石榴皮多酚对脂变 L-02 肝细胞胆固醇合成的影响及机制探究

梁 俊，李建科*，刘永峰，马倩倩，赵 伟
（陕西师范大学 食品工程与营养科学学院，陕西 西安 710062）

摘要：研究了石榴皮多酚纯化物、安石榴苷和石榴鞣花酸对脂变肝细胞胆固醇合成的影响及机制；采用 MTT 法筛选石榴皮多酚适宜浓度，体积分数 50%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基与 L-02 肝细胞孵育 48 h 建立脂肪变性肝细胞模型；实验分为正常组、模型组和治疗组，治疗组加入不同浓度的受试物，继续培养 48 h，油红 O 染色定性观察细胞形态和脂滴堆积，高效液相色谱法定量检测细胞内胆固醇含量；紫外分光-速率法检测 HMG-CoA 还原酶活性变化；结果显示石榴皮多酚均能成剂量依赖性地减少细胞内脂滴的积累、减少细胞内总胆固醇的含量，同时抑制 HMG-CoA 还原酶的活性，其中以 100 μg/mL 的安石榴苷标品效果最佳。表明石榴皮多酚具有降低肝细胞内总胆固醇的作用，可能是通过抑制 HMG-CoA 还原酶活性实现的，安石榴苷是石榴皮多酚中降血脂的主要活性形式。

关键词：石榴皮多酚；安石榴苷；石榴鞣花酸；L-02 肝细胞；胆固醇；HMG-CoA 还原酶
中图分类号：R 285.5　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)02—0487—07

Effects of Pomegranate Peel Polyphenols(PPPs) on Cholesterol Synthesis in the Human L-02 Hepatocyte

LIANG Jun, *LI Jian-ke**, *LIU Yong-feng*, *MA Qian-qian*, *ZHAO-Wei*
(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: To study the possible mechanisms of Pomegranate Peel Polyphenols、Punicalagine and ellagic acid on cholesterol biosynthesis. The model of steatotic L-02 hepatocyte was established by cultured with 50% (*V/V*) fetal bovine serum for 48 hours, and the appropriate concentrations of PPPs were detected by MTT assay, Then the experiment is divided into there groups: normal group、model group and therapy group, different contents of PPPs is added to the therapy group. After 48h cultured, the lipid droplets stained with oil red O were observed, meanwhile, the intracellular total cholesterol levels were determined by HPLC and the activity of HMG-CoA reductase was detected by ultraviolet spectro-velocity method. The accumulation of lipid droplets and the content of TC were decreased in PPPs treatment group , existing dose-effect relationship, meanwhile, the activity of

收稿日期：2012-02-24
基金项目：国家自然科学基金项目(31171677)。
* **通信作者**：李建科(1960—)，男，陕西扶风人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品营养与安全研究。E-mail:jiankel@snnu.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

HMG-CoA reductase was significantly inhibited in PPPs treatment groups,especially in the Punicalagin group. PPPs can decrease the content of TC in steatotic hepatocytes,The possible mechanism is by downregulating the activity of HMG-CoA reductase,Punicalagin was the key component in PPPs on lipid-lowering.

Keywords: pomegranate peel polyphenols,punicalagin,ellagic acid,human L-02 Hepatocyte, cholesterol synthesis,HMG-CoA reductase

程霜等人[1]研究发现,富集的石榴皮多酚具备明显降低高脂大鼠的血清总胆固醇、甘油三酯和肝总胆固醇的作用;赵艳红等人[2]进一步证明安石榴苷是石榴皮多酚纯化物的主要活性成分;B.Cerdá等人[3]对安石榴苷吸收代谢的研究表明,安石榴苷吸收入血的活性形式为鞣花酸。究竟石榴皮多酚的何种成分或代谢产物发挥降血脂作用仍不清楚。作者以L-02肝细胞模型作为研究对象,观察石榴皮多酚纯化物、安石榴苷和石榴鞣花酸对肝细胞内胆固醇含量和胆固醇合成限速酶HMG-CoA还原酶活性的影响,研究石榴皮多酚的降脂作用、活性形式及作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

