

红树莓提取物降低油酸诱导 HepG2 细胞脂肪的积累

刘畅¹, 张海华², 柴洋洋¹, 宋兴舜³, 王金玲¹

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 黑龙江谱尼测试科技有限公司, 黑龙江哈尔滨 150040)

(3. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 为研究红树莓对人肝细胞脂肪积累的影响, 本文以红树莓果和籽的提取物为原料, 测定了提取物中的活性成分, 并通过体外油酸诱导建立 HepG2 细胞脂肪积累模型, 以噻唑兰染色吸光度 (OD 值)、甘油三酯 (TG) 含量、细胞内脂质含量三个指标, 探索红树莓果和籽提取物对肝细胞脂肪积累的影响。试验结果表明: 红树莓果提取物中总酚 15.18±0.94 mg GAE/g、黄酮 1.25±0.05 mg RE/g、原花青素 20.35±1.06 mg CE/g、花色苷 1.15±0.70 mg CGE/g; 红树莓籽提取物中总酚 15.35±1.55 mg GAE/g、黄酮 11.22±0.66 mg RE/g、原花青素 27.08±0.99 mg CE/g、花色苷未检出; 以牛血清白蛋白 (BSA) 作为溶剂配制的 1000 μmol/L 油酸造模剂孵育 HepG2 细胞 24 h 可成功诱导肝细胞脂肪积累; 红树莓提取物能显著降低 1000 μmol/L 油酸诱导的肝细胞脂肪积累, 其中 200 μg/mL 红树莓果提取物处理细胞时, 与模型组相比, 胞内脂质含量降低了 25.93%, TG 含量降低了 37.23%; 4 mg/mL 红树莓籽提取物处理时, 胞内脂质含量降低了 47.12%, TG 含量降低了 46.23%。红树莓提取物中富含活性成分, 能够降低高脂细胞模型内脂肪的积累, 对脂肪肝等疾病具有一定的预防作用。

关键词: 红树莓; 提取物; HepG2; 脂肪积累

文章编号: 1673-9078(2019)02-24-31

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.004

Effect of Raspberry Extract on Reducing Oleic Acid-induced Fat

Accumulation in HepG2 Cells

LIU Chang¹, ZHANG Hai-hua², CHAI Yang-yang¹, SONG Xing-shun³, WANG Jin-ling¹

(1.School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(2.Heilongjiang Puni Technology Co., Ltd., Harbin 150040, China)

(3.School of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: In order to study the effect of red raspberry on human liver cell fat accumulation, the active components in the extracts of raspberry and seed were determined, and the fat accumulation model of HepG2 cells was established by oleic acid induction *in vitro*. The results showed that the contents of total polyphenols, flavonoid, proanthocyanidins and anthocyanins in red raspberry extract were 15.18±0.94 mg GAE/g, 1.25±0.05 mg RE/g, 20.35±1.06 mg CE/g, and 1.15±0.70 mg CGE/g, respectively. In raspberry seed extract, the contents of total polyphenols, flavonoid, and proanthocyanidins were 15.35±1.55 mg GAE/g, 11.22±0.66 mg RE/g, and 27.08±0.99 mg CE/g, respectively, and no anthocyanins was detected. Liver cell fat accumulation could be successfully induced by incubating HepG2 cells for 24 h with 1000 μmol/L oleic acid moulding agent prepared with bovine serum albumin (BSA) as solvent. Red raspberry extract could significantly reduce hepatocyte fat accumulation induced by 1000 μmol/L oleic acid. When 200 μg/mL red raspberry extract induced cells, the intracellular lipid content decreased by 25.93% and TG content decreased by 37.23% in comparison with the model group. When treated by 4 mg/mL raspberry seed extract, the intracellular lipid content was decreased by 47.12%, and TG content was decreased by 46.23% in comparison with the model group. Red raspberry extract is rich in active ingredients, which can reduce the accumulation of fat in the high-fat cell model, and has a certain preventive effect on diseases such as fatty liver.

Key words: red raspberry; extract; HepG2 cells; fat accumulation

收稿日期: 2018-11-01

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金 (2572017CA05); 哈尔滨市应用技术与开发项目 (2017RAYXJ012)

作者简介: 刘畅 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 王金玲 (1975-), 女, 工学博士, 副教授, 研究方向: 生物活性物质

红树莓 (*Rubus idaeus* L.) 又名覆盆子、托盘、红马林等, 蔷薇科悬钩子属浆果植物^[1]。红树莓在世界上被誉为“黄金水果”^[2], 果实酸甜可口, 可药食两用, 富含人体必需的多种营养成分及对人体有益的微量元素、花青素、黄酮以及鞣花酸等活性物质, 具有抗氧化、抗炎、抗癌细胞增殖、抑菌、降血压、降血脂、降血糖等生物学功能, 对乳腺癌细胞、中枢神经细胞、结肠癌细胞等具有一定的抑制作用^[3,4]。Luo 等^[5]通过动物实验研究发现摄入红树莓果、浓缩汁以及红树莓植物化学物质鞣花酸和覆盆子酮可以减少肥胖的发生。Garcia 等^[6]研究发现树莓多酚生物活性物质能够保护神经细胞减少氧化应激反应并减弱小胶质细胞的活化。靳振刚^[7]等通过动物实验发现红树莓提取物能显著降低高血脂大鼠血清中甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平和肝脏中 TG 水平。

现代人生活水平提高但生活节奏快、压力大, 加之饮食结构及饮食习惯的改变, 加剧了脂肪代谢的紊乱。而脂肪代谢紊乱是引发高血脂症、肥胖症、脂肪肝等的诱因, 其引发的非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), 现已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病, NAFLD 以肝细胞脂肪沉积为特征, 占肝脏重量的 5% 以上, 与肥胖、胰岛素抵抗和代谢综合征等密切相关, 肥胖人群中的患病率较高^[8,9]。近年来研究发现植物活性物质具有一定的调整脂类代谢的功能, 而且与合成的药物相比, 对身体健康无副作用^[10]。李新明^[11]等研究表明苹果多酚及其分离出的活性单体均具有较好的降脂活性。

