

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.03.005

# 小黑药亲电成分干预混合游离脂肪酸诱导的人肝癌细胞株 HepG2 脂肪变性研究

Study on intervention effects of electrophilic components from *Xiaoheiyao* against free fatty acid-induced steatosis in HepG2 cells

董文乐 蒋羽鹤 夏淑芳

DONG Wen-le JIANG Yu-ge XIA Shu-fang

曹丛丛 赵蔚 成向荣

CAO Cong-cong ZHAO Wei CHENG Xiang-rong

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**摘要:**采用 GSH 功能化磁珠靶向敲出小黑药亲电成分并用 LC-MS 表征, 基于游离脂肪酸 (FFA) 诱导的 HepG2 细胞脂肪变性模型, 评价小黑药亲电成分降低肝细胞脂质累积和氧化应激的作用和机制。结果表明: 小黑药亲电成分主要集中在乙酸乙酯部位; 在 0.5~2.0 mg/mL 浓度下, 小黑药石油醚部位、乙酸乙酯部位、水部位均具有降低脂肪变性细胞脂质累积和 ROS 生成的活性, 其中乙酸乙酯部位在各浓度下效果最好; 乙酸乙酯部位在各浓度下具有降低细胞内 TG、TC 水平和提高细胞内抗氧化酶活性的作用; 经过 GSH 功能化磁珠靶向敲出亲电化合物后, 乙酸乙酯部位在 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下对细胞内 TG 水平的降低和细胞内抗氧化酶水平的提高效果显著减弱。乙酸乙酯部位萃取物上调 *Nrf2* 及下游 *NQO1*、*HO-1*、*GCLC* 基因, 下调脂质合成基因 *SREBP1c*、*ACCI*、*FAS* 的表达, 促进脂质分解基因 *PPAR $\alpha$* 、*CPT1A* 的表达; 而靶向敲出亲电成分后, 乙酸乙酯部位萃取物调控脂代谢和抗氧化相关基因的作用明显下降。LC-MS 表征亲电成分敲出前后乙酸乙酯部位样品, 发现了 7 个变化的主要质谱峰, 推测其为主要的亲电化合物。小黑药中亲电化合物可以改善脂肪酸诱导的脂肪变性, 其机制主要与抗氧化和脂代谢相关基因的调节有关。

**关键词:** 小黑药; 亲电成分; 人肝癌细胞株 HepG2; 游离脂

肪酸; 脂质累积; 氧化应激

**Abstract:** The electrophilic components in *Xiaoheiyao* were knocked out by GSH functionalized magnetic nanoparticles (GSH-MNPs) and characterized by LC-MS analysis, and the effect and mechanism of the electrophilic components in *Xiaoheiyao* for reducing lipid accumulation and oxidative stress in hepatocytes were evaluated, based on free fatty acid (FFA)-induced HepG2 cells. The ethyl acetate fraction was determined as the most electrophilic components-enriched part of *Xiaoheiyao*. At the concentration of 0.5~2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the petroleum ether, ethyl acetate and water fractions of *Xiaoheiyao* exhibited the activities of decreasing hepatic lipid accumulation and ROS production, in which the ethyl acetate fraction showed the best activities. The ethyl acetate fraction of *Xiaoheiyao* decreased the intracellular levels of TG and TC while increased the activities of the antioxidant enzymes. After electrophilic components in ethyl acetate fraction were knocked out by GSH-MNPs, the activities for the decreasing TG and TC levels and increasing the activities of antioxidant enzymes were significantly compromised. After treated with ethyl acetate fraction, the expression of *Nrf2* and its downstream genes *NQO1*, *HO-1* and *GCLC* were upregulated. Moreover, the expression of genes for lipid synthesis, including *SREBP1c*, *ACCI*, and *FAS*, were found downregulated, while the expression genes *PPAR $\alpha$*  and *CPT1A*, involved in lipidolysis, were upregulated. After the electrophilic components were knocked out, the effects of the ethyl acetate fraction on regulating lipid metabolism and redox-related genes were significantly reduced. Seven mass features were found by LC-MS and concluded as electrophilic components when comparing the ethyl acetate fractions before and after treated with GSH-MNPs. The mechanism of electrophilic components in

**基金项目:** 国家自然科学基金 (编号: 31700301)

**作者简介:** 董文乐, 男, 江南大学在读硕士研究生。

**通信作者:** 成向荣 (1985—), 男, 江南大学副教授, 博士。

E-mail: cheng-xiangrong@hotmail.com

**收稿日期:** 2019-11-22

Xiaoheiyao improving the hepatic steatosis induced by FFA was associated with the regulation of the genes related to lipid metabolism and redox.

**Keywords:** Xiaoheiyao; electrophilic component; human hepatoma cell line HepG2; free fatty acid; lipid accumulation; oxidative stress

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以肝脏脂质过量累积与细胞脂肪变性为主要特征的代表性疾病<sup>[1]</sup>。目前对于该病的内在机制尚未,普遍接受的发病机制是 Day 等<sup>[2]</sup>提出的“二次打击”学说,该学说涉及了影响非酒精性脂肪肝发展的多种因素,其中细胞内活性氧过多引起的氧化应激是该病发生发展的一个重要因素。氧化应激可损伤线粒体内脂肪酸 $\beta$ 氧化相关酶,影响 $\beta$ 氧化进程,从而导致脂质过量累积,诱导 NAFLD 的发生<sup>[3-4]</sup>。

当机体内生成过多活性氧时,体内抗氧化系统清除自由基的能力下降,需要补充外源性抗氧化剂。外源抗氧化剂基于性质及作用机制分为直接抗氧化剂和间接抗氧化剂,间接抗氧化剂可通过上调各种细胞保护蛋白的表达起到抗氧化作用,具有不易降解、半衰期长以及不易促氧化的特点<sup>[5]</sup>。膳食源亲电化合物是一类广泛存在于日常膳食中,普遍具有 $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和羰基或环张力的间接抗氧化剂<sup>[6]</sup>,其可通过烷基化修饰 Nrf2-Keap1 信号通路中 Keap1 的半胱氨酸残基使 Nrf2 摆脱 Keap1 的结合,释放入核,促进下游抗氧化物质的表达<sup>[7]</sup>。研究已证实,生姜中的花姜酮<sup>[8]</sup>和胡萝卜中的呋醇类化合物<sup>[9]</sup>可以修饰 Keap1 的半胱氨酸残基激活 Nrf2-Keap1 信号通路,促进下游细胞保护性蛋白和抗氧化酶的表达,进而调控细胞氧化还原稳态。氧化应激在非酒精性脂肪肝发生、发展中扮演了重要角色,笔者推测膳食源亲电化合物是一类潜在的非酒精性脂肪肝干预因子。

小黑药是菊科旋覆花属植物显脉旋覆花(*Inula nervosa* Wall.)的根茎<sup>[10]</sup>,于 2010 年被批准为新食品原料。小黑药具有抗氧化<sup>[11]</sup>、抑菌<sup>[12]</sup>等作用,还能通经络,祛风除湿,健胃消食,祛痰止咳<sup>[13]</sup>,目前尚无其他功效的报道,小黑药干预肝细胞脂肪变性的作用尚未明确。严岚<sup>[14]21-61</sup>的研究结果表明显脉旋覆花地上部分含有苯丙素类、二萜类、百里香酚类成分;贺安娜等<sup>[11]</sup>的研究结果表明显脉旋覆花地下部分中多酚类和黄酮类成分的含量分别为 1.3%~2.3%,0.018%~0.028%;张虹等<sup>[15]</sup>的研究结果表明显脉旋覆花根中黄酮类成分的含量为 1.0%~2.3%。此外,同属近缘的旋覆花植物具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤活性的亲电性倍半萜内酯类成分<sup>[16]</sup>,但目前关于小黑药的化学成分,特别是亲电化合物的研究较少,小黑药干预肝细胞脂肪变性的作用尚未明确。

