

# 素馨花水提物及其主要成分对 3T3-L1 细胞成脂分化的影响

张奕孜<sup>1</sup>, 周致言<sup>1</sup>, 谢寅正<sup>1</sup>, 孙伶俐<sup>2</sup>, 孙世利<sup>2</sup>, 甘礼社<sup>1</sup>, 吴日辉<sup>1</sup>, 黄金文<sup>1</sup>, 张焜<sup>1</sup>, 李冬利<sup>1\*</sup>

(1. 五邑大学生物科技与大健康学院, 广东江门 529000)

(2. 广东省茶树资源创新利用重点实验室, 广东广州 510640)

**摘要:** 该研究探讨素馨花水提物 (WE) 及其化学成分在 3T3-L1 前脂肪细胞上的降脂作用。通过将 3T3-L1 细胞诱导为成熟脂肪细胞, 油红 O 染色定量和检测甘油三酯 (TG) 含量判断素馨花样品对脂滴的抑制作用; 液质联用仪分析 WE 中化学成分; MTT 检测素馨花及其成分对 3T3-L1 细胞增殖的影响; Western Blot 检测 AMPK、C/EBP $\alpha$ 、FAS、ACC、CPT1、Bax、Bcl-2 等蛋白表达。结果发现, WE 能剂量依赖性抑制脂滴形成, 其中高浓度 WE (500  $\mu\text{g/mL}$ ) 能降低中性脂质含量 23.59%, 降低 TG 含量 30.20%, 在脂肪积累早期作用最显著, 并证明其活性成分主要是橄榄苦苷, 含量为 13.77%。WE 及橄榄苦苷能激活 AMPK (123.19% 和 115.98%) 及其下游靶点 ACC (451.06% 和 1 050.0%) 的磷酸化, 下调其下游靶点 FAS (81.72% 和 60.50%) 的蛋白表达, 减少脂肪形成, 提高 CPT1 (164.84% 和 292.19%) 蛋白的表达, 加快脂肪酸氧化; 抑制 C/EBP $\alpha$  (68.97% 和 34.57%) 的表达, 影响 3T3-L1 细胞分化; 上调 Bax (154.60% 和 139.37%), 下调 Bcl-2 (41.10% 和 45.62%) 蛋白的表达, 诱导脂肪细胞凋亡。结果提示, WE 能在 3T3-L1 细胞分化过程早期抑制细胞生长、分化和脂肪合成并促进脂肪酸氧化从而有效抑制脂质积累, 机制上可能通过调控 AMPK 和 Bax/Bcl-2 通路。

**关键词:** 素馨花; 3T3-L1 前脂肪细胞; 降脂; AMP 蛋白激酶 (AMPK); 橄榄苦苷

文章编号: 1673-9078(2023)03-27-36

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0423

## Effects of a Water Extract of *Jasminum grandiflorum* L. and its Main Components on the Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Cells

ZHANG Yizi<sup>1</sup>, ZHOU Zhiyan<sup>1</sup>, XIE Yinzheng<sup>1</sup>, SUN Lingli<sup>2</sup>, SUN Shili<sup>2</sup>, GAN Lisha<sup>1</sup>, WU Rihui<sup>1</sup>, HUANG Jinwen<sup>1</sup>, ZHANG Kun<sup>1</sup>, LI Dongli<sup>1\*</sup>

(1. School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen 529000, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Tea Plant Resources Innovation Utilization, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The lipid-lowering effects of a water extract of *Jasminum grandiflorum* L. (WE) and its chemical components on 3T3-L1 preadipocytes was investigated. To determine the inhibitory effects of *J. grandiflorum* samples on lipid droplet development, oil red O staining was used to quantify and detect triglyceride (TG) contents following the induction of 3T3-L1 preadipocytes to produce mature adipocytes. Liquid chromatography-mass spectrometry was used to analyze the chemical components in the water extract of *J. grandiflorum*, an MTT assay was used to determine the effects of *J. grandiflorum* and its components on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes, and western blotting was performed to determine the expression of AMPK, C/EBP $\alpha$ , FAS, ACC, CPT1, Bax, and Bcl-2 proteins. The results revealed that the WE can

引文格式:

张奕孜, 周致言, 谢寅正, 等. 素馨花水提物及其主要成分对 3T3-L1 细胞成脂分化的影响[J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 27-36.

ZHANG Yizi, ZHOU Zhiyan, XIE Yinzheng, et al. Effects of a water extract of *Jasminum grandiflorum* L. and its main components on the adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 27-36.

收稿日期: 2022-04-11

基金项目: 广东普通高校重点领域 (乡村振兴战略) 项目 (2019KZDZX2003); 广东普通高校重点实验室项目 (2017KSYS010); 江门市创新科研团队引进资助项目 (2018630100180019806)

作者简介: 张奕孜 (1996-), 女, 硕士在读, 研究方向: 制药工程, E-mail: 903207106@qq.com

通讯作者: 李冬利 (1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: wyuchemldl@126.com

significantly inhibit the formation of lipid droplets in a dose-dependent manner. A high concentration of WE (500  $\mu\text{g/mL}$ ) was found to reduce the contents of neutral lipids and TG by 23.59% and 30.20%, respectively. These effects were found to be most significant during the early stage of fat accumulation, and it was established that the active constituent contributing most to this lipid-lowering effect was oleuropein, with a content of 13.77%. Furthermore, WE and oleuropein were shown to activate the phosphorylation of AMPK (123.19% and 115.98%, respectively) and its downstream target ACC (451.06% and 1 050.0%), and to downregulate the protein expression of its downstream target FAS (81.72% and 60.50%). This had the effect of reducing adipogenesis and increasing the expression of CPT1 (164.84% and 292.19%), and accelerating fatty acid oxidation. Moreover, it inhibited the expression of C/EBP $\alpha$  (68.97% and 34.57%), thereby affecting the differentiation of 3T3-L1 cells, and also upregulated the expression of Bax (154.60% and 139.37%) and downregulated the expression of Bcl-2 (41.10% and 45.62%), thus inducing 3T3-L1 cell apoptosis. These findings indicate that a WE of *J. grandiflorum* can inhibit cell growth, differentiation, and lipid synthesis, and promote fatty acid oxidation during the early stage of 3T3-L1 cell differentiation, thereby effectively inhibiting lipid accumulation, the underlying mechanism of which may involve the regulation of AMPK and Bax/Bcl-2 pathways.