目前, 国内外对红树莓果实主要从基础营养成分的测定、生物活性成分的分析、抗氧化以及产品的研发等方面进行了大量研究, 但对降脂功能的细胞实验报道较少。本试验以红树莓为原料, 测定了红树莓果和籽提取物中的活性成分, 并通过油酸诱导 HepG2 细胞建立脂肪积累模型, 研究红树莓提取物对细胞内脂肪积累的影响, 完善红树莓提取物对脂类代谢影响研究的基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

红树莓 (秋福, Autumn Bliss), 采自黑龙江省尚志市, 速冻处理后运回东北林业大学食品科学与工程实验室冻藏; 人肝癌细胞系 (HepG2), 购自黑龙江省肿瘤医院; DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液, 美国 HyClone 公司; 噻唑兰 (MTT), 美国 Amresco 公司; 油酸 (OA)、二甲

基亚砷 (DMSO), 美国 Sigma 公司; 甘油三酯 (TG) 试剂盒、蛋白测定 (BCA) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; RIPA 细胞裂解液, 碧云天生物技术研究所; 油红 O、PBS 磷酸盐缓冲液, 北京博奥拓达科技有限公司; 牛血清蛋白 (BSA), 上海源叶生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

Epoch2 微孔板分光光度计: 美国伯腾有限公司; DK-S12 电热恒温水浴锅: 上海森信试验仪器有限公司; CKX41 倒置显微镜: OLYMPUS; 二氧化碳培养箱: 美国赛默飞世尔科技公司; 超清工作台: YATAIKELONG; 离心机: 湖南星科科学仪器有限公司; 手提式压力蒸汽灭菌锅: 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; -80 °C 低温冰箱: 美国赛默飞世尔科技公司; 722 型可见分光光度计: 上海光谱仪器有限公司; DHG-9240 型电热恒温鼓风干燥箱: 上海一恒科技有限公司; 25 cm² 透气细胞培养瓶: 美国 Corning 公司; 96、12 孔板: 美国 Corning 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 红树莓提取物的制备

红树莓果提取物的制备^[7], 并略有修改: 红树莓冻果于室温解冻, 解冻后研磨成红树莓果泥, 以 1:8 (g/mL) 的料液比加入 65% 乙醇, 在提取温度 45 °C、提取时间 4 h 条件下密封震荡提取, 3000 r/min 离心 15 min 取上清液, 提取两次合并两次上清液, 在 45 °C、0.1 MPa 条件下真空旋转浓缩, 将浓缩液在 -20 °C 预冻 24 h, -80 °C 预冻 2 h, 冷冻干燥, 得到红树莓果提取物备用。

红树莓籽提取物的制备: 红树莓籽粉碎后在 4 °C 用石油醚浸提脱脂, 晾干称重以 1:60 (g/mL) 的料液比加入 60% 乙醇, 并用超声波辅助在温度 40 °C、功率 350 W、时间 45 min 条件下密封提取, 3000 r/min 离心 15 min 留上清液, 提取两次合并两次上清液, 在 45 °C、0.1 MPa 条件下真空旋转浓缩, 将浓缩液在 -20 °C 预冻 24 h, -80 °C 预冻 2 h, 冷冻干燥, 得到红树莓籽提取物备用。

1.3.2 活性成分的测定

1.3.2.1 总酚含量测定

参考吕俊丽^[12]的方法, 并略有修改。取 200 μL 待测样品于 10 mL 具塞比色管中, 加入 1 mL 福林酚试剂, 摇匀, 加入 2 mL 15% Na₂CO₃ 溶液, 蒸馏水定容到 10 mL, 充分摇匀室温下避光反应 2 h 后, 于波长 760 nm 处测定吸光值。以没食子酸为标准品, 绘

制质量浓度-吸光度曲线, 得到标准曲线为: $y=0.26x+0.0938$ ($R^2=0.9984$)。根据标准曲线可得其总酚含量, 红树莓果和籽提取物中总酚含量以每克红树莓果和籽粉(干重)中总酚的毫克数表示, 表示为 mg GAE/g, 下同。

1.3.2.2 总黄酮含量测定

参考闫蕊^[13]等的方法, 并略有修改。取 200 μL 待测样品于 25 mL 的具塞比色管中, 加水至 6 mL 后, 加 5% NaNO_2 溶液 1 mL, 摇匀静置 6 min 后, 加 1 mL 的 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, 摇匀静置 6 min 后, 加入 10 mL 的 1 mol/L NaOH , 用 50%乙醇定容至 25 mL, 静置 15 min, 在 500 nm 波长处测定吸光值。以芦丁为标准品, 绘制质量浓度-吸光度曲线, 得到标准曲线为: $y=0.976x+0.0906$ ($R^2=0.9996$)。根据标准曲线可得其总黄酮含量, 红树莓果和籽提取物中总黄酮以每克红树莓果和籽粉(干重)中总黄酮的毫克数表示, 表示为 mg RE/g。

1.3.2.3 原花青素、花色苷含量测定

原花青素用香草醛-浓硫酸法^[14]测定; 花色苷用 pH 示差法^[15]。

1.3.3 细胞培养

HepG2 细胞在 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的二氧化碳培养箱中, 用含 10% FBS、1%青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基培养。当细胞达 80%~90%密度时传代, 细胞生长稳定良好即可使用。取对数生长期细胞接种于 96、12 孔培养板进行实验。

