

## 泽漆醇提取物抗氧化活性及对油酸诱导HepG2细胞脂肪堆积的影响

甘露珍, 姜琼, 饶志威, 张聪子, 杜光, 章登政

### Antioxidant Activity of *Euphorbia helioscopia* Ethanol Extract and Its Effect on Oleic Acid Induced Fat Accumulation in HepG2 Cells

GAN Luzhen, JIANG Qiong, RAO Zhiwei, ZHANG Congzi, DU Guang, and ZHANG Dengzheng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050131>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

中国沙棘乙醇提取物的体外及对HepG2细胞的抗氧化活性

Antioxidant activity of ethanol extracts from Chinese seabuckthorn berries in vitro and on HepG2 cells

食品工业科技. 2017(05): 93-97 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.05.009>

鸡肉酶解物对HepG2细胞抗氧化活性及小鼠血清抗氧化酶活性的影响

Effect of Chicken Hydrolysate on Antioxidative Activity of HepG2 Cells and Antioxidative Enzyme Activity of Mouse Serum

食品工业科技. 2020, 41(15): 310-314,331 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.048>

戊糖片球菌P36对HepG2细胞抗氧化能力影响的初步研究

Preliminary study on the effect of *Pediococcus pentosaceus* P36 on the antioxidant capacity of HepG2 cells

食品工业科技. 2018, 39(12): 98-102 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.12.018>

酒糟粗提物对肝癌细胞HepG2增殖的抑制作用

Inhibition on the Growth of HepG2 Cells by Crude Extraction from Distillers' Grains

食品工业科技. 2021, 42(21): 392-399 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010175>

二氢杨梅素和杨梅苷抑制HepG2细胞的协同作用

Synergistic Anti-tumor Effect of Dihydromyricetin and Myricitrin on HepG2 cells

食品工业科技. 2021, 42(8): 333-337 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070271>

汉源花椒总黄酮提取物的抗氧化及抗Hela肿瘤细胞增殖活性研究

The Study of Anti-oxidative and Anti-proliferative Activities of Total Flavonoids Extract from Hanyuan *Zanthoxylum bungeanum*

食品工业科技. 2020, 41(13): 296-301,314 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.047>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

甘露珍, 姜琼, 饶志威, 等. 泽漆醇提取物抗氧化活性及对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 330–336. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050131

GAN Luzhen, JIANG Qiong, RAO Zhiwei, et al. Antioxidant Activity of *Euphorbia helioscopia* Ethanol Extract and Its Effect on Oleic Acid Induced Fat Accumulation in HepG2 Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(6): 330–336. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050131

· 营养与保健 ·

# 泽漆醇提取物抗氧化活性及对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的影响

甘露珍, 姜琼, 饶志威, 张聪子, 杜光, 章登政\*

(咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院药学部, 湖北咸宁 437199)

**摘要:** 为了探究泽漆醇提取物体外抗氧化作用及其对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的影响。本研究采用浸渍法分别以 25%、50%、75% 甲醇和乙醇对泽漆粉末进行提取, 评估不同泽漆提取物的体外抗氧化活性, 并测定其总酚和总黄酮含量。建立 HepG2 细胞脂肪堆积模型, 不同浓度 (20、40、60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 泽漆 50% 乙醇提取物处理 24 h, 观察细胞内脂滴形成情况; 测定细胞中甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量、总谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性及总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC)。结果表明, 泽漆醇提取物均具有抗氧化活性, 且有浓度依赖性, 其中 50% 乙醇提取物在一定浓度范围内抗氧化效果最佳 ( $P<0.05$ ), 且总酚 ( $8.813\%\pm 1.344\%$ ) 和总黄酮 ( $17.938\%\pm 0.819\%$ ) 含量也较高。与模型组比较, 泽漆 50% 乙醇提取物能够降低 HepG2 细胞内脂滴和 TG 值, 提高细胞 GSH、T-AOC 含量和 SOD 活性 ( $P<0.05$ ), 具有浓度依赖性。综上所述, 50% 乙醇提取物可以抑制油酸诱导的 HepG2 细胞脂肪堆积, 并增强细胞内源性抗氧化能力。

**关键词:** 泽漆, 醇提取物, 抗氧化作用, HepG2 细胞, 脂肪堆积

中图分类号: R961

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)06-0330-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050131



本文网刊:

## Antioxidant Activity of *Euphorbia helioscopia* Ethanol Extract and Its Effect on Oleic Acid Induced Fat Accumulation in HepG2 Cells

GAN Luzhen, JIANG Qiong, RAO Zhiwei, ZHANG Congzi, DU Guang, ZHANG Dengzheng\*

(Department of Pharmacy, Xianning Central Hospital/The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology, Xianning 437199, China)

**Abstract:** In order to investigate the antioxidant effect of the extract of *Euphorbia helioscopia in vitro* and its effect on lipid accumulation in HepG2 cells induced by oleic acid. In this study, 25%, 50%, 75% methanol and ethanol were used to extract the powder by immersion method. The antioxidant activities of the different extracts were assessed, and the levels of total phenols and total flavonoids were measured. To establish a model of lipid accumulation in HepG2 cells, the cells were treated with 50% ethanol extract (at concentrations of 20, 40, and 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h to observe the formation of lipid droplets. The triglyceride (TG) content, total glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) activity, and total antioxidant capacity (T-AOC) in the cells were determined. The findings demonstrated that all extracts exhibited concentration-dependent antioxidant activity. Among them, the 50% ethanol extract exhibited the most potent antioxidant effect in a certain concentration range ( $P<0.05$ ), with higher levels of total phenols ( $8.813\%\pm 1.344\%$ ) and total flavonoids ( $17.938\%\pm 0.819\%$ ). Compared with the model group, the 50% ethanol extract displayed a concentration-dependent ability to decrease lipid droplets and TG values in HepG2 cells, while increasing the levels of GSH, T-AOC, and SOD activity.