**Key words:** *Jasminum grandiflorum* L.; 3T3-L1 preadipocyte; lipid-lowering; AMP protein kinase; oleuropein

肥胖被定义为可损害健康的异常或过量脂肪累积,已成为严重威胁人类健康的公共卫生问题之一,会导致代谢紊乱,进而导致心血管相关疾病、非酒精性脂肪性肝和1型糖尿病等更复杂的并发症<sup>[1]</sup>。据世界卫生组织统计,2016年全球18岁及以上的超重成年人超过19亿,其中肥胖超过6.5亿人<sup>[2]</sup>。肥胖发生的根本原因是能量摄入远超过能量消耗,过剩的能量以甘油三酯(Triglyceride, TG)的形式储存于脂肪<sup>[3]</sup>。脂肪组织在代谢、调节胰岛素敏感性和能量稳态中至关重要,脂肪细胞分泌的各种脂肪因子参与调节糖代谢、食物消化和炎症反应等多种生理过程<sup>[4]</sup>。研究发现,脂肪细胞分化及分泌功能的异常是引起脂肪组织堆积过多的关键一步<sup>[5]</sup>,故靶向调控脂肪细胞分化及纠正其功能被视为控制脂肪堆积的有效途径<sup>[6,7]</sup>。目前,美国食品和药物管理局(FDA)批准用于临床调控脂肪细胞分化的药物有限,而且长期服用这些药物会导致胃肠道、营养不良等副作用<sup>[8]</sup>。因此,进一步发现脂肪细胞分化和脂质积累的调控剂,开发安全有效的降脂药物具有重要意义。

越来越多的研究表明天然产物在抗肥胖上有潜在的作用<sup>[9]</sup>。木犀科植物素馨花(*Jasminum grandiflorum* L.)的干燥花蕾,长期作为一种民间药食两用的药材,具有疏肝解郁、行气止痛之功效<sup>[10]</sup>,还可以当茶饮用。现代天然药物化学研究发现,素馨花含有环烯醚萜类、三萜类、黄酮类、木脂素类等化合物。课题组前期研究及文献调研发现,素馨花提取物及其主要成分具有良好的改善胃粘膜损伤<sup>[11]</sup>、抗炎<sup>[12]</sup>、抑菌<sup>[13]</sup>和抗乙型肝炎病毒<sup>[14]</sup>等作用。

然而,素馨花提取物对脂肪细胞增殖分化的影响及其物质基础尚不明确。本试验通过构建3T3-L1细胞高脂模型,研究素馨花水提物(WE)的体外降脂作用机制和物质基础,为素馨花食药价值的深度开

发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

素馨花样品于2019年6月购于中国江门市鹤山茶山农户,存放于五邑大学,编号201906JG。

DMEM高糖培养基,美国Gibco公司;胎牛血清FBS,美国Gibco公司;PBS缓冲液,美国Gibco公司;青链霉素,美国Gibco公司;二甲基亚砜DMSO, Biosharp公司;地塞米松(Dexamethasone, Dex, 纯度 $\geq 99\%$ ),北京MYM生物科技有限公司;牛胰岛素,上海源叶生物科技有限公司;3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx, 纯度 $\geq 99\%$ ),上海源叶生物科技有限公司;盐酸黄连素水合物(Berberine, 纯度 $\geq 97\%$ ),上海源叶生物科技有限公司;橄榄苦苷(Oleuropein, 纯度 $\geq 98\%$ ),上海源叶生物科技有限公司;女贞甙(Ligustrin, 纯度 $\geq 98\%$ ),实验室从素馨花中分离得到;四氮甲基偶氮唑盐(MTT),北京MYM生物科技有限公司;甘油三酯(TG)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;油红O染色液, Solarbio公司; Bax抗体, Abcam; Bcl-2抗体, Abcam; AMPK抗体, CST; p-AMPK抗体, CST; C/EBP $\alpha$ 抗体, CST; FAS抗体, CST; ACC抗体, CST; p-ACC抗体, CST; CPT1抗体, Abcam;  $\beta$ -actin抗体, Sigma。

### 1.2 主要仪器设备

TriStar LB941多功能酶标仪,德国Berthold Technologies公司;倒置显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司;细胞培养箱, Thermo; 恒温水浴锅, CRYSTAL; 电泳仪, Tanon; 化学发光凝胶成像系统, Tanon; 分析天平, OHAUS; 超高效液相色谱-四极杆

/静电场轨道阱高分辨质谱联用仪, Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 素馨花提取物的准备

50 g 干燥素馨花粉末, 用 20 倍体积的沸水浸提 2 次, 第一次 45 min, 第二次 30 min, 合并, 蒸干, 冷冻干燥, 复溶, 备用。

#### 1.3.2 素馨花提取物中主要化学成分的分析 and 测定

素馨花水提物溶液用质谱级甲醇稀释到合适浓度, 用一次性微孔过滤膜过滤后装进进样小瓶中, 进行液质联用仪分析, 根据质谱信息确定其中主要的化学成分为橄榄苦苷和女贞甙。精密称取橄榄苦苷和女贞甙标准品, 分别加入质谱级甲醇中溶解, 配成合适浓度的标准品溶液, 用一次性微孔过滤膜过滤后装进进样小瓶中在同样的色谱和质谱条件下进行分析, 以峰面积为纵坐标, 化合物的浓度为横坐标, 制作橄榄苦苷和女贞甙的标准曲线。读取素馨花水提物样品中橄榄苦苷和女贞甙对应的峰面积, 计算其含量。

#### 1.3.3 3T3-L1 细胞培养和分化诱导

3T3-L1 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院, 用  $\rho=10\%$  FBS 和  $m=1\%$  青链霉素的高糖 DMEM 培养基培养于 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 培养箱, 待长满后接触抑制 48 h, 用 DMEM 分化诱导剂 I (含 0.5 mmol/L IBMX、1  $\mu\text{mol/L}$  Dex、10  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素和  $\rho=10\%$  FBS) 培养 3 d, 换用 DMEM 分化诱导剂 II (含 10  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素和  $\rho=10\%$  FBS) 培养 3 d, 换用 DMEM 分化诱导剂 III (含  $\rho=10\%$  FBS) 培养 3 d。分别用素馨花水提物、黄连素(阳性药物)、橄榄苦苷、女贞甙、橄榄苦苷和女贞甙联用处理。

#### 1.3.4 油红 O 染色及定量

细胞在药物处理结束后, 用 PBS 清洗 3 次, 用  $m=4\%$  多聚甲醛固定 5 min, 弃掉多聚甲醛后 PBS 清洗 2 次。加入油红 O 染液常温染色 40 min, 结束后用双蒸水反复清洗, 显微镜观察拍照 (每组不少于三个视野), 每孔加入 500  $\mu\text{L}$  异丙醇, 充分溶解油红 O, 吸取每孔 100  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板, 酶标仪检测 490 nm 处吸光度值。

#### 1.3.5 甘油三酯 (TG) 的测定

细胞培养液中的甘油三酯按南京建成说明书操作。将培养液上清离心后取上清测定, 取 2.5  $\mu\text{L}$  上清液于 96 孔板中, 再加入 250  $\mu\text{L}$  工作液, 以蒸馏水做空白对照, 37 °C 孵育 10 min, 在酶标仪 510 nm 处测

定吸光度值。

#### 1.3.6 细胞增殖活性的测定

取对数生长期的 3T3-L1 细胞以每孔 5 000 个铺板到 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的候选物于 37 °C 培养箱分别培养 24、48 和 72 h。培养结束前 4 h, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  5 mg/mL MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 充分混匀后, 酶标仪测定 490 nm 波长的吸光度值。

