

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240109005

基于脂肪变性细胞模型研究明桑降脂茶 调控 LO2 细胞脂代谢的作用

薛帼珍¹, 刘佳宁², 张敏爱³, 闫晓睿¹, 杨晓霞¹, 刘昕¹,
杜晨晖¹, 张希春^{1*}, 刘计权^{1*}

(1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 晋中 030619; 2. 北京协和医学院药物研究所, 北京 100500;
3. 太原海关技术中心, 太原 030021)

摘要: **目的** 明确明桑降脂茶的降脂作用及其发挥降脂作用的物质基础。**方法** 制备大鼠空白血清、明桑降脂茶全方和桑叶减味含药血清, 以油酸诱导人正常肝细胞(LO2 细胞)建立脂肪变性细胞模型, 将细胞分为对照组(含空白血清)、模型组(含空白血清)、明桑降脂茶全方血清处理组、桑叶减味血清处理组。培养 4 h 后, 显微镜下观察各组脂肪积累情况; 酶标仪测定细胞内脂质含量; 按试剂盒说明测定细胞内甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)含量, 以及过氧化物酶体增殖物启动受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α)、固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol regulatory element binding protein 1c, SREBP-1c)表达。高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)研究各组指纹图谱、绿原酸和橙黄决明素含量的差异。**结果** 与模型组比较, 明桑降脂茶全方血清组、桑叶减味血清组均能显著降低细胞内脂滴数量和脂质含量, 降低 TG、TC、LDL-C 含量和 SREBP-1c 表达, 升高 HDL-C 含量和 PPAR α 表达, 全方血清组的降脂作用优于桑叶减味血清组; 全方血清组、桑叶减味血清组、空白血清组共有峰分别为 53、35、23 个, 三者共有峰 18 个; 剔除共有峰后, 全方血清组有 22 个不同于桑叶减味血清组的差异峰, 桑叶减味血清组有 4 个不同于全方血清组的差异峰; 全方血清组中绿原酸和橙黄决明素含量均高于桑叶减味血清组, 绿原酸含量在二者之间差异显著。**结论** 明桑降脂茶具有明显的降脂作用, 桑叶在其中发挥重要降脂作用。

关键词: 明桑降脂茶; 含药血清; 高效液相色谱法; LO2 细胞; 脂代谢

基金项目: 山西省自然科学基金面上项目(20210302123233)、山西道地药材品质形成机制创新团队项目(2022TD2009)、山西中医药大学中药资源学科建设项目(2023XKJS-24)、山西中医药大学太行本草专项(2022PY-TH-30)、山西科技创新人才重点团队(202304051001020)

Fund: Supported by the Project of Shanxi Natural Science Foundation (20210302123233), the Innovation Team of Shanxi Genuine Medicinal Materials Quality Formation Mechanism (2022TD2009), the Subject Construction of Traditional Chinese Medicine Resources in Shanxi University of Traditional Chinese Medicine (2023XKJS-24), the Taihang Materia Medica of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine (2022PY-TH-30), and the Shanxi Key Team of Scientific and Technological Innovation Talents (202304051001020)

***通信作者:** 张希春, 博士, 教授, 主要研究方向为中药资源、中药材规范化种植及新产品开发。E-mail: zxcxpy@126.com

刘计权, 博士, 教授, 主要研究方向为中药资源、中药材规范化种植及新产品开发。E-mail: liujiquan2008@163.com

***Corresponding author:** ZHANG Xi-Chun, Ph.D, Professor, School of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China. E-mail: zxcxpy@126.com

LIU Ji-Quan, Ph.D, Professor, School of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China. E-mail: liujiquan2008@163.com

Regulation of Mingsang lipid-lowering tea on lipid metabolism of LO2 cells based on steatosis cell model

XUE Guo-Zhen¹, LIU Jia-Ning², ZHANG Min-Ai³, YAN Xiao-Rui¹, YANG Xiao-Xia¹,
LIU Xin¹, DU Chen-Hui¹, ZHANG Xi-Chun¹, LIU Ji-Quan^{1*}

(1. School of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;

2. Institute of Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100500, China; 3. Customs Technical

Center of Taiyuan, Taiyuan 030021, China)

ABSTRACT: Objective To clarify the lipid-lowering effect of Mingsang lipid-lowering tea and the material basis of its lipid-lowering effect. **Methods** The blank serum of rats, the medicine-containing serum of the whole prescription and reduced *Folium mori* of Mingsang lipid-lowering tea were prepared. Steatosis cell model of LO2 cells was established by oleic acid induction. The cells were divided into control group (containing blank serum), model group (containing blank serum), medicine-containing serum treatment group of the whole prescription and medicine-containing serum treatment group of reduced *Folium mori*. After culture for 4 hours, the fat accumulation of each group was observed under the microscope. The intracellular lipid content was measured by enzyme marker. The levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) were determined according to the instructions of the kits. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to study the differences of the fingerprint, and the contents of chlorogenic acid and citrulline in each group. **Results** Compared with the model group, the numbers of lipid droplets, the content of lipid, TG, TC, LDL-C, and the expression of SREBP-1c were significantly decreased, the content of HDL-C and the expression of PPAR α were significantly increased in medicine-containing serum treatment groups of the whole prescription and reduced *Folium mori*. The lipid-lowering effect of the whole prescription serum group was better than that of reduced *Folium mori* serum group. There were 53, 35 and 23 peaks in the whole prescription serum, the reduced *Folium mori* serum and the blank serum respectively, and there were 18 common peaks among them. After eliminating the common peaks, there were 22 different peaks in the whole prescription serum group compared with the reduced *Folium mori* serum group, and 4 different peaks in the reduced *Folium mori* serum group compared with the whole prescription serum group. The content of chlorogenic acid and citrulline in the whole prescription serum group were higher than those in the reduced *Folium mori* serum group, and the difference of chlorogenic acid content between them was significant. **Conclusion** Mingsang lipid-lowering tea has obvious lipid-lowering effect, in which *Folium mori* has played an important role in lipid-lowering.

