

新疆小枝玫瑰醇提物对脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂质蓄积的改善作用

候欣启¹, 王秋雨², 陈立格^{1,3}, 马红梅^{1*}, 兰卫^{1*}

(1. 新疆医科大学中医学院, 新疆乌鲁木齐 830017) (2. 新疆医科大学药学院, 新疆乌鲁木齐 830017)

(3. 江苏省盐城市第一人民医院, 江苏盐城 224000)

摘要: 为探究新疆小枝玫瑰醇提物对 HepG2 细胞脂肪堆积的影响, 以新疆小枝玫瑰醇提物为对象, 用脂肪酸 (free fatty acids, FFAs) 诱导 HepG2 细胞建立体外脂肪酸负荷模型。MTT 法筛选小枝玫瑰对 HepG2 细胞的安全浓度。用甘油三酯 (triglyceride, TG) 试剂盒测定小枝玫瑰醇提物干预后各组细胞的 TG 含量。油红 O 染色观察并测定各组细胞内脂滴蓄积情况和脂质含量。Western blot 法测定各组细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)、酰基辅酶 A 氧化酶 1 (peroxisomal acyl-coenzyme oxidase 1, ACOX1)、肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A (carnitine palmitoyltransferase 1A, CPT1A) 蛋白水平。结果显示: 小枝玫瑰醇提物作用 HepG2 细胞的安全浓度 ≤ 200 $\mu\text{mol/L}$ 。以 FFAs 浓度为 1.5 mmol/L 孵育 24 h 可成功诱导 HepG2 细胞体外脂肪酸负荷模型。与模型组相比, 小枝玫瑰醇提物组呈剂量依赖性地显著 ($p < 0.05$) 降低 FFAs 诱导的细胞内 TG 和脂质含量, TG 水平下降 47.17%~60.38%, 脂质含量下降 25.00%~36.61%; 与模型组相比, 小枝玫瑰醇提物能显著上调 PPAR α 及其下游 ACOX1、CPT1A 蛋白表达水平 ($p < 0.05$)。小枝玫瑰醇提物可以改善 FFAs 诱导的 HepG2 细胞脂质蓄积, 其抗脂变作用是通过激活 PPAR α 介导的脂肪酸氧化代谢通路, 进而减少细胞内 TG 水平和脂质含量实现的。

关键词: 小枝玫瑰; HepG2 细胞; 过氧化物酶体增殖物激活受体 α ; 脂质积累

文章编号: 1673-9078(2022)05-24-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0865

Effect of Alcohol Extract of Xinjiang Ramulus Rose on Fatty Acid Induced Lipid Accumulation in HepG2 Cells

HOU Xinqi¹, WANG Qiuyu², CHEN Lige^{1,3}, MA Hongmei^{1*}, LAN Wei^{1*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China)

(2. Department of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China)

(3. The First People's Hospital of Yancheng City, Yancheng 224000, China)

Abstract: To explore the influence of the alcohol extract of Xinjiang *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. on the accumulation of fat in HepG2 cells, the alcohol extract of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. was used as the object, HepG2 cells were induced with free fatty acids (FFAs) to establish a fatty acid load model *in vitro*. The safe concentration of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. in the HepG2 cells was determined by MTT method. The triglyceride (TG) kit was used to measure the TG content of each group of cells after the intervention of the alcohol extract of

引文格式:

候欣启,王秋雨,陈立格,等.新疆小枝玫瑰醇提物对脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂质蓄积的改善作用[J].现代食品科技,2022,38(5): 24-32

HOU Xinqi, WANG Qiuyu, CHEN Lige, et al. Effect of alcohol extract of Xinjiang ramulus rose on fatty acid induced lipid accumulation in HepG2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 24-32

收稿日期: 2021-08-08

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1703902-3); 新疆维吾尔自治区十三五重点学科-新疆医科大学中西医结合学科-1006 项目; 新疆医科大学博士基金项目 (2019-1); 新疆医科大学大学生创新训练计划项目第 15 期 (S202010760019)

作者简介: 候欣启 (1999-), 女, 本科生, 研究方向: 中药药理学, E-mail: 1282447497@qq.com

通讯作者: 马红梅 (1986-), 女, 副教授, 研究方向: 中药药理学; E-mail: 411967924@qq.com; 共同通讯作者: 兰卫 (1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药新药研发, E-mail: 641059126@qq.com

Branchlets Rosa rugosa Thunb. Intracellular lipid droplet accumulation and lipid content of each group were determined by oil red O staining. Western blotting method was used to detect the protein levels of PPAR α , ACOX1, and CPT1A in each group. The results showed that the safe concentration of alcohol extract of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. in HepG2 cells was equal to or less than 200 μ mol/L. The fatty acid load model of HepG2 cells *in vitro* could be successfully established with FFAs concentration of 1.5 mmol/L for 24 h. Compared with the model group, the ethanol extract of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. markedly decreased the intracellular TG and lipid content induced by FFAs in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). The TG level decreased by 47.17%~60.38%, and the lipid content decreased by 25.00%~36.61%. Compared with the model group, the ethanol extract of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. could obviously up-regulate PPAR α , ACOX1 and CPT1A protein expression ($p < 0.05$). The ethanol extract of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. can improve FFAs-induced lipid accumulation in HepG2 cells, and its anti-lipidemia effect is achieved by activating PPAR α -mediated fatty acid oxidation metabolism pathway, and then reducing intracellular TG and lipid content.