1.3.4 细胞存活率的测定

细胞用 0.25%胰蛋白酶进行消化制成单细胞悬液, 计数, 按每孔 200 μL 、细胞密度 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 吸弃培养液, 设置对照组 (BC) 和试验组, 对照组加含 1% FBS 的 DMEM 培养基, 试验组加用含 1% FBS 的 DMEM 培养基配制的终浓度为 10、50、100、200、300、500、1000、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红树莓果提取物, 终浓度为 0.4、0.6、1、2、4、6、8、10 mg/mL 的红树莓籽提取物, 每组设 6 复孔, 重复试验三次, 加样后继续培养 24 h, 弃上清液, 加入 MTT 终质量浓度为 0.5 mg/mL 的无血清 DMEM 培养液 200 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h 后, 吸弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 避光振荡 10 min, 使结晶充分溶解, 在 490 nm 波长处用酶标仪测吸光度。

$$\text{细胞存活率}/\% = A_{\text{试验}}/A_{\text{对照}} \times 100$$

式中: $A_{\text{试验}}$ 为试验组的吸光度; $A_{\text{对照}}$ 为对照组的吸光度。

1.3.5 细胞脂肪积累模型的建立

采用 DMSO 带入油酸 (A) 和蛋白吸附 (B) ^[16]

两种方法制备油酸造模剂。油酸造模剂 A 的配制: 吸取油酸 0.318 mL, 在无菌通风避光环境下加入 0.682 mL 100% DMSO, 反复吹打, 直至油酸完全溶解于 DMSO 内, 配成 1 mol/L 的油酸造模剂, 0.22 μm 滤膜过滤除菌 4 $^\circ\text{C}$ 保存备用; 油酸造模剂 B: 吸取油酸 100 μL , 于 70 $^\circ\text{C}$ 水浴中边振荡边将油酸溶于 3.06 mL 0.1 mol/L NaOH 中, 配成 100 mmol/L 储备液; 称取 2.844 g BSA, 加 PBS 溶液 28.44 mL 溶解, 配成浓度为 10% 的 BSA 溶液; 于 55 $^\circ\text{C}$ 水浴中边振荡边将上述储备液逐滴加入 10% BSA 溶液中, 配成油酸浓度为 10 mmol/L 的溶液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20 $^\circ\text{C}$ 冻存备用。临用时用含 1% FBS 的 DMEM 培养基稀释至所需浓度。

将 HepG2 以每孔 200 μL 、细胞密度 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 待细胞贴壁后, 吸弃培养液, 设置对照组和模型组 (MC), 对照组加含 1% FBS 的 DMEM 培养基, 模型组加用含 1% FBS 的 DMEM 培养基配制的终浓度为 100、200、500、1000、1500、2000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的油酸造模剂, 每组设 6 复孔, 重复试验三次, 分别测定其 MTT 值、TG 含量及脂质含量。

1.3.6 红树莓提取物干预试验

细胞消化, 计数, 按每孔 2 mL、细胞密度 1×10^5 个/mL 接种于 12 孔板中, 培养 24 h, 设对照组、模型组 (MC) 和试验组; 对照组加含 1% FBS 的 DMEM 培养基, 模型组加用含 1% FBS 的 DMEM 培养基配制的终浓度为 1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 油酸造模剂 B, 试验组在与对照组相比无显著性差异范围内, 选择红树莓果和籽提取物的三个适当浓度(需要根据 1.3.4 结果确定), 加入用含 1% FBS 的 DMEM 培养基配制的终浓度为 1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 油酸造模剂 B 和相应浓度的红树莓提取物。培养 24 h 后测定细胞内 TG 含量及脂质含量。

1.3.7 油红 O 染色

按 1.3.5、1.3.6 处理后, 吸弃培养液, 加 2 mL PBS 溶液清洗细胞, 吸弃 PBS, 加入 2 mL 10%中性福尔马林溶液室温放置 10 min, 换新的 10%中性福尔马林溶液室温放置至少 1 h, 注意密封。吸弃中性福尔马林溶液, 以 2 mL 双蒸水洗细胞 2 次, 加 2 mL 60%异丙醇, 室温放置 5 min, 吸弃异丙醇, 室温放置或者电吹风小心吹干细胞。每孔加 1 mL 油红 O 工作液, 室温放置 10 min, 弃去油红 O, 马上用 1 mL 双蒸水洗细胞 4 次终止染色, 吸弃双蒸水后, 放置待细胞干, 每孔加 1 mL 100%异丙醇, 轻柔摇晃 10~15 min 使染剂充分溶解, 选择 490 nm 波长用酶标仪测吸光度, 计为脂质含量^[10]。

1.3.8 TG 和蛋白含量的检测

按 1.3.5、1.3.6 各组处理后, 吸弃培养液, 用 PBS 小心洗 2~3 次, 加入 RIPA 细胞裂解液, 充分裂解后, 6000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 TG 试剂盒测定 TG 含量、BCA 试剂盒测定总蛋白含量。

1.3.9 数据处理

采用 Excel 制图, 采用 SPSS 20.0 对数据进行处理与分析, 结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。各组数据采用邓肯多重

范围检验法 (Duncan's Multiple-Range test) 分析数据间的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 红树莓提取物中活性成分分析

红树莓提取物中总酚、黄酮、原花青素、花色苷的含量见表 1。

表 1 红树莓提取物中总酚、黄酮、原花青素、花色苷含量

Table 1 The content of total phenol, flavones, procyanidins and anthocyanins in the extracts of red raspberry

样品	总酚/(mg GAE/g)	总黄酮/(mg RE/g)	原花青素/(mg CE/g)	花色苷/(mg CGE/g)
红树莓果提取物	15.18±0.94	1.25±0.05	20.35±1.06	1.15±0.70
红树莓籽提取物	15.35±1.55	11.22±0.66	27.08±0.99	未检出