石榴皮多酚纯化物:采用XRD-6树脂纯化制备,纯度为87.81%;安石榴苷的纯度为69.42%。安石榴苷标品:货号E-0363,纯度≥96.0%;石榴鞣花酸标品:货号E-0654,纯度≥98.0%;两种标品均购自上海同田生物技术股份有限公司。低温、避光、隔氧存放。

成年人L-02细胞:购自武汉大学典型物种保藏中心;胎牛血清:杭州四季清公司产品;RPMI-1640基本培养基:美国Gibco公司产品;BCA蛋白质浓度测定试剂盒、托伐他汀:珠海健康元生物医药有限公司产品;胆固醇标品:中国药品生物制品检定所提供;二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶、MTT、油红O、NADPH、HMG-CoA、二硫苏糖醇(DTT)、胰岛素-I6634等,均购自于美国Sigma公司;HMG-CoA还原酶液,自制;色谱级甲醇,购自成都科密欧公司;KH_2PO_4、EDTA、$NaHCO_4$等除注明外,所用试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

311型气套式CO_2恒温培养箱,Thermo公司产品;IX51型倒置显微镜,日本Olympus产品;SW-CJ-1D型超净工作台,江苏吴江市净化设备厂制造;MR23i高速低温离心机,法国Jouan公司产品;TK-C1381型数码摄像系统;酶标仪,TU-1810型紫外可见分光光度计,北京普析通用公司产品;Q5000型微量核酸蛋白质测定仪,Breeze1525型高效液相色谱仪,美国Dionex公司产品;精密微量移液器(0.5~10μL,10~100μL,100~1000μl):德国Eppendorf公司产品;KQ3200DE型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基制备 先利用基本培养基配制成含1.8 g/L $NaHCO_3$、1 μg/mL胰岛素和100 U/mL青霉素-链霉素的部分完全培养基,再按胎牛血清(FBS)的含量分成两种完全培养基,即:体积分数50% FBS的造模培养基和体积分数10% FBS的正常培养基

1.3.2 成年人L-02肝细胞培养 L-02肝细胞培养于50 cm^3含4 mL体积分数10% FBS的正常培养基的细胞培养瓶中,置37 ℃、体积分数5% CO_2及饱和湿度的孵箱内培养,待细胞80%融合时用含质量分数0.25%胰蛋白酶消化,传代[4]。

1.3.3 脂变L-02细胞模型的建立 将处于对数生长期的L-02肝细胞以2×10^4 cell/孔接种于6孔板中,置于37℃、体积分数5% CO_2培养箱中贴壁培养48 h后,改用造模培养液继续培养48 h建立脂肪变性肝细胞模型[5-6]。

1.3.4 MTT法筛选3种受试物作用浓度 将安石榴苷标品、石榴鞣花酸标品和石榴皮多酚纯化物用DMSO溶解,过滤除菌,用生理盐水稀释为不同质量浓度备用[7-8]。将处于对数生长期的L-02肝细胞以1×10^3 cell/孔接种于96孔板中,先利用造模培养液培养48 h建立脂变肝细胞模型,然后改用正常培养基培养,使3种受施物终质量浓度为

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.5,5,10,20,40,80,160 μg/mL 和 360 μg/mL,继续培养 48 h,每个质量浓度设 4 个复孔。处理结束后每孔避光加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,继续培养 4 h;小心吸弃孔中的培养液,以 150 μL/孔的量加入 DMSO 终止反应,振荡 10 min 使结晶充分溶解;于以 570 nm 的波长于酶标仪上检测各孔吸光值,计算各药物浓度下 L-02 细胞的存活率。

1.3.5 试验分组及处理 试验分正常组、模型组、治疗组,治疗组加入不同质量浓度的石榴皮多酚纯化物、安石榴苷标品和石榴鞣花酸,使其终质量浓度分别为 25、50、100 μg/mL,各组处理见表 1。

