

本文引用:张雨林,谭洋,詹济华,满兴战,李雪,裴刚.芦笋提取物抗氧化和抑制3T3-L1前脂肪细胞分化活性研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(1):27-30.

芦笋提取物抗氧化和抑制3T3-L1前脂肪细胞分化活性研究

张雨林,谭洋,詹济华,满兴战,李雪,裴刚*
(湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 研究芦笋提取物的抗氧化能力和抑制3T3-L1前脂肪细胞分化的活性。**方法** 采用乙醇回流提取,通过酸碱处理,制备得到芦笋提取物;利用紫外分光光度法测定提取物中的酚酸含量(以没食子酸计);采用DPPH法测定提取物清除自由基的活性;通过CCK8法及油红O染色法分别检测芦笋提取物对3T3-L1前脂肪细胞存活率及分化率的影响。**结果** 芦笋提取物中以没食子酸计的酚酸含量为0.5308 mg/mg;测得提取物清除自由基活性强弱与剂量成正相关,当其浓度达到2 mg/mL时,其对DPPH的清除率可达89.68%;在10~200 μg/mL的测定浓度范围内,提取物对3T3-L1细胞生存率无明显影响,对3T3-L1细胞的分化有明显抑制作用,且呈剂量依赖性。**结论** 芦笋提取物具有较好清除自由基的活性,且活性强弱呈剂量依赖关系;芦笋提取物具有抑制前脂肪细胞分化的能力,且随剂量升高而增大。

[关键词] 芦笋;酚酸;抗氧化;3T3-L1前脂肪细胞

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.01.007

Study of the Activities of Antioxidant and Inhibiting Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes of the Extract from *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud

ZHANG Yulin, TAN Yang, ZHAN Jihua, MAN Xingzhan, LI Xue, PEI Gang*

(School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the activities of antioxidant and inhibiting differentiation of 3T3-L1 preadipocytes of *Lusun* [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud] extract. **Methods** The *Lusun* extract was prepared by using ethanol reflux extraction and acid and alkali treatment. The content of phenolic acid of the extract was measured by UV spectrophotometry. The activity of free radical scavenging of extract was measured by using DPPH method. The effects of the extract on the survival rate and differentiation rate of 3T3-L1 preadipocytes were detected by CCK8 and oil red O staining. **Results** The content of phenolic acid in the *Lusun* extract was 0.5308 mg/mg calculated by gallic acid. The activity of scavenging free radicals of *Lusun* extract has positive correlation with dose, the DPPH removal rate was 89.68% when the concentration reached 2 mg/mL. The *Lusun* extract at the concentration of 10~200 μg/mL had no significant effect on the survival rate of 3T3-L1 cells, and had obvious inhibiting effect on the differentiation of 3T3-L1 cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** The *Lusun* extract has significant scavenging free radical activity and have remarkable inhibition effect on 3T3-L1 cells proliferation, and the activities increase with the dose.

[Keywords] *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud; phenolic acid; antioxidation; 3T3-L1 preadipocytes

[收稿日期] 2017-06-05

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目(16K064);长沙市科技局资助项目(kq1602015);湖南省芦笋研究开发中心芦笋产业联合研究开发基金。

[作者简介] 张雨林,女,在读硕士研究生,研究方向:天然产物研究与开发。

[通讯作者] *裴刚,男,教授,博士研究生导师,peigang@hotmail.com。

芦笋为禾本科植物芦苇 [*phragmites communis* (Cav.) Trin. ex Steud]的嫩芽,又名南荻,广泛分布于洞庭湖及其下游。研究显示,芦笋中含有丰富的黄酮、氨基酸、矿质元素、膳食纤维等活性成分^[1-2],长期服用有降脂轻身的功效^[3],但有关其降脂的物质基础和机制研究还没有系统研究。

文献显示,许多具有降脂功效的植物如石榴、茶叶、葡萄、苹果、山楂等均含有较高的酚酸成分^[4-5]。3T3-L1 前脂肪细胞是目前研究脂肪代谢紊乱疾病最广泛的一种细胞系^[6],且细胞氧化应激反应可造成前脂肪细胞功能障碍^[7-8]。因此,本文对芦笋提取物中酚酸含量进行测定,并对其抗氧化活性及抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化的能力进行研究。

