

荷叶碱对小鼠肝 AML-12 细胞内脂质代谢的影响

徐豪^{1,2}, 王雪竹^{1,2}, 俞卓利^{1,2}, 高靖汝¹, 郭瑞¹, 李娇妹¹, 李松涛¹, 韩强^{1,2*}

(1. 浙江中医药大学公共卫生学院, 浙江杭州 310053) (2. 浙江中医药大学中医药科学院, 浙江杭州 310053)

摘要: 该研究通过高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 测定荷叶中荷叶碱含量, 对比分析 25 种荷叶中荷叶碱含量差异, 并利用油酸诱导建立 AML-12 细胞脂质蓄积模型, 研究荷叶碱对脂质代谢的影响。通过测定甘油三酯 (Triglyceride, TG) 含量和油红 O 染色情况, 评估细胞脂质蓄积情况; 检测细胞内 AMP 依赖的蛋白激酶 (Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase, AMPK) 通路相关蛋白表达水平, 探究荷叶碱影响脂质代谢的作用机制。经 HPLC 检测, 发现荷叶品种间荷叶碱含量差异显著, 其中佛座莲的荷叶碱质量分数最高, 达 0.68 mg/g, 而金凤的荷叶碱质量分数最低, 仅为 0.22 mg/g。在脂质代谢研究中, 与对照组相比, 模型组在建模后脂滴数量显著增加, TG 含量提升 ($P < 0.01$), P-AMPK 和脂肪甘油三酯脂肪酶 (Adipose Triglyceride Lipase, ATGL) 在蛋白水平上表达显著降低 ($P < 0.05$); 在荷叶碱的干预下, AML-12 细胞的脂滴蓄积程度明显降低, TG 含量显著减少 ($P < 0.05$), P-AMPK 和 ATGL 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。由此表明: 不同荷叶品种间荷叶碱含量存在明显差异, 荷叶碱可能是通过调控 AMPK/ATGL 途径调节 AML-12 细胞内脂质代谢。该结果可为荷叶的开发利用提供理论支持。

关键词: 荷叶碱; AML-12 细胞; 脂代谢; 高脂血症

文章编号: 1673-9078(2023)11-18-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.0185

Effects of Nuciferine on Lipid Metabolism in Mouse Hepatic AML12 Cells

XU Hao^{1,2}, WANG Xuezu^{1,2}, YU Zhuoli^{1,2}, GAO Jingru¹, GUO Rui¹, LI Jiaomei¹, LI Songtao¹, HAN Qiang^{1,2*}

(1. School of Public Health, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

(2. Academy of Chinese Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Nuciferine content in 25 varieties of lotus leaf was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). A lipid accumulation model using AML-12 cells was established with oleic acid induction to study the effects of nuciferine on lipid metabolism. The accumulation of lipid droplets in the cells was evaluated by measuring triglyceride (TG) content and by oil red O staining, and the expression of proteins regulated by the adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway was assessed to explore the mechanism by which nuciferine affects lipid metabolism. HPLC analysis revealed significant differences in nuciferine content among different lotus leaf varieties. Among these variants, the mass fraction from "Fozuolian" was highest (0.68 mg/g), while that of "Jinfeng" was lowest (0.22 mg/g). In terms of lipid metabolism, compared with the control group, the number of lipid droplets in the model group increased significantly with increasing TG level, while P-AMPK and adipose triglyceride lipase (ATGL) protein expression decreased significantly ($P < 0.05$). With administration of nuciferine, lipid droplet and TG content accumulation in AML-12 cells significantly decreased ($P < 0.05$), while expression of P-AMPK and ATGL proteins significantly increased ($P < 0.05$). This suggests that there are significant differences in nuciferine content among lotus leaves of different varieties, and nuciferine may regulate lipid metabolism in AML-12 cells by regulating the AMPK/ATGL pathway. These results provide technical support for the development and utilization of lotus leaves.

