

# 玳玳果黄酮提取物关键效应组分辨识及调控脂质代谢作用机制研究

熊朝栋<sup>1,2</sup>, 陈红<sup>1\*</sup>, 陈丹<sup>2\*</sup>, 余文静<sup>2</sup>, 马国萍<sup>2</sup>(1.福建省立医院干部特诊科, 福州 350001; 2.福建中医药大学药学院, 福州 350122)

**摘要:** 目的 探究玳玳果黄酮提取物及其敲出目标组分对脂肪变性细胞调控脂质代谢作用及机制, 辨识关键效应组分。方法 采用油酸诱导建立 HepG2 脂肪变性细胞模型, 非诺贝特为阳性对照, 油红 O 染色法及甘油三酯(triglycerides, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC)为评价指标, 考察玳玳果黄酮提取物、柚皮苷(目标组分)、新橙皮苷(目标组分)、其他相关组分(黄酮提取物敲除柚皮苷、新橙皮苷)、黄酮提取物敲除其他相关组分(柚皮苷-新橙皮苷 6:7)对脂肪变性模型细胞脂质集聚影响。基于 AMPK/SREBP-1c 及 PPAR $\alpha$  信号通路, 采用 qRT-PCR 法、Western blotting 检测大鼠肝脏相关基因、蛋白的表达。结果 预防性给药后, 与模型组相比, 玳玳果黄酮提取物、柚皮苷、新橙皮苷、提取物敲除其他相关组分的细胞脂质积聚、TG 及 TC 含量均有明显的改善( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ); 玳玳果黄酮提取物及柚皮苷、新橙皮苷可使促腺苷酸激活蛋白激酶(ATP-activated protein kinase, AMPK)的 mRNA 及磷酸化蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ); 显著抑制并明显下调固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBP-1c)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)、乙酰辅酶羧化酶(coenzyme carboxylase, ACC)的 mRNA 和蛋白表达水平( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ); 可促进过氧化物酶增殖物激活受体(peroxidase proliferator-activated receptor, PPAR $\alpha$ )、肉毒碱棕榈酰基转移酶(carnitine palmitoyltransferase-1, CPT-1)的 mRNA 及蛋白表达水平明显上升( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ); 其他相关组分无明显差异。结论 玳玳果黄酮提取物及其关键效应组分柚皮苷、新橙皮苷可有效改善脂质积聚; 其作用机制为激活 AMPK 促其蛋白磷酸化表达, 从而抑制脂质合成, 同时促进脂肪酸的氧化分解, 由此减少脂肪沉积, 发挥调控脂质代谢的作用。

**关键词:** 玳玳果黄酮提取物; 柚皮苷; 新橙皮苷; HepG2 细胞脂肪变性模型; 促腺苷酸激活蛋白激酶; 固醇调节元件结合蛋白; 过氧化物酶增殖物激活受体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)14-1818-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.14.005

引用本文: 熊朝栋, 陈红, 陈丹, 等. 玳玳果黄酮提取物关键效应组分辨识及调控脂质代谢作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(14): 1818-1827.

## Study on the Identification of the Key Effect Components and the Lipid Metabolism Mechanism for Daidai Flavonoid Extracts

XIONG Chaodong<sup>1,2</sup>, CHEN Hong<sup>1\*</sup>, CHEN Dan<sup>2\*</sup>, YU Wenjing<sup>2</sup>, MA Guoping<sup>2</sup>(1.Cadre Special Department, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China; 2.Department of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the effect and mechanism of Daidai flavonoid extracts and its key effect components on the regulation of lipid metabolism in steatosis cells and to identify the key effect components. **METHODS** HepG2 cell steatosis model was established by oleic acid induction. Fenofibrate was used as a positive control. The oil red O staining method, triglycerides(TG), and total cholesterol(TC) were used as evaluating indicators to investigate the effects of Daidai flavonoid extracts, naringin(key effect component), neohesperidin(key effect component), other related components(flavonoid extract excluded naringin and neohesperidin), and extracts excluded other related components(6:7 of naringin-neohesperidin) on the lipid accumulation in HepG2 cell steatosis model. Based on AMPK/SREBP-1c and PPAR $\alpha$  signaling pathways, qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of related genes and proteins in rat liver. **RESULTS** After preventive administration, compared with the model group, the cell lipid accumulation, TG and TC levels were significantly improved( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ) in the groups of Daidai flavonoid extracts, naringin, neohesperidin and extracts excluded other related components. Daidai flavonoid extracts, naringin and neohesperidin significantly increased the expression levels of ATP-activated protein kinase(AMPK) mRNA and phosphorylated protein( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ); inhibited and reduced the mRNA and protein expression levels of sterol regulatory element binding protein(SREBP-1c), fatty acid synthase(FAS) and acetyl coenzyme carboxylase(ACC)( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ); increased the mRNA and protein expression levels of peroxidase proliferator-activated receptor(PPAR $\alpha$ ) and carnitine palmitoyltransferase-1(CPT-1)( $P<0.01$

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2018J01253); 福建省卫生计生委医学创新项目(2016-CX-45); 福建省科技计划项目(2010Y2004)

作者简介: 熊朝栋, 男, 硕士 E-mail: 1370601492@qq.com \*通信作者: 陈红, 女, 主任医师 E-mail: chyed@sina.com 陈丹, 女, 博士, 教授 E-mail: 2536282060@qq.com

or  $P < 0.05$ ). There was no significant difference in other related component group. **CONCLUSION** The Daidai flavonoid extracts and the key effect components naringin and neohesperidin can effectively improve the lipid accumulation of steatosis model cells. The mechanism is to activate AMPK to promote its phosphorylation expression, thereby inhibiting lipid synthesis. At the same time, it promotes the oxidation and decomposition of fatty acids, thereby reducing fat deposition and regulating lipid metabolism.