1 实验材料

芦笋于 2016 年 4 月采自湖南省沅江市,经湖南中医药大学中药教研室肖锦仁副教授鉴定为禾本科芦苇属植物芦苇的嫩芽,标本现保存于湖南中医药大学中药化学教研室,编号:20160411;蒸馏水为自制,其余试剂均为分析纯。没食子酸(中国药品生物制品检定所,批号 110831-200803),磷钼钨酸试液(厦门海标科技有限公司),Vitamin C(Solarbio 公司,批号 305D039),3T3-L1 前脂肪细胞(长沙维尔生物科技有限公司),DMEM 高糖培养基(HYCLONE 公司,批号 AB10110957),PBS(HYCLONE 公司,批号 AC10209969),新生牛血清(gibco 公司,批号 42G4350G),细胞增殖与毒性检测试剂盒(CCK8,七海生物,批号 20161106),胎牛血清(gibco 公司,批号 42G5550K),地塞米松(美仑生物,批号 MB1295),3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx,上海EKEAR 公司,批号 EKKS1172),分化诱导剂胰岛素(Solarbio 公司,批号 601C022),油红 O(Sigma 公司,批号 313B0513)。

2 实验方法

2.1 芦笋提取物的制备

取干燥芦笋 2 kg,加 10 倍体积 70%乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压回收溶剂至无醇味,置于蒸发皿中浓缩得浸膏 324 g。向芦笋浸膏中加入 1 200 mL 水搅散得浓缩液,加入 1% NaOH 溶液调 pH 至 10,静置 30 min,4 000 r/min 离心 15 min,弃去不溶物沉淀。上层液体加入稀 HCl 调 pH 至 3,再加入乙酸乙酯反复萃取至水层多酚检识反应为阴性。取有机层,回收溶剂,蒸干,得

芦笋提取物 25.5 g。

2.2 芦笋提取物中酚酸含量的测定^[9]

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品 5 mg,置于 50 mL 棕色容量瓶中,加 15%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,使没食子酸标准品浓度为 0.1 mg/mL。

2.2.2 供试样品溶液的制备 精密称取芦笋提取物 2.5 mg,置于 25 mL 棕色容量瓶中,加 15%甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,使芦笋样品浓度为 0.1 mg/mL。

2.2.3 标准曲线的测定 精密量取对照品溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置于 25 mL 棕色容量瓶中,各加入磷钼钨酸试液 0.5 mL 再分别加蒸馏水 12.5、11.5、10.5、9.5、8.5、7.5 mL,加 29%碳酸钠溶液至刻度,摇匀,放置 30 min 后,于 760 nm 的波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,没食子酸质量为横坐标,绘制标准曲线,得 $y=62.707x+0.0716$ ($r=0.9990$),表明当没食子酸的质量在 0.1~0.6 mg 时,其与吸光度线性关系较好。

2.2.4 酚酸的含量测定 取对照品溶液,按照“2.2.3”项的操作,测量芦笋提取物中以没食子酸计的酚酸含量。

2.3 芦笋提取物清除自由基活性测定^[10]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取 Vitamin C 20 mg,加入 40%乙醇溶解,并定容至 10 mL,采用二倍稀释法,稀释 5 次,共得到 0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.00 0、2.00 0 mg/mL 6 个不同浓度的标准品溶液。

2.3.2 供试样品溶液的制备 精密称取芦笋提取物 20 mg,加入 40%乙醇溶解,并定容至 10 mL,采用二倍稀释法,稀释 5 次,共得到 0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.00 0、2.00 0 mg/mL 6 个不同浓度的样品溶液。

