

洋甘菊总黄酮对HepG2细胞脂质沉积的改善作用研究[△]

阿曼古丽·艾则孜^{1,2*}, 马红梅¹, 兰卫^{1#}(1.新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830017; 2.新疆维吾尔医学专科学校药理学系, 新疆和田 848000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)11-1306-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.11.05



摘要 目的 探讨洋甘菊总黄酮对人肝癌HepG2细胞脂质异常的调节作用及其降脂机制。方法 采用大孔树脂分离纯化得到高含量的洋甘菊总黄酮提取物。将HepG2细胞分为对照组(不给药)、模型组(不给药)、非诺贝特组(阳性对照, 3.61 μg/mL)和洋甘菊总黄酮低、中、高剂量组(100、150、200 μg/mL)后,除对照组不造模外,其余组细胞采用1 mmol/L油酸和棕榈酸混合液联合诱导建立脂质沉积细胞模型。干预24 h后,检测细胞上清液中的游离脂肪酸(FFA)水平和细胞中的三酰甘油(TG)、FFA水平;采用油红O染液染色观察细胞中脂滴沉积情况,并检测脂质含量;采用DAPI染液染色观察细胞中二酰甘油酰基转移酶2(DGAT2)蛋白表达情况,并检测DGAT2蛋白表达荧光强度;采用Western blot法检测TG合成关键酶乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、脂肪酸合成酶(FAS)、DGAT2的蛋白表达水平。结果 经分离纯化后,洋甘菊总黄酮含量从6.72%提高到56.20%。细胞实验结果显示,与对照组比较,模型组细胞中的TG、FFA水平和细胞上清液中的FFA水平显著升高,细胞中脂质含量显著升高,DGAT2蛋白表达荧光强度显著升高,ACC、FAS、DGAT2蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$);细胞中可见大量脂滴堆积。与模型组比较,洋甘菊总黄酮低、中、高剂量组以上指标水平均显著逆转($P < 0.01$);细胞中脂滴堆积现象明显减少。结论 洋甘菊总黄酮可以抑制脂质沉积模型HepG2细胞的TG合成,减少细胞脂质积累,防止细胞脂质损伤,其机制可能与其下调ACC/FAS/DGAT2通路表达有关。

关键词 洋甘菊总黄酮;脂质沉积;降脂作用

Study on improvement effect of total flavonoids from *Matricaria recutita* on lipid deposition in HepG2 cells

Amanguli · Aizezi^{1,2}, MA Hongmei¹, LAN Wei¹(1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China; 2. Dept. of Pharmacy, Xinjiang Uygur Medical College, Xinjiang Hotan 848000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the regulatory effect of total flavonoids of *Matricaria recutita* on lipid abnormalities in human hepatoma HepG2 cells and its lipid-lowering mechanism. **METHODS** The high-content total flavonoids extract from *M. recutita* was isolated and purified by macroporous resin. HepG2 cells were divided into control group (without administration), model group (without administration), fenofibrate group (positive control, 3.61 μg/mL) and *M. recutita* total flavonoids low-dose, medium-dose and high-dose groups (100, 150 and 200 μg/mL). Except for control group, lipid deposition model of HepG2 cells in other groups were established by 1 mmol/L mixture of oleic acid and palmitic acid. After 24 hours of intervention, the levels of free fatty acids (FFA) in cell supernatant and triglyceride (TG) and FFA in cells were detected; Oil red O staining was used to observe the deposition of lipid droplets in cells and detect the content of lipid; DAPI staining was used to observe the protein expression of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) in cells, and fluorescence intensity of protein expression of DGAT2 were also detected; protein expressions of key enzymes of TG synthesis as acetyl CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS) and DGAT2 were detected by Western blot. **RESULTS** After separation and purification, the content of total flavonoids from *M. recutita* increased from 6.72% to 56.20%. The results of cell experiment showed that compared with control group, the levels of TG and FFA in cells and FFA in the cell supernatant increased significantly in the model group, the content of lipid in cells increased significantly, the fluorescence intensity of protein expression of DGAT2 increased significantly, and the protein expressions of

[△] 基金项目:国家自然科学基金-地区科学基金资助项目(No. 81960771);国家重点研发计划项目(No.2017YFC1703902);新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No.2018D01C160);新疆维吾尔自治区高校科研计划自然科学青年项目(No.XJEDU2017S025)

* 讲师,硕士研究生。研究方向:中药药理。E-mail:297475833@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药药理。电话:0901-2110289。E-mail:lanwei516@sina.com

ACC, FAS and DGAT2 increased significantly ($P < 0.01$); a large number of lipid droplets were accumulated in the cells. Compared with model group, the levels of above indexes in *M. recutita* total flavonoids low-dose, medium-dose and high-dose groups were significantly reversed ($P < 0.01$); the accumulation of lipid droplets in cells decreased significantly. **CONCLUSIONS** *M. recutita* total flavonoids can inhibit the

TG synthesis of lipid deposition model HepG2 cell, reduce the lipid accumulation of cells and prevent the lipid damage of cells. Its mechanism may be related to the down-regulation of the expression of ACC/FAS/DGAT2 pathway.