**KEYWORDS:** Daidai flavonoid extracts; naringin; neohesperidin; HepG2 cell steatosis model; ATP-activated protein kinase(AMPK); sterol regulatory element binding protein(SREBP-1c); peroxidase proliferator activated receptor(PPAR $\alpha$ )

玳玳(*Citrus Aurantium L. var daidai Tanaka*)是芸香科柑桔亚属植物酸橙的变种,是药食同源类药材。玳玳果含有丰富的黄酮类成分,临床多用于胸腹满闷胀痛、食积不化、痰饮等病症的治疗<sup>[1-3]</sup>。玳玳果黄酮提取物是笔者所在课题组以授权发明专利制备的玳玳果有效部位提取物,具有良好的降血脂及抗氧化作用,主要效应组分为新橙皮苷、柚皮苷,且二者含量占总黄酮含量的60%以上<sup>[4-8]</sup>。近年来,在高脂血症和降脂药物的研究中,发现了一些与高脂血症有关的重要作用靶点如腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK),它是调控体内蛋白质、脂质及糖类代谢的重要“开关靶点”<sup>[9-12]</sup>。研究表明,AMPK激活后主要可通过影响固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c)和其下游靶点如乙酰辅酶A羧化酶(acetyl CoA carboxylase, ACC)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)等,抑制脂质的从头合成<sup>[13-15]</sup>;同时通过影响过氧化物酶增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ )靶点及其下游肉毒碱棕榈酰基转移酶(carnitine palmitoyltransferase-1, CPT-1)表达,促进脂肪酸的氧化分解<sup>[16-17]</sup>。

因此,本研究针对玳玳果黄酮提取物,以及基于组分敲出法从提取物敲出的目标组分柚皮苷、新橙皮苷、其他相关组分(玳玳果黄酮提取物敲除柚皮苷及新橙皮苷后产物)、提取物敲除其他相关组分[柚皮苷-新橙皮苷(6:7)]样品<sup>[18]</sup>,采用油酸诱导建立 HepG2 细胞脂肪变性模型,以非诺贝特为阳性对照药物,考察比较玳玳果黄酮提取物及其各敲出目标组分对脂质积聚和脂质代谢异常的改善作用,辨识关键效应组分;进一步研究比较玳玳果黄酮提取物、关键效应组分及其他相关组分,基于 AMPK/SREBP-1c 和 PPAR $\alpha$  关键信号通路因子,对调控脂质从头合成途径、脂肪酸氧化代谢途径的基因及蛋白表达水平的影响,阐明玳玳果黄酮提取物及关键效应组分调控细胞脂质代谢作用机制及多靶点的作用特性,揭示提取物中关键效应组分与其他相关组分的整体协同作

用,为玳玳果黄酮提取物的进一步临床应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Infinite M200 PRO 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司); MiniproteatTetra 垂直电泳仪、ChemiDocXRS+ 化学发光成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司; ABI7900 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司); XS205 十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; ZD 9550 脱色摇床(海尔其林贝尔仪器制造有限公司); DM ILLED 倒置相差显微镜(德国 Leica 公司); Forma 371 型二氧化碳培养箱、HFuu586 超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific)。

### 1.2 试剂

玳玳果黄酮提取物(自制,批号:20190401;总黄酮含量:86.47%);柚皮苷(自制,批号:20190625;纯度>98.0%);新橙皮苷(自制,批号:20190702;纯度>98.0%);提取物敲除其他相关组分[柚皮苷-新橙皮苷(6:7),自制批号:20190610];其他相关组分样品(自制,批号:20190605);非诺贝特胶囊(法国利博福尼制药有限公司,规格:每粒 200 mg;批号:H20160155);油酸(oleic acid, OA,上海源叶生物科技有限公司,批号:B21592)。

饱和油红 O 染色液(货号:G1260)、噻唑蓝 MTT(货号:G1262)均购自北京索莱宝科技有限公司;甘油三酯(triglycerides, TG)试剂盒(货号:A110-1-1)、总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒(货号:A111-1-1)均购自南京建成生物工程研究所;RIPA 裂解液(强,货号:P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型,货号:P0010S)均购自碧云天生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒(货号:R401-01)、RNA 逆转录试剂盒(货号:R123-01)、CPT-1(货号:15184-1-AP)抗体均购自南京诺维赞生物科技有限公司;飞克特敏 ECL 发光液(大连美仑生物技术有限公司,货号:ma0186);AMPK $\alpha$  抗体(货号:10929-2-AP)、ACC 抗体(货号:21923-1-AP)、FAS/CD95 抗体(货号:13098-1-AP)、SREBP1 抗

体(货号: 14088-1-AP)、PPAR $\alpha$  抗体(货号: 15540-1-AP)、 $\beta$ -actin 抗体(货号: 66009-1-ig)、羊抗鼠 IgG(H+L)、羊抗兔 IgG(H+L)等均购自武汉三鹰生物技术有限公司; phospho-AMPK(Thr172)抗体(北京博奥森生物技术公司, 货号: bs-4002R)。

### 1.3 细胞株

人肝癌细胞(HepG2 细胞), 由福建中医药大学中西医结合研究院黄苏萍教授团队馈赠。

## 2 方法

### 2.1 溶液配制

**2.1.1 油酸造模母液** 吸取 95.20  $\mu\text{L}$  OA 加入 5 mL 的基础培养基中, 加入 30  $\mu\text{L}$  的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)超声 5 min 使其溶解, 当无油状物析出时将溶液补足至 10 mL, 过滤除菌, 4  $^{\circ}\text{C}$  封口保存备用, 即得 30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  OA 造模母液, 临用前以完全培养基稀释至所需浓度。

**2.1.2 非诺贝特溶液** 精密称取 14.4 mg 非诺贝特胶囊内容物, 加入 2 mL 的 DMSO 溶解, 滤过除菌, 4  $^{\circ}\text{C}$  封装保存, 即得 20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的非诺贝特溶液, 临用时稀释至所需浓度。

**2.1.3 药物溶液** 玳玳果黄酮提取物溶液: 精密称取玳玳果黄酮提取物 60 mg, 加入 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  OA 造模液适量溶解后, 补足至 6 mL, 滤过除菌, 即得浓度为 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  玳玳果黄酮提取物溶液, 封口 4  $^{\circ}\text{C}$  保存, 备用, 临用时稀释至所需浓度。

各敲出目标组分溶液: 分别精密称取敲出目标组分柚皮苷、新橙皮苷、其他相关组分、敲除其他相关组分样品, 各 20 mg, 加入 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  OA 造模液适量溶解后, 补足至 4 mL, 滤过除菌, 即得浓度为 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的各组分溶液, 封口 4  $^{\circ}\text{C}$  保存, 备用, 临用时稀释至所需浓度。

### 2.2 MTT 法检测 HepG2 细胞活力

取处于对数生长期、状态良好的 HepG2 细胞, 接种于 96 孔板中(每孔  $2\times 10^3$  个细胞), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  下培养 24 h, 使 HepG2 细胞重新贴壁。贴壁后分别加入含不同种类、不同浓度药物的完全培养基, 其中玳玳果黄酮提取物的浓度为 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 和 800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 新橙皮苷与其他相关组分浓度为 0, 4.4, 8.8, 17.5, 35, 70, 140 和 280  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 柚皮苷浓度为 0, 3.8, 7.5, 15, 30, 60, 120 和 240  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 非诺贝特浓度 10.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 完全培养基处理。同时设置空白调零组(加不含细胞的完全培养基)、正常组(无