#### 1.3.7 Western Blot 检测蛋白表达

处理后的 3T3-L1 细胞用预冷 PBS 洗 2 次, 加入含蛋白酶抑制剂的裂解液, 冰上裂解 30 min, 收集细胞蛋白。BCA 法测定总蛋白质浓度, SDS 聚丙烯酰胺凝胶上分离样品蛋白, 转移至 PVDF 膜上, 用脱脂牛奶(5%的添加量)常温封闭 2 h 后, 4 °C 孵育一抗(Bax、Bcl-2、AMPK、p-AMPK、C/EBP $\alpha$ 、FAS、ACC、p-ACC、CPT1、 $\beta$ -actin) 过夜后, PBS 洗涤 3 次室温孵育二抗 50 min, 成像系统显影, Image J 软件分析灰度值, 以  $\beta$ -actin 作为对照。

#### 1.3.8 统计学处理

实验数据均采用平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 组间差异用单项方差分析 (One Way ANOVA) 比较, 所有实验均进行至少 3 次重复,  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 素馨花水提物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中胞内脂质积累的影响

3T3-L1 前脂肪细胞向成熟脂肪细胞的分化是由有丝分裂克隆扩增 (Mitotic Clonal Expansion, MCE) 启动的, 细胞经历近两轮有丝分裂, 直到细胞接触抑制再次开始<sup>[15,16]</sup>。在 3T3-L1 前脂肪细胞开始被诱导分化时, 会经历细胞数量的增长, 细胞体积变大, 细胞质中开始出现脂滴, 随后脂滴慢慢增大, 伴随着 TG 的累积<sup>[17]</sup>。

为了研究素馨花水提物对前脂肪细胞分化过程中胞内脂质积累的作用, 本试验利用诱导剂诱导 3T3-L1 细胞为成熟脂肪细胞, 观察不同剂量的素馨花水提物对脂滴形成和甘油三酯含量的影响。图 1 油红 O 染色结果显示, 与正常组比较, 模型组脂滴生成量明显增加, 脂肪细胞显著增大; 与模型组比较, 素馨花水提物 (50、200、500  $\mu\text{g/mL}$ ) 可剂量依赖性地减小脂肪细胞体积和降低脂滴生成量, 中性脂质含量分别从 100% 降低到 95.78%、87.87%、76.41%。同时, 3T3-L1

细胞经诱导后, TG 含量升高了 6.90 倍, 从 0.31 mmol/L 显著升高到 2.45 mmol/L, 但可被素馨花水提取物(50、200、500  $\mu\text{g/mL}$ ) 剂量依赖性地分别降低 14.69%、22.04%、30.70% (2.09、1.91、1.71 mmol/L)。以上结果提示, 素馨花水提取物对脂质积累具有良好的抑制作用。

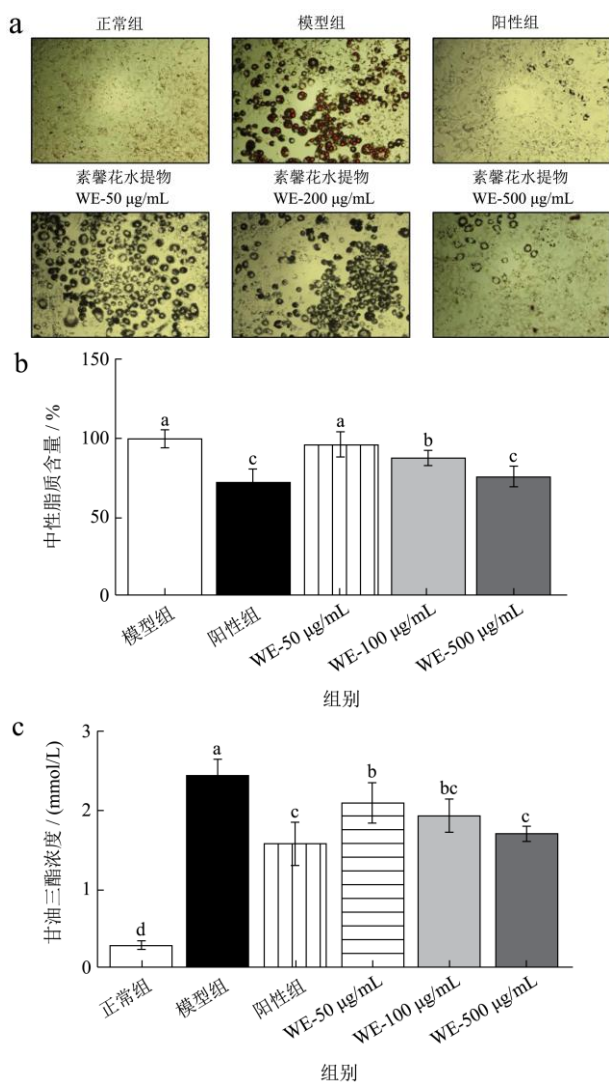


图1 素馨花水提取物对 3T3-L1 细胞分化过程中脂滴和 TG 的影响

Fig.1 Effects of *Jasminum grandiflorum* L. flowers water extract on lipid droplets and TG during 3T3-L1 cells differentiation

注: a 为油红 O 染色代表性示意图; b 为油红 O 染色定量; c 为素馨花对 3T3-L1 细胞 TG 的影响; 图中不同小写字母表示显著差异,  $P < 0.05$ , 图 2、3、5 同。

为探究素馨花水提取物对成熟的脂肪细胞有无抑制脂质积累的作用, 本试验将素馨花水提取物直接加入诱导成熟的 3T3-L1 脂肪细胞中孵育 3 d。图 2 结果显示, 不同浓度素馨花水提取物 (50、200、500  $\mu\text{g/mL}$ ) 不能显著抑制脂滴的形成, 只有高剂量组 (500  $\mu\text{g/mL}$ ) 能够显著降低 TG 积累, TG 含量降低了 20.51% (1.86 mmol/L), 说明素馨花提取物主要在诱导过程

中起降脂活性。

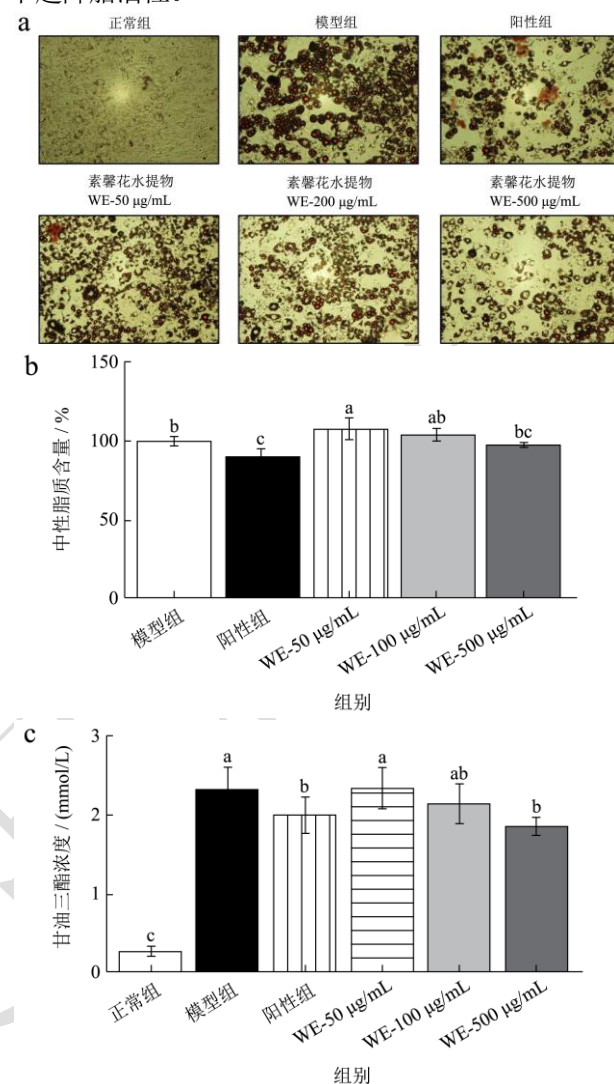


图2 素馨花水提取物对 3T3-L1 成熟脂肪细胞脂滴和 TG 的影响

Fig.2 Effects of *Jasminum grandiflorum* L. flowers water extract on lipid droplets and TG in 3T3-L1 mature adipocytes

