

辣木叶水提物对油酸钠-钠棕榈酸酯诱导的HepG2细胞脂质代谢及抗氧化能力的影响

伍卫红¹, 黄燕秋¹, 李嘉俊¹, 敬美莲¹, 黄永昌¹, 杨卓凡², 张子恒², 燕宇轩², 宣攸威², 胡巨豪², 杨舒乔², 周红祖^{3*}, 余惠旻^{2*}

1. 广东江门中医药职业学院, 广东 江门 529000

2. 深圳大学 医学部, 广东 深圳 518060

3. 深圳市中医院, 广东 深圳 518020

摘要: 目的 探讨辣木叶水提物(MOLAE)对脂肪堆积人HepG2细胞的调节作用。方法 制备MOLAE冻干粉;通过CCK-8法检测油酸钠-钠棕榈酸酯(O-P)对HepG2细胞活力的影响、油红O染色检测O-P对细胞脂质堆积的影响、试剂盒法检测O-P对细胞三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)水平的影响,筛选O-P诱导HepG2细胞脂质代谢异常模型的作用浓度及时间;CCK-8法检测辛伐他汀、MOLAE对HepG2细胞活力的影响,筛选安全作用浓度;设立对照组、模型组、辛伐他汀(阳性药, 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组和MOLAE(3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,除对照组外,其他各组均给予0.4-0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的O-P诱导细胞脂质沉积,诱导3 h后开始给药,干预24 h后,CCK-8法检测细胞活性,油红O染色观察细胞中脂滴形成情况,试剂盒法测定细胞中TG、TC、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)水平。**结果** 确定造模方式为:0.4-0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的O-P作用HepG2细胞3 h后开始给药;10、15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的辛伐他汀和3.125~100.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的MOLAE作用于HepG2细胞24、48 h后,不影响细胞活力。与模型组比较,不同浓度的MOLAE(3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)均能降低TG、TC、MDA水平($P<0.05$ 、 0.01),显著升高GSH、SOD水平($P<0.05$ 、 0.01)。油红O染色结果表明,辛伐他汀组和MOLAE组(12.5、25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)脂滴堆积现象均较模型组有明显改善。**结论** MOLAE能够降低O-P诱导的HepG2细胞中TG、TC水平,提高GSH、SOD水平和降低MDA水平,减少细胞中脂质堆积的现象。

关键词: 辣木叶水提物; 油酸钠-钠棕榈酸酯; HepG2细胞; 脂质堆积; 调血脂; 抗氧化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)10-2152-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.10.011

Effects of *Moringa oleifera* leaf aqueous extract on lipid metabolism and antioxidant capacity in HepG2 cells induced by sodium oleate-sodium palmitate

WU Weihong¹, HUANG Yanqiu¹, LI Jiajun¹, JING Meilian¹, HUANG Yongchang¹, YANG Zhuofan², ZHANG Ziheng², YAN Yuxuan², XUAN Zanwei², HU Juhao², YANG Shuqiao², ZHOU Hongzu³, YU Huimin²

1. Guangdong Jiangmen Chinese Medicine College, Jiangmen 529000, China

2. School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

3. Shenzhen Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518020, China

Abstract: **Objective** To investigate the regulating effects of *Moringa oleifera* leaf aqueous extract (MOLAE) on lipid abnormality in human HepG2 cells. **Methods** Detect the effect of sodium oleate-sodium palmitate (O-P) on HepG2 cell viability using the CCK-8 method, the effect of O-P on cell lipid accumulation using oil red O staining, and the effect of O-P on cell triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) levels using the kit method. Screen the concentration and time of O-P induced abnormal lipid metabolism model in HepG2 cells. The CCK-8 method was used to detect the effects of simvastatin and MOLAE on the viability of HepG2 cells, and to screen for safe concentrations of action. Establish control group, model group, and simvastatin (positive drug, 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group

收稿日期: 2023-06-08

基金项目: 广东省教育厅普通高校认定类科研项目(2020KTSCX342); 深圳市药学会医院药学研究基金(恒瑞基金)(SZ2022A25); 深圳市基础研究面上项目(JCYJ20220531102208019); 深圳大学2023年度聚徒项目(聚徒+学术)