收稿日期: 2023-05-12

基金项目: 湖北省卫健委中医药科研发项目 (ZY2021M044); 湖北省科技计划项目 (2020CFB868); 咸宁市科技计划引导性项目 (2020ZRKX03YD); 咸宁市中心医院院级科研探索基金 (2018XYTS001)。

作者简介: 甘露珍 (1991-), 女, 硕士, 研究方向: 药理学研究, E-mail: 13476923498@163.com。

\* 通信作者: 章登政 (1992-), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向: 药理学研究, E-mail: hustzdz@163.com。

Therefore, the 50% ethanol extract showed potential in inhibiting oleic acid-induced fat accumulation in HepG2 cells and enhancing the endogenous antioxidant capacity of the cells.

**Key words:** *Euphorbia helioscopia*; alcohol extract; antioxidant effect; HepG2 cells; fat accumulation

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是世界上最常见的慢性肝病之一,随着生活方式的改变,其患病率迅速增长<sup>[1]</sup>。NAFLD在发病过程中,脂肪酸在肝脏内以甘油三酯(TG)的形式沉积,发生脂肪变性,随之氧化应激诱发脂质过氧化反应及炎症反应。鉴于氧化应激在 NAFLD 发病机制中的重要性,使用抗氧化剂治疗 NAFLD 引起广泛关注<sup>[2-4]</sup>。因为传统化学合成抗氧化剂具有一定的细胞毒性和致癌性,其应用被限制;而天然抗氧化剂更加安全,已逐渐成为抗氧化剂研究的热点<sup>[5-7]</sup>。

泽漆(*Euphorbia helioscopia* L.)是大戟科一年生草本植物,广泛分布在中国各地,其作为一种药用植物,几十年来被广泛用于治疗水肿、痰咳、疟疾、结痂和骨髓炎等多种疾病<sup>[8-9]</sup>,也被报道用作保健食品原料<sup>[10]</sup>。众所周知,泽漆具有广泛的生物活性,包括抗增殖、抗炎、驱虫、抗菌、抗真菌、降脂和促伤口愈合等活性<sup>[11-13]</sup>。研究表明,泽漆的不同提取液及多种活性小分子成分在抑制肿瘤细胞生长与增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞迁移与侵袭等方面展现了抗肿瘤的作用<sup>[14-17]</sup>。有研究报道,泽漆提取物具有清除自由基的活性<sup>[18-19]</sup>;另有报道,泽漆提取物的抗氧化活性与抗糖尿病之间可能存在联系<sup>[20-21]</sup>。然而,关于泽漆不同提取物抗氧化活性的对比研究较少,尤其是其对细胞脂肪堆积的研究鲜有报道。

本研究拟采用不同的溶剂提取泽漆有效成分,比较其抗氧化能力大小,并进一步探讨泽漆提取物对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的影响,为其抗氧化性与治疗 NAFLD 提供一定理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

泽漆干燥全草 为实验室自制,经粉碎、过 40 目筛,备用; HepG2 细胞 美国典型生物库(ATCC);胎牛血清、DMEM 培养基 美国 HyClone 公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS) 美国 Alorich 公司;Foline-phenol 分析纯,上海 Bio-sharp 公司;丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、芦丁(Rutin)、维生素 C( $V_C$ )、乙二胺四乙酸(EDTA)等其它的分析试剂 上海晶纯生物科技股份有限公司;MTT、油红 O 染料 美国 Sigma 公司;甘油三酯(A110-1-1)、谷胱甘肽(A006-2-1)、超氧化物歧化酶(A001-3-2)活性、总抗氧化能力(A015-2-1)试剂盒 南京建成生物工程研究所。

HH-4 型水浴锅 常州市华普达教学仪器有限公司;SB-5200 型超声波清洗器 宁波新芝生物科技

股份有限公司; Cary 60 型紫外可见分光光度计 美国安捷伦科技有限公司; Bio Tek Synergy 2 型多功能酶标仪 美国伯腾仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 泽漆提取物的制备 参照文献 [22] 进行优化,等量称取 6 份 5.0 g 泽漆粉末放入锥形瓶中,分别用 100 mL 的 25% 甲醇、25% 乙醇、50% 甲醇、50% 乙醇、75% 甲醇、75% 乙醇预浸泡 30 min,后 30 °C 超声 30 min,超声功率 300 W,过滤,恒温 80 °C 水浴干燥,获得提取物,依次命名为 25% 甲醇、25% 乙醇、50% 甲醇、50% 乙醇、75% 甲醇和 75% 乙醇。