研究拟根据亲电天然产物易与富电子的巯基发生亲

电加成的特点,设计巯基功能化磁珠对小黑药醇提取物、各极性部位中的亲电成分进行靶向敲出,并基于游离脂肪酸(FFA)诱导的 HepG2 细胞评价小黑药亲电成分对肝细胞脂肪变性的干预作用,以期小黑药功能产品的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

人肝癌细胞株 HepG2:中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;

小黑药:2018 年 9 月采自云南昆明梁王山;

DMEM 高糖培养基、PBS 缓冲液:美国 Hyclone 公司;

胎牛血清、胰酶和双抗:美国 Gibco 公司;

活性氧检测试剂盒、RIPA 裂解液(弱)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒:上海碧云天生物科技有限公司;

甘油三酯测定试剂盒、总胆固醇检测试剂盒、总抗氧化能力检测试剂盒、总超氧化物歧化酶检测试剂盒、过氧化氢酶测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶测定试剂盒、总谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽测定试剂盒:南京建成生物工程研究所;

RNA easy Isolation Reagent:南京诺唯赞生物科技有限公司;

MonScript<sup>TM</sup> RTIII All in One Mix 逆转录试剂盒、MonAmp<sup>TM</sup> Fast SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Mix (None ROX) 实时荧光定量聚合酶链式反应试剂盒:中国莫纳生物科技有限公司;

油酸钠:北京迈瑞达科技有限公司;

棕榈酸钠:上海麦克林生化科技有限公司;

尼罗红:北京索莱宝科技有限公司;

无脂肪酸的牛血清白蛋白:上海翊圣生物科技有限公司;

羧基磁性琼脂糖微球:上海英芮诚生化科技有限公司;

其他化学药品和试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

细胞培养箱:Thermo BB15 型,美国 Thermo 公司;

酶标仪:BioTek Synergyh1 型,美国 biotek 公司;

高效液相色谱仪:LC20A 型,岛津(上海)商贸有限公司;

质谱仪:MALDI SYNAPT MS 型,美国沃特世公司;

荧光分光光度计:F98 型,中国上海棱光技术有限公司;

实时荧光定量 PCR 系统:Monad Selected q225 型,中国莫纳生物科技有限公司;

旋转蒸发器:R-501 型,上海申顺生物科技有限公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 小黑药提取与萃取 根据文献[11,17]稍作改动,具体如下:将小黑药粉碎成粉末,与 95%乙醇按 1:20 (g/mL)混合,45 °C 超声辅助提取 30 min。过滤后收集上层清液,重复 4 次,取上层清液用旋转蒸发器减压浓缩蒸干得小黑药醇提物浸膏。浸膏分散在蒸馏水中,按体积比 1:2 依次加入石油醚、乙酸乙酯萃取 3 次,分别获得石油醚部位、乙酸乙酯部位和水部位,旋转蒸发器减压浓缩至干。

### 1.2.2 GSH 功能化磁珠的制备

(1) 取适量羧基磁性琼脂糖微球(体积分数为 10%)于离心管中,磁性分离去除上清液;分别加入去离子水、0.1 mol/LMES 缓冲液后混匀洗涤,磁性分离去除上清液,加入适量 MES 缓冲液混合重悬磁珠;加入 20 mg/mL 偶联试剂 EDC·HCl 溶液,室温振荡 30 min;加入 1 mg/mL 的 MES 缓冲液溶解的 GSSG 溶液,室温振荡混合 12~16 h,磁性分离去除上清液;反应结束后以 20 mmol/L pH 7.4 PBS 洗涤 4 次,以 10 mg/mL 的浓度储存于 4 °C,即为 GSSG 功能化磁珠。

(2) 取适量 10 mg/mL GSSG 功能化磁珠加入等体积 4 mg/mL PBS 缓冲液溶解的三(2-羧乙基)膦(TCEP)溶液进行反应;磁性分离去除上清液后将磁珠用 PBS 缓冲液洗涤 3~5 次;洗涤后的磁珠分散于 1 mL PBS 缓冲液中,即为 GSH 功能化磁珠(GSH-MNPs)。

1.2.3 小黑药亲电成分的定量表征 配制梯度浓度为 0.1,0.2,0.4,0.8,1.6 mg/mL 甲萘醌甲醇溶液,各取 5.0 mL 加入到 95.0 mL GSH 功能化磁珠溶液中,室温下振荡孵育 30 min 后,磁性分离,弃去上清液,剩余磁珠快速分散于适量 PBS 缓冲液中,清洗 3~5 次后,加入 100.0 mL 25.0 mg/mL 的 FITC 溶液继续孵育 10 min 后,在激发波长 469 nm,发射波长 523 nm,增益 12 档条件下,用荧光分光光度计测定上清液荧光值。根据甲萘醌浓度与上清液荧光值,绘制标准曲线。在相同条件下,以 10 mg/mL 的各极性萃取物的甲醇溶液作为待测样品,检测 GSH 功能化磁珠与各极性萃取物的甲醇溶液后 FITC 探针的荧光值,以表征各部位中亲电成分的含量。

1.2.4 小黑药亲电成分的靶向敲出 取 GSH 功能化磁珠 190 mL 与 10 mL,20 mg/mL 的各极性部位萃取物溶液,室温下反应 30 min,获得亲电成分敲出后的小黑药石油醚部位(PE-H)、乙酸乙酯部位(AE-H)、水部位(W-H)样品。另取 190  $\mu$ L PBS 与 10  $\mu$ L,20 mg/mL 的各极性部位萃取物溶液,相同条件下反应,得到未被 GSH 功能化磁珠孵育后的上清液,得到石油醚(PE-Q)、乙酸乙酯部位(AE-Q)、水部位(W-Q)的对照样品。

1.2.5 小黑药 AE 和 AEH 的 LC-MS 分析 对 GSH 功

能化磁珠处理前后的乙酸乙酯部位样品 AE 和 AEH 离心浓缩至干,配制成 1.0 mg/mL 的甲醇溶液,过 0.22 mm 滤膜后待 LC-MS 分析。

(1) 液相条件:色谱柱为 BEH C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm  $\times$  100 mm,1.7 mm);柱温 45 °C;进样量 10 mL;流动相:A 为 100%乙腈,B 为 0.1%甲酸水溶液;体积流速 0.3 mL/min;检测波长 200~600 nm。洗脱条件为:0~20 min,5%~100%乙腈;20~25 min,100%乙腈;25~30 min,5%乙腈。

(2) 质谱条件:离子源为电喷雾离子源(ESI),扫描方式采用正、负离子模式。脱溶剂气流速 700 L/h;脱溶剂气温度 400 °C;毛细管电压 3 000 V;锥孔电压 30 V;锥孔气流速 50 L/h;离子源温度 100 °C。

1.2.6 脂肪变性细胞模型的建立 根据文献[18-19]的方法稍作改动,具体如下:称取一定量的油酸钠和棕榈酸钠(摩尔比为 2:1),75 °C 水浴直至完全溶解,配成一定浓度的游离脂肪酸(FFA)溶液,用含无脂肪酸的牛血清白蛋白(d-BSA)的 PBS 溶液稀释,0.22 mm 无菌滤膜过滤待用。FFA 终浓度为 1.2 mmol/L,d-BSA 终浓度为 1%,细胞共孵育 24 h 后,建立脂肪变性细胞模型。

