

芪葛汤有效成分降脂的体外初筛实验

张伟娇^{1,2}, 谭梅傲^{3,4}, 柯雪红^{2,4}, 周遵明^{3,4}, 黄可儿^{2,4}(1. 深圳市宝安纯中医治疗医院, 广东深圳 518000; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东广州 510405;
3. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东广州 510405; 4. 岭南医学研究中心, 广东广州 510405)

摘要:【目的】体外筛选芪葛汤降脂的有效成分。【方法】采用300 $\mu\text{mol/L}$ 油酸+150 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸+100 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸体外构建大鼠BRL肝细胞脂质堆积模型, 体外筛选黄芪甲苷、葛根素、川陈皮素、3'-羟基葛根素、毛蕊异黄酮、柚皮素、槲皮素等7个芪葛汤的有效成分。以四甲基偶氮唑盐(MTT)实验确定芪葛汤有效成分对肝细胞的毒性剂量。预给药干预48 h, 分别使用氯仿与甲醇、异丙醇抽提细胞脂质, 检测甘油三酯(TG)含量, 采用油红O染色法观察细胞脂质堆积情况。【结果】经MTT实验确定100 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷、1 mmol/L 葛根素、40 $\mu\text{mol/L}$ 川陈皮素、500 $\mu\text{mol/L}$ 3'-羟基葛根素、100 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊异黄酮、100 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素、20 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素为干预肝细胞的无毒性剂量。氯仿与甲醇抽提脂质发现100 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷、1 mmol/L 葛根素、40 $\mu\text{mol/L}$ 川陈皮素、100 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素能降低肝细胞TG含量。而异丙醇抽提脂质结果发现100 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷、40 $\mu\text{mol/L}$ 川陈皮素、100 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素、20 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素能降低肝细胞TG含量。油红O染色结果提示模型组细胞大量脂质堆积, 而黄芪甲苷、川陈皮素、柚皮素的脂质堆积稍有减少, 其他组则改善不明显。【结论】芪葛汤有效成分黄芪甲苷、川陈皮素、柚皮素可降低大鼠BRL肝细胞脂质堆积。

关键词: 芪葛汤; 黄芪甲苷; 川陈皮素; 柚皮素; 降脂; 大鼠肝细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)08-1700-08

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.08.029

Preliminary Screening of Effective Components of *Qige* Decoction with Lipid-lowering EffectZHANG Wei-Jiao^{1,2}, TAN Mei-Ao^{3,4}, KE Xue-Hong^{2,4},
ZHOU Zun-Ming^{3,4}, HUANG Ke-Er^{2,4}

(1. Shenzhen Baoan Pure Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000 Guangdong, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 3. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 4. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To screen the effective lipid-lowering components of *Qige* Decoction *in vitro*. **Methods** Firstly, lipid accumulation model of Buffalo rat liver(BRL) cells was established by using 300 $\mu\text{mol/L}$ oleic acid, 150 $\mu\text{mol/L}$ palmitic acid and 100 $\mu\text{mol/L}$ linoleic acid *in vitro*. *In vitro*, 7 active ingredients of *Qige* Decoction including astragaloside IV, puerarin, nobiletin, 3'-hydroxy puerarin, calycosin, naringenin, quercetin were screened. methyl-thiazolyl-tetrazolium(MTT) assay was used to determine the toxic dose of active ingredients of *Qige* Decoction for liver cells. After 48 hours of pre-administration intervention, chloroform and methanol, and isopropanol were used to extract cell lipids, respectively, and oil red O staining method was used to observe the accumulation of cell lipids. **Results** MTT assay results showed that 100 $\mu\text{mol/L}$ of astragaloside IV, 1 mmol/L of puerarin, 40 $\mu\text{mol/L}$ of nobiletin, 500 $\mu\text{mol/L}$ of 3'-hydroxy puerarin, 100 $\mu\text{mol/L}$ of calycosin, 100 $\mu\text{mol/L}$ of naringenin, 20 $\mu\text{mol/L}$ of quercetin were non-toxic doses for intervening liver cells. The results of chloroform and

收稿日期: 2021-04-07

作者简介: 张伟娇(1983-), 女, 硕士, 主治医师; E-mail: jiaomirabelle@qq.com

通讯作者: 黄可儿, 女, 博士, 博士研究生导师, 主任医师; E-mail: hke8989@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 82074099、82074099); 广州中医药大学“一流学科建设学科研究项目”(编号: XK2019011); 广州中医药大学第一附属医院“创新强院科研项目之院内制剂开发项目”(编号: 211010010602)

methanol extraction showed that 100 $\mu\text{mol/L}$ of astragaloside IV, 1 mmol/L of puerarin, 40 $\mu\text{mol/L}$ of Nobiletin and 100 $\mu\text{mol/L}$ of naringin reduced the content of TG in liver cells. Isopropanol extraction results showed that 100 $\mu\text{mol/L}$ of astragaloside IV, 40 $\mu\text{mol/L}$ of nobiletin, 100 $\mu\text{mol/L}$ of naringin and 20 $\mu\text{mol/L}$ of quercetin reduced the TG content of liver cells. Oil red O staining results showed that a large amount of lipid accumulation in the model group, and the lipid accumulation in astragaloside IV, citrinin and naringin groups was slightly reduced, however the improvement was not obvious in the other groups. **Conclusion** The effective components such as qigedecocotion, astragaloside IV, tangerinin and naringin is effective for reducing lipid accumulation in BRL cells.