1.2.2 DPPH 自由基的清除率测定 参照文献 [23],采用 DPPH 氧化法,将提取物用 60% 乙醇配成 0.015~0.500 mg/mL 样液,分别取 20  $\mu$ L 样液加入 200  $\mu$ L 的 0.004% DPPH 乙醇溶液中,立即混匀,室温静置 30 min,以  $V_C$ 、Rutin、BHA、BHT 作阳性对照。用酶标仪于 517 nm 处测吸光度。样品 DPPH 自由基的清除率计算公式见式(1):

$$\text{清除率}(\%) = (A_1 - A_0) / A_1 \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中,  $A_1$  为待测样品与 DPPH 作用后的吸光度值;  $A_0$  为与样液等体积的 60% 乙醇溶液与 DPPH 作用后的吸光度值。

1.2.3 ABTS<sup>+</sup>自由基的清除率测定 参照文献 [24],将 7 mmol/L ABTS<sup>+</sup>溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液混合,室温避光 16 h。用甲醇稀释上述混合液,使混合液在 734 nm 处吸光度为 0.70±0.02。将提取物用 60% 乙醇配成一系列浓度样液,分别取 50  $\mu$ L 样液加入 100  $\mu$ L 的混合液中,立即混匀,室温静置 30 min,以  $V_C$ 、Rutin、BHA、BHT 作阳性对照。于 734 nm 处测吸光度值。ABTS<sup>+</sup>自由基清除率计算公式见式(2):

$$\text{清除率}(\%) = (A_1 - A_0) / A_1 \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中,  $A_1$  为待测样品与混合液反应后的吸光度值,  $A_0$  为等体积 60% 乙醇溶液与混合液作用后的吸光度值。

1.2.4 还原 Fe<sup>3+</sup>能力测定 参照文献 [25],在 100  $\mu$ L 样品溶液中加入 100  $\mu$ L 去离子水及 25  $\mu$ L 0.5 mmol/L FeCl<sub>2</sub>,立即于 562 nm 处测吸光度值  $A_1$ 。加入 25  $\mu$ L 2.5 mmol/L 菲啰嗪,混匀后室温避光反应 20 min,再测吸光度值  $A_2$ 。以 EDTA 为阳性对照。Fe<sup>3+</sup>还原能力的计算公式见式(3):

$$\text{Fe}^{3+} \text{还原能力}(\%) = [1 - (A_{\text{样}2} - A_{\text{样}1}) / (A_{\text{对照}2} - A_{\text{对照}1})] \times 100 \quad \text{式(3)}$$

1.2.5 总酚含量测定 参照文献 [26], 取 40  $\mu\text{L}$  样品溶液(或没食子酸溶液), 加入 360  $\mu\text{L}$  蒸馏水后再加入 40  $\mu\text{L}$  福林酚试剂, 混匀, 5 min 后加入 400  $\mu\text{L}$  7% 碳酸钠溶液, 立即用蒸馏水稀释至 1 mL, 充分混合, 室温孵育 90 min, 750 nm 测吸光度。以没食子酸作标准曲线, 得回归方程  $y=0.112x-0.0544$ ,  $R^2=0.9993$ 。样品中的总酚以没食子酸的含量表示, 单位为 1 mg 没食子酸当量/每克样品。

1.2.6 总黄酮含量测定 参照文献 [27], 准确称取 8 mg 芦丁标准品, 用 60% 乙醇溶解后转移到 50 mL 容量瓶并定容, 然后配制成母液浓度为 0.16 mg/mL 的芦丁标准液。分别移取芦丁标准液 0、0.2、1.0、1.8、2.6、3.4、4.2、5 mL 于 25 mL 容量瓶中, 加入 1% 的  $\text{AlCl}_3$  乙醇溶液 5 mL, pH5.5 的醋酸钠缓冲盐 4 mL, 再用 60% 乙醇液定容到 25 mL。在 200~400 nm 波长段进行紫外扫描, 于最大吸收波长 275 nm 处测定吸光度, 以对照品溶度  $C(\mu\text{g/mL})$  为横坐标, 吸光值  $A$  为纵坐标进行线性回归, 回归方程为  $y=0.0347x-0.0068$ ,  $R^2=0.9996$ 。

1.2.7 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 HepG2 细胞, 并置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱, 备用。

1.2.8 MTT 实验 将泽漆 50% 乙醇提取物粉末采用 DMSO 溶解配制成浓度为 10 mg/mL 的泽漆 50% 乙醇提取物溶液。取生长状态良好的 HepG2 细胞以每孔  $5 \times 10^3$  个接种于 96 孔板中, 待细胞生长至 70% 融合度时, 采用 0、25、50、100、200、400、800、1600  $\mu\text{g/mL}$  泽漆 50% 乙醇提取物处理 HepG2 细胞 24 h。每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 后, 放置培养箱中孵育 4 h 后, 弃掉液体, 每孔再加 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 10 min 充分溶解, 酶标仪在 490 nm 处测定  $A$  值 ( $A_{490}$ ), 并以空白孔调零, 以  $A_{490}$  值代表增殖活性。

1.2.9 油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积模型的建立及分组 取生长状态良好的 HepG2 细胞以每孔  $2 \times 10^5$  个接种于 6 孔培养板, 待细胞生长至 70% 融合度时, 采用 0.2 mmol/L 油酸(OA)刺激 HepG2 细胞 24 h 构建脂肪堆积模型<sup>[21]</sup>。根据实验目的设置对照组、油酸组(OA 组)、油酸+泽漆 50% 乙醇提取物低、中、高剂量组(20.0、40.0、60.0  $\mu\text{g/mL}$ ), 油酸和泽漆 50% 乙醇提取物干预同时进行, 干预时间为 24 h。其中对照组加 100  $\mu\text{L}$  DMEM 培养基, OA 组加 50  $\mu\text{L}$  油酸溶液和 50  $\mu\text{L}$  DMEM 培养基, 油酸+泽漆醇提取物组加 50  $\mu\text{L}$  油酸溶液和 50  $\mu\text{L}$  含泽漆醇提取物的 DMEM 培养基。