表 1 各试验组处理情况

Table 1 Experimental groups and treatments

组别	处理
正常组	先用正常培养液培养 48 h,换液,继续用正常培养液培养 48 h
模型组	先用造模培养液培养 48 h,换液,用正常培养液继续培养 48 h
治疗组	先造模培养 48 h,换液,用含不同浓度受施物的正常培养液继续培养 48 h

1.3.6 油红 O 染色法定性观察细胞内脂滴形成 参照文献[9]染色,倒置显微镜下利用普通光观察细胞内红色脂滴形成情况。

1.3.7 高效液相色谱法检测细胞内胆固醇含量 参照文献[10-11]采用外标法峰面积定性定量,结果以 μg/mg 蛋白质表示,具体试验条件如下:

1)标准曲线的绘制:用无水乙醇溶解胆固醇标品,配制成 1 mg/mL 的贮备液,然后以流动相稀释到 20,40,60,80,100 mg/L,作为工作液,经 HPLC 检测,绘制标准曲线。

2)HPLC 法测定的色谱条件:C18 色谱柱,甲醇作为流动相,体积流量为 1 mL/min,在 205 nm 下检测 20 min,柱温 38 ℃。

1.3.8 HMG-CoA 还原酶活性测定(紫外分光-速率法) 参照文献[12-14],略有改动,研究石榴皮多酚对 L-02 肝细胞内 HMG-CoA 还原酶活性的影响,各组处理见表 2。取洁净玻璃试管,按表 3 顺序依次加入各试剂,将各试管置于 37 ℃恒温水浴中孵育10 min,加入 0.5 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液终止反应,1 500 r/min 离心 2 min,取上清液于 340 nm 处测定 OD 值,按标准曲线计算 NADPH 的含量。

表 2 试验分组及处理

Table 2 Experimental groups and treatments

组别	处理
酶活性间接影响	细胞脂变后,换液,按表 1 处理结束后,获取 HMG-CoA 还原酶液,按表 3 顺序加样,测定各组 HMG-CoA 还原酶活性
酶活性直接影响	从正常肝细胞获取 HMG-CoA 还原酶液后,向各组加入不同浓度的多酚,按表 3 顺序加样,测定各组 HMG-CoA 还原酶活性

表 3 加样顺序及加样量

Table 3 Dose and sequence of reagents

组别	试剂体积/μL				
	反应缓冲液	HMG-CoA	酶溶液	抑制剂	NADPH
空白组	800	100	0	0	100
正常组	700	100	100	0	100
模型组	700	100	100	0	100
间接组	700	100	100	0	100
直接组	600	100	100	100	100

1.3.9 数据处理 以上各组试验均重复 4 次,均以 $x\pm s$ 表示,SPSS 统计软件进行统计分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 MTT 细胞增殖实验

由图 1 结果所示:细胞存活率随着石榴皮多酚质量浓度的增加而呈逐渐下降的趋势,低质量浓度的石榴皮多酚对脂变后的 L-02 肝细胞增殖无明显抑制,表现为在 0~80 μg/mL 的质量浓度范围内,细胞存活率均在 90%以上,但在高质量浓度的石榴皮多酚作用下,L-02 肝细胞出现了较多的死亡,表现出明显的增殖抑制效应,故在本实验中选定 0~100 μg/mL 的质量浓度范围内与脂变肝细胞孵育 48 h 进行后续的实验研究。

2.2 油红 O 染色定性观察不同处理下脂滴堆积情况

由图 2 可见:正常组细胞边缘较清晰,细胞内积累较少的红色脂肪滴;模型组细胞有明显的增大,细胞内均可见较多较大的红色脂肪滴,甚至出现脂肪滴的融合现象,有趋向于大泡性脂肪样变;安石榴苷、鞣花酸和石榴皮多酚纯化物与细胞共孵育48 h 后,均能成剂量依赖性地减少细胞内脂滴的