Keywords: Qige Decocotion; astragaloside IV; tangerinin; naringin; lowering lipid; rat liver cells

芪葛汤是由黄芪30 g、葛根10 g、陈皮5 g组成。方中：黄芪，甘，微温，入脾、肺经，具有健脾补中的功效；葛根，甘、辛，凉，归脾、胃经，具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻的功能；陈皮，苦，温，归脾、肺经，具有理气健脾、燥湿化痰的功效。本课题组多年致力于芪葛汤的药理研究，芪葛汤对大鼠酒精性肝损伤具有治疗作用，芪葛汤预给药不仅能降低酒精性肝损伤大鼠的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)，通过代谢组学分析亦发现其还能改善酒精性肝损伤的甘油磷脂、色氨酸、花生四烯酸等脂质产物的代谢^[1]，表明芪葛汤可能具有降脂的药理作用。

在前期实验中，本课题组共筛选了多个芪葛汤的入血移行成分^[2]，包括川陈皮素、3'-羟基葛根素等，而黄芪甲苷、葛根素为黄芪、葛根的主要成分，因此，本研究共筛选黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)、葛根素(puerarin)、川陈皮素(nobiletin)、3'-羟基葛根素(3'-hydroxy puerarin)、毛蕊异黄酮(calycosin)、柚皮素(naringenin)、槲皮素(quercetin)等7个有效成分进行体外的初筛实验。

由于体内环境与体外环境的差异，本实验采用300 $\mu\text{mol/L}$ 油酸+150 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸+100 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸构建大鼠肝细胞脂质堆积的模型，应用全自动生化仪检测大鼠肝细胞的甘油三酯(TG)含量并应用油红O染色法观察肝细胞脂质堆积情况，现将研究结果报道如下。

1 材料

1.1 细胞 大鼠BRL肝细胞系购自于国家实验细胞资源共享平台，培养条件：DMEM高糖培养基+10%胎牛血清(FBS)+1%青霉素-链霉素；冻存条

件：DMEM高糖培养+8%二甲基亚砷(DMSO)+20%FBS。

1.2 药品 黄芪甲苷分析标准品[高效液相色谱(HPLC) $\geq 99.89\%$]、川陈皮素分析标准品(HPLC $\geq 98.5\%$)、毛蕊异黄酮分析标准品(HPLC $\geq 98.5\%$)、柚皮分析标准品(HPLC $\geq 99.18\%$)(成都曼思特生物科技有限公司)；葛根素分析标准品(HPLC $\geq 98\%$)(上海源叶公司)；3'-羟基葛根分析标准品(HPLC $\geq 98\%$)[Cato research chemical(中国)公司]；槲皮素分析标准品(中科院药检所)。

1.3 试剂与仪器 亚油酸(西安鲲鹏公司)；油酸钠、棕榈酸钠(美国Sigma公司)；DMEM高糖培养基、FBS、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)(0.25%)、青霉素-链霉素(美国Gibco公司)；TG检测试剂盒(九强生物技术有限公司)；四甲基偶氮唑盐(MTT)细胞增殖及毒性检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司)；油红O染色液(北京Solarbio公司)。CKS53倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)；BS-220全自动生化仪(美国迈瑞公司)；BIO-RAD550酶标仪(日本Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 棕榈酸与油酸的配制 由于棕榈酸与油酸均不溶于水，故采用牛血清蛋白(BSA)配制6 mmol/L棕榈酸与12 mmol/L油酸。具体操作方法：使用磷酸盐缓冲液(PBS)配制3 mL 20% BSA与40% BSA。称取21.92 mg油酸钠与10.02 mg棕榈酸钠，分别加入3 mL PBS，75℃恒温水浴箱加热溶解油酸钠与棕榈酸钠。将油酸钠快速加入到20% BSA中，棕榈酸钠加入到40% BSA中。

2.2 大鼠肝细胞脂质堆积体外模型的构建 将BRL细胞分为正常对照组、模型组。其中：正常

对照组不处理,模型组加入300 $\mu\text{mol/L}$ 油酸+150 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸+100 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸诱导24 h构建大鼠肝细胞脂质堆积体外模型。

2.3 有效成分的配制 使用DMSO配制100 mmol/L黄芪甲苷、40 mmol/L川陈皮素、500 mmol/L 3'-羟基葛根素、500 mmol/L毛蕊异黄酮、500 mmol/L柚皮素、100 mmol/L槲皮素储存液。葛根素临用前DMEM配制5 mmol/L葛根素。