1.2.10 油红 O 染色 取生长状态良好的 HepG2 细胞以每孔  $2 \times 10^5$  个接种于 6 孔培养板, 按 1.2.9 分组处理。弃去上清, PBS 洗 3 次, 10% 福尔马林固定 40 min, PBS 洗 3 次, 用油红 O 染色液室温染色 20 min, PBS 洗 2 次, 置于倒置显微镜下观察细胞内脂滴染色情况。

1.2.11 TG、GSH、T-AOC 含量和 SOD 活性测定 取生长状态良好的 HepG2 细胞以每孔  $2 \times 10^5$  个接种于 6 孔培养板, 按 1.2.9 分组处理。弃去上清, PBS 洗 3 次。收集细胞, 冰上裂解 30 min, 按照试剂盒说明书的操作步骤测定 TG、GSH、T-AOC 含量和 SOD 活性。

### 1.3 数据处理

本研究数据均采用 SPSS22.0 统计软件进行分析, 并以均值 $\pm$ 标准差的形式表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 泽漆不同醇提取物对 DPPH 自由基的清除作用

如图 1 所示, 25% 甲醇、25% 乙醇、50% 甲醇、50% 乙醇、75% 甲醇和 75% 乙醇各组泽漆醇提取物在浓度 0.015~0.500 mg/mL 的范围内, 随着浓度的增加, 对 DPPH 自由基的清除活性逐渐增强, 其中在 0.030~0.500 mg/mL 的范围内, 50% 乙醇组活性最强 ( $P < 0.05$ )。

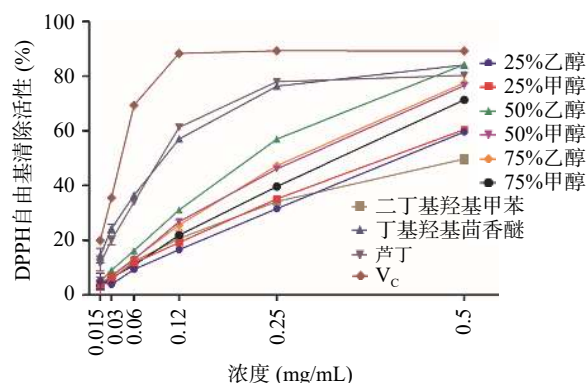


图1 泽漆不同醇提取物对 DPPH 自由基的清除活性  
Fig.1 DPPH radical scavenging activity of different alcohol extracts of *Euphorbia helioscopia*

### 2.2 泽漆不同醇提取物对 ABTS<sup>+</sup>自由基的清除作用

如图 2 所示, 25% 甲醇、25% 乙醇、50% 甲醇、50% 乙醇、75% 甲醇和 75% 乙醇各组泽漆醇提取物在浓度 0.010~0.080 mg/mL 的范围内, 随着浓度的

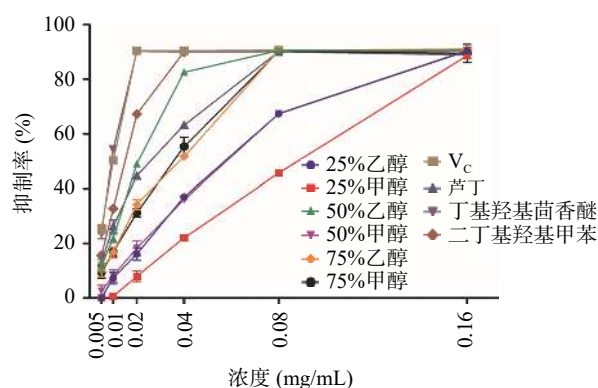


图2 泽漆不同醇提取物对 ABTS<sup>+</sup>自由基的清除活性  
Fig.2 ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of different alcohol extracts of *Euphorbia helioscopia*

增加, 对 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除活性逐渐增强, 其中在 0.010~0.040 mg/mL 的范围内 50% 乙醇组清除活性最强 ( $P < 0.01$ ), 并在浓度为 0.080 mg/mL 时, 达到最高值。

### 2.3 泽漆不同醇提取物对 Fe<sup>3+</sup> 的还原力

如图 3 所示, 25% 甲醇、25% 乙醇、50% 甲醇、50% 乙醇、75% 甲醇和 75% 乙醇各组泽漆醇提取物在浓度 0.125~2.000 mg/mL 的范围内, 随着浓度的增加, 对 Fe<sup>3+</sup> 的还原力逐渐增强。在 0.063~2.000 mg/mL 的范围内, 50% 乙醇组和 50% 甲醇组还原能力明显比 75% 甲醇和 75% 乙醇组强 ( $P < 0.001$ ); 在浓度为 0.063、0.125 mg/mL 时, 50% 乙醇组和 50% 甲醇组还原能力明显比 25% 甲醇和 25% 乙醇组强 ( $P < 0.001$ ), 随着浓度升高, 四组还原能力有所波动, 并在 2 mg/mL 时螯合率接近 100%。综上所述, 在各组泽漆醇提取物中, 50% 乙醇提取物还原能力较高。有研究报道, 泽漆甲醇和乙醇提取物具有抗氧化活性, 其纯甲醇提取物对 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup> 的清除能力比纯乙醇提取物更强, 分析原因可能是纯甲醇提取物中总酚和总黄酮含量比纯乙醇提取物中高<sup>[15]</sup>。因此, 本研究接下来检测比较各组总酚和总黄酮含量。