### 1.2.7 细胞给药分组

(1) 对照组:含终浓度为 1% d-BSA 的 DMEM 培养基培养。

(2) 模型组:含终浓度为 1% d-BSA + 终浓度为 1.2 mmol/L FFA 的 DMEM 培养基培养。

(3) 各极性部位萃取物组:含终浓度为 1% d-BSA + 终浓度为 1.2 mmol/L FFA + 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL PE-Q,AE-Q,W-Q 的 DMEM 培养基培养。

(4) 亲电成分敲出后各极性部位萃取物组:含终浓度为 1% d-BSA + 终浓度为 1.2 mmol/L FFA + 0.5,1.0, 2.0 mg/mL 的 PE-H,AE-H,W-H 的 DMEM 培养基培养。

1.2.8 细胞内脂滴累积水平测定 根据文献[19]的方法稍作改动,具体如下:尼罗红粉末溶于 DMSO 溶液中,配成 1.0 mg/mL 浓度下的尼罗红染料溶液。取经不同给药处理的 96 孔板,弃原培养基,PBS 清洗 1 次,加入尼罗红染料溶液,于 37 °C 培养箱中染色 15 min,弃去尼罗红染料,PBS 清洗 2 次,在激发波长 488 nm,发射波长 550 nm 的条件下,用酶标仪测定荧光值,计算细胞内相对脂滴含量。

1.2.9 细胞内 ROS 含量检测 取经不同给药处理的 96 孔板,弃去培养基,PBS 洗两遍,加入 DCFH-DA 荧光探针,于 37 °C 培养箱中孵育 20 min,PBS 清洗 3 次以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA 探针,在激发波长 488 nm,发射波长 525 nm 的条件下,用酶标仪检测荧光强度。

1.2.10 细胞内脂代谢、氧化应激指标的测定 将细胞接种于 6 孔板中,分组给药孵育 24 h 后,每孔加入适量裂解液裂解细胞,按试剂盒说明书测定细胞裂解液中甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、丙二醛(MDA)、还原型/氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)、总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px),细胞内总蛋白含量按试剂盒说明书测定。

### 1.2.11 实时荧光定量 PCR 测定相关基因表达

(1) RNA 提取:将对数期的细胞消化后接种于 6 孔板中,分组给药孵育 24 h 后,按试剂盒说明书进行细胞样本处理、样本中 RNA 的提取和产物检测。

(2) RNA 反转录成 cDNA:按试剂盒说明书进行操作。

(3) 实时荧光定量 PCR 分析:按试剂盒说明书进行操作,内参基因  $\beta$ -actin 及目标基因引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列  
Table 1 Primers of PCR

基因	引物序列(5'—3')
$\beta$ -actin	正向:GTTGTCGACGACGAGCG
	反向:GCACAGAGCCTCGCCTT
<i>Nrf2</i>	正向:TCCAGTCAGAAACCAGTGGAT
	反向:GAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
<i>NQO1</i>	正向:GTGGTGGAGTCGGACCTCTATG
	反向:AAGCCAGAACAGACTCGGCAG
<i>HO-1</i>	正向:GAGTGTAAGGACCCATCGGA
	反向:GCCAGCAACAAAGTGAAG
<i>GCLC</i>	正向:AGGGAGTTTATCGCAAACCA
	反向:AAGTAACTCTGGCATTACACA
<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	正向:ACGATTCGACTCAAGCTGGT
	反向:GTTGTGTGACATCCCGACAG
<i>CPT1A</i>	正向:ATCAATCGGACTCTGGAACGG
	反向:TCAGGGAGTAGCGCATGGT
<i>ACCI</i>	正向:GGATGGTGTCTACTCGGTAATAGA
	反向:GGGTGATATGTGCTGCGTCAT
<i>FAS</i>	正向:TTCCGAGATTCCATCCTACG
	反向:AGGCTCACAACGAATGGAC
<i>SREBP1c</i>	正向:CACTGGTTCGTAGATGCGGAGAA
	反向:TCATTGATGGAGGAGCGGTAGC

1.2.12 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,结果以(平均数±标准差)表示,所有试验均重复 3 次,组间比较采用单因素方差分析和 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于 GSH 功能化磁珠定量表征小黑药亲电成分

为探究小黑药亲电成分对肝细胞脂肪变性的干预作

用,首先对小黑药中的亲电成分含量进行表征。前期张潇雨等<sup>[20]</sup>报道了以游离 GSH 为探针、甲萘醌为对照物的天然提取物中亲电成分的定量方法,其检测原理为亲电性荧光探针 FITC 可以与反应体系内亲电成分竞争游离 GSH,通过测定未结合 FITC 的荧光强度表征亲电成分含量。试验以亲和磁珠固定化的 GSH 代替游离 GSH,建立天然提取物中亲电成分的定量方法。试验结果如图 1 所示,在 0.3~1.2 mg/mL 的浓度范围内,随着甲萘醌浓度的增加,上清液的荧光值逐渐增加,荧光值与甲萘醌浓度呈现良好的线性关系( $R^2=0.9791$ ),表明该方法可用于亲电成分含量的测定。

小黑药醇提物及其各极性部位萃取物经 GSH 亲和磁珠孵育后上清液的荧光值如图 1 所示。结果显示,样品上清液的荧光值均高于空白样品,各样品荧光值顺序为乙酸乙酯部位>石油醚部位>小黑药醇提物>水部位。表明小黑药醇提物及其各极性部位萃取物均含有亲电成分,小黑药亲电成分主要集中于乙酸乙酯部位。

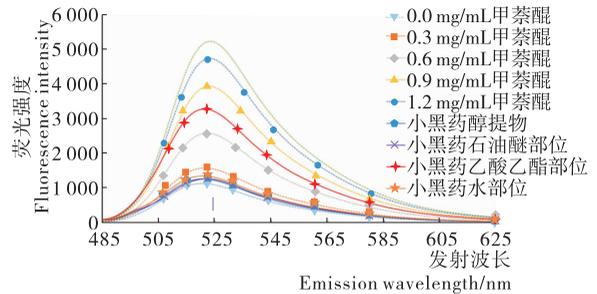
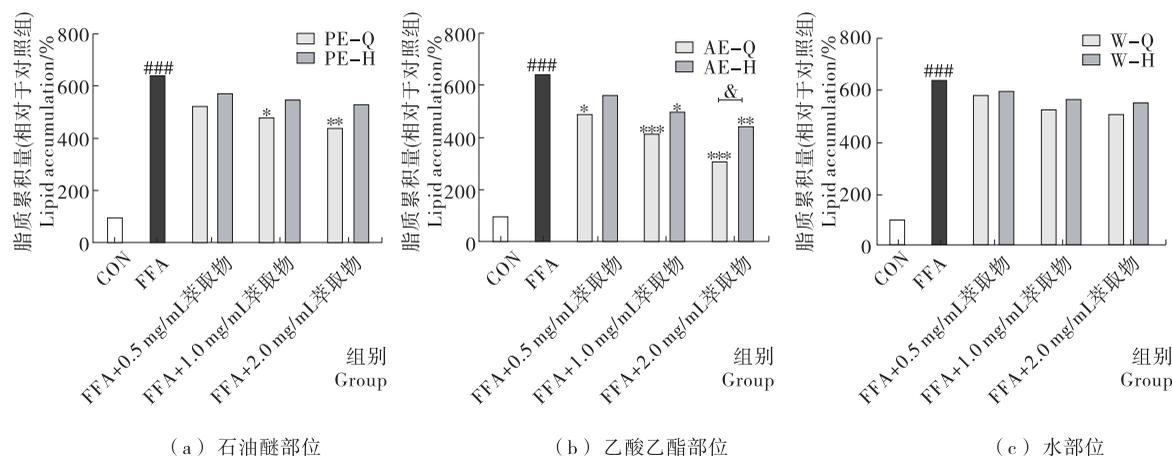