KEY WORDS: Mingsang lipid-lowering tea; medicine-containing serum; high performance liquid chromatography; LO2 cells; lipid metabolism

0 引言

高血脂症是由血液中的脂质成分代谢异常或者转运异常所引起的一种全身性疾病, 通常包括甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平升高及高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平下降等, 会诱发冠心病、脑中风、高血压、高血糖等疾病^[1]。随着人们饮食方式和生活习惯的改变, 高血脂症呈现发病率高和年轻化的趋势, 目前高血脂症的治疗多以他汀

类降脂西药为主, 但长期服用他汀类药物会导致肝、肾等器官的损伤, 严重影响到当代人们的生活质量^[2]。

咖啡、决明子、桑叶、山楂、菊苣、紫苏叶均为药食两用原料, 其中, 咖啡^[3]、决明子^[4-5]、菊苣^[6]具有加快人体新陈代谢、调节血糖、降低血脂、保护心血管、预防肥胖症等作用; 桑叶^[7-9]、山楂^[10-11]、紫苏叶^[12-13]可显著降低高血脂大鼠 TC、TG、LDL-C 水平, 提高 HDL-C 水平, 具有明显的降血脂、抗动脉粥样硬化形成及抑制血清脂质增加的作用。上述 6 味药均含有的有效成分绿原酸可显著降低高血脂小鼠的体重, 降低脂质水平并改变脂肪组织中脂肪生成和

脂肪分解相关基因的 mRNA 表达^[14]。此外, 决明子中含有的橙黄决明素同样能显著降低大鼠 TG、TC 和 LDL-C 水平, 也是控制患者血脂水平的主要有效成分^[15]。基于以上原因, 课题组前期以咖啡、决明子、桑叶、山楂、菊苣、紫苏叶为原料, 采用现代工艺研制出了明桑降脂茶。

中药降脂血清药理研究方法近年来倍受关注, 以含药血清进行体外实验可排除中药复方及粗提物成分、电解性能、渗透压、酸碱度等因素的影响, 并与药物在体内发挥药理学效应的真实过程较为接近, 故可准确、真实地反映中药的整体作用及潜在机制^[16], 人正常肝细胞株 LO2 是目前常用的研究体外脂代谢细胞模型^[17]。降脂机制研究发现, 过氧化物酶体增殖物启动受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α) 在调节脂代谢中发挥关键的作用^[18], 固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol regulatory element binding protein 1c, SREBP-1c) 是调控胆固醇、脂肪酸和 TG 合成的关键因子^[19], 目前 PPAR α 、SREBP-1c 已逐渐成为治疗高脂血症、肥胖等代谢性疾病的研究重点。桑叶作为药食同源领域的研究热点, 有研究表明桑叶对高脂血症的治疗有独特疗效^[9], 为进一步明确明桑降脂茶的降脂作用以及发挥降脂作用的物质基础, 本研究同时对明桑降脂茶进行桑叶减味处理, 利用油酸 (oleic acid, OA) 模拟高脂肪酸环境诱导 LO2 细胞建立脂肪变性细胞模型, 对明桑降脂茶的调脂作用机制进行了研究; 利用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 研究明桑降脂茶发挥降脂作用的物质基础, 以期为该茶剂进一步开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞

雄性 SD 大鼠 30 只, 体重(200±20) g, 购自湖南斯莱克实验动物有限公司; 实验动物许可证号为 SCKK 湘 2021-0007, 实验动物伦理审批号为 AWE202209092; LO2(人正常肝细胞), 购自普诺赛生命科技有限公司。

1.2 材料与试剂

明桑降脂茶由实验室制备。取咖啡、决明子, 粉碎后过 5 号筛, 得筛上物 I, 筛下物煎煮过滤, 浓缩药液得浓缩液 I; 取桑叶、紫苏叶、山楂、菊苣, 煎煮过滤, 浓缩药液得浓缩液 II, 干燥药渣, 粉碎后过 5 号筛, 得筛上物 II; 合并筛上物 I、筛上物 II、浓缩液 I、浓缩液 II, 混合制粒, 干燥, 即得。

油红 O 染色试剂盒(0310A23, 北京雷根生物技术有限公司); 二苯基四氮唑溴盐(methylthiazolylidiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂盒(M1020)、绿原酸对照品(纯度 ≥ 98%)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(A8020)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(D8371)(北京索莱宝科技有限公司); TC 试剂盒(20221110)、TG 试

剂盒(20221110)、HDL-C 试剂盒(20221109)、LDL-C 试剂盒(20221109)(南京建成生物工程研究所); PPAR α 酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(F0584-A)、SREBP-1c ELISA 试剂盒(F111553)(山西华科博瑞生物科技有限公司); 橙黄决明素对照品(纯度 ≥ 98%, 成都普菲德生物技术有限公司)。

1.3 仪器与设备

SpectraMax i3x 型酶标仪(美国 Molecular Devices 有限公司); EZ4 倒置显微镜(浙江纳德科学仪器有限公司); TD4Z-WS 台式自动平衡离心机(湖南湘立科学仪器有限公司); QP 系列二氧化碳培养箱(济南鑫贝西生物技术有限公司); MX-S 涡旋混匀器[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司]; Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); AlltimaTM-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m, 美国 Grace 公司)。

1.4 方法

1.4.1 含药血清及其他溶液制备

(1) 大鼠灌胃液制备

根据组方比例分别称取咖啡、决明子、桑叶、山楂、菊苣、紫苏叶适量, 煎煮, 制粒, 干燥, 即得明桑降脂茶颗粒。明桑降脂茶一般成人用量为 30 g(一日三次, 一次 10 g), 大鼠按照成人(60 kg)单位剂量的 6.3 倍灌胃给药, 即大鼠按照 1 mL/(100 g·d)进行灌胃给药。称取 5 g 明桑降脂茶, 加入 90°C 蒸馏水 400 mL, 冲泡 2 次, 每次 10 min, 滤过, 合并滤液, 浓缩, 制备灌胃液, 4°C 保存备用。在原方基础上减去桑叶, 按照上述工艺制备明桑降脂茶桑叶减味品, 进行桑叶减味品大鼠灌胃液的制备。

(2) 含药血清制备

SD 大鼠 30 只, 适应性喂养一周, 按体重随机分为 3 组(空白组、明桑降脂茶全方组、明桑降脂茶桑叶减味组), 每组 10 只。按 1 mL/(100 g·d)灌胃给药, 空白组灌胃等量生理盐水, 早中晚各 1 次, 持续 5 d, 末次灌胃 2 h 内, 尾静脉采血, 静置 2 h, 3000 r/min 离心 15 min, 取上层血清, 同组混匀, 56°C 水浴灭活 30 min, -80°C 保存备用。