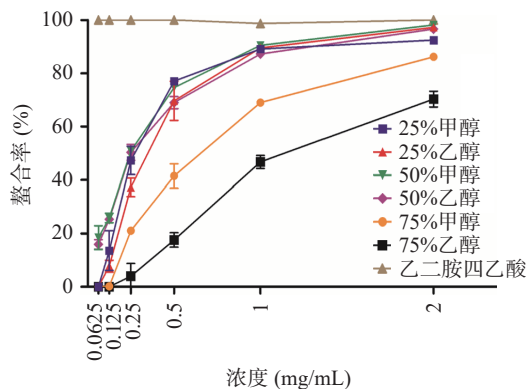


图 3 泽漆不同醇提取物对 Fe<sup>3+</sup> 的还原力  
Fig.3 Fe<sup>3+</sup> reducing power of different alcohol extracts of *Euphorbia helioscopia*

### 2.4 泽漆不同醇提取物中的总酚和总黄酮含量

多种酚类和黄酮类化合物具有抗氧化活性<sup>[28]</sup>, 本研究通过化学方法检测各组总酚和总黄酮含量。结果发现, 50% 乙醇提取物总酚和总黄酮含量均较高, 与其更高的抗氧化活性相符。如图 4 所示, 测得 25% 甲醇、25% 乙醇、50% 甲醇、50% 乙醇、75% 甲醇和 75% 乙醇各组泽漆醇提取物中总酚和总黄酮含量, 其中 50% 乙醇组的总酚含量明显高于 25% 甲醇组、50% 甲醇组和 25% 乙醇组 ( $P < 0.05$ ), 而与 75% 甲醇组和 75% 乙醇组相比, 无显著性差异 ( $P = 0.905$  和  $0.314$ )。50% 乙醇组的总黄酮含量明显高于 25% 甲醇组、50% 甲醇组和 25% 乙醇组 ( $P < 0.05$ ), 而与 75% 甲醇组和 75% 乙醇组相比, 无显著性差异 ( $P = 0.171$  和  $0.155$ )。

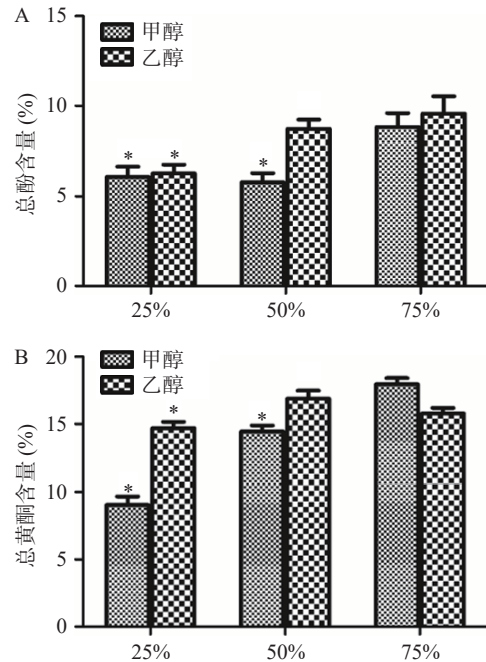


图 4 泽漆不同醇提取物中的总酚和总黄酮含量  
Fig.4 Contents of total phenol and total flavone in different alcohol extracts of *Euphorbia helioscopia*  
注: 与 50% 乙醇组相比, \*表示  $P < 0.05$ 。

相对于其它组泽漆醇提取物, 泽漆 50% 乙醇提取物的 DPPH 自由基和 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除作用更强, 对 Fe<sup>3+</sup> 的还原力也较高, 并且其提取物中总酚和总黄酮含量也较高, 与其高抗氧化活性相符。故选取泽漆 50% 乙醇提取物进行下一步研究。

### 2.5 泽漆 50% 乙醇提取物对 HepG2 细胞脂肪堆积的影响

MTT 检测 HepG2 细胞增殖活性(图 5), 与空白组相比, 100~1600 μg/mL 泽漆 50% 乙醇提取物各干预组 HepG2 细胞增殖活性明显降低, 具有浓度依赖性 ( $P < 0.001$ ), IC<sub>50</sub> 值为 237.486 μg/mL。选取细胞抑制率在 15% 范围内的最大泽漆 50% 乙醇提取物浓度 60.0 μg/mL 作为后续实验的高剂量组, 按照等比例设置中、低浓度组, 即 40、20 μg/mL 泽漆 50%