图 1 不同浓度甲萘醌、小黑药提取物与各极性部位萃取物的荧光值

Figure 1 Fluorescence intensity of different concentrations of menadione, extract and fractions of *Xiaoheiyao*

### 2.2 小黑药亲电成分对脂肪变性细胞内脂质累积与 ROS 生成的影响

基于 FFA 诱导的 HepG2 细胞模型分别评价了小黑药各极性萃取物经 GSH 功能化磁珠靶向敲出亲电成分前后的活性变化,结果如图 2、3 所示。模型组与对照组相比,细胞内脂质累积量和 ROS 生成量显著增加( $P<0.05$ ),表明给予 1.2 mmol/L 的 FFA 成功诱导了 HepG2 细胞脂肪变性,结果与文献<sup>[19-20]</sup>报道一致。与模型组相比,不同浓度的小黑药各极性萃取物可以浓度依赖性的降低细胞内脂质累积量和 ROS 生成量,其中以 AE 组效果最好。给予 2.0 mg/mL AE,细胞内脂质累积量由模型组的(640.8±41.4)%显著降低至(316.1±37.1)%( $P<0.05$ ),ROS 生成量由模型组的(136.6±6.2)%显著降低至(100.3±5.0)%( $P<0.05$ )。而各极性萃取物中亲电成分被靶向敲出后,各萃取物的降脂活性和抗氧化活



(a) 石油醚部位 (b) 乙酸乙酯部位 (c) 水部位

与对照组相比,###表示 $P<0.001$ ;与模型组相比,\*表示 $P<0.05$ ,\*\*表示 $P<0.01$ ,\*\*\*表示 $P<0.001$ ;磁珠孵育前后相比,&表示 $P<0.05$

图 2 小黑药各极性部位萃取物亲电成分对 FFA 诱导 HepG2 细胞脂质累积的影响

Figure 2 Effect of electrophilic components from fractions of *Xiaoheiyao* on lipid accumulation in FFA-induced HepG2 cells

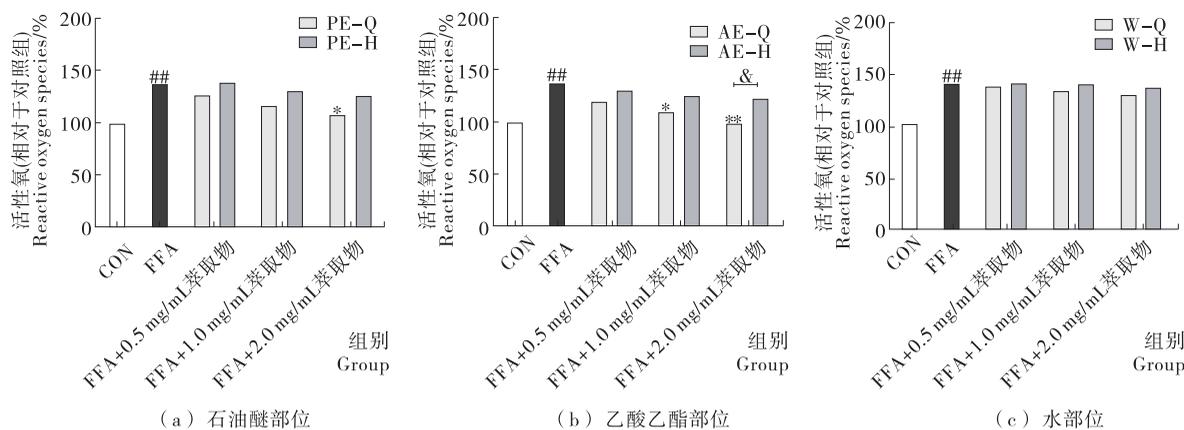
性均出现了不同程度的下降,乙酸乙酯部位活性下降幅度最大。在 2.0 mg/mL 浓度下,乙酸乙酯部位亲电成分被敲出后,AE 抑制脂质累积和降低 ROS 生成的能力显著降低( $P<0.05$ )。上述试验结果表明,小黑药亲电成分具有降低细胞内脂质累积和 ROS 生成的作用,乙酸乙酯部位的亲电成分干预肝脂肪变性的效果最好,可能与乙酸乙酯部位中亲电成分含量最高有关。

试验结果显示,小黑药各极性部位萃取物经 GSH 亲和磁珠靶向敲出亲电成分后仍具有降低脂肪变性细胞 ROS 生成的作用。贺安娜等<sup>[11]</sup>的研究表明显脉旋覆花醇提物含有的黄酮、多酚类成分具有清除 DPPH、ABTS 及超氧阴离子自由基,提高 D-半乳糖致衰小鼠肝脏、肾

脏及血清抗氧化能力的作用,而多酚、黄酮类成分普遍不具有 $\alpha,\beta$ -不饱和羰基的亲电化合物特征基团。因此,推测小黑药各极性部位萃取物经 GSH 亲和磁珠靶向敲出亲电成分后,可能是其中的多酚、黄酮类成分发挥了降低脂肪变性细胞 ROS 水平的作用。研究结果进一步说明了小黑药抗氧化活性成分的多样性,除了多酚、黄酮类直接抗氧化剂,还含有亲电性间接抗氧化剂。

### 2.3 乙酸乙酯部位亲电成分对脂肪变性肝细胞的干预作用

针对小黑药亲电成分含量最高、干预肝细胞脂肪变性最好的乙酸乙酯部位,进一步探究了其对脂肪变性肝细胞的脂代谢、氧化应激的影响(图 4、5)。

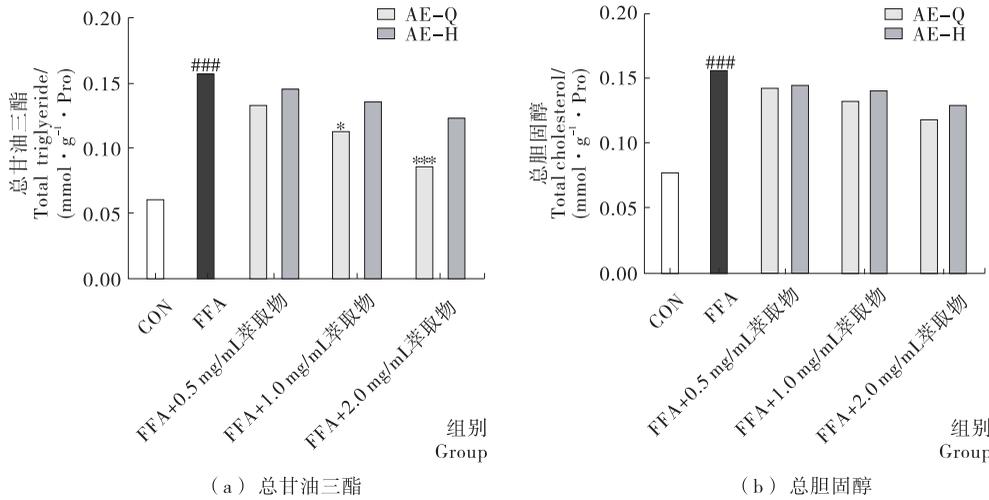


(a) 石油醚部位 (b) 乙酸乙酯部位 (c) 水部位

与对照组相比,###表示 $P<0.001$ ;与模型组相比,\*表示 $P<0.05$ ,\*\*表示 $P<0.01$ ,\*\*\*表示 $P<0.001$ ;磁珠孵育前后相比,&表示 $P<0.05$