KEYWORDS total flavonoids from *Matricaria recutita*; lipid deposition; lipid-lowering effect

近年来,随着社会的飞速发展和人们物质生活水平不断提高,高脂血症患者不断增加,发病率逐年升高^[1]。游离脂肪酸(non-esterified fatty acids, FFA)、三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)中的一种及以上升高或脂蛋白水平升高即可诊断为高脂血症^[2]。该病可引发如心肌梗死、心脏猝死、糖尿病、高血压、脂肪肝等一系列疾病,是形成冠心病的主要原因之一^[3],因此,对高脂血症的预防与治疗意义重大。洋甘菊是菊科母菊属,又称德国洋甘菊,为菊科植物洋甘菊 *Matricaria chamomilla* L. 的干燥花或全草。洋甘菊具有降低血压、降低胆固醇、发汗通便等功效,其提取物(如黄酮类)具有抗炎、抗氧化、抗肝毒性、抗病毒、保护血管和解痉等作用^[4-5]。本实验采用油酸和棕榈酸联合诱导 HepG2 细胞建立脂质沉积细胞模型,探讨洋甘菊总黄酮对肝脂质异常的调节作用及其降脂机制,以期能为洋甘菊治疗高脂血症的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

STS-2 型脱色摇床购自上海琪特分析仪器有限公司; Benchmark Plus 型全波长酶标仪、Power Pac 型垂直电泳槽、Gel Doc XR+ 型凝胶成像分析系统、AB135-S 型电子分析天平购自美国 Bio-Rad 公司; 5424R 型低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司; SW-XJ-2F 型超净台购自苏州安泰空气技术有限公司; 371 型直热式 CO₂ 恒温培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; IX71-5-12FL/pH 型倒置荧光三目显微镜购自德国 Roper Scientific 公司; DW-HL668 型超低温冰箱购自合肥中科美菱低温科技股份有限公司; TCS SP8 型激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司; RE-52B 型旋转蒸发器购自上海亚荣生化仪器厂。

1.2 主要试剂

TG 试剂盒、FFA 试剂盒、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号分别为 A110-1-1、A042-2-1、C009-2-1、C010-2-2)购自南京建成生物工程研究所; 油红 O 溶液、棕榈酸、油酸(批号分别为 SLBW7964、SLBZ8298、0459K073)购自美国 Sigma 公司; 青霉素+链霉素双抗、4%多聚甲醛组织固定液(批号分别为 Bj111995904、1810473)购自合肥白鲨生物科技有限公司; 乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)、二酰基甘油酰基转移酶 2(diacylglycerol transferase 2, DGAT2)、

β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号分别为 bsm-52486R、bsm-54469R、bs-12998R、bs-0061R、bs-0295G-HRP)购自北京博奥森生物技术有限公司; 牛血清白蛋白(批号 EZ6688B182)购自德国 BioFroxx 公司; 10 \times TBST、D-101 大孔树脂(批号分别为 T1081、1021Q011)购自北京索莱宝科技有限公司; DAPI 染液、Alexa Fluor488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号分别为 C1005、A0423)购自上海碧云天生物技术有限公司; DMEM 培养基(批号 AF29562465)购自美国 HyClone 公司; 胎牛血清、25%胰蛋白酶(批号分别为 70101002、2186974)购自美国 Gibco 公司; 彩色蛋白 Marker(40~300 kDa, 批号 26625)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 彩色蛋白 Marker(10~250 kDa, 批号 3580111)购自北京博泰斯生物技术有限公司; 磷酸盐缓冲液(PBS, 批号 26625)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 亚硝酸钠、氢氧化钠(批号分别为 20200803、20210320)购自天津市盛奥化学试剂有限公司; 硝酸铝(批号 20200305)购自天津市永晟精细化工有限公司。其他试剂均为国产优质分析纯。

1.3 主要药物

洋甘菊药材采自新疆医科大学中医学院药材基地,经新疆医科大学第四附属医院李永和主任中药师鉴定为母菊属一年生草本植物洋甘菊的干燥花。非诺贝特胶囊(规格 0.2 g/粒,批号 20181239)购自美国 Abbott 公司。

1.4 细胞

人肝癌 HepG2 细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 洋甘菊总黄酮的制备

2.1.1 洋甘菊总黄酮的初步提取 取洋甘菊药材 700 g, 用 12 倍体积(8 400 mL)的 70% 乙醇浸泡 2 h, 放入提取锅在 80 $^{\circ}$ C 提取 3 次, 每次 2 h; 合并提取液, 用纱布过滤, 滤液用旋转蒸发器在 80 $^{\circ}$ C 浓缩回收乙醇, 待浓缩液总体积为 700~800 mL, 冷冻干燥, 收集干膏粉。

检测洋甘菊总黄酮提取物中的总黄酮含量。总黄酮含量检测方法^[6]: 取干膏粉 0.029 70 g, 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 超声助溶, 充分溶解; 取 10 mL 置于 25 mL 量瓶中, 依次加入 5% 亚硝酸钠溶液、10% 硝酸铝溶液各 1 mL, 每加 1 种试剂后, 室温放置 6 min; 再加入 4% NaOH 溶液 10 mL, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 在 500 nm 波长处检测吸光度(A)值, 按回归方程 $A=0.011\ 30C+$