由表 1 可以看出, 红树莓果提取物活性成分中总酚含量接近红树莓籽提取物的, 而总黄酮和原花青素的含量低于籽提取物的, 这可能由于红树莓籽经过粉碎处理可以使活性成分更大程度地释放出来, 因此籽中活性成分含量略高; 但籽中未检出花色苷, 由于花色苷色素的主要成分主要存在于红树莓果肉中。孟实^[17]等通过 HPLC 方法对树莓提取物中活性成分进行了测定, 结果表明树莓提取物中富含多种酚类物质如鞣花酸 (0.51 $\mu\text{g/g}$)、树莓酮 (0.11 $\mu\text{g/g}$)、原花青素 B₂ (1.94 $\mu\text{g/g}$)、矢车菊素 (0.61 $\mu\text{g/g}$)、水杨酸 (0.07 $\mu\text{g/g}$) 等, 是红树莓具有活性物质的基础。韩晓波^[18]等总结了树莓中的活性成分如鞣花酸、花青素等对肝损伤的保护作用及机制。红树莓果和籽提取物中富含活性物质这为进一步研究对肝癌细胞内脂肪积累情况提供依据。

2.2 红树莓提取物对 HepG2 细胞存活率的影响

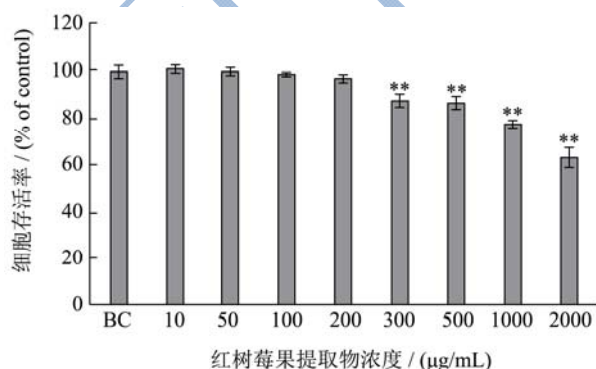


图 1 红树莓果提取物对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of red raspberry extract on HepG2 cell viability

注: *表示与 BC 组比较具有显著性差异 ($p < 0.05$); **表示与 BC 组比较具有极显著性差异 ($p < 0.01$)。

通过 MTT 法检测不同浓度的红树莓提取物处理细胞 24 h 后对细胞存活率的影响, 其中红树莓果提取物对细胞存活率的影响如图 1 所示。

由图 1 可知, 红树莓果提取物的浓度与 HepG2 细胞的存活率呈剂量依赖关系, 随着红树莓果提取物浓度的增大细胞存活率逐渐降低。与 BC 组相比, 当红树莓果提取物浓度高于 300 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率有极显著性降低 ($p < 0.01$), 说明高剂量果提取物对 HepG2 细胞的生长有一定影响作用; 红树莓果提取物浓度在 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围, 对细胞存活率没有显著性影响 ($p > 0.05$)。张春鹏^[19]等研究红树莓丙酮提取物对 HepG2 细胞的影响, 结果表明随着树莓丙酮提取物浓度增大对 HepG2 细胞抑制率逐渐增加, 细胞存活率逐渐降低, 与本试验结果相似。综合考虑, 采用 200 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度作为处理 HepG2 细胞脂肪积累的上限质量浓度。

图 2 是红树莓籽提取物对 HepG2 细胞存活率的影响。

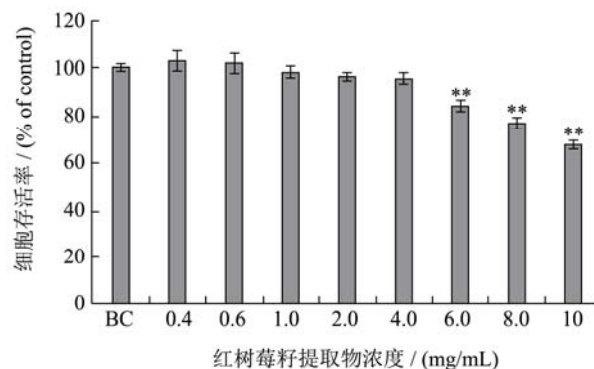


图 2 红树莓籽提取物对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.2 Effects of red raspberry seed extract on HepG2 cell viability

注: *表示与 BC 组比较具有显著性差异 ($p < 0.05$); **表示与 BC 组比较具有极显著性差异 ($p < 0.01$)。

由图 2 可知,红树莓籽提取物的浓度与 HepG2 细胞的存活率呈剂量依赖关系,随着红树莓籽提取物浓度的增大细胞存活率逐渐降低。与 BC 组相比,当红树莓籽提取物浓度高于 6 mg/mL 时,细胞存活率具有极显著性差异 ($p < 0.01$),说明高剂量籽提取物对细胞的生长有影响作用;红树莓籽提取物浓度在 0.4~4 mg/mL 范围,对细胞存活率没有显著性影响 ($p > 0.05$),并且在低浓度下,细胞存活率大于 100%,这是可能由于树莓籽中富含许多活性成分促进了细胞生长。夏兰兰^[20]等对不同样品葡萄籽多酚化合物抗氧化和抗癌细胞增殖能力进行研究,结果表明低剂量葡萄籽提取物对细胞生长有促进作用,细胞存活率大于 100%,随着葡萄籽提取物浓度的增加,细胞存活率逐渐降低。综合考虑,采用 4 mg/mL 的浓度作为处理 HepG2 细胞脂肪积累的上限质量浓度。