(3) 其他溶液制备

MTT 试剂: 称取 MTT 适量, 加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)充分溶解, 0.22 μ m 滤膜除菌, 制得质量浓度 5 mg/mL MTT 试剂, 避光保存备用。

OA 溶液制备: 将 OA 加入 0.1 mmol/L NaOH 溶液, 制成储备液(溶液 I), 在 PBS 中加入 BSA 溶液, 制成浓度 10% BSA 溶液(溶液 II), 合并溶液 I、II, 0.22 μ m 滤膜除菌, 制得浓度 10 mmol/L OA 溶液, -20°C 保存备用。

1.4.2 降脂作用研究

(1) 含药血清最佳作用浓度的确定

参考文献[20]方法, 选择 0.5 mmol/L OA 处理 LO2 细胞 24 h 建立 LO2 细胞脂肪变性细胞模型。将 LO2 细胞接

种于 96 孔板进行造模、孵育接种,分别加入 1.4.1 项下各组浓度 5%、10%、15%大鼠血清,继续培养 24 h,每组设 3 个复孔,以相应浓度胎牛血清作为对照,每孔加入 20 μ L MTT 溶液,继续培养 4 h,吸弃上清液,加入 150 μ L DMSO 溶液,采用酶标仪于 570 nm 处检测 OD 值,计算细胞存活率。

(2) LO2 细胞脂质含量的测定

将 LO2 细胞接种于 6 孔板进行造模、孵育接种,分别加入 1.4.1 项下所得最佳作用浓度各组大鼠血清,每组设 3 个复孔,培养 24 h 后除去培养基,油红 O 染色 30 min,60% 异丙醇清洗,油红 O 染色 20 min,水洗,Mayer 苏木素复染 2 min,水洗,油红 O 染色 1 min,加蒸馏水至细胞完全覆盖,于显微镜下观察细胞内脂滴染色情况。每孔加入 60%异丙醇溶液,采用酶标仪于 485 nm 处测定 OD 值。

(3) LO2 细胞 TG、TC、HDL-C、LDL-C 含量的测定

将 LO2 细胞接种于 6 孔板进行造模、孵育接种,分别加入 1.4.1 项下所得最佳作用浓度各组大鼠血清,每组设 3 个复孔,培养 24 h,收集细胞悬液,按照试剂盒说明测定 LO2 细胞 TG、TC、HDL-C、LDL-C 含量。

(4) LO2 细胞 PPAR α 、SREBP-1c 蛋白表达的测定

将 LO2 细胞接种于 6 孔板进行造模、孵育接种,分别加入 1.4.1 项下所得最佳作用浓度各组大鼠血清,每组设 3 个复孔,培养 24 h,收集细胞悬液,按照 PPAR α 试剂盒、SREBP-1c 试剂盒说明操作。

1.4.3 HPLC 测定

(1) 色谱条件

色谱柱: AlltimaTM-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相、柱温、进样量、流速、梯度洗脱条件参考文献[21]; 检测波长: 280 nm。

(2) 对照品溶液制备

精密称取绿原酸、橙黄决明素对照品适量,用甲醇溶解分别制成质量浓度为 0.4164 mg/mL、3.8622 mg/mL 对照品储备液。分别精密量取两种对照品溶液各 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,置 50 mL 容量瓶中,以甲醇稀释至刻度,制得系列混合对照品溶液,4 $^{\circ}$ C 避光保存备用。

(3) 供试品溶液制备

参照文献[22]方法,取 1.4.1 项下各组大鼠血清各 0.1 mL,加入甲醇 5.25 mL,涡旋混匀 10 min,10000 r/min 离心 10 min,取上清液氮气吹干,残渣加入 160 μ L 甲醇,涡旋混匀 5 min,0.22 μ m 滤膜过滤,滤液即为各组含药血清供试品溶液。

(4) HPLC 指纹图谱建立

分别取 10 批大鼠空白血清、全方血清和桑叶减味血清供试品,按上述 HPLC 色谱条件进样测定,将得到的色谱图数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)软件进行指纹图谱共有模式的建立以及指纹图谱的比较。同上,分别精密吸取各组含药血清、橙黄决明素、绿原酸及混合对照品溶液,按照上述方法进

样测定并进行指纹图谱的比较。

(5) 绿原酸、橙黄决明素含量测定

分别精密吸取全方血清、桑叶减味血清、混合对照品溶液各 10 μ L,按上述 HPLC 色谱条件进样测定,记录峰面积并计算绿原酸、橙黄决明素含量,平行测定 3 次。

1.5 数据处理

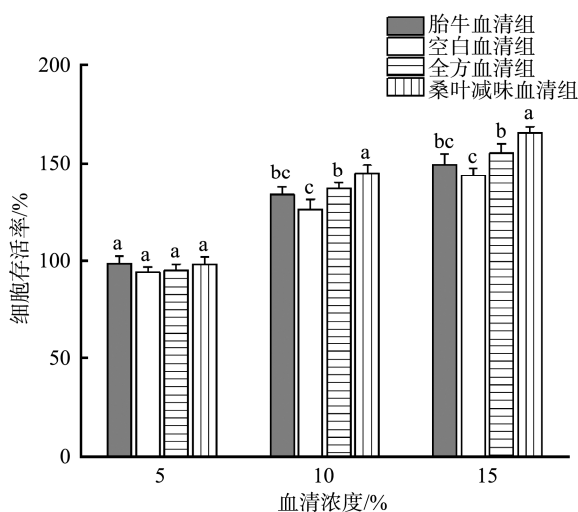
实验数据以平均数 \pm 标准偏差表示,应用 SPSS 25.0 统计学软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为组间对比差异显著,使用 Origin 2021 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 降脂作用实验结果

2.1.1 明桑降脂茶含药血清最佳作用浓度的实验结果

由图 1 可知,当血清作用浓度为 10%、15%时,与相应浓度胎牛血清组比较,含药血清组均使 LO2 细胞存活率升高,空白血清组均使 LO2 细胞存活率降低;当血清作用浓度为 5%时,与胎牛血清组比较,空白血清、全方血清和桑叶减味血清作用下细胞生长状况均良好,对细胞存活率影响较小($P < 0.05$)。因此,本研究选用 5%含药血清作为最佳作用浓度,按表 1 分组开展进一步实验。