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

堆积,其中安石榴苷组效果最明显,石榴皮多酚纯化物次之,说明安石榴苷可能是石榴皮多酚中起主要作用的主要成分,作用效果与其含量成正比关系。

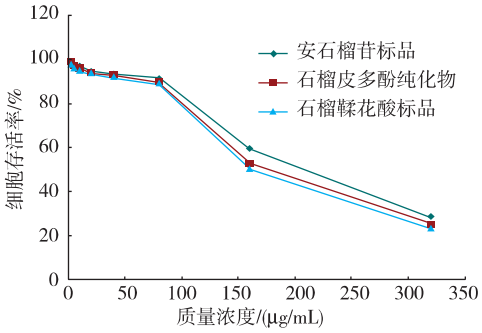
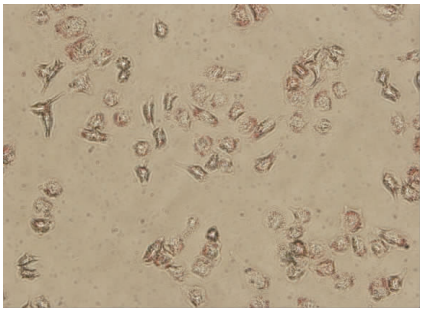
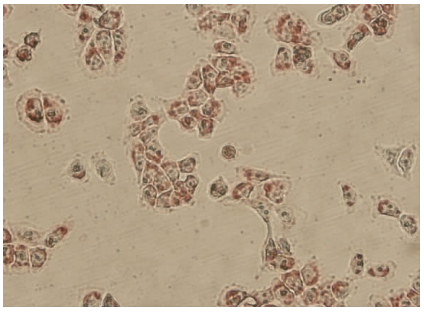


图 1 不同质量浓度石榴皮多酚作用 48 h 后对脂变 L-02 肝细胞存活率的影响($x\pm s$,n=4)

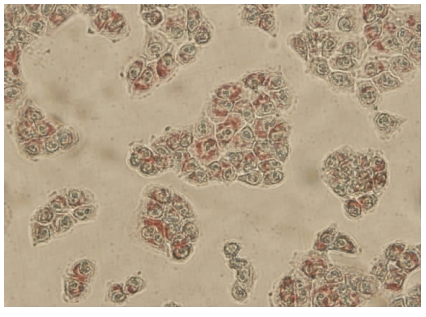
Fig. 1 Effect of different concentrations of PPPs on the steatotic hepatocytes proliferation after 48 h culturation



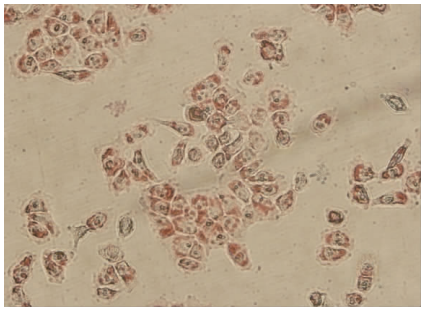
(a) 正常对照组48 h (×100)



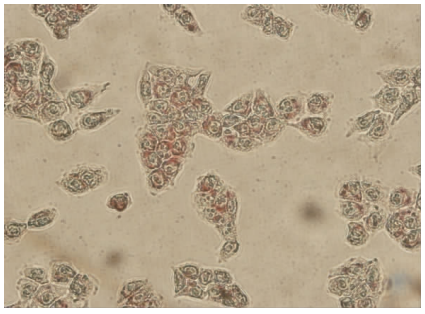
(b) 模型组48 h (×100)



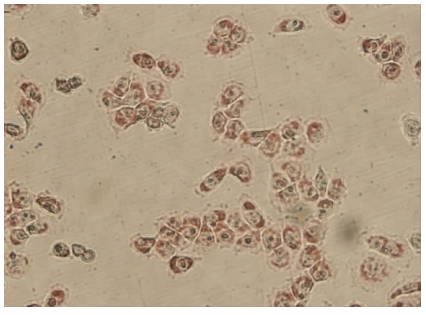
(c) 安石榴苷标品25 mg/L (×100)