2.3 细胞脂肪积累模型的建立

2.3.1 油酸造模剂对细胞存活率的影响

图 3 是油酸造模剂 A 和 B 对 HepG2 细胞存活率的影响。

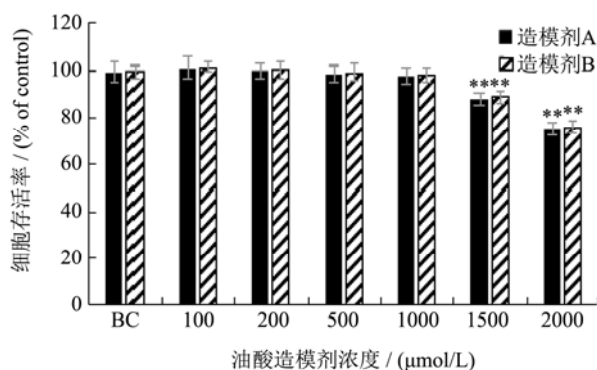


图 3 油酸造模剂 A 和 B 对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.3 Effects of oleic acid modulator A and B on HepG2 cell viability

注: *表示与 BC 组比较具有显著性差异 ($p < 0.05$); **表示与 BC 组比较具有极显著性差异 ($p < 0.01$)。

由图 3 可知,随着油酸造模剂 A 和 B 的浓度增加, HepG2 细胞的存活率逐渐降低,当浓度在 100~200 μmol/L 时,与 BC 组相比细胞存活率大于 100%,说明低剂量的油酸造模剂能促进细胞生长;当浓度在 500~1000 μmol/L 范围时,对细胞存活率无显著影响 ($p > 0.05$);当浓度在 1500~2000 μmol/L 范围时,与 BC 组相比细胞存活率出现极显著降低 ($p < 0.01$),这是由于高剂量油酸诱导剂对细胞产生毒性作用;综合考虑,最终选取 200、500、1000 μmol/L 三个水平作为后续试验中油酸造模剂诱导浓度。

2.3.2 油酸造模剂对细胞脂肪及 TG 积累的影响

响

图 4 是油酸造模剂 A 和 B 对细胞脂质含量和 TG 含量的影响。

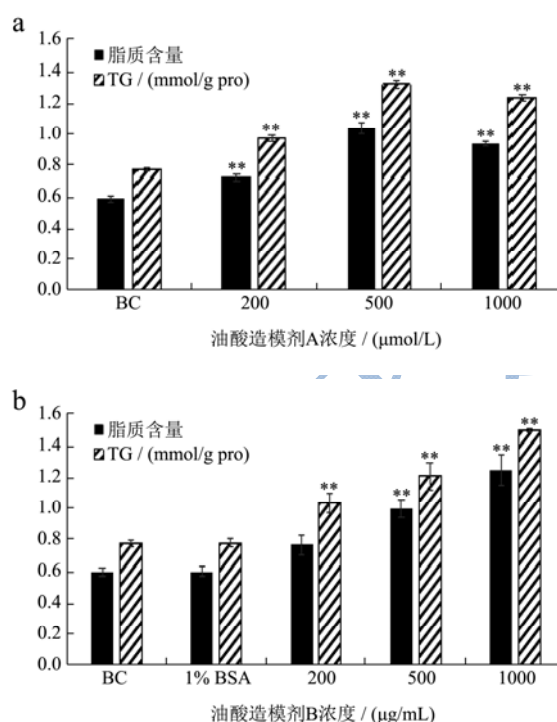


图 4 油酸造模剂 A 和 B 对细胞脂质含量和 TG 含量的影响

Fig.4 Effects of oleic acid modeling agent A and B on cell fat accumulation and TG content

注: *表示与 BC 组比较具有显著性差异 ($p < 0.05$); **表示与 BC 组比较具有极显著性差异 ($p < 0.01$)。

如图 4 中 a 所示,用油酸造模剂 A 处理组中细胞内脂质和 TG 含量明显高于 BC 组,两者相比具有极显著性差异 ($p < 0.01$),其中油酸造模剂 A 浓度为 500 μmol/L 诱导细胞时细胞内脂质含量和 TG 含量最高,此时,细胞内脂质含量是 BC 组的 1.75 倍, TG 含量是 BC 组的 1.71 倍。林霖^[21]等研究结果显示,利用油酸溶解于 DMSO 中作为造模剂诱导 HepG2,当浓度为 0.5 mM 时为最佳诱导浓度,此时细胞内脂质积累明显增多,因此,其选择浓度为 0.5 mM 油酸诱导细胞造模。

如图 4 中 b 所示,用油酸造模剂 B 处理组中细胞内脂质和 TG 含量明显高于 BC 组,两者相比具有极显著性差异 ($p < 0.01$),其中油酸造模剂 B 浓度为 1000 μmol/L 诱导细胞时细胞内脂质含量和 TG 含量最高,此时,细胞内脂质含量是 BC 组的 2.10 倍, TG 含量是 BC 组的 1.93 倍。1% BSA 诱导时,与 BC 组相比,无显著差异 ($p > 0.05$),说明 BSA 只作为溶剂,对细胞内脂肪的积累没有影响。Okamoto 等^[22]也以 BSA 作为溶剂配成浓度 1.0 mmol/L 的油酸,诱导 HepG2

细胞 24 h 后成功建成肝细胞脂肪积累模型。与 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸造模剂 A 诱导细胞脂肪积累相比, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 油酸造模剂 B 诱导效果更好, 综合考虑这两种油酸造模剂诱导效果, 最终选择浓度为 1000 $\mu\text{mol/L}$ 油酸造模剂 B 诱导 HepG2 细胞建立脂肪积累模型。