Key words: *Branchlets Rosa rugosa* Thunb.; HepG2 cell; PPAR α ; lipid accumulation

随着经济和生活水平逐年提高,国人的生活方式、饮食结构和运动状况也在发生重大变化。这些年来,我国代谢性疾病的患病率居高不下,非酒精性脂肪性肝病(non-alcohol fatty liver disease, NAFLD)、高脂血症(hyperlipidemia, HLP)、糖尿病、代谢综合征、肥胖症等占比持续增加。中国已经成为是世界上NAFLD人数最多的国家,患病率为29.2%,NAFLD干预治疗和药物研发工作紧急而重要^[1]。NAFLD是一种与胰岛素抵抗相关的代谢应激性肝损伤的疾病,它也是糖尿病和心血管等疾病进程的危险因素之一,严重危害公众健康^[2-5]。高脂血症是人体内脂代谢及转运异常导致血清中脂质水平异常的一种代谢性疾病,是NAFLD和心血管疾病等的重要致病因素^[6,7]。截止目前,市面上还未出现针对NALFD的药物,患病群体之庞大和临床需求之迫切使得NAFLD的药物研发成为热点^[8]。对于改善人体血脂水平或者改善肝脏脂变性等,临床上常用他汀类药物进行干预,他汀类药物可引起横纹肌溶解或增加糖尿病患病风险,因此开发具有降血脂功能的疗效安全可靠的天然药物显得十分必要^[9]。

新疆小枝玫瑰(*Branchlets Rosa rugosa* Thunb.)是紫红花重瓣玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb.)的亚种玫瑰。新疆小枝玫瑰主要分布在新疆和田地区,因其光照充沛,无霜期长,生长于沙漠边缘等地理环境,故玫瑰精油产量和品质均优于其他玫瑰,被誉为“液体黄金”^[10,11]。新疆小枝玫瑰属国家药典收载品种^[12],其制剂玫瑰花口服液、玫瑰花糖膏已作为单方制剂收载于《国家卫生部药品标准(维吾尔药分册)》。小枝玫瑰是玫瑰花其中一种的分支,系药食两用植物,其味甘,性温,具有疏肝解郁,活血化瘀调经之功效^[13]。在新疆南部,小枝玫瑰花在民间常常作为餐桌上各类食材的配料,它们被制作为玫瑰花茶、玫瑰花饅、玫瑰花酱、各类民族风味甜品的馅料等。新疆小枝玫瑰的活

性成分有总黄酮、多糖、多酚和挥发性成分等^[14]。课题组前期研究表明^[15-19],小枝玫瑰提取物具有很好的降血脂、降血糖和抗氧化作用,实验结果显示,小枝玫瑰醇提物、水提物、总多酚等均可显著改善高脂血症大鼠的肝脏脂肪变性和血清脂质生化指标。新疆小枝玫瑰具有降低高脂血症大鼠血脂作用,但具体降脂机制不明确,且尚未开展体外细胞层面的机制研究。本实验以新疆小枝玫瑰醇提物为对象,通过建立HepG2细胞体外脂肪酸负荷模型,研究小枝玫瑰醇提物对细胞内脂质蓄积的影响,完善小枝玫瑰醇提物对脂质代谢影响研究的基本数据,为开发新疆小枝玫瑰作为治疗NALFD、高脂血症等相关疾病的药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小枝玫瑰醇提物(依照前期课题研究^[20],小枝玫瑰总黄酮提取工艺:50%乙醇,料液比1:16,采用紫外分光光度法测定总黄酮纯度为29.02%。课题组成员对小枝玫瑰醇提物进行液质联用分析,其主要成分为二水槲皮素、木犀草素、鞣花酸、黄酮没食子酸、没食子酸等18种化学成分);HepG2细胞系,上海细胞库;DMEM高糖培养基、胎牛血清(FBS)、双抗(青霉素-链霉素溶液)、0.25%胰蛋白酶溶液,美国Gibco公司;二甲基亚砜(DMSO)、噻唑兰(MTT)、油红O染液、油酸(OA)、棕榈酸(PA),美国Sigma公司;25 cm²细胞培养瓶、96孔板和6孔板,美国Corning公司;牛血清蛋白(BSA),Biofrox公司;磷酸盐缓冲液(PBS),美国Hyclone公司;甘油三酯(TG)检测试剂盒,中生北控公司;非诺贝特胶囊,法国利博福尼制药有限公司;ACOX1多克隆兔抗体、CPT1A多克隆兔抗体,北京博奥森生物技术有限公司;PPAR α

单克隆鼠抗体, 武汉三鹰生物技术有限公司; GAPDH 多克隆抗体, Affinity 生物科学公司。

1.2 主要仪器设备

MultiskanGo 酶标仪、PowerPac™HC 电泳仪、BIO-RAD 蛋白显色仪 (ChemiDOC MP 全自动成像系统), 美国 Bio-Rad 公司; SW-CJ-2F 超净工作台, 美国 Airtech 公司; 371 型直热式 CO₂ 恒温培养箱, 美国 Thermo scientific; 5424R 低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; IX73 荧光倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; IMS-300 制冰机, 美国 Scotsman 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞培养^[21]

取 HepG2 细胞用含 1%青霉素-链霉素溶液, 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基接种于 25 cm² 无菌培养瓶中, 在 5% CO₂ 培养箱中, 37 °C 饱和湿度培养, 荧光倒置显微镜下观察细胞密度。细胞正常生长后, 可继续实验。

1.3.2 HepG2 细胞体外脂肪酸负荷模型的建立

1.3.2.1 FFAs 造模液对 HepG2 细胞活力的影响

参考文献方法^[22], 按油酸:棕榈酸=2:1 的比例进行混合, 即可将其制成 2.0、1.5、1.0、0.5、0.25 mmol/L 的脂肪酸造模液。取 HepG2 细胞接种至 96 孔板培养 24 h, 设立空白组、对照组、不同浓度 FFAs (0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L) 诱导细胞, 每组设立 6 个复孔, 干预 24 h 后, 每孔分别加入 10 μL MTT 溶液, 孵育 4 h, 加 250 μL 的 DMSO 溶解, 用酶标仪测定 490 nm 波长处的 OD 值, 确定脂肪酸造模液对 HepG2 细胞活力的影响^[23]。

1.3.3.2 油红 O 染色确定脂肪酸造模浓度及细胞内脂质蓄积情况

参照油红 O 染液说明书, 按体积比油红 O 染液:蒸馏水=3:2 配制工作液, 避光操作, 双层中性滤纸过滤, 即得。细胞在 6 孔板培养 24 h 后, 分别加入不同浓度 FFAs (0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L) 诱导细胞, 37 °C 培养箱孵育 24 h, 加入组织细胞专用固定液固定细胞, PBS 洗 2 次, 油红 O 孵育 30 min, PBS 洗 2 次, 60%异丙醇脱色, PBS 洗 2 次, 镜下观察细胞内脂质蓄积情况, 拍片记录^[24]。参照 1.3.3.1 的安全浓度, 同时结合各组油红 O 染色结果, 确定脂肪酸最佳造模浓度。