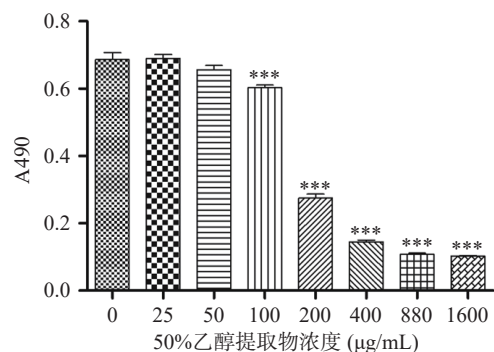


图 5 不同浓度泽漆 50% 乙醇提取物对 HepG2 细胞增殖活性的影响  
Fig.5 Effects of different concentrations of 50% ethanol extract of *Euphorbia helioscopia* on the proliferation activity of HepG2 cells  
注: 与空白组比较, \*\*\* $P < 0.001$ 。

乙醇提取物作为后续实验处理 HepG2 细胞的中、低剂量。

油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积模型常用来评价药物对肝细胞脂肪堆积的干预<sup>[21]</sup>。油红 O 染色观察各组细胞内脂滴形成情况(橘红色油滴,用红色箭头标记),与对照组相比,OA 组细胞内大量油滴堆积,说明脂肪堆积模型建立成功;与 OA 组相比,随着泽漆 50% 乙醇提取物浓度的增加, HepG2 细胞内油滴堆积量逐渐减少,具有一定的浓度依赖性(图 6),说明泽漆乙醇提取物可以抑制 HepG2 细胞内脂肪堆积。GPO-PAP 法测定结果显示,对照组、OA 组及 50% 乙醇提取物低、中、高剂量组 HepG2 细胞中 TG 含量分别为(0.111±0.015)、(0.286±0.010)、(0.238±0.004)、(0.207±0.005)和(0.176±0.010)mmol/g,差异有统计学意义( $F=142.125, P<0.001$ )。与对照组比较,OA 组 HepG2 细胞中 TG 含量显著上升( $P<0.001$ );与 OA 组比较,50% 乙醇提取物低、中、高剂量组 HepG2 细胞中 TG 含量均显著降低( $P<0.001$ ),具有浓度依赖性。结果说明,泽漆乙醇提取物可以增强 HepG2 细胞内源性抗氧化能力,并且具有浓度依赖性。

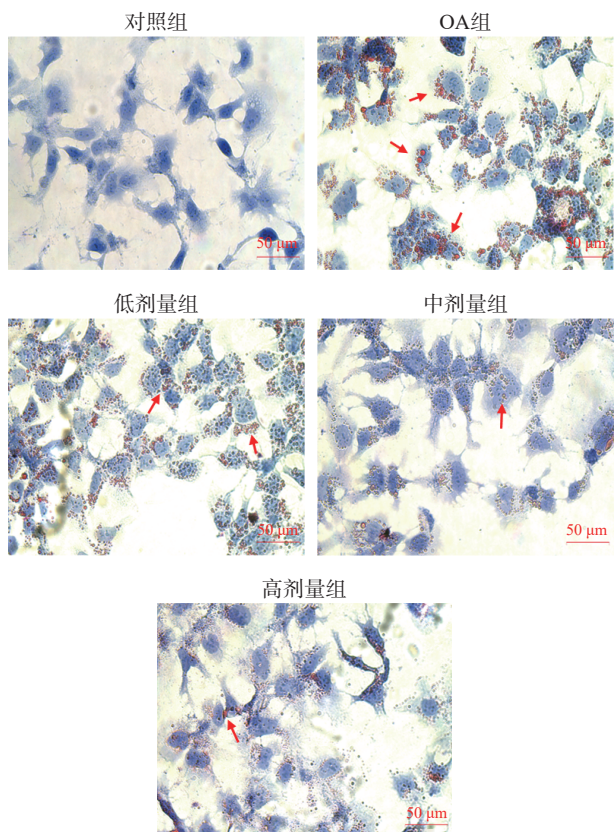


图 6 HepG2 细胞油红 O 染色(400×)

Fig.6 Oil red O staining of HepG2 cells (400×)

注:红色箭头标记部分典型油滴。

### 2.6 泽漆 50% 乙醇提取物对 HepG2 细胞内源性抗氧化能力的影响

如表 1 所示,与对照组比较,OA 组 HepG2 细胞中 GSH 和 T-AOC 含量及 SOD 活性显著降低( $P<$

0.001);与 OA 组比较,50% 乙醇提取物低、中、高剂量组 HepG2 细胞中 GSH 含量( $P<0.05$ )和 T-AOC 含量( $P<0.001$ )明显上升,SOD 活性也显著上升( $P<0.001$ ),具有浓度依赖性。

表 1 泽漆 50% 乙醇提取物对 HepG2 细胞中 GSH、T-AOC 含量和 SOD 活性的影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of *Euphorbia helioscopia* 50% ethanol extract on GSH, T-AOC content and SOD activity in HepG2 cells ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	GSH(mg/mL)	SOD(kU/g)	T-AOC(mmol/g)
对照组	17.424±1.147	52.262±0.432	8.462±0.516
OA组	6.857±0.672***	29.782±0.301***	4.036±0.269***
低剂量组	8.387±0.495 <sup>#</sup>	33.425±0.650 <sup>###</sup>	5.604±0.272 <sup>###</sup>
中剂量组	10.340±0.489 <sup>###</sup>	36.519±0.507 <sup>###</sup>	6.384±0.180 <sup>###</sup>
高剂量组	14.161±0.618 <sup>###</sup>	41.143±1.197 <sup>###</sup>	7.713±0.171 <sup>###</sup>