第一作者: 伍卫红(1968—), 女, 副教授, 研究方向为天然药物的研究与开发。E-mail: 782999160@qq.com

*共同通信作者: 周红祖, 女, 主任药师, 广东省中医药传承人, 主要从事中药鉴定与药理学研究。E-mail: zhouhzu@163.com

余惠旻, 男, 副研究员, 博士, 主要从事中药及复方药理研究。E-mail: yuhuimin@szu.edu.cn

and the MOLAE (3.125, 6.250, 12.500, 25.000, 50.000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) group, except for the control group, were all given O-P of 0.4-0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ to induce cell lipid deposition. After induction for 3 h, the drug was administered. After 24 hours of intervention, cell activity was detected using CCK-8 method, lipid droplet formation was observed using oil red O staining, and the levels of TG, TC, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) in cells were measured using a kit method. **Results** The modeling method was determined as follows: Administration of O-P with a concentration of 0.4-0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ was initiated on HepG2 cells for 3 h. Simvastatin with 10 and 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and MOLAE of 3.125—100.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ did not affect cell viability after 24 and 48 hours of action on HepG2 cells. Compared with the model group, different concentrations of MOLAE (3.125, 6.250, 12.500, 25.000, 50.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) can reduce the levels of TG, TC, and MDA ($P < 0.05, 0.01$), and significantly increase the levels of GSH and SOD ($P < 0.05, 0.01$). The oil red O staining results showed that the accumulation of lipid droplets in the simvastatin group and MOLAE (12.5, 25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group was significantly improved compared with model group. **Conclusion** MOLAE can reduce TG and TC levels in model group, increase GSH and SOD levels and reduce MDA levels, reduce lipid accumulation in cells and prevent lipid damage.

Key words: *Moringa oleifera* leaf aqueous extract; sodium oleate-sodium palmitate; HepG2 cell; lipid accumulation; hypolipidemic effect; antioxidant

近年来,伴随生活水平的不断改善,血脂异常人群的数量居高不下,据统计,14.12亿中国人,成年人有8.5亿,血脂异常的人数高达3.026亿,且呈现出年轻化的趋势^[1]。高血脂症的危害很多,加剧肥胖,进而引发肠道微生态失衡、动脉粥样硬化、冠心病、糖尿病、肝脏的相关脂肪性病变、神经退行性疾病、骨关节炎以及组织癌变等^[2]。临床上一线治疗药物——他汀类药物的长期使用,会引起肌肉疼痛、肌肉炎症反应、肝功能异常及停药后易反弹等副作用^[3]。因此,从药食同源的资源中获取安全、有效的降脂类产品成为当下研究的热点和难点问题。

辣木 *Moringa oleifera* Lam. 为辣木科辣木属植物,根、茎、叶、花、枝、种子和树皮都被长期食用和药用,我国卫生部于2012年批准将辣木叶作为新食品资源^[4]。经文献考证,国内学者对辣木叶的研究主要集中在降血糖及抗氧化等方面^[5-7],对其在血脂调节方面的研究匮乏。本研究通过油酸钠-钠棕榈酸酯(O-P)诱导HepG2细胞建立体外脂质代谢异常模型,结合细胞中三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)的检测,综合评价辣木叶水提物(*Moringa oleifera* leaf aqueous extract, MOLAE)体外调控血脂水平及抗氧化的作用,为辣木叶降血脂药物的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人肝癌细胞HepG2,由深圳大学医学部细胞中心提供。

1.2 细胞

辣木叶购自扶风斯诺特生物科技有限公司,由

深圳市中医院中药科周红祖主任药师鉴定为辣木科辣木属植物辣木 *Moringa Oleifera* Lam. 的干燥叶片;辛伐他汀(北京索莱宝公司,批号IS0170);DMEM高糖培养基、0.25%胰酶(美国Gibco公司);胎牛血清(北京G-clone公司);细胞培养皿(广州BIOFIL公司);油酸钠、钠棕榈酸酯(美国麦克林公司);TC、TG、GSH、SOD、MDA及总蛋白定量测定(BCA法)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司;CCK-8活性检测试剂盒(美国MCE公司)。

1.3 主要仪器

371细胞培养箱、1300 SERIES A2生物安全柜(美国Thermo公司);CKX53倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);Infinite M200微孔板检测仪(瑞士TECAN公司)。