1.3.3 确定小枝玫瑰醇提物的安全浓度^[23]

HepG2 细胞培养 24 h (96 孔板, 接种密度为 5×10⁴ cells/mL), 设立空白对照组、小枝玫瑰醇提物组 (稀

释储备液至 50、100、200、400、600、800 μg/mL), 加入不同处理组样品, 继续培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL MTT 溶液, 培养 4 h, 弃上清, 加 DMSO 100 μL, 酶标仪测定 490 nm 波长的 OD 值, 计算细胞存活率, 确定小枝玫瑰醇提物的安全浓度。

1.3.4 小枝玫瑰醇提物清除 HepG2 细胞脂肪堆积实验^[25]

1.3.4.1 油红 O 染色及细胞内脂质含量的测定

HepG2 细胞接种到 24 孔板培养 24 h, 设立空白对照组 (DMEM 完全培养基)、模型组 (1.5 mmol/L FFA)、非诺贝特组 (1.5 mmol/L FFA+100 μmol/L 非诺贝特)、小枝玫瑰醇提物组 (1.5 mmol/L FFA+50 μg/mL, 1.5 mmol/L FFA+100 μg/mL, 1.5 mmol/L FFA+200 μg/mL), 每组设立 4 个复孔, 干预 24 h, 然后按 1.3.3.2 方法进行油红 O 染色, 镜下观察脂滴大小及数量, 拍片记录。

按上述方法处理后, 加 60%异丙醇脱色, PBS 清洗, 用 100%异丙醇溶解, 490 nm 处测得吸光度值。

1.3.4.2 细胞内 TG 含量测定

将 HepG2 细胞接种到培养瓶中, 37 °C, 5% CO₂ 培养 24 h, 按上步方法分组并加入不同浓度药物干预 24 h 后, 常规细胞消化步骤操作, 离心后得细胞沉淀, 弃上清, 加细胞裂解液 (RIPA:PMSF=100:1), 用 TG 试剂盒方法测定细胞内 TG 的含量。

1.3.5 Western Blot 检测各组 PPARα、ACOX1、CPT1A 蛋白的表达

参考 BCA 蛋白定量试剂盒方法测定蛋白浓度^[26]。根据 10% SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒说明书制胶, 等量蛋白样品 (上样量统一为 10 μL), 电泳结束后, 电转至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉封闭, 一抗孵育过夜。二抗室温孵育 50 min, 电化学发光 (ECL) 显色拍照, GAPDH 为内参。

1.4 统计学处理

利用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行统计学分析。数值以 $\bar{x} \pm S$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析和 LSD 法统计。p<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 小枝玫瑰醇提物对 HepG2 细胞存活率的影响

以小枝玫瑰醇提物为研究对象, 评价在 24 h 内, 小枝玫瑰醇提物 (0、50、100、200、400、600、800

μmol/L)对 HepG2 细胞活性的影响,结果如图 1 所示。不同浓度的小枝玫瑰醇提取物处理 HepG2 细胞 24 h 后,与正常组细胞相比较,当干预浓度小于等于 200 μmol/L 时,细胞存活率高于 95%,保持着良好的生长活性;但当干预浓度为 400、600 μmol/L 和 800 μmol/L 时,与空白对照组相比, HepG2 细胞存活率显著下降 ($p<0.01$),细胞存活率已低于 70%。本实验中为了避开小枝玫瑰醇提取物本身对细胞造成抑制作用,后续药物干预实验采用的梯度浓度为(50、100、200 μmol/L)。

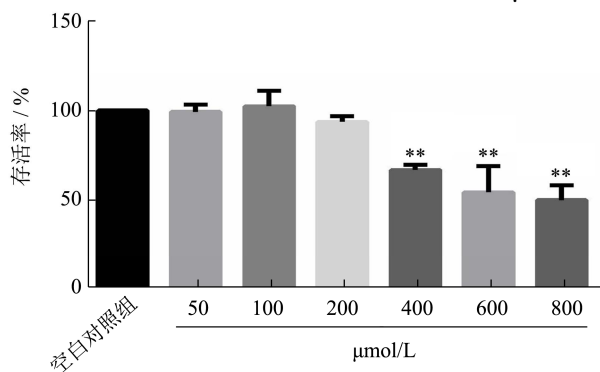


图 1 小枝玫瑰醇提取物对 HepG2 细胞活性的影响

Fig.1 Effects of alcohol extract of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. on the viability of HepG2 cells

注:与空白对照组比较, ** $p<0.01$ 。表 2 同。

2.2 FFAs 诱导 HepG2 细胞建立体外脂肪酸负荷模型

2.2.1 不同浓度 FFAs 对 HepG2 细胞活性的影响

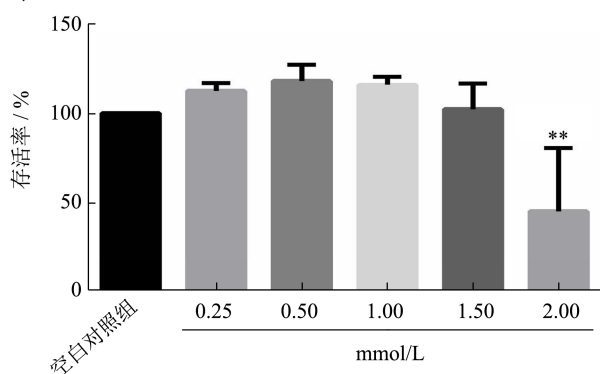


图 2 不同浓度的 FFAs 对 HepG2 细胞活性的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of FFAs on the viability of HepG2 cells

采用饱和或者不饱和 FFAs 孵育细胞建立脂肪堆积模型(脂肪酸负荷模型)是目前 NAFLD 的体外研究普遍采用的方法,以 HepG2 细胞最为常见。如图 2 所示,本实验借助 MTT 法考察 FFAs 在 24 h 内对 HepG2 细胞存活率的影响,分别设置浓度为 0、0.25、