## 2.2 素馨花水提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞不同分化阶段细胞中脂质积累的影响

从前脂肪细胞到成熟脂肪细胞, 3T3-L1 细胞经历了多个分化阶段, 如增殖、成脂和终分化阶段<sup>[18]</sup>。为了探究素馨花水提取物是否通过抑制脂肪形成来减少脂质积累, 本试验在诱导的三个不同阶段用高剂量 (500  $\mu\text{g/mL}$ ) 素馨花水提取物处理 3T3-L1 前脂肪细胞。0~3 d、3~6 d、6~9 d、0~6 d、3~9 d、0~9 d 分别代表 3T3-L1 分化的不同阶段。由图 3 可知, 在 0~3 d、0~6 d、0~9 d 加入素馨花水提取物, 其抑制中性脂质含量 (83.35%、81.78%、77.67%) 效果最显著, TG 含量分别降低了 19.75%、20.58%、26.75% (1.95、1.93、1.78 mmol/L), 初步证明素馨花水提取物起降脂作用是

在脂肪积累的早期。

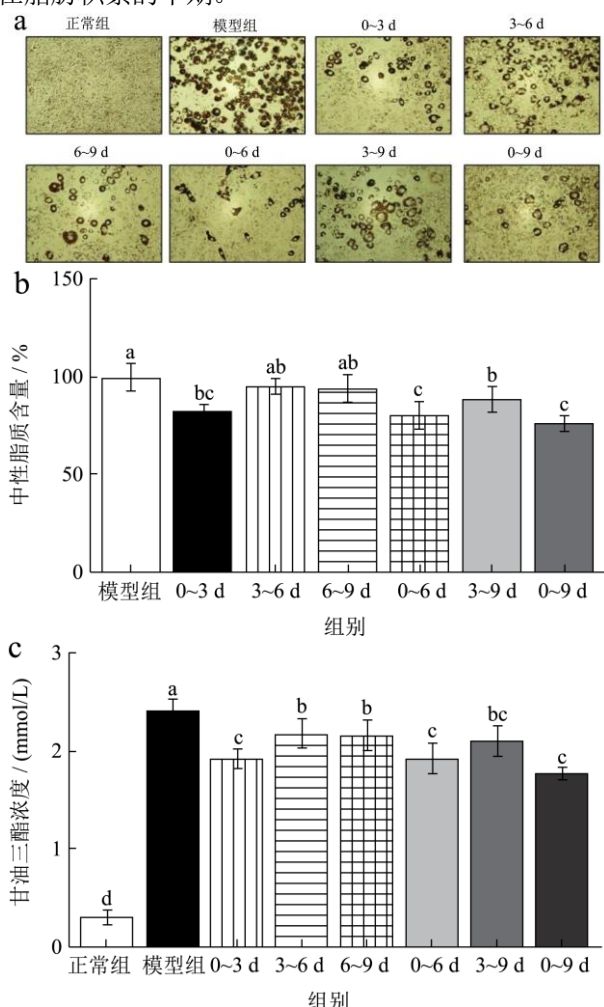


图3 素馨花水提取物对3T3-L1细胞不同分化阶段的脂滴和TG的影响

Fig.3 Effects of *Jasminum grandiflorum* L. flowers water extract on lipid droplets and TG in 3T3-L1 cells at different differentiation stages

### 2.3 素馨花水提取物中主要成分鉴定

为了探究素馨花水提取物中的物质基础,本试验用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱联用仪(UHPLC-Q-Orbitrap-MS)检测素馨花水提取物中主要的化合物及含量。从图4可知素馨花水提取物中的主要单体化合物是橄榄苦苷和女贞甙。通过标准曲线法(表1)测定出素馨花水提取物中橄榄苦苷和女贞甙

表1 橄榄苦苷和女贞甙的标准曲线

Table 1 Calibration curves of oleuropein and ligustroside

化合物	保留时间/min	标准曲线	R <sup>2</sup>
橄榄苦苷	11.56	y=98 509 361.950 3x+52 974 980.541 7	0.995 9
女贞甙	12.89	y=153 822 338.523 3x+27 666 763.666 7	0.998 7

的百分含量分别是13.77%和0.66%,即高剂量组素馨花水提取物(500 μg/mL)中含有68.87 μg/mL 橄榄苦苷和3.29 μg/mL 女贞甙。本研究发素馨花水提取物中环烯醚萜类化合物橄榄苦苷和女贞甙的含量较高,可能是其起降脂作用的物质基础。

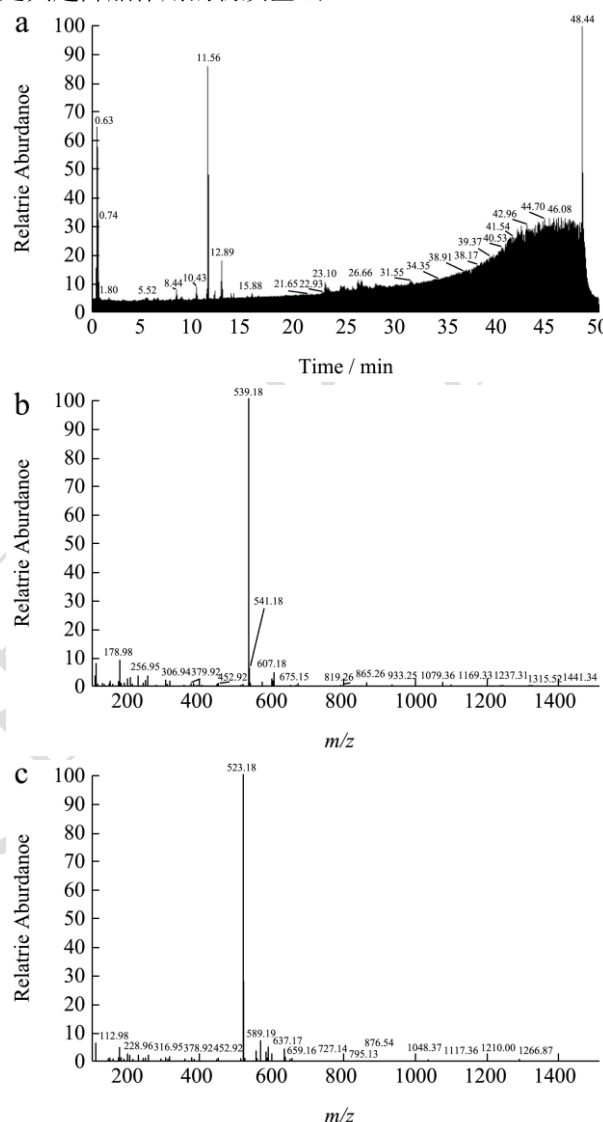


图4 素馨花水提取物UHPLC-Q-Orbitrap-MS检测结果图

Fig.4 UHPLC-Q-Orbitrap-MS detection results of water extract of *Jasminum grandiflorum* L. flowers