2.4 应用MTT实验筛选各有效成分无毒性的浓度

2.4.1 MTT实验分组 ①黄芪甲苷:设置空白对照组,DMEM组,DMSO溶剂组,100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷溶液组。②葛根素:由于葛根素在水溶液中溶解度相对较高,可不利用DMSO助溶,故设置空白对照组,DMEM组,5 000、2 500、1 000、500、250、100、50、25 $\mu\text{mol/L}$ 葛根素组。③川陈皮素:设置空白对照组,DMEM组,DMSO溶剂组,40、20、10 $\mu\text{mol/L}$ 川陈皮素组。④3'-羟基葛根素:设置空白对照组,DMEM组,DMSO溶剂组,500、250、125、75、37.5、18.75、9.375 $\mu\text{mol/L}$ 3'-羟基葛根素组。⑤毛蕊异黄酮:设置空白对照组,DMEM组,DMSO溶剂组,500、250、125、75、37.5、18.75、9.375 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊异黄酮组。⑥柚皮素:设置空白对照组,DMEM组,DMSO溶剂组,500、250、125、75、37.5、18.75、9.375 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素组。⑦槲皮素:设置空白对照组,DMEM组,DMSO溶剂组,100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素组。①~⑦除空白对照组无肝细胞,仅加入PBS,其他组别均含肝细胞。每组设置6个复孔。

2.4.2 MTT实验操作步骤 胰酶消化细胞,重悬计数后,将细胞铺板在96孔板中,每孔加入 2×10^3 个细胞(铺板数量取决于细胞增殖速度)。1 d后,待细胞铺板后,每孔加入相应的药物干预。待药物干预24、48 h后,小心的吸去培养基,每孔加入100 μL MTT溶解。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h左右,吸掉液体,每孔加入150 μL DMSO溶液。振摇10 min后,应用酶标仪于490 nm波长处读取吸光度值。

2.5 有效成分干预实验 细胞铺板于6孔板中,根据MTT结果,选择适宜剂量干预。中药单体干预24 h后,小心吸取培养基,弃掉。重新加入相同浓度的单体干预,同时以300 $\mu\text{mol/L}$ 油酸+

150 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸+100 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸诱导构建肝细胞脂质堆积模型,24 h后,抽提细胞TG、固定行油红O染色。

2.5.1 细胞TG的抽提与检测 ①氯仿与甲醇提取:为提取脂质被广泛采用的方法。具体操作方法:胰酶消化细胞后,用PBS洗涤细胞2次。加入抽提液(氯仿:甲醇=2:1)1 mL,并重悬细胞。超声裂解细胞10 min。超声工作效率99%,工作频率25 kHz。放入4 $^{\circ}\text{C}$ 抽提24 h。以12 000 r/min(离心半径5 cm)离心30 min。吸取上清,加入1/5的纯水洗涤,并涡旋15 s。以2 000 r/min(离心半径5 cm)离心10 min,弃上清。低速流量氮吹样本,以免脂质残留到管壁。加入200 μL 无水乙醇复溶,必要时90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中复溶。全自动生化仪上机检测样本。②异丙醇提取:在实验过程中发现,氯仿与甲醇的提取需要经过多个不同的步骤,步骤过程中对脂质耗损较多,故本实验直接采用异丙醇提取脂质。具体操作方法:胰酶消化细胞后,将细胞收集到5 mL的离心管中,加入300 μL 异丙醇,并重悬细胞。在常温或者冰水浴中超声裂解细胞10 min。超声工作效率99%,工作频率25 kHz,在镜下可见细胞破碎。放入4 $^{\circ}\text{C}$ 抽提24 h。以12 000 r/min(离心半径5 cm)离心30 min,取上清250 μL 。全自动生化仪上机检测样本。每组设置6个复孔。

2.5.2 油红O染色法 油红O是很强的脂溶剂和染脂剂,油红O染色能使脂质染成橘黄至红色。具体操作方法:100 mL异丙醇加入0.5 g油红O固体,配制油红O储存液,避光保存,使用前储存液:ddH₂O=3:2配制,并经微孔滤过膜过滤,使用前现配现用。移除细胞培养基,用PBS洗去多余的培养基,加多聚甲醛固定液固定30 min。弃去固定液,水洗2次。60%异丙醇浸洗5 min。弃去异丙醇,加入新配制好的油红O染液,浸染15 min,水洗2~5次。加入Mayer苏木素染色液,复染核1 min,弃去并水洗2~5次。加入分化液1 min,镜下观察。

2.6 统计方法 采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。计量资料满足正态分布,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;如不满足正态分布,则用M(P25~P75)表示。同时满足正态性和方差齐性的2组独立计量资料可用两独立样本 t 检验,否则采用非参数

检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肝细胞脂质堆积体外模型的构建 肝细胞与 $300\ \mu\text{mol/L}$ 油酸+ $150\ \mu\text{mol/L}$ 棕榈酸+ $100\ \mu\text{mol/L}$ 亚油酸共培养24 h后,经油红O染色,细胞内可见明显的红色脂质,经氯仿+甲醇抽提细胞脂质后,应用全自动生化仪检测细胞TG含量,结果显示,TG含量明显升高($P < 0.05$),证明脂肪酸可成功诱导肝细胞脂质堆积模型。见图1。

3.2 芪葛汤有效成分的MTT实验结果 筛选芪葛汤有效降脂成分,首先需要了解芪葛汤有效成分对肝细胞的毒性剂量。故采用MTT实验观察各有效成分对肝细胞增殖情况的影响,结果发现,各浓度黄芪甲苷、葛根素、川陈皮素24、48 h均对肝细胞无明显增殖及毒性作用。见图2。