2 方法

2.1 MOLAE冻干粉的制备

由本实验室自制,取辣木干叶于60℃烘箱中,烘2h至恒质量,粉碎得到辣木干叶粉。准确称取1kg辣木干叶粉,加8倍蒸馏水浸泡30min,加水煎煮3次,每次30min,滤过合并3次滤液,冷冻干燥,每克干粉相当于生药10g。经芦丁标准曲线法,测得总黄酮的质量分数为7.014%。

2.2 O-P母液的配制

精确称量0.018g油酸钠、0.033g钠棕榈酸酯,分别加入3mL培养基,混匀后于75℃水浴加热至溶解。将油酸钠与20%牛血清白蛋白(BSA)溶液混合、钠棕榈酸酯与40%BSA混合,得到10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 油酸钠母液与20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 钠棕榈酸酯母液,用0.22 μm 滤器滤过除菌后于4℃保存备用。

2.3 O-P 诱导 HepG2 脂质代谢异常细胞模型的建立

2.3.1 不同浓度 O-P 对细胞活性的影响 取 HepG2 对数生长期细胞,用 DMEM 高糖培养基制成细胞悬液($1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$)加入 96 孔板、每孔 100 μL , 12 h 后分别加入低、中、高浓度分别为 0.2-0.1、0.4-0.2、0.8-0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 O-P, 对照组不加 O-P, 空白组不接种细胞、不加 O-P。分别培养 24、48 h 后, CCK-8 法检测各组细胞活性(每组设置 6 个复孔), 应用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度(A)值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3.2 不同浓度 O-P 对细胞脂质堆积的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞, 以每孔 $3 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板内, 每孔加入 1 mL 细胞悬液, 待细胞贴壁后, 更换为含终浓度为 0.2-0.1、0.4-0.2、0.8-0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 O-P 的 DMEM 高糖培养基培养 24 h, 对照组不加 O-P。

弃去 6 孔板内的培养液, 磷酸盐缓冲液(PBS)轻缓漂洗 2 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液(每孔 1 mL)固定 30 min 后, 用 PBS 轻缓漂洗 2 次, 每孔加入 1.5 mL 油红 O 应用液(现配现用, 避光保存, 2 h 内使用), 染色 10~15 min 后, 用蒸馏水漂洗 1 次, 用 60% 的异丙醇漂洗 1 次(约 30 s), 洗去多余的油红 O 染液至背景透明, 显微镜观察采集图片。

2.3.3 不同浓度 O-P 对细胞 TC、TG 水平的影响 细胞接种方式同“2.3.2”项, 待细胞贴壁后, 更换为含 O-P 终浓度为 0.2-0.1、0.4-0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DMEM 高糖培养基培养 24、48 h, 对照组不加 O-P。吸去原有培养基, 用 PBS 对贴壁细胞进行清洗后, 按照每孔 80 μL 加入 Triton X-100 溶液(1% 无菌)裂解 30 min, 刮下细胞后按试剂盒说明, 对细胞内的 TC、TG 水平进行测定。

2.3.4 中浓度 O-P 作用 HepG2 细胞不同时间对 TG 水平的影响 细胞接种方式同“2.3.2”项, 待细胞贴壁后, 更换为含终浓度为 0.4-0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 O-P 的 DMEM 高糖培养基培养 3、6、12、24、48 h, 对照组不加 O-P。试剂盒法检测 TG 水平, 具体操作同“2.3.3”项。

2.4 辛伐他汀、MOLAE 对 HepG2 细胞活性的影响

CCK-8 法检测辛伐他汀(10、15、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、MOLAE(3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对 HepG2 细胞活力的影响, 方法同“2.3.1”项。

2.5 MOLAE 对 O-P 诱导的 HepG2 细胞脂质水平及氧化应激相关指标的影响

2.5.1 实验分组及给药 细胞接种方式同“2.3.2”

项, 待细胞贴壁后分为对照组、模型(O-P: 0.4-0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)组、MOLAE(3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组、辛伐他汀(15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组, 除对照组外, 其余各组均给予 O-P 0.4-0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 作用 3 h 后给予相应的受试药物, 作用 24 h。每组设置 3 个复孔。

