

泽泻汤对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的抑制作用

李 甜^{1,2}, 廖茂梁^{2,3*}, 郑雅楠², 王 阳^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

3. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 评价泽泻汤 95%乙醇、50%乙醇和水提取物抑制 HepG2 肝细胞脂肪累积能力。方法 采用油酸诱导 HepG2 细胞脂肪累积建立模型,以噻唑兰染色和油红 O 染色法吸光度值为指标,结合细胞内脂滴形态,评价泽泻汤对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪累积的干预作用。结果 泽泻汤提取物作用 HepG2 细胞后,经染色后均发现细胞内脂滴明显减少,且质量浓度越高脂类含量越少,50%乙醇提取物和水提取物在终质量浓度 160、320 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞内脂滴与模型组相比明显降低 ($P<0.01$),95%乙醇提取物 80 $\mu\text{g/mL}$ 作用细胞 24 h 后,细胞内脂滴较模型组有减少 ($P<0.05$)。结论 3 种泽泻汤提取物均能够减少细胞内脂肪的堆积,其中以 50%乙醇提取物对 HepG2 细胞脂肪堆积抑制能力最强。

关键词: 泽泻汤; HepG2 细胞; 油酸; 细胞脂肪累积; 油红 O 染色

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)05-0772-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.05.004

Inhibition of Zexie Decoction on oleic acid-induced fat accumulation in HepG2 cells

LI Tian^{1,2}, LIAO Mao-liang^{2,3}, ZHENG Ya-nan², WANG Yang¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To evaluate the effects of 95% ethanol, 50% ethanol, and distilled water extracts from Zexie Decoction on fat accumulation of HepG2 hepatic cells. **Methods** Fat accumulation model in HepG2 cells was induced by oleic acid. Absorptions of MTT method and oil red O method and intracellular lipid droplet morphology were used to evaluate the effect of Zexie Decoction on oleic acid-induced fat accumulation in HepG2 cells. **Results** The lipid droplet of HepG2 cells was significantly reduced after cultivation with Zexie Decoction extracts, and the higher concentration, the less lipid contents. After culturing with 50% ethanol extract (160 $\mu\text{g/mL}$) and water extract (320 $\mu\text{g/mL}$), the lipid droplet of HepG2 cells reduced significantly compared with model group ($P<0.01$), and after culturing with 95% ethanol extract with the maximum concentration of 80 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h. the lipid droplet of HepG2 cells was also reduced ($P<0.05$). **Conclusion** Three extracts of Zexie Decoction show the effect of lipid-decreasing, and 50% ethanol extract is the best lipid-lowering ingredient.

Key words: Zexie Decoction; HepG2 cells; oleic acid; fat accumulation; oil red O staining

泽泻汤出自于东汉张仲景《金匮要略》,以泽泻与白术相配伍,具有渗泻水饮、扶助脾胃之功效,用治“心下有支饮,其人苦冒眩”证。泽泻与白术的配伍作为临床利水健脾的基础药被历代医家重视。现代研究表明,泽泻汤具有利尿、减轻内耳淋

巴水肿、降血压、降血脂、抗动脉硬化等作用^[1]。泽泻汤水煎液还具有一定的降胆固醇作用^[2]。本实验用不同溶剂提取泽泻汤剂,得到的 3 种提取物,作用于油酸诱导脂肪化的 HepG2 脂肪堆积细胞模型,评价泽泻汤剂对肝细胞脂肪累积的干预能力。

收稿日期: 2017-03-13

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(14JCQNJC13800; 天津市科技计划项目 (14ZCZDSY00005))

作者简介: 李 甜 (1991—), 女, 天津中医药大学硕士研究生。Tel: 13821829552 E-mail: Luris_1111@163.com

***通信作者** 王 阳 (1966—), 女, 天津中医药大学教授, 硕士生导师, 研究方向为药物制剂。

廖茂梁 (1981—), 男, 天津药物研究院副研究员, 研究方向为新药研发。Tel: 13072008557 Email: liaomaoliang@163.com

1 材料

泽泻、白术药材均购自安国市同義中药饮片厂有限公司,批号分别为 13080051、1301006,经天津药物研究院廖茂梁副研究员鉴定均符合《中国药典》2015 年版一部的相关规定;HepG2 细胞(人体肝癌细胞)购自美国模式培养物集存库(ATCC);DMEM 培养基(批号 993010,美国 Gibco 公司);胎牛血清 FBS(批号 NWC0388, Gibco);MTS 试剂盒(批号 0429,北京赛默生物科技有限公司);油红 O 染料(批号 O0625,美国 Sigma 公司);胰蛋白酶(批号 29180064,美国 Gibco 公司)。