Key words: nuciferine; AML-12 cells; lipid metabolism; hyperlipidemia

引文格式:

徐豪,王雪竹,俞卓利,等.荷叶碱对小鼠肝 AML-12 细胞内脂质代谢的影响[J].现代食品科技,2023,39(11):18-24

XU Hao, WANG Xuezu, YU Zhuoli, et al. Effects of nuciferine on lipid metabolism in mouse hepatic AML12 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 18-24

收稿日期: 2023-02-20

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2021C02018); 浙江中医药大学校级科研项目 (2020ZG08; 2020ZR07)

作者简介: 徐豪 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: 654675406@qq.com

通讯作者: 韩强 (1987-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品科学, E-mail: han33827@163.com

荷叶,是睡莲科植物莲的干制叶,自古以来就被当作药物和食物同时使用,具有清暑化湿、升发清阳、凉血止血的功效^[1],主要分布在黄河流域、长江地区、珠江中下游,尤以湖北、湖南、浙江、江苏等南方各省为主^[2]。现代药物化学发现,荷叶含有荷叶碱、黄酮、多糖和挥发油等化合物,具有降压降脂、抗氧化、抗炎和抗癌等多种作用^[3-6]。因此,荷叶茶或者含有荷叶成分的食品或药物受到社会各界越来越多的关注,市场对于荷叶药材的需求也越来越大,但目前市面上所售的荷叶药材成分不一,各种组分相差较大^[7],对于荷叶药材的药效有很大影响。《中国药典(2020版)》规定以 Nuci 含量作为荷叶质量的衡量标准,目前研究发现不同产地、不同品种和不同处理方式会影响荷叶中荷叶碱的含量^[8-11],但同一产地不同品种对荷叶中 Nuci 含量影响鲜有报道。因此,有必要研究同一产地不同品种的荷叶中有效成分的含量差异。

近年来,高脂血症(Hyperlipidemia, HLP)的发病率逐年上升,且呈年轻化趋势^[12]。高脂血症主要指体内血脂水平异常升高,临床上表现为 TG、总胆固醇(Total Cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(Low Density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C)的升高和(或)高密度脂蛋白胆固醇(High Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C)的降低,是动脉粥样硬化、冠心病、胰腺炎等严重危害机体健康的疾病的主要致病因素^[13-15]。肝脏是体内脂质代谢的重要场所,是脂质沉积的主要器官,肝脏的脂质代谢水平与高脂血症、糖尿病、脂肪肝等心血管疾病密切相关^[16]。因此,维持肝脏的脂质稳态对于预防和治疗高脂血症具有重要意义。

荷叶碱(Nuciferine, Nuci)是荷叶的主要活性成分,据研究,荷叶碱具有降血脂、抗氧化、抗炎、抗癌、降血压等多种生物活性,是一种具有多种药理作用的植物生物碱^[17-20]。研究发现,荷叶碱可以通过抑制脂质合成蛋白 SCAP、SREBP-1c、SREBP2 等和促进脂质分解蛋白 CPT-1a、CD36、ACC、ATGL 等对高脂小鼠肝脏脂质蓄积起抑制作用。荷叶碱可明显改善糖尿病小鼠的葡萄糖耐量能力^[21],减少动脉粥样硬化动物模型或泡沫细胞模型中泡沫细胞内脂质沉积^[22]。

因此,本研究以荷叶及荷叶碱为研究对象,对荷叶品种间荷叶碱含量进行分析,并初步探究荷叶碱对 AML-12 细胞的降脂作用及其机制,为荷叶的选材及相关降脂产品的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂

荷叶于 2022 年 7 月采摘自西湖荷花栽培基地(中国,杭州),采摘 25 种不同品种荷叶(春晓、秋水长天、金合欢、牡丹莲、矮寿金莲、粉玲珑、喜相逢、牢头红、红台莲、碧莲、金珠落玉盘、金凤、粉层托珠、小台红、女儿红、佛座莲、落花缙、藤壶莲、红石榴、念恩、逸心莲、转冬药、黄匙、之江鸿运、小水红);于 60 °C 烘干 24 h,水分烘干后粉碎过 60 目,得荷叶粉末,于 -20 °C 保存。

AML-12 细胞由中国科学院上海细胞库提供,经浙江中医药大学脂代谢实验室传代保存。

荷叶碱(纯度≥98%),批号:H04211807002,成都瑞芬思生物科技有限公司;乙腈、甲醇,分析纯,德国 Merck 公司;三乙胺,分析纯,上海麦克林公司;冰醋酸,色谱纯,上海麦克林公司;DMEM/F12 培养基、胎牛血清,美国 Gibco 公司;甘油三酯试剂盒,南京建成生物工程研究所;噻唑蓝(MTT),美国 Sigma 公司;二甲基亚砜(DMSO),美国 Sigma 公司;抗体 AMPK、P-AMPK 和 ATGL,美国 Abcam 公司;油红 O 染色试剂盒,上海碧云天生物技术公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体,武汉博士德生物技术有限公司。