注: a 为总离子流图; b 为橄榄苦苷质谱图(RT=11.56 min); c 为女贞甙质谱图(RT=12.89 min)。

## 2.4 素馨花水提取物及其化学成分对 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中胞内脂质积累的影响

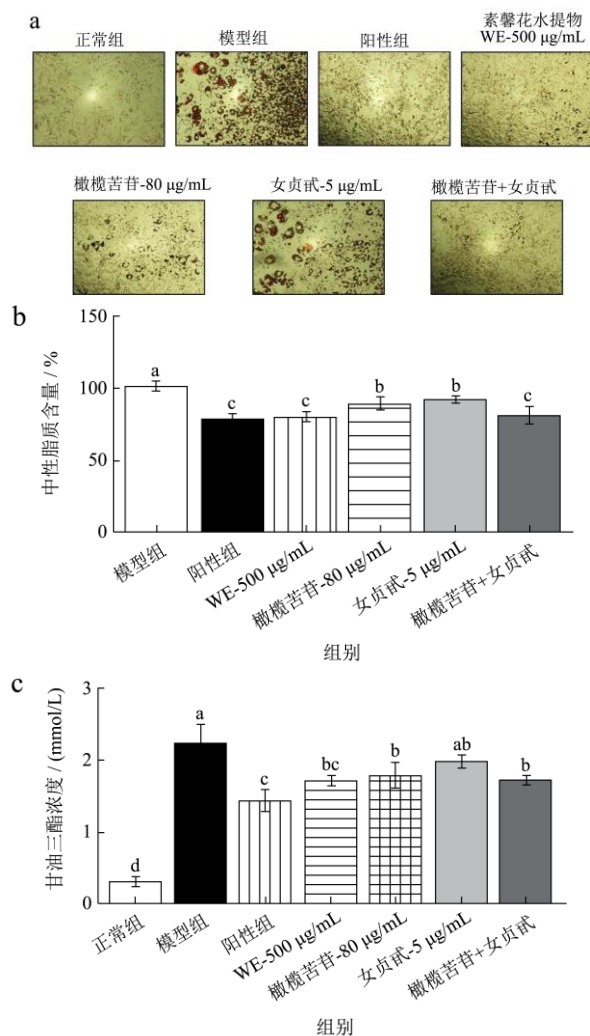


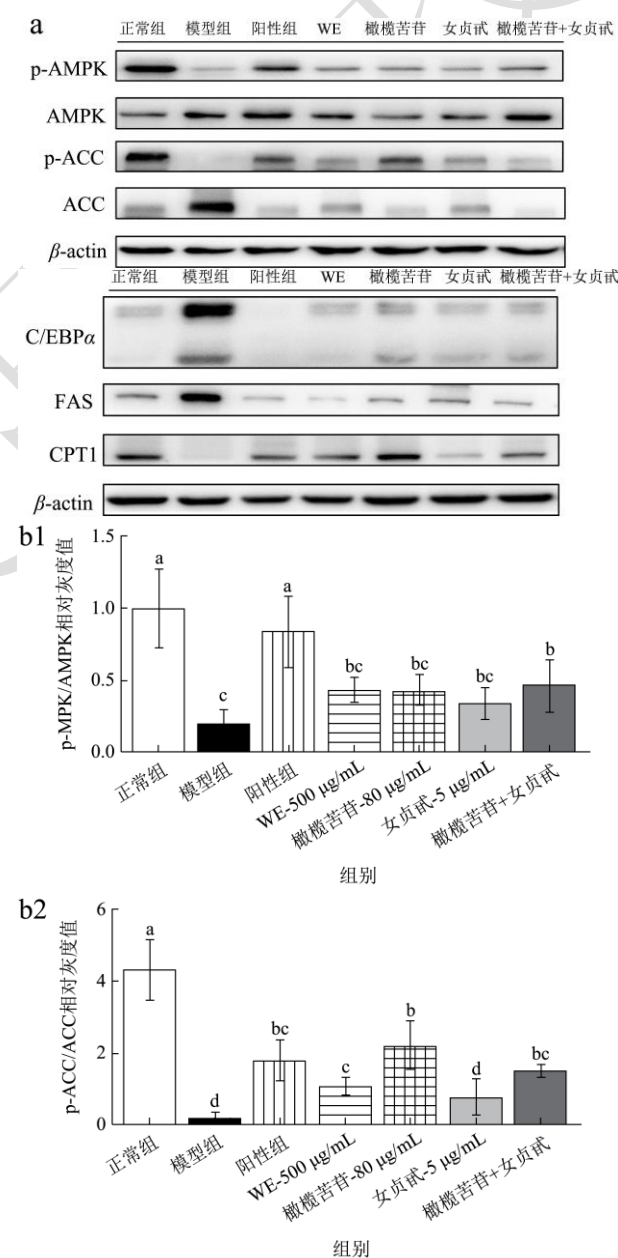
图 5 素馨花水提取物及其化学成分对 3T3-L1 细胞分化过程中脂滴和 TG 的影响

**Fig.5 Effects of *Jasminum grandiflorum* L. flowers water extract and its chemical constituents on lipid droplets and TG during 3T3-L1 cells differentiation**

研究表明, 300  $\mu\text{mol/L}$  时, 橄榄苦苷可以抑制大部分脂肪细胞的分化, 油红 O 定量发现橄榄苦苷能剂量依赖性降低总脂质含量, 且在早期表现出基本的降脂作用, 在中后期的作用不明显<sup>[19]</sup>。为了探究素馨花水提取物起降脂作用的活性物质, 在 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化过程中, 给予高剂量组素馨花水提取物 (500  $\mu\text{g/mL}$ )、橄榄苦苷 (80  $\mu\text{g/mL}$ )、女贞甙 (5  $\mu\text{g/mL}$ ) 及橄榄苦苷和女贞甙联用 (80  $\mu\text{g/mL}$  橄

榄苦苷+5  $\mu\text{g/mL}$  女贞甙) 作用 9 d。从图 5 结果可以看出, 与模型组相比, 素馨花水提取物、橄榄苦苷、女贞甙、两种单体化合物联用均能够显著抑制脂滴生成, 中性脂质含量分别从 100% 降至 79.89%、89.23%、92.40%、81.51%, TG 含量分别降低了 23.31%、20.18%、10.76%、22.42%, 从 2.23 mmol/L 降至 1.71、1.78、1.99、1.73 mmol/L, 这些结果提示素馨花水提取物中起降脂作用的主要物质可能是橄榄苦苷。