图 3 小黑药各极性部位萃取物亲电成分对 FFA 诱导 HepG2 细胞 ROS 生成的影响

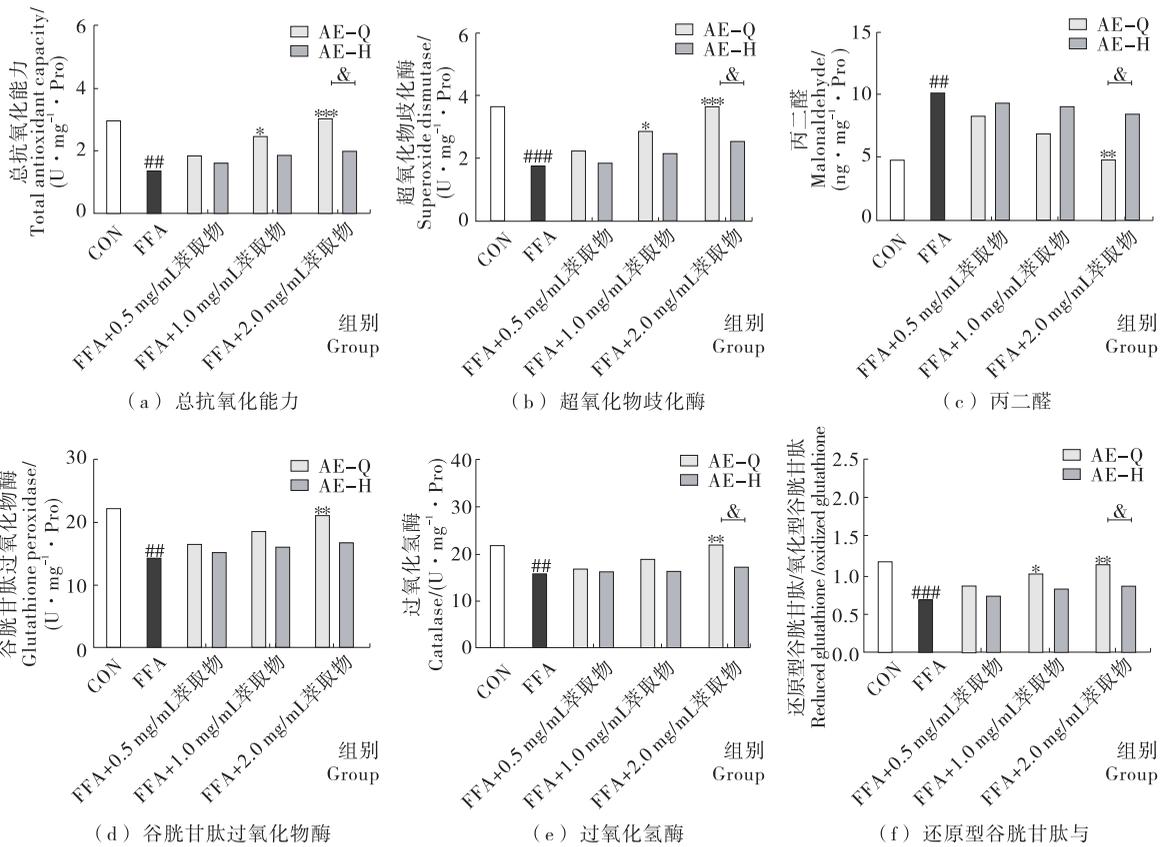
Figure 3 Effect of electrophilic components from fractions of *Xiaoheiyao* on ROS generation in FFA-induced HepG2 cells



与对照组相比,###表示P<0.001;与模型组相比,\*表示P<0.05,\*\*表示P<0.01,\*\*\*表示P<0.001;磁珠孵育前后相比,&表示P<0.05

图4 小黑药乙酸乙酯部位亲电成分对 FFA 诱导 HepG2 细胞脂代谢的影响

Figure 4 Effect of electrophilic components from ethyl acetate fraction of *Xiaoheiyao* on lipid metabolism in FFA-induced HepG2 cells



与对照组相比,##表示P<0.01;与模型组相比,\*表示P<0.05,\*\*表示P<0.01,\*\*\*表示P<0.001;磁珠孵育前后相比,&表示P<0.05

图5 小黑药乙酸乙酯部位亲电成分对 FFA 诱导 HepG2 细胞氧化还原状态的影响

Figure 5 Effect of electrophilic components from ethyl acetate fraction of *Xiaoheiyao* on redox state in FFA-induced HepG2 cells

如图 4 所示,模型组与对照组相比,细胞内 TG 和 TC 含量显著上升( $P < 0.05$ );AE 组、AEH 组与模型组相比,细胞内 TG 和 TC 水平出现不同程度下降;AEH 组细胞内 TG 和 TC 含量均高于相应给药浓度的 AE 组,给药浓度为 2 mg/mL 时,AEH 组细胞内的 TG 含量与 AE 组相比显著性降低( $P < 0.05$ ),但 AEH 组细胞内 TC 含量与 AE 组相比没有显著性降低( $P > 0.05$ )。以上结果表明小黑药乙酸乙酯部位的亲电成分可降低脂肪变性肝细胞内 TG 和 TC 的积累,并且降低 TG 积累活性优于降低 TC 积累活性。

小黑药亲电成分对脂肪变性细胞的氧化还原稳态的影响结果如图 5 所示。模型组与对照组相比,细胞内 MDA 含量显著上升( $P < 0.05$ ),而反映抗氧化能力的 T-AOC、GSH/GSSG 和抗氧化酶活力的 SOD、CAT、GSH-px 出现显著下降( $P < 0.05$ );细胞给予不同浓度的 AE 和 AEH 后,FFA 诱导的 HepG2 细胞氧化还原水平均出现不同程度的改善;对比 AE 组与 AEH 组,特别是在 2 mg/mL 浓度下,除 GSH-px 外,亲电成分靶向敲出前后细胞内 MDA、T-AOC、GSH/GSSG、SOD、CAT 水平均具有显著性差异( $P < 0.05$ )。试验结果表明,小黑药乙酸乙

酯部位亲电成分通过提高细胞内源性抗氧化物质与抗氧化酶的水平,调节脂肪变性肝细胞的细胞氧化还原稳态。

#### 2.4 乙酸乙酯部位亲电成分对氧化还原稳态与脂代谢相关基因表达的影响

氧化应激在 NAFLD 发生发展中扮演了重要角色,如损伤线粒体的正常功能(包括线粒体呼吸链活性和脂肪酸  $\beta$ -氧化能力)<sup>[21]</sup>,致使细胞内脂质合成与分解失衡<sup>[22]</sup>,最终导致细胞脂肪变性。膳食源亲电成分是一类可通过上调 Nrf2 信号通路,调控细胞内源性抗氧化酶表达的间接抗氧化剂<sup>[7]</sup>,具有潜在的 NAFLD 干预作用。在揭示小黑药亲电成分对 FFA 诱导 HepG2 细胞的脂代谢、氧化还原稳态调控的基础上,进一步分析了乙酸乙酯部位中亲电成分对相关基因表达的影响。