0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L。实验结果显示随着 FFAs 浓度的增大, HepG2 细胞存活率逐渐加大,直到 1.5 mmol/L 时细胞的存活率仍处于 90%以上,细胞活性良好;而当达到 2.0 mmol/L 时,与空白对照组相比细胞存活率大大降低 ($p<0.01$)。因此 FFAs 的造模的安全浓度小于等于 1.5 mmol/L,最终造模的浓度的选择还需结合参考不同浓度 FFAs 诱导 HepG2 细胞的油红 O 染色结果。

关于 HepG2 细胞用 FFAs 造体外脂肪酸负荷模型,不同的文献^[27-29]中造模浓度(0.5、1.0、1.5 mmol/L)不尽相同,为了保证本次实验结果的准确可靠,对 FFAs 的浓度进行考察,并得到安全浓度范围(0~1.5 mmol/L)。

2.2.2 不同浓度 FFAs 干预 HepG2 细胞后脂滴形成情况

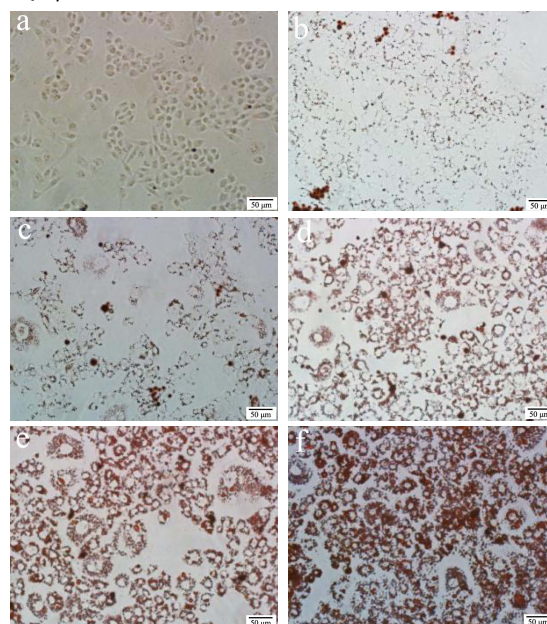


图 3 不同浓度 FFAs 干预 HepG2 细胞后脂滴形成情况 (50 μm)

Fig.3 Lipid droplet formation after intervention of HepG2 cells with different concentrations of FFAs

注: a: 正常组; b: 0.25 mmol/L; c: 0.5 mmol/L; d: 1.0 mmol/L; e: 1.5 mmol/L; f: 2.0 mmol/L。

如图 3 所示,正常组(图 3a) HepG2 细胞大多呈短梭形或菱形,结构完整,形态规则,分布均匀,生长状态良好,胞浆内无明显脂滴,边界清晰。FFAs 诱导的各组细胞,随着 FFAs 浓度的增加,有不同程度的脂变性,倒置显微镜下观察可见各组细胞形成了不同程度的红色脂滴;在浓度为 0.25 mmol/L 至 1.5 mmol/L 时(图 3b~3e),随着 FFAs 浓度增大,红色脂滴数量开始逐渐增加并呈现连续排列成环状,常常围绕在细胞核周围;但当 FFAs 浓度增大 2.0 mmol/L 时,脂滴融合,界限不清,排列无序,乃至出现细胞破损

状况。由图 2 的结果可知细胞在 FFAs 浓度为 2.0 mmol/L 时存活率低于 70%，影响了细胞正常生长。因此，为了实验结果的准确可靠，结合图 2 的 MTT 结果和油红 O 染色形态学指标，最终选择 1.5 mmol/L 的 FFAs 作为 HepG2 细胞脂肪堆积模型的造模浓度。

2.3 小枝玫瑰醇提取物对 FFAs 诱导 HepG2 细胞脂质蓄积和 TG 的影响

2.3.1 小枝玫瑰醇提取物对脂肪堆积 HepG2 细胞内脂质蓄积的抑制作用

本实验中用油红 O 染色定性和定量的表征小枝玫瑰醇提取物对 HepG2 细胞脂肪堆积模型脂滴的影响。油红 O 染色已经成为研究动物组织和细胞中脂质代谢的常规定性和半定量的分析方法^[30,31]，半定量的方法有些是借助图谱 ImageJ 软件对各组细胞的平均光密度分析或是异丙醇溶解油红 O 后在 490 nm 处测定 OD 值各组进行比较分析。油红 O 染色和细胞 TG 含量测定评估细胞脂质积累的经典指标^[32]。

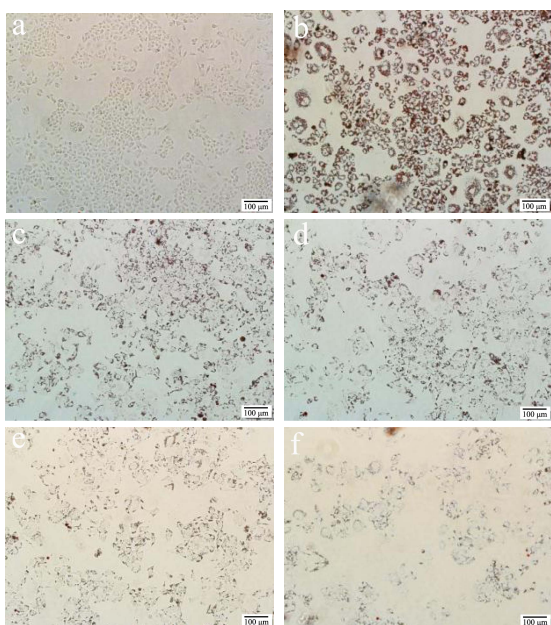


图 4 小枝玫瑰醇提取物对 FFAs 诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的影响 (100 μm)

Fig.4 Effect of alcohol extract of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. on fat accumulation in HepG2 cells induced by FFAs

注：a：正常组；b：模型组；c：造模液+100 μg/mL 非诺贝特；d：造模液+50 μg/mL 小枝玫瑰；e：造模液+100 μg/mL 小枝玫瑰；f：造模液+200 μg/mL 小枝玫瑰。

各组细胞油红 O 染色结果如图 4 所示，与正常组相比，模型组细胞中显示大量红色脂滴，成串珠样或者脂滴融合为不规则形状，肉眼可见脂变程度明显。随着小枝玫瑰醇提取物浓度的增加（50、100、200