注:不同字母表示组间对比差异显著, $P < 0.05$,下同。

图 1 不同浓度血清对 LO2 细胞存活率的影响情况

Fig.1 Effects of different concentrations of serum on LO2 cell viability

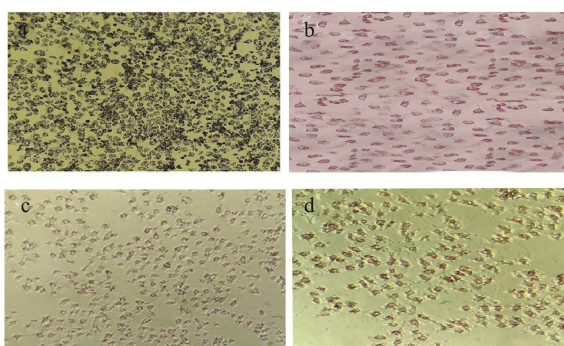
表 1 LO2 细胞实验分组

Table 1 Experimental grouping of LO2 cells

分组	培养基	血清
对照组	RPMI 1640 培养基	5%大鼠空白血清
模型组	RPMI 1640 培养基 (含 0.5 mmol/L OA)	5%大鼠空白血清
全方血清	RPMI 1640 培养基 (含 0.5 mmol/L OA)	5%全方血清
桑叶减味血清	RPMI 1640 培养基 (含 0.5 mmol/L OA)	5%桑叶减味血清

2.1.2 明桑降脂茶含药血清对 LO2 细胞脂质含量的影响

由图 2 可知, 对照组 LO2 细胞连接紧密, 细胞内几乎未见红色脂滴; 与对照组比较, 模型组细胞内红色脂滴数量明显增多; 与模型组比较, 两组含药血清细胞内红色脂滴数量明显减少; 与全方血清组比较, 桑叶减味血清组细胞内红色脂滴数量明显增多。由表 2 可知, 各组 LO2 细胞脂质含量差异显著。与对照组比较, 模型组细胞脂质含量显著升高; 与模型组比较, 两组含药血清细胞脂质含量均显著减少, 其中全方血清组细胞脂质含量显著低于桑叶减味血清组。表明全方血清组和桑叶减味血清组均能清除细胞脂质沉积, 其中全方血清组清除作用较强, 推测桑叶在降低脂质沉积方面发挥重要作用。



注: a. 对照组; b. 模型组(因添加油红 O 染液、不添加含药血清, 故较其他组图片颜色偏红); c. 全方含药血清组; d. 桑叶减味含药血清组。

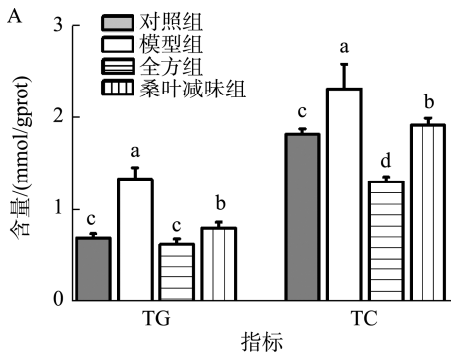
图 2 LO2 细胞内脂肪积累情况(400×)

Fig.2 Intracellular fat accumulation in LO2 (400×)

表 2 LO2 细胞脂质含量(n=3)
Table 2 LO2 cell lipid content (n=3)

分组	脂质含量(OD 值)
对照组	0.065±0.004 ^d
模型组	0.196±0.009 ^a
全方血清	0.071±0.002 ^c
桑叶减味血清	0.156±0.005 ^b

注: 不同字母表示组间对比差异显著, P<0.05。



2.1.3 明桑降脂茶含药血清对 LO2 细胞 TG、TC、HDL-C、LDL-C 含量的影响

由图 3A 可知, 与对照组比较, 模型组细胞 TG、TC 含量均显著升高; 与模型组比较, 两组含药血清组细胞 TG、TC 含量均显著降低, 其中全方血清组细胞 TG、TC 含量显著低于桑叶减味血清组, 表明全方血清组清除脂质沉积作用较强; 由图 3B 可知, 与对照组比较, 模型组细胞 HDL-C 含量显著降低、LDL-C 含量显著升高; 与模型组比较, 两组含药血清组细胞 HDL-C 含量均显著升高、LDL-C 含量均显著降低, 其中全方血清组细胞 HDL-C 含量显著高于桑叶减味血清组、LDL-C 含量显著低于桑叶减味血清组。表明全方血清组和桑叶减味血清组均能显著降低 LO2 细胞脂质沉积, 其中全方血清组清除作用较强, 推测桑叶在降低脂质沉积方面发挥重要作用。

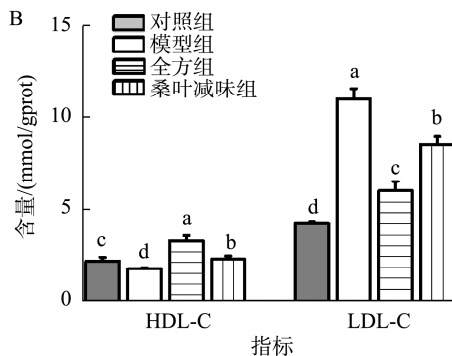
2.1.4 明桑降脂茶含药血清对 LO2 细胞 PPAR α 、SREBP-1c 蛋白表达水平的影响

由图 4 可知, 与对照组比较, 模型组细胞 PPAR α 蛋白表达显著下降、SREBP-1c 蛋白表达显著升高; 与模型组比较, 两组含药血清 PPAR α 蛋白表达均显著升高、SREBP-1c 蛋白表达均显著下降, 其中全方血清组 PPAR α 蛋白表达显著高于桑叶减味血清组, SREBP-1c 蛋白表达显著低于桑叶减味血清组。表明全方血清组和桑叶减味血清组均能显著升高 PPAR α 、降低 SREBP-1c 蛋白表达, 其中全方血清组对蛋白表达影响作用较强, 推测桑叶在影响 LO2 细胞 PPAR α 、SREBP-1c 蛋白表达方面发挥重要作用。