2.5.2 细胞内脂质、氧化应激指标的测定 试剂盒法检测 TC、TG、GSH、SOD 及 MDA 水平, 具体操作同“2.3.3”项。

2.5.3 细胞脂质堆积检测 油红 O 染色检测 MOLAE(12.5、25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对 O-P 诱导的 HepG2 细胞脂质堆积的影响, 具体操作同“2.3.2”项。

2.6 数据分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验。

3 结果

3.1 O-P 诱导 HepG2 脂质代谢异常细胞模型的建立

3.1.1 不同浓度 O-P 对细胞活性的影响 0.2-0.1、0.4-0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 O-P 作用于 HepG2 细胞 24、48 h 后, 细胞存活率与对照组相比均无统计学差异; 0.8-0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 O-P 溶液作用 HepG2 细胞 24、48 h 后, 细胞存活率与对照组比较显著下降($P < 0.01$)。结果见表 1。结果表明高浓度的 O-P 溶液对 HepG2 细胞有较高的毒性作用。

3.1.2 不同浓度 O-P 对细胞脂质堆积的影响 油红 O 染色的结果显示, 与对照组相比, 0.2-0.1、0.4-0.2、0.8-0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 O-P 作用于 HepG2 细胞 24 h 后, 均不同程度诱导了细胞内脂滴的形成, 细胞内聚集了大量红色的脂滴, 且细胞边界模糊, 形态不规则; 其中 0.4-0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞的脂滴形成状况最明显

影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of different concentrations of O-P on HepG2 cell activity for 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%	
		24 h	48 h
对照	—	100	100
O-P	0.2-0.1	89.7 $\pm$ 1.5	83.0 $\pm$ 2.6
	0.4-0.2	84.7 $\pm$ 4.5	78.7 $\pm$ 5.5
	0.8-0.4	48.0 $\pm$ 4.8**	39.1 $\pm$ 4.5**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

显, 0.8-0.4 mmol·L⁻¹组由于细胞毒性作用, 细胞数量明显减少。结果见图1。

3.1.3 O-P 对 HepG2 细胞内 TC、TG 水平的影响 与相应对照组比较, 0.2-0.1、0.4-0.2 mmol·L⁻¹的 O-P 作用于 HepG2 细胞 24 h、48 h 后, 均显著提高了细胞

内 TG、TC 的水平 ($P < 0.01$); 0.4-0.2 mmol·L⁻¹ 浓度组与相应的 O-P 0.2-0.1 mmol·L⁻¹ 组比较, TG、TC 的水平均显著升高 ($P < 0.01$)。结合细胞活性及油红 O 脂滴堆积检测结果, O-P 0.4-0.2 mmol·L⁻¹ 为最佳造模浓度。结果见表2。

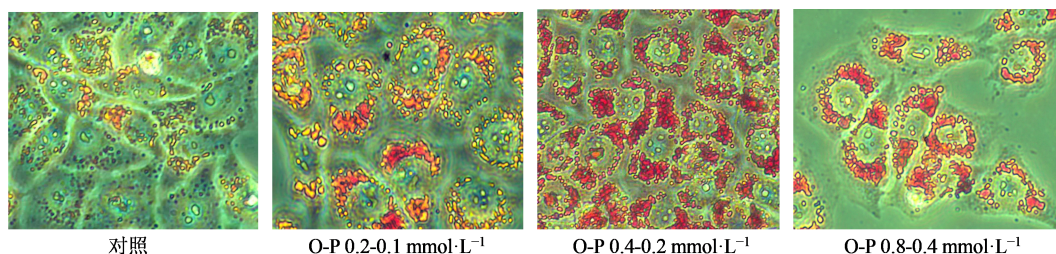


图1 不同浓度 O-P 作用 HepG2 细胞 24 h 对脂滴形成的影响 (×400)

Fig. 1 Effect of different O-P concentrations on lipid droplet formation in HepG2 cells for 24 h (×400)

表2 不同浓度 O-P 作用 HepG2 细胞 24、48 h 对 TC、TG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of different doses of O-P on TC and TG contents of HepG2 cells for 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·g ⁻¹)		TC/(mmol·g ⁻¹)	
		24 h	48 h	24 h	48 h
对照	—	0.046±0.008	0.052±0.008	0.057±0.007	0.064±0.005
O-P	0.2-0.1	0.167±0.028**	0.173±0.025**	0.129±0.008**	0.137±0.006**
	0.4-0.2	0.347±0.159***	0.353±0.015***	0.158±0.007***	0.164±0.005***