药物干预的正常培养基), 培养 24, 48 h 后, 弃去原培养基, PBS 清洗 1 次, 向每孔加入 20  $\mu\text{L}$  预先配置浓度为 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 MTT 溶液(避光保存), 轻柔晃动使其铺满孔底, 5% $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中继续培养 4 h 后, 弃去 96 孔板内溶液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 室温下放置摇床上低速振荡混匀 20 min(避光), 使产生的紫色结晶充分溶解, 于酶标仪 490 nm 波长处检测各孔吸光度(OD)值。采用细胞活力式(1)计算。

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{OD}_{\text{加药}490\text{nm}} - \text{OD}_{\text{调零}490\text{nm}}}{\text{OD}_{\text{正常}490\text{nm}} - \text{OD}_{\text{调零}490\text{nm}}} \times 100\% \quad (1)$$

### 2.3 对 OA 诱导建立 HepG2 细胞脂肪变性模型的影响

**2.3.1 细胞培养与给药处理** 取生长状态良好的对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板(每孔  $1\times 10^5$  个细胞), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h 使细胞重新贴壁。待细胞贴壁后进行实验分组, 再同时给予含 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  OA 和不同浓度的药物(根据“3.1.1”项下结果而定)。正常组仅 10%FBS 完全培养基处理; 模型组在正常组基础条件上加入含 OA 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 给药组在模型组基础上加相应浓度药物; 其他相关组分(玳玳果黄酮提取物敲除柚皮苷及新橙皮苷后产物, 70  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、提取物敲除其他相关组分(柚皮苷约 60.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、新橙皮苷 70.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、柚皮苷组(60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、新橙皮苷组(70  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、玳玳果黄酮提取物组(200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、非诺贝特组(阳性对照, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。处理时间为 24 h, 每组细胞设 3 个复孔, 重复试验 3 次。

**2.3.2 油红 O 染色法观察脂质积聚** 取“2.3.1”项下给药处理后的细胞, 弃去原培养基, 用适量 PBS 缓冲液反复清洗 3 次; 每孔加入 1 mL 4%多聚甲醛, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内固定 30 min, 再以适量 PBS 缓冲液清洗 3 次; 每孔用 500  $\mu\text{L}$  新鲜配制的油红 O 染液, 室温染色 10 min 后, 弃去染液, 以 PBS 缓冲液清洗各孔 3 次至背景透明, 用电子显微镜观察各组细胞形态及脂滴分布情况, 拍照记录; 而后每孔加入 1 mL DMSO 溶解油红 O 染色, 室温下低速振荡混匀 20 min, 酶标仪 358 nm 处测定各孔吸光度(OD)值。

**2.3.3 测定各组细胞 TG、TC 含量** 取“2.3.1”项下给药处理后的细胞, 弃去原培养基, 用适量 PBS 缓冲液反复清洗 3 次; 以胰酶消化液处理得细

胞悬液, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃去上清液, 以 PBS 缓冲液清洗 2 次, 弃去上清液; 加入 2% 的 TritonX-100; 裂解 30 min, 将裂解后的液体严格按照 TC 和 TG 含量测定试剂盒说明书操作, 每个样本 3 个复孔, 重复试验 3 次; BCA 法测定每孔细胞的蛋白含量。

$$\text{TC或TG含量}(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{prot}) = \frac{\text{OD值样本} - \text{OD值空白}}{\text{OD值校准} - \text{OD值空白}} \times \frac{\text{校准品浓度}(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})}{\text{待测样本蛋白浓度}(\text{gprot} \cdot \text{L}^{-1})}$$

**2.3.4 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞脂质代谢相关基因表达** 取“2.3.1”项下细胞, 弃去原培养基, 用适量 PBS 缓冲液反复清洗 3 次; 以 RNAIsolater 溶液提取总 RNA, 将提取所得总 RNA 置于核酸分析仪中, 分析纯度。将总 RNA 逆转录为 cDNA。按 PCR 试剂盒说明书操作, 构建反应体系, 每个样本设 3 个复孔, 测定目标 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因名称	种属	引物序列(5'→3')
<i>AMPKa</i>	<i>homo</i>	F: TTGCCAAAGGAGTGATTTCAGATG R: TTAGGTCAACAGGAGAAGAGTCAA
<i>PPARa</i>	<i>homo</i>	F: TTCGCAATCCATCGGCGAG R: CCACAGGATAAGTCACCGAGG
<i>SREBP-1c</i>	<i>homo</i>	F: CTTAGAGCGAGCACTGAACTG R: GGAAGTATGGAGAAGCTGTAG
<i>CPT-1</i>	<i>homo</i>	F: ATCAATCGGACTCTGGAAACGG R: TCAGGGAGTAGCGCATGGT
<i>FAS</i>	<i>homo</i>	F: GGACCCTCTACCTCTGGTT R: GGGCTTATGGCAGAATTGGC
<i>ACC</i>	<i>homo</i>	F: AGACTGTGGTGGTTGGTAGA R: CTGCTGGATTATCTTGGCTTCA
<i>GAPDH</i>	<i>homo</i>	F: CTGGGCTACACTGAGCACC R: AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG

**2.3.5 Western blotting 检测各组细胞脂质代谢相关蛋白表达** 取“2.3.1”项下细胞, 弃去原培养基, 用适量 PBS 缓冲液反复清洗 3 次; 加入适量增强型 RIPA 裂解液(临用前加入磷酸酶和蛋白酶抑制剂)于冰上裂解 30 min, 12 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取适量上清液, 以 BCA 法检测蛋白含量, 根据测定结果将上清液与适量上样缓冲液(5×)混匀, 100 °C 金属浴变性。将变性后的蛋白按每孔 20 μg 进行 SDS-PAGE 电泳。将转至 PVDF 膜的蛋白以 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别加入 AMPK、

p-AMPK、SREBP-1c、ACC、FAS 及 PPARα、CPT-1 抗体, 4 °C 摇床孵育过夜, 隔日室温二抗孵育 1~2 h。采用 ChemiDocXRS+ 化学发光成像系统采集图像, 以 β-actin 为内参对照, 使用 Image J 软件对条带定量分析。

## 2.4 数据处理与统计学分析

采用 GraphPad Prism 7 软件作图, SPSS 20.0 统计软件处理数据。符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。符合正态分布的计量资料, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间两两比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验, 两两比较采用最小显著性差异法(LSD), 不符合正态分布的数据采用非参数检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 玳玳果黄酮提取物降脂药效及关键效应组分辨识

**3.1.1 对 HepG2 细胞增殖影响** 分别考察玳玳果黄酮提取物及各敲出目标组分 24, 48 h 对 HepG2 细胞活力的影响。结果表明, 玳玳果黄酮提取物浓度 12.5~800.0 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 柚皮苷浓度 3.8~60.0 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 新橙皮苷浓度 4.4~70.0 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 其他相关组分浓度 4.4~70.0 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 非诺贝特浓度 10.0 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 对正常 HepG2 细胞活力无明显抑制作用, 可用于后续给药浓度的设定。