2.2 HPLC 指纹图谱建立与分析

2.2.1 HPLC 指纹图谱共有模式的建立

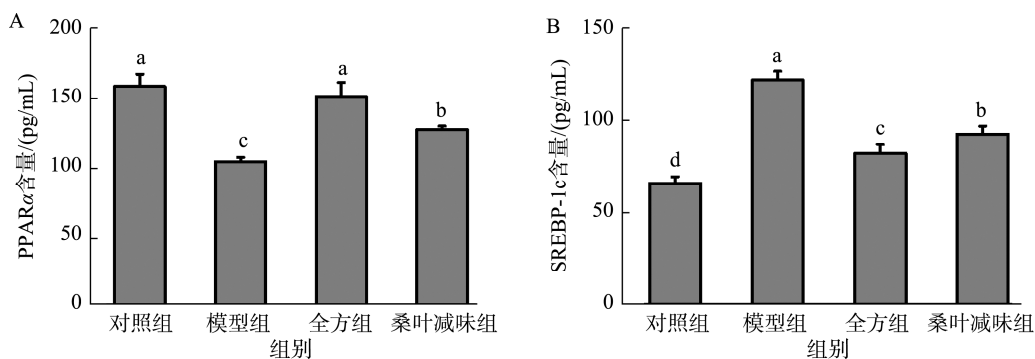
如图 5 所示, 将 10 只大鼠空白血清按 1.4.3 项下色谱条件进样测定, 将得到的色谱图数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)软件, K1~K10 为 10 只大鼠空白血清图谱, 以大鼠空白血清 K1 为参照图谱, 进行全谱图扫描后自动匹配生成空白血清对照指纹图谱 RK, 将 10 只大鼠空白血清中具有相近保留时间且保留时间符合正态分布的特征峰标定为共有峰, 得到 23 个共有峰。同上, 全方血清图谱和桑叶减味血清图谱分别得到 53、35 个共有峰(图 6~7)。



注: A 为 LO2 细胞 TG、TC 含量水平; B 为 LO2 细胞 HDL-C、LDL-C 含量水平。

图 3 各组 LO2 细胞 TG、TC、HDL-C、LDL-C 含量水平

Fig.3 Levels of TG, TC, HDL-C, and LDL-C content in LO2 cells of each group



注: A 为 LO2 细胞 PPARα 表达水平; B 为 SREBP-1c 表达水平。

图 4 各组 LO2 细胞 PPARα、SREBP-1c 蛋白表达水平

Fig.4 Protein expression levels of PPAR α and SREBP-1c in LO2 cells of each group

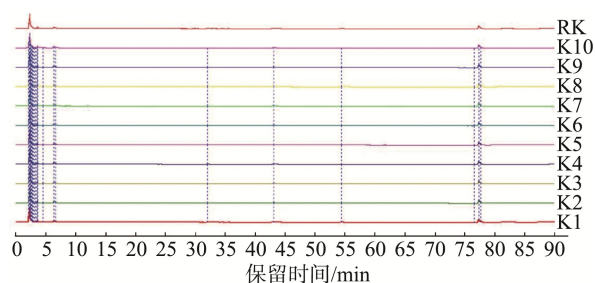


图 5 空白血清共有模式指纹图谱

Fig.5 Common pattern fingerprint map in blank serum

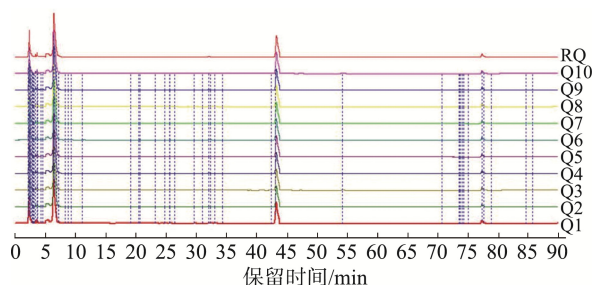


图 6 明桑降脂茶全方血清共有模式指纹图谱

Fig.6 Common pattern fingerprint of Mingsang lipid-lowering tea

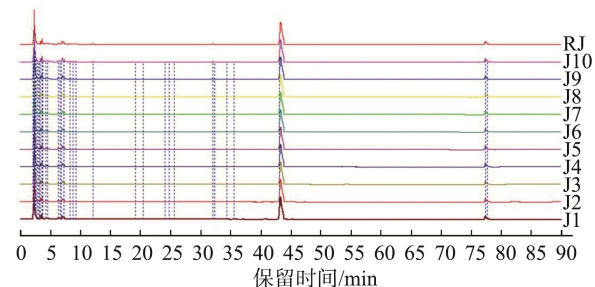


图 7 桑叶减味血清共有模式指纹图谱

Fig.7 Common pattern fingerprint of mulberry leaf reduced serum

2.2.2 HPLC 指纹图谱的对比分析

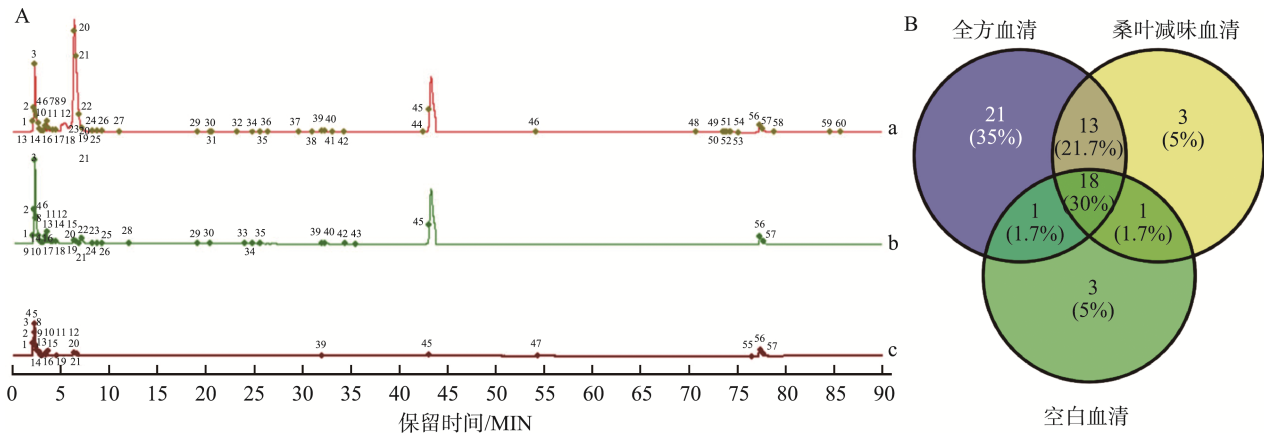
(1)全方血清、桑叶减味血清与空白血清指纹图谱的比较
为了进一步揭示全方血清、桑叶减味血清与空白血清