与同时间对照组比较: ** $P < 0.01$; 与同时间 O-P 0.2-0.1 mmol·L⁻¹ 组比较: *** $P < 0.01$

** $P < 0.05$ vs control group at same time; *** $P < 0.05$ vs O-P 0.2-0.1 mmol·L⁻¹ group at the same time

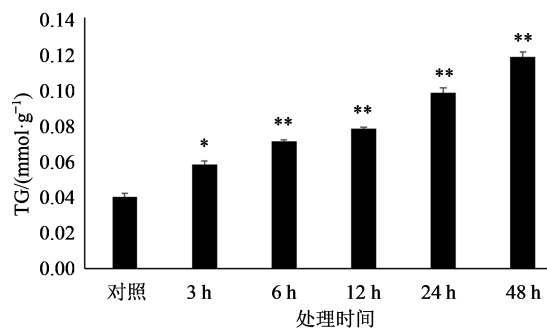
3.1.4 中浓度 O-P 作用 HepG2 细胞不同时间对 TG 水平的影响 中浓度 O-P 作用于 HepG2 细胞后, 随着时间的延长 TG 水平逐渐升高, 与时间呈正相关。与对照组比较, O-P 作用于 HepG2 细胞 3 h 后, TG 水平即开始显著升高 ($P < 0.05$)。结果见图2。结合以上研究, 确定 0.4-0.2 mmol·L⁻¹ 的 O-P 作用 HepG2 细胞 3 h 后开始给予受试药物, 开展后续实验。

3.2 辛伐他汀对 HepG2 细胞活性的影响

与对照组比较, 10、15 μmol·L⁻¹ 的辛伐他汀作用于 HepG2 细胞 24、48 h 后, 细胞存活率无统计学差异; 20 μmol·L⁻¹ 的辛伐他汀作用 HepG2 细胞 24、48 h 后细胞存活率均显著下降 ($P < 0.01$)。结果见表3。结果表明, 20 μmol·L⁻¹ 的辛伐他汀对细胞有较高的毒性作用, 10、15 μmol·L⁻¹ 无毒性作用, 因此选用 15 μmol·L⁻¹ 的辛伐他汀作为阳性药物开展后续实验。

3.3 MOLAE 对 HepG2 细胞活性的影响

3.125~100.000 μg·mL⁻¹ 的 MOLAE 作用于 HepG2 细胞 24、48 h 后, 细胞存活率未出现明显改变, 与对照组比较无统计学差异; 200 μg·mL⁻¹ 的 MOLAE 作用 24、48 h 后细胞存活率分别为 (64.5±



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

图2 O-P 作用 HepG2 细胞不同时间对 TG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of O-P dose on TG content of HepG2 cells at different time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

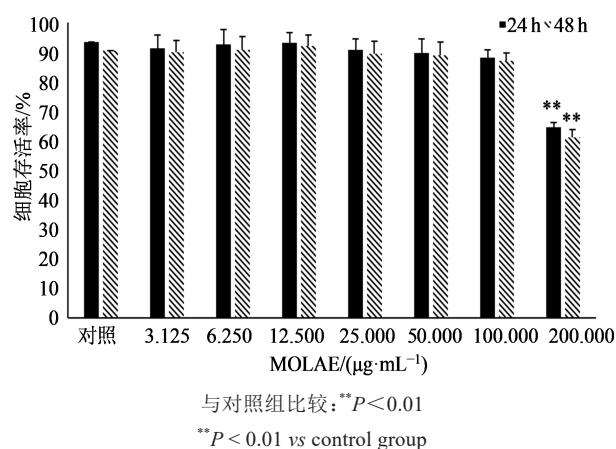
1.5)% 和 (61.1±2.6)%, 与对照组比较显著降低 ($P < 0.01$)。结果见图3。选择 MOLAE 3.125~100.000 μg·mL⁻¹ 进行后续实验。