**3.1.2 对脂肪变性模型细胞脂质积聚作用** 油红 O 染色电镜下观察, 与正常组相比, 模型组可观察到明显红色脂滴积聚; 与模型组相比, 玳玳果黄酮提取物、新橙皮苷、柚皮苷、提取物敲除其他相关组分、非诺贝特组均出现红色脂滴数不同程度减少; 其他相关组分组脂滴数量无明显变化。油红 O 染色 OD 值测定结果, 与正常组相比, 模型组 OD 值显著升高; 与模型组相比, 玳玳果黄酮提取物、新橙皮苷、柚皮苷、提取物敲除其他相关组分、非诺贝特组 OD 值均显著降低(*P*<0.01); 其他相关组分组与模型组相比 OD 值差异无统计学意义。

结果表明, 玳玳果黄酮提取物、柚皮苷、新橙皮苷、提取物敲除其他相关组分样品均能改善脂肪变性模型脂滴分布并减少脂质积聚。玳玳果黄酮提取物组与非诺贝特 OD 值相近, 无显著性差异, 减少脂质积聚作用效果相当。提取物敲除其他相关组分组的药效仅次于玳玳果黄酮提取物组(*P*<0.05)。柚皮苷与新橙皮苷 2 组 OD 值相近, 无

显著性差异, 两者改善脂滴分布及减少脂质积聚效果相当。其他相关组分几乎无改善作用。故柚皮苷与新橙皮苷是玳玳果黄酮提取物降脂作用的主要贡献组分。结果见图 1 和表 2。

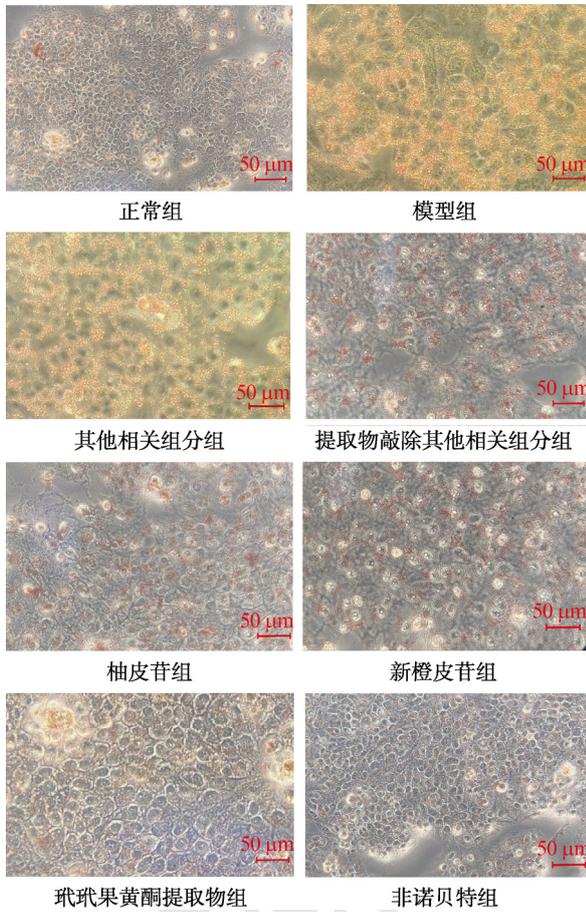


图 1 各组细胞油红 O 染色形态图(200×)

Fig. 1 Morphology of oil red O staining in each group(200×)

表 2 各组细胞油红 O 吸光度值测定结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab. 2 Determination results of absorbance value of oil red O in each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	油红 O 染色 OD 值
正常组	0.136 8±0.010 3
模型组	0.350 4±0.020 3 <sup>1)</sup>
其他相关组分	0.343 9±0.021 6
提取物敲除其他相关组分	0.212 1±0.019 7 <sup>2)</sup>
柚皮苷	0.231 2±0.003 5 <sup>2)3)</sup>
新橙皮苷	0.244 2±0.018 0 <sup>2)3)</sup>
玳玳果黄酮提取物	0.205 5±0.014 9 <sup>2)4)</sup>
非诺贝特组	0.181 2±0.011 2 <sup>2)3)</sup>

注: 与正常组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与提取物敲除其他相关组分相比, <sup>3)</sup> $P<0.01$ , <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with the extracts knocked out other related components group, <sup>3)</sup> $P<0.01$ , <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

3.1.3 对脂肪变性模型细胞 TG、TC 含量的影响与正常组相比, HepG2 脂肪变性模型细胞 TG、TC 含量显著升高( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 玳玳果黄酮提取物、新橙皮苷、柚皮苷、提取物敲除其他相关组分、非诺贝特组的 TG、TC 含量均显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 其他相关组分 TG、TC 含量无明显变化。

结果表明, HepG2 脂肪变性细胞模型成立; 玳玳果黄酮提取物、柚皮苷、新橙皮苷、提取物敲除其他相关组分均能改善脂肪变性模型细胞脂质水平, 其他相关组分几乎无降脂效果。玳玳果黄酮提取物与非诺贝特降脂效果相当。柚皮苷与新橙皮苷两者改善脂质水平效果相当, 是提取物降脂作用的主要贡献者, 即关键效应组分。结果见图 2。

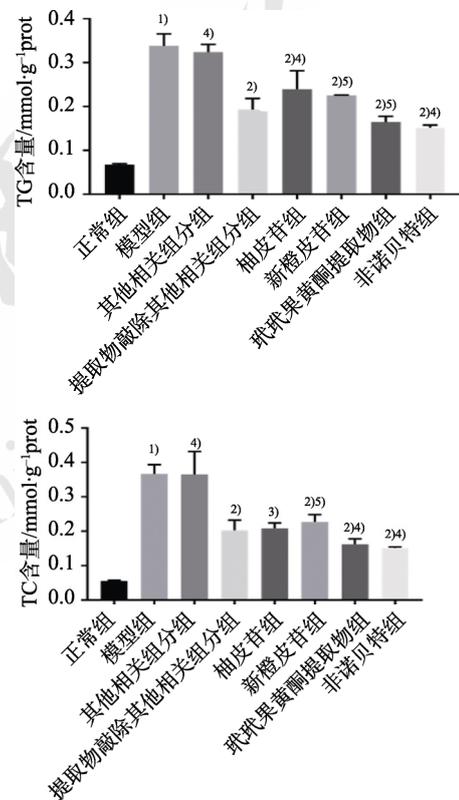


图 2 各组细胞 TG、TC 含量测定结果

与正常组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P<0.01$ , <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; 与玳玳果黄酮提取物组相比, <sup>4)</sup> $P<0.01$ , <sup>5)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 2 Results of determination of TG and TC content in cells of each group