## 2.5 素馨花对 3T3-L1 细胞 AMPK 通路蛋白表达的影响



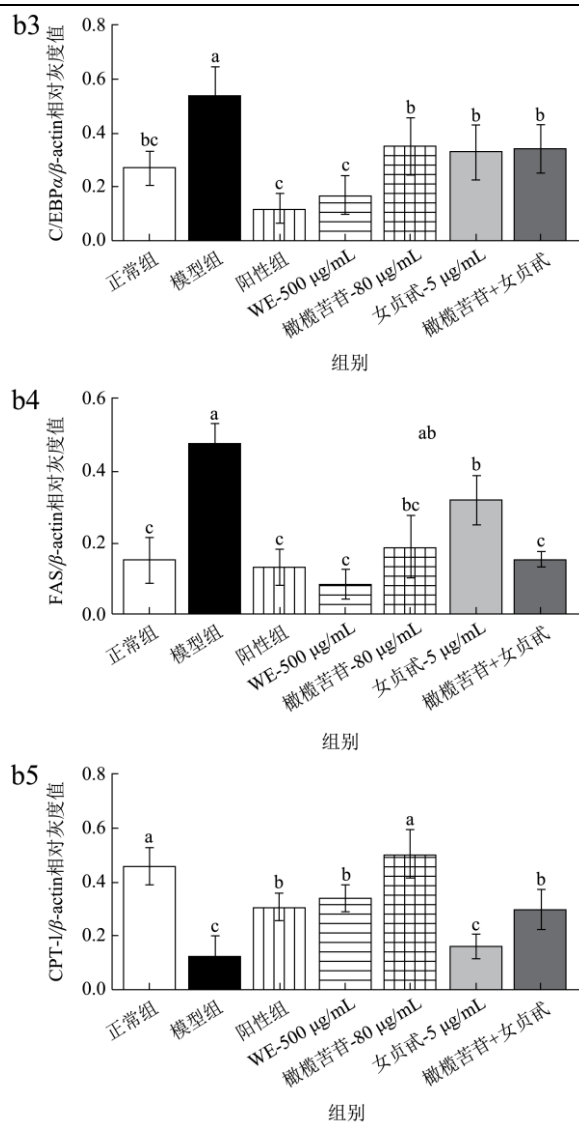


图6 素馨花水提取物及其化学成分对3T3-L1细胞分化和代谢相关蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of *Jasminum grandiflorum* L. flowers water extract and its components on expression of proteins associated with differentiation and metabolism in 3T3-L1 cells

注: a 为 Western blot 检测结果; b1~b5 为蛋白定量分析结果; 图中不同小写字母表示显著差异,  $P < 0.05$ 。

AMPK 被认为是体内能量平衡的调控器和总开关<sup>[20]</sup>, 可能是肥胖治疗的潜在靶点<sup>[21-23]</sup>。AMPK 可以通过多个途径调节脂质代谢: AMPK 的激活可以磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl CoA Carboxylase, ACC) 而抑制其活性, 从而抑制脂肪的从头合成; 同时丙二酰辅酶 A 的含量降低, 可以解除对肉碱棕榈酰转移酶 (Carnitine Palmitoyltransferase-1, CPT1) 的抑制作用, 增强转运长链脂肪酰基辅酶 A 进入线粒体进行  $\beta$  氧化的能力, 从而促进细胞脂质分解<sup>[20]</sup>。在前脂肪细胞分化早期, CCAAT 增强子结合蛋白家族 (C/EBP $\alpha$ ) 被诱导高表达, 参与脂肪细胞分化的调控, 并能促进成

熟脂肪细胞的形成和脂质生成, 抑制 C/EBP $\alpha$  的表达可介导分化前的生长阻滞, 激活 AMPK 可以抑制这一现象<sup>[24]</sup>。此外, C/EBP $\alpha$  在 3T3-L1 细胞的分化作用研究得较多, 它是在大多数脂肪特异性基因转录启动之前表达的, 是前脂肪细胞的分化和脂质合成过程中的重要调控转录因子<sup>[25,26]</sup>, 影响 3T3-L1 细胞的成脂分化。

图6免疫印迹结果显示, 与正常组相比, 经诱导后的模型组腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 显著降低 (正常组表达强度的 0.19 倍), 其下游靶点乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl CoA Carboxylase, ACC) 的磷酸化显著降低 (正常组表达强度的 0.04 倍), CCAAT 增强子蛋白 (C/EBP $\alpha$ ) 显著升高 (正常组表达强度的 1.96 倍), 脂肪酸合成酶 (FAS) 显著升高 (正常组表达强度的 3.15 倍), 肉毒碱棕榈酰转移酶 (CPT1) 显著降低 (正常组表达强度的 0.28 倍)。与模型组相比, 素馨花水提取物、橄榄苦苷、两种单体化合物联用都能够显著性激活 AMPK (2.23、2.16 和 2.40 倍) 和下游 ACC 的磷酸化 (5.52、11.51 和 7.77 倍), 下调其下游靶点 C/EBP $\alpha$  (0.31、0.65 和 0.64 倍)、FAS (0.18、0.40 和 0.32 倍) 的活性, 减少脂肪的合成; 并提高 CPT1 蛋白的表达 (2.65、3.92 和 2.34 倍), 促进脂肪酸的氧化。该实验结果显示素馨花水提取物和橄榄苦苷都能够激活 AMPK 通路, 橄榄苦苷是橄榄叶和橄榄油中的主要酚类化合物, 多篇文献报道橄榄中环烯醚萜类化合物在动物模型上有抗肥胖功效<sup>[27-30]</sup>, 此外, 橄榄苦苷可以在 C2C12 肌肉细胞和小鼠体内激活 AMPK<sup>[31,32]</sup>。

## 2.6 素馨花通过抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡起降脂活性

脂肪细胞增殖是脂肪细胞分化的一个重要阶段, 抑制前脂肪细胞增殖也被认为具有预防肥胖和代谢疾病的潜力<sup>[33-35]</sup>, 发生肥胖和脂肪积累可能通过脂肪细胞数量或大小的增加, 或两者同时增加<sup>[36]</sup>, 新的脂肪细胞可以通过细胞凋亡的形式而被清除, 从而达到抑制脂质积累的效果<sup>[37]</sup>。许多天然化合物已被报道可诱导 3T3-L1 前脂肪细胞或脂肪细胞凋亡, 表明它们可能是有希望的治疗肥胖的药物<sup>[38]</sup>。

为了研究素馨花是否能够抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖, 本试验通过 MTT 实验测定素馨花水提取物、橄榄苦苷、女贞甙不同作用浓度和不同时间下的细胞存活率, 同时用正常细胞 LO<sub>2</sub> 做对比。从图7结果可知, 素馨花水提取物、橄榄苦苷、女贞甙都能剂量依赖性地降低 3T3-L1 细胞的存活率, 而对于正常肝细胞

