石榴花对棕榈酸诱导的 HepG2 细胞脂质沉积的改善作用及机制研究

田晓丹[1]，金　晨[2]，陈　志[1]，曾艳丽[1]，廖佳伟[1]，何小燕[1]，华钰萍[1]，赵　鹏[1]，张　凌[1*]

1. 江西中医药大学药学院，江西 南昌　330004
2. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室，江西 南昌　330004

摘　要：目的　探讨石榴花提取物（*Punica granatum* flower extract，PFE）及其活性成分白桦脂酸和木犀草素对棕榈酸诱导的人肝癌 HepG2 细胞脂质沉积的改善作用和作用机制。**方法**　通过 CCK-8 法测定棕榈酸、辛伐他汀、PFE、白桦脂酸和木犀草素对 HepG2 细胞活力的影响，以确定后续给药剂量。利用 500 μmol/L 棕榈酸建立 HepG2 细胞脂质沉积模型，同时给予 PFE（50、100、200 mg/L）、白桦脂酸（40、80、160 μmol/L）、木犀草素（40、80、160 μmol/L）进行干预，采用油红 O 染色法测定细胞内脂质含量；GPO-PAP 法测定细胞内三酰甘油（triglyceride，TG）和总胆固醇（Total cholesterol，TC）含量；流式细胞仪检测早、晚期凋亡细胞率；Western blotting 检测凋亡因子 B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B（phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）、Janus 激酶 2/信号传导及转录激活因子 3（Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3，JAK2/STAT3）通路相关蛋白表达；qRT-PCR 测定 *PI3K*、*Akt*、*JAK2*、*STAT3* 的 mRNA 表达。**结果**　选取对细胞活力无显著影响的 PFE（50、100、200 mg/L）、白桦脂酸（40、80、160 μmol/L）和木犀草素（40、80、160 μmol/L）进行后续实验。与对照组比较，模型组细胞内脂质、TC 和 TG 含量均显著升高（$P<0.001$），细胞凋亡率显著升高（$P<0.001$），PI3K、Akt、Bax 蛋白和 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达水平均显著升高（$P<0.001$），JAK2、STAT3、Bcl-2 蛋白和 *JAK2*、*STAT3* mRNA 表达水平均显著下降（$P<0.001$）。与模型组比较，各给药组细胞内脂质、TC 和 TG 含量均显著降低（$P<0.05$、0.01、0.001），细胞早、晚期凋亡率显著下降（$P<0.01$、0.001），细胞中 PI3K、Akt、Bax 蛋白和 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达水平均显著降低（$P<0.05$、0.001），JAK2、STAT3 蛋白和 mRNA 表达水平均显著升高（$P<0.05$、0.01、0.001），PFE 组和白桦脂酸组 Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$、0.001）。**结论**　PFE、白桦脂酸和木犀草素能够改善棕榈酸诱导的 HepG2 细胞脂质沉积，其作用机制与抑制游离脂肪酸诱导的细胞凋亡、调控 PI3K/Akt 和 JAK2/STAT3 通路有关。

关键词：石榴花；高脂血症；脂质沉积；HepG2 细胞；棕榈酸；白桦脂酸；木犀草素；凋亡；磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通路；Janus 激酶 2/信号传导及转录激活因子 3 通路

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)08 - 2462 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.013

Effect and mechanism of *Punica granatum* flower on lipid deposition induced by palmitic acid in HepG2 cells

TIAN Xiao-dan[1], JIN Chen[2], CHEN Zhi[1], ZENG Yan-li[1], LIAO Jia-wei[1], HE Xiao-yan[1], HUA Yu-ping[1], ZHAO Peng[1], ZHANG Ling[1]

1. School of Pharmacy, Jiangxi University of traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM. Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective　To investigate the effect and mechanism of *Punica granatum* flower extract (PFE) and its active components betulinic acid and luteolin on palmitic acid-induced lipid deposition in HepG2 cells. **Methods**　CCK-8 method was used to determine the effects of palmitic acid, simvastatin, PFE, betulinic acid and luteolin on viability of HepG2 cells, so as to determine the subsequent

收稿日期：2023-01-30

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81960697）；江西省教育厅科技重点项目（170699）；江西中医药大学科技创新团队发展计划（CXTD22002）

作者简介：田晓丹，女，硕士研究生，研究方向为药物成分分析和质量标准及中药药效与活性成分。E-mail: 2537385342@qq.com

***通信作者：**张　凌，教授，博士生导师，研究方向为药物成分分析和质量标准及中药药效与活性成分。E-mail: dw64810@163.com

dosage. Lipid deposition model of HepG2 cells was established with 500 μmol/L palmitic acid. At the same time, PFE (50, 100, 200 mg/L), betulinic acid (40, 80, 160 μmol/L) and luteolin (40, 80, 160 μmol/L) were given for intervention, and intracellular lipid content was measured by oil red O staining; The contents of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) in cells were determined by GPO-PAP method; The rate of early and late apoptotic cells was detected by flow cytometry; Western blotting was used to detect expressions of apoptosis factors B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt), Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) pathway related proteins; The mRNA expressions of *PI3K*, *Akt*, *JAK2* and *STAT3* were determined by qRT-PCR. **Results** PFE (50, 100, 200 mg/L), betulinic acid (40, 80, 160 μmol/L) and luteolin (40, 80, 160 μmol/L) which had no significant effect on cell viability were selected for subsequent experiments. Compared with control group, the contents of lipid, TC and TG in cells of model group were significantly increased ($P < 0.001$), apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.001$), PI3K, Akt, Bax proteins and *PI3K*, *Akt* mRNA expression levels were significantly increased ($P < 0.001$), JAK2, STAT3, Bcl-2 proteins and *JAK2*, *Akt* mRNA were significantly increased. Compared with model group, the contents of lipid, TC and TG in cells of each drug group were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), apoptosis rate in early and late stages were significantly decreased ($P < 0.01$, 0.001), PI3K, Akt and Bax proteins and *PI3K*, *Akt* mRNA expression levels in cells were significantly decreased ($P < 0.01$), JAK2, STAT3 protein and mRNA expression levels were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), and Bcl-2 protein expression level in PFE group and betulinic acid group were significantly increased ($P < 0.01$, 0.001). **Conclusion** PFE, betulinic acid and luteolin could improve lipid deposition induced by palmitic acid in HepG2 cells, and its mechanism may be related to inhibiting apoptosis induced by free fatty acids and regulating PI3K/Akt and JAK2/STAT3 pathways.

