保肝机制可能与抑制脂质过氧化相关, 与本实验结果一致。

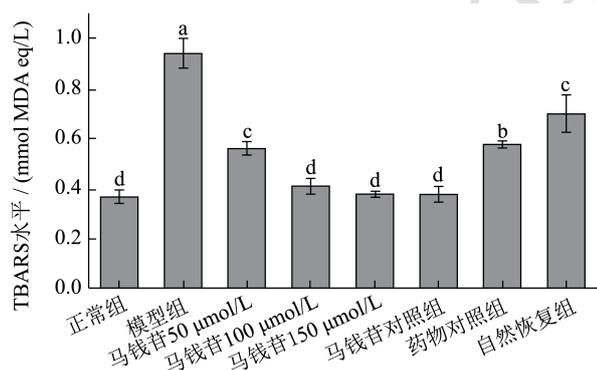


图3 马钱苷对脂肪变性 L02 细胞 TBARS 水平的影响

Fig.3 Effect of loganin on levels of TBARS in steatosis L02 cells

## 3 结论

本文以马钱苷为原料, 以高浓度胎牛血清诱导人肝 L02 细胞脂肪变性, 研究了马钱苷对细胞脂肪变性的抑制作用及相关作用机制。研究结果表明, 马钱苷可以剂量依赖性抑制脂变细胞增殖和胞浆内脂滴累积, 减少因脂肪变性引起的细胞外 AST、ALT 和 LDH 泄露以及胞内胞外 TC 和 TG 的蓄积, 从而减少脂变

引起的 L02 细胞损伤。此外, 还可以抑制脂变细胞内 TBARS 生成, 减少因脂质过氧化引起的细胞损伤。

## 参考文献

- [1] Maheshwari Ankur, Misro Man M, Aggarwal Archanaet, et al. Pathways involved in testicular germ cell apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and testicular cell apoptosis [J]. FEBS Journal, 2009, 276(3): 870-881
- [2] 张庆. 生姜有效部位对高脂血症大鼠肝脏脂肪变性影响的研究[D]. 济南: 山东大学, 2005  
ZHANG Qing. Effects of effect parts of *Zingiber officinale* (EPZ) on the fatty degeneration in the liver of the experimental hyperlipidemic rats [D]. Jinan: Shandong University, 2005
- [3] 房宝晨. EGCG对1,3-二氯-2-丙醇诱导脂质代谢紊乱的干预作用及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018  
FANG Bao-chen. The intervention effect and mechanism of epigallocatechin-3-gallate against 1,3-dichloro-2-propanol induced lipid metabolism disorder [D]. Changchun: Jilin University, 2018
- [4] LI Na, CHEN Zhen, MAO Xiao-jian, et al. Effects of lipid regulation using raw and processed Radix *Polygoni multiflori* in rats fed a high-fat diet [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (Ecam), 2012, 2012: 329171
- [5] SONG Chun-yan, SHI Jian, ZENG Xin, et al. Sophocarpine alleviates hepatocyte steatosis through activating AMPK signaling pathway [J]. Toxicology in Vitro, 2013, 27(3): 1065-1071
- [6] FAN Xiao-fen, DENG Yin-quan, YE Lei, et al. Effect of Xuezhikang Capsule on serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperlipidemia [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2010, 16(2): 119-123
- [7] Chung Jayong, Koo Kyeongok, LIAN Fu-zhi, et al. Apo-10'-lycopenoic acid, a lycopene metabolite, increases sirtuin 1 mRNA and protein levels and decreases hepatic fat accumulation in ob/ob mice [J]. The Journal of Nutrition, 2012, 142(3): 405-410
- [8] Ginsberg Henry N. Is the slippery slope from steatosis to steatohepatitis paved with triglyceride or cholesterol [J]. Cell Metabolism, 2006, 4(3): 179-181
- [9] 李金梅, 丁丽丽, 宋保亮, 等. 大黄酮对Huh-7细胞SREBP表达及脂质代谢的影响[J]. 药学学报, 2015, 50(2): 174-179  
LI Jin-mei, DING Li-li, SONG Bao-liang, et al. Effects of chrysoferanol on expression of SREBPs and lipid metabolism in Huh-7 cells [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2015, 50(2):