2.4 红树莓提取物对细胞脂肪积累及 TG 积累的影响

图 5 是红树莓果提取物对细胞脂质含量和 TG 含量的影响。

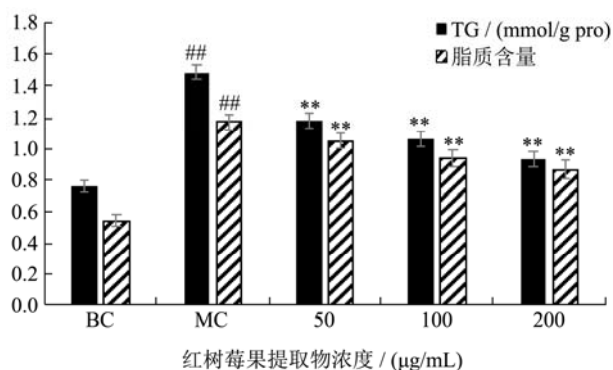


图 5 红树莓果提取物对细胞脂肪积累和 TG 含量的影响

Fig.5 Effects of raspberry extracts on cell fat accumulation and TG content

注: #表示与 BC 组比较具有显著性差异 ($p<0.05$); ##表示与 BC 组比较具有极显著性差异 ($p<0.01$); *表示与 MC 组比较具有显著性差异 ($p<0.05$); **表示与 MC 组比较具有极显著性差异 ($p<0.01$)。

由图 5 可知, MC 组细胞内脂质含量和 TG 含量明显高于 BC 组, 两者相比具有极显著性差异 ($p<0.01$); 随着红树莓果提取物质量浓度的增加, HepG2 细胞内脂质含量和 TG 值呈现逐渐下降的趋势, 当浓度达到 200 $\mu\text{g/mL}$, 与 MC 组相比, 细胞内脂质含量降低了 25.93%, TG 含量下降了 37.23%。说明红树莓果提取物具有降低细胞内脂肪积累作用。吕业春^[23]等研究表明 100 $\mu\text{g/mL}$ 蓝莓多酚能使肝细胞内 TG 含量降低了 40%, 具有清除肝细胞脂肪积累的能力。

图 6 是红树莓籽提取物对细胞脂质含量和 TG 含量的影响。

由图 6 可知, MC 组细胞内脂质含量和 TG 含量明显高于 BC 组, 两者相比具有极显著性差异 ($p<0.01$); 随着红树莓籽提取物质量浓度的增加, HepG2 细胞内脂质含量和 TG 含量呈现逐渐下降的趋势, 当浓度达到 4 mg/mL , 与 MC 组相比, 细胞内脂质含量降低了 47.12%, TG 含量降低了 46.23%。说明

红树莓籽提取物具有降低细胞内脂肪积累作用。

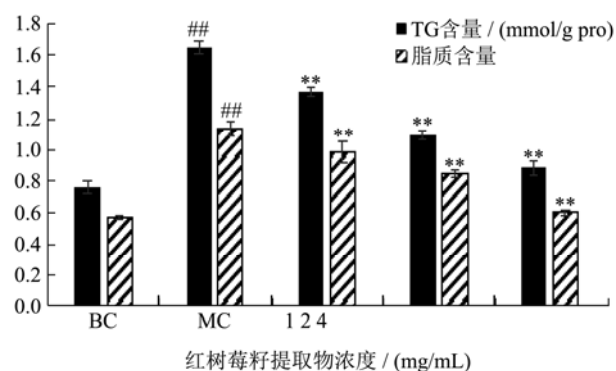


图 6 红树莓籽提取物对细胞脂质含量和 TG 含量的影响

Fig.6 Effects of red raspberry seed extracts on cell fat accumulation and TG content

注: #表示与 BC 组比较具有显著性差异 ($p<0.05$); ##表示与 BC 组比较具有极显著性差异 ($p<0.01$); *表示与 MC 组比较具有显著性差异 ($p<0.05$); **表示与 MC 组比较具有极显著性差异 ($p<0.01$)。

3 讨论

肝脏是脂肪代谢的重要器官。HepG2 细胞是人肝癌细胞株, 来源于人肝胚胎瘤细胞, 与肝细胞表型相似, 相对于正常肝细胞, HepG2 易于培养, 细胞特性稳定, 通过脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪积累模型与脂肪肝的病理学特征具有很大的相似性, 已成功用于脂肪肝细胞模型的建立^[23]。与动物实验相比, 诱导细胞建立脂肪肝模型, 可以缩短实验周期, 并为功能成分的研究提供方便快捷的途径。本试验比较了两种不同造模剂对 HepG2 细胞内脂肪积累影响, 试验发现以 BSA 作为溶剂配制的油酸造模剂 B 诱导效果好于以 DMSO 作为溶剂配制的油酸造模剂 A。以 DMSO 作为溶剂时, 虽然油酸-DMSO 体系比较稳定, 但是加入 DMEM 培养液稀释时, 体系变得不稳定, 有油酸析出, 油酸浓度越大, 体系不稳定性越大, 析出油酸可能越多, 进而影响诱导效果, 本试验数据显示, 油酸造模剂 A 在 500 $\mu\text{mol/L}$ 的诱导效果优于 1000 $\mu\text{mol/L}$, 可能是上述原因造成; 陈莉^[24]等通过研究合适的脂肪酸溶剂, 发现 BSA 比 DMSO 更适合作为油酸溶剂, 与本试验研究结果相似, 可能由于高剂量 DMSO 对细胞活性有一定的毒性作用, 所以建模体系需要控制 DMSO 的低浓度, 也是造成体系不稳定的因素之一。吴迪^[25]等研究表明终浓度在 1% 以下的 DMSO 对人肝癌、食管癌等细胞生长与繁殖均无影响, 但建议需要结合具体的实验和细胞确定安全的浓度范围。