500、250、125 $\mu\text{mol/L}$ 3'-羟基葛根素24 h对细胞有增殖作用,48 h则无明显毒性及增殖作用。500、250、125 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊异黄酮24、48 h均对细胞有毒性作用。各浓度柚皮素24 h对细胞无毒性作用,500、250、125 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素48 h对细胞有毒性作用。见图3。

100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素24 h对细胞有毒性作用。100、50、25 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素48 h均对细胞有毒性作

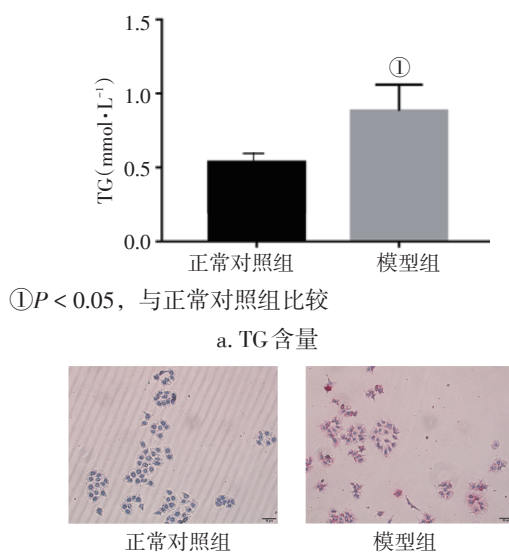


图1 肝细胞脂质堆积体外模型的构建

Figure 1 Construction of lipid accumulation model of live cells *in vitro*

用。见图4。

3.3 TG含量的测定结果(氯仿与甲醇抽提) 经有效成分干预后,根据MTT结果,选择各有效成分无毒性的浓度进行干预实验。以100 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷、1 mmol/L 葛根素、40 $\mu\text{mol/L}$ 川陈皮素、500 $\mu\text{mol/L}$ 3'-羟基葛根素、100 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊异黄酮、100 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素、20 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素干预细

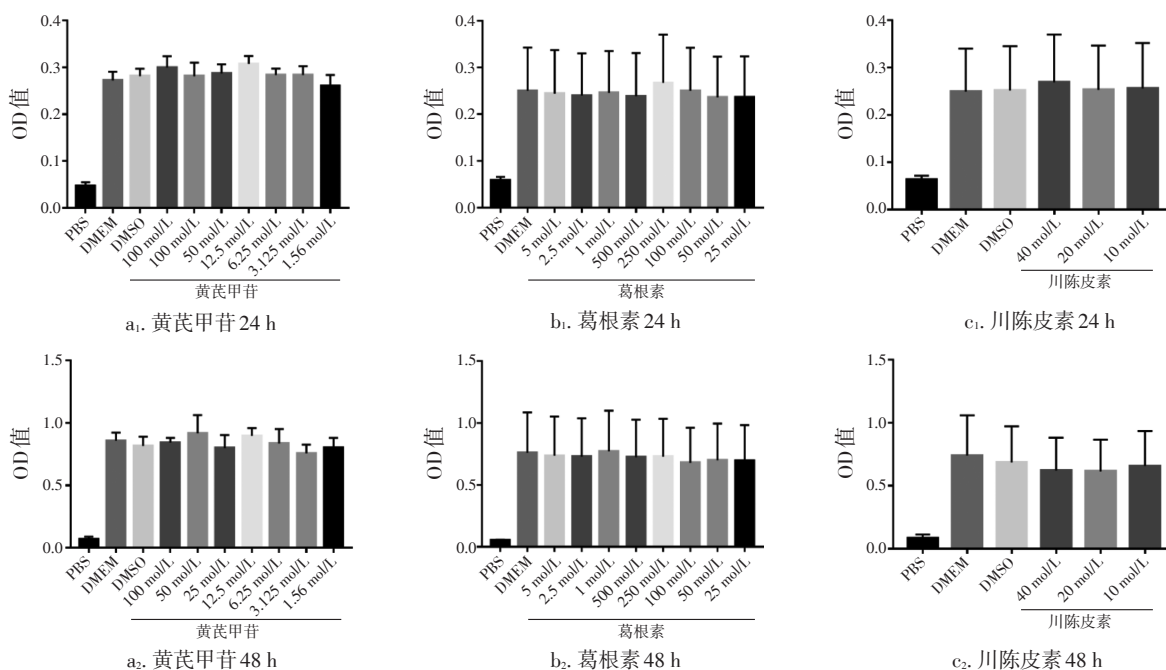
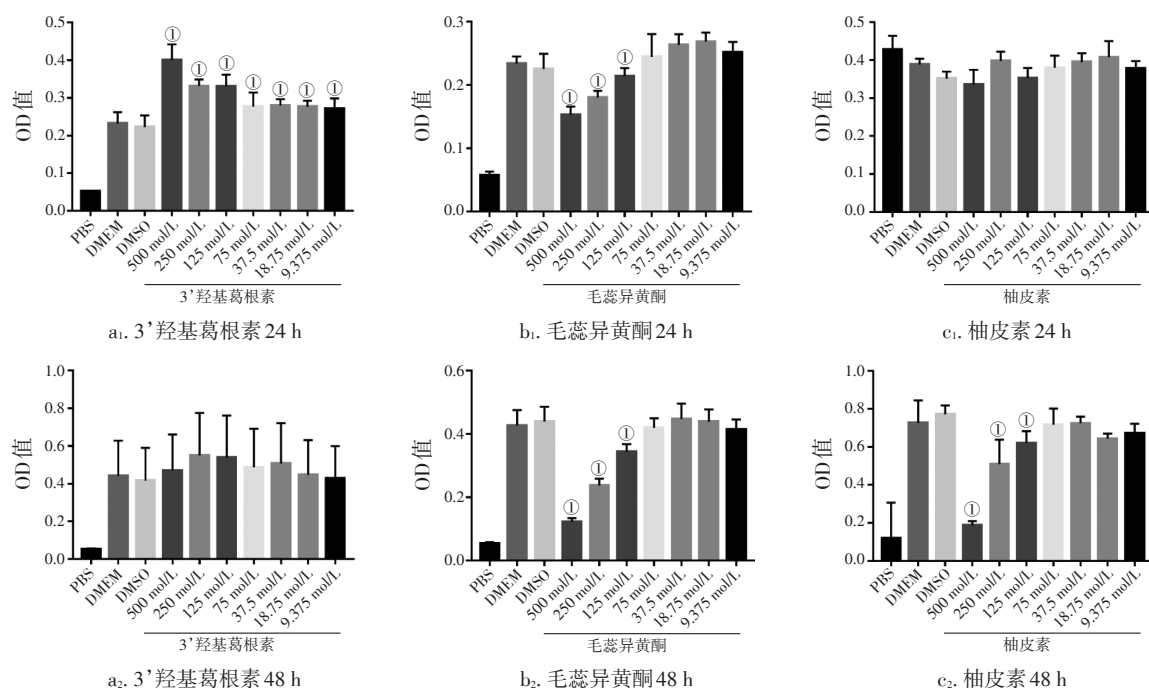