LO<sub>2</sub> 的存活率影响较小, 初步判断素馨花样品能够抑制脂肪细胞的增殖。

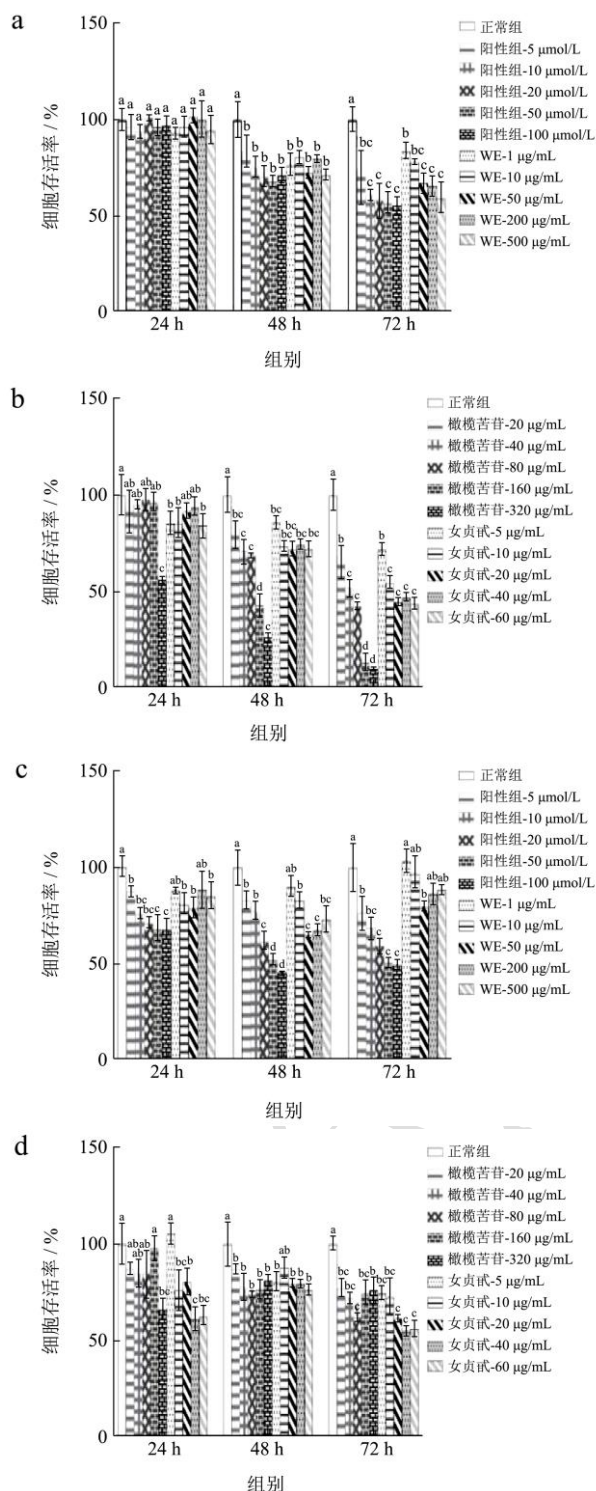


图7 素馨花水提取物及其成分对 3T3-L1 细胞和 LO<sub>2</sub> 细胞增殖的影响

**Fig.7 Effects of different concentrations of *Jasminum grandiflorum* L. flowers water extract and its components on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes and LO<sub>2</sub> cells**

注: a 为黄连素和素馨花水提取物对 3T3-L1 细胞增殖的影响; b 为橄榄苦苷和女贞甙对 3T3-L1 细胞增殖的影响; c 为黄连素和

素馨花水提取物对 LO<sub>2</sub> 细胞增殖的影响; d 为橄榄苦苷和女贞甙对 LO<sub>2</sub> 细胞增殖的影响; 图中不同小写字母表示显著差异, P<0.05。

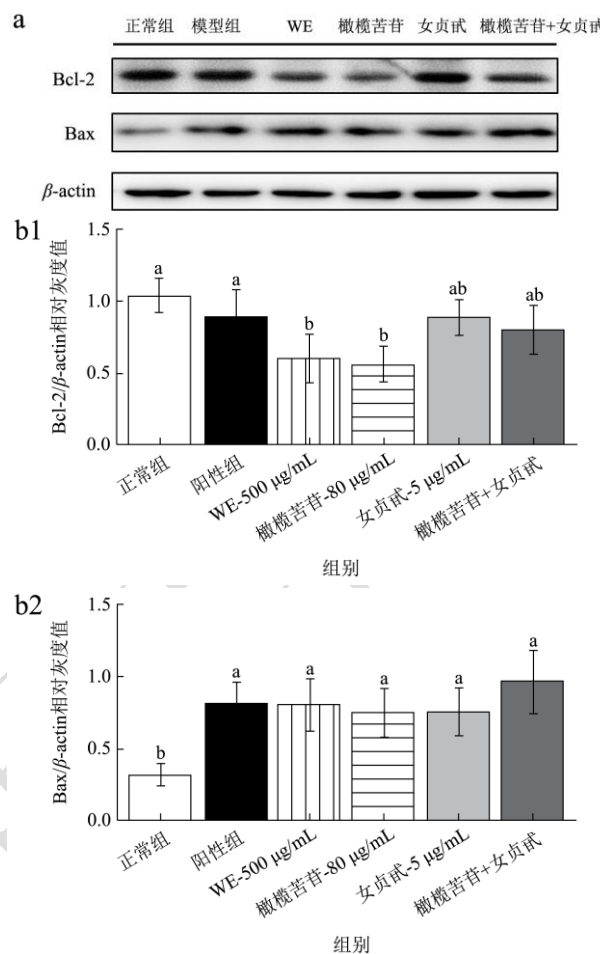


图8 素馨花水提取物及其化学成分对 3T3-L1 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

**Fig.8 Effects of *Jasminum grandiflorum* L. flowers water extract and its components on expression of apoptosis-related proteins in 3T3-L1 cells**

注: a 为 Western blot 检测结果; b1、b2 为蛋白定量分析结果; 图中不同小写字母表示显著差异, P<0.05。

文献表明, 细胞水平上, 橄榄苦苷能够降低体外增殖的 3T3-L1 细胞的活力<sup>[19]</sup>, 能够抑制有丝分裂克隆扩增过程中 3T3-L1 细胞的分裂并导致细胞周期延迟、下调脂肪形成相关基因来抑制细胞分化<sup>[39]</sup>。为了进一步探究素馨花水提取物抑制前脂肪细胞增殖是否与诱导细胞凋亡有关, 采用 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达。图 8 蛋白印迹结果显示, 素馨花水提取物、橄榄苦苷、两种单体化合物联用都可以下调 Bcl-2 蛋白含量(正常组表达强度的 0.59、0.54、0.78 倍), 上调 Bax 蛋白含量(正常组表达强度的 2.54、2.39、3.08 倍), 说明它们都可以诱导 3T3-L1 前脂肪细胞凋亡, 达到抑制增殖从而产生降脂作用。