近年来, NAFLD 的患者呈逐年增长趋势, 引起了广泛关注, NAFLD 是由于肝内脂肪酸利用减少或

肝细胞合成甘油三酯能力增强,或极低密度脂蛋白合成及分泌障碍等引起的疾病^[26]。目前,植物活性物质因具有广泛生物活性并对 NAFLD 的预防和治疗具有一定作用,逐渐成为研究热点。相关研究发现红树莓作为第三代新型水果,营养成分丰富,富含鞣花酸、水杨酸、树莓酮等活性成分,具有一定的降脂功能^[4],但目前国内研究红树莓对脂肪肝的预防和治疗作用及机制主要通过动物实验,在细胞水平上进行研究的报道较少。王丽丽^[27]等通过动物实验研究发现树莓酮是通过减轻肝细胞脂肪变性及肝组织的炎症反应、调节血脂代谢、改善胰岛素和瘦素抵抗、抑制肝脏发生氧化应激和脂质过氧化反应等机制,对非酒精性脂肪肝起到保护和调节的作用。Zhang 等^[28]研究发现,红树莓果提取物通过调控 PTEN/AKT 信号通路能够显著抑制肝癌细胞增殖,抑制细胞周期的进展,这为患者潜在的辅助治疗提供了依据。本试验中红树莓提取物能够降低高脂细胞内脂质的积累,其具体的作用机制还需进一步的研究与探讨。

本试验研究发现一定剂量内的红树莓果和籽提取物可降低油酸诱导的 HepG2 胞内脂质积累,其有效剂量安全,其中红树莓果提取物不产生细胞毒性的浓度 $\leq 200 \mu\text{g/mL}$,而籽提取物不产生细胞毒性的浓度 $\leq 4 \text{mg/mL}$,高于果提取物,经测定提取浓缩后的果提取物的 pH 为 3.23,籽提取物的 pH 为 4.59,可能果提取物中含有酸性物质,使得果提取物的 pH 较低,细胞耐受度低于籽提取物。HepG2 细胞对红树莓提取物酸碱度耐受度的影响仍需要试验进一步研究。此外,需要对红树莓提取物中具体活性物质做进一步分析,以明确其中对 HepG2 细胞脂肪积累有直接降低效果的物质。为药食同源资源的开发提供更多依据。

4 结论

通过对红树莓提取物中活性成分的测定,测得果和籽提取物中含有总酚、黄酮、原花青素等;以牛血清白蛋白(BSA)作为溶剂配制的 1000 $\mu\text{mol/L}$ 油酸造模剂孵育 HepG2 细胞 24 h 可成功诱导肝细胞脂肪积累;红树莓果提取物和籽提取物处理细胞时,可显著降低胞内脂质含量和 TG 含量。因此,饮食中增加鲜红树莓或富含红树莓的产品,会对脂肪肝等疾病具有一定的防治作用。

参考文献

- [1] 迟超,杨宪东,孙琪,等.不同品种红树莓果籽营养成分分析[J].食品与发酵工业,2017,43(12):218-223
CHI Chao, YANG Xian-dong, SUN Qi, et al. Assessment of

- nutritional components in five cultivars of red raspberry seeds [J]. Food & Fermentation Industries, 2017, 43(12): 218-223
- [2] TENG Hui, FANG Ting, LIN Qi-yang, et al. Red raspberry and its anthocyanins: Bioactivity beyond antioxidant capacity [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 66: 153-165
- [3] Baby B, Antony P, Vijayan R. Antioxidant and anticancer properties of berries [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 2: 1-12
- [4] 张瑞婷,夏伟,张述仁,等.红树莓的功能活性成分及其药理作用研究进展[J].安徽农业科学,2018,46(24):13-14
ZHANG Rui-ting, XIA Wei, ZHANG Shu-ren, et al. Research progress on functional active components and pharmacological action of red raspberry [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(24): 13-14
- [5] Luo T, Miranda-Garcia O, Adamson A, et al. Development of obesity is reduced in high-fat fed mice fed whole raspberries, raspberry juice concentrate, and a combination of the raspberry phytochemicals ellagic acid and raspberry ketone [J]. Journal of Berry Research, 2016, 6(2): 213-223
- [6] Garcia G, Nanni S, Figueira I, et al. Bioaccessible (poly) phenol metabolites from raspberry protect neural cells from oxidative stress and attenuate microglia activation [J]. Food Chemistry, 2017, 215(15): 274-283
- [7] 靳振刚,旷慧,王金玲.红树莓水提取物和乙醇提取物的降血脂功能比较[J].食品工业科技,2017,38(20):307-311
JIN Zhen-gang, KUANG Hui, WANG Jin-ling. Comprasion of the hypolipidemic activities of water extractions and ethanol extractions from red resberry [J]. Science & Technology of Food Industry, 2017, 38(20): 307-311
- [8] Reccia I, Kumar J, Akladios C, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease [J]. Metabolism-clinical & Experimental, 2017, 72: 94-108
- [9] GONG Zhen-wei, Tas E, Yakar S, et al. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease in aging [J]. Molecular & Cellular Endocrinology, 2016, 455(C): 115-130
- [10] 曾璐.基于肝脂肪变性 HepG2 细胞模型探讨护肝清脂片主要成分对脂质代谢的影响及可能机制[D].南方医科大学, 2015
ZENG Lu. Lipid metabolic effects and mechanisms of main components of Hugaan Qingzhi Tablet on hepatic steatosis HepG2 cell model [D]. Southern Medical University, 2015
- [11] 李新明,李群,高忠东,等.苹果多酚及其活性单体的提取、分离纯化及降脂效果研究[J].安徽农业科学,2017,45(13):85-88
LI Xin-ming, LI Qun, GAO Zhong-dong, et al. Extraction,