Key words: *Punica granatum* L. flower; hyperlipidemia; lipid deposition; HepG2 cells; palmitic acid; betulinic acid; luteolin; apoptosis; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway; Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 pathway

高脂血症是心血管疾病发生和发展的主要风险因素之一，主要由体内血脂水平异常引起，临床上主要表现为总胆固醇（total cholesterol，TC）、三酰甘油（triglyceride，TG）、低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein cholesterol，LDL-C）的升高和（或）高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein cholesterol，HDL-C）的降低[1]。近年来高脂血症的发病率和死亡率逐年上升，且呈年轻化趋势[2]。肝脏作为动物体内脂质沉积的主要器官，是脂质代谢的重要场所[3]，肝脏脂质代谢与高脂血症、糖尿病、脂肪肝等心血管疾病密切相关[4]。因此，维持肝脏脂质稳态对于预防和治疗心血管疾病具有重要意义。

石榴花是石榴 *Punica granatum* L.的干燥花瓣，在维吾尔族药物中又被称为“古丽娜”，维药中常用于治疗反胃、神经衰弱、糖尿病及其并发症。研究表明，石榴花主要化学成分有黄酮类、多酚类、三萜类等[5]，具有抗 2 型糖尿病、保护循环系统、抗炎、抗氧化、保肝、抗肿瘤等作用[6]。本课题组前期对石榴花多个萃取部位的化学成分进行了分离鉴定，主要鉴定出木犀草素、鞣花酸、齐墩果酸、刺芒柄花素等成分[5,7]，通过整理文献得到目前石榴花已分得的化合物包括白桦脂酸、槲皮素等[5]，对分离鉴定出的部分化合物进行了抗炎、降糖、调血脂研究，在调血脂研究中发现石榴花提取物及其 5 个化合物可降低高脂饮食小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平，升高血清 HDL-C 水平，其中木犀草素调血脂效果与辛伐他汀相似，高剂量时甚至优于辛伐他汀[8]。肝脏作为重要的脂质代谢器官，目前对于石榴花是否能改善肝脏脂质沉积及其有效成分、作用机制鲜有报道。课题组前期通过网络药理学方法预测出石榴花中白桦脂酸、木犀草素等化合物能够作用于磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B（phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）、Janus 激酶 2/信号传导及转录激活因子 3（Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3，JAK2/STAT3）通路改善脂质沉积，通过分子对接技术验证白桦脂酸和木犀草素均与 PI3K、Akt、JAK2、STAT3 靶点有良好的结合能。本研究以棕榈酸建立人肝癌 HepG2 细胞脂质沉积模型，检测石榴花提取物、白桦脂酸和木犀草素干预前后细胞内脂质、TC 和 TG 的含量变化，采用流式细胞术测定细胞早、晚期凋亡数量，采用 Western blotting 方法检测凋亡因子 B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）、PI3K、Akt、JAK2、STAT3 蛋白表达，采用 qRT-PCR 方法检测 *PI3K*、*Akt*、*JAK2*、*STAT3* mRNA 表达，研究石榴花提取物、白桦脂酸和木犀草素对 HepG2 细胞脂质沉积的影响

和作用机制。

1 材料

1.1 细胞株

HepG2 细胞购自武汉普诺赛生物有限公司。

1.2 药材

石榴花购自新疆莎车县，经新疆医科大学兰卫教授鉴定为石榴科植物石榴 *P. granatum* L.的干燥花瓣。

1.3 药品与试剂

白桦脂酸（质量分数≥98%，批号 C1626004）、木犀草素（质量分数≥98%，批号 J2128605）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；胎牛血清（批号 2059458CP）购自美国 Gibco 公司；DMEM 高糖培养基（批号 20220928）、PBS（批号 20220104）、0.25%胰酶（批号 20220809）、棕榈酸（批号 924V021）、辛伐他汀（批号 1122G022）、BCA 蛋白检测试剂盒（批号 20220312）购自北京索莱宝科技有限公司；CCK-8 试剂盒（批号 GK1000）购自美国 GlpBio 公司；TC 检测试剂盒（批号 20211112）、TG 检测试剂盒（批号 20211112）购自南京建成生物有限公司；TransZol Up Plus RNA 试剂盒（批号 Q41206）、细胞凋亡试剂盒（批号 P20807）购自北京全式金生物技术有限公司；PI3K 抗体（批号 10005702）、Akt 抗体（批号 10022173）、JAK2 抗体（批号 00046735）、STAT3 抗体（批号 00097602）Bax 抗体（批号 00080266）、Bcl-2 抗体（批号 00087156）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（批号 10021642）、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体（批号 20000451）、ECL 检测试剂盒（批号 20030355）购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 仪器

BB150 型 CO_2 细胞培养箱、1510-01871 型酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；TE2000S 型倒置显微镜（日本 Nikon 公司）；DYY-6C 型电泳仪（北京六一公司）；5424R 型冷冻型离心机（德国 Eppendorf 公司）；FACS-CantoII型流式细胞仪（美国 BD 公司）；Chemic Doc XR+型凝胶成像仪（美国 Bio-Rad 公司）；QuantStudio 5 型实时荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司）。

2 方法

2.1 石榴花提取物的制备

取干燥石榴花 1 kg，粉碎成粗粉，过筛，加入 60%乙醇，50～60 ℃加热回流萃取 2 次，每次 1 h。收集萃取液，用纱布滤过后合并，滤液加压浓缩后得总浸膏，于 4 ℃冰箱保存[5]。课题组前期对石榴花进行了质量标准、化学成分的分离鉴定及指纹图谱研究[7]，其水分含量为 12.6%，总灰分为 4.66%，酸不溶性灰分为 1.13%，并采用高效液相色谱法同时测定石榴花提取物中的主要活性成分没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的质量分数分别为 2.51、6.76、18.6 mg/g[9]。

