

千金子制霜前后提取物对 HEK293 和 IEC-6 细胞自噬和线粒体动力学的影响

姜明瑞, 马思媛, 朱海婷, 张俊丽, 王晓宇, 陈文静, 毛易凡, 徐 鹏, 张新宁, 王英姿*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: **目的** 从细胞自噬和线粒体动力学途径探究千金子制霜前后提取物对人胚胎肾细胞 (HEK293) 和大鼠小肠上皮细胞 (IEC-6) 的影响。 **方法** 将 HEK293 和 IEC-6 细胞分为对照组及千金子生品提取物 (100、200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组和千金子霜品提取物 (100、200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组, 分别采用 MTT 法和流式细胞术测定细胞活力、细胞凋亡、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平和线粒体膜电位; 使用丹酰尸胺 (dansylcadaverine, MDC) 染色法观察细胞自噬囊泡数量; 利用 Western blotting 检测细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3)、p62、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2)、视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophic protein 1, OPA1)、动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 的表达。 **结果** 与对照组比较, 千金子制霜前后提取物作用于 HEK293 细胞、IEC-6 细胞后存活率显著降低 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 自噬囊泡显著增多 ($P < 0.01$), 细胞内 ROS 水平显著升高 ($P < 0.01$), 线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), p62、Mfn2、OPA1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), LC3-II/I、Drp1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与相同剂量的生品比较, 千金子制霜后细胞存活率升高 ($P < 0.01$), 诱导 HEK293 和 IEC-6 细胞凋亡的能力减弱 ($P < 0.01$), 细胞自噬囊泡的数量减少 ($P < 0.01$), 线粒体膜电位升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), ROS 水平降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并能减弱对 p62、Mfn2、OPA1 蛋白表达的下调作用及 LC3-II/I、Drp1 蛋白表达的上调作用 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 **结论** 千金子制霜减毒的作用机制可能与通过调控细胞自噬途径和线粒体动力学平衡、影响细胞增殖及凋亡有关。

关键词: 千金子; 制霜减毒; 细胞自噬; 线粒体动力学; HEK293 细胞; IEC-6 细胞; 千金子素 L1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)21-7829-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.016

Effects of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on autophagy and mitochondrial dynamics in HEK293 and IEC-6 cells

JIANG Mingrui, MA Siyuan, ZHU Haiting, ZHANG Junli, WANG Xiaoyu, CHEN Wenjing, MAO Yifan, XU Peng, ZHANG Xinling, WANG Yingzi

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To investigate the effects of extracts from Qianjinzi (*Euphorbiae Semen*) before and after frosting on human embryonic kidney cells (HEK293) and rat intestinal epithelial cells (IEC-6) through the pathways of cell autophagy and mitochondrial dynamics. **Methods** The HEK293 and IEC-6 cells were divided into control group, *Euphorbiae Semen* extracts (100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$) groups and *Euphorbiae Semen Pulveratum* extracts (100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$) groups. The MTT method and flow cytometry were employed to determine cell viability, cell apoptosis, reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial membrane potential; The number of autophagic vesicles in cells was observed using dansylcadaverine (MDC) staining method; Western blotting was used to detect the expressions of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), p62, mitofusin 2 (Mfn2), optic atrophic protein 1 (OPA1) and dynamin-related protein 1 (Drp1) in cells. **Results** Compared with control group, the extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting significantly reduced the cell viability rate of HEK293 cells and IEC-6 cells ($P < 0.01$), significantly increased the apoptosis rate ($P < 0.05$, 0.01) and the number of autophagic vesicles ($P < 0.01$), elevated the intracellular ROS level ($P < 0.01$), decreased the mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$, 0.01), and down-regulated the expression levels of p62, Mfn2 and OPA1 ($P < 0.01$), while up-regulated the protein expression levels of LC3-II/I and Drp1 ($P < 0.01$). Compared with the same dose of

收稿日期: 2025-06-24

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (7232286); 国家中医药管理局高水平建设学科 (zyyzdxk-2023272)

作者简介: 姜明瑞, 博士研究生, 研究方向为中药制剂新技术与中药炮制原理研究。E-mail: jiangmingrui@126.com

*通信作者: 王英姿, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂新技术与中药炮制原理研究。E-mail: wangyizi@sina.com

Euphorbiae Semen, after frosting, the cell viability rate in HEK293 and IEC-6 cells was increased ($P < 0.01$), the ability to induce apoptosis of HEK293 and IEC-6 cells was weakened ($P < 0.01$), the number of autophagic vesicles was decreased ($P < 0.01$), the mitochondrial membrane potential was increased ($P < 0.05, 0.01$), ROS level was reduced ($P < 0.05, 0.01$), and the effect of down-regulation of p62, Mfn2 and OPA1 proteins as well as the up-regulation of LC3-II/I and Drp1 proteins were weakened ($P < 0.05, 0.01$).

Conclusion The attenuation mechanism of processing for *Euphorbiae Semen* may be closely related to its regulation of cell autophagy pathways and mitochondrial dynamic balance, ultimately affecting cell proliferation and apoptosis.

Key words: *Euphorbiae Semen*; attenuating toxicity of frosting; autophagy; mitochondrial dynamic; HEK293 cells; IEC-6 cells; *Euphorbia* factor L₁

千金子 *Euphorbiae Semen* 为大戟科植物续随子 *Euphorbia lathyris* L. 的干燥成熟种子, 味辛、性温, 有毒, 具有泻下逐水、破血消癥之效。现代研究表明, 千金子主要含有脂肪油、二萜醇酯、蛋白质等成分, 可用于二便不通、水肿、痰饮、积滞胀满、血瘀经闭等症。千金子对胃肠道有刺激作用, 故临床多采用去油制霜法炮制后入药, 以降低其毒性, 缓和其峻泻作用^[1-3]。课题组前期通过代谢组学技术研究发现, 千金子制霜后对马尿酸、 α -酮戊二酸等反映线粒体功能的生物标志物的干扰作用减小^[3], 且可通过减弱 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 通路上调引起的炎症反应, 从而减轻肠、肾损伤^[4]。

千金子制霜减毒机制可能与调控细胞自噬及减轻线粒体功能障碍有关。自噬是细胞自我防御的重要途径, 在诱导细胞凋亡、维持细胞内环境稳态和能量稳态方面发挥重要作用^[5]。但在药物诱导的炎症反应等持续刺激下会激活细胞产生过度性自噬, 可促进自噬性细胞死亡和凋亡的发生, 加重细胞损伤。而线粒体是细胞能量代谢的中心, 与细胞自噬的调控密切相关, 线粒体动力学在其结构及功能维持中扮演着关键角色, 能够通过不断的分裂融合来维持细胞的正常生理功能^[6]。目前的研究表明线粒体结构损伤和功能障碍、细胞自噬功能失调而发生的过度凋亡等, 均可能对细胞产生毒性作用^[7-8], 但是千金子制霜前后提取物通过调节与线粒体能量代谢密切相关的细胞自噬水平与线粒体融合/分裂平衡减轻肠、肾细胞损伤的作用机制尚不明确。基于此, 本研究从细胞自噬和线粒体动力学的角度探讨千金子制霜前后提取物对人胚胎肾细胞 (HEK293) 和大鼠小肠上皮细胞 (IEC-6) 的影响, 为解析千金子制霜减毒的作用机制提供重要依据。