注:与对照组比较,\*\*\* $P<0.001$ ;与OA组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>###</sup> $P<0.001$ 。

### 3 讨论与结论

本研究分别用 25%、50%、75% 的甲醇或乙醇作为溶剂对泽漆进行提取,通过体外抗氧化活性检测方法比较其抗氧化能力。结果发现,这六种泽漆提取物均具有抗氧化活性,且具有浓度依赖性,相对于其它组泽漆醇提取物,泽漆 50% 乙醇提取物的 DPPH 自由基和 ABTS<sup>+</sup>自由基的清除作用更强,对 Fe<sup>3+</sup>的还原力也较高,总体上 50% 乙醇提取物抗氧化效果更佳。多种酚类和黄酮类化合物具有抗氧化活性,本研究通过化学方法检测各组总酚和总黄酮含量,结果发现,50% 乙醇提取物总酚和总黄酮含量均较高,与其高抗氧化活性呈正相关。有研究报道,泽漆提取物具有抗氧化和抗糖尿病活性,而且甲醇提取物中总酚和总黄酮含量比乙醇提取物中高,并且甲醇提取物对 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup>的清除能力更强<sup>[21]</sup>。分析原因,可能是两者的提取方法不同,导致提取物中总酚和总黄酮含量不同,此外本研究中相同浓度的甲醇和乙醇提取泽漆也有 75% 甲醇提取物中总黄酮比 75% 乙醇提取物含量高的情况。

本研究用油酸诱导 HepG2 细胞建立脂肪堆积模型,并进一步探讨泽漆 50% 乙醇提取物对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的影响。与空白组相比,100~1600 μg/mL 各组细胞增殖活性明显降低,具有浓度依赖性。根据其 IC<sub>15</sub> 值,选取无毒副作用的剂量作为后续实验的干预剂量。结果显示,OA 组细胞内大量油滴堆积,脂肪堆积模型建立成功;而泽漆 50% 乙醇提取物可以减少细胞内油滴堆积,降低 TG 含量,存在浓度依赖性,说明泽漆乙醇提取物可以抑制 HepG2 细胞内脂肪堆积。进一步研究发现,泽漆 50% 乙醇提取物可以促进 HepG2 细胞内 GSH 和 T-AOC 含量上升和 SOD 活性上升,具有浓度依赖性。结果说明,泽漆乙醇提取物可以增强 HepG2 细胞内源性抗氧化能力。这可以为将泽漆醇提取物用于 NAFLD 治疗提供新的理论依据。然而,有研究

报道, 泽漆乙酸乙酯提取物可能诱导 MDA-MB-231 细胞中 ROS 过量生成, 通过线粒体损伤途径促进凋亡, 从而抑制细胞生长<sup>[29]</sup>。泽漆提取物在细胞发挥的作用是否跟提取方式和细胞类型有关, 有待于进一步研究。当然, 本研究未对泽漆提取物做进一步提纯质谱分析, 探讨某种或某类化合物的抗氧化作用, 对此课题组后期将进行更加深入细致的研究。

综上所述, 泽漆甲醇和乙醇提取物均具有抗氧化活性, 其中以 50% 乙醇提取物抗氧化效果最佳, 且其可以抑制油酸诱导的 HepG2 细胞脂肪堆积, 并增强 HepG2 细胞内源性抗氧化能力。