2.2 细胞培养

HepG2 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素溶液的 DMEM 完全培养基，于 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱中培养。

2.3 CCK-8 法检测药物对细胞活力的影响

HepG2 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板，细胞贴壁后加入含棕榈酸（0、62.5、125、250、500、1000 μmol/L）、辛伐他汀（0、2.5、5、10、20、40 μmol/L）、石榴花提取物（0、25、50、100、200、400 mg/L）、白桦脂酸（0、20、40、80、160、320 μmol/L）、木犀草素（0、20、40、80、160、320 μmol/L）的完全培养基，孵育 24 h，同时设调零组（不接种细胞不含药物）和对照组（接种细胞不含药物），每组设 5 个复孔。各孔中加入 10 μL 的 CCK-8 溶液，孵育 1 h，采用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度（A）值，计算细胞存活率。

细胞存活率＝$(A_{给药}-A_{调零})/(A_{对照}-A_{调零})$

2.4 HepG2 细胞脂质沉积模型的建立

HepG2 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，细胞贴壁后，按李世英等[10]方法在细胞培养液中加入 500 μmol/L 的棕榈酸，培养 24 h，诱导 HepG2 细胞脂质沉积模型，当 HepG2 细胞变大变圆，且细胞周围有脂滴环绕时，说明模型建立成功。

2.5 油红 O 染色及脂质含量的测定

按“2.4”项下方法处理细胞，在造模同时，分别加入辛伐他汀（20 μmol/L）、石榴花提取物（50、100、200 mg/L）、白桦脂酸（40、80、160 μmol/L）、木犀草素（40、80、160 μmol/L）对细胞进行干预，另设置不含药物的对照组。给药 24 h 后，PBS 清洗 2 遍，用 4%多聚甲醛固定 30 min；PBS 清洗 2 遍，60%异丙醇分化 1 min，油红 O 避光染色 20 min，60%异丙醇脱色，PBS 洗涤 2 遍后置于倒置显微镜下观察并拍照。用 200 μL 异丙醇萃取细胞中的染料，吸取 100 μL 至 96 孔板中，通过酶标仪测定 506

nm 处的 *A* 值，对细胞内脂质进行相对定量。

2.6 细胞内 TC、TG 含量的测定

按“2.5”项下方法进行给药，用预冷的 PBS 清洗 2 次，加入 RIPA 细胞裂解液，混匀后于冰上裂解 30 min，取上清，按照 TC、TG 检测试剂盒说明书，采用 GPO-PAP 法测定细胞内 TC、TG 含量。

2.7 流式细胞术检测细胞凋亡率

使用 Annexin V-FITC/碘化丙啶（PI）染色结合流式细胞术检测早晚期凋亡的细胞数量。按“2.4”项下方法处理细胞，在造模同时，分别加入石榴花提取物（50、200 mg/L）、白桦脂酸（40、160 μmol/L）、木犀草素（40、160 μmol/L）对细胞进行干预，另设置不含药物的对照组。给药 24 h 后，收集细胞，用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，加入 100 μL 预冷的 1× Annexin V Binding Buffer 重悬细胞，加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI，轻轻混匀，室温避光染色 15 min，加入 400 μL 预冷的 1×Annexin V Binding Buffer，混匀后于冰上避光放置，1 h 内利用流式细胞仪检测 HepG2 细胞凋亡情况。

2.8 qRT-PCR 检测 *PI3K*、*Akt*、*JAK2* 和 *STAT3* mRNA 表达

按“2.7”项下方法进行给药，收集细胞，按照试剂盒说明书提取细胞中总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5’-3’)
GAPDH	F: GGACCTGACCTGCCGTCTAG
	R: GTAGCCCAGGATGCCCTTGA
PI3K	F: CCACGACCATCATCAGGTGAA
	R: CCTCACGGAGGCATTCTAAAGT
Akt	F: TCCTCCTCAAGAATGATGGCA
	R: GTGCGTTCGATGACAGTGGT
JAK2	F: TCTGGGGAGTATGTTGCAGAA
	R: AGACATGGTTGGGTGGATACC
STAT3	F: CAGCAGCTTGACACACGGTA
	R: AAACACCAAAGTGGCATGTGA

2.9 Western blotting 检测 Bax、Bcl-2、PI3K、Akt、JAK2 和 STAT3 蛋白表达

按“2.7”项下方法进行给药，收集细胞，每孔加入 80 μL RIPA 裂解液，于冰上裂解 30 min，提取总蛋白，采用 BCA 试剂盒测定总蛋白总浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5%脱脂牛奶，室温摇床封闭 2 h，分别加入 GAPDH（1∶5000）、Bcl（1∶1000）、Bax（1∶2000）、PI3K（1∶1000）、Akt（1∶5000）、JAK2（1∶2000）、STAT3（1∶2000）抗体，4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min；加入二抗（1∶5000），室温摇床孵育 2 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，加入 ECL 发光显影液，置于凝胶成像仪显影并拍照，用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.10 统计分析

实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。使用 Graph Pad Prism 7.0.2 绘制统计结果图。