1 材料

1.1 药材

千金子饮片 (批号 1203070692) 购自亳州市中药饮片厂, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为大戟科植物续随子 *E. lathyris* L. 的干燥成熟种子; 千金子霜由同一批千金子饮片按《中国药典》2020 年版制霜法 (通则 0213) 制得。经检测, 千金子脂肪油质量分数为 48.61%, 千金子霜脂肪油质量分数为 19.21%, 符合《中国药典》2020 年版一部标准。

1.2 细胞

HEK293 细胞、IEC-6 细胞购自北纳生物。

1.3 药品与试剂

DMEM 高糖培养基 (批号 8123305)、PBS 缓冲液 (批号 6123015)、0.25% 胰酶-EDTA (批号 2509042) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (批号 A0823D) 购自 Excell Bio 公司; 细胞级二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 710N0313)、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒 (批号 2311005) 购自北京 Solarbio 公司; MTT 试剂 (批号 20230508) 购自北京 Biorigin 公司; 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 MA0220-Jun-011)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 MA0219) 购自大连美仑生物技术有限公司; 细胞自噬染色检测试剂盒 (批号 090623240409) 购自上海碧云天生物科技有限公司; β -actin 抗体 (批号 AH11286487)、p62 抗体 (批号 Bs-2539R)、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2) 抗体 (批号 BA12287871)、视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophic protein 1, OPA1) 抗体 (批号 BB12217538)、动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 抗体 (批号 BB06201409)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 BJ08079044) 购自北京 Bioss 公司; 微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3) 抗体 (批号 CY5992) 购自上海埃必威生物技术有限公司。

1.4 仪器

Heal force 细胞培养箱、B004 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); MiliQ Biocel 纯水机 (美国 Millipore 公司); Observer.Z1 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); BD-C6 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); Tanon 1600 型凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); 凝胶电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 千金子生品与霜品提取物的制备

称取 50 g 千金子生品, 采用 300 mL 95%乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压回收乙醇, 以等体积石油醚萃取 3 次, 合并后减压回收石油醚, 得到千金子生品提取物。称取 50 g 千金子霜品, 重复上述操作, 即得千金子霜品提取物, 4 °C 保存备用^[9-10]。经高效液相色谱法检测千金子生品提取物和千金子霜品提取物中千金子素 L₁ 的质量分数分别为 (3.81 ± 0.03)、(2.03 ± 0.01) mg/g^[11]。

2.2 细胞培养

将冻存的 HEK293 细胞、IEC-6 细胞于 37 °C 水浴锅中复苏后, 分别加入含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 待细胞密度达到 80%~90% 时传代。

2.3 MTT 法检测细胞存活率

取处于对数生长期的 HEK293 和 IEC-6 细胞, 以 5 × 10³ 个/孔均匀接种于 96 孔板中, 设置空白组 (仅含培养基)、对照组 (仅含细胞和培养基) 及千金子生品提取物 (50、100、200、400、800 μg/mL) 组和千金子霜品提取物 (50、100、200、400、800 μg/mL) 组, 各给药组加入不同浓度的药液 100 μL, 每组设 6 个复孔, 孵育 48 h 后加入 20 μL MTT 溶液孵育 4 h, 弃去上清, 加入 150 μL DMSO 显色, 于 490 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

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

2.4 Annexin V-FITC/PI 染色法检测细胞凋亡

取处于对数生长期的 HEK293 和 IEC-6 细胞, 以 2 × 10⁵ 个/孔均匀接种于 6 孔板中, 设置对照组 (仅含细胞和培养基) 及千金子生品提取物 (100、200、400 μg/mL) 组和千金子霜品提取物 (100、200、400 μg/mL) 组, 每组设 3 个复孔。加入药物干预 48 h

后, 使用不含 EDTA 的胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。用 1 × 结合缓冲液重新悬浮细胞, 取 100 μL 细胞悬液, 加入 5 μL Annexin V/FITC 避光孵育 5 min, 再加入 10 μL PI 溶液和 200 μL PBS, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 丹酰尸胺 (dansylcadaverine, MDC) 染色观察细胞自噬囊泡形成情况

取处于对数生长期的 HEK293 和 IEC-6 细胞, 以 2 × 10⁵ 个/孔均匀接种于 6 孔板中, 按“2.4”项下方法进行分组处理。加入药物干预 48 h 后, 吸净培养液, 用 PBS 清洗 1 次, 避光加入 1 mL MDC 染色液, 放置于 37 °C 细胞培养箱中染色。染色结束后吸净 MDC 染色液, 使用 1 × Assay Buffer 洗涤, 在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 DCFH-DA 染色法测定细胞内 ROS 水平

取处于对数生长期的 HEK293 和 IEC-6 细胞, 以 2 × 10⁵ 个/孔均匀接种于 6 孔板中, 按“2.4”项下方法进行分组处理。加入药物干预 48 h 后, 收集细胞悬液, 用无血清培养液洗涤, 1 000 r/min 离心 5 min。每孔加入 1 mL 用无血清培养基稀释的 DCFH-DA 探针, 重悬细胞沉淀, 37 °C 孵育 1 h 后弃去培养基, PBS 溶液洗涤, 收集细胞沉淀, 加入 PBS 溶液重悬, 使用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

2.7 JC-1 染色法测定细胞线粒体膜电位

取处于对数生长期的 HEK293 和 IEC-6 细胞, 以 2 × 10⁵ 个/孔均匀接种于 6 孔板中, 按“2.4”项下方法进行分组处理。加入药物干预 48 h 后, 吸弃培养液, 收集细胞。加入 JC-1 工作液, 37 °C 避光孵育 20 min 后, 4 °C、600 × g 离心 4 min, 吸弃上清, 使用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 弃上清, 加入 JC-1 染色缓冲液重悬细胞, 采用流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位。

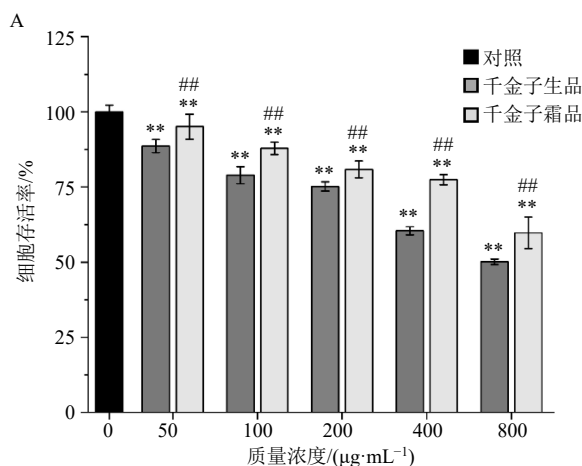
2.8 Western blotting 检测 LC3-II/I、p62、Mfn2、OPA1、Drp1 蛋白表达