### 参考文献

- [1] POUWELS S, SAKRAN N, GRAHAM Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss[J]. *BMC Endocrine Disorders*, 2022, 22(1): 63.
- [2] CHEN Z, TIAN R F, SHE Z G, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 152: 116–141.
- [3] BENICE K K, BIMBAUM M J. Metabolic drivers of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Molecular Metabolism*, 2021, 50: 101143.
- [4] HONG T, CHEN Y Y, LI X Y, et al. The role and mechanism of oxidative stress and nuclear receptors in the development of NAFLD[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 6889533.
- [5] XU X Q, LIU A M, HU S Y, et al. Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action[J]. *Food Chemistry*, 2021, 353: 129488.
- [6] MIZOBUCHI M, ISHIDOH K, KAMEMURA N. A comparison of cell death mechanisms of antioxidants, butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2022, 45(4): 1899–1906.
- [7] PETROPOULOS SA, DI GIOIA F, POLYZOS N, et al. Natural antioxidants, health effects and bioactive properties of wild allium species[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2020, 26(16): 1816–1837.
- [8] YANG Y, CHEN X F, LUAN F, et al. *Euphorbia helioscopia* L.: A phytochemical and pharmacological overview[J]. *Phytochemistry*, 2021, 184: 112649.
- [9] 王冬, 张翔宇, 邵莹莹, 等. 中药泽漆及其复方制剂抗肿瘤药理作用与临床应用研究进展[J]. *天津中医药*, 2023, 40(3): 402–408. [WANG D, ZHANG X Y, SHAO Y Y, et al. Research progress on antitumor pharmacological action and clinical application of traditional Chinese medicine *Euphorbia helioscopia* L. and its compound preparations[J]. *Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2023, 40(3): 402–408.]
- [10] 周瑞保. 泽漆保健速溶茶粉的制备方法: 中国, 107223743A[P]. 2017-10-03. [ZHOU R B. The preparation method of *Euphorbia helioscopia* care instant tea powder: CN, 107223743A [P]. 2017-10-03.]
- [11] ZHANG Y, XIONG F, ZHANG J J, et al. Euphycopias A-I, macrocyclic diterpenes with NLRP3 inflammasome inhibitory activity from *Euphorbia helioscopia* L.[J]. *Fitoterapia*, 2022, 157: 105139.
- [12] 高帆, 牛玉季, 张亚茹, 等. 泽漆抗肿瘤抗炎作用及机制研究[J]. *河南大学学报(医学版)*, 2021, 40(6): 391–399. [GAO F, NIU Y J, ZHANG Y R, et al. Study on the anti-tumor and anti-inflammatory effects and mechanism of *Euphorbia helioscopia* L.[J]. *Journal of Henan University (Medical Science)*, 2021, 40(6): 391–399.]
- [13] 刘雅慧, 陈兰英, 周滕静, 等. 泽漆水提物对 LPS 诱导的急性肺损伤的影响[J]. *中成药*, 2022, 44(3): 732–739. [LIU Y H, CHEN L Y, ZHOU M J, et al. Effects of aqueous extract of *Euphorbia helioscopia* on LPS-induced acute lung injury[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2022, 44(3): 732–739.]
- [14] WANG Z Y, LIU H P, ZHANG Y C, et al. Anticancer potential of *Euphorbia helioscopia* L. extracts against human cancer cells[J]. *Anatomical Record (Hoboken)*, 2012, 295(2): 223–233.
- [15] 刘金辉, 方亚妮, 贺太平. 中药泽漆抗肿瘤作用文献研究[J]. *现代中医药*, 2022, 42(4): 12–15. [LIU J H, FANG Y N, HE T P. Literature study on the antitumor effect of Chinese medicine Zizhi[J]. *Modern Chinese medicine*, 2022, 42(4): 12–15.]
- [16] MU H Y, GONG C Y, ZHANG R J, et al. Diterpenoids from *Euphorbia helioscopia* and their enhancement of NK cell-mediated killing of NSCLC cells[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2022, 119: 105534.
- [17] LI X Q, BAI Y L, ZHANG D L, et al. Euphornin reduces proliferation of human cervical adenocarcinoma HeLa cells through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest[J]. *Oncotargets and Therapy*, 2018, 11: 4395–4405.
- [18] CATENI F, ZILIC J, ALTIERI T, et al. Lipid metabolites with free-radical scavenging activity from *Euphorbia helioscopia* L.[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2014, 181: 90–98.
- [19] NGO T C, DAO D Q, MAI T V, et al. On the radical scavenging and DNA repairing activities by natural oxygenated diterpenoids: theoretical insights[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2022, 62(10): 2365–2377.
- [20] MUSTAFA I, ANWAR H, IRFAN S, et al. Attenuation of carbohydrate metabolism and lipid profile by methanolic extract of *Euphorbia helioscopia* and improvement of beta cell function in a type 2 diabetic rat model[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2022, 22(1): 23.
- [21] MUSTAFA I, FAISAL M N, HUSSAIN G, et al. Efficacy of *Euphorbia helioscopia* in context to a possible connection between antioxidant and antidiabetic activities: A comparative study of different extracts[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2021, 21(1): 62.
- [22] 王玲, 王天杰, 董媛媛, 等. 泽漆总黄酮不同提取方法比较研究[J]. *中医学报*, 2014, 29(8): 1172–1174. [WANG L, WANG T J, DONG Y Y, et al. Comparison study on extraction methods of total flavonoids in *Euphorbia Helioscopia*[J]. *China Journal of Chinese Medicine*, 2014, 29(8): 1172–1174.]
- [23] SENTHILKUMAR A, VENKATESALU V. Chemical constituents, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from the fruit pulp of wood apple[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 46: 66–72.
- [24] AKTUMSEK A, ZENGİN G, GÜLER G O, et al. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 55: 290–296.
- [25] VINAYAK R C, SUDHA S A, CHATTERJI A. Bio-screening of a few green seaweeds from India for their cytotoxic and antioxidant potential[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(13): 2471–2476.

- [26] LI H Y, HAO Z B, WANG X L, et al. Antioxidant activities of extracts and fractions from *lysimachia foenum-graecum* hance [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(2): 970-974.
- [27] 鄢又玉, 夏婷, 张育, 等. 三氯化铝比色测定火棘总黄酮方法的系统考察[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(5): 89-94. [YAN Y Y, XIA T, ZHANG Y, et al. Systematic investigation on  $AlCl_3$  colorimetric determination of total flavones of *pyracantha fortuneana* fruit[J]. *Food Research and Development*, 2015, 36(5): 89-94.]
- [28] 李甜, 廖茂梁, 郑雅楠, 等. 泽泻汤对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的抑制作用[J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(5): 772-775. [LI T, LIAO M L, ZHENG Y N, et al. Inhibition of ZexieDecotion on oleic acid-induced fat accumulation in HepG2 cells[J]. *Drugs & Clinic*, 2017, 32(5): 772-775.]
- [29] 王筱婧, 王东兴, 范洁, 等. 泽漆抑制三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞及其凋亡机制研究[J]. *药学实践杂志*, 2017, 35(4): 337-340,358. [WANG X J, WANG D X, FAN J, et al. Inhibitory effect of *Euphorbia helioscopia* on human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells and its possible mechanism of apoptosis[J]. *Journal of Pharmaceutical and Service*, 2017, 35(4): 337-340, 358.]