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ , <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; compared with Daidai flavonoid extracts group, <sup>4)</sup> $P<0.01$ , <sup>5)</sup> $P<0.05$ 。

3.1.4 降脂作用贡献度及整体协同作用分析 与提取物敲除其他相关组分相比, 玳玳果黄酮提取物组降低 OD 和 TG、TC 含量最优, 差异有统计学意义( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ); 柚皮苷组、新橙皮

昔组降低 OD 和 TG、TC 含量不如提取物敲除其他相关组分，差异有统计学意义( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )；其他相关组分几乎无作用。

对于减少脂质积聚及降低细胞 OD 值和 TG、TC 含量的效果，玳玳果黄酮提取物(由关键效应组分与其他相关组分组成)表征出的降脂效果最佳，优于提取物敲除其他相关组分；且降脂药效玳玳果黄酮提取物>提取物敲除其他相关组分[柚皮苷-新橙皮苷(6:7)]组 $\geq$ 柚皮苷组 $\geq$ 新橙皮苷组，其他相关组分单独给药时对细胞脂质积聚几乎无影响。

因此，分别以玳玳果黄酮提取物、提取物敲除其他相关组分、柚皮苷、新橙皮苷干预后，均可显著降低细胞脂质含量并减少细胞脂质积聚；玳玳果黄酮提取物降脂关键效应组分为柚皮苷与新橙皮苷，两者是提取物降脂作用的主要贡献组分，最佳含量比为 6:7；玳玳果黄酮提取物敲除其他相关组分后降脂药效显著降低，故其他相关组分在玳玳果黄酮提取物中起到协同改善脂质积聚的作用。揭示了玳玳果黄酮提取物表征出的中药整体协同作用的特性。结果见表 2，图 1~2。

### 3.2 玳玳果黄酮提取物及关键效应组分对脂肪变性细胞调控脂质代谢机制研究

#### 3.2.1 影响 AMPK 关键靶点 mRNA 及 p-AMPK 蛋白表达

与正常组相比，HepG2 脂肪变性模型细胞的 AMPK mRNA 表达及磷酸化 p-AMPK 蛋白表达水平均显著下调( $P<0.01$ )。与模型组相比，玳玳果黄酮提取物、柚皮苷、新橙皮苷、非诺贝特组细胞 AMPK mRNA 表达及 p-AMPK 蛋白相对表达水平均显著升高( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )，其他相关组分表达水平差异无统计学意义。

提示，脂肪变性模型细胞的 AMPK mRNA 及 p-AMPK 蛋白表达水平被抑制；玳玳果黄酮提取物、柚皮苷、新橙皮苷、非诺贝特分别干预后，均能上调细胞 AMPK mRNA 及促磷酸化 p-AMPK 蛋白表达水平；柚皮苷、新橙皮苷与提取物表征出相同的基于 AMPK 信号通路的作用机制，是提取物的关键效应组分。结果见图 3。

#### 3.2.2 影响脂肪从头合成通路 SREBP-1c、ACC、FAS mRNA 及蛋白表达

##### 3.2.2.1 对 SREBP-1c mRNA 及蛋白表达的影响

与正常组相比，脂肪变性模型细胞 SREBP-1c mRNA

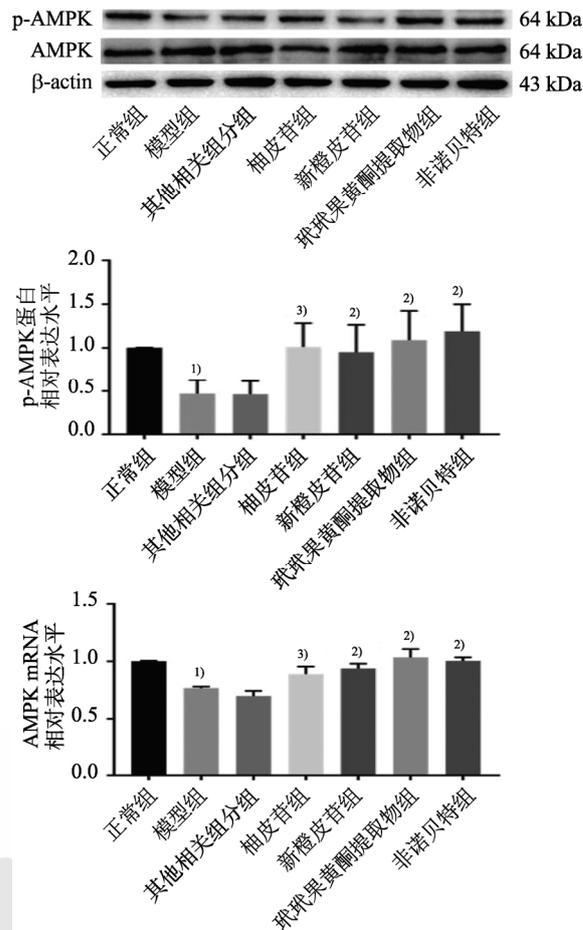


图 3 玳玳果黄酮提取物及敲出目标组分对脂肪变性模型细胞 AMPK mRNA 及 p-AMPK 蛋白表达的影响与正常组相比，<sup>1)</sup> $P<0.01$ ；与模型组相比，<sup>2)</sup> $P<0.01$ ，<sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of Daidai flavonoid extracts and its effect components on the expression of AMPK mRNA and p-AMPK protein in a steatosis cellular model Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ , <sup>3)</sup> $P<0.05$ .

和蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$ )。与模型组相比，玳玳果黄酮提取物、柚皮苷、新橙皮苷、非诺贝特组的细胞 SREBP-1c mRNA 及蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )，其他相关组分差异无统计学意义。

结果表明，细胞脂肪积聚时 SREBP-1c mRNA 和蛋白表达水平上调；而玳玳果黄酮提取物及关键效应组分柚皮苷、新橙皮苷对 SREBP-1c 的 mRNA 和蛋白表达量上调均表征出明显的抑制作用，可使其表达水平显著降低，抑制脂肪从头合成通路 SREBP-1c 靶点。结果见图 4。

##### 3.2.2.2 对 ACC mRNA 及蛋白表达的影响

与正常组相比，脂肪变性模型细胞的 ACC mRNA 及蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。与模型