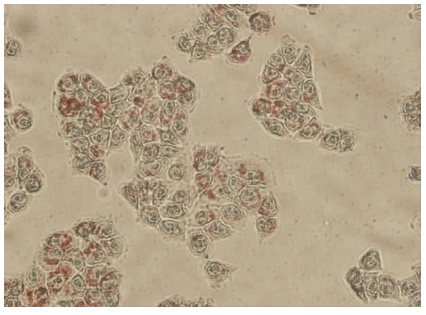
(d) 鞣花酸标品25 mg/L (×100)



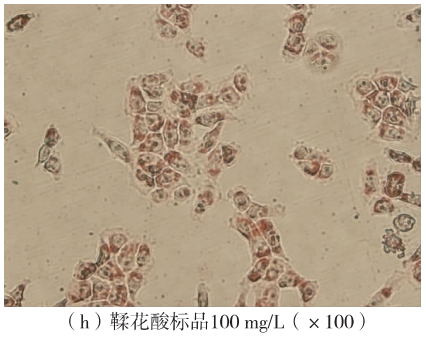
(e) 安石榴苷标品50 mg/L (×100)



(f) 鞣花酸标品50 mg/L (×100)

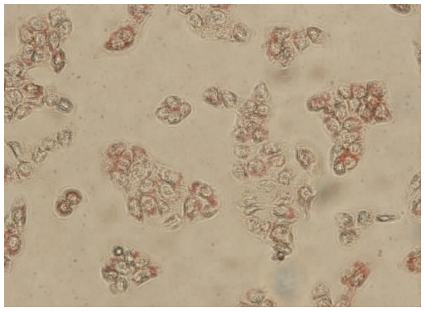


(g) 安石榴苷标品100 mg/L (×100)

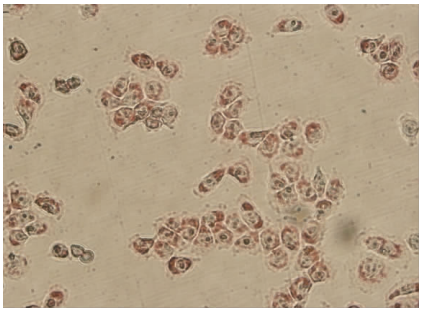


(h) 鞣花酸标品100 mg/L (×100)

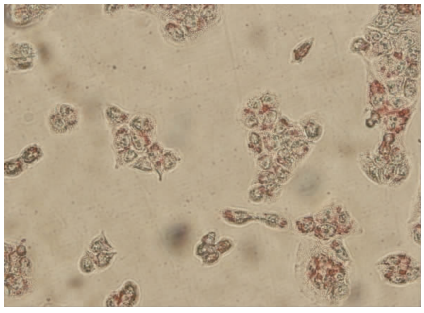
© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



(i)石榴皮多酚纯化物25 mg/L(×100)



(j)石榴皮多酚纯化物50 mg/L(×100)



(k)石榴皮多酚纯化物100 mg/L(×100)

图 2 不同处理后细胞内脂滴形成情况

Fig. 2 Accumulation of lipid droplets in hepatocytes observed by oil red O staining (×100)

2.3 HPLC 定量检测不同处理后细胞内胆固醇含量的变化

由图 4、图 5 结果可见,采用本色谱条件检测效果较好,标准曲线线性相关性良好;由图 6、图 5 结果可知:与正常组相比,模型组可造成细胞内 TC 含量和 CE 百分含量的增加,差异具有显著性;与模型组相比,安石榴苷、鞣花酸和石榴皮多酚纯化物均能减少细胞内 TC 和 CE 含量,并具剂量依赖性,其中 100 μg/mL 安石榴苷降胆固醇作用最明显。

2.4 不同质量浓度的安石榴苷对 HMG-CoA 还原酶活性的影响

由图 7 结果可见,不同处理组与脂变后的 L-02 肝细胞共孵育 48 h 后,HMG-CoA 还原酶活性检测发现:与正常组相比,模型组 HMG-CoA 还原酶活性较强;3 种多酚治疗组与模型组相比,HMG-CoA 还原酶活性减弱,差异具显著性,且呈现出一定的剂量相关性;3 种受试物对HMG-CoA 还原酶活性抑制强弱顺序依次是:安石榴苷标品>石榴皮多酚纯化物>鞣花酸标品,其中质量浓度为 100 μg/mL 的安石榴苷抑制效果最好。