RT-6000 型酶标分析仪(深圳书社生命科学股份有限公司);CO-ICXDS-1B 型倒置光学显微镜(重庆光电仪器有限公司);离心机(美国 Sigma 公司);二氧化碳恒温培养箱(Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 泽泻汤不同提取物的制备

按泽泻与白术质量比为 15:6 称取方中各药味共 100 g,分别加入 10 倍量 95%乙醇、50%乙醇和水,加热回流提取 2 次,每次提取 1.5 h,滤过,合并滤液,减压浓缩至稠膏状,置减压干燥器中,减压干燥成干膏,粉碎成粉末,分别获得泽泻汤 95%乙醇提取物 8.31 g,出膏率为 8.31%;泽泻汤 50%乙醇提取物 25.18 g,出膏率为 25.18%;泽泻汤水提取物 35.37 g,出膏率为 35.37%。

2.2 泽泻汤提取物细胞供试品溶液的制备

精密称取 320 mg 泽泻汤 95%乙醇、50%乙醇和水提取物粉末,加 1 mL DMSO 溶解,用 DMEM 高糖培养基稀释 100 倍,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得质量浓度均为 3.2 mg/mL 的泽泻汤 3 种提取物储备液。用 DMEM 高糖培养基依次稀释 3 种储备液,得到不同质量浓度的细胞供试品溶液。

2.3 油酸储备液制备

70 $^{\circ}\text{C}$ 震荡水浴下,将油酸溶于 0.1 mmol/L NaOH,配制成 100 mmol/L 储备液,滤过除菌,备用^[3]。

2.4 细胞培养

HepG2 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。当细胞达 80%~90%密度时传代。分别取对数生长期的细胞接种于 96、6 孔培养板进行实验。

2.5 泽泻汤提取物对细胞活力的影响

对数增长期细胞经胰酶(美国 Gibco 公司)消

化后接种于 96 孔板,每孔加入细胞悬液 180 μL ,细胞密度为 1×10^4 个/mL。待细胞充分贴壁后加入泽泻汤提取物,每孔 20 μL ,使终质量浓度分别为 20、40、80、160、320 $\mu\text{g/mL}$ 。对照组每孔 20 μL 的 DMEM,每组 5 个复孔。作用 24 h 后,每孔加 20 μL MTS,处理 3.5 h 后测定 490 nm 波长处吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药 } 490 \text{ nm}} / A_{\text{对照 } 490 \text{ nm}}$$

式中 $A_{\text{对照 } 490 \text{ nm}}$ 为对照组吸光度值, $A_{\text{给药 } 490 \text{ nm}}$ 为给药组吸光度值。

2.6 油酸诱导 HepG2 细胞脂肪化模型的建立

MTS 法筛选出无细胞毒性的油酸钠质量浓度后,按 20×10^4 个/mL 密度将 HepG2 接种于 6 孔培养板,孵育 24 h 后取出,设对照组和模型组^[4]。对照组加 100 μL DMEM 培养基,模型组加 50 μL 油酸溶液和 50 μL DMEM。将 6 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中继续孵育 24 h 后,油红 O 染色,置光镜下观察。

2.7 油红 O 染色

按 20×10^4 个/mL 细胞密度将 HepG2 接种于 6 孔培养板中,设对照组、模型组、给药组。对照组加入空白 DMEM 培养基 100 μL ,模型组加油酸钠溶液 50 μL 和 50 μL DMEM,给药组加 50 μL 油酸钠和 50 μL 样品液,每组设 5 复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后, PBS 冲洗 3 遍,10%福尔马林固定 40 min,室温条件下; PBS 冲洗 3 遍,用油红 O 工作液(油红 O 溶于异丙醇配成 0.5%油 O 贮备液,以 3:2 的比例将贮备液与蒸馏水混匀后滤过,至液体澄清,即得油红 O 工作液^[5])染色 20 min,室温条件下; PBS 缓冲液洗 2 次;倒置显微镜观察细胞内脂滴染色情况。用 60%异丙醇被染色的脂滴溶出后,用酶标仪测定各组 485 nm 处 A 值^[6], A 值大小反映了脂质的含量。

2.8 统计分析

采用 SPSS 17.0 数据分析软件对实验数据进行处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验法比较组间差异。

3 结果

3.1 泽泻汤提取物对 HepG2 细胞的毒性

高质量浓度泽泻汤提取物对 HepG2 细胞有一定的毒害作用,细胞存活率在 90%以上,对细胞毒害作用很小。所以 95%乙醇提取物的可使用质量浓度在 0~80 $\mu\text{g/mL}$; 50%乙醇提取物的可使用质量