3.4 MOLAE 对 O-P 诱导的 HepG2 细胞 TG、TC 水平的影响

与对照组比较, 模型组 TG、TC 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 不同浓度的

表3 辛伐他汀作用 HepG2 24、48 h 对细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Effects of simvastatin treatment on cell survival rate of HepG2 for 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%	
		24 h	48 h
对照	—	100	100
辛伐他汀	10	95.5 $\pm$ 3.1	94.1 $\pm$ 2.6
	15	94.5 $\pm$ 2.5	93.5 $\pm$ 2.5
	20	93.5 $\pm$ 2.5**	80.5 $\pm$ 4.5**

与对照组比较:** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group图3 MOLAE作用 HepG2 细胞 24、48 h 对细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Effect of MOLAE on cell survival rate of HepG2 cell for 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

MOLAE(3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 均能降低TG、TC水平($P < 0.05, 0.01$)。25.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的MOLAE降TG的作用最强,明显优于辛伐他汀;同时,12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的MOLAE降低TC的效果最佳,与辛伐他汀组作用效果相当。结果见表4、图4。

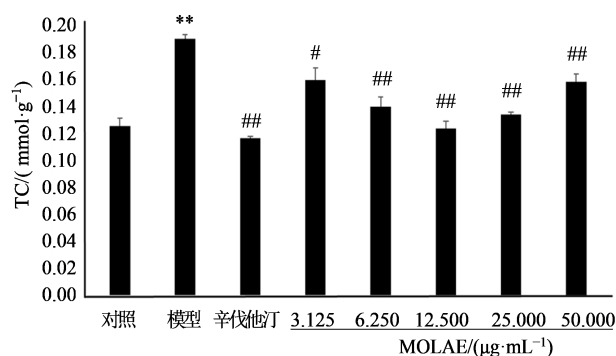
3.5 MOLAE 对 O-P 诱导的 HepG2 细胞 GSH、SOD、MDA 水平的影响

与对照组比较,模型组 GSH、SOD 水平均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,MOLAE(3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 均能显著升高 GSH、SOD 水平($P < 0.05, 0.01$)。

与对照组比较,模型组 MDA 显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,MOLAE(3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 显著降低 MDA 水平($P < 0.01$)。20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MOLAE 升高 GSH 的作用、25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MOLAE 升高 SOD 的作用、以及 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MOLAE 降低 MDA 的作用效果明显优于辛伐他汀组。结果见图5。

表4 MOLAE 对 O-P 诱导的 HepG2 细胞 TG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effects of MOLAE on TG content in HepG2 cell induced by O-P ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TG/($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照	—	0.149 $\pm$ 0.016
模型	—	0.361 $\pm$ 0.010**
辛伐他汀	15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.216 $\pm$ 0.013 ^{##}
MOLAE	3.125	0.225 $\pm$ 0.037 ^{##}
	6.250	0.267 $\pm$ 0.021 ^{##}
	12.500	0.155 $\pm$ 0.014 ^{##}
	25.000	0.124 $\pm$ 0.018 ^{##}
	50.000	0.230 $\pm$ 0.007 ^{##}

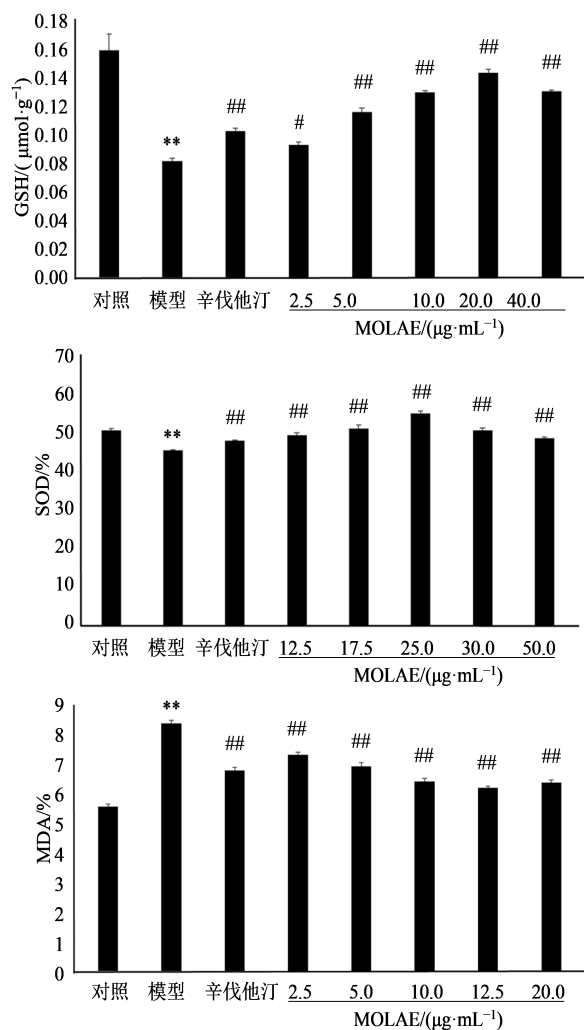
与对照组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:^{##} $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group图4 MOLAE 对 O-P 诱导的 HepG2 细胞 TC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Effects of MOLAE on TC content in HepG2 cell induced by O-P ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 MOLAE 对 O-P 诱导的 HepG2 细胞脂滴堆积的影响