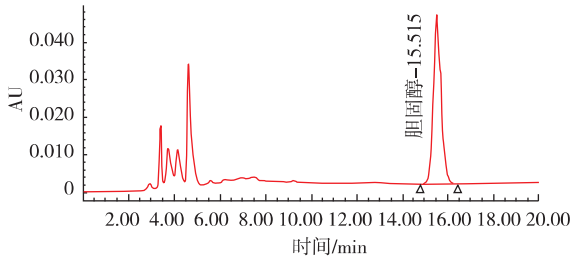


图 3 胆固醇标品(100 mg/L)高效液相检测图

Fig. 3 HPLC detection figure of cholesterol standard product(100 mg/L)

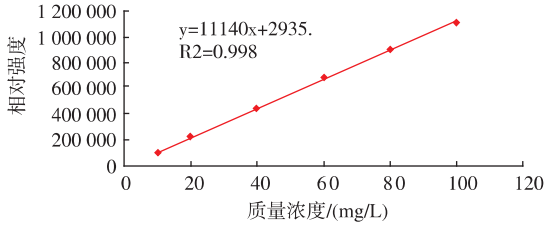


图 4 胆固醇标准曲线

Fig. 4 Standard curve of cholesterol

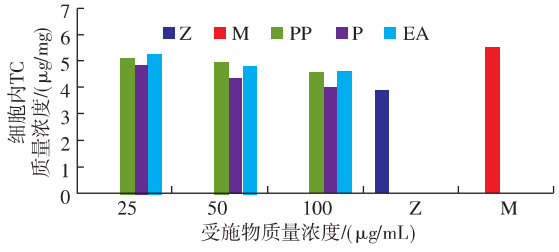


图 5 不同处理对脂变 L-02 肝细胞内 TC 含量的影响

Fig. 5 Affection of intracellular TC from steatotic L-02 hepatocyte in different treatment

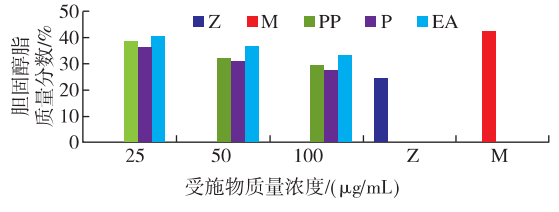


图 6 不同处理对脂变 L-02 肝细胞内胆固醇酯(CE)含量的影响

Fig. 6 Affection of intracellular CE from steatotic L-02 hepatocyte in different treatment

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

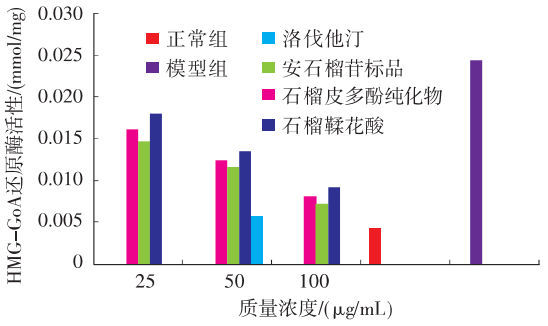


图 7 不同处理对脂变 L-02 肝细胞内 HMG-CoA 还原酶活性的间接影响

Fig. 7 Indirectly inhibition of HMG -CoA reductase activity from steatotic L -02 hepatocyte by different treatment