- isolation and purification of apple polyphenol and its active monomers and their lowing-fat effect [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(13): 85-88
- [12] 吕俊丽,游新勇,任志龙,等.酶解水溶剂法提取苜蓿多酚的工艺研究[J].中国粮油学报,2017,32(11):123-127
LYU Jun-li, YOU Xin-yong, REN Zhi-long, et al. Study on the extraction of buckwheat polyphenols by enzymatic hydrolysis of water [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(11): 123-127
- [13] 闫蕊,赵桦.黄花油点草总黄酮超声提取工艺的响应面优化及抗氧化性分析[J].食品工业科技,2018,39(10):190-196
YAN Rui, ZHAO Hua. Optimization of extraction technology by response surface methodology and inoxidizability of total flavonoids from *Tricyrtis maculata* Machride [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(10): 190-196
- [14] 宁玮钰,冯建文,吕长山,等.红树莓不同溶剂提取物抗氧化活性[J].食品工业科技,2016,37(19):117-122
NING Wei-yu, FENG Jian-wen, LYU Chang-shan, et al. Antioxidant activity of different solvents extracts from red raspberry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(19): 117-122
- [15] 毕凯媛,崔珊珊,高阳,等.超声辅助果胶酶法提取红树莓花色苷及其成分测定[J].食品工业科技,2018,39(13):198-200
BI Kai-yuan, CUI Shan-shan, GAO Yang, et al. Ultrasonic-assisted pectinase extraction and identification of anthocyanins from *Rubus idaeus* L [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(13): 198-200
- [16] 侯晓琳,周培培,杨小林,等.竹节参皂苷 V 对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的影响作用[J].海峡药学,2017,29(3): 38-40
HOU Xiao-lin, ZHOU Pei-pei, YANG Xiao-lin, et al. Effect of chikusetsusaponin V on oleic acid-induced fat accumulation in HepG2 cells [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2017, 29(3): 38-40
- [17] 孟实,张晓书,赵余庆.树莓与蓝莓中多酚类成分的HPLC测定[J].食品研究与开发,2014,35(3):81-84
MENG Shi, ZHANG Xiao-shu, ZHAO Yu-qing. Analysis of phenolic compounds in blue berry and raspberry by HPLC [J]. Food Research and Development, 2014, 35(3): 81-84
- [18] 韩晓波,陈晶.树莓对肝损伤的保护作用及机制的研究现状[J].中医药学报,2014,42(3):158-161
HAN Xiao-bo, CHEN Jing. Study on the protective effect and mechanism of raspberry on liver injury [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2014, 42(3): 158-161
- [19] 张春鹏,刘明,赵金璐,等.树莓体外抑制人肝癌细胞系 HepG2 生长的实验性研究[J].实用肿瘤学杂志,2008,22(5): 409-411
ZHANG Chun-peng, LIU Ming, ZHAO Jin-lu, et al. Inhibitive activities of raspberry on proliferation of HepG2 [J]. Journal of Practical Oncology, 2008, 22(5): 409-411
- [20] 夏兰兰,张雅丽,朱磊,等.葡萄籽多酚化合物抗氧化能力与抗癌细胞增殖活性的评价[J].食品科技,2011,36(11):174-179
XIA Lan-lan, ZHANG Ya-li, ZHU Lei, et al. Antioxidant properties and antiproliferative activities of grape seed phenolic compounds on cancer cell culture [J]. Food Science and Technology, 2011, 36(11): 174-179
- [21] 林霖,盛夏,吉猛,等.油酸体外诱导细胞脂肪变性对脂质代谢及炎症的影响[J].现代生物医学进展,2016,16(25):4810-4811
LIN Lin, SHENG Xia, JI Meng, et al. The effect of oleic acid on induction of steatosis and inflammation in HepG2 cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(25): 4810-4811
- [22] Okamoto Y, Tanaka S, Haga Y. Enhanced GLUT2 gene expression in an oleic acid-induced *in vitro* fatty liver model [J]. Hepatology Research, 2002, 23(2): 138-144
- [23] 吕业春,刘翼翔,吴薇,等.蓝莓多酚对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪累积的干预作用[J].食品科学,2011,32(17):308-312
LYU Ye-chun, LIU Yi-xiang, WU Wei, et al. Preventive effect of blueberry polyphenols on oleic acid-induced fat accumulation in HepG2 cells [J]. Food Science, 2011, 32(17): 308-312
- [24] 陈莉,汪春红,黄邵鑫,等.不同溶剂中油酸对 LO2 和 HepG2 细胞生长和活力的影响[J].公共卫生与预防医学,2012, 23(3):4-8
CHEN Li, WANG Chun-hong, HUANG Shao-xin, et al. Influence of oleic acid in different solvent media on LO2 and HepG2 cell-growth and viability [J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2012, 23(3): 4-8
- [25] 吴迪,巴哈尔古丽·卡哈尔,吴桂荣,等.溶媒二甲基亚砜对细胞生长与活力的影响研究[J].新疆医科大学学报,2010, 33(5):489-491
WU Di, Kahaer-Bahaerguli, WU Gui-rong, et al. Studies on the effect of DMSO as a solvent mediator on cell growth and viability [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2010, 33(5): 489-491
- [26] 董姝,刘平,孙明瑜.非酒精性脂肪肝的治疗研究进展[J].辽宁中医杂志,2013,40(3):599-602
DONG Shu, LIU Ping, SUN Ming-yu. The development of

- treatment for NAFLD [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 40(3): 599-602
- [27] 王丽丽. 树莓酮对非酒精性脂肪性肝炎干预作用及机理研究[D]. 沈阳农业大学, 2011
- WANG Li-li. The research on intervention and function of raspberry ketone in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [D]. Shenyang Agricultural University, 2011
- [28] ZHANG Hao-peng, LIU Jia-ren, LI Guo-dong, et al. Fresh red raspberry phytochemicals suppress the growth of hepatocellular carcinoma cells by PTEN/AKT pathway [J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2018, 104: 55-56

现代食品科技