3 结果

3.1 CCK-8 检测细胞活性

如图 1 所示，与对照组比较，棕榈酸、辛伐他

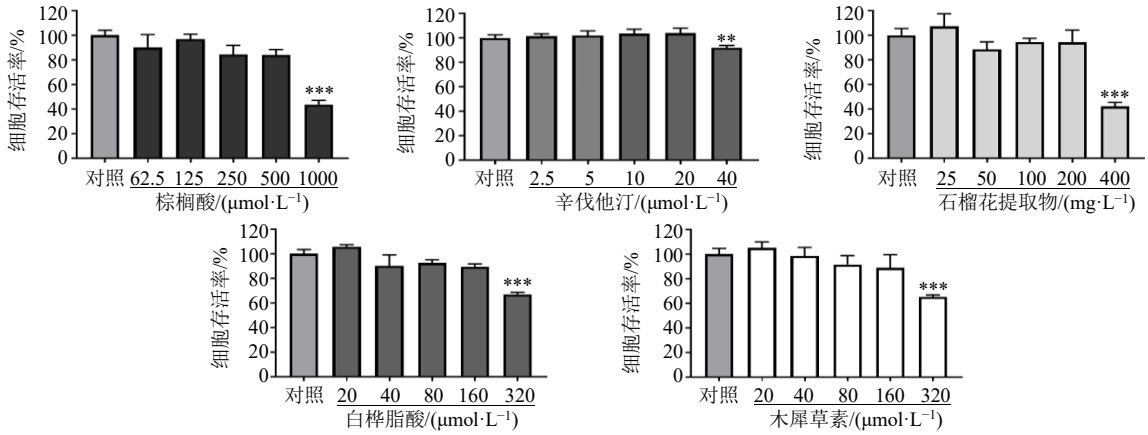


图 1 棕榈酸、辛伐他汀、石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Effects of palmitic acid, simvastatin, *P. granatum* flower extract, betulinic acid and luteolin on survival rate of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

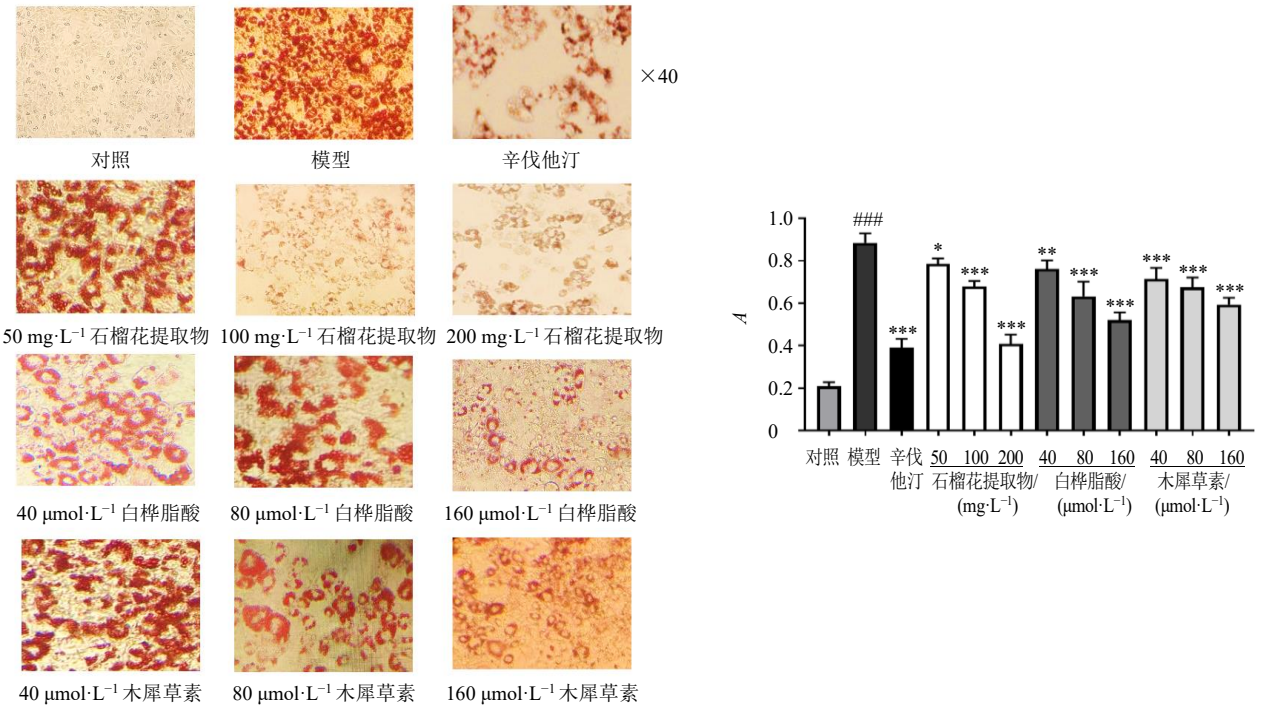
汀、石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素分别在 500 μmol/L、20 μmol/L、200 mg/L、160 μmol/L、160 μmol/L 及以下浓度时对细胞活力无显著影响，故选择 500 μmol/L 棕榈酸作为造模剂量，20 μmol/L 辛伐他汀作为阳性对照药物剂量，石榴花提取物（50、100、200 mg/L）、白桦脂酸（40、80、160 μmol/L）、木犀草素（40、80、160 μmol/L）作为给药剂量进行后续实验。

3.2　细胞内脂质含量的测定

如图 2 所示，HepG2 细胞在诱导前为类梭形细胞，棕榈酸诱导后细胞变圆，体积变大，细胞周围有脂滴环绕，经油红 O 染色后脂滴被染成红色，说明 HepG2 细胞脂质沉积模型建模成功；HepG2 细胞经药物干预后，细胞内脂滴减少。脂质含量定量结果显示，与对照组比较，HepG2 细胞经棕榈酸诱导后细胞内脂质含量显著升高（$P<0.001$）；与模型组比较，各给药组细胞内脂质含量均显著降低（$P<0.05$、0.01、0.001），且呈剂量相关性，石榴花提取物在高剂量时与辛伐他汀作用相当。

3.3　细胞内 TC、TG 含量的测定

如图 3 所示，与对照组比较，棕榈酸诱导后 HepG2 细胞内 TC 和 TG 含量均显著升高（$P<0.001$）；与模型组比较，各给药组细胞内 TC 和 TG 含量均显著降低（$P<0.05$、0.001），呈剂量相关性。



与对照组比较：$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$，下图同

$^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* control group; $^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* model group, same as below figures

图 2　石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素对 HepG2 细胞内脂质含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 2　Effects of *P. granatum* flower extract, betulinic acid and luteolin on lipid content in HepG2 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