0.009 25 计算提取物中的总黄酮含量,其中 C 表示总黄酮含量。

2.1.2 洋甘菊总黄酮的分离纯化 取“2.1.1”项下干膏粉 36.93 g,用 3 000 mL 蒸馏水溶解制成含总黄酮约 0.8 mg/mL 的溶液,用 D-101 大孔树脂(使用前均用 95% 乙醇浸泡 2 h,再以大量蒸馏水洗至无醇味)填好分离柱后上样,上样量为 16 倍柱体积,上样速度为 1.0 mL/min。上样完成后,用大量蒸馏水洗去吸附在大孔树脂柱中的还原糖类成分,洗脱速度为 1.0 mL/min。最后用 70% 乙醇洗脱,收集吸附在大孔树脂上的黄酮类成分,洗脱速度为 0.5 mL/min。蒸馏水洗脱和乙醇洗脱用量均控制在柱体积的 6 倍左右。洗脱液采用旋转蒸发仪在 70 °C 挥干乙醇,冷冻干燥,收集纯化后的干膏粉。

取纯化后的干膏粉 0.028 10 g,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇定容,超声助溶,充分溶解;取 1 mL 置于 25 mL 量瓶中,按照“2.1.1”项下同法检测纯化后的总黄酮含量。

2.2 造模

HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的高糖 DMEM 培养基,在 5% CO₂、37 °C 条件下培养。待细胞处于对数生长期时,以 5×10⁴ 个/mL 接种于 6 孔板,每孔 500 μL。细胞分为对照组和模型组。待细胞贴壁后,对照组给予含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的高糖 DMEM 培养基继续培养,模型组加入终浓度均为 1 mmol/L 的油酸和棕榈酸混合液^[7],培养 24 h 后收集培养液和细胞。根据 AST、ALT、FFA 检测试剂盒说明书上的操作步骤,采用酶标仪检测上清液中的 AST、ALT、FFA 水平。加细胞裂解液裂解细胞后,将细胞刮下来,以 12 000 r/min 于 4 °C 离心细胞裂解液 10 min,取上清液,用 BCA 试剂盒检测细胞中的 TG、FFA 水平。结果显示,与对照组比较,模型组细胞中的 TG、FFA 水平显著升高 ($P < 0.01$);细胞上清液中的 FFA 水平显著升高 ($P < 0.01$),ALT、AST 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这说明造模后细胞内脂质类成分增加,但细胞未受到严重损伤,表明成功诱导 HepG2 细胞建立脂质沉积细胞模型^[8],可进行后续实验。结果见表 1。

表 1 造模对 HepG2 细胞(上清液)中 TG、FFA、AST、ALT 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞		细胞上清液		
	TG/(mmol/g prot)	FFA/(mmol/g prot)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	FFA/(mmol/L)
对照组	0.07±0.01	0.02±0.01	6.27±0.42	7.30±0.20	0.12±0.01
模型组	0.71±0.10 ^a	0.08±0.01 ^a	7.21±0.57	7.63±0.07	0.43±0.01 ^a

a: 与对照组比较, $P < 0.01$

2.3 TG、FFA 水平检测

采用 Benchmark Plus 型全波长酶标仪检测。取对数生长期细胞,以 5×10⁴ 个/mL 接种于 6 孔板,每孔 500 μL。细胞分为对照组、模型组、非诺贝特组(阳性对照,终质量浓度为 3.61 μg/mL)和洋甘菊总黄酮低、中、高剂量组

(终质量浓度分别为 100、150、200 μg/mL)^[7]。待细胞贴壁后,对照组给予含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的高糖 DMEM 培养基继续培养,其余 5 组按照“2.2”项下进行造模,再给予相应剂量药物干预 24 h 后,吸取 6 孔板中的培养液,分别按 FFA 检测试剂盒说明书上的操作步骤检测各组细胞上清液中的 FFA 水平和细胞中的 TG、FFA 水平。

2.4 脂质积累的观察与脂质含量的检测

采用倒置显微镜观察并用 Benchmark Plus 型全波长酶标仪检测。取对数生长期细胞,以 5×10⁴ 个/mL 接种于 6 孔板,每孔 500 μL。细胞按照“2.3”项下方法分组、造模、给药后,吸弃培养液,用 PBS 轻柔漂洗 2 次;加入 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min 左右,再用 PBS 轻柔漂洗 2 次;每孔加入 1.5 mL 的油红 O 染液(去离子水与油红 O 溶液体积比为 3:2)染色 30 min,用 PBS 漂洗 1 次,60% 异丙醇固定;用 PBS 清洗掉多余的油红 O 染液,甘油明胶封片,倒置显微镜下观察并拍照。细胞内脂质类成分可以与油红 O 染液特异性结合呈橘红色,橘红色区域大小可以反映 HepG2 细胞的脂质沉积状况。拍照结束后,吸弃上清液,每孔加入 1 mL 异丙醇,轻柔摇晃 10~15 min 使染料充分溶解,以酶标仪检测在 490 nm 波长处的吸光度(A)值,用以表示脂质含量。