μg/mL），细胞内红色脂滴数量大大减少，脂变性状况得到缓解（图 4d~4f）。与模型组相比，阳性药非诺贝特组和小枝玫瑰醇提取物高、中、低浓度组的脂滴数量和密度均显著减少，细胞内脂滴融合情况减少，这表明阳性药物组和各给药组均能不同程度地对抗 FFAs 诱导的肝细胞的脂肪堆积，抑制细胞内脂滴的形成。如图 5 所示，细胞内脂质含量：模型组细胞为 1.12 (OD 值)，正常组细胞为 0.10 (OD 值)，两组相比，差异显著 ($p < 0.01$)；随着小枝玫瑰醇提取物浓度的增加，HepG2 细胞内脂质含量呈现逐渐下降的趋势。与模型组相比，阳性药组 (OD 值为 0.88) 和小枝玫瑰低中高剂量组 (OD 值分别为 0.84、0.75、0.71) 的细胞内脂质含量均明显减少 ($p < 0.01$)；当小枝玫瑰醇提取物浓度达到 200 μg/mL，细胞内脂质含量降低了 36.61%。这说明小枝玫瑰醇提取物具有清除细胞脂肪累积的能力，能够显著缓解 FFAs 诱导细胞内脂质蓄积。

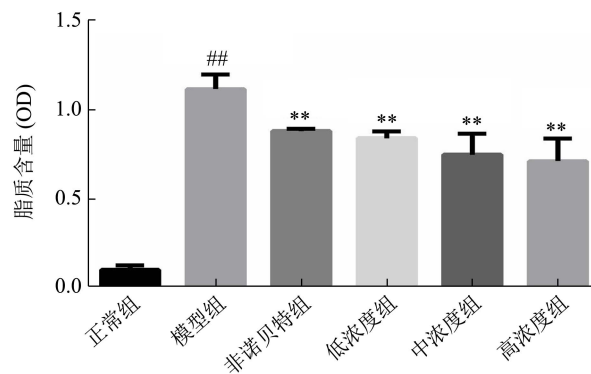


图 5 小枝玫瑰醇提取物对 FFAs 诱导 HepG2 细胞脂质含量的影响
Fig.5 Effect of alcohol extract of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. on lipid content in HepG2 cells induced by FFAs

注：与正常组比较， $##p < 0.01$ ；与模型组比较， $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ 。表 6 同。

2.3.2 小枝玫瑰醇提取物对 FFAs 诱导细胞内 TG 含量的影响

肝脏是脂肪酸代谢的中枢器官，通过复杂而精确调控生化、信号和细胞通路来控制脂质稳态的中心器官。肝脏发生着众多的生理生化和代谢反应，肝脏的细胞类型有很多种，其中肝实质细胞，也是我们常说的肝细胞是最重要的细胞类型之一，它是多种生化反应和代谢（如：糖脂代谢）场所。脂肪酸在细胞和血液中常常以 TG 的形式存在，而 TG 的合成贮存和代谢转运等常常在肝细胞中进行^[33]。肝细胞可从血液中摄取脂肪酸，也可以通过脂肪从头合成过程而产生。脂肪酸的消除形式有两种，一是组装到极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 中分泌到血液中而消除，一是在细胞内通过氧化分解而消除。VLDL 的蛋白组装和功能关系到 TG 能否顺利转

出肝细胞^[34]。肝细胞内 TG 的含量是检测 NAFLD 脂变性的指标。

关于玫瑰提取物的动物实验,有研究报道^[18],玫瑰花多酚可以降低高脂血症大鼠血清 TG 水平,同时显著改善高脂血症大鼠肝脏脂肪变性,抑制脂肪酸合成酶的形成,但在此研究中并未开展对大鼠肝脏 TG 的检测和机制研究,只是形态学指标上观察到玫瑰多酚可以改善肝脏脂肪变性。另有研究指出^[15],玫瑰黄酮提取物可改善高脂血症大鼠血脂四项指标并抑制单核细胞趋化因子 1 的表达,研究结果显示,大鼠血清 TG 水平,模型组 TG 含量 4.98 mmol/L 显著高于玫瑰黄酮高剂量组 TG 含量 3.25 mmol/L ($p<0.05$)。本课题组前期发现^[16,17]:动物实验结果显示,小枝玫瑰水提物和醇提物对四氧嘧啶糖尿病小鼠均有降血糖作用,同时可改善小鼠糖耐量;体外实验,小枝玫瑰醇提物可抑制 α -葡萄糖苷酶活性(其 IC_{50} 为 11.35 $\mu\text{g/mL}$),其抑制活性超过阳性药阿卡波糖(其 IC_{50} 为 15.92 $\mu\text{g/mL}$)。这些研究表明,玫瑰提取物对于糖代谢和脂代谢均有非常好的调节作用,为开发小枝玫瑰醇提物对糖脂代谢类疾病的研究奠定了基础。

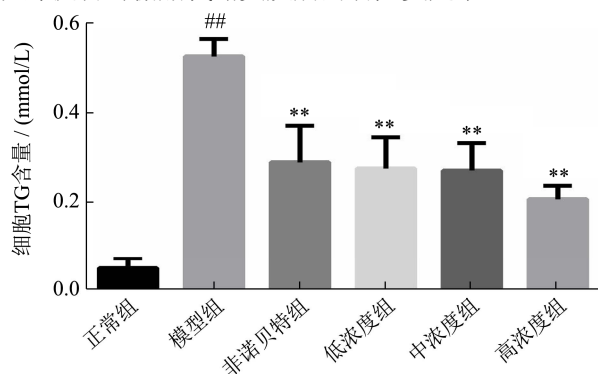


图6 小枝玫瑰醇提物对 FFAs 诱导细胞内 TG 含量的影响

Fig.6 Effect of alcohol extract of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. on TG content in cells induced by FFAs

小枝玫瑰醇提物对 FFAs 诱导细胞内 TG 含量的影响,结果如图 6 所示,模型组 TG 含量为 0.53 mmol/L 极显著高于正常组 TG 含量 0.05 mmol/L ($p<0.01$);随着小枝玫瑰醇提物浓度的逐渐增加,与模型组相比,小枝玫瑰各浓度组细胞内 TG 含量显著减少($p<0.01$),中浓度组 TG 含量降低了 49.06%,低浓度组 TG 含量降低了 47.17%;当小枝玫瑰醇提物为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞内 TG 含量降低至 0.21 mmol/L。与模型组 TG 含量 (0.53 mmol/L) 相比,阳性药非诺贝特组 TG 含量 (0.29 mmol/L) 明显降低 ($p<0.01$)。在本实验中,小枝玫瑰醇提物能够显著降低 FFAs 诱导细胞内 TG 和脂质含量,改善肝细胞内脂质蓄积情况。