取处于对数生长期的 HEK293 和 IEC-6 细胞, 以 2 × 10⁵ 个/孔均匀接种于 6 孔板中, 按“2.4”项下方法进行分组处理。加入药物干预 48 h 后, 弃去上清, 加入适量的裂解液裂解细胞, 收集细胞上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5%脱脂牛奶于室温封闭 2 h, 分别加入 LC3 (1 : 1 000)、p62 (1 : 1 000)、Mfn2 (1 : 1 000)、OPA1 (1 : 1 000)、Drp1 (1 : 1 000)、β-actin (1 : 5 000)

一抗, 4 ℃ 孵育过夜; TBST 洗涤后, 加入二抗 (1 : 20 000), 室温孵育 1 h; TBST 洗涤后, 使用凝胶成像系统曝光, 利用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 统计学分析

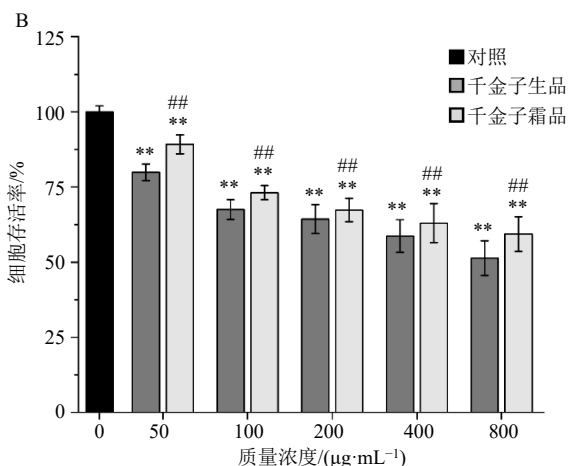
采用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计学分析, 符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组均符合正态分布的数据做方差齐性检验, 组间方差齐时, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 检验; 组间方差不齐时, 采用非参数检验。



3 结果

3.1 千金子制霜前后提取物对 HEK293 和 IEC-6 细胞存活率的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 50~800 μg/mL 千金子制霜前后提取物均能显著降低 HEK293 和 IEC-6 细胞存活率 ($P < 0.01$); 与相同剂量的千金子生品组比较, 千金子霜品提取物对 HEK293 和 IEC-6 细胞存活率的抑制作用明显减弱 ($P < 0.01$)。故选择 100、200、400 μg/mL 的千金子制霜前后提取物进行后续实验。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与相同剂量的千金子生品组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs *Euphorbiae Semen* at same dose group, same as below figures.

图 1 千金子制霜前后提取物对 HEK293 (A) 和 IEC-6 (B) 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effects of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on viability of HEK293 (A) and IEC-6 (B) cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.2 千金子制霜前后提取物对 HEK293 和 IEC-6 细胞凋亡的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 千金子制霜前后提取物 (100、200、400 μg/mL) 组 HEK293 和 IEC-6 细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与相同剂量的千金子生品组比较, 100、400 μg/mL 的千金子霜品提取物显著降低 HEK293 细胞凋亡率 ($P < 0.01$), 100、200、400 μg/mL 的千金子霜品提取物显著降低 IEC-6 细胞凋亡率 ($P < 0.01$)。

3.3 千金子制霜前后提取物对 HEK293 和 IEC-6 细胞自噬囊泡形成的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 千金子制霜前后提取物 (100、200、400 μg/mL) 组 HEK293 和 IEC-6 细胞内绿色荧光增强, 自噬体数量明显增加 ($P < 0.01$); 与相同剂量的千金子生品组比较, 千金子霜品提取物组 HEK293 和 IEC-6 细胞内自噬囊泡数量

降低, 其中千金子霜品提取物 (100、400 μg/mL) 组细胞内荧光强度显著减弱 ($P < 0.01$)。

3.4 千金子制霜前后提取物对 HEK293 和 IEC-6 细胞自噬相关蛋白 LC3-II/I、p62 表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 千金子制霜前后提取物 (100、200、400 μg/mL) 组 HEK293 细胞中自噬相关蛋白 p62 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), LC3-II/I 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与相同剂量的千金子生品组比较, 千金子霜品提取物 (100、200、400 μg/mL) 组 HEK293 细胞中 p62 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 千金子霜品提取物 (100、200 μg/mL) 组 HEK293 细胞中 LC3-II/I 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

如图 5 所示, 与对照组比较, 千金子制霜前后提取物 (100、200、400 μg/mL) 组 IEC-6 细胞中 p62 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), LC3-II/I 蛋白表

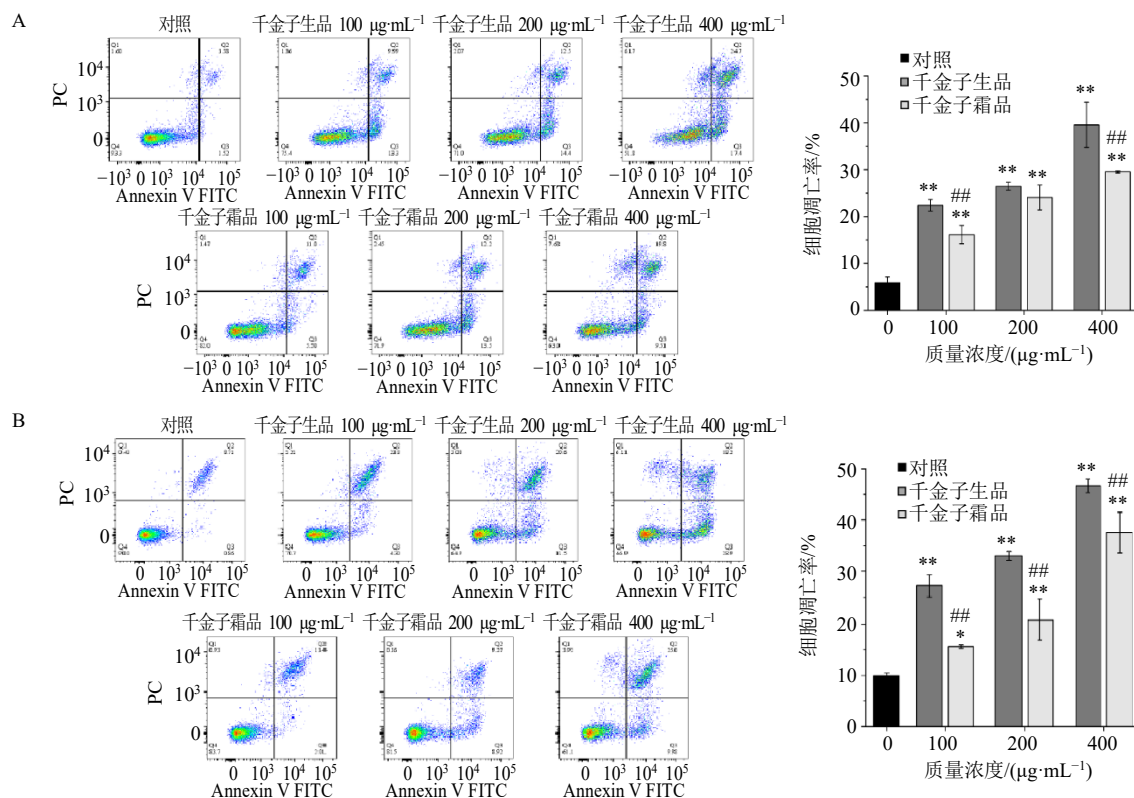


图 2 千金子制霜前后提取物对 HEK293 (A) 和 IEC-6 (B) 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on apoptosis of HEK293 (A) and IEC-6 (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