1.1.2 仪器设备

Waters e2695 型高效液相色谱仪,美国沃特世公司;SK3300H 超声波表面清洗器,上海科导仪器责任有限公司;MR-4100 多功能酶标仪,美国 Dynatech 公司;AxioObserverA1 研究级倒置显微镜,德国蔡司集团;CLASS1003111 型细胞培养箱,美国 Thermo 公司;SW-CJ-IF 型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;Tanon-6200 化学发光成像仪,上海天能科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 荷叶品种间荷叶碱含量测定

1.2.1.1 荷叶碱提取液制备

经前期单因素试验和正交试验对荷叶碱提取工艺进行优化,确立荷叶碱的最佳提取工艺。精确称取 5.0 g 干燥荷叶粉末,在 90~100 °C 的水浴环境下,用 15 倍体积的水,蒸汽回流提取 2 次,每次 60 min,合并两次提取液,放置备用。

1.2.1.2 色谱条件

依据中华人民共和国药典(2020年版):色谱柱采用十八烷基硅烷键合硅胶作为填充剂 Inert Sustain C18 (4.6 mm×1 500 mm, 5 μmol/L);流动相为乙腈-水-三乙胺-冰醋酸(27:70.6:1.6:0.78, V/V/V/V);流速为1.0 mL/min;色谱柱柱温为25℃;仪器进样量为20 μL;酶标仪检测波长为270 nm。

1.2.1.3 标准曲线的绘制

参考文献^[23],将荷叶碱标准储备液配制成质量浓度为3、15、30、60、90、120 μg/mL的标准液,用HPLC检测荷叶碱峰面积,HPLC图如图1所示。以标准溶液摩尔浓度为横坐标(C),以峰面积为纵坐标(S),绘制标准曲线:线性回归方程为 $S=65\ 652C-26\ 483$, $R^2=0.999\ 2$ 。试验结果表明,荷叶碱质量浓度在3~120 μg/mL范围内与峰面积存在良好的线性关系。为保证标准曲线的准确性,对标准曲线进行了精密性、重复性和加标回收率试验,结果表明标准曲线准确可靠,可用于荷叶中荷叶碱含量的检测。

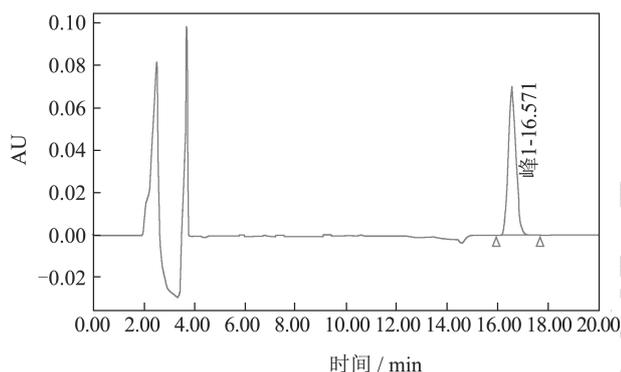


图1 荷叶碱标准品 HPLC 图

Fig.1 HPLC diagram of nuciferine standard

1.2.1.4 品种间荷叶碱含量测定

分别精密称取25种荷叶粉末5.0 g,每种3份,按照1.2.1.1的步骤制备荷叶提取液,并在1.2.1.2色谱条件进行检测分析,记录各品种荷叶碱峰面积,根据标准曲线线性回归方程计算出荷叶碱的质量分数。

1.2.2 荷叶碱降脂试验

1.2.2.1 药液配制

将油酸溶解于氢氧化钠溶液中,然后加入质量分数10%的BSA,稀释至摩尔浓度为3 mmol/L,得油酸钠盐溶液。精确称取2.95 mg荷叶碱,将其加入1 mL二甲基亚砜溶液中充分溶解,配制成摩尔浓度为10 mmol/L的母液,并于-40℃保存。

1.2.2.2 细胞培养及实验分组

将AML-12细胞复苏后,置于体积分数5% CO₂、37℃恒温恒湿培养箱中,用DMEM/F-12培养基培养,待细胞生长密度到达70%~80%时,进行细胞传代接板

用于开展后续实验。实验中细胞分为4组:UT组(完全培养基)、OA组(含0.4 mmol/L油酸)、Nuci-25 μmol/L组(含0.4 mmol/L油酸和25 μmol/L荷叶碱)、Nuci-50 μmol/L组(含0.4 mmol/L油酸和50 μmol/L荷叶碱)。