2.5 DGAT2 蛋白表达量的检测

采用 DAPI 染液染色法观察并检测。取对数生长期细胞,以 5×10⁴ 个/mL 接种至共聚焦皿中,每皿 200 L。细胞按照“2.3”项下方法分组、造模、给药后,以 4% 多聚甲醛溶液室温固定 30 min, PBS 冲洗 2 次,每次 3 min;在圈内滴加 3% 牛血清白蛋白溶液 300 μL 均匀覆盖组织,封闭 1 h 后,吸弃封闭液, PBS 冲洗 2 次,每次 3 min;在圈内滴加 DGAT2 一抗(稀释度 1:300),用封口膜封口,湿盒内 4 °C 孵育过夜;次日吸走一抗, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;圈内滴加入 300 μL Alexa Fluor488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(稀释度 1:300),室温下继续避光孵育 2 h, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;在圈内滴加 200 μL DAPI 染液避光染色 10 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;每皿加入 1 mL PBS 冲洗,用 TCS SP8 型激光共聚焦显微镜观察并拍照。DAPI 染液染色后细胞核在紫外光激发下显蓝色荧光, DGAT2 蛋白阳性表达显绿色荧光。每个样本选取 3 个视野,使用 Image J 软件统计 DGAT2 蛋白表达的荧光强度,荧光强度越大表示蛋白表达量越高。

2.6 ACC、FAS、DGAT2 蛋白表达水平的检测

采用 Western blot 法检测。细胞培养至形态正常且贴壁满 70%~80% 时,消化计数后以 5×10⁴ 个/mL 接种至培养瓶中。细胞按照“2.3”项下方法分组、造模、给药后,弃上清液,每瓶加 PBS 2 mL 冲洗 2 次,每次 1 min;每瓶加细胞裂解液 200 μL,冰浴裂解 30 min。将裂解的细

胞刮下来并转移至EP管中,以12 000 r/min于4℃离心10 min;将细胞上清液转移至1.5 mL EP管中;用BCA法检测总蛋白浓度,样品中加入4×蛋白上样缓冲液和双蒸水,使总蛋白浓度调成一致,100℃煮蛋白10 min,再置于-80℃冰箱备用。将蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至PVDF膜,取出PVDF膜置于含5%脱脂奶粉的TBST封闭液中封闭1.5 h,洗涤3次后加入一抗(ACC、FAS稀释度1:700, DGAT2、 β -actin稀释度1:1 000),4℃孵育过夜,收集一抗,洗涤3次;加入二抗(稀释度1:5 000),室温避光孵育1 h,洗涤3次;然后暗室中以ECL发光试剂曝光,压片、显影、定影后用Image Lab软件分析图像,以目标蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

2.7 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件对各组数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 洋甘菊总黄酮的制备结果

初步提取得到的干膏粉中,总黄酮含量为6.72%;纯化后的干膏粉中,总黄酮含量为56.20%。这表明分离纯化后,洋甘菊总黄酮含量明显提高。

3.2 洋甘菊总黄酮对细胞(上清液)中TG、FFA水平的影响

与对照组比较,模型组细胞中的TG、FFA水平和细胞上清液中的FFA水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,非诺贝特组和洋甘菊总黄酮低、中、高剂量组细胞中的TG、FFA水平和细胞上清液中的FFA水平均显著降低($P<0.01$)。结果见图1。

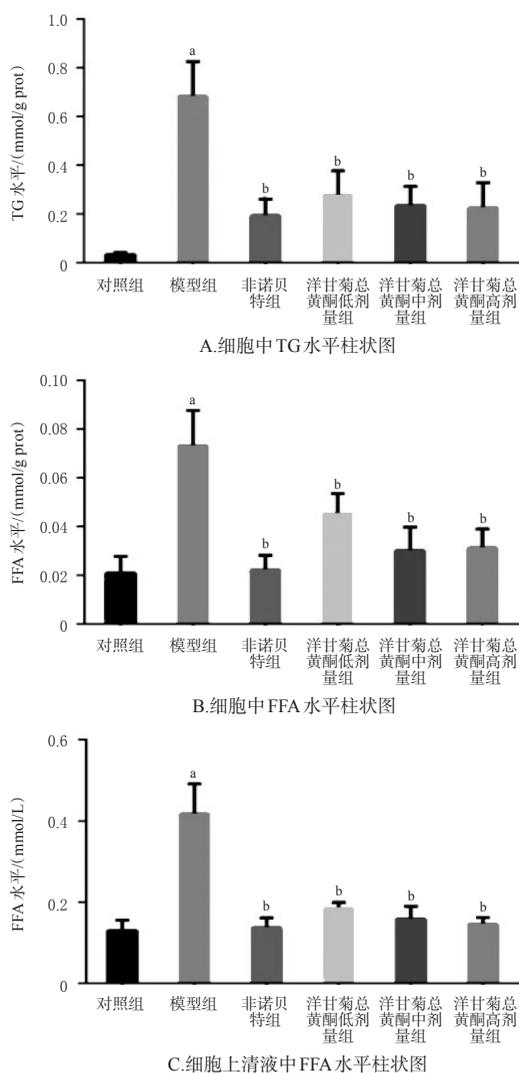
3.3 洋甘菊总黄酮对HepG2细胞脂肪积累的影响

由油红O染液染色结果可见,对照组细胞间结合紧密,基本上无橘红色脂滴;模型组细胞中可见大量橘红色脂滴堆积,表明1 mmol/L油酸和棕榈酸混合液干预24 h能显著增加细胞内脂质沉积;非诺贝特组和洋甘菊总黄酮低、中、高剂量组细胞中脂滴堆积较模型组显著减少。结果见图2。