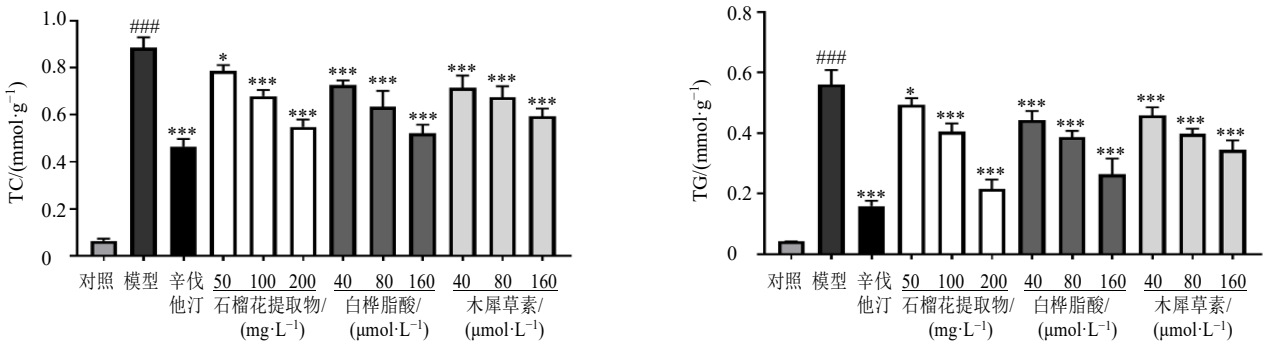


图 3　石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素对 HepG2 细胞内 TC 和 TG 含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

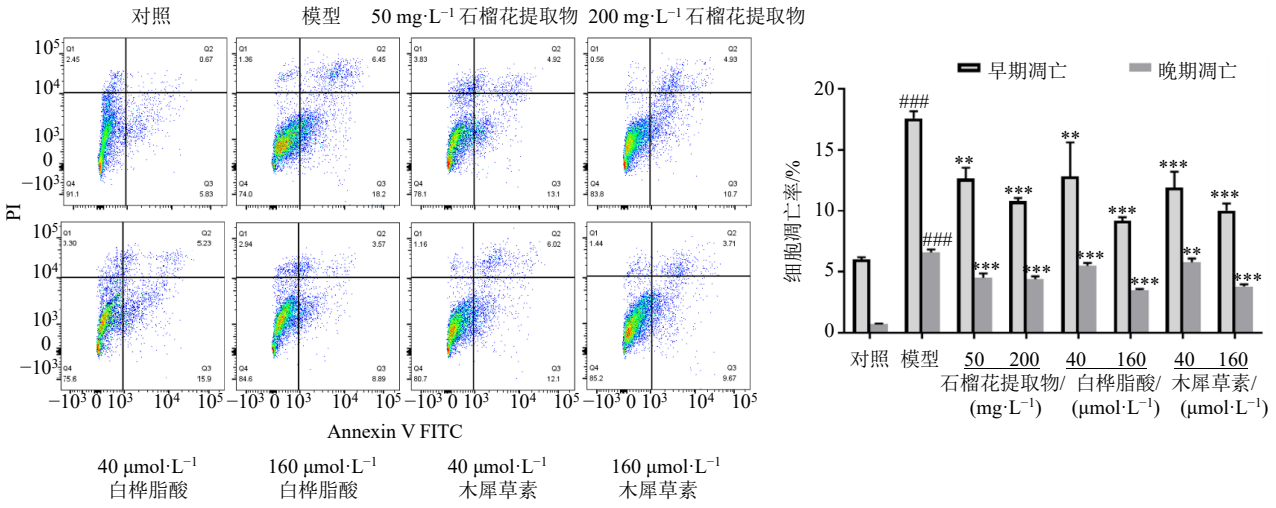
Fig. 3　Effects of *P. granatum* flower extract, betulinic acid and luteolin on TC and TG contents in HepG2 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

3.4 石榴花提取物、白桦脂酸及木犀草素对细胞凋亡的影响

如图 4 所示，与对照组比较，HepG2 细胞经棕榈酸诱导后早、晚期细胞凋亡率均显著升高（P＜0.001）；与模型组比较，各给药组早、晚期细胞凋亡率均显著降低（P＜0.01、0.001），且呈剂量相关性。

3.5 石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素对 HepG2 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

如图 5 所示，与对照组比较，模型组细胞中 Bax 蛋白表达水平显著升高（P＜0.001），Bcl-2 蛋白表达水平显著下降（P＜0.001）；与模型组比较，各给药组 Bax 蛋白表达水平均显著下降（P＜0.05、0.001），石榴花提取物、白桦脂酸各剂量组 Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高（P＜0.01、0.001），木犀草素组 Bcl-2 蛋白表达水平升高但无统计学意义。



与同期对照组比较：###P＜0.001；与同期模型组比较：**P＜0.01 ***P＜0.001

###P < 0.001 *vs* control group at same period; **P < 0.01 ***P < 0.001 *vs* model group at same period

图 4 石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素对 HepG2 细胞凋亡的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 4 Effects of *P. granatum* flower extract, betulinic acid and luteolin on apoptosis of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

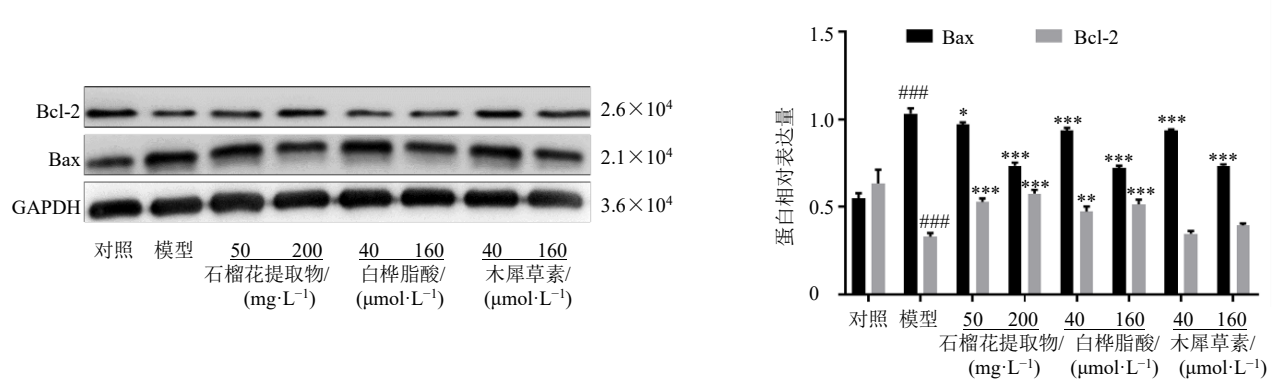


图 5 石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素对 HepG2 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 5 Effects of *P. granatum* flower extract, betulinic acid and luteolin on Bax and Bcl-2 protein expressions in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