2.3.3 清除率测定 移取 0.5 mL 不同浓度的样品溶液和 2.5 mL 0.004% DPPH 溶液(70%乙醇溶液溶解),混匀,放置 20 min,在 517 nm 处测定吸光度 A_i ;移取 0.5 mL 空白溶剂和 2.5 mL DPPH 溶液,在同等条件下测定吸光度 A_o ;移取 0.5 mL 不同浓度的样品溶液和 2.5 mL DPPH 溶液,在同等条件下测定吸光度 A_j ,每个值均平行测定 3 次。计算各浓度样品的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \{1 - [(A_i - A_j) / A_o]\} \times 100\%$$

2.4 3T3-L1 前体脂肪细胞实验^[11]

2.4.1 CCK8 法测定细胞存活率 3T3-L1 前脂肪细胞置于 37 ℃、5% CO₂、100%湿度的培养箱中用普通培养基 (10%新生牛血清 DMEM 高糖培养基) 培养, 根据细胞数量传代。将处于对数生长期的 3T3-L1 前脂肪细胞接种于 96 孔板, 每孔 200 μL, 细胞数约 10⁵ 个/孔, 待细胞贴壁完全后, 加入不同浓度的芦笋提取物样品溶液 10 μL (10、20、50、100、150、200 μg/mL)。设置不加细胞空白对照组和阴性对照, 每个浓度平行 6 个复孔。培养 24 h 后, 加入 CCK8 10 μL, 30 min 后用酶标仪读取 450 nm 的吸光度值。通过以下公式计算存活率。

存活率(%)=[A(样品)-A(空白对照)]/[A(阴性对照)-A(空白对照)]×100%

2.4.2 油红 O 染色与分化率测定 将处于生长对数期细胞接种于 96 孔板, 细胞密度约为 10⁵ 个/孔, 待细胞贴壁后 24 h, 培养基换成分化培养基 (10%胎牛血清 DMEM 高糖培养基、10 μg/mL 胰岛素、1 μmol/L 地塞米松和 0.5 μmol IBMX) 48 h 后换成维持培养基 (10%胎牛血清 DMEM 高糖培养基、10 μg/mL 胰岛素) 24 h 换 1 次培养液。待细胞贴壁完全后, 加入不同浓度 (10、20、50、100、150、200 μg/mL) 的芦笋提取物样品溶液 10 μL, 每组各设 6 个复孔。按照分化的方法, 诱导分化。完成后, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 油红 O 染色 30 min, 弃去油红溶液, PBS 洗 2 次, 显微镜下观察并拍照。用异丙醇处理细胞 15 min, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度, 定量分析细胞的分化程度。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 21.0 对所测数据进行处理, 试验结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示 d, 采用单因素方差分析检测组间差异。

3 实验结果

3.1 酚酸含量测定实验

使用紫外分光光度法测量, 得到芦笋提取物中以没食子酸计的酚酸含量为 0.530 8 mg/mg。

3.2 清除自由基实验

按照“2.3”项操作, 对样品进行清除自由基活性的测定, 结果如图 1 所示。

3.3 3T3-L1 前脂肪细胞实验

芦笋提取物处理 24 h 后 3T3-L1 细胞的存活率如图 2。在测定的浓度范围内, 芦笋提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞的生存率影响较小。芦笋提取物

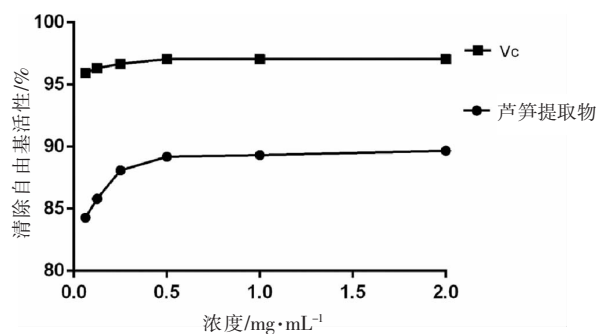


图 1 芦笋提取物和 Vitamin C 清除自由基活性折线图

处理 24 h 后诱导分化的 3T3-L1 细胞的分化率, 随着芦笋提取物浓度的增加而逐渐降低, 见图 3。说明在测定的浓度范围内, 芦笋提取物对 3T3-L1 细胞的分化有明显抑制作用, 并随浓度增加, 抑制分化作用增强。