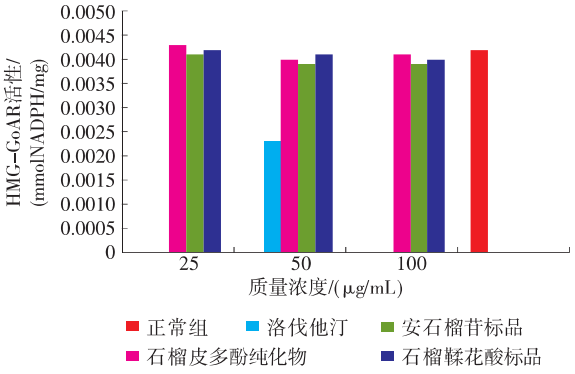


图 8 不同处理对正常 L-02 肝细胞内 HMG-CoA 还原酶活性的直接影响

Fig. 8 Directly inhibition of HMG-CoA reductase activity from normal L -02 hepatocyte by different treatment

由图 8 结果可见,不同处理组与正常 L-02 肝细胞 HMG-CoA 还原酶液直接作用后,各多酚治疗组与正常组相比,HMG-CoA 还原酶活性无明显差异,洛伐他汀治疗组 HMG-CoA 还原酶活性明显降低。

3 讨 论

脂质在肝细胞内的大量堆积会引起肝细胞脂肪变性,这与细胞内胆固醇含量的改变密切相关[15]。胆固醇在细胞内的含量主要受其合成的影响,HMG-CoA 还原酶是胆固醇生物合成的限速酶,因此脂质的堆积所导致的肝细胞脂肪变性可能与 HMG-CoA 还原酶活性提高相关。作者在脂变肝细胞模型的基础上,探究了石榴皮多酚纯化物、安石榴苷标品和石榴皮多酚纯化物对 L-02 肝细胞内胆固醇和胆固醇酯含量的影响,发现 3 种多酚物质均能降低肝细胞内 TC 和 CE 水平,同时通过 HMG-CoA 还原酶活性测定发现,3 种多酚物质均能降低 HMG-CoA 还原酶活性,该抑制作用为非竞争性抑制。Michael S.Brown 等人[16]指出,固醇调节元件结合蛋白质 (sterol-regulatory element binding protein, SREBP) 是参与调节细胞胆固醇代谢的转录激活因子,可参与调节胆固醇合成通路的有关基因如 HMG—CoA 还原酶基因的表达,从而达到对细胞内胆固醇水平的有效调控。石榴皮多酚对 HMG-CoA 还原酶活性的抑制可能是通过细胞信号途径而实现的,其具体的调控途径有待于进一步深入研究。

4 结 语

石榴皮多酚可降低脂变肝细胞内 TC 和 CE 的质量浓度,主要是通过抑制细胞内 HMG-CoA 还原酶活性实现的,该抑制作用为非竞争性抑制。胆固醇质量分数和 HMG-CoA 还原酶活性测定结果表明:安石榴苷降脂作用效果最佳,呈明显的剂量效应关系,安石榴苷是石榴皮多酚中起降血脂的关键成分。

参考文献:

[1] 程霜,郭长江,杨继军,等. 石榴皮多酚提取物降血脂效果的实验研究[J]. 解放军预防医学杂志,2005,3(23):160-163.
CHENG Shuang,GUO Chang-Jiang,YANG Ji-Jun,et al. Experimental study on hypolipidemic effect of polyphenolic extract from pomegranate peel[J]. **Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army**,2005,3(23):160-163.(in Chinese)

[2] 赵艳红,李建科,李国荣. 石榴皮多酚纯化及其抗氧化活性表征[J]. 食品科学,2010,11(31):31-37.
ZHAO Yan-hong,LI Jian-ke,LI Guo-rong. Purification with macroporous adsorbent resins and in vitro antioxidant evaluation of pomegranate peel polyphenols[J]. **Food Science**,2010,11(31):31-37. (in Chinese)

[3] Cerdá B, Llorach R,José J Cerón,et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin,an antioxidant polyphenofrom pomegranate juice[J]. **European Journal of Nutrion**,2003,1(42):18-28

[4] 陈慧梅,廖红,高静. 肝细胞培养方法研究进展[J]. 细胞生物学杂志,2002,3(24):163-166.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

CHEN Hui-mei,LIAO Hong,GAO Jing. The research progress of hepatocyte culture [J]. **Chinese Journal of Coll Biology**, 2002,3(24):163-166.(in Chinese)