3.6 石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素对 HepG2 细胞 *PI3K*、*Akt*、*JAK2* 和 *STAT3* mRNA 表达的影响

如图 6 所示，与对照组比较，HepG2 细胞经棕榈酸诱导 24 h 后细胞中 *JAK2*、*STAT3* mRNA 表达水平显著降低（P＜0.001），*PI3K*、*Akt* mRNA 表达水平显著上升（P＜0.001）；与模型组比较，各给药组 *JAK2*、*STAT3* mRNA 表达水平显著上升（P＜0.05、0.01、0.001），*PI3K*、*Akt* mRNA 表达水平显著降低（P＜0.05、0.01、0.001）。

3.7 石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素对 HepG2 细胞 PI3K、Akt、JAK2 和 STAT3 蛋白表达的影响

如图 7 所示，与对照组比较，模型组细胞中 JAK2、STAT3 蛋白表达水平显著下降（P＜0.001），

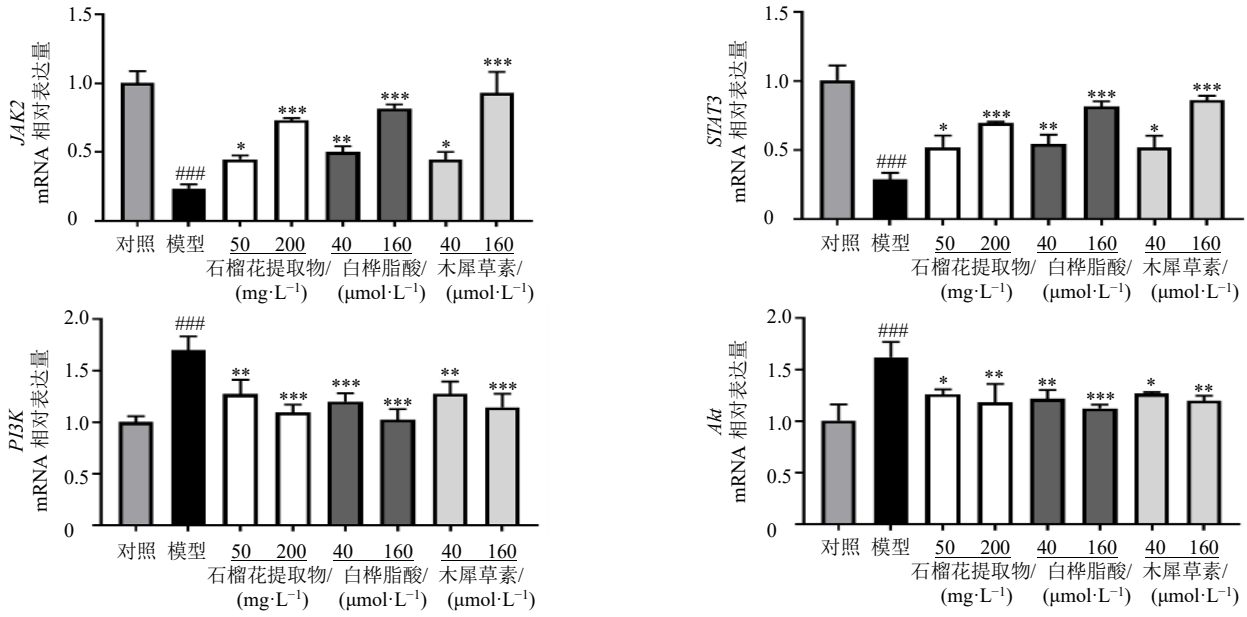


图 6　石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素对 HepG2 细胞 *PI3K*、*Akt*、*JAK2* 和 *STAT3* mRNA 表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 6　Effects of *P. granatum* flower extract, betulinic acid and luteolin on *PI3K*, *Akt*, *JAK2* and *STAT3* mRNA expressions in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