小黑药乙酸乙酯部位亲电成分对氧化还原稳态相关基因表达的影响结果如图 6 所示。AE 组与 AEH 组氧化还原稳态相关基因 *Nrf2*、*NQO1*、*GCLC* 的表达具有显著性差异( $P < 0.05$ ),*HO-1* 的表达虽有差异,但并不显著( $P > 0.05$ ),表明小黑药乙酸乙酯部位中亲电成分发挥抗氧化活性主要与 *Nrf2*、*NQO1*、*GCLC* 表达上调有关。已

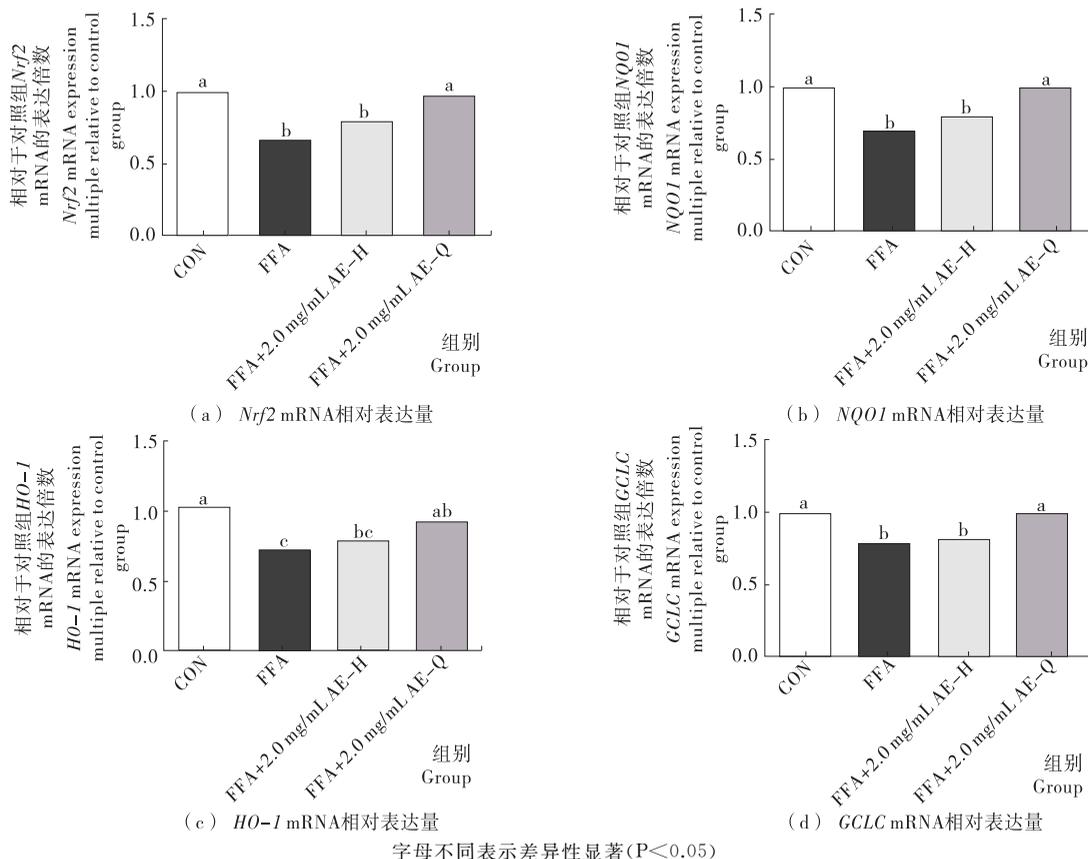


图 6 小黑药乙酸乙酯部位中亲电成分对 FFA 诱导 HepG2 细胞 Nrf2 信号相关基因表达的影响

Figure 6 Effect of electrophilic components from ethyl acetate fractions of *Xiaoheiyao* on expression of Nrf2 pathway related genes in FFA-induced HepG2 cells

有研究表明 *HO-1*、*NQO1* 和 *GCLC* 在调控肝脏 ROS 水平方面发挥着重要的作用,且 *HO-1*、*NQO1* 和 *GCLC* 受 Nrf2-Keap1 通路调控<sup>[23]</sup>,其他抗氧化酶如 SOD、CAT 等也受到 Nrf2-Keap1 通路调控<sup>[24]</sup>,生姜中的花姜酮、萝卜中的天然焯醇为天然亲电化合物,均已被报道可通过激活 Nrf2-Keap1 通路调节下游抗氧化酶和二相解毒酶的表达<sup>[8-9]</sup>,提示小黑药乙酸乙酯部位中亲电成分发挥抗氧化活性可能与通过激活 Nrf2-Keap1 信号通路进而显著上调 *NQO1*、*GCLC* 的表达有关。小黑药乙酸乙酯部位亲电成分对脂代谢相关基因表达的影响结果如图 7 所示。AE 组与 AEH 组细胞脂代谢相关基因表达存在差异,其中脂质合成相关基因 *SREBP1c*、*ACC1* 的表达差异显著 ( $P < 0.05$ )、*FAS* 的表达差异不显著 ( $P > 0.05$ ),而脂质氧化分解相关基因 *PPAR $\alpha$*  的表达差异显著 ( $P < 0.05$ )、*CPT1A* 的表达差异不显著 ( $P > 0.05$ ),表明小黑药乙酸乙酯部位亲电成分主要通过降低脂质合成相关基因和提高脂质氧化分解相关基因的表达调节细胞内脂代谢水平。*SREBP1c* 是肝脏主要调节脂质合成的重要转录因子,其下游涉及 *FAS*、*ACC1* 等基因的调节,已有研究<sup>[25]</sup>表明 *Nrf2* 可以负反馈 *SREBP1c*、*PPAR $\alpha$*  进而影响下游脂合成基因的表达,亦有研究<sup>[26]</sup>指出 *Nrf2* 敲除脂肪合成酶 *FAS* 和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 *SCD* 等

脂质合成相关酶表达水平明显提高,提示小黑药乙酸乙酯中的亲电成分可能通过上调 *Nrf2* 的表达,下调 *SREBP1c* 和 *ACC1* 表达,降低脂质过量合成,上调 *PPAR $\alpha$*  表达,增加脂质氧化分解,进而降低细胞内脂质的累积。综合上述研究结果,小黑药亲电成分可能通过激活 *Nrf2* 细胞信号途径上调抗氧化酶的表达,同时抑制脂质合成和促进脂质氧化分解,从而调节 FFA 诱导的肝细胞氧化应激和脂代谢异常。

## 2.5 小黑药乙酸乙酯部位中亲电成分分析

基于小黑药各萃取部位中亲电成分含量与活性的比较,选取亲电成分含量最丰富、肝细胞脂肪变性干预作用最好的乙酸乙酯部位,采用 LC-MS 分析,比较亲电成分靶向敲出前后质谱的变化,从而表征乙酸乙酯部位中的亲电成分,结果如图 8 所示。对比正、负离子模式下的总离子流图各峰形,发现有 7 个变化的峰,对应的保留时间分别为 4.03, 7.49, 7.87, 8.44, 9.93, 16.98, 19.93 min。分析其在正负离子模式下的准分子离子峰,显示 1~7 号离子流信号对应的分子量分别为 472, 292, 426, 370, 428, 420, 248。通过高分辨信号推导和前期小黑药植物化学研究结果<sup>[14] 23-56</sup>,推测 2 号峰为 Nervolan B, 3 号峰为 Nervoyan C, 6 号峰为 Vanclevic acid methyl ester, 7 号峰为 Tomentosin。其中 Nervolan B 和 Tomentosin 具有  $\alpha$ ,