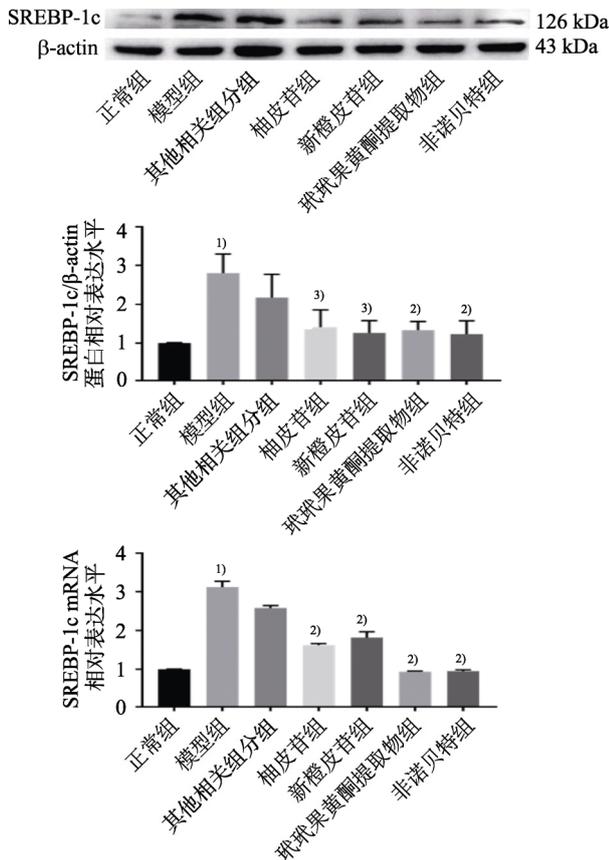


图 4 玳玳果黄酮提取物及敲出目标组分对脂肪变性模型细胞 SREBP-1c mRNA 及蛋白表达的影响  
与正常组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P<0.01$ , <sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effects of Daidai flavonoid extracts and its effect components on the Expression of SREBP-1c mRNA and Protein in a steatosis cellular model  
Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ , <sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

组相比, 玳玳果黄酮提取物、柚皮苷、新橙皮苷以及非诺贝特组的细胞 ACC mRNA 及蛋白相对表达水平均显著下降( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ), 其他相关组分差异无统计学意义。

结果表明, 脂肪变性细胞的 ACC mRNA 及蛋白表达水平升高, 玳玳果黄酮提取物、关键效应组分柚皮苷、新橙皮苷均对脂肪变性细胞的 ACC mRNA 及蛋白表达水平上调有明显的抑制作用, 可抑制脂质从头合成通路 ACC 靶点。结果见图 5。

**3.2.2.3 对 FAS mRNA 及蛋白表达的影响** 与正常组相比, 脂肪变性模型细胞的 FAS mRNA 及蛋白表达水平升高( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。与模型组相比, 玳玳果黄酮提取物、柚皮苷、新橙皮苷的细胞 FAS mRNA 及蛋白相对表达水平均显著下降( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ), 其他相关组分差异无统计学意义。

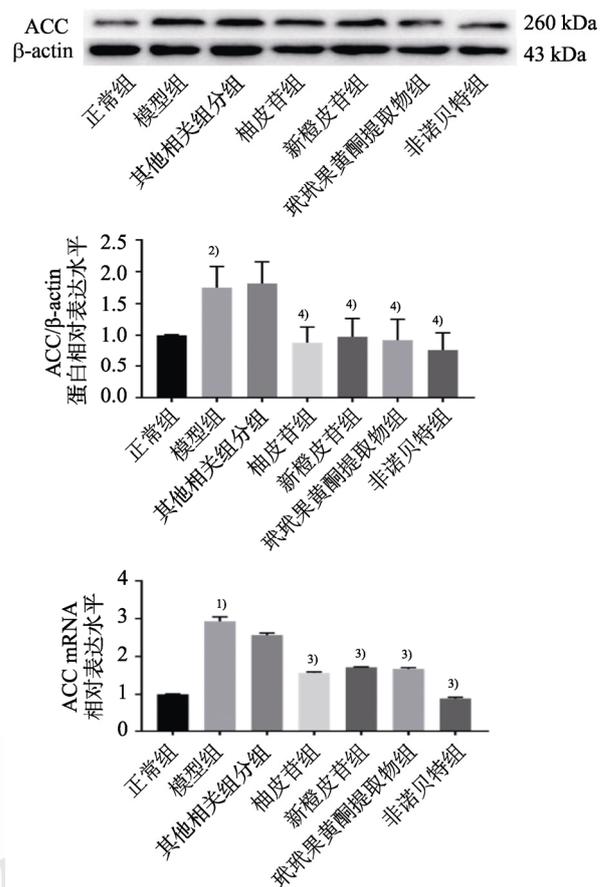


图 5 玳玳果黄酮提取物及敲出目标组分对脂肪变性模型细胞 ACC mRNA 及蛋白表达的影响  
与正常组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ , <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与模型组相比, <sup>3)</sup> $P<0.01$ , <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 5 Effects of Daidai flavonoid extracts and its effect components on the expression of ACC mRNA and protein in a steatosis cellular model  
Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ , <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with model group, <sup>3)</sup> $P<0.01$ , <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

结果表明, 脂肪变性模型细胞的 FAS mRNA 及蛋白表达水平升高, 玳玳果黄酮提取物及关键效应组分柚皮苷、新橙皮苷均对脂肪变性模型细胞 FAS mRNA 及蛋白表达水平上调有明显的抑制作用, 可抑制脂质从头合成通路的 FAS 靶点。结果见图 6。

### 3.2.3 影响脂肪酸氧化分解通路 PPAR $\alpha$ 、CPT-1 mRNA 及蛋白表达

**3.2.3.1 对 PPAR $\alpha$  mRNA 及蛋白表达影响** 与正常组相比, 脂肪变性模型细胞的 PPAR $\alpha$  mRNA 及蛋白表达水平显著下调( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。与模型组相比, 玳玳果黄酮提取物、柚皮苷、新橙皮苷及非诺贝特组的细胞 PPAR $\alpha$  mRNA 及蛋白相对表达水平均显著升高( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ), 其他相关组分差异无统计学意义。