脂质含量检测结果显示,与对照组细胞脂质A值(0.30 ± 0.11)比较,模型组细胞脂质A值(0.93 ± 0.14)显著升高($P<0.01$);与模型组比较,非诺贝特组和洋甘菊总黄酮低、中、高剂量组细胞脂质A值(0.34 ± 0.09 、 0.54 ± 0.17 、 0.43 ± 0.13 、 0.43 ± 0.06)显著降低($P<0.01$)。以上结果进一步验证了油红O染液的染色实验结果,说明洋甘菊总黄酮可以降低脂质沉积细胞中的脂质含量。

3.4 洋甘菊总黄酮对HepG2细胞中DGAT2蛋白表达量的影响

由DAPI染液染色结果可见,模型组细胞绿色荧光



a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.01$

图1 各组细胞(上清液)中的TG、FFA水平检测结果

明显增强,表明DGAT2蛋白表达量明显上调;非诺贝特组和洋甘菊总黄酮低、中、高剂量组绿色荧光明显减弱, DGAT2蛋白表达量明显下调。结果见图3。

荧光强度检测结果显示,与对照组(23.53 ± 1.88)比较,模型组DGAT2蛋白表达荧光强度(81.40 ± 7.21)显著升高($P<0.01$);与模型组比较,非诺贝特组和洋甘菊总黄酮低、中、高剂量组DGAT2蛋白表达荧光强度(35.85 ± 2.97 、 44.77 ± 1.05 、 35.95 ± 1.42 、 35.72 ± 1.17)显著降低($P<0.01$)。以上结果进一步验证了DAPI染液的染色实验结果,说明洋甘菊总黄酮可以降低脂质沉积细胞中的DGAT2蛋白表达量。

3.5 洋甘菊总黄酮对HepG2细胞中ACC、FAS、DGAT2蛋白表达水平的影响

Western blot法检测结果显示,与对照组相比,模型组ACC、FAS、DGAT2蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,非诺贝特组和洋甘菊总黄酮低、中、高剂量组ACC、FAS、DGAT2蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。结果见图4。

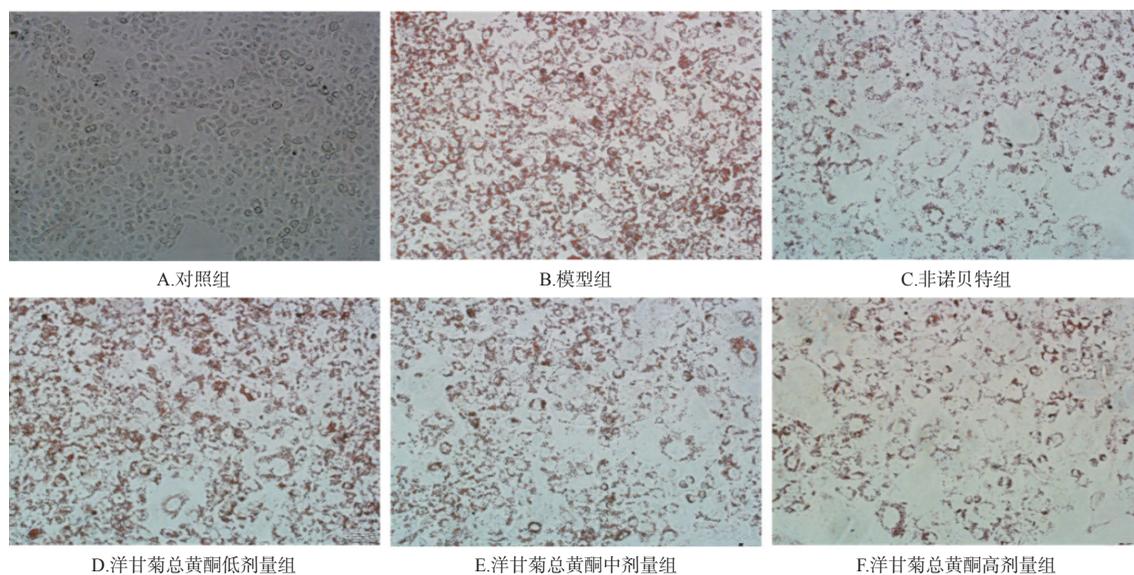


图2 各组细胞油红O染液染色显微图(×200)