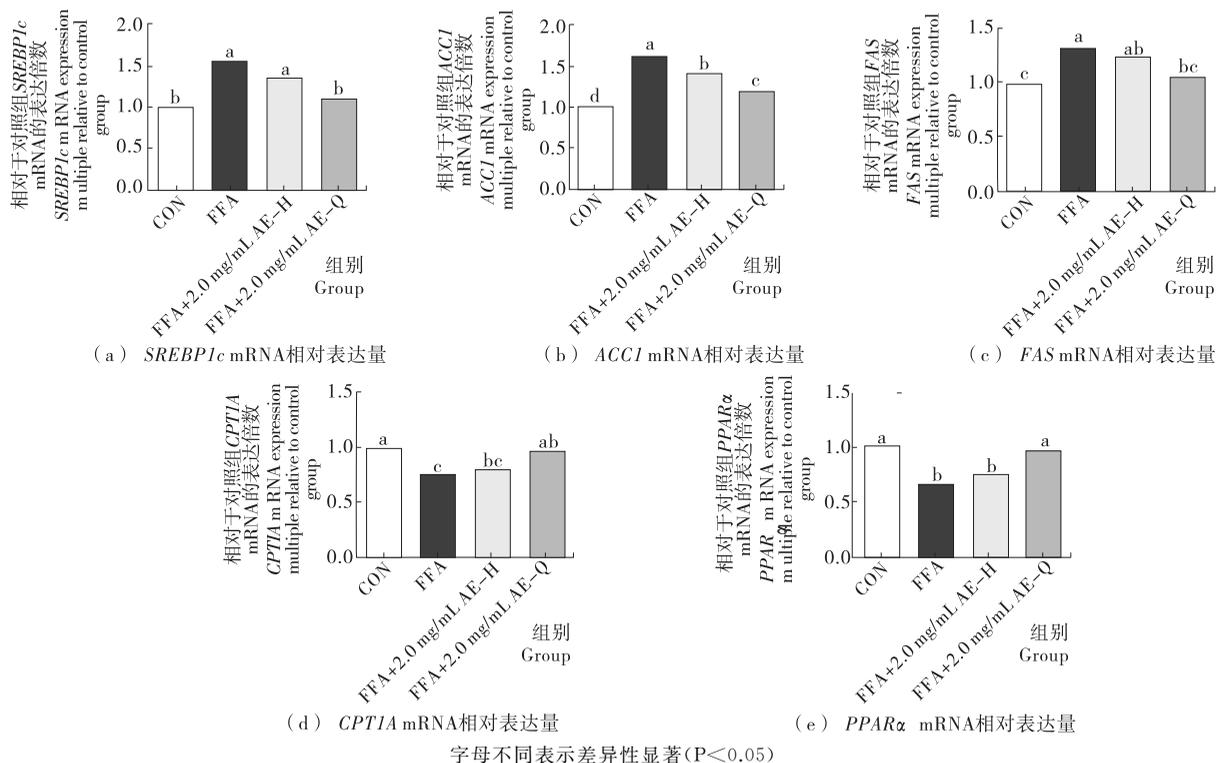


图 7 小黑药乙酸乙酯部位中的亲电成分对 FFA 诱导 HepG2 细胞脂代谢相关基因的影响

Figure 7 Effect of electrophilic components from ethyl acetate fractions of *Xiaoheiyao* on expression of lipid metabolism related genes in FFA-induced HepG2 cells

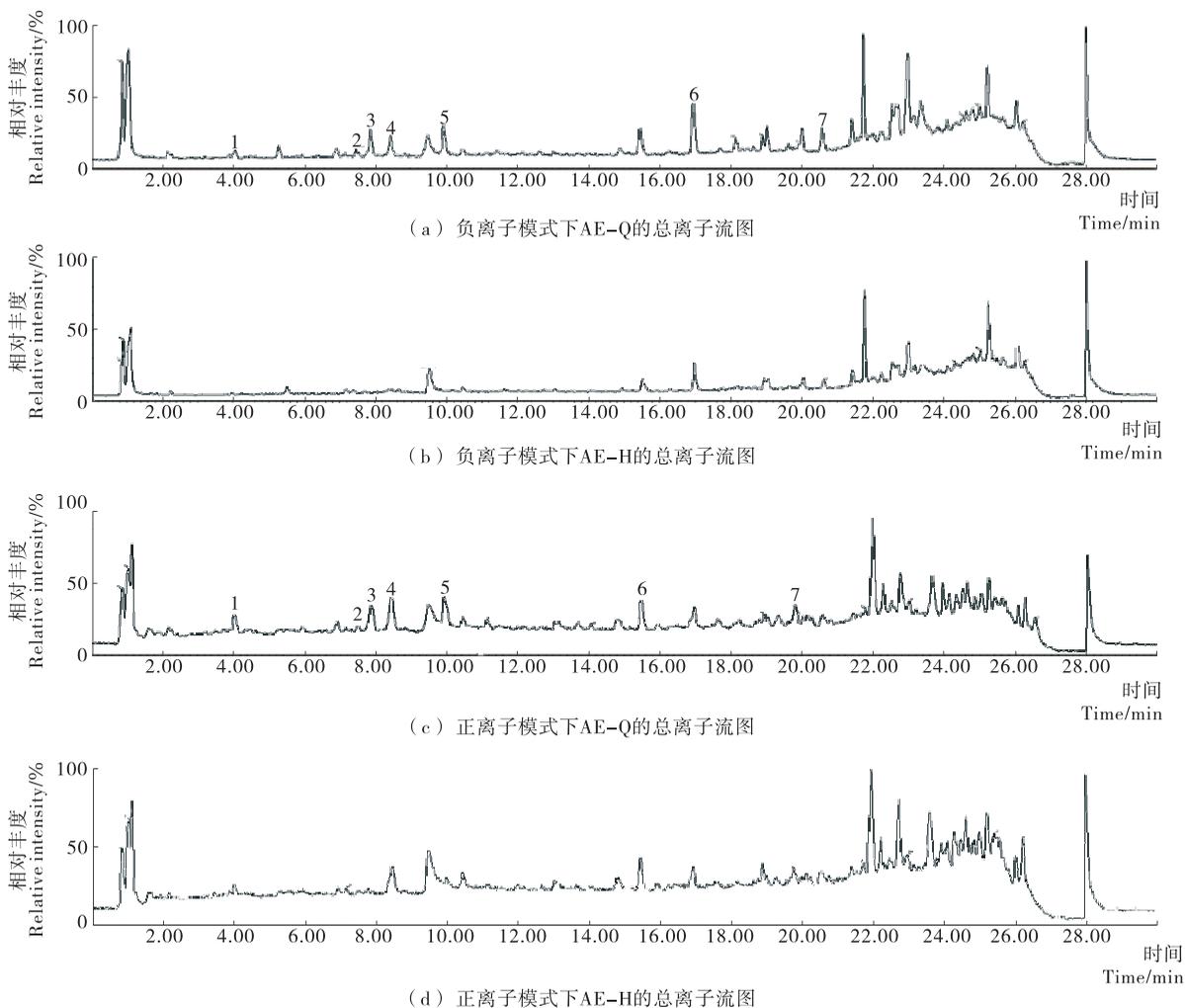


图 8 小黑药乙酸乙酯部位经 GSH 功能化磁珠孵育前后成分的总离子流图

Figure 8 TIC chromatograms of ethyl acetate fraction of *Xiaohaiyao* with and without GSH-MNPs treated