2.4 小枝玫瑰醇提物对 FFAs 诱导的 HepG2 细胞 PPAR α 通路蛋白表达的影响

肝脏脂肪酸代谢失衡导致肝细胞内 TG 的过度积累。代谢相关脂肪性肝病表现为 TG 以脂滴的形式在肝细胞中异常蓄积,肝脏脂肪变性严重可发展为 NASH、肝硬化和肝癌。肝脏脂质异常沉积,大多是因为脂肪酸 β 氧化不足或脂质合成过度导致,受损肝细胞的 PPAR α 失去了对下游参与脂质合成、脂肪酸氧化等相关靶基因调控作用^[35-37]。脂肪酸氧化分解代谢过程,根据脂肪酸链的长短不同,发生场所不同,主要是在线粒体和过氧化物酶体中进行。脂肪酸氧化发生的关键酶是 CPT1A 和 ACOX1。PPAR α 是一种通过调控其下游靶基因 CPT1A 和 ACOX1 来发挥影响脂肪酸氧化的^[38]。机体 PPAR α 的异常会导致脂质代谢的紊乱,从而引发脂代谢障碍等相关疾病,如:非酒精性脂肪肝、高脂血症、心血管疾病等。在生理条件下,人们通过饮食摄入的脂肪酸可在细胞内转换为脂酰辅酶 A,然后再进入线粒体中氧化分解释放能量,以便机体利用。脂酰辅酶 A 由于分子量较大,不能直接进入线粒体,此时需要和肉碱结合促进其转运,CPT1A 是催化脂酰辅酶 A 结合的酶,因此其含量的高低直接决定长链脂肪酸是进入线粒体还是存储于胞质^[39]。在脂肪酸进入线粒体后, β 氧化酶系之一 ACOX1 又在其中占有重要地位,有文献报道 ACOX1^{-/-}小鼠表现出脂肪性肝炎、肝脏 H_2O_2 水平升高,广泛的自发性过氧化物酶体增殖的增加,证明了 ACOX1 在 PPAR α 生理调节功能中的必不可少的作用^[40]。脂肪酸氧化代谢通路在抗肝脏脂变性研究中显得尤为重要。

鉴于前期实验中发现小枝玫瑰醇提物对 FFAs 诱导的 HepG2 细胞中 TG 的改善作用显著,我们选择研究从脂肪酸氧化代谢途径探究小枝玫瑰醇提物。因此在本实验中,我们考察了脂肪酸 β -氧化的关键蛋白 PPAR α 及其下游的 ACOX1、CPT1A。如图 7 所示,与正常组相比,模型组细胞 PPAR α 、ACOX1、CPT1A 的蛋白表达明显下调 ($p<0.01$)。与模型组相比,小枝玫瑰醇提物中、高浓度组的 PPAR α 、ACOX1 的蛋白表达显著上调,中浓度组 ($p<0.05$),高浓度组 ($p<0.01$),呈现剂量依赖性;小枝玫瑰醇提物低、中、高浓度组的 CPT1A 的蛋白表达显著上调,低浓度组 ($p<0.05$),中、高浓度组 ($p<0.01$),呈现剂量依赖性;阳性药非诺贝特组 PPAR α 、ACOX1、CPT1A 的蛋白表达明显上调 ($p<0.05$)。此外,实验结果发现,

小枝玫瑰醇提取物不同剂量组对于 HepG2 细胞中相关蛋白表达水平的影响同样呈现浓度依赖性。

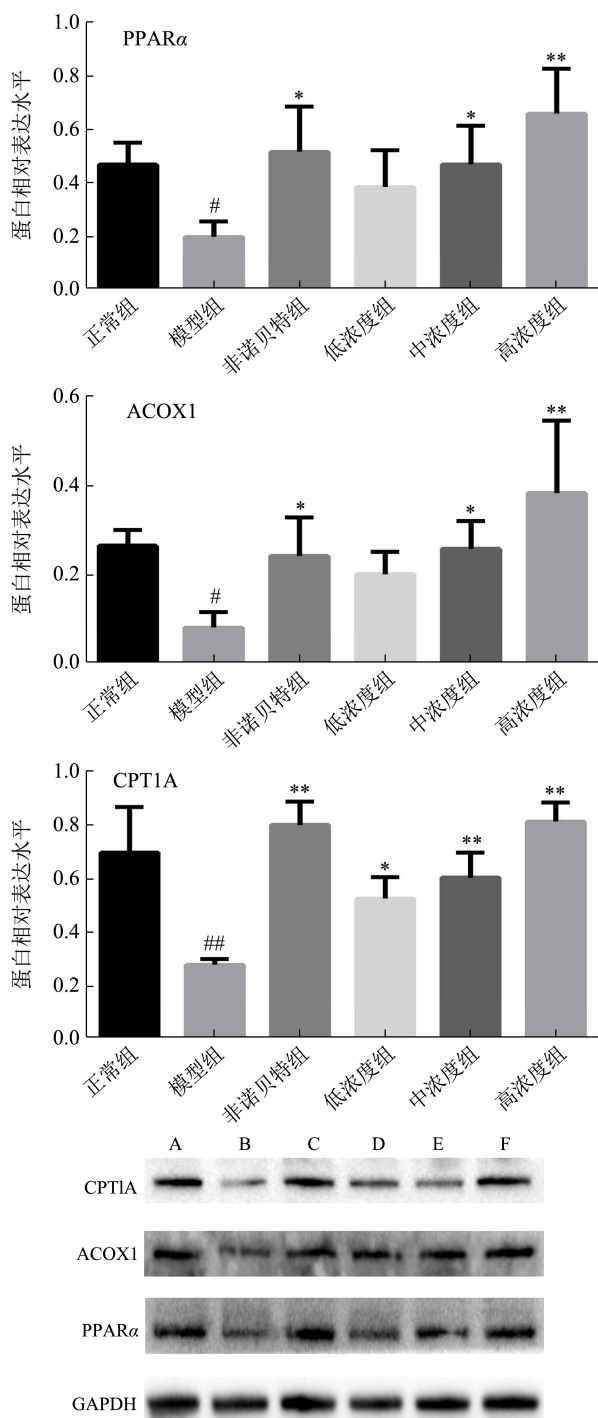


图7 小枝玫瑰醇提取物对 FFAs 诱导的 HepG2 细胞 PPAR α 通路蛋白表达的影响

Fig.7 Effects of alcohol extract of *Branchlets Rosa rugosa* Thunb. on the proteins expression of PPARα pathway in FFAs-induced HepG2 cells