图2 黄芪甲苷、葛根素、川陈皮素的MTT实验

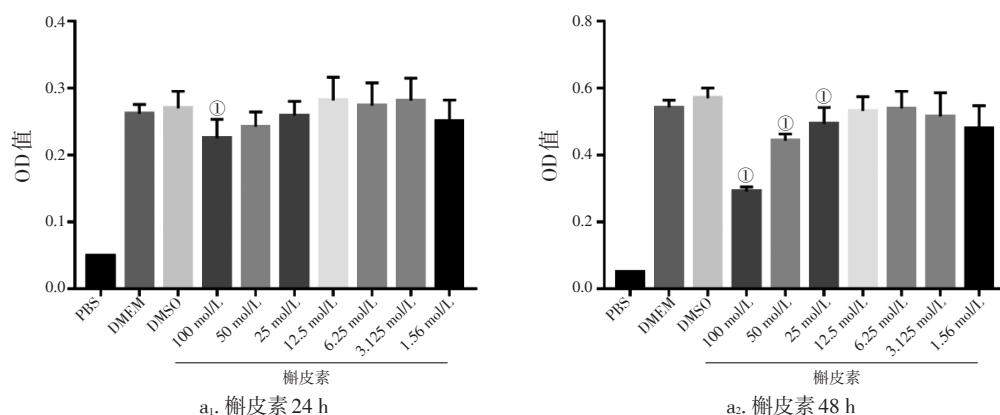
Figure 2 MTT assay results of astragaloside IV, puerarin and nobilitin



① $P < 0.05$, 与DMEM组比较

图3 3'-羟基葛根素、毛蕊异黄酮、柚皮素的MTT实验结果

Figure 3 MTT assay results of 3'-hydroxypuerarin, calycosin and naringenin



① $P < 0.05$, 与DMEM组比较

图4 槲皮素的MTT实验结果

Figure 4 MTT assay results of quercetin

胞, 并采用氯仿与甲醇抽提细胞脂质, 具体结果见表1。

经正态性检验, 各组数值均符合正态分布, 经正态性检验的 P 值分别为0.318、0.152、0.561、0.430、0.526、0.669、0.740、0.109、0.059, 均 $P > 0.05$ 。经方差齐性检验, 各组之间比较均符合方差齐性。2组之间可进行独立样本 t 检验。

与正常对照组比较, 模型组TG含量显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷组、葛根

素组、陈皮素组、柚皮素组、槲皮素组TG含量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 3'-羟基葛根素组、毛蕊异黄酮组TG含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.4 TG含量的测定结果(异丙醇抽提) 由于氯仿与甲醇抽提抽提步骤较多, 组间方差较大, 为了减少抽提的过程的误差, 采用单纯异丙醇抽提细胞中的脂质, 具体结果见表2。

经正态性检验, 各组数值均符合正态分布, 经正态性检验的 P 值分别为0.846 537、0.695 079、

表 1 芪葛汤有效成分干预对模型细胞 TG 含量的影响
(氯仿与甲醇抽提脂质)

Table 1 Effects of intervention of effective components of *Qige* Decoction on TG content (chloroform and methanol extracting lipid)

分组	TG(mmol·L ⁻¹)	F 值	P 值
正常对照组	0.64 ± 0.10 ^③	0.317	0.000
模型组	0.94 ± 0.08	—	—
黄芪甲苷组	0.59 ± 0.18 ^③	4.005	0.001
葛根素组	0.65 ± 0.53 ^③	3.961	0.000
川陈皮素组	0.76 ± 0.17 ^①	2.500	0.042
3'-羟基葛根素组	0.84 ± 0.22	11.211	0.332
毛蕊异黄酮组	0.94 ± 0.13	2.564	0.979
柚皮素组	0.72 ± 0.11 ^②	0.351	0.003
槲皮素组	0.88 ± 0.13	3.734	0.320