$\beta$ -不饱和羰基结构,为亲电化合物,而 Nervoyan C 和 Vanclevic acid methyl ester 具有丙烯醇结构,为弱亲电化合物。

### 3 结论

针对小黑药亲电成分及其干预脂肪变性作用尚未明确的现状,结合亲电成分靶向敲出技术、体外肝细胞脂肪变性模型评价方法,研究发现小黑药含有亲电成分,主要分布在乙酸乙酯部位;小黑药亲电成分具有降低 FFA 诱导的 HepG2 细胞内脂质累积、氧化应激的作用,其中乙酸乙酯部位活性最佳,其活性机制为小黑药亲电成分通过激活 Nrf2-Keap1 信号通路上调下游抗氧化、脂质氧化分解基因的表达和下调脂合成基因的表达,小黑药中亲电化合物可以改善脂肪酸诱导的脂肪变性,其机制与抗氧化和脂代谢相关基因的调节有关。此外,通过 LC-MS 表征初步从乙酸乙酯部位中发现 7 个明显变化的质谱峰,这些质谱峰对应化合物的确切结构尚未完全揭示,需

要通过核磁共振等手段进一步确定。

### 参考文献

[1] ZHOU You-lian, ZHENG Ti-ying, CHEN Hui-ting, et al. Microbial intervention as a novel target in treatment of non-alcoholic fatty liver disease progression [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 51(5): 2 123-2 135.

[2] DAY C P, JAMES O F W. Steatohepatitis: A tale of two "hits"? [J]. Gastroenterology, 1998, 114(4): 842-845.

[3] MONTGOMERY M K, TURNER N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: An update[J]. Endocr Connect, 2015, 4(1): R1-R15.

[4] NUNNARI J, SUOMALAINEN A. Mitochondria: In sickness and in health[J]. Cell, 2012, 148(6): 1 145-1 159.

[5] DINKOVA-KOSTOVA A T, TALALAY P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2008, 521: S128-S138.

[6] GERSCH M, KREUZER J, SIEBER S A. Electrophilic nat-

- ural products and their biological targets[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(6): 659-682.
- [7] FORMAN H J, DAVIES K J A, URSINI F. How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging *in vivo* [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 66: 24-35.
- [8] OHNISHI K, IRIE K, MURAKAMI A. *In Vitro* covalent binding proteins of zerumbone, a chemopreventive food factor[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(8): 1 905-1 907.
- [9] OHNUMA T, NAKAYAMA S, ANAN E, et al. Activation of the Nrf2/ARE pathway via S-alkylation of cysteine 151 in the chemopreventive agent-sensor Keap1 protein by falcarindiol, a conjugated diacetylene compound[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, 244(1): 27-36.
- [10] 张鸭关, 刘品华, 汪帆. 显脉旋覆花的营养成分及营养价值评价[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(21): 353-355, 360.
- [11] 贺安娜, 余朝文, 曾军英, 等. 显脉旋覆花不同部位体内外抗氧化作用比较[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(1): 79-83.
- [12] 刘品华, 杨光红, 田雪莲, 等. 小黑药抗油脂氧化及抑菌效果研究[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(10): 187-189.
- [13] 赵丽, 辛克勤, 李永秋. 显脉旋覆花[J]. *食品与药品*, 2007(5): 53-54.
- [14] 严岚. 显脉旋覆花的化学成分研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2010.
- [15] 张虹, 李树伟, 李春燕, 等. 显脉旋覆花根中总黄酮提取方法的研究[J]. *云南民族大学学报: 自然科学版*, 2015, 24(2): 112-114.
- [16] SECA A M L, GRIGORE A, PINTO D C G A, et al. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 154(2): 286-310.
- [17] 张磊, 项芳芝, 苗文娟, 等. 菊花中生物活性物质提取工艺研究进展[J]. *食品与机械*, 2017, 33(4): 205-210.
- [18] NATH A, LI I, ROBERTS L R, et al. Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 1-19.
- [19] GÓMEZ-LECHÓN M J, DONATO M T, MARTÍNEZ-ROMERO A, et al. A human hepatocellular *in vitro* model to investigate steatosis[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2007, 165(2): 106-116.
- [20] ZHANG Xiao-yu, MA Zhong-jun. A new fluorescein isothiocyanate-based screening method for the rapid discovery of electrophilic compounds[J]. *Analytical Methods*, 2010, 2(10): 1 472-1 478.
- [21] CARDOSO A R, CABRAL-COSTA J V, KOWALTOWSKI A J. Effects of a high fat diet on liver mitochondria: Increased ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity and reactive oxygen species generation[J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2010, 42(3): 245-253.
- [22] 韩伟佳, 刘霜, 段钟平, 等. 非酒精性脂肪性肝病中肝细胞脂肪变性分子机制的研究[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2018, 27(10): 1 103-1 109.
- [23] UPADHYAY K K, JADEJA R N, THADANI J M, et al. Carbon monoxide releasing molecule A-1 attenuates acetaminophen-mediated hepatotoxicity and improves survival of mice by induction of Nrf2 and related genes[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2018, 360: 99-108.
- [24] 李涛, 邓放明, 覃思, 等. Nrf2-ARE 介导的黄酮类化合物抗氧化应激的研究进展[J]. *食品与机械*, 2016, 32(6): 201-207.
- [25] LI Lu, FU Jing-qi, SUN Jing, et al. Is Nrf2-ARE a potential target in NAFLD mitigation? [J]. *Current Opinion in Toxicology*, 2019, 13: 35-44.
- [26] WALSH J, KITTINGHAM N R, GRIFFIN J L, et al. The role of the transcription factor Nrf2 in lipid metabolism in the liver[J]. *Toxicology*, 2011, 290(2): 140-141.
- (上接第 23 页)
- [19] COHEN A E, JOHNSTON C S. Almond ingestion at meal-time reduces postprandial glycemia and chronic ingestion reduces hemoglobin A1c in individuals with well-controlled type 2 diabetes mellitus[J]. *Metabolism*, 2011, 60(9): 1 312-1 317.
- [20] LI Sing-chung, LIU Yen-hua, LIU Jen-fang, et al. Almond consumption improved glycemic control and lipid profiles in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Metabolism*, 2011, 60(4): 474-479.
- [21] 张俐勤. 低热量甜味剂罗汉果皂甙的分离、分析及其生物活性评价[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004: 65-66.
- [22] 何伟平, 朱晓韵, 刘丽君, 等. 罗汉果低血糖指数(CI)食品及其药理研究[J]. *轻工科技*, 2011(7): 1-2, 5.
- [23] 戚向阳, 陈维军, 宋云飞, 等. 罗汉果提取物对糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(10): 1 226-1 227.
- [24] 戚向阳, 陈维军, 张俐勤, 等. 罗汉果皂甙清除自由基及脂质过氧化作用的研究[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(2): 382-388.
- [25] CHEN Wei-jun, WANG Jing, QI Xiang-yang, et al. The antioxidant activities of natural sweeteners, mogrosides, from fruits of *Siraitia grosvenori*[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2007, 58(7): 548-556.
- [26] GULATI S, MISRA A, PANDEY R M. Effect of almond supplementation on glycemia and cardiovascular risk factors in asian indians in north india with type 2 diabetes mellitus: A 24-week study[J]. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 2017, 15(2): 98-105.
- [27] 周英, 郑艳, JEFF E, 等. 罗汉果提取物和罗汉果苷 V 对胰岛素分泌的调节作用[J]. *药理学报*, 2009, 44(11): 1 252-1 257.