对照组细胞结合紧密,内有少量橘红色油滴形成,模型组细胞中可见大量橘红色脂滴堆积,辛伐他汀组和 MOLAE 组(12.5、25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)脂滴堆积现象均较模型组有明显改善,25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MOLAE 组效果明显优于辛伐他汀组。结果见图6。

4 讨论

目前调节脂质代谢或转运异常,成为预防和治疗高脂血症的主要策略和手段。高脂血症体外模型的建立对于筛选降血脂药物活性物质及成分至关重要,本实验结合文献研究^[8],通过考察 O-P 对细胞的毒性作用及其对细胞中 TG、TC 水平的影响,结合油红 O 脂质堆积实验,优化实验条件,成功建立了 0.4-0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ O-P 诱导 HepG2 细胞脂质代谢



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

图5 MOLAE对O-P诱导的HepG2细胞GSH、SOD、MDA水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effects of MOLAE on GSH, SOD, and MDA content in HepG2 cell induced by O-P ($\bar{x} \pm s, n=3$)

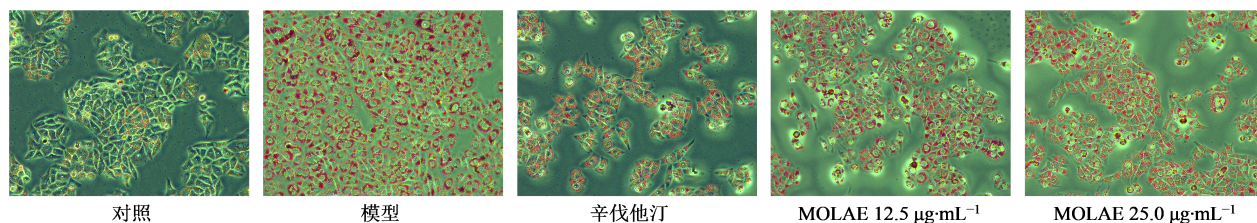


图6 不同浓度MOLAE作用24 h对模型中脂滴堆积的影响($\times 200$)

Fig. 6 Effect of different concentrations of MOLAE on lipid droplet accumulation in model for 24 h ($\times 200$)

组。以上抗氧化的研究结果与文献报道相一致,如:辣木叶提取物通过增加过氧化氢酶(CAT)和SOD的活性,降低了过氧化氢(H_2O_2)对体外培养的人KB肿瘤细胞的毒性作用及氧化损伤^[11],以及辣木叶水提取物通过提高HepG2细胞的GSH-Px、

异常的模型,并确定了造模后给予受试药物的时间(3 h)。

高脂血症是以血液中TC、TG、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)中1项或几项指标的升高和(或)高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)指标的降低为临床特征的一种原发或继发的长期、慢性、隐匿性脂质代谢异常性疾病。虽然没有直接证据证实高脂血症是许多疾病的原因或结果,但是由于血脂水平异常而导致的高脂血症是引发动脉粥样硬化等心脑血管疾病的首要危险因素^[9]。SOD水平的降低被认为是高脂血症所致的脂肪肝的主要生化指标之一,而MDA与GSH等的氧化与过氧化的不平衡而引起的氧化应激是高脂血症所致肝脏损伤的主要原因之一^[10]。本实验结果显示,辛伐他汀 $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 显著降低模型细胞内的TG水平,为 $(0.216 \pm 0.013) \text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, $25.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的MOLAE降TG的作用最强,为 $(0.124 \pm 0.018) \text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$,明显优于辛伐他汀;同时, $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的MOLAE降低TC的效果最佳,与辛伐他汀组作用效果相当。