正常的 3T3-L1 前脂肪细胞呈纤维母细胞形态, 为贴壁生长的梭型, 体积小, 细胞间质少, 胞浆中无油脂滴 (图 4A)。分化后的 3T3-L1 细胞, 细胞变大, 变圆, 细胞内脂滴明显 (图 4C)。未加芦笋提取物的空白组比加了芦笋提取物组的 3T3-L1 细胞分化更明显, 细胞形态更大, 且脂滴数目更多 (图 4B-E)。证明芦笋提取物有抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化的作用。

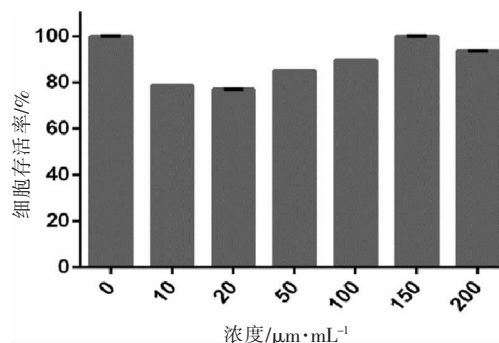
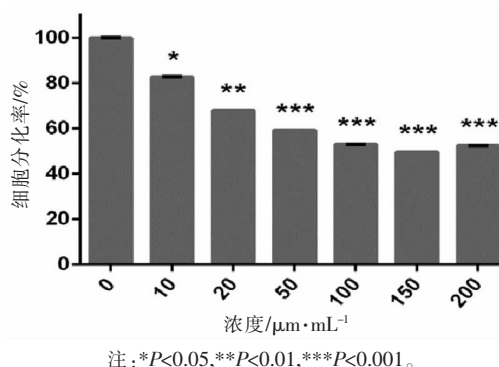


图 2 芦笋提取物处理 3T3-L1 细胞存活率



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 芦笋提取物处理后 3T3-L1 细胞分化率

4 讨论

众所周知, 脂肪细胞的数目增多和体积增大这

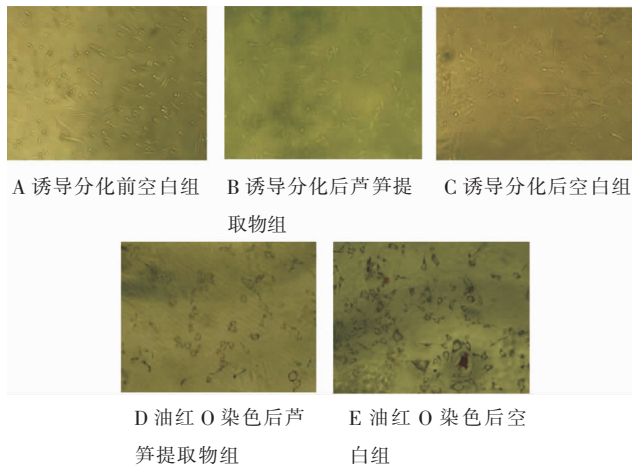


图4 3T3-L1细胞形态对比图($\times 20$)

两个过程是导致肥胖的关键,而前体脂肪细胞的增殖和分化则分别与这两个过程密切相关^[12],脂肪细胞的分化是指由前脂肪细胞转变为成熟脂肪细胞的过程,脂肪分化异常或过度分化将导致脂质囤积,因此可以从是否能适当控制前体脂肪分化入手探究芦笋提取物降脂活性?研究发现,活性氧簇(ROS)、过氧化氢(H_2O_2)可通过下调CCAAT/增强子结合蛋白 α (CCAAT, C/EBP α)及过氧化物酶体增殖激活受体C(PPARC)的表达,抑制3T3-L1脂肪细胞脂联素(AD)的表达^[7]。还有实验表明,过氧化氢类似物t-BHP可剂量依赖性的降低AD而增加单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、1型纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)mRNA的表达^[8]。王映梅^[13]等研究发现, H_2O_2 可能通过多条信号转导通路,实现对3T3-L1脂肪细胞PAI-1、细胞白介素6(IL-6)因子的上调。其中AD是肥胖及其并发症的负相关因子,可通过激活AMP激活的蛋白激酶促进脂肪酸的氧化,减少脂质积累^[14];MCP-1、PAI-1、IL-6都是介导脂肪细胞炎症反应的作用因子。因此,ROS、 H_2O_2 等氧化因子可通过抑制AD、上调MCP-1、PAI-1、IL-6等细胞因子介导脂肪细胞炎症反应的产生,造成前脂肪细胞异常分化,形成脂质积累。由上,基于研究芦笋提取物抗氧化活性对3T3-L1脂肪细胞的影响,本研究对芦笋提取物的抗氧化活性进行了检测。