- 174-179
- [10] 曹丽娟,张旭,陈朝银,等.原花青素对 MSG 诱导的肥胖小鼠及脂肪变性 L-02 肝细胞的降脂作用[J].中国酿造,2016,35(8):155-158  
CAO Li-juan, ZHANG Xu, CHEN Chao-yin, et al. Lipid-lowering effect of procyanidins on the MSG-induced obese mice and steatotic L-02 hepatocytes [J]. China Brewing, 2016, 35(8): 155-158
- [11] 罗燕,和兴萍,李雪,等.几种细胞脂肪变性模型的建立与比较分析[J].中华中医药学刊,2017,35(8):2074-2077  
LUO Yan, HE Xing-ping, LI Xue, et al. Establishment and comparative analysis of several kinds of cell fatty degeneration model [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2017, 35(8): 2074-2077
- [12] 潘雪丰,温彩霞,许建华.两种细胞系用于建立体外脂肪肝模型比较[J].广东药学院学报,2010,26(1):85-89  
PAN Xue-feng, WEN Cai-xia, XU Jian-hua. Comparison of two cell lines for cell model of hepatocytic steatosis *in vitro* [J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2010, 26(1): 85-89
- [13] WANG Hui, CHAN Ping-kei, PAN Si-yuan, et al. ERp57 is up-regulated in free fatty acids-induced steatotic L02 cells and human nonalcoholic fatty livers [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2010, 110(6): 1447-1456
- [14] 李观林.山茱萸中环烯醚萜苷类的研究进展[J].亚太传统医药,2014,10(18):48-49  
LI Guan-lin. Research progress of iridoid glycosides from *Cornus officinalis* [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2014, 10(18): 48-49
- [15] Yamabe Noriko, Noh Jeong Sook, Park Chan Hum, et al. Evaluation of loganin, iridoid glycoside from corni fructus, on hepatic and renal glucolipototoxicity and inflammation in type 2 diabetic *db/db* mice [J]. European Journal of Pharmacology, 2010, 648(1): 179-187
- [16] 马艳霞,王明艳,姜泽群,等.山茱萸活性成分对D-半乳糖致衰老形胶质细胞影响的实验研究[J].中国药理学通报,2014,30(12):1688-1692  
MA Yan-xia, WANG Ming-yan, JIANG Ze-qun, et al. Effect of active ingredient from fructus corni on aging astrocyte induced by D-galactose [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2014, 30(12): 1688-1692
- [17] Rawji Khalil S, Mishra Manoj K, Michaels Nathan J, et al. Immunosenescence of microglia and macrophages: impact on the ageing central nervous system [J]. Brain, 2016, 139(Pt 3): 653-661
- [18] LIU Shu-min, HUANG Hui-hua. Effects of epicatechin gallate (ECG) on fetal bovine serum (FBS)-induced steatosis in human liver cell line L02 and 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH)-induced oxidative stress in human erythrocytes [J]. European Food Research and Technology, 2016, 242(4): 495-504
- [19] 戴冰,肖子曾,刘磊,等.马钱苷对大鼠前脂肪细胞增殖与分化的影响[J].中药新药与临床药理,2007,18(6):448-450  
DAI Bing, XIAO Zi-zeng, LIU Lei, et al. Effects of loganin on the proliferation and differentiation of rat preadipocyte [J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2007, 18(6): 448-450
- [20] 王福兴.山茱萸提取物通过NF- $\kappa$ B炎症信号通路改善2型糖尿病小鼠的机制研究[D].西安:陕西师范大学,2018  
WANG Fu-xing. Study on the alleviating effect of *Cornus officinalis* on type 2 diabetic model mice via NF- $\kappa$ B signaling pathway [D]. Xian: Shanxi Normal University, 2018
- [21] Woreta Tinsay A, Alqahtani Saleh A. Evaluation of abnormal liver tests [J]. Medical Clinics of North America, 2014, 98(1): 1-16
- [22] 李乐,陈伟玲,汪明星,等.血清LDH检测在恙虫病患者早期诊断中的价值及相关性[J].广州医药,2019,50(1):33-35  
LI Le, CHEN Wei-ling, WANG Ming-xing, et al. The value and correlations of serum LDH detection in early diagnosis of tsutsugamushi patients [J]. Guangzhou Medical Journal, 2019, 50(1): 33-35
- [23] 李利平.探讨肝功能中ALT,AST及血脂中TG,TC在脂肪肝诊断中意义[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(66):107-134  
LI Li-ping. Discussion on value of ALT, AST in liver function and TG, TC in blood lipid in the diagnosis of fatty liver [J]. World Latest Medicine Information, 2015, 15(66): 107-134
- [24] 南美娟,唐凯,张化为,等.山茱萸不同部位提取物对急性肝损伤模型小鼠的保肝作用研究[J].中国药房,2018,29(17):2385-2389  
NAN Mei-juan, TANG Kai, ZHANG Hua-wei, et al. Study on the liver-protective effects of different parts extracts of *Cornus officinalis* on acute liver injury model mice [J]. China Pharmacy, 2018, 29(17): 2385-2389

(下转第 123 页)