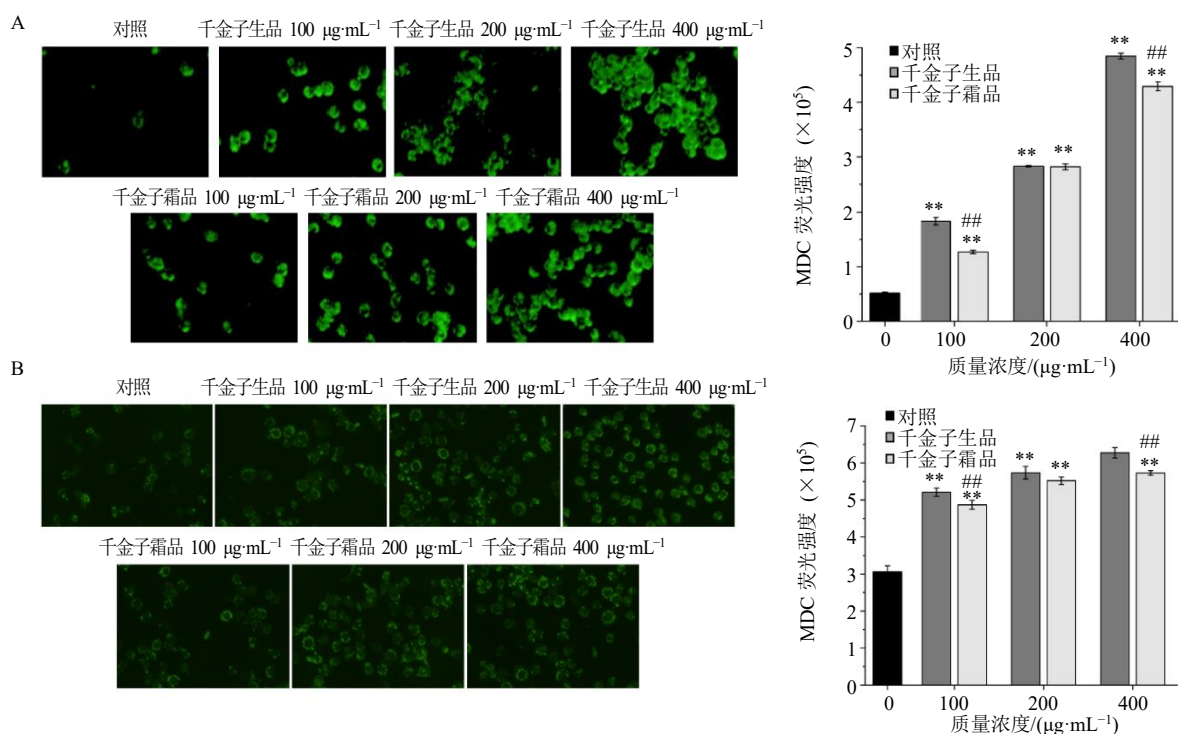


图 3 千金子制霜前后提取物对 HEK293 (A) 和 IEC-6 (B) 细胞自噬囊泡形成的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on formation of autophagosomes in HEK293 (A) and IEC-6 (B) cells ($\times 200$; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

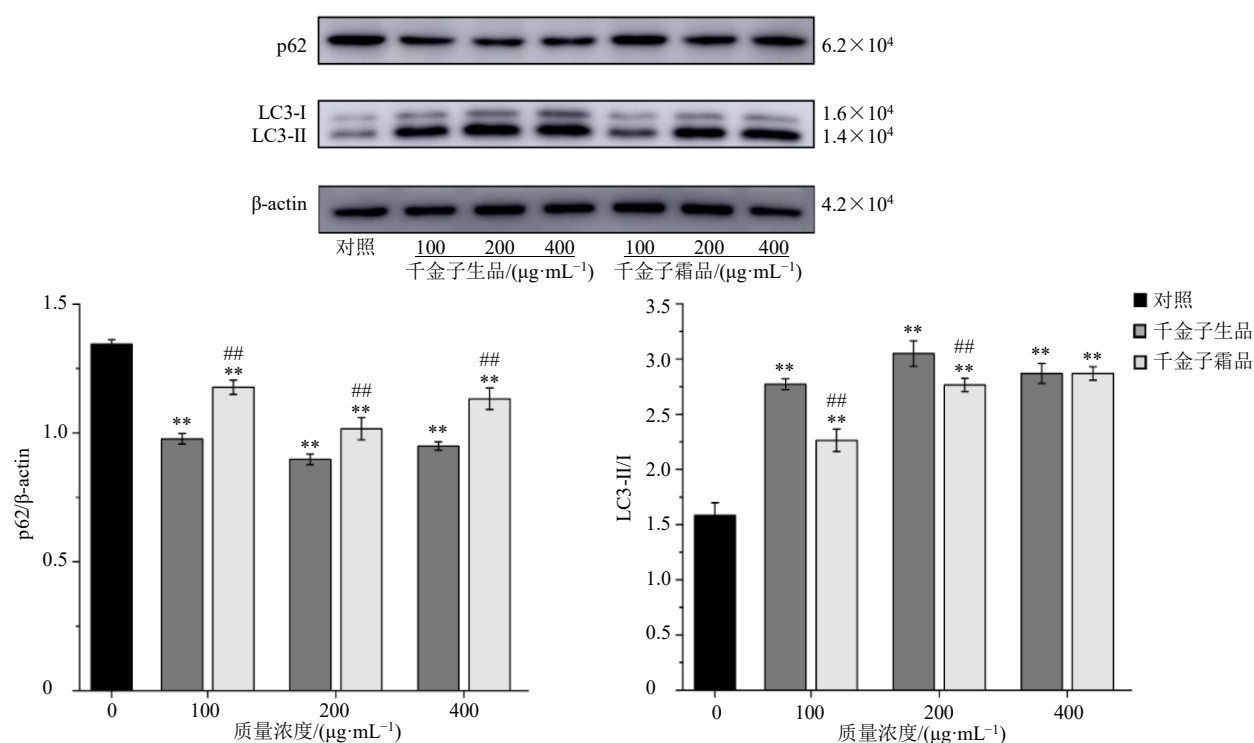


图 4 千金子制霜前后提取物对 HEK293 细胞 p62、LC3-II/I 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on expressions of p62 and LC3-II/I proteins in HEK293 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