三者之间的差异峰和共有峰, 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)软件进行对比, 利用 Venny2.1.0 软件取其共有峰交集, 结果如图 8 所示。全方血清、桑叶减味血清与空白血清三者之间有 18 个共有峰, 3 者特有峰分别有 21 个、3 个、3 个。与全方血清、桑叶减味血清相比, 空白血清分别有 19 个共有峰、4 个特有峰, 其中全方血清较空白血清多出 34 个药源性成分(色谱峰号分别为 6、7、17、18、22、23、24、25、26、27、29、30、31、32、34、35、36、37、38、40、41、42、44、46、48、49、50、51、52、53、54、58、59、60), 桑叶减味血清较空白血清多出 16 个药源性成分(色谱峰号分别为 17、18、22、23、24、25、26、28、29、30、33、34、35、40、42、43), 推测这些差异成分是其发挥不同降脂作用的主要原因。

全方血清、桑叶减味血清有 31 个共有峰, 剔除与空白血清相同色谱峰, 全方血清与桑叶减味血清指纹图谱有 13 个共有峰(色谱峰号分别为 17、18、22、23、24、25、26、29、30、34、35、40、42)。进一步对全方血清与桑叶减味血清 13 个共有峰的峰面积比较发现, 全方血清 40、42 号峰面积显著高于桑叶减味血清, 而桑叶减味血清 17、18、22、23、24、29、30、34 号峰面积显著高于全方血清(表 3 所示), 这可能也是二者在降低脂质沉积作用方面产生差异的原因。

(2)全方血清与桑叶减味血清指纹图谱共有峰的指认

如图 9 所示, 将橙黄决明素、绿原酸及混合对照品与全方血清、桑叶减味药血清指纹图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)软件进行对比, 结果显示在保留时间 6.347 min 时, 桑叶减味血清、全方血清与绿原酸、混合对照品图谱在相同位置上均出现色谱峰, 由此推测桑叶减味血清、全方血清色谱图中峰 a 为绿原酸(对应图 8A 色谱峰 22); 在保留时间 43.153 min 时, 桑叶减味血清、全方血清与橙黄决明素、混合对照品图谱在相同位置上均出现色谱峰, 由此推测桑叶减味血清、全方血清



注: a 为全方血清; b 为桑叶减味血清; c 为空白血清。

图 8 全方血清、桑叶减味血清与空白血清指纹图谱(A)及其色谱峰 Venny 图(B)

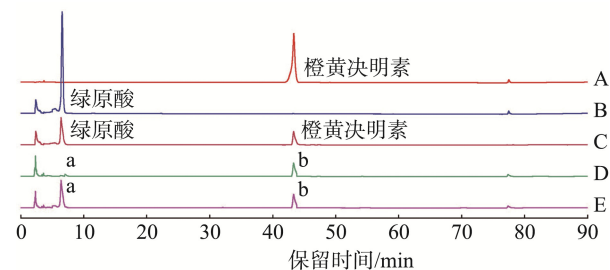
Fig.8 Fingerprint of whole serum, mulberry leaf serum and blank serum (A) and Venny diagram of chromatographic peaks (B)

表 3 全方血清与桑叶减味血清指纹图谱共有峰峰面积的比较(n=10)

Table 3 Comparison of total peaks and peaks (n=10)

共有色谱峰	桑叶减味血清组	全方血清组
峰 17	1.288±0.059	0.984±0.158*
峰 18	1.393±0.084	0.894±0.201*
峰 22	6.572±0.315	3.918±0.201*
峰 23	2.901±0.166	2.112±0.154*
峰 24	0.302±0.041	0.173±0.025*
峰 25	0.161±0.019	0.188±0.015
峰 26	0.238±0.028	0.289±0.034
峰 29	0.223±0.022	0.087±0.010*
峰 30	0.142±0.017	0.099±0.012*
峰 34	0.042±0.011	0.014±0.004*
峰 35	0.207±0.045	0.181±0.022
峰 40	0.215±0.023	0.297±0.033*
峰 42	0.148±0.017	0.213±0.028*

注: *表示组间对比差异显著, P<0.05。



注: A 为橙黄决明素对照品指纹图谱; B 为绿原酸对照品指纹图谱; C 为混合对照品指纹图谱; D 为桑叶减味血清指纹图谱; E 为全方血清指纹图谱。

图 9 全方血清、桑叶减味血清与对照品指纹图谱对比
Fig.9 Comparison of whole serum, mulberry leaf serum and control samples

色谱图中峰 b 为橙黄决明素(对应图 8A 色谱峰 45)。进一步对全方血清与桑叶减味血清中绿原酸、橙黄决明素的含量进行测定,结果显示,桑叶减味血清中绿原酸含量 [(17.851±0.377) μg/mL] 显著低于全方血清 [(26.215±0.184) μg/mL] (P<0.05); 桑叶减味血清中橙黄决明素含量 [(3.592±0.854) μg/mL] 低于全方血清 [(4.261±0.091) μg/mL], 但无显著差异, 因此推测桑叶中的绿原酸在降低脂质沉积方面发挥重要作用。

3 讨论与结论

高血脂症的发生严重影响到人们的生活质量。近年来随着我国中医药的不断发展, 治未病的观念深入人心, 以药食两用中药开发的茶剂、保健食品, 在满足人们日常消费需求的同时, 能够起到调理身体、预防疾病的目的。本研究前期针对高血脂症的预防, 选用具有降脂作用的咖啡、决明子、桑叶、山楂、菊苣、紫苏叶这 6 味药食两用的中药研制了明桑降脂茶。目前, 评价高血脂症的指标主要有 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C。本研究基于脂肪变性细胞模型探究了明桑降脂茶对 LO2 细胞脂代谢的调控作用, 结果表明, 明桑降脂茶全方血清组、桑叶减味血清组均能显著降低细胞内脂滴数量和脂质含量, 降低 TG、TC、LDL-C 含量, 升高 HDL-C 含量, 全方血清组的降脂作用显著优于桑叶减味血清组, 推测桑叶可能在降低脂质沉积方面发挥重要作用。