1.2.2.3 细胞毒性实验

参考文献^[21],取对数生长期的AML-12细胞以每孔5 000个均匀接种于96孔板上,待细胞贴壁后,加入DMEM/F-12培养基,并添加不同摩尔浓度的候选物在37℃恒温培养箱中干预24 h。干预结束前4 h,在96孔板中加入20 μL 5 mg/mL MTT溶液,放入培养箱继续干预4 h,弃掉旧培养基,加入100 μL DMSO,待充分溶解后,在酶标仪570 nm波长处测量吸光度。

1.2.2.4 甘油三酯(TG)测定

按南京建成甘油三酯试剂盒说明书的方法检测AML-12细胞内TG含量。以蒸馏水做空白对照,取培养液上清离心,吸取2.5 μL上清液于96孔板中,再加入250 μL工作液,37℃孵育10 min,孵育完成后在酶标仪510 nm波长处测吸光度。细胞蛋白浓度使用BCA试剂盒检测。检测结果表示为每克细胞总蛋白中所含的甘油三酯的质量浓度(mg/g)。

1.2.2.5 油红O染色

按碧云天油红O染色试剂说明书对AML-12细胞进行固定及染色。在干预结束后,缓慢吸除细胞培养液,接着用PBS洗涤2次,再加入4%(m/V)多聚甲醛固定液固定10 min, PBS漂洗2次,加入染色洗涤液覆盖细胞20 s,随后吸除染色洗涤液,加入油红O染色工作液覆盖细胞,37℃染色10 min,吸除油红O染色工作液,再加入染色洗涤液,静置30 s,吸去染色洗涤液后用PBS洗涤2次,再用苏木素染色液对细胞核进行5 min常温复染,加入染色洗涤液清洗,最后吸除染色洗涤液,用PBS反复洗涤,在显微镜下观察和拍照。

1.2.2.6 蛋白免疫印迹实验

参考文献^[24],在处理后的AML-12细胞中,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,冰上裂解30 min,用BCA试剂盒检测样品蛋白质浓度,并将各组蛋白质浓度调平。将样品蛋白质等量上样,用10% SDS-PAGE电泳分离蛋白质,再低温转移至PVDF膜,用含5%(m/V)脱脂奶粉的TBS-T溶液室温封闭1 h,加入一抗,4℃孵育过夜。TBS-T洗膜3次,加入二抗室温摇床孵育1 h。采用数字凝胶成像仪对拍摄图像,通过Image J软件对蛋白条带进行灰度分析。

1.3 数据统计分析

所有数据用SPSS 25.0软件系统进行统计分析,

用 GraphPad Prism 8 软件系统绘图。数据以平均值±标准差 (x±s) 表示, 组间差异用单因素 ANOVA 比较, $P < 0.05$ 时, 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 不同品种对荷叶中荷叶碱含量的影响

《中国药典 (2020 版)》规定以荷叶碱含量作为荷叶药材质量的衡量标准。由表 1 可知 25 种荷叶中荷叶碱含量在 0.22~0.68 mg/g 之间, 其中金凤、腾壶莲和牡丹莲等品种中荷叶碱含量低于如佛座莲、落花缙、逸心莲等高荷叶碱含量品种, 差异甚至可达 3 倍。本次研究发现同一产地不同品种荷叶中荷叶碱含量差异明显, 这与罗翔强等^[25]报道的不同产地的荷叶药材中荷叶碱含量存在差异的研究理论相似。

表 1 不同品种荷叶中荷叶碱含量表 (n=3)

Table 1 Results of alkaloid content in different varieties of lotus leaves (n=3)