注: A: 正常组; B: 模型组; C: 非诺贝特组; D: 低浓度组; E: 中浓度组; F: 高浓度组。与正常组比较, [#] $p < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ 。

本文研究显示, FFAs 孵育 HepG2 细胞建立的脂

肪酸负荷模型, 模型组细胞的脂肪酸分解代谢相关蛋白 PPARα、CPT1A 和 ACOX1 的表达显著下调。这表明, HepG2 细胞中脂肪酸的积累可能导致肝脏脂肪酸氧化分解途径受阻或影响相关的代谢通路, 使得肝细胞中脂质蓄积, 脂变性严重。经小枝玫瑰醇提取物干预后, PPARα、CPT1A 和 ACOX1 的表达均升高, 提示小枝玫瑰醇提取物可通过上调 PPARα 及其转录靶基因 CPT1A 和 ACOX1 的蛋白表达水平, 促进肝细胞内脂肪酸 β-氧化, 在一定程度上减轻肝细胞脂质累积。

3 结论

本实验以小枝玫瑰醇提取物为原料, 以 FFAs 诱导 HepG2 细胞建立体外脂肪堆积模型, 研究了小枝玫瑰醇提取物对 FFAs 诱导 HepG2 细胞脂肪变性的改善作用及相关作用机制。小枝玫瑰醇提取物通过激动 PPARα 信号通路, 上调了 PPARα 的表达, 并上调了其调控的下游 CPT1A 和 ACOX1 的表达, 促进脂肪酸氧化分解, 改善 FFAs 诱导的肝细胞内脂质蓄积, 减少细胞内 TG 蓄积, 进而达到改善 NAFLD 作用。小枝玫瑰或可成为改善 NAFLD 的候选植物药, 为治疗提供新的选择。

参考文献

- [1] Zobair M Younossi, Aaron B Koenig, Dinan Abdelatif, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. Lancet, 2016, 64: 73-84
- [2] Rinella M E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review [J]. JAMA, 2015, 313(22): 2263- 2273
- [3] Diehl A M, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. N Engl J Med, 2017, 377(21): 2063-2072
- [4] Birkenfeld A L, Shulman G I. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes [J]. Hepatology, 2014, 59(2): 713-723
- [5] 信丰智, 范建高. 欧洲非酒精性脂肪性肝病诊疗指南解读 [J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24(6): 403-405
XIN Fengzhi, FAN Jianga. Interpretation of European clinical practice guidelines for the management of patients with non-alcoholic fatty liver diseases [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2016, 24(6): 403-405
- [6] Ross S M. Red Yeast Rice: The efficacy of *Monascus purpureus* yeast for treatment of hyperlipidemia a modifiable risk factor of cardiovascular disease [J]. Holist Nurs Pract, 2017, 31(1): 52-58

- [7] Milonas D, Tziomalos K. Experimental therapies targeting apolipoprotein C-III for the treatment of hyperlipidemia-spotlight on volanesorsen [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28(4): 389-394
- [8] Gao Y, Tian R, Liu H, et al. Research progress on intervention effect and mechanism of protocatechuic acid on nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, 6: 1-23
- [9] 叶平.他汀类药物安全性再认识[J].*中华心血管病杂志*, 2013,41(7):540-541
YE Ping. Recognition of the safety of statins [J]. *Chinese Journal of Cardiology*, 2013, 41(7): 540-541
- [10] 新疆维吾尔自治区卫生厅.维吾尔药材标准:上册[M].新疆人民出版社,1993:8
Department of Public Health of Xinjiang Uygur Autonomous Region. Uyghur Medicinal Material Standards: Volume 1 [M]. Xinjiang People's Health Publishing House, 1993: 8
- [11] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药分册[S].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1998:141
Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of the People's Republic of China. Uyghur Medicines of the Ministry of Health Drug Standards of the People's Republic of China [S]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Medical Press, 1998: 141
- [12] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:200
Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part One) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 200
- [13] 薛鹏,孙晓燕,张威毅,等.玫瑰细胞露的化学成分及活性研究[J].*现代食品科技*,2017,33(6):105-110,44
XUE Peng, SUN Xiaoyan, ZHANG Weiyi, et al. Phytochemical constituents, and antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibitory activities of rose oil distillation wastewater [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(6): 105-110, 44
- [14] 姜君君.小枝玫瑰的活性筛选与成分含量测定[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2016
JIANG Junjun. Activity screening and determining the component content of branchlets roses [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2016
- [15] 贺家勇,魏琴,李志强,等.玫瑰黄酮提取物对高脂血症大鼠血脂及单核细胞趋化因子 1 表达的影响[J].*新疆医科大学学报*,2018,41(11):1404-1407
HE Jiayong, WEI Qin, LI Zhiqiang, et al. Effects of rose flavonoid extract on blood lipid and monocyte chemoattractant factor-1 expression in hyperlipidemia rats [J]. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2018, 41(11): 1404-1407
- [16] 兰卫,王莹,郝宇薇,等.维药小枝玫瑰提取物对四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖及糖耐量的影响[J].*药物评价研究*,2017,40(4):492-495
LAN Wei, WANG Ying, HAO Yuwei, et al. Effects of Uygur medicine branchlets roses extracts on blood glucose and glucose tolerance in diabetes mice induced by alloxan [J]. *Drug Evaluation Research*, 2017, 40(4): 492-495
- [17] 郭玉婷,兰卫,田思敏,等.新疆小枝玫瑰降糖作用及机制研究[J].*新疆医科大学学报*,2015,4:452-454
GUO Yuting, LAN Wei, TIAN Simin, et al. The study on anti-diabetes and its mechanism of Xinjiang branchlets roses [J]. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2015, 4: 452-454
- [18] 陈永真.玫瑰花有效成分对高脂血症大鼠的干预作用[D].呼和浩特:内蒙古医科大学,2020
CHEN Yongzhen. Intervention of active constituents of rose flower on hyperlipidemic rats [D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2020
- [19] 王骁腾.新疆高脂血症中医证候及相关因素的临床研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2016
WANG Xiaoteng. Clinical study on TCM syndromes and related factors of hyperlipidemia in Xinjiang [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2016
- [20] 刘寰宇,王莹,严文平,等.小枝玫瑰总黄酮提取工艺研究[J].*新疆医科大学学报*,2018,41(8):1016-1018
LIU Huanyu, WANG Ying, YAN Wenping, et al. Study on extraction process of total flavones in branchlet rose [J]. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2018, 41(8): 1016-1018
- [21] 郝广萍.人肝癌细胞 HepG2 培养方法探究与分析[J].*华北理工大学学报(医学版)*,2018,20(1):7-10
HAO Guangping. Explore and analysis on culture methods of HepG2 cells [J]. *Journal of North China University of Science and Technology (Health Sciences Edition)*, 2018, 20(1): 7-10
- [22] 韩丽.新疆维药芹菜根抗高脂血症活性部位的制备和体外药效学研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2017
HAN Li. Preparation and pharmacodynamics study on the active site of anti-hyperlipidemia of Xinjiang *Apium graveolens* L. root [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University,