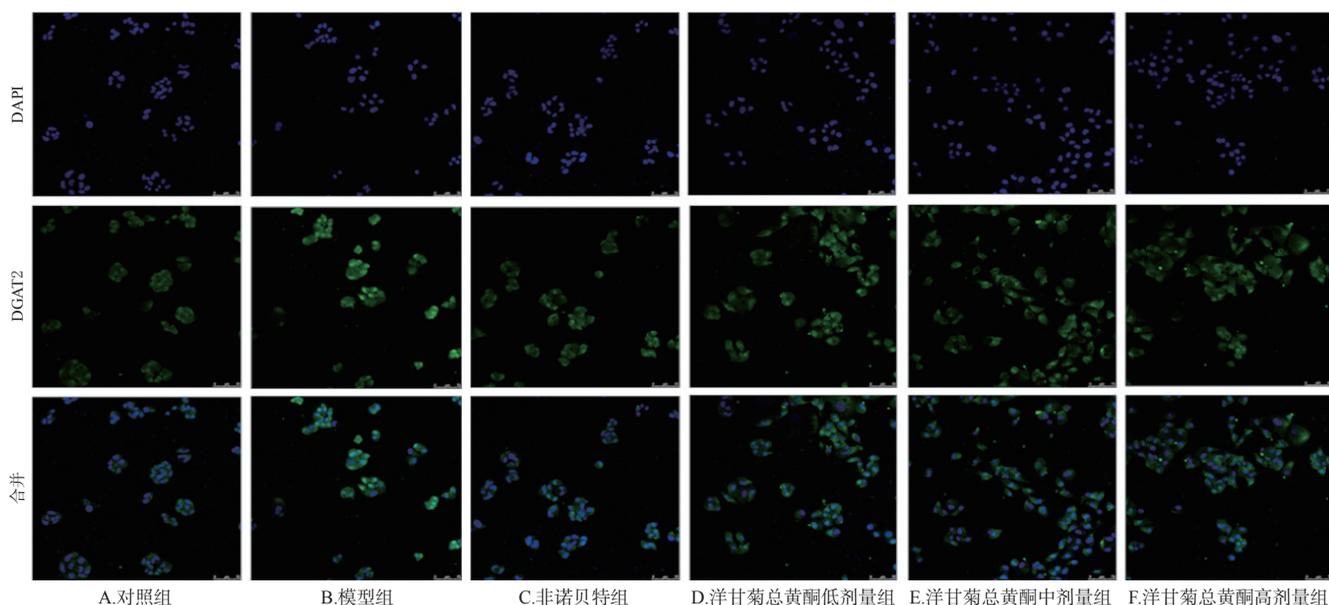
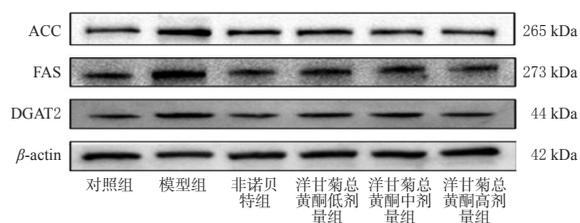
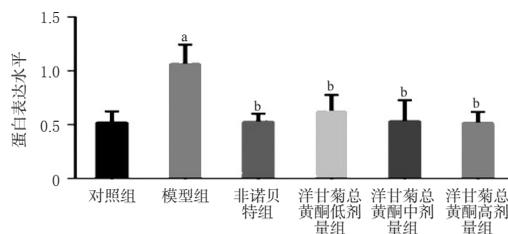


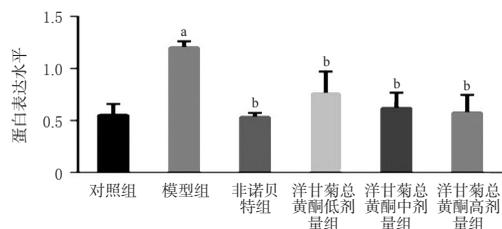
图3 各组细胞中DGAT2蛋白表达的DAPI染液染色显微图(×200)



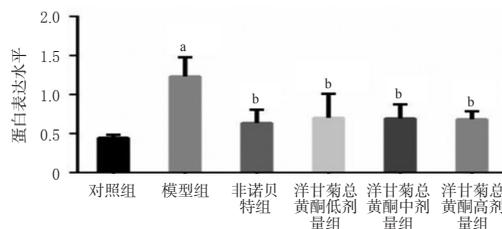
A. Western blot电泳图



B. ACC蛋白表达水平柱状图



C. FAS蛋白表达水平柱状图



D. DGAT2蛋白表达水平柱状图

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$

图4 各组细胞中ACC、FAS、DGAT2蛋白表达水平的检测结果

4 讨论

过量FFA蓄积在肝,超过肝的代谢能力时会对细胞产生脂毒性,并可能诱导脂肪肝的发生。棕榈酸是大部分哺乳动物体内FFA的重要组成部分,参与FFA在体内的脂质生物合成过程;其除对细胞有脂毒性外,与油酸共同作用可诱导肝细胞发生脂肪变性^[9-10]。AST、ALT是细胞非特异性功能酶,AST主要存在于肝细胞线粒体,ALT存在于肝细胞的细胞质,两者可以较准确地反映肝脏病理损伤程度,已成为公认的最灵敏的肝细胞损伤指标^[11-12]。本实验以HepG2细胞为研究对象,分别用1 mmol/L油酸和棕榈酸混合液联合诱导HepG2细胞,结果显示,与对照组比较,模型组细胞中的TG、FFA水平和上清液中的FFA水平显著升高,而细胞上清液中的ALT、AST水平差异无统计学意义,说明模型组细胞未发生严重的脂质损伤,符合脂质沉积细胞模型建立要求^[9],造模成功。