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, ③ $P < 0.005$, 与模型组比较

表 2 芪葛汤有效成分干预对细胞模型 TG 含量的影响
(异丙醇抽提)

Table 2 Effects of intervention of effective components of *Qige* Decoction on TG content (isopropanol extracting lipid)

分组	TG(mmol·L ⁻¹)	F 值	P 值
正常对照组	0.29 ± 0.08 ^③	1.865	0.000
模型组	0.59 ± 0.13	—	—
黄芪甲苷组	0.42 ± 0.55	5.025	0.019
葛根素组	0.52 ± 0.09	0.820	0.278
川陈皮素组	0.43 ± 0.06 ^①	3.241	0.019
3'-羟基葛根素组	0.55 ± 0.21	3.400	0.681
毛蕊异黄酮组	0.57 ± 0.09	0.888	0.796
柚皮素组	0.38 ± 0.11 ^①	0.190	0.015
槲皮素组	0.38 ± 0.99 ^②	1.309	0.006

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, ③ $P < 0.001$, 与模型组比较

0.141 112、0.183 242、0.557 428、0.137 352、0.322 330、0.083 276、0.062 296, 均 $P > 0.05$ 。经方差齐性检验, 各组之间比较均符合方差齐性, 2 组之间可进行独立样本 t 检验。

与正常对照组比较, 模型组 TG 含量显著升高($P < 0.001$); 与模型组比较, 黄芪甲苷组、川陈皮素组、柚皮素组、槲皮素组 TG 含量下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 葛根素组、3'-羟基葛根素组、毛蕊异黄酮组 TG 含量无统计学差异($P > 0.05$)。

3.5 油红 O 染色结果 有效成分干预细胞后, 经固定后的油红 O 染色, 结果提示, 模型组细胞大量脂质堆积, 而黄芪甲苷组、川陈皮素组、柚皮

素组的脂质堆积较模型组稍有减少, 其他组则较模型组改善不明显。见图 5。

4 讨论

芪葛汤组方源于黄芪葛根汤(黄芪 20 g、葛根 10 g)。黄芪葛根汤是常用经方, 出自《证治汇补》, 能解酒郁, 能使酒湿内从气化而消, 外从元府而泄, 为虚人伤酒恶寒之专方。本课题组前期通过比较黄芪-葛根药对的不同配比(3:1、2:1、1:1、1:2、1:3)干预乙醇所致胃黏膜损伤, 结果发现不同配比的黄芪-葛根均能保护胃黏膜损伤, 其可能的机制是通过抑制 Bcl-2/Bax/Caspase-3 等凋亡相关蛋白的表达, 其中, 以黄芪:葛根=3:1 为

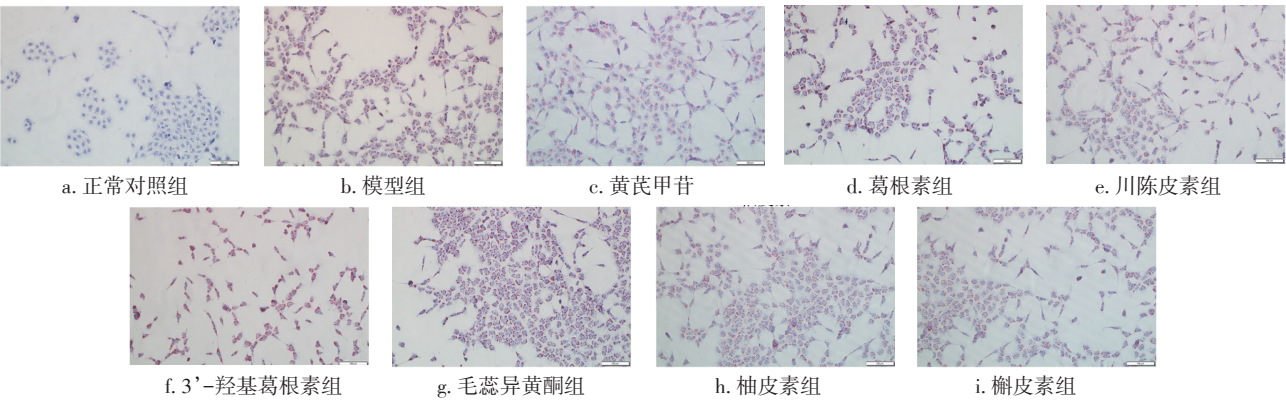


图 5 芪葛汤有效成分干预后对肝细胞脂质堆积的影响(油红 O 染色, ×200)

Figure 5 Effects of intervention of effective components of *Qige* Decoction on lipid accumulation of liver cells(by oil red O staining, ×200)

保护胃黏膜的最佳配比^[2]。在对黄芪有效成分的研究中,我们发现黄芪皂苷及黄芪甲苷能改善大黄灌胃所诱导的胃黏膜损伤^[3],黄芪甲苷在体内、体外均能保护乙醇诱导的胃黏膜损伤,其可能的机制是通过抑制炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1(IL-1)的表达,促进IL-10的释放,同时还能降低胃组织凋亡相关蛋白的表达^[4-5]。