种类	荷叶碱含量/(mg/g)	RSD/%
春晓	0.42±0.06 ^d	0.12
秋水长天	0.35±0.05 ^e	0.11
金合欢	0.59±0.08 ^b	0.19
牡丹莲	0.27±0.03 ^e	0.09
矮寿金莲	0.28±0.03 ^e	0.05
粉玲珑	0.41±0.06 ^d	0.11
喜相逢	0.30±0.06 ^e	0.15
牢头红	0.29±0.03 ^e	0.05
红台莲	0.43±0.03 ^d	0.07
碧莲	0.36±0.09 ^e	0.22
金珠落玉盘	0.29±0.04 ^e	0.12
金凤	0.22±0.04 ^e	0.13
粉层托珠	0.43±0.06 ^d	0.12
小台红	0.39±0.05 ^d	0.12
女儿红	0.51±0.06 ^c	0.08
佛座莲	0.68±0.09 ^a	0.13
落花缙	0.61±0.08 ^b	0.18
腾壶莲	0.25±0.05 ^e	0.17
红石榴	0.42±0.07 ^d	0.12
念恩	0.57±0.08 ^b	0.13
逸心莲	0.61±0.05 ^b	0.05
转冬药	0.34±0.03 ^e	0.03
黄匙	0.55±0.09 ^c	0.20
之江鸿运	0.38±0.05 ^d	0.18
小水红	0.49±0.06 ^c	0.18

注: 与 a 相比, b: $P < 0.05$; c: $P < 0.01$; d: $P < 0.005$; e: $P < 0.001$ 。

2.2 荷叶碱及油酸对 AML-12 细胞活性的影响

由图 2 可知, 不同浓度的荷叶碱 (6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 和不同浓度的油酸 (50、100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后, 各组细胞活性与 UT 组比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 即荷叶碱 (6.25~100 $\mu\text{mol/L}$) 和油酸 (50~800 $\mu\text{mol/L}$) 都没有对 AML-12 细胞活性有损伤, 这与 Li^[21]的研究结果一致。研究根据人体推荐饮荷叶茶量、荷叶的荷叶碱含量及人和小鼠给药换算比例^[26], 确定荷叶碱给药浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

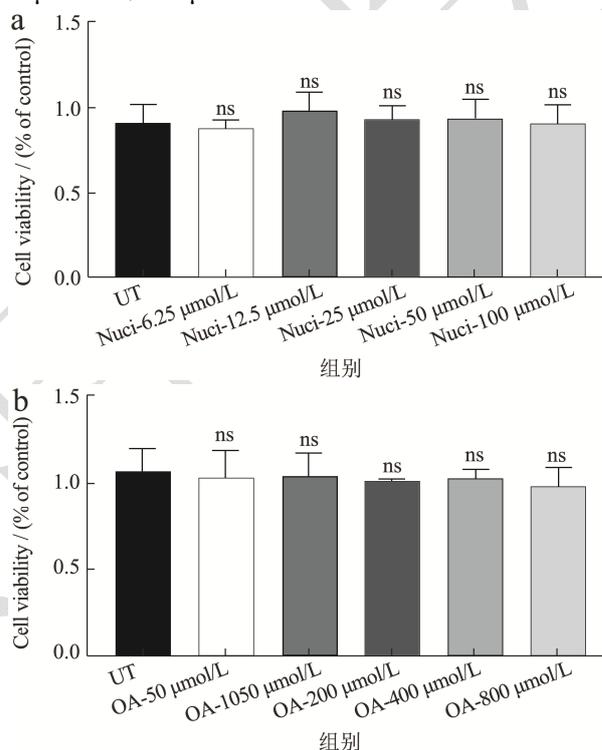


图 2 AML-12 细胞的活力变化

Fig.2 Changes in viability of AML-12 cells

注: a 和 b 分别为荷叶碱和油酸对 AML-12 细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)。"ns" 表示无统计学意义。

2.3 荷叶碱对细胞内甘油三酯含量的影响

大量研究表明, 甘油三酯蓄积在高脂血症的发病中起着重要的作用, 是引起高脂血症的主要原因。大量甘油三酯在肝脏中积累, 使得肝细胞脂肪变性, 肝脏脂质代谢紊乱, 从而导致高脂血症、肥胖、肝硬化甚至肝癌等疾病的发生^[27]。为了探究荷叶碱在 AML-12 细胞中起降 TG 作用, 在建立高脂模型后, 用 25 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的荷叶碱溶液干预作用 16 h。由图 3 可知, 25 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 荷叶碱组中 TG 含量分别降低了 26.52% 和 33.17%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果表明荷叶碱能抑制 AML-12 细