浓度在 0~160 $\mu\text{g/mL}$ ；水提取物的可使用质量浓度在 0~320 $\mu\text{g/mL}$ 。见表 1。

表 1 泽泻汤提取物对 HepG2 细胞的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 1 Cytotoxicity of Zexie Decoction extracts on HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100
95%乙醇 提取物	20	100.00 $\pm$ 0.00
	40	99.41 $\pm$ 0.00
	80	99.41 $\pm$ 0.01
	160	84.81 $\pm$ 0.01*
	320	64.00 $\pm$ 0.02**
50%乙醇 提取物	20	92.85 $\pm$ 0.00
	40	96.65 $\pm$ 0.01
	80	90.84 $\pm$ 0.02
	160	92.19 $\pm$ 0.00
	320	79.26 $\pm$ 0.01*
水提取物	20	97.73 $\pm$ 0.01
	40	94.88 $\pm$ 0.00
	80	95.73 $\pm$ 0.00
	160	99.15 $\pm$ 0.00
	320	96.30 $\pm$ 0.01

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 油红 O 染色

3.2.1 油酸对 HepG2 细胞活力的影响 油酸浓度在 62.5~250 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率在 90% 以上, 无细胞毒性; 当浓度 ≥ 500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率明显降低, 说明该浓度已对 HepG2 细胞有毒性作用。所以造模时油酸钠的浓度上限是 250 $\mu\text{mol/L}$ 。见表 2。

表 2 油酸对 HepG2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of oleic acid on activities of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A 值	细胞存活率/%
对照	—	1.122 $\pm$ 0.039	100.00
油酸	62.5	1.011 $\pm$ 0.016	90.10
	125	1.201 $\pm$ 0.010	91.00
	250	1.010 $\pm$ 0.025	90.03
	500	0.898 $\pm$ 0.017	80.05**
	1 000	0.838 $\pm$ 0.034	74.67**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

3.2.2 油红 O 染色观察 对照组中 HepG2 细胞均呈近卵球形生长, 边缘清晰, 胞浆丰富, 细胞边缘未见红色油滴沉积。150 $\mu\text{mol/L}$ 油酸处理的模型组中, 细胞内可见明显的红色脂滴环绕于胞核周围, 表明建模成功。见图 1。

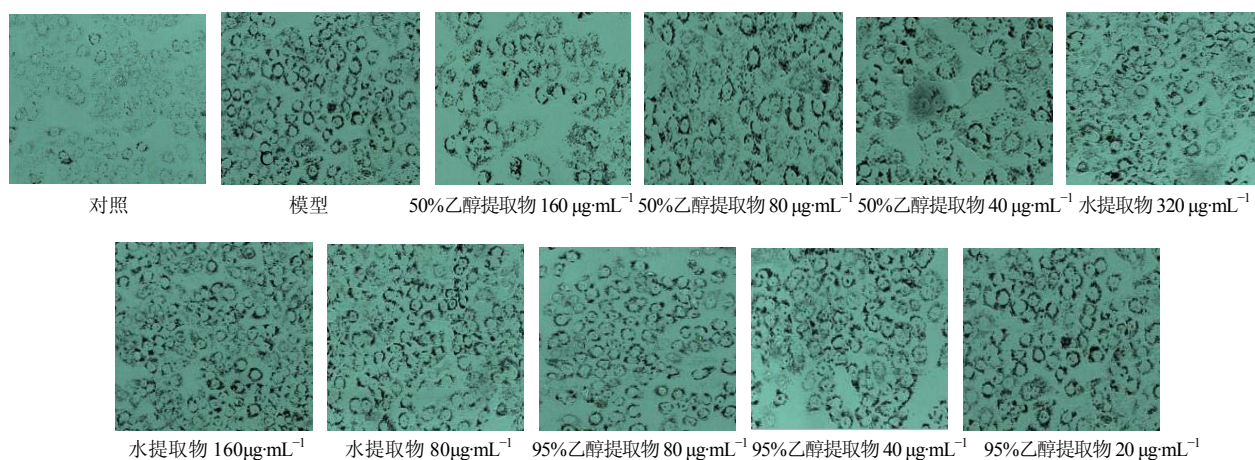


图 1 HepG2 细胞油红 O 染色

Fig. 1 Oil red dye of HepG2 cells

通过光学显微镜进一步进行形态学观察, 随着泽泻汤提取物质量浓度的增加, HepG2 细胞内红色脂滴呈现逐渐下降的趋势。随着提取物剂量的增加, HepG2 细胞内红色脂滴含量呈现减少的趋势, 且脂