PPARα、SREBF 分别是调控脂肪酸氧化和脂质合成途径中重要的上游转录因子, 其中 PPARα 是一类由配体激活的核转录因子, 主要在脂肪酸氧化速度较快的肝细胞、心肌细胞、肠上皮细胞等表达^[18]。SREBP-1c 可促进下游脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FAS)等生脂基因表达并促使肝脏脂肪酸合成增加而消耗减少, 导致肝脏内脂质累积^[19]。进一步研究明桑降脂茶调控脂代谢的机制发现, 明

桑降脂茶全方血清组、桑叶减味血清组均能显著上调 PPAR α 表达、下调 SREBP-1c 表达,全方血清组的调控作用优于桑叶减味血清组。表明明桑降脂茶可能通过上调 PPAR α 蛋白表达和下调 SREBP-1c 蛋白表达来影响脂质生成,增强细胞内脂肪酸氧化,从而降低脂质积累水平,推测桑叶可能在调控过程中起到重要作用。

中药中所含的化学成分非常复杂,口服给药时,一般只有吸收进入体内的成分或其代谢产物以血液为载体输送到机体的具体部位才能产生作用^[23]。近年来许多学者利用含药血清指纹图谱方法开展了中药血清药物化学研究^[24]。相关文献^[25-26]报道显示,绿原酸经口服后,通过水解、还原、甲基化、甘氨酸结合和葡萄糖醛酸结合等途径代谢^[27-28],最终以原型形式留存在血液中。万敏^[29]在决明子含药血清中研究发现,橙黄决明素、黄决明素、决明素均可吸收入血。本研究利用 HPLC 测定指纹图谱对比分析发现,明桑降脂茶全方含药血清产生 34 种药源性成分,推测其中有 21 个化学成分来源于桑叶及其代谢物;桑叶减味血清产生 16 个药源性成分,推测其来源于除桑叶以外的其他中药;全方血清与桑叶减味血清有 13 个共有峰,且峰面积之间具有一定的差异性,这些都是导致二者在降低脂质沉积作用方面产生差异的可能原因。进一步研究发现,绿原酸、橙黄决明素均可被机体直接吸收入血,而且全方含药血清中绿原酸含量显著高于桑叶减味含药血清,造成含量差异的原因,一方面可能是由于桑叶含有绿原酸、原儿茶酸、咖啡酸等多种酸类成分,减味处理使得绿原酸的溶出量减少,另一方面可能由于桑叶与其他药味配伍后相互影响促进了绿原酸的吸收。高茹等^[30]也表示中药复方及配伍可以促进绿原酸在体内的吸收,会使其迅速达到峰浓度。

总之,从细胞层面的实验结果来看,明桑降脂茶能够有效调控脂代谢,预防高血脂症的发生,桑叶在其中发挥重要作用。中药对疾病的预防和治疗是多成分、多靶点综合作用的结果,本研究只对绿原酸、橙黄决明素进行了鉴定和含量测定,相信其他成分也在降脂中发挥重要作用。后期将进一步开展动物降脂实验,利用质谱对更多活性成分进行鉴定,系统阐明明桑降脂茶的降脂作用和发挥降脂作用的物质基础。

参考文献

- [1] 郝慧敏,魏平,秦令祥,等. 浊点萃取协同超声波辅助提取桑叶黄酮工艺优化及其对高血脂小鼠的降血脂作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(18): 303-311.
HAO HM, WEI P, QIN LX, et al. Optimization of cloud point extraction assisted ultrasonic extraction of mulberry leaf flavonoids and its hypolipidemic effect on hyperlipidemic mice [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(18): 303-311.
- [2] SAMANTHA K. Epidemiology and management of hyperlipidemia [J]. Am J Manag Care, 2017, 23(9): 139-148.
- [3] 张艳,吴国,王晓禹,等. 咖啡豆化学成分发现及药用价值研究现状[J]. 中国野生植物资源, 2022, 41(5): 57-66.
ZHANG DX, WU GT, WANG XY, et al. Advances on the chemical composition and medicinal value of coffee beans [J]. Chin Wild Plant Resour, 2022, 41(5): 57-66.
- [4] ZHAO Y, ZHAO K, JIANG K, et al. A review of flavonoids from cassia species and their biological activity [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2016, 17(13): 1134-1146.
- [5] 靳森. 决明子的开发利用现状及发展趋势[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(3): 633-637.
JIN M. Present situation and development trend of exploitation for *Cassia tora* Linn [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(3): 633-637.
- [6] 朱春胜,林志健,牛红娟,等. 一测多评法测定菊苣中绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的量[J]. 中草药, 2016, 47(4): 666-670.
ZHU CS, LIN ZJ, NIU HJ, et al. Simultaneous determination of chlorogenic acid, aesculetin, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid A in *Cichorii herba* by QAMS [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2016, 47(4): 666-670.
- [7] 师英春,廖森泰,杨琼,等. 桑叶多酚、多糖及其复合物的体外模拟消化特性、降糖降脂和促益生菌增殖活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(8): 128-137.
SHI YC, LIAO ST, YANG Q, et al. *In vitro* simulated digestion characteristics, hypoglycemic and lipid reduction and probiotic proliferation activities of mulberry leaf polyphenols, polysaccharides and their complexes [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(8): 128-137.
- [8] 冯淦熠,刘莹莹,李颖慧,等. 桑叶黄酮降糖、降脂作用与机制及其在动物生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2020, 32(1): 48-53.
FENG GY, LIU YY, LI YH, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and mechanisms of flavonoids from mulberry leaves and its application in animal production [J]. Chin J Anim Nutr, 2020, 32(1): 48-53.
- [9] 冯晓新. 桑叶速溶茶制备工艺优化及对小鼠降脂效果评价[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2021.
FENG XX. Optimization of Sangye surong tea preparation process and evaluation of lipid-lowering effect in mice [D]. Harbin: Heilongjiang University, 2021.
- [10] 张宝杰,郑彧,刘美奇,等. 山楂生、炒品果胶结构表征和体外降脂作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(21): 253-262.
ZHANG BJ, ZHENG Y, LIU MQ, et al. Structural characterization of hawthorn and lipid-lowering pectin *in vitro* [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(21): 253-262.
- [11] 由璐. 山楂超微粉对高脂膳食诱导的 C57BL/6J 小鼠肥胖的调控作用及素食营养餐粉研制[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2019.
YOU L. Regulation of hawthorn ultrapowder on high-fat meal-induced obesity in C57BL/6J mice and development of vegetarian nutritious meal powder [D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science and Technology, 2019.
- [12] OLIVET CE, SHALOM ST, KYUNG OC, et al. Green perilla leaf extract ameliorates long-term oxidative stress induced by a high-fat diet in aging mice [J]. Nutr Res Pract, 2022, 16(5): 549-564.
- [13] 王振兴. 紫苏叶中降血糖活性成分的筛选分离及其作用机制[D]. 南昌: 江西师范大学, 2021.
WANG ZX. Screening and isolation of hypoglycemic active components in Perilla leaves and their mechanism of action [D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2021.
- [14] HAN X, ZHANG Y, GUO J, et al. Chlorogenic acid stimulates the