洋甘菊是常用中药材,洋甘菊总黄酮提取物主要成分有槲皮素、木犀草素及其衍生物等^[13]。研究发现,槲皮素是一种潜在的生物类黄酮,具有抗癌、抗氧化、抗炎、抗衰老、神经保护等药理活性,对肥胖症、癌症、糖尿病具有明显的治疗作用^[14],对大鼠脂质代谢紊乱、肝功能损伤及神经精神行为障碍有改善作用^[15]。槲皮素可以显著降低血清TG、TC、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和组织中TG、TC水平,显著升高血清高密度脂蛋白水平^[16]。木犀草素及其衍生物可以改善糖和脂代谢紊乱^[17]。本课题组前期研究显示,洋甘菊70%醇提物可以显著改善实验性高脂血症大鼠的血脂水平,具有明显的降脂保肝作用,且有效降脂成分主要为总黄酮^[18]。洋甘菊70%醇提物中总黄酮含量较低(只有5%左右),若用大孔树脂进行分离纯化后可提高提取物中总黄酮含量(达50%左右)。因此,为提高洋甘菊总黄酮的降脂功效,本研究先对提取物进行分离纯化,得到较高含量的洋甘菊总黄酮(56.20%),再进一步研究洋甘菊总黄酮的降脂机制。非诺贝特是过氧化物酶增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α)激活剂,而PPAR α 在肝脏组织中高表达,可以调控脂质合成关键基因DGAT2的表达^[19-20],所以本研究选择非诺贝特为阳性对照药来观察洋甘菊总黄酮的降脂作用机制。

本研究建立HepG2细胞的脂质沉积细胞模型后,给予洋甘菊总黄酮100、150、200 $\mu\text{g/mL}$ 干预24 h。结果显示,与模型组比较,洋甘菊总黄酮低、中、高剂量组细胞中的TG、FFA水平和细胞上清液中的FFA水平均显著降低,脂滴堆积得到明显改善,脂质含量显著降低。这

说明洋甘菊总黄酮可以有效改善HepG2细胞的脂质沉积情况。

参与脂肪及TG生物合成的酶很多,其中FAS催化脂肪合成的全过程;ACC是一种生物素依赖酶,催化长链脂肪酸合成过程;DGAT2是参与二酰甘油/TG生物合成的关键限速酶,可促进DGAT2表达、增加TG合成、导致脂质累积^[21-22]。以上酶在肝细胞脂肪酸合成及TG生物合成中起着至关重要的作用。研究发现,消痰化痰类中药通过调控固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein 1c, SREBP-1c)、FAS和ACC基因的过度表达,抑制脂质合成,促进脂肪酸氧化,从而减少肝脏脂质沉积^[23];胰岛素类似物Exendin-4可通过下调SREBP-1c、FAS和ACC基因的表达而降低由胰岛素引起的HepG2细胞中TG水平的升高程度^[24],减轻脂肪变性程度。杨玲等^[25]研究发现,棕榈酸可引起BRL 3A细胞氧化应激,并通过提高SREBP表达及核转位效率,上调ACC、FAS、DGAT1、DGAT2的mRNA及蛋白表达水平,促进TG合成,诱导脂肪变性。本研究结果表明,洋甘菊总黄酮能够下调脂肪酸诱导HepG2细胞中TG合成相关蛋白ACC、FAS、DGAT2的表达。

综上所述,洋甘菊总黄酮可以抑制脂质沉积模型HepG2细胞的TG合成,减少细胞脂质积累,防止细胞脂质损伤,其机制可能与下调ACC/FAS/DGAT2通路表达有关。

参考文献

- [1] XU Y H, NIU Y F, GAO Y, et al. Borapetoside E, a clerodane diterpenoid extracted from *Tinospora crispa*, improves hyperglycemia and hyperlipidemia in high-fat-diet-induced type 2 diabetes mice[J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(8):2319-2327.
- [2] 张冬磊,杨宁,郝建宇.对高脂血症性及胆源性急性胰腺炎患者C-反应蛋白和D-二聚体水平变化的观察[J].*重庆医学*, 2017, 46(1):60-63.
- [3] 胡书云,韩冰,王金玲.中药汤剂在治疗高脂血症中的应用效果评估[J].*四川中医*, 2019, 37(6):219-221.
- [4] SOLTANI M, MOGHIMIAN M, ABTAHI-EIVARI S H, et al. Protective effects of *Matricaria chamomilla* extract on torsion/detorsion-induced tissue damage and oxidative stress in adult rat testis[J]. *Int J Fertil Steril*, 2018, 12(3):242-248.
- [5] HEMMATI A A, JALALI A, KESHAVARZ P. Effect of chamomile hydroalcoholic extract on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat[J]. *Tanaffos*, 2018, 17(4):264-271.
- [6] 兰卫,郭玉婷,胡江兰,等.大孔树脂分离纯化维药洋甘菊中黄酮工艺研究[J].*时珍国医国药*, 2017, 28(3):575-578.