### 3 结论

素馨花作为药食两用的茶饮, 被越来越多人所接受, 开发其健康活性具有重要意义。其水提物能在3T3-L1 前脂肪细胞分化过程前期通过抑制脂肪细胞生长、分化和脂肪合成并促进脂肪酸氧化从而有效抑制脂质的积累, 其中的主要活性成分是橄榄苦苷。研究表明素馨花在肥胖的预防和治疗中具有潜在的价值, 能够为素馨花的开发利用推广提供一些理论支撑和依据, 素馨花茶值得进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle [J]. *Nature Medicine*, 2001, 7(10): 1138-1143.
- [2] Wang Y, Yao W, Li B, et al. Nuciferine modulates the gut microbiota and prevents obesity in high-fat diet-fed rats [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2020, 52(12): 1959-1975.
- [3] Rao Y, Liu H, Gao L, et al. Synthesis and biological evaluation of novel bouchardatine derivatives as potential adipogenesis/lipogenesis inhibitors for antiobesity treatment [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015, 58(23): 9395-9413.
- [4] Rosen E, Spiegelman B. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis [J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 847-853.
- [5] López-miranda J, Pérez-martínez P, Marin C, et al. Dietary fat, genes and insulin sensitivity [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2007, 85(3): 213-226.
- [6] Booth A, Magnuson A, Foster M. Detrimental and protective fat: body fat distribution and its relation to metabolic disease [J]. *Hormone Molecular Biology & Clinical Investigation*, 2014, 17(1): 13-27.
- [7] 周兴华, 张晓伟, 孙鑫娟, 等. 双酚 S 影响 3T3-L1 前脂肪细胞分化及其作用机制的研究 [J]. *现代食品科技*, 2017, 33(11): 1-6.
- [8] Park Y, An M, Kim J, et al. Antiobesity effect of ethanolic extract of *Ramulus Mori* in differentiated 3T3-L1 adipocytes and high-fat diet-induced obese mice [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 251: 112542.
- [9] Gentile L, Uccella N, Sivakumar G. Soft-MS and computational mapping of oleuropein [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(5): 992.
- [10] 陈千良, 孙文基. 裂环烯醚萜类化合物研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2003, 18(2): 58-63.
- [11] Zhang Y, Sun L, Lai X, et al. Gastroprotective effects of extract of *Jasminum grandiflorum* L. flower in HCl/EtOH-induced gastric mucosal ulceration mice [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 144: 112268.
- [12] Li D, Tang X, Liu C, et al. Jasmine (*Jasminum grandiflorum*) flower extracts ameliorate tetradecanoylphorbol-acetate induced ear edema in mice [J]. *Natural Product Communications*, 2020, 15(4): 1-7.
- [13] Nagarajappa R, Batra M, Sharda A, et al. Antimicrobial effect of *Jasminum grandiflorum* L. and *Hibiscus rosa-sinensis* L. extracts against pathogenic oral microorganisms - an *in vitro* comparative study [J]. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 2015, 13(4): 341-348.
- [14] Zhao G, Yin Z, Dong J. Antiviral efficacy against hepatitis b virus replication of oleuropein isolated from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 125(2): 265-268.
- [15] Kwon J, Seo S, Yue S, et al. An inhibitory effect of resveratrol in the mitotic clonal expansion and insulin signaling pathway in the early phase of adipogenesis [J]. *Nutrition Research*, 2012, 32(8): 607-616.
- [16] Taisuke K, Kenroh S, Kyoko K, et al. Indirubin promotes adipocyte differentiation and reduces lipid accumulation in 3T3-L1 cells via peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 21(3): 1552-1560.
- [17] Mota D, Richard A, Hang H, et al. Transcriptional regulation of adipogenesis [J]. *Comprehensive Physiology*, 2017, 7(2): 635-674.
- [18] Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, et al. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes [J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 425: 88-90.
- [19] Drira R, Chen S, Sakamoto K. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells [J]. *Life Sciences*, 2011, 89(19-20): 708-716.
- [20] Herzig S, Shaw R. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19: 121-135.
- [21] Carling D. AMPK signalling in health and disease [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2017, 45: 31-37.
- [22] Garcia D, Shaw R. AMPK: Mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance [J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(6): 789-800.

- [23] Li Z, Li J, Miao X, et al. A minireview: Role of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in obesity-related renal injury [J]. *Life Sciences*, 2021, 265: 118828.
- [24] Li Y, Li C, Wu J, et al. Harmane ameliorates obesity through inhibiting lipid accumulation and inducing adipocyte browning [J]. *RSC Advances*, 2020, 10(8): 4397-4403.
- [25] Atilla E. Fat cell and fatty acid turnover in obesity [J]. *Obesity and Lipotoxicity*, 2017, 960: 135-160.
- [26] Zhang G, Li N, Tong Y, et al. Artemisinin derivatives inhibit adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes through upregulation of CHOP [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 557: 309-315.
- [27] Michaela S, Ioanna A, Alexios-leandros S, et al. Oleuropein as an inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. *Genes & Nutrition*, 2014, 9(1): 376.
- [28] Malliou F, Andreadou I, Gonzalez F, et al. The olive constituent oleuropein, as a ppara agonist, markedly reduces serum triglycerides [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2018, 59: 17-28.
- [29] Vds I, Dhef H, Hjm S, et al. Nutraceutical oleuropein supplementation prevents high fat diet-induced adiposity in mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 14: 702-715.
- [30] Taesun P, Narae K, Sujin S. Oleuropein attenuates visceral adiposity in high fat diet-induced obese mice through the modulation of WNT10b- and galanin-mediated signalings [J]. *New Biotechnology*, 2014, 31: S112.
- [31] Porcu C, Sideri S, Martini M, et al. Oleuropein induces AMPK-dependent autophagy in NAFLD mice, regardless of the gender [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 19(12): 3948.
- [32] Hadrich F, Garcia M, Maalej A, et al. Oleuropein activated AMPK and induced insulin sensitivity in C2C12 muscle cells [J]. *Life Sciences*, 2016, 151: 167-173.
- [33] Lee J, Yoo Y-M, Lee Y, et al. Melatonin induces apoptotic cell death in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Molecular Biology*, 2020, 54(2): 233-243.
- [34] Chu G, Zhou X, Hu Y, et al. Rev-erba Inhibits proliferation and promotes apoptosis of preadipocytes through the agonist GSK4112 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4524.
- [35] Li T, Zhang L, Jin C, et al. Pomegranate flower extract bidirectionally regulates the proliferation, differentiation and apoptosis of 3T3-L1 cells through regulation of PPAR $\gamma$  expression mediated by PI3K-AKT signaling pathway [J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2020, 131: 110769.
- [36] Flier J. The adipocyte: Storage depot or node on the energy information superhighway? [J]. *Cell*, 1995, 80: 15-18.
- [37] Prins J, O'rahilly S. Regulation of adipose cell number in man. [J]. *Clinical Science*, 1997, 92: 3-11.
- [38] Rayalama S, Della-feraa M, Baile C. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2008, 19: 717-726.
- [39] Kang M, Kang N, Ko S, et al. Anti-obesity effects of seaweeds of Jeju Island on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and obese mice fed a high-fat diet [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, 90: 36-44.