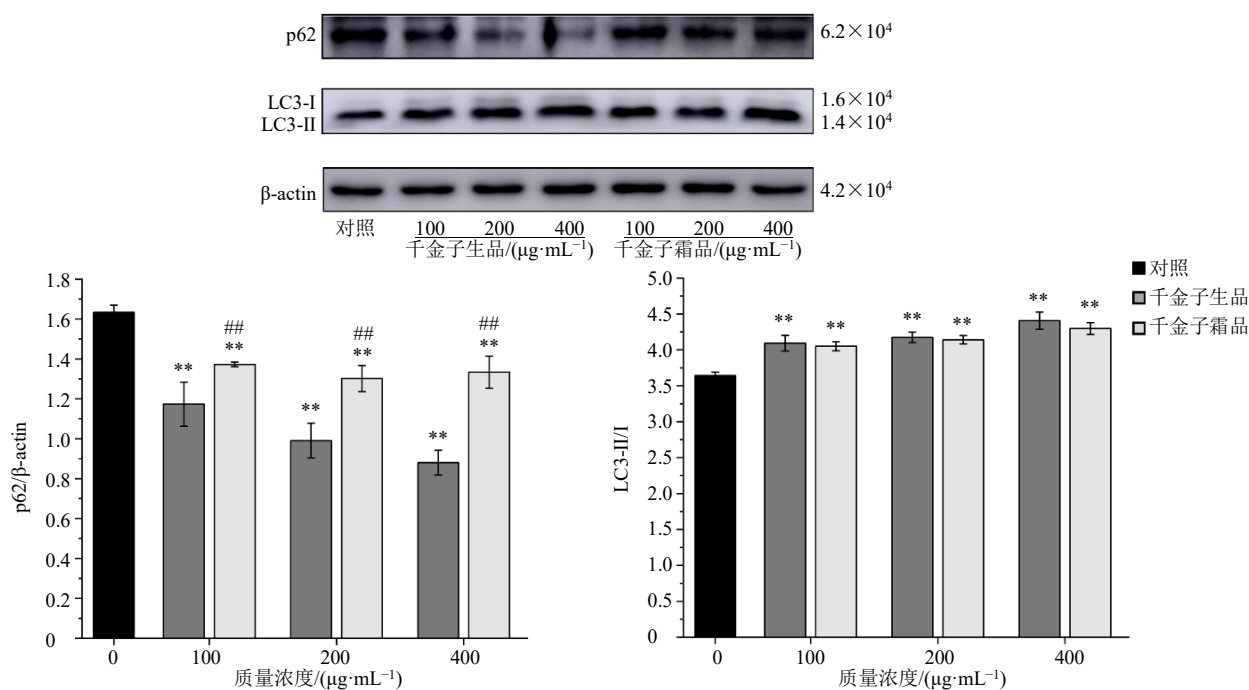


图 5 千金子制霜前后提取物对 IEC-6 细胞 p62、LC3-II/I 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on expressions of p62 and LC3-II/I proteins in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

达水平显著升高 ($P<0.01$); 与相同剂量的千金子生品组比较, 千金子霜品提取物 (100、200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组 p62 表达水平显著升高 ($P<0.01$), LC3-II/I 表达水平无显著变化。

3.5 千金子制霜前后提取物对 HEK293 和 IEC-6 细胞 ROS 水平的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 千金子制霜前后

提取物 (200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组 HEK293 细胞内 ROS 水平显著升高 ($P<0.01$), 千金子生品提取物 (100、200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组和千金子霜品提取物 (200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组 IEC-6 细胞内 ROS 水平显著升高 ($P<0.01$); 与相同剂量的千金子生品组比较, 千金子霜品提取物 (200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组 HEK293 细胞和 IEC-6 细胞内 ROS 水平均显著降低 ($P<0.05$ 、0.01)。

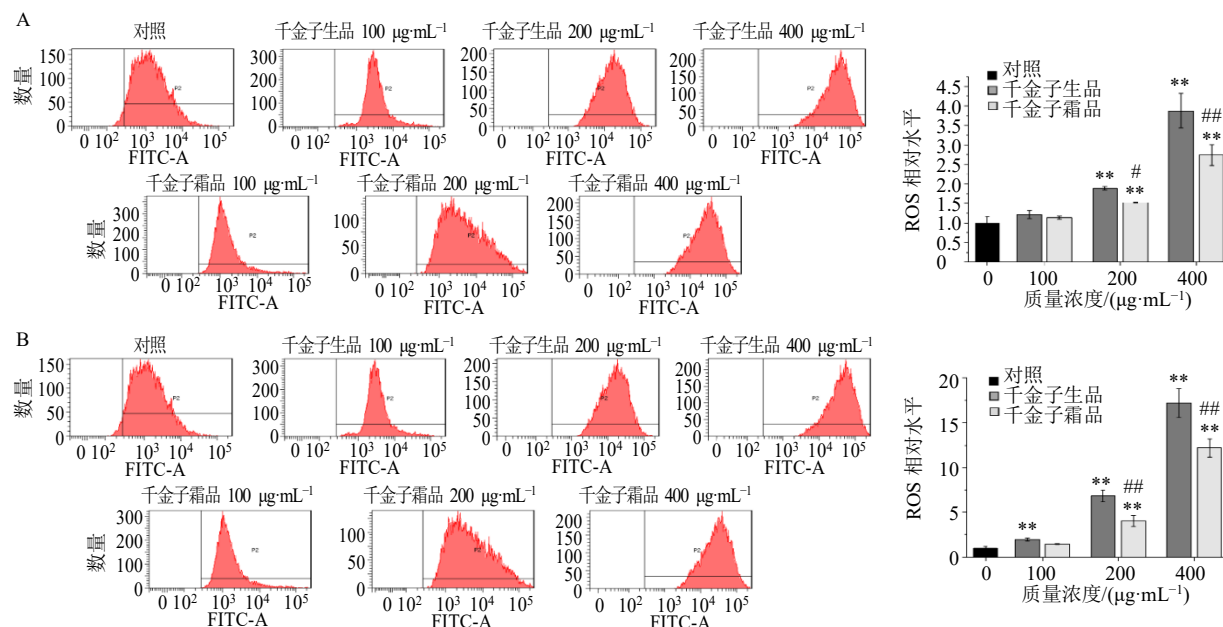


图 6 千金子制霜前后提取物对 HEK293 (A) 和 IEC-6 (B) 细胞内 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effects of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on ROS level in HEK293 (A) and IEC-6 (B) cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 千金子制霜前后提取物对 HEK293 和 IEC-6 细胞线粒体膜电位的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 千金子生品提取物 (200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组和千金子霜品提取物 (400 $\mu\text{g/mL}$) 组 HEK293 细胞线粒体膜电位显著降低 ($P<0.05$ 、0.01), 千金子制霜前后提取物 (100、200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组 IEC-6 细胞线粒体膜电位显著降低 ($P<0.05$ 、0.01); 与相同剂量的千金子生品组比较, 千金子霜品提取物 (400 $\mu\text{g/mL}$) 组 HEK293 细胞线粒体膜电位显著升高 ($P<0.05$), 千金子霜品提取物 (100、200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组 IEC-6 细胞线粒体膜电位均显著升高 ($P<0.01$)。