本课题组基于黄芪-葛根药对能保护胃黏膜的基础上,进一步研究了芪葛汤对酒精性肝损伤的防治作用,发现芪葛汤预给药能改善酒精性肝损伤大鼠的甘油磷脂、色氨酸、花生四烯酸等脂质产物代谢^[1]。在对陈皮的研究中,我们发现:用广陈皮水提液干预高脂饲料喂养诱导的高脂血症大鼠模型,结果显示广陈皮能显著降低高脂血症大鼠的胆固醇(TC)、TG、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),以及升高高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平。对高脂血症大鼠的血清与尿液的代谢组学分析还发现,陈皮干预能显著回调高脂血症大鼠1-磷酸鞘氨醇、LysoPC(18:0)、9-癸酰肉碱、乙酰肉碱,顺式-4-辛二酸、2-辛酸和醛酸等多个代谢物水平,这些代谢物涉及甘油脂代谢、脂肪酸合成等多条代谢通路^[6-7]。上述前期研究结果提示,芪葛汤可能具有调脂的作用,但是,我们对芪葛汤中的哪些成分具有降脂作用仍不十分明确,因此,本研究进一步筛选了芪葛汤的多个有效成分并进行体外的初筛实验。

在芪葛汤的体外筛选实验中,综合甲醇+氯仿与异丙醇的抽提方法,黄芪甲苷、川陈皮素、柚皮素能降低大鼠肝细胞脂质堆积。黄芪甲苷是黄芪的主要成分,无论是以黄芪为君药的方剂还是单药黄芪都已经被实验证明具有降低血脂的疗效。有研究表明,黄芪能通过调节mTORC1-过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ 信号通路,降低TG水平^[8],黄芪的水提物能减少载脂蛋白E(ApoE)基因敲除大鼠动脉硬化斑块^[9]。而黄芪甲苷则被证明能够浓度依赖性地增强AMP依赖的蛋白激酶(AMPK)、乙酰辅酶A羧化酶和胆固醇调节元件结合蛋白(SREBPs)的磷酸化,抑制成熟SREBP-1的积累和核易位。黄芪甲苷治疗还可以浓度依赖性地减轻游离脂肪酸诱导的肝内质网应激以及相关蛋白葡萄糖调节蛋白78、C/EBP同源蛋白和蛋白激酶R样内质网激酶的表达。用AMPK抑制剂化合物C

(20 μ mol/L)预处理的细胞则大大减少了这些有益作用,说明黄芪甲苷可能通过调控AMPK影响肝脏脂质代谢^[10-11]。川陈皮素可以有效地抑制高脂膳食大鼠的体质量增长,降低Lee's指数、食物利用率和脂肪系数,降低血清中TC、TG和LDL-C水平,同时,还可降低肝脏指数、血清中ALT、AST水平,改善肝脏脂肪变性情况^[12-13]。柚皮素可降低高脂饲养大鼠的TG水平,还可降低ApoE^{-/-}小鼠主动脉粥样硬化斑块^[14]。

而在甲醇+氯仿抽提TG的实验中,我们发现葛根素也能降低TG水平。亦有其他研究结果表明,葛根最主要的成分葛根素能降低高脂血症大鼠TC、TG、LDL-C水平及全血低、高切黏度,并增加HDL-C的水平^[15-16]。葛根素通过AMPK-PPAR γ -肝X受体 α (liver X receptors α , LXR- α)通路显著促进了ATP结合盒转运蛋白A1(ABCA1)mRNA和蛋白的表达,降低了人类THP-1巨噬细胞源性泡沫细胞中的细胞脂质蓄积;而向巨噬细胞中转染miR-7,可降低葛根素处理的巨噬细胞AMPK的磷酸化,下调PPAR γ -LXR- α -ABCA1的表达,表明了葛根素可通过涉及miR-7和AMPK-PPAR γ -LXR- α -ABCA1级联的途径,促进ABCA1介导的脂质外流,并降低细胞内脂质水平^[16]。在异丙醇抽提实验中,我们发现槲皮素也具有降脂的疗效。槲皮素已被大量实验证明具有降脂作用。槲皮素属黄酮醇类化合物。在临床试验中,年龄在30~60岁的2型糖尿病患者口服槲皮素(250 mg/d)8周可显著降低血清LDL水平^[17]。体外和体内实验表明,槲皮素能增加肝脏低密度脂蛋白受体的表达^[18]。75 μ mol/L槲皮素处理HepG2细胞24 h后,SREBP2蛋白水平升高^[19]。但是,由于本研究在甲醇+氯仿、异丙醇的抽提实验中未同时发现葛根素与槲皮素的具体降脂作用,故暂不能明确葛根素与槲皮素是否具有降脂的作用。此外,本实验未发现3'-羟基葛根素、毛蕊异黄酮具有降脂的作用,故推测3'-羟基葛根素、毛蕊异黄酮可能不是芪葛汤降脂的有效成分。

无论是黄芪甲苷还是葛根素、槲皮素均存在溶解度差、口服利用率低、代谢率高等问题,这些问题均限制了其在体内的应用。目前,对于槲皮素,研究人员已经通过化学修饰和纳米技术改进提高了槲皮素的生物利用度。研究人员合成了