- thermogenesis of brown adipocytes by promoting the uptake of glucose and the function of mitochondria [J]. *J Food Sci*, 2019, 84: 3815–3824.
- [15] 李春晓, 王月明, 韦东来, 等. 决明子的主要化学成分和药理作用研究进展[J]. *现代农业研究*, 2018, (6): 47–50.
LI CX, WANG YM, WEI DL, *et al.* The main chemical composition and pharmacological action of *Semen Cassiae* [J]. *Mod Agric Res*, 2018, (6): 47–50.
- [16] 王建湘, 廖杨, 易琼, 等. 柴胡陷胸汤含药血清对高血脂致人脐静脉内皮细胞损伤的影响及机制[J]. *中国药房*, 2022, 33(20): 2493–2497, 2502.
WANG JX, LIAO Y, YI Q, *et al.* Effects of Chaihu xianxiong decoction containing serum on HUVEC injury induced by high-fat serum and its mechanism [J]. *J Chin Pharm*, 2022, 33(20): 2493–2497, 2502.
- [17] 曾菊花. 白桦脂酸对脂肪变性的 LO2 细胞 RAGE-NF- κ B/iNOS 信号通路的影响[D]. 深圳: 南方医科大学, 2019.
ZENG JH. Effect of betulinic acid on the RAGE-NF- κ B/iNOS signaling pathway in LO2 cells with steatosis [D]. Shenzhen: Southern Medical University, 2019.
- [18] 陈箱宇, 王晗, 蔡燕雪, 等. 梓树籽油和石榴籽油对小鼠肝脏脂代谢的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(13): 40–47.
CHEN XY, WANG H, CAI YX, *et al.* Effects of catalpa seed oil and pomegranate seed oil on hepatic glucose and lipid metabolism in mice [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(13): 40–47.
- [19] 李明月. *Lactobacillus casei* YBJ02 调节高血脂小鼠脂代谢功能与评价[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
LI MY. *Lactobacillus casei* YBJ02 regulating lipid metabolism in hyperlipidemic mice and its evaluation [D]. Chongqing: Southwest University, 2017.
- [20] 董丽红, 张瑞芬, 黄菲, 等. 油酸诱导单纯性肝脂肪变性细胞模型的建立及应用[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(11): 1622–1626.
DONG LH, ZHANG RF, HUANG F, *et al.* Establishment and application of hepatocyte steatosis models induced by oleic acid [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2017, 33(11): 1622–1626.
- [21] 周捷, 阮健, 袁静. 清热明目茶 HPLC 特征指纹图谱研究及多成分含量测定[J]. *药物分析杂志*, 2020, 40(2): 312–320.
ZHOU J, RUAN J, YUAN J. Study on the characteristic fingerprint of Qingre Mingmu tea by HPLC and determination of multicomponent [J]. *J Pharm Anal*, 2020, 40(2): 312–320.
- [22] 潘涛, 欧阳波, 肖作奇, 等. 基于 HPLC-DAD 的产康乐颗粒入血成分鉴定及含量测定[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(11): 908–911.
PAN T, OUYANG B, XIAO ZQ, *et al.* Identification and assay of constituents of *Chankangle granules* migrating to blood by HPLC-DAD [J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2016, 36(11): 908–911.
- [23] 张君涛, 王平, 刘爱峰, 等. 中药含药血清制备方法的研究概述[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(11): 4006–4009.
ZHANG JT, WANG P, LIU AIF, *et al.* Overview about preparation methods of serum containing Chinese medicine [J]. *J Tradit Chin Med*, 2015, 30(11): 4006–4009.
- [24] 刘菊燕. 茅苍术的血清药物化学和血清药理学研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
LIU JY. Serum medicinal chemistry and serum pharmacology of *Atractylodes lancea* [D]. Nanjing: Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2015.
- [25] 聂雪凌, 唐鸿志, 许平. 绿原酸的检测及代谢途径研究进展[J]. *广州化工*, 2013, 41(1): 3–6.
NIE XL, TANG HZ, XU P. Recent progress of the detection and metabolism of chlorogenic acid [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2013, 41 (1): 3–6.
- [26] 胡玲玲, 胡扬, 宋辉, 等. 绿原酸在肝微粒体和肠道菌群中的体外代谢研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(20): 8198–8206.
HU LL, HU Y, SONG H, *et al.* *In vitro* research on metabolism of chlorogenic acid in liver microsomes and intestinal flora [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(20): 8198–8206.
- [27] YANG CJ, WANG SH, GUO XW, *et al.* Simultaneous determination of seven anthraquinones in rat plasma by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and pharmacokinetic study after oral administration of semen cassiae extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169(1): 305–313.
- [28] MIAO MS, XIANG LL. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid [J]. *Adv Pharmacol*, 2020, 87(1): 71–88.
- [29] 万敏. 生、炒决明子多种成分的含量测定及其护肝作用的比较研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2018.
WAN M. Comparative study on the content determination of various components of raw and fried cassia seeds and their liver protection effects [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [30] 高茹, 林以宁, 梁鸽, 等. 绿原酸的吸收与代谢研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 316–319.
GAO R, LIN YN, LIANG G, *et al.* Absorption and metabolism of chlorogenic acid [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2012, 18(10): 316–319.

(责任编辑: 郑丽 韩晓红)

作者简介



薛帼珍, 硕士研究生, 主要研究方向为中药新产品开发与应用。
E-mail: xueguozhen1997@163.com



张希春, 博士, 教授, 主要研究方向为中药资源、中药材规范化种植及新产品开发。
E-mail: zxcxpy@126.com



刘计权, 博士, 教授, 主要研究方向为中药资源、中药材规范化种植及新产品开发。
E-mail: liujiquan2008@163.com