在本次研究中,确定了该芦笋提取物中酚酸以没食子酸计的含量为0.530 8 mg/mg。通过抗氧化实验发现芦笋提取物具有较好的清除自由基活性,且活性强弱呈剂量依赖关系,当其浓度达到

2 mg/mL时,其对DPPH的清除率可达89.68%,与Vitamin C的抗氧化活性相当。且在3T3-L1细胞实验中,细胞存活率实验证实测量浓度内芦笋提取物对前脂肪细胞无细胞毒性,在分化率试验中,图3可以明显观察到芦笋提取物样品组的细胞分化程度明显低于空白组,图2B显示芦笋提取物对3T3-L1细胞的分化有明显抑制作用,且呈剂量依赖性。

通过本阶段的实验,确定了芦笋提取物的酚酸含量,证实提取物具有较强的抗氧化活性,且可明显抑制3T3-L1前脂肪细胞的增殖分化,为后期物质基础和作用机制研究奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] 肖骏玖,赵玲艳,石星波,等.洞庭湖区南荻嫩茎营养成分分析与重金属含量测定[J].食品科学,2015,36(12):104-107.
- [2] 余晓红,朱雪梅,李凤伟,等.芦苇叶黄酮类提取物体内体外抗氧化性研究[J].食品科学,2015,36(1):209-213.
- [3] 甘泉,路锋,侯恩太,等.芦苇药理学研究概况[J].安徽农业科学,2010,38(15):7878-7879.
- [4] 高航,徐虹.植物多酚抗肥胖作用的研究进展[J].食品科学,2014,35(21):334-338.
- [5] SERGENT T, VANDERSTRAETEN J, WINAND J, et al. Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances[J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 68-73.
- [6] 杨昕,杨继红.3T3-L1前脂肪细胞与肥胖的相关性研究进展[J].中国民族民间医药,2011,20(22):19-20.
- [7] 陈宝堂,魏经国,王玮,等.氧自由基对脂肪细胞中脂联素表达的下调作用[J].心脏杂志,2008,20(2):142-146.
- [8] 张秀娟,王丽静,刘小莺,等.氧化应激对3T3-L1脂肪细胞MCP-1、PAI-1、脂联素表达的影响[J].福建医科大学学报,2012,46(1):1-6.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].一部.北京:中国医药科技出版社,2015.
- [10] 裴刚,胡乔铭,向德标,等.二角菱壳和四角菱壳不同提取物抗氧化能力比较研究[J].中国药物经济学,2013(S1):225-226.
- [11] 冷银芝.低剂量双酚A通过PPAR γ 促进小鼠3T3-L1前脂肪细胞分化的研究[D].合肥:安徽医科大学,2016.
- [12] 陈粉粉,张立杰,张利红,等.EGCG对猪前体脂肪细胞增殖和分化的作用[J].动物学报,2006,52(6):1119-1124.
- [13] 王映梅,曲萍,铁茹,等.氧自由基增强脂肪细胞IL-6表达的实验研究[J].陕西医学杂志,2010,39(2):146-149.
- [14] 朱剑.白藜芦醇对3T3-L1前脂肪细胞成脂分化以及TNF- α 诱导的脂肪因子表达的影响[D].南京:南京医科大学,2008.

(本文编辑 苏维)