槲皮素醚类衍生物、槲皮素酯类衍生物和槲皮素胺类衍生物,以提高槲皮素的水溶性。如: Kim等^[20]将氨基酸与疏水侧链如丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸结合到槲皮素上,提高槲皮素的水溶性; Sun等^[21]构建的槲皮素纳米脂质载体使槲皮素的水溶性提高了1 000倍。因此,积极地通过各种技术手段增加单体的口服利用度对进一步研究单体在体内的药理机制是必要的。

本课题组在筛选出芪葛汤有效成分之后,下一步也将分别在体内、体外研究其降脂的药理机制。

参考文献:

- [1] 朱恬. 芪葛颗粒对酒精性肝损伤的保护作用及代谢组学研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [2] 来慧丽. “黄芪-葛根”药对对乙醇诱导的胃粘膜损伤的保护[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [3] 孙雪莲, 黄可儿, 冯小权, 等. 黄芪皂苷及黄芪甲苷对慢性胃粘膜损伤大鼠胃粘膜上皮细胞超微结构的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(2): 75-78.
- [4] 秦书敏. 黄芪甲苷对乙醇诱导的大鼠胃粘膜损伤的保护作用及机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [5] 刘翠玲, 黄可儿, 陈柏书, 等. 乙醇诱导人胃上皮细胞株凋亡的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(1): 101-106.
- [6] 曾威, 罗艳, 黄可儿, 等. 广陈皮抗高脂血症的血清代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(1): 72-79.
- [7] ZENG W, HUANG K E, LUO Y, et al. Nontargeted urine metabolomics analysis of the protective and therapeutic effects of *Citri Reticulatae Chachiensis Pericarpium* on high-fat feed-induced hyperlipidemia in rats [J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(4): 123-134.
- [8] LONG Y, ZHANG X X, CHEN T, et al. *Radix Astragali* improves dysregulated triglyceride metabolism and attenuates macrophage infiltration in adipose tissue in high-fat diet-induced obese male rats through activating mTORC1-PPAR γ signaling pathway [J]. *PPAR Res*, 2015, 2014(2014): 167-195.
- [9] 李新才, 曾碧映, 邓凤君, 等. 黄芪水提取物对载脂蛋白E基因敲除大鼠动脉硬化斑块部位基质金属蛋白酶-9表达及斑块形成的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(20): 5074-5075.
- [10] ZHOU B, ZHOU D L, WEI X H, et al. Astragaloside IV attenuates free fatty acid-induced ER stress and lipid accumulation in hepatocytes via AMPK activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(7): 998-1008.
- [11] SU Y, CHEN Q Q, MA K K, et al. Astragaloside IV inhibits palmitate-mediated oxidative stress and fibrosis in human glomerular mesangial cells via downregulation of CD36 expression [J]. *Pharmacol Rep*, 2019, 71(2): 319-329.
- [12] 李玲, 陈常秀. 陈皮提取物对肉鸡生长性能、血脂指标和抗氧化功能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009, (17): 104-106.
- [13] 冯孔龙, 朱晓艾, 陈彤, 等. 川陈皮素对高脂膳食诱导大鼠的降脂减肥及预防脂肪肝形成作用[J]. 食品科学, 2018, 39(01): 213-220.
- [14] 杨颖, 罗晖, 吕湛. 柚皮苷与柚皮素对ApoE $^{-/-}$ 小鼠主动脉粥样硬化斑块形成的作用[J]. 医药导报, 2016, 35(11): 1181-1185.
- [15] 刘海燕. 葛根素对高脂血症大鼠血液流变学及血脂的影响[A]//中国营养学会第九次全国营养学术会议论文摘要汇编[C]. 北京: 中国营养学会, 2004: 166-168.
- [16] LI C H, GONG D, CHEN L Y, et al. Puerarin promotes ABCA1-mediated cholesterol efflux and decreases cellular lipid accumulation in THP-1 macrophages [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 811: 74-86.
- [17] MAZLOOM Z, ABDOLLAHZADEH S M, DABBAGHMANESH M H, et al. The effect of quercetin supplementation on oxidative stress, glycemic control, lipid profile and insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized clinical trial [J]. *Journal of Health Sciences and Surveillance System*, 2014, 2(1): 123-144.
- [18] JIANG X, YU J, WANG X, et al. Quercetin improves lipid metabolism via SCAP-SREBP2-LDLr signaling pathway in early stage diabetic nephropathy [J]. *Diabet Metab Syndr Ob*, 2019, 12(4): 827-855.
- [19] MOON J, LEE S M, DO H J, et al. Quercetin up-regulates LDL receptor expression in HepG2 cells [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(11): 1688-1694.
- [20] KIM M K, PARK K S, YEO W S, et al. *In vitro* solubility, stability and permeability of novel quercetin-amino acid conjugates [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(3): 1164-1171.
- [21] SUN M, NIE S, PAN X, et al. Quercetin-nanostructured lipid carriers: characteristics and anti-breast cancer activities in vitro [J]. *Colloid Surf B Biointerfaces*, 2014, 113(4): 15-24.

【责任编辑: 侯丽颖】