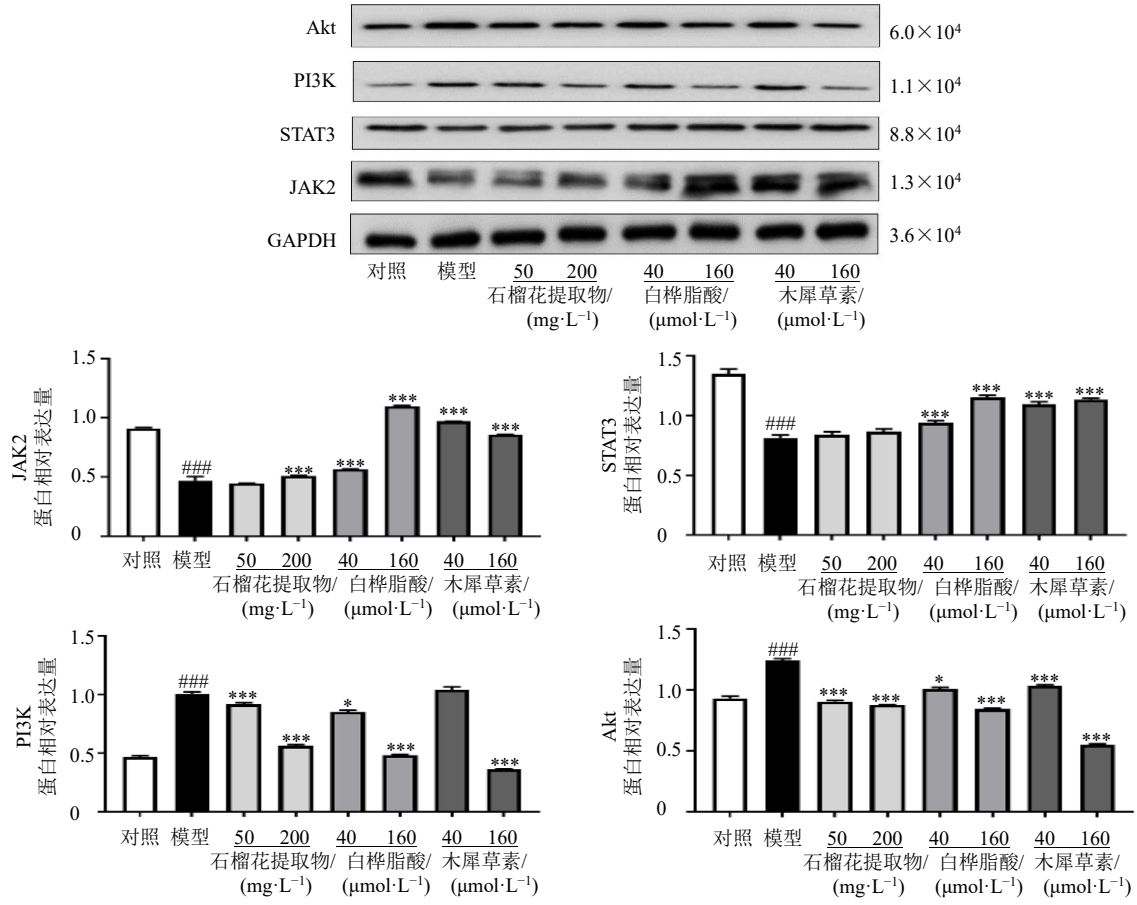


图 7　石榴花提取物、白桦脂酸、木犀草素对 HepG2 细胞 PI3K、Akt、JAK2 和 STAT3 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 7　Effects of *P. granatum* flower extract, betulinic acid and luteolin on PI3K, Akt, JAK2 and STAT3 protein expressions in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

PI3K、Akt 蛋白表达水平显著上升（$P<0.001$）；与模型组比较，石榴花提取物（200 mg/L）组、白桦脂酸各剂量组和木犀草素各剂量组 JAK2 蛋白表达水平显著上升（$P<0.001$），白桦脂酸和木犀草素各剂量组 STAT3 蛋白相对水平显著上升（$P<0.001$），石榴花提取物各剂量组、白桦脂酸各剂量组和木犀草素（160 μmol/L）组 PI3K 蛋白表达水平显著下降（$P<0.05$、0.001），各给药组 Akt 蛋白表达水平显著下降（$P<0.05$、0.001），与 qRT-PCR 实验结果基本一致。

4 讨论

肝细胞内脂质过量沉积会导致肝细胞的脂肪变性，进而形成肝脏的脂肪病变[11]，减少肝脏脂质积累是改善脂质沉积的关键因素。研究表明，石榴花提取物可改善糖尿病大鼠模型中心脏 TG 蓄积和高脂血症[12]；白桦脂酸可有效改善人正常肝细胞 L02 的脂肪变性程度[13]，显著降低肝脏中 TC、TG 水平，改善脂质代谢[14]；木犀草素可降低高脂血症大鼠中 TC、TG 和 LDL-C 的水平，并增加血液中 HDL-C 的水平，减少肝脏脂肪变性[15]。本研究建立 HepG2 细胞脂质沉积模型，给予石榴花提取物、白桦脂酸和木犀草素干预 24 h，结果表明石榴花提取物、木犀草素和白桦脂酸可不同程度地抑制棕榈酸诱导的 HepG2 细胞内脂质含量，并显著降低 TC、TG 含量，说明石榴花提取物可有效改善 HepG2 细胞的脂质沉积，在治疗肝脏脂质沉积相关的高脂血症方面具有积极意义。

过量的游离脂肪酸（棕榈酸、油酸等）会对机体造成脂毒性，引起肝细胞脂肪变性，导致细胞凋亡[16-18]，损害肝脏脂质代谢及其他生理功能。细胞凋亡相关因子 Bcl-2 和 Bax 均属于 Bcl-2 家族成员，Bcl-2 能抑制细胞凋亡，对细胞有保护作用；Bax 具有促进细胞凋亡的作用[19]。本研究结果表明，棕榈酸诱导的 HepG2 细胞中细胞凋亡细胞率显著增加，可能是因为棕榈酸组细胞内的饱和脂肪酸过量引起了细胞凋亡，经石榴花提取物、白桦脂酸和木犀草素干预后，细胞凋亡率显著下降。为进一步阐明石榴花提取物及其活性成分抗凋亡的作用机制，采用 Western blotting 检测对 HepG2 细胞中 Bcl-2、Bax 蛋白表达，结果显示，石榴花提取物组、白桦脂酸组和木犀草素组细胞中 Bax 蛋白表达水平显著降低，Bcl-2 蛋白表达水平上升，说明石榴花提取物、白桦脂酸和木犀草素通过影响细胞凋亡相关因子的表达，抑制棕榈酸诱导的 HepG2 细胞凋亡。