胞中的甘油三酯的蓄积情况。

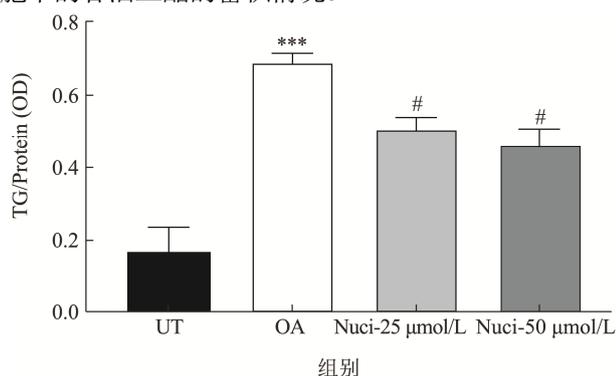


图3 各组细胞内甘油三酯含量

Fig.3 Intracellular triglyceride content in each group

($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: 与对照组相比, ***.差异高度显著 ($P<0.001$); 与模型组相比, #.显著差异 ($P<0.05$).

2.4 油红 O 染色结果

由图 4 可知, UT 组细胞没有着色, 而模型组在 0.4 μmol/L 油酸处理 24 h 后, 细胞周围可见黄褐色脂滴, 细胞着色明显; 荷叶碱联合油酸共同处理后, 细胞内脂滴密度和着色均有所降低 ($P<0.05$), 且随着荷叶碱摩尔浓度的增加, 抑制作用也越明显。在李晨驰^[28]的研究结果中也发现蓝莓花青素对油酸所致的 AML-12 细胞脂质蓄积有一定改善作用, 油红 O 染色程度随蓝莓花青素干预降低, 这与本研究 and 汪娇等^[29]的结果相似。

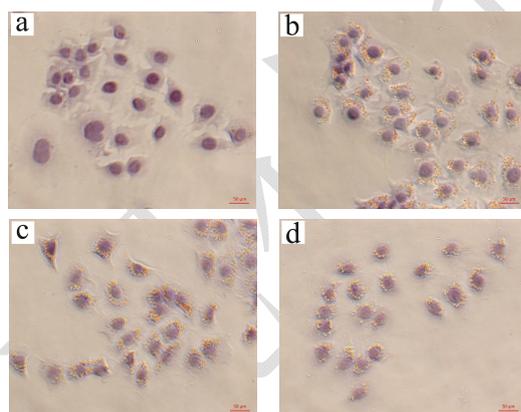


图4 荷叶碱对油酸所致的 AML-12 细胞脂质蓄积的影响 (400×)

Fig.4 Effect of nuciferine on oleic acid-induced lipid accumulation in AML-12 cells

注: a 为 UT 组; b 为模型组; c 为 Nuci-25 μmol/L 组; d 为 Nuci-50 μmol/L 组。

2.5 蛋白免疫印迹实验

采用 Western blot 测定细胞内蛋白表达水平, 结

果由图 5 可知, AML-12 细胞暴露于油酸后, AMPK 的磷酸化水平明显降低 ($P<0.001$), ATGL 表达水平降低 ($P<0.05$)。在添加荷叶碱共同培养后, AML-12 细胞中 AMPK 的磷酸化水平显著提高, ATGL 的表达水平回升。Ma 等^[30]、王艳等^[31]、赵丹丹等^[32]的研究报道表明, AMPK 能在各种代谢相关器官中不同程度的表达, 并且可以被细胞压力、运动状态和影响细胞能量代谢的物质等条件激活, 并在激活后发挥促进炎症、肿瘤和糖脂代谢正向调控的作用。在本次研究中观察到, 荷叶碱能抑制油酸诱导的 P-AMPK 和 ATGL 蛋白表达量降低, 提示 AMPK/ATGL 信号通路参与了荷叶碱对 AML-12 细胞的降脂作用。