3.7 千金子制霜前后提取物对 HEK293 和 IEC-6 细胞线粒体动力学相关蛋白 Mfn2、OPA1、Drp1 表达的影响

如图 8 所示, 在 HEK293 细胞中, 与对照组比较, 千金子生品提取物 (200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组和千

金子霜品提取物 (400 $\mu\text{g/mL}$) 组 Mfn2 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), 千金子生品提取物 (100 $\mu\text{g/mL}$) 组和千金子霜品提取物 (100、200 $\mu\text{g/mL}$) 组 OPA1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$), 千金子生品提取物 (400 $\mu\text{g/mL}$) 组 OPA1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), 千金子制霜前后提取物 (100、200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组 Drp1 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$); 与相同剂量的千金子生品组比较, 千金子霜品提取物 (400 $\mu\text{g/mL}$) 组 Mfn2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$), Drp1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), 千金子霜品提取物 (100、200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组 OPA1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$)。

如图 9 所示, 在 IEC-6 细胞中, 与对照组比较, 千金子制霜前后提取物 (100、200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组线粒体融合蛋白 Mfn2 和 OPA1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), 线粒体分裂蛋白 Drp1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$); 与相同剂量的千金子生品

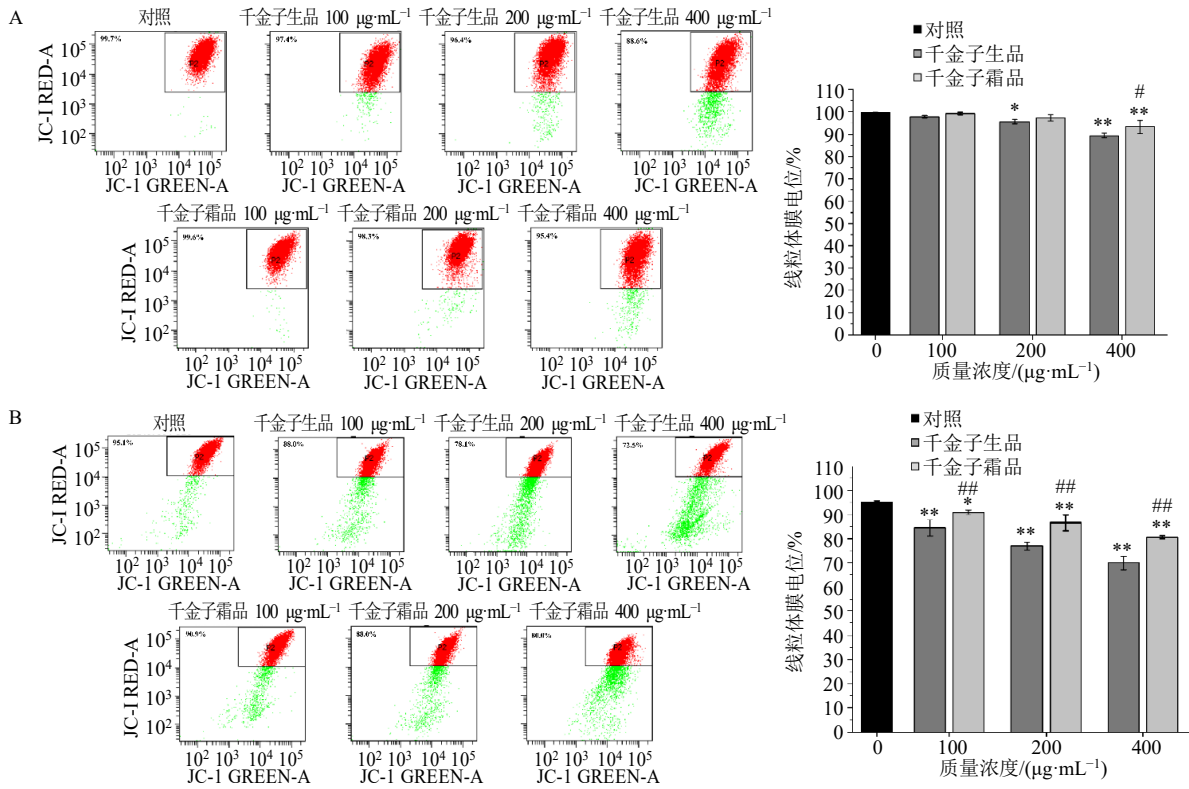


图 7 千金子制霜前后提取物对 HEK293 (A) 和 IEC-6 (B) 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on mitochondrial membrane potential in HEK293 (A) and IEC-6 (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

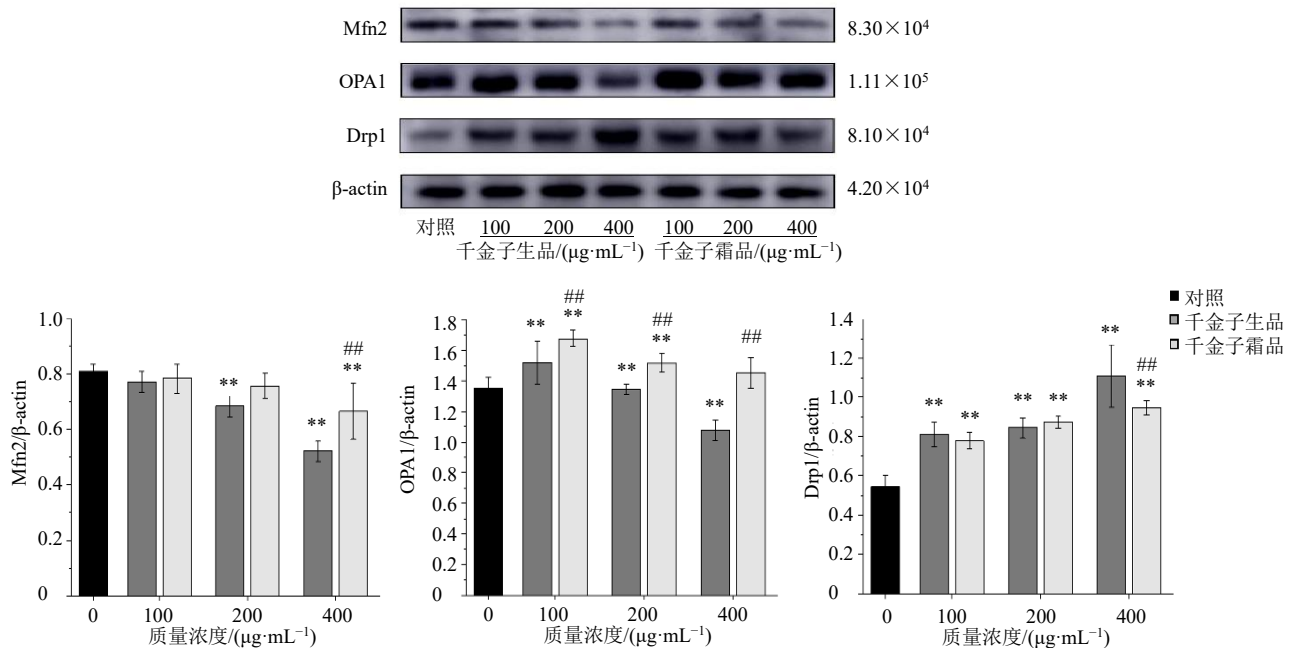


图 8 千金子制霜前后提取物对 HEK293 细胞 Mfn2、OPA1、Drp1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on expressions of Mfn2, OPA1 and Drp1 proteins in HEK293 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