- [7] 阿曼古丽·艾则孜,王莹,兰卫.洋甘菊总黄酮对肝脏脂肪变性的改善作用[J/OL].中药药理与临床,2022;1-16[2022-04-28]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=ZYYL-20220418000&uniplatform=NZKPT&v=g3PdBwCvGt-DA_21ThZItjcNPINyrAeSJBiVpbwDEBWNPiinzQHcN-94tnQu1TvKaR.DOI: 10.13412/j.cnki.zyy1.20220418.001.
- [8] 刘晶晶.化痰祛痰方对FFA诱导HepG2细胞脂质沉积的影响及机制研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2018.
- [9] 沈敏燕,胡曦,朱静,等.黄连碱促进肝细胞自噬及胆固醇外流改善脂肪肝的脂质蓄积[J].蚌埠医学院学报,2021,46(4):421-424,430.
- [10] 刘晶晶,贾连群,杨关林,等.化痰祛痰方对油酸和棕榈酸诱导HepG2细胞脂质损伤及自噬的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(10):4381-4385.
- [11] 王熙瑶,刘宁,文凤,等.不同肝病基础乙肝相关原发性肝细胞癌AST/ALT和AFP的表达水平差异及临床应用评价[J].胃肠病学和肝病学杂志,2021,30(11):1234-1239.
- [12] 王丽艳,孔凡刚.肝病患者血清中AST/ALT比值的临床意义研究[J/OL].中西医结合心血管病电子杂志,2020,8(30):97-98[2022-04-28]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFDLAST2020&filename=ZXJH202030074&uniplatform=NZKPT&v=8iJPaWjfvpk3x22HTNOcpvuORWRz0ODyCq11fZfG7-XQUvHbDJTzXg0TzMqt8-nzy>. DOI: 10.16282/j.cnki.cn11-9336/r.2020.30.074.
- [13] 万文婷,宋颜君,许利嘉,等.母菊的研究综述与应用前景分析[J].中国现代中药,2019,21(2):260-265.
- [14] ZOU H Y, YE H Q, KAMARAJ R, et al. A review on pharmacological activities and synergistic effect of quercetin with small molecule agents[J]. Phytomedicine, 2021, 92: 153736.
- [15] FRANCO E P D, CONTESINI F J, LIMA DA SILVA B, et al. Enzyme-assisted modification of flavonoids from *Matricaria chamomilla*: antioxidant activity and inhibitory effect on digestive enzymes[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2020, 35(1): 42-49.
- [16] KAMOHARA T, KOSHIGUCHI M, MAEDA-YAMAMOTO M, et al. The combination of 'benifuuki' with quercetin suppresses hepatic fat accumulation in high-fat high-cholesterol diet-fed rats[J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2019, 65(2): 196-201.
- [17] EBRAHIMI Y, HASANVAND A, VALIBEIK A, et al. Natural antioxidants and medicinal plants effective on hyperlipidemia[J]. Res J Pharm Technol, 2019, 12(3): 1457.
- [18] 兰卫,王莹,郝宇薇,等.德国洋甘菊对实验性高血脂症大鼠的降脂作用[J].新疆医科大学学报,2018,41(2): 208-210,215.
- [19] 兰卫.洋甘菊总黄酮对高脂血症模型小鼠脂质代谢的影响及机制[J].中国药房,2021,32(22):2706-2712.
- [20] 赵喜.蛇床子素经PPAR α / γ 信号通路治疗大鼠高脂性脂肪性肝炎的研究[D].苏州:苏州大学,2016.
- [21] MCFIE P J, BANMAN S L, STONE S J. Diacylglycerol acyltransferase-2 contains a C-terminal sequence that interacts with lipid droplets[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2018, 1863(9): 1068-1081.
- [22] 田思聪,雷鹏,孙瑶,等.莱菔硫烷下调DGAT2和ACAT1表达抑制肝脂肪变的研究[J].第三军医大学学报,2019,41(12):1102-1109.
- [23] 鲍新民,郭建利,刘晨旭,等.消痰化痰中药对NAFLD大鼠SREBP 1c/FAS/ACC mRNA表达的影响[J].中国中医药现代远程教育,2019,17(15):91-94.
- [24] 苏寒,张美家,王怀杰,等. Exendin-4对胰岛素抵抗人肝癌HepG2细胞脂代谢相关因子基因表达的影响[J].吉林大学学报(医学版),2018,44(1):36-40,206.
- [25] 杨玲,杨汶菱,张绘艳,等.棕榈酸通过上调ACC/FAS/DGAT2通路表达诱导BRL 3A细胞脂肪变性[J].畜牧兽医学报,2019,50(12):2537-2544.

(收稿日期:2021-10-08 修回日期:2022-03-28)

(编辑:舒安琴)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