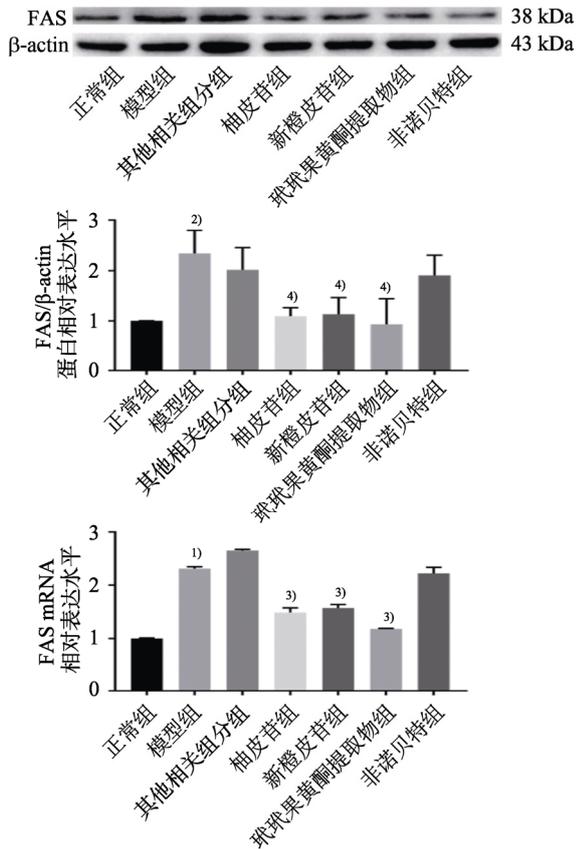


图 6 玳玳果黄酮提取物及敲出目标组分对脂肪变性模型细胞 FAS mRNA 及蛋白表达的影响

与正常组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , <sup>4)</sup> $P < 0.05$ 。  
**Fig. 6** Effect of Daidai flavonoid extracts and its effect components on the expression of FAS mRNA and protein in a steatosis cellular model  
 Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; compared with model group, <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , <sup>4)</sup> $P < 0.05$ .

结果表明, 脂肪变性模型细胞的 PPAR $\alpha$  mRNA 及蛋白相对表达水平被抑制, 玳玳果黄酮提取物及关键效应组分柚皮苷、新橙皮苷均对细胞的 PPAR $\alpha$  mRNA 及蛋白表达水平有明显的上调作用, 可通过 PPAR $\alpha$  靶点, 促进脂酸的氧化分解。结果见图 7。

**3.2.3.2 对 CPT-1 mRNA 及蛋白表达的影响** 与正常组相比, 模型细胞 CPT-1 mRNA 及蛋白表达水平显著下调( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 玳玳果黄酮提取物、柚皮苷、新橙皮苷及非诺贝特组的细胞 CPT-1 mRNA 及蛋白相对表达水平均显著升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 其他相关组分差异无统计学意义。

结果表明, 脂肪变性模型细胞的 CPT-1 mRNA 及蛋白表达被抑制, 玳玳果黄酮提取物及关键效应组分柚皮苷、新橙皮苷均对细胞的 CPT-1 mRNA

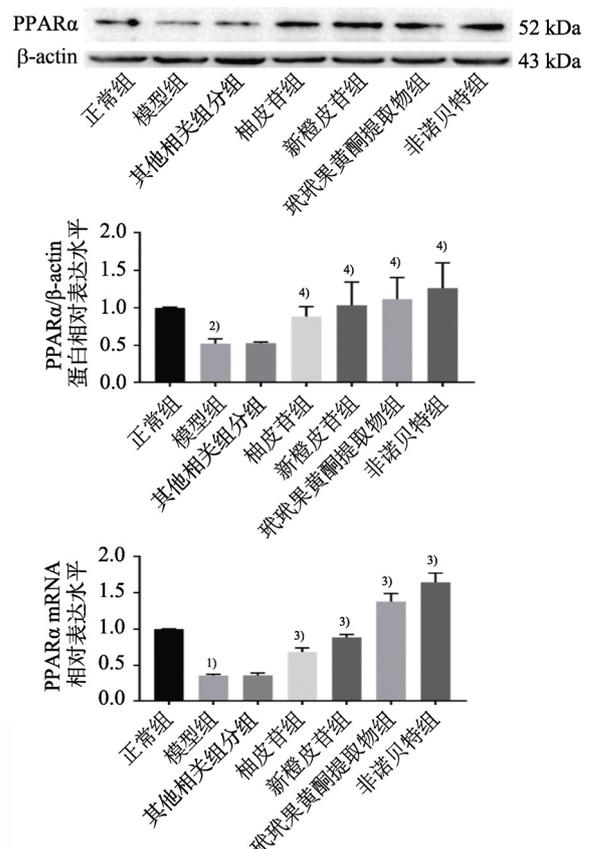


图 7 玳玳果黄酮提取物及敲出目标组分对脂肪变性模型细胞 PPAR $\alpha$  mRNA 及蛋白表达的影响

与正常组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , <sup>4)</sup> $P < 0.05$ 。  
**Fig. 7** Effect of Daidai flavonoid extracts and its effect components on the expression of PPAR $\alpha$  mRNA and protein in a steatosis cellular model  
 Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; compared with model group, <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , <sup>4)</sup> $P < 0.05$ .

及蛋白表达水平有明显的上调作用, 作用于 CPT-1 靶点, 参与促进脂酸氧化分解, 减少脂质积聚。结果见图 8。

#### 4 讨论

本实验采用常用于降脂类中药研究的 OA 诱导 HepG2 细胞建立脂肪变性模型<sup>[19-20]</sup>, 以贝特类降脂药物的代表非诺贝特为阳性对照药, 经预防性给药, 研究辨识玳玳果黄酮提取物降脂药效的关键效应组分。结果提示, 玳玳果黄酮提取物降脂作用的关键效应组分是柚皮苷、新橙皮苷; 玳玳果黄酮提取物(柚皮苷与新橙皮苷含量比为 6 : 7 及其他相关组分组成)的降脂药效最佳; 影响细胞脂质积聚药效排列为玳玳果黄酮提取物 > 提取物敲除其他相关组分  $\geq$  柚皮苷  $\geq$  新橙皮苷; 其他相关组分单独给药时对细胞脂质积聚几乎无影响, 但玳玳果黄酮提取物敲除其他相关组分后降

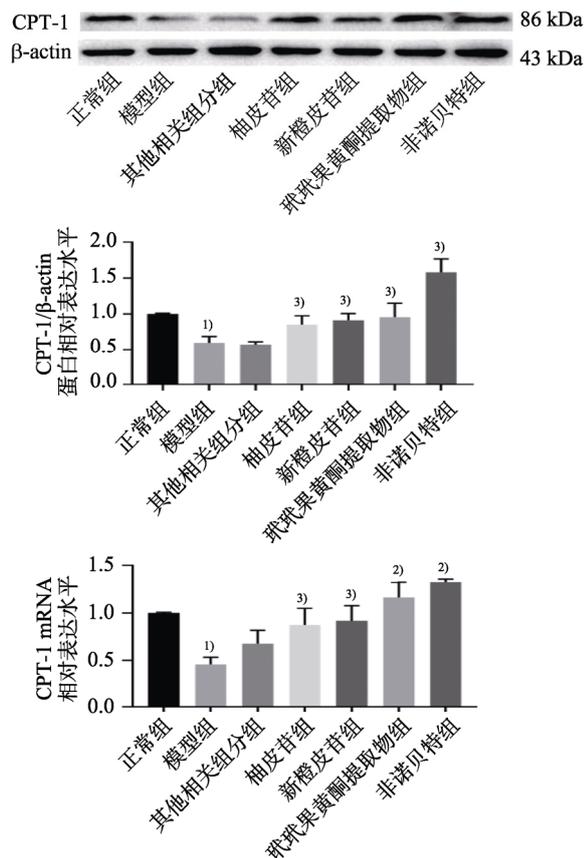


图 8 玳玳果黄酮提取物及敲出目标组分对脂肪变性模型细胞 CPT-1 mRNA 及蛋白表达的影响  
与正常组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , <sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

Fig. 8 Effect of Daidai flavonoid extracts and its effect components the expression of CPT-1 mRNA and protein in a steatosis cellular model

Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , <sup>3)</sup> $P < 0.05$ .