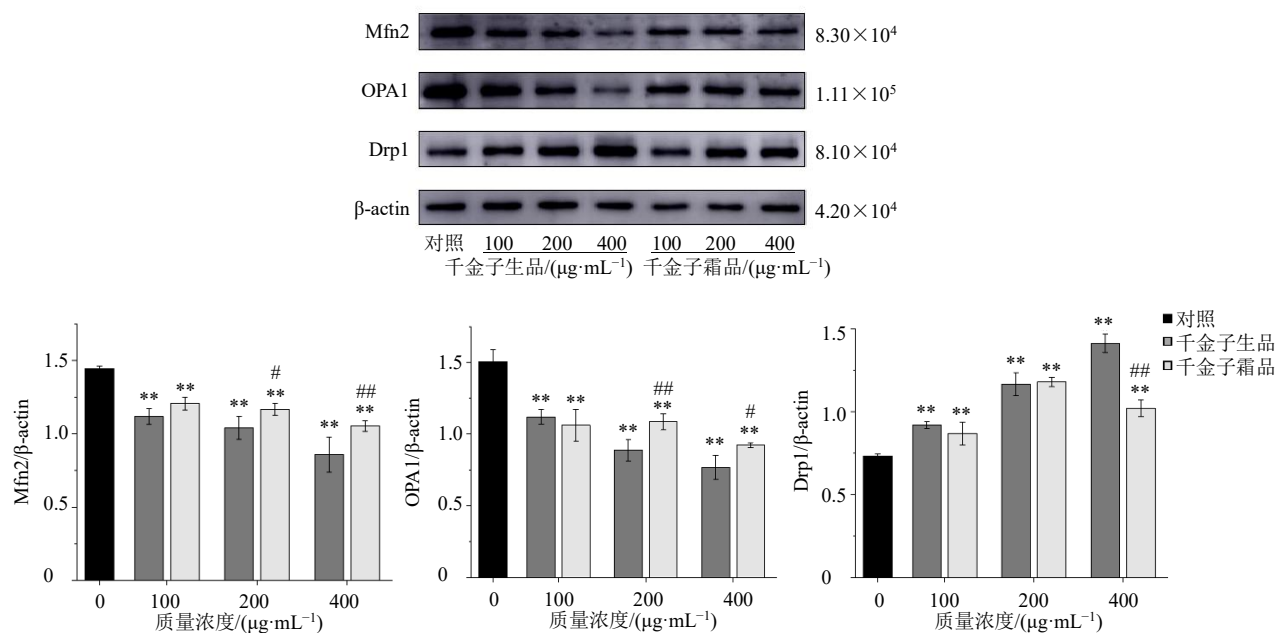


图 9 千金子制霜前后提取物对 IEC-6 细胞 Mfn2、OPA1、Drp1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effects of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on expressions of Mfn2, OPA1 and Drp1 proteins in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组比较, 千金子霜品提取物 (200、400 $\mu\text{g/mL}$) 组 Mfn2 和 OPA1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 千金子霜品提取物 (400 $\mu\text{g/mL}$) 组 Drp1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

细胞自噬是一种在正面或者负面环境下能够进行自我保护和自我更新的机制, 正常条件下细胞自噬活性维持在较低水平, 在营养剥夺或应激条件下能够降解受损的细胞器, 同时协助细胞调节其内部的蛋白质水平保持细胞的正常功能^[12-14]。另一方面, 过度活化的细胞自噬则导致细胞功能受损, 引起自噬性死亡^[15]。本研究检测了自噬过程中具有代表性的 LC3、p62 蛋白^[16-17], LC3 是一种可溶性蛋白, 在自噬形成时, LC3-I 通过泛素激活酶 E1 和泛素结合酶 E2 与磷脂酰乙醇胺偶联, 生成 LC3-II, 负责膜的融合和选择性降解过程, LC3-II 的表达水平或 LC3-II/I 的值通常与自噬体数量成正比, p62 是细胞自噬的接头蛋白, 在自噬过程中与泛素化的蛋白质结合, 当线粒体受损后其被激活, 在自噬体表面与 LC3-II 蛋白相互作用形成复合物自噬体, 将受损线粒体包裹形成自噬小体, 与 LC3-II 共同调节选择性降解过程, 其表达水平的下降常被认为是自噬活性的增强^[18-20]。王佳贺等^[21]通过体外实验发现从狼毒大戟中的二萜类化合物岩大戟内酯 B 能够诱导

人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞发生自噬, 抑制细胞自噬后能够降低 HL-60 细胞的凋亡。Herawati 等^[22]以人非小细胞肺癌 A549 细胞为研究对象, 发现蓖麻籽粗蓖麻毒素能够诱导细胞凋亡、坏死, 并通过调节 Beclin-1、自噬相关蛋白 5 (autophagy-related protein 5, Atg5)、LC3-II 及 p62 的表达从而抑制 A549 细胞自噬。本研究在体外条件下证明了千金子生品可降低 HEK293 和 IEC-6 细胞的存活率, 促进细胞凋亡, 制霜能降低其诱导凋亡作用, 从而缓解细胞毒性。进一步研究结果表明千金子生品提取物作用于 HEK293 和 IEC-6 细胞后自噬囊泡数量增加, 抑制细胞中自噬相关蛋白 p62 的表达, 升高 LC3-II/I 的值, 促进自噬过程中自噬囊泡的融合和降解, 说明千金子生品提取物诱导 HEK293 和 IEC-6 细胞发生的为病理性自噬, 可能是其导致肠、肾损伤的主要原因之一, 而制霜后相较于生品能够减弱其引起的病理性自噬, 表现为细胞内自噬泡数量降低, 荧光强度减弱, p62 蛋白表达水平的升高和 LC3-II/I 表达水平的降低, 从而减轻肠、肾细胞损伤。

线粒体动力动态平衡是细胞线粒体稳态和功能保持稳定的前提, 在正常细胞内, 通过相关蛋白调节, 实现分裂/融合动力学平衡, 能够维持线粒体能量代谢以及机体的正常生理功能, 一旦该平衡破坏则会导致线粒体断片化使其功能受损, 造成细胞