研究表明，PI3K/Akt 信号通路是参与细胞生长、增殖、凋亡的重要信号转导途径[20]，在肝脏中起着关键作用，与脂质的合成密切相关。PI3K/Akt 信号通路的异常激活可导致肝脏脂质代谢受损，引起肝脏脂质沉积[21]，抑制 PI3K/Akt 信号通路有利于减少脂毒性引起的肝细胞损伤和脂代谢紊乱[22-23]。肝细胞中特异性缺失 JAK2 的小鼠在早期会发生自发性脂肪变性[24]，STAT3 可介导肝脏中的糖脂代谢[25]，肝细胞中 STAT3 的活化可预防脂肪变性[26]，激活 JAK2/STAT3 信号通路可调节下游多类脂代谢关键因子，在降低 TC 和 TG 含量、改善脂肪酸代谢过程中发挥重大作用[27]。本研究通过 Western blotting 和 qRT-PCR 实验发现，棕榈酸诱导的 HepG2 细胞中 PI3K、Akt 蛋白和 mRNA 表达水平明显升高，JAK2、STAT3 蛋白和 mRNA 表达水平明显降低；给予石榴花提取物、白桦脂酸和木犀草素干预后，能够明显下调细胞 PI3K、Akt 蛋白和 mRNA 表达水平，并上调 JAK2、STAT3 蛋白和 mRNA 表达水平，提示石榴花提取物可以通过抑制 PI3K/Akt 途径和促进 JAK2/STAT3 途径来降低脂质积累，从而改善棕榈酸诱导的 HepG2 细胞脂质沉积。

本研究发现，石榴花提取物能够抑制棕榈酸诱导的 HepG2 细胞中脂质积累和细胞凋亡，可通过调控 PI3K/Akt、JAK2/STAT3 信号通路来发挥改善 HepG2 细胞脂质沉积的作用，为石榴花改善肝脏脂质沉积的研究、在维吾尔族药物中的开发与利用提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] El-Tantawy W H, Temraz A. Natural products for controlling hyperlipidemia: Review [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2019, 125(2): 128-135.

[2] Zhang Q, Zhang D L, Zhou X L, *et al*. Antihyperlipidemic and hepatoprotective properties of vitamin B6 supplementation in rats with high-fat diet-induced hyperlipidemia [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2021, 21(12): 2260-2272.

[3] Ten Hove M, Pater L, Storm G, *et al*. The hepatic lipidome: From basic science to clinical translation [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 159: 180-197.

[4] Bai L, Li H L. Innate immune regulatory networks in hepatic lipid metabolism [J]. *J Mol Med*, 2019, 97(5): 593-604.

[5] 周彩虹. 维药古丽娜化学成分及其抗炎活性研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.

[6] 李丽蓉, 金晨, 廖辉, 等. 石榴花 (古丽娜) 的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 209-214.

[7] 黄斌, 金晨, 何玉琴, 等. 石榴花的化学成分分离鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 56-59.

[8] 李彤. 维药“古丽娜”降糖、降脂的药效作用研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.

[9] 黄斌, 金晨, 廖辉, 等. 多指标优选维药古丽娜提取工艺及含量测定研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(1): 353-356.

[10] 李世英, 汪艳. 抑制线粒体丙酮酸载体通过激活 AMPK-ACC 通路改善棕榈酸诱导的 HepG2 细胞脂肪变性 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(12): 1679-1683.

[11] 李野. 维生素 D 对油酸诱导的人肝癌细胞 (HepG2) 脂质沉积促进作用的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.

[12] Huang T H, Peng G, Kota B P, *et al*. Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: Role of lowering circulating lipids [J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 145(6): 767-774.

[13] 曾菊花. 白桦脂酸对脂肪变性的 LO2 细胞 RAGE-NF-κB/iNOS 信号通路的影响 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.

[14] Adeleke G E, Adaramoye O A. Betulinic acid abates N-nitrosodimethylamine-induced changes in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in the liver and kidney of Wistar rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(11): e22901.

[15] Sun J H, Wang Z D, Chen L, *et al*. Hypolipidemic effects and preliminary mechanism of *Chrysanthemum* flavonoids, its main components luteolin and luteoloside in hyperlipidemia rats [J]. *Antioxidants* (*Basel*), 2021, 10(8): 1309.

[16] Liu J L, Han L N, Zhu L L, *et al*. Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats [J]. *Lipids Health Dis*, 2016, 15: 27.

[17] Hsu J Y, Lin H H, Chyau C C, *et al*. Aqueous extract of pepino leaves ameliorates palmitic acid-induced hepatocellular lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(6): 903.

[18] Gindlhuber J, Schinagl M, Liesinger L, *et al*. Hepatocyte proteome alterations induced by individual and combinations of common free fatty acids [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3356.

[19] Qiu Q, Jiang L J, Zhen H S, *et al*. Promotion of HepG2 cell apoptosis by *Sedum emarginatum* Migo and the mechanism of action [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 31.

[20] Zhou J, Jiang Y Y, Chen H, *et al*. Tanshinone I attenuates the malignant biological properties of ovarian cancer by inducing apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(2): e12739.

[21] Yang H L, Cao Q Y, Xiong X L, *et al*. Fluoxetine regulates glucose and lipid metabolism via the PI3K-AKT signaling pathway in diabetic rats [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(4): 3073-3080.

[22] Cheng C, Liu X H, He J, *et al*. Apolipoprotein A4 restricts diet-induced hepatic steatosis via SREBF1-mediated lipogenesis and enhances IRS-PI3K-Akt signaling [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2022, 66(18): e2101034.

[23] Park J Y, Jang M G, Oh J M, *et al*. *Sasa quelpaertensis* leaf extract ameliorates dyslipidemia, insulin resistance, and hepatic lipid accumulation in high-fructose-diet-fed rats [J]. *Nutrients*, 2020, 12(12): 3762.

[24] Shi S Y, Martin R G, Duncan R E, *et al*. Hepatocyte-specific deletion of Janus kinase 2 (JAK2) protects against diet-induced steatohepatitis and glucose intolerance [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(13): 10277-10288.

[25] Liu J Y, Zhang Y C, Song L N, *et al*. Nifuroxazide ameliorates lipid and glucose metabolism in palmitate-induced HepG2 cells [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(67): 39394-39404.

[26] Gurzov E N, Stanley W J, Pappas E G, *et al*. The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes [J]. *FEBS J*, 2016, 283(16): 3002-3015.

[27] Zheng P Y, Ji G, Ma Z S, *et al*. Therapeutic effect of puerarin on non-alcoholic rat fatty liver by improving leptin signal transduction through JAK2/STAT3 pathways [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37(1): 69-83.

[责任编辑 李亚楠]