脂药效显著降低, 故提取物中其他相关组分对降脂药效的贡献在于, 能与关键效应组分一起发挥整体协同作用, 提高玳玳果黄酮提取物的药效作用; 同时也印证了笔者所在课题组前期对提取物药效物质基础效应组分群相对质量组成比例的研究结果; 揭示了玳玳果黄酮提取物整体协同作用的有效性。

AMPK 是机体能量代谢的关键靶点; SREBP-1c 主要分布在肝脏、脂肪组织, 可促进脂质合成, 影响 ACC、FAS 等下游靶点表达, SREBP-1c 的过度表达可引起脂质代谢紊乱, 而激活 AMPK 可下调 SREBP-1c 的表达, 从而抑制甘油三酯和脂肪酸的合成; PPAR $\alpha$  多分布在肝脏、肠道及心脏组织, 能诱导肝脏线粒体脂肪酸氧化限速酶 CPT-1 表达, AMPK 激活后促蛋白磷酸化, 可上调 PPAR $\alpha$  和 CPT-1 的表达, 增强线粒体对脂肪酸的氧化分

解<sup>[9-17]</sup>。故实验基于 AMPK/SREBP-1c 及 PPAR $\alpha$  信号通路, 探究玳玳果黄酮提取物调控脂质代谢的合成与氧化分解的多靶点的作用机制。

研究结果提示, 玳玳果黄酮提取物调控脂质代谢表征出多靶点的作用机制, 关键效应组分柚皮苷和新橙皮苷表征出与提取物相同的作用机制。它们均可通过激活能量代谢关键酶 AMPK 的 mRNA 水平促蛋白磷酸化表达, 从而显著抑制 AMPK 下游的 SREBP-1c、ACC、FAS 的 mRNA 及蛋白表达, 抑制脂质合成; 同时, 明显上调 PPAR $\alpha$ 、CPT-1 的 mRNA 及蛋白表达量, 促进脂肪酸氧化分解, 减少脂肪沉积; 由此改善脂质代谢紊乱, 发挥调控脂质代谢的作用。研究结果为阐释中药整体协同作用及多靶点协同作用机制提供了有益的研究思路。

## REFERENCES

- [1] 冉先德. 中华药海[M]. 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 1993: 964.
- [2] 肖培根. 中华药海第 2 卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 446.
- [3] 陈丹, 林超, 刘永静, 等. 代代的研究进展[J]. 福建中医学院学报, 2008, 18(1): 61-63.
- [4] CHEN D, LIU Y J. Method for preparing flavonoid effective part of Dai-Dai fruit: China, CN102058701A[P]. 2011-05-18.
- [5] QIU H X, CHEN D, LIU Y J, et al. Study on antiatherosclerosis effects of Daidai flavones dropping pills on hyperlipidemia rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(7): 597-601.
- [6] ZENG L J, CHEN D, HUANG Q D, et al. Isolation of a new flavanone from Daidai fruit and hypolipidemic activity of total flavonoids extracts[J]. Nat Prod Res, 2015, 29(16): 1521-1528.
- [7] ZENG L J, CHEN D, ZHENG L, et al. Studies on pharmacokinetics features of characteristic active ingredients of Daidai flavone extract in different physiological status[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(2): 309-315.
- [8] ZENG H P, CHEN D, CHEN H, et al. Research on intestinal absorption process and transfer mechanism *in vivo* of the flavonoid lipid-lowering extract from Daidai fruit[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(3): 286-293.
- [9] SUN Y, HUANG J J, YE K, et al. Effect of lindera aggregata extract on lipid-lowering and hepatic LKB1-AMPK pathway in hyperlipidemic rat model[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(7): 821-825.
- [10] LI X, WU L, NIU M Z, et al. Nebivolol inhibits high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in HK-2 cells via AMPK/NOX/ROS pathway[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(17): 2013-2020.
- [11] HARDIE D G, ROSS F A, HAWLEY S A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis[J]. Nat

- Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(4): 251-262.
- [12] CHEN K Y, LIN J A, YAO H Y, et al. Arctigenin protects against steatosis in WRL68 hepatocytes through activation of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B and AMP-activated protein kinase pathways[J]. Nutr Res, 2018(52): 87-97.
- [13] SONG Y Y, SUN Y, ZHANG C, et al. Epigallocatechin gallate regulates the lipid metabolism of HepG2 cells through the AKT/SREBP-1/FASN signaling pathway[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(18): 2200-2207.
- [14] LI Y, XU S, MIHAYLOVA M M, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice[J]. Cell Metab, 2011, 13(4): 376-388.
- [15] HA J H, JANG J, CHUNG S I, et al. AMPK and SREBP-1c mediate the anti-adipogenic effect of  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(3): 816-824.
- [16] KIM E N, LIM J H, KIM M Y, et al. PPAR $\alpha$  agonist, fenofibrate, ameliorates age-related renal injury[J]. Exp Gerontol, 2016(81): 42-50.
- [17] YIN J, LUO Y, DENG H, et al. Huga Qingzhi medication ameliorates hepatic steatosis by activating AMPK and PPAR $\alpha$  pathways in L02 cells and HepG2 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(1): 229-239.
- [18] XIONG C D, CHEN D, HONG L T, et al. Preparation and knockout separation of effective components including neohesperidin and naringin in Daidai flavonoid extracts[J]. Fujian J Tradit Chin Med(福建中医药), 2020, 51(4): 32-35.
- [19] BARBERO-BECERRA V J, GIRAUDI P J, CHÁVEZ-TAPIA N C, et al. The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an *in vitro* model of NASH[J]. Toxicol in Vitro, 2015, 29(7): 1753-1758.
- [20] BAN D J, WEI W, SHEN C, et al. Costunolide inhibits ethanol-induced hepatocyte injury and steatosis[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31(4): 608-614.

收稿日期: 2021-07-27

(本文责编: 陈怡心)