氧化应激^[23-24]。Drp1 是调控线粒体分裂的关键蛋白,Mfn2 和 OPA1 是介导线粒体内外膜融合的关键蛋白,共同维持线粒体形态、数量、质量的相对稳定^[25-26]。已有的研究报道线粒体 ROS 过度产生、线粒体膜电位下降和线粒体动力学失衡是线粒体功能障碍的重要表现^[27]。胡瑜^[28]发现红大戟与醋制红大戟均能显著降低 IEC-6 细胞线粒体膜电位,提示醋制红大戟的减毒机制可能与线粒体膜电位的调节有关,Shi 等^[29]研究发现大戟属植物泽漆的二萜衍生物 euphobias B 可能通过改善线粒体损伤,维持线粒体膜电位进而抑制 NLRP3 的激活。为进一步说明千金子制霜后降低肠、肾细胞损伤的作用机制,本研究检测了细胞内 ROS 水平及线粒体膜电位的变化,结果表明,千金子生品提取物组较对照组 ROS 水平显著升高,并可能通过 ROS 影响 HEK293 和 IEC-6 细胞线粒体膜的通透性,降低线粒体膜电位,无法进行正常的能量代谢。制霜后与千金子生品组相比,能够缓解细胞内 ROS 水平的升高,维持线粒体膜电位完整性。线粒体融合分裂相关蛋白的表达结果显示,千金子生品提取物较对照组能够引起线粒体融合蛋白 Mfn2 和 OPA1 表达下降,并提高细胞中线粒体分裂蛋白 Drp1 的表达,使线粒体分裂和融合过程出现异常,诱导线粒体动力学稳态的明显失衡,而千金子霜品提取物相较于千金子生品提取物,细胞中 Mfn2、OPA1 蛋白的下调作用和 Drp1 蛋白表达的上调作用明显减弱,能够缓解线粒体动力学失衡现象,改善线粒体能量代谢紊乱从而降低肠、肾细胞损伤作用。

综上,千金子制霜后可能通过调节细胞自噬水平和线粒体融合/分裂的动态平衡,减轻对肠、肾细胞的损伤。本研究初步阐明了千金子制霜前后提取物对调控与能量代谢密切相关的细胞自噬和线粒体动力学途径的影响,为千金子制霜减毒机制的深入研究提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 36-37.
- [2] Zhang Y, Wang Y Z, Li S J, et al. ITRAQ-based quantitative proteomic analysis of processed *Euphorbia lathyris* L. for reducing the intestinal toxicity [J]. *Proteome Sci*, 2018, 16: 8.
- [3] Yang Z Y, Jiang M R, Yue Z Z, et al. Metabonomics analysis of *Semen Euphorbiae* and *Semen Euphorbiae* *Pulveratum* using UPLC-Q-TOF/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2022, 36(3): e5279.
- [4] 王慧楠,姜明瑞,王志成,等. 千金子制霜前后提取物对 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路的影响研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(6): 780-789.
- [5] 许可嘉. 自噬介导的雷公藤甲素肝脏毒性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [6] 谭子璇,朱武政. 线粒体动力学调控机制及其在肾脏病理生理学中的作用 [J]. *生理学报*, 2024, 76(1): 148-160.
- [7] 韩岚,林朝展,赵海霞,等. 2012—2021 年国家自然科学基金中药毒理学研究方向资助项目分析 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(5): 1415-1420.
- [8] 张巧巧,景永帅,张丹参. 线粒体质量控制在缺血性脑损伤中的作用机制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2023, 37(7): 501-502.
- [9] 杨子烨,张桂梅,王佩华,等. 千金子制霜前后提取物对人胚肾细胞 HEK293 的体外毒性作用 [J]. *中国现代中药*, 2022, 24(5): 831-836.
- [10] 王慧楠,魏晓彤,石双慧,等. 千金子制霜前后提取物通过调控脂筏介导 Caco-2 细胞中 TLR4 信号通路的作用机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(22): 7474-7481.
- [11] 姜明瑞,岳珠珠,王志成,等. 千金子生品和霜品提取物中主要二萜醇酯类成分在大鼠肠道菌群中的体外代谢研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(6): 2579-2585.
- [12] 张昕. 羽扇豆醇通过促进自噬抑制三阴性乳腺癌的作用机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
- [13] 吕瑞龙,窦芬瑜,柴梦娜,等. 中药调控线粒体自噬抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(8): 3005-3013.
- [14] Li Qi Y, Luo Y, Guo H B, et al. Compound Danshen Tablets ameliorate myocardial ischemia/reperfusion injury-induced ventricular remodeling by regulating autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(3): 548-554.
- [15] 张彩霞,王伟艳,李会芳,等. miR-20a 通过 ATG16L1 影响细胞自噬并参与调节雷公藤甲素肝毒性 [J]. *中草药*, 2023, 54(13): 4214-4223.
- [16] Islam M A, Sooro M A, Zhang P H. Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1405.
- [17] Liu W J, Ye L, Huang W F, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2016, 21: 29.
- [18] 刘进进. 党参多糖对去卵巢大鼠骨质疏松的影响及机制研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- [19] 陈雪瑞. pH 响应型 MOF 纳米粒子输送药物在细胞自

- 噬和抗肿瘤治疗中的应用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [20] 朱晓敏, 钟颖, 黄娜娜, 等. 基于 Akt/mTOR 通路研究地榆皂苷 II 诱导肝癌细胞凋亡和自噬作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(11): 3726-3734.
- [21] 王佳贺, 王超. 细胞自噬对岩大戟内酯 B 诱导的白血病细胞 HL-60 凋亡的影响 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(28): 13-16.
- [22] Herawati I E, Lesmana R, Levita J, *et al.* Cytotoxicity, apoptosis, migration inhibition, and autophagy-induced by crude ricin from *Ricinus communis* seeds in A549 lung cancer cell lines [J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2022, 28: e936683.
- [23] 李小波, 谢艳, 陈金霞, 等. 大黄酸抑制线粒体分裂和 EMT 减缓乳腺癌细胞迁移 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2023, 25(8): 2692-2698.
- [24] 潘冬梅, 柯孙葵, 尹乾浩, 等. MoS₂ 纳米酶通过调控线粒体动力及自噬减轻炎性内皮细胞损伤 [J]. 药学报, 2024, 59(10): 2791-2799.
- [25] Chen D Y, Duan H Q, Zou C, *et al.* 20(R)-ginsenoside Rg₃ attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by mitigating mitochondrial oxidative stress via the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(3): 1462-1477.
- [26] Xian H X, Liou Y C. Functions of outer mitochondrial membrane proteins: Mediating the crosstalk between mitochondrial dynamics and mitophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(3): 827-842.
- [27] 何凯仪. BCATc Inhibitor 2 介导的 Mfn2 泛素化降解和线粒体功能障碍促进胶质母细胞瘤细胞凋亡的机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2024.
- [28] 胡瑜. 红大戟醋法炮制减毒存效机制研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2023.
- [29] Shi Q Q, Zhang X J, Wang T T, *et al.* Euphobias A—C: Three rearranged jatrophane diterpenoids with tricyclo [8.3.0.0^{2,7}] tridecane and tetracyclo [11.3.0.0^{2,10}.0^{3,7}] hexadecane cores from *Euphorbia helioscopia* [J]. *Org Lett*, 2020, 22(20): 7820-7824.

[责任编辑 李亚楠]