[5] **王炳芳,朱韶杰,田培营. 脂肪肝细胞模型的建立及其生物学特性**[J]. **世界华人消化杂志**,2007,15(35):3674-3677.
WANG Bing-Fang,ZHU Shao-Jie,TIAN Pei-Ying. Establishment of a cellular model of non-alcoholic fatty liver and its biological characteristics[J]. **World Chinese Joural of Digestology**,2007,15(35):3674-3677.(in Chinese)

[6] **程少冰,杨钦河,张玉佩,等. 三七总皂甙对脂肪变性** L-02 **肝细胞** TG **含量及** LXRa mRNA **表达的影响**[J]. **中国病理生理杂志**,2010,26(6):1151-1155.
CHENG Shao-bing,YANG Qin-he,ZHANG Yu-pei,et al. The effects of total saponins of panax notoginseng on cholesterol content and the expression of LXRa mRNA in cultured L-02 steatosis hepatocytes[J]. 2010,26(6):1151-1155.(in Chinese)

[7] **朱欣,傅文宇,王晓峰,等. 三丁基锡对** BRL-3A **细胞活力以及凋亡的影响**[J]. **毒理学杂志**,2006,1(20):25-26.
ZHU Xin,FU Wen-yu,WANG Xiao-feng. The effects of Tributyltin on cell viability and apoptosis in BRL-3A cells [J]. **Journal of Toxicology**,2006,1(20):25-26.(in Chinese)

[8] Fiona M Young,Wichaya Phungtamdet,Barbara J S Sanderson. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic eects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line,WIL2NS[J]. **Toxicology in Vitro**,2005,19:1051-1059.

[9] **田玉旺,李琳,李丽,等. 介绍一种改良的油红** O **脂肪染色法**[J]. **中国组织化学与细胞化学杂志**,2007,6(16):736.
TIAN Yu-wang,Li-ling,LI Li,et al. A modified method on fat stain with oil red O staining [J]. **Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry**,2007,6(16):736.(in Chinese)

[10] **邹凤平,熊鸣,余琼卫,等. 高效液相色谱检测巨噬细胞内胆固醇的研究**[J]. **分析科学学报**,2007,6(23):647-650.
ZOU Feng-ping,XIONG Ming,YU Qiong-wei,et al. Determination of cholesterol in monocyte-derived macrophages by high performance liquid chromatography[J]. **Journal of Analytical Science**,2007,6(23):647-650.(in Chinese)

[11] Vercaemst R,Union A,Rosseneu M,et al. Quantitation of plasma free cholesterol and cholesteryl esters by high performance liquid chromatography Study of a normal population[J]. **Atherosclerosis**,1998,78:245-250.

[12] **罗春梅. 多廿醇对** 3-**羟基-**3-**甲基戊二酰辅酶** A **还原酶活性的抑制作用研究**[D]. **南宁:广西医科大学**,2007.

[13] Roberto Menendez,Ana Ma Amor,Idania Rodeiro,et al. Policosanol modulates HMG-CoA reductase activity in cultured fibroblasts[J]. **Archives of Medical Research**,2001,32:8-12.

[14] Simonetta Oliaro-Bosso,Emanuela Calcio Gaudino,Stefano Mantegna,et al. Regulation of HMGCoA reductase activity by policosanol and octacosadienol,a new synthetic analogue of octacosanol[J]. **Lipids**,2009,44:907-916.

[15] **田艳,范竹萍,邱德凯,等. 脂肪变性对肝细胞胆固醇代谢的影响**[J]. **世界华人消化杂志**,2008,16(10):1031-1036.
TIAN Yan,FAN Zhu-ping,QIU De-kai,et al. Cholesterol metabolism in cultured steatotic hepatocytes [J]. **World Chinese Journal of Digestology**,2008,16(10):1031-1036.(in Chinese)

[16] Michael S Brown,Joseph L Goldstein. The SREBP Pathway:Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor[J]. **Cell**,1997,89:331-340.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net