高脂血症形成后,脂质过氧化状态的加剧,会严重破坏内皮细胞的结构与功能,并进一步造成肝脏损伤,抑制脂质过氧化是抗高脂血症的重要环节。本实验中抗氧化指标的检测显示, $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MOLAE升高GSH的作用、 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MOLAE升高SOD的作用、以及 $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MOLAE降低MDA的作用效果明显优于辛伐他汀组。油红O染色从脂质堆积的角度进一步验证了以上实验结果,辛伐他汀组和MOLAE组(12.5 、 $25.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)脂滴堆积现象均较模型组有明显改善, $25.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的MOLAE组减少脂质堆积的效果明显优于辛伐他汀

SOD活性,降低细胞中MDA水平干预脂质过氧化进程的作用^[12]。

本研究结果显示,MOLAE可以显著下调O-P诱导脂质代谢异常的HepG2细胞中TC、TG水平,降低MDA的水平,升高SOD、GSH的水平。结果说

明,一定剂量的MOLAE在细胞水平上除具有调血脂、缓解高脂血症症状的作用外,对细胞的氧化应激水平也产生了显著影响。本研究为调脂新药的开发提供了思路,也为辣木叶降血脂的深入研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Repositioning of the global epicentre of non-optimal cholesterol [J]. *Nature*, 2020, 582(7810): 73-77.
- [2] Karr S. Epidemiology and management of hyperlipidemia [J]. *Am J Manag Care*, 2017, 23(9 Suppl): S139-S148.
- [3] Ward N C, Watts G F, Eckel R H. Statin toxicity [J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 328-350.
- [4] 崔一凡, 陈香兰, 张旭, 等. 辣木叶成分及其活性研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2022, 39(9): 1142-1150.
Cui Y F, Chen X L, Zhang X, et al. Research progress on the constituents and activities of *Moringa oleifera* leaves [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2022, 39(9): 1142-1150.
- [5] 赵一鹤, 李沁, 夏菁, 等. 辣木叶提取物的抗氧化活性研究 [J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(7): 136-138.
Zhao Y H, Li Q, Xia J, et al. Study on antioxidant activity of extracts from *Moringa oleifera* leaves [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2019, 47(7): 136-138.
- [6] 董笑克, 胡玉立, 洪明昭, 等. 辣木叶的降糖作用及其机制研究进展 [J]. *环球中医药*, 2019, 12(2): 315-320.
Dong X K, Hu Y L, Hong M Z, et al. Research progress of hypoglycemic effect and mechanism of *Moringa oleifera* leave [J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2019, 12(2): 315-320.
- [7] 袁静, 梁文仪, 袁永兵, 等. 辣木叶化学成分和药理活性的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4422-4432.
Yuan J, Liang W Y, Yuan Y B, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Moringa oleifera* leaves [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(14): 4422-4432.
- [8] Cao P Q, Huang G D, Yang Q Y, 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] Stewart J, Mccallin T, Martinez J, et al. Hyperlipidemia [J]. *Pediatr Rev*, 2020, 41(8): 393-402.
- [10] 杨卓凡, 宣攢威, 罗浩鑫, 等. 辣木叶及其有效成分抗高脂血症药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(4): 911-916.
Yang Z F, Xuan Z W, Luo H X, et al. Research progress of anti-hyperlipidemia effects of *Moringa oleifera* leaves and its active components [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(4): 911-916.
- [11] Sreelatha S, Padma P R. Modulatory effects of *Moringa oleifera* extracts against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and oxidative damage [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2011, 30(9): 1359-1368.
- [12] Gu F, Tao L, Chen R L, et al. Ultrasonic-cellulase synergistic extraction of crude polysaccharides from *Moringa oleifera* leaves and alleviation of insulin resistance in HepG2 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12405.

[责任编辑 兰新新]