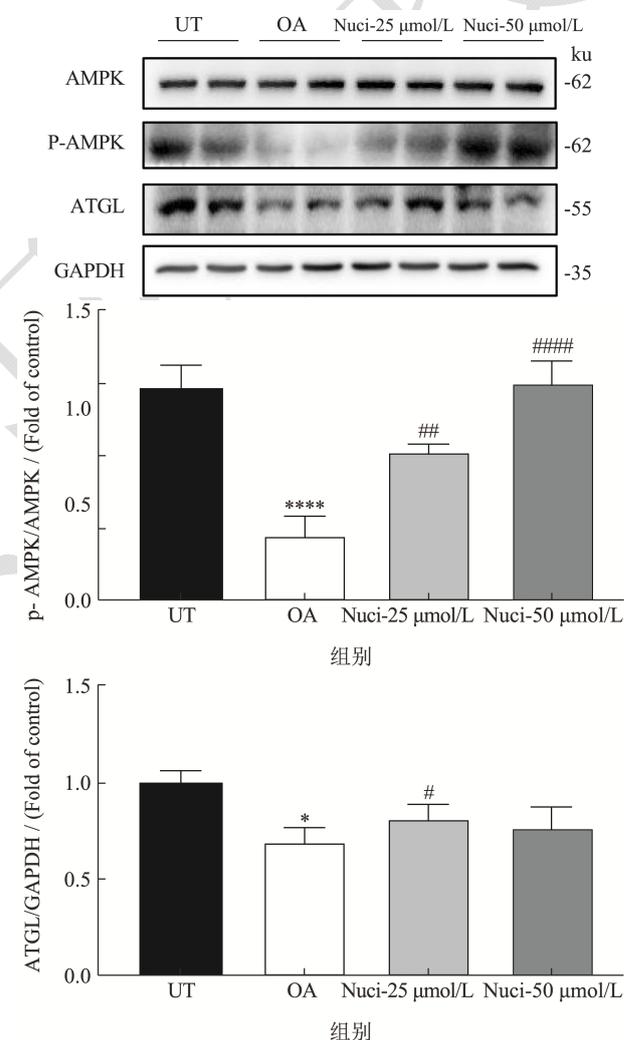


图5 各组细胞内蛋白表达情况

Fig.5 The expression of intracellular protein in each group

($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: 与对照组相比, *显著差异 ($P<0.05$); ****差异高度显著 ($P<0.001$); 与模型组相比, #显著差异 ($P<0.05$); ##差异极显著 ($P<0.01$); ####差异高度显著 ($P<0.001$).