- 2016
- [23] 刘畅,张海华,柴洋洋,等.红树莓提取物降低油酸诱导 HepG2 细胞脂肪的积累[J].现代食品科技,2019,35(2):24-31, 178
LIU Chang, ZHANG Haihua, CHAI Yangyang, et al. Effect of raspberry extract on reducing oleic acid-induced fat accumulation in HepG2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(2): 24-31, 178
- [24] 秦红霞,赵玲,王宇豪,等.两种脂肪细胞内脂滴染色方法的比较研究[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2014,23(6): 544-547
QIN Hongxia, ZHAO Ling, WANG Yuhao, et al. Comparative research of two methods for staining lipid droplet in adipocytes [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2014, 23(6): 544-547
- [25] Lee M R, Park K I, Ma J Y. *Leonurus japonicus* Hoult attenuates nonalcoholic fatty liver disease in free fatty acid-induced HepG2 cells and mice fed a high-fat diet [J]. Nutrients, 2017, 10(1): 20
- [26] 刘欣欣,孙华磊,葛惠娜,等.紫檀芪对 II 型糖尿病大鼠血脂的改善及对 PPAR γ 的调控作用[J]. 现代食品科技,2018,34 (9):6-11
LIU Xinxin, SUN Hualei, GE Huina, et al. The improvement of blood lipid in type II diabetic rats by pterostilbene and its modulation of PPAR γ expression [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(9): 6-11
- [27] 魏晓丽,郭艳丽,张永威,等.基于网络药理学探究黄诺玛昔对非酒精性脂肪肝的降脂作用[J].第三军医大学学报,2021, 43(5):383-394
WEI Xiaoli, GUO Yanli, ZHANG Yongwei, et al. Lipid-lowering effect of flavanomainon on non-alcoholic fatty liver disease based on network pharmacology [J]. Journal of Third Military Medical University, 2021, 43(5): 383-394
- [28] Zhang J, Du H, Shen M, et al. Kangtaizhi granule alleviated nonalcoholic fatty liver disease in high-fat diet-fed rats and HepG2 cells via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. J Immunol Res, 2020, 2020(8): 1-17
- [29] 张晓霞,韩丽,孙晶,等.新疆芹菜根提取物抑制 HepG2 细胞体外脂肪堆积的实验研究[J].新疆医科大学学报,2019,42 (6):808-812
ZHANG Xiaoxia, HAN Li, SUN Jing, et al. Scavenging effect of the extract of *Apium graveolens* L. root in Xinjiang on fat accumulation in HepG2 cells [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2019, 42(6): 808-812
- [30] Yuan W, Yan M, Wang Y, et al. Optimized preparation of eugenol microcapsules and its effect on hepatic steatosis in HepG2 cells [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2021, 47(2): 225-234
- [31] He M, Wang C, Long X H, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor ameliorates steatosis in HepG2 cells by regulating hepatic lipid metabolism [J]. World J Gastroenterol, 2020, 6(10): 1029-1041
- [32] Liaqat H, Kim K J, Park S Y, et al. Antioxidant effect of wheat germ extracts and their antilipidemic effect in palmitic acid-induced steatosis in HepG2 and 3T3-L1 cells [J]. Foods, 2021, 10(5): 1061
- [33] Alves-Bezerra M, Cohen D E. Triglyceride metabolism in the liver [J]. Compr Physiol, 2017, 8(1): 1-8
- [34] Simon J, Nuñez-García M, Fernández-Tussy P, et al. Targeting hepatic glutaminase 1 ameliorates non-alcoholic steatohepatitis by restoring very-low-density lipoprotein triglyceride assembly [J]. Cell Metab, 2020, 31(3): 605-622
- [35] Byun S, Seok S, Kim Y C, et al. Fasting-induced FGF21 signaling activates hepatic autophagy and lipid degradation via JMJD3 histone demethylase [J]. Nat Commun, 2020, 1(1): 807
- [36] Zhang Z J, Zong C, Jiang M Y, et al. Hepatic HuR modulates lipid homeostasis in response to high-fat diet [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 3067
- [37] Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Hepatol, 2015, 62(3): 720-733
- [38] Joo H K, Lee Y R, Lee E O, et al. Protective role of dietary capsanthin in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Med Food, 2021, 24(6): 635-644
- [39] Sudhir K, Richa R, Karns R, et al. Augmenter of liver regeneration protein deficiency promotes hepatic steatosis by inducing oxidative stress and microRNA-540 expression [J]. FASEB J, 2019, 33(3): 3825-3840
- [40] Fan C Y, Pan J, Usuda N, et al. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism [J]. J Biol Chem, 1998, 273(25): 15639-15645