滴变小, 颜色变浅。提示泽泻汤 3 种提取物均可有效降低 HepG2 细胞脂滴含量, 对脂肪肝可能具有一定的防治作用。

3.2.3 染色脂滴的吸光度值 被染色的脂滴可由

60%异丙醇溶出,且在 485 nm 处有吸收^[8]。对照组细胞内脂滴与模型组比较有极显著性差异 ($P<0.01$),说明脂肪化造模成功。油酸刺激 24 h 后,与对照组比较,模型组 HepG2 细胞内脂滴含量明显升高 ($P<0.01$),表明造模成功。在 50%乙醇提取物和水提取物 160、320 $\mu\text{g/mL}$ 作用下时,细胞内脂滴与模型组相比明显降低 ($P<0.01$),对脂肪累积有干预作用;在 80、160 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞内脂滴也有所减少 ($P<0.05$);95%乙醇提取物 160、320 $\mu\text{g/mL}$ 作用细胞 24 h 后,细胞内脂滴较模型组有减少 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 染色后脂滴的吸光度值 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 3 Absorption value of lipid droplet ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值
对照	—	0.316 $\pm$ 0.02
模型	—	0.525 $\pm$ 0.00**
95%乙醇提取物	20	0.521 $\pm$ 0.00
	40	0.512 $\pm$ 0.01
	80	0.417 $\pm$ 0.00 [#]
50%乙醇提取物	40	0.358 $\pm$ 0.01 [#]
	80	0.350 $\pm$ 0.02 [#]
	160	0.340 $\pm$ 0.00 ^{##}
水提取物	80	0.391 $\pm$ 0.00
	160	0.359 $\pm$ 0.00 [#]
	320	0.322 $\pm$ 0.01 ^{##}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

因此可知泽泻汤 50%乙醇提取物的降脂能力最强。脂滴降低呈较明显的剂量相关性。通过 3 组泽泻汤提取物改善细胞内脂肪堆积现象可推测,泽泻汤具有良好的降脂活性。

3 讨论

本研究结果显示,泽泻汤 3 种提取物,即 95%乙醇提取物、50%乙醇提取物及水提取物作用培养脂肪化 HepG2 细胞后明显抑制细胞内脂质的累积。有文献报道,泽泻汤总提物及其 100%、50%乙醇部位可能通过增强肝脏内调节脂蛋白代谢的酶活性,进而明显影响总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白、

高密度脂蛋白等血脂组分的代谢,而发挥调节血脂水平的作用^[7]。其可能机制为汤剂中的泽泻三萜类化合物和白术内酯,通过抑制胆固醇和三酰甘油的生物合成途径中一个或几个环节,从而达到降低胆固醇和三酰甘油的目的。本文实验结果显示 50%乙醇提取物干预 HepG2 细胞内脂肪累积作用最为明显,说明除了三萜类成分有降脂外,部分水提取物也有降脂活性,需进一步将所得 95%乙醇提取物、50%乙醇提取物和水提取物采用 HPLC 法测定其中的 23-乙酰泽泻醇 B 和白术内酯含量。泽泻汤降低脂质堆积的机制也可以通过体外降脂实验,如胆固醇胶束溶解度抑制试验、脂肪酶活性抑制试验以及 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶还原酶活性抑制试验进一步确定其机制^[9]。

参考文献

- [1] 付涛,姜淋捷,陈桂林,等.泽泻汤降血脂及抗氧化作用有效部位的研究[J].时珍国医国药,2012,23(2):266-268.
- [2] 朱广伟,张贵君,汪萌.不同配伍比例的泽泻汤降血脂作用研究[J].中华中医药学刊,2015,33(1):189-191.
- [3] 章斌,刘艳,张春风,等.漏芦对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪累积的干预作用[J].亚太传统医药,2013,9(5):10-12.
- [4] 张露,谢作权,宋怀光,等.银杏叶提取物 GBE50 对培养细胞内胆固醇代谢的影响[J].中国药理学通报,2008,24(3):313-317.
- [5] 张志辉,邓安珺,于金倩,等.黄连碱药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2013,38(17):2750-2754.
- [6] Han C W, Kwun M J, Kim K H, et al. Ethanol extract of *Alismatis Rhizoma* reduces acute lung inflammation by suppressing NF- κ B and activating Nrf2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(1): 402-410.
- [7] 黄晓飞,周蕾,彭晓辉,等.泽泻汤及其乙醇部位对高血症大鼠血脂及血脂代谢相关酶的影响[J].湖北中医药大学学报,2013,16(6):3-6.
- [8] Cao P, Huang G, Yang Q, et al. The effect of chitooligosaccharides on oleic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells [J]. *Saudi Pharm J*, 2016, 24(3):292-298.
- [9] 姜运耀,吕国英,李燕飞,等.植物来源的胰脂肪酶抑制剂研究进展[J].中国生化药物杂志,2012,33(2):199-202.