3 结论

本研究通过 HPLC 法对同一产地不同品种的 25 种荷叶所含荷叶碱含量进行分析比较,发现不同品种间荷叶中荷叶碱含量差异较大,同时,在建立 AML-12 细胞脂质蓄积模型后,发现荷叶碱对油酸诱导的 AML-12 细胞脂质蓄积存在一定抑制作用,通过检测相关蛋白表达水平发现,这可能是通过激活 AML-12 细胞内 AMPK/ATGL 通路,调节胞体能量代谢平衡来实现。本研究为荷叶相关产品的选材和开发利用提供参考,也为治疗高脂血症提供一个潜在的可能性药物。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 张焱.饮食节有身体好-《黄帝内经》中的食养之道[M].北京:中国中医药出版社,2012.
- [3] Sung Min Kim, Eun Jung Park, Hae Jeung Lee. Nuciferine attenuates lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses by inhibiting p38 MAPK/ATF2 signaling pathways [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(6): 2373-2383.
- [4] ZHANG Chao, DENG Jianjun, LIU Dan, et al. Nuciferine ameliorates hepatic steatosis in high-fat diet/streptozocin-induced diabetic mice through a PPAR α /PPAR γ coactivator-1 α pathway [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2018, 175(22): 4218-4228.
- [5] WANG Xinfeng, CHENG Waisan, YANG Haixia, et al. Nuciferine relaxes rat mesenteric arteries through endothelium-dependent and -independent mechanisms [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172(23): 5609-5618.
- [6] 熊万涛,廖加抱,杨智霞,等.荷叶碱对肥胖模型小鼠肠道菌群及慢性炎症的影响[J].*中国中药杂志*,2021,46(8):2104-2111.
- [7] 吴昊,刘斌,王伟,等.HPLC法测定不同市售荷叶药材中4种生物碱类成分的含量[J].*北京中医药大学学报*,2008,7:478-481.
- [8] 郭春延,楚建周,薛晶晶,等.白洋淀不同区域荷叶品质和抗氧化性差异[J].*河北大学学报(自然科学版)*,2020,40(5):527-535.
- [9] 黄旭东,晁鲁平,项庆琰,等.不同产地荷叶功能性成分的评价[J].*食品研究与开发*,2017,38(12):153-158.
- [10] 李慧芬,张学兰,崔伟亮,等.HPLC同时测定不同产地荷叶饮品中4种黄酮成分[J].*中国实验方剂学杂志*,2014,20(2): 55-58.
- [11] 曾虹燕,苏杰龙,方芳,等.不同方法提取的荷叶挥发油化学成分分析[J].*西北植物学报*,2005,3:578-582.
- [12] 田时秋,李依林,裴海鸾,等.高脂血症发病机制及药物治疗[J].*生命的化学*,2022,42(12):2237-2247.
- [13] 刘少凯,张彦伟,王春晖,等.高脂血症人群预测潜在冠心病风险模型的临床研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2023, 21(5):885-888.
- [14] 王鑫玉,赵一慕,高云,等.普洱茶素II改善高脂血症 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化作用机制研究[J].*中草药*,2023,54(4): 1157-1163.
- [15] 肖健雄,武依娜,谢东辉.高脂血症性急性胰腺炎的发病机制及治疗的研究进展[J].*牡丹江医学院学报*,2021,42(1): 158-160,163.
- [16] 黄雪君,杨九妹,毕晓黎,等.布芍调脂胶囊对非酒精性脂肪肝大鼠脂质水平、肝功能、血液流变学及肝脏病理形态的影响[J].*环球中医药*,2022,15(1):25-30.
- [17] 熊维,覃再嫩,贺茂林.荷叶碱对脂多糖诱导的大鼠软骨细胞炎症的抗炎作用研究[J].*蛇志*,2021,33(1):17-22.
- [18] LI Danyun, LIU Bing, FAN Yumei, et al. Nuciferine protects against folic acid-induced acute kidney injury by inhibiting ferroptosis [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2021, 178(5): 1182-1199.
- [19] 陈云宪,唐良秋,梁家荣,等.荷叶碱通过上调 SDF-1/CXCR4 信号通路促进人主动脉内皮细胞增殖[J].*中国动脉硬化杂志*,2020,28(11):981-985.
- [20] ZHANG Lina, GAO Jinghua, TANG Peng, et al. Nuciferine inhibits LPS-induced inflammatory response in BV2 cells by activating PPAR- γ [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 63: 9-13.
- [21] LI Zizhuo, CHEN Yaodong, AN Tingting, et al. Nuciferine inhibits the progression of glioblastoma by suppressing the SOX2-AKT/STAT3-Slug signaling pathway [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1): 1-15.
- [22] 况军,王巍.荷叶碱对小鼠动脉粥样硬化血管炎症及基质金属蛋白酶的影响[J].*临床心血管病杂志*,2015,31(1):97-100.
- [23] 邢毅.荷叶碱的提取分离及荷叶提取物降血脂功能研究[D].无锡:江南大学,2019.
- [24] GUO Rui, CHEN Lin, ZHU Jinyan, et al. Monounsaturated fatty acid-enriched olive oil exacerbates chronic alcohol-induced hepatic steatosis and liver injury in C57BL/6J mice [J]. *Food Function*, 2023, 14(3): 1573-1583.
- [25] 罗翔强,刘经相,曾丽婷,等.不同产地荷叶中二氧化硫和荷叶碱含量测定研究[J].*海峡药学*,2022,34(3):75-78.
- [26] 李娜,宋金春.荷叶碱对人肝癌细胞株 HepG2 凋亡及其作用机制[J].*中国药物警戒*,2017,14(12):715-719,726.
- [27] WANG Qinyu, OU Yangjie, HU Guomin, et al. Naringenin

- attenuates non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the NLRP3/NF- κ B pathway in mice [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2020, 177(8): 1806-1821.
- [28] 李晨驰,韩萧萧,杨柳,等. 蓝莓花青素对油酸诱导肝细胞脂肪变性小鼠 Plin5 蛋白表达的影响[J].*中国现代医学杂志*, 2021,31(24):7-12.
- [29] 汪娇,蒋鹏,周建伟. 川陈皮素对非酒精性脂肪肝细胞的保护作用 and lncLSTR 的调控机制[J].*中国病理生理杂志*,2018, 34(6):1129-1133,1137.
- [30] MA Li, LI Weiyun, ZHANG Yanbo, et al. FLT4/VEGFR3 activates AMPK to coordinate glycometabolic reprogramming with autophagy and inflammasome activation for bacterial elimination [J]. *Autophagy*, 2022, 18(6): 1385-1400.
- [31] 王艳,黄德强,罗志军.AMPK 对线粒体功能的调节[J].*中国细胞生物学学报*,2013,35(10):1434-1443.
- [32] 赵丹丹,于娜,左加成,等.降糖消渴颗粒对糖尿病大鼠脂质代谢及肝脏 AMPK 信号通路的影响[J].*中华中医药杂志*, 2016,31(12):4974-4977.