

## 栾树籽油对非酒精性脂肪肝的保护作用

郑 蕾<sup>1,2</sup>, 李欣禹<sup>1</sup>, 杨文涛<sup>1</sup>, 张存劳<sup>1</sup>, 郭建博<sup>2,3</sup>, 徐 玥<sup>1,2</sup>

(1. 西安医学院 药学院, 西安 710021; 2. 陕西省食品药品安全监测重点实验室, 西安 710065;  
3. 陕西省食品药品监督检验研究院, 西安 710065)

**摘要:** 为了促进栾树资源的开发和利用, 通过体外细胞实验和体内动物实验研究了栾树籽油对非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 的保护作用。体外实验采用游离脂肪酸 (FFA) 诱导人正常肝细胞系 Lo-2, 建立 NAFLD 细胞模型, 观察栾树籽油的干预对 Lo-2 细胞脂肪变性以及甘油三酯 (TG) 含量的影响, 观察栾树籽油对 NAFLD 细胞脂质堆积的影响。体内实验采用高脂饲料饲养诱导建立 NAFLD 小鼠模型, 造模成功后连续灌胃给药 7 d, 取小鼠血清、肝脏组织, 观察肝脏组织病理学, 检测血清及肝脏组织总胆固醇 (TC)、TG、谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 水平, 探讨栾树籽油对 NAFLD 小鼠肝脏的保护作用。结果显示: 通过 FFA 诱导 Lo-2 建立 NAFLD 细胞模型, 栾树籽油干预 NAFLD 细胞 24 h 后, Lo-2 细胞增殖能力增强, 显示出一定的细胞保护能力, 油红 O 染色结果表明栾树籽油能显著减少 FFA 诱导的 Lo-2 细胞内脂质堆积, 降低 TG 的含量, 且呈剂量依赖性; NAFLD 小鼠实验表明栾树籽油具有降低血脂、改善脂质沉积和保护肝脏的作用。综上, 体内外实验均证明栾树籽油可减少细胞内脂质的积累, 从而达到降脂效果。

**关键词:** 栾树籽油; 非酒精性脂肪肝; Lo-2; 降脂护肝

中图分类号: TS225.1; Q591.5 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)08-0074-05

## Protection effect of *Koelreuteria paniculata* seed oil on non-alcoholic fatty liver disease

ZHENG Lei<sup>1,2</sup>, LI Xinyu<sup>1</sup>, YANG Wentao<sup>1</sup>, ZHANG Cunlao<sup>1</sup>,  
GUO Jianbo<sup>2,3</sup>, XU Yue<sup>1,2</sup>

(1. College of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Shaanxi Provincial Key Laboratory of Food and Drug Safety Monitoring, Xi'an 710065, China; 3. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China)

**Abstract:** In order to promote the development and utilization of *Koelreuteria paniculata* plant resources, the protection effect of *Koelreuteria paniculata* seed oil against non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) was investigated through in vitro cellular experiments and in vivo animal experiments. In vitro experiments were conducted using free fatty acid (FFA)-induced human hepatocytes (Lo-2) to establish a NAFLD cell model to observe the effects of *Koelreuteria paniculata* seed oil intervention on steatosis and triglyceride (TG) content in Lo-2 cells, and to observe the effect of *Koelreuteria paniculata* seed oil on lipid accumulation in the NAFLD cell model. Through in vivo experiments, a mice model of NAFLD was established using high-fat diet feeding. After successful modelling, the mice were administered continuously with *Koelreuteria paniculata* seed oil by gavage for 7 d. Serum and liver tissues

收稿日期: 2023-05-19; 修回日期: 2023-06-16

基金项目: 教育部“春晖计划”合作科研项目(14); 陕西省科技厅项目(2021SF-390)

作者简介: 郑 蕾(1985), 女, 副教授, 博士, 研究方向为中药物质基础(E-mail) zhenglei@xiyi.edu.cn。

通信作者: 徐 玥, 副教授(E-mail) xuy@xiyi.edu.cn。

of the mice were collected to observe liver histopathology, and the levels of total cholesterol (TC), TG, glutamic transaminase (AST) and glutamic aminotransferase (ALT) were measured to investigate the hepatoprotective effects of *Koelreuteria paniculata* seed oil on mice with

NAFLD. The results showed that NAFLD cell models were established by FFA induction of Lo-2, and after *Koelreuteria paniculata* seed oil intervened in the model cells for 24 h, the proliferation ability of Lo-2 cells was enhanced and they showed certain cytoprotective ability. The results of oil red O staining showed that *Koelreuteria paniculata* seed oil could significantly reduce the accumulation of lipids in FFA-induced Lo-2 cells and lower the content of TG, and the effect was concentration-dependent. Experiments on NAFLD mice showed that *Koelreuteria paniculata* seed oil could lower blood lipids, improve lipid accumulation, and protect the liver. In conclusion, from in vivo and in vitro experiments, *Koelreuteria paniculata* seed oil can reduce the accumulation of intracellular lipids, thus achieving a lipid-lowering effect.

**Key words:** *Koelreuteria paniculata* seed oil; NAFLD; Lo-2; lowering lipid and protecting liver

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是一种由于脂肪沉积于肝细胞而造成的疾病, 可引起进行性肝组织损伤, 从单纯脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎, 可迅速发展为晚期肝纤维化, 导致肝硬化。NAFLD 与肥胖、2 型糖尿病、高血压和血脂异常有关, 是代谢综合征的肝脏表现。膳食脂肪酸 (FFA) 参与肝脂肪的生成, 并可能在肝脂肪变性的发病机制中发挥双重作用, 表现在它们或参与肝脂肪的发展, 或防止或逆转肝脂肪积累<sup>[1-3]</sup>。因此, 饮食中的脂肪酸组成是 NAFLD 发展的重要影响因素。

栾树 (*Koelreuteria bipinnata* Franch.) 是无患子科 (Sapindaceae) 栾树属 (*Koelreuteria*) 植物, 又名灯笼树, 在我国大部分地区均有野生分布<sup>[4]</sup>, 其生长速度快, 树形高大, 枝叶繁茂, 顶生圆锥花序, 春季新叶红色, 夏季开满黄花, 秋季叶色变黄, 蒴果期膜质果皮膨大, 颜色紫红, 形似灯笼, 花果艳丽, 具有较高的观赏价值, 属于园林绿化当中的优良树种<sup>[5-6]</sup>。此外, 栾树对石灰岩山地具有较强适应性, 对于帮助石漠化地区植被重建以及土壤污染治理均具有极高的生态价值<sup>[7]</sup>。栾树籽产量高, 其种仁中含有油脂和蛋白质, 栾树籽油中富含花生一烯酸、油酸和亚油酸, 具有一定的利用价值<sup>[8-9]</sup>。本课题组通过网络药理学已经预测栾树籽油治疗脂肪肝具有多成分、多靶点、多通路的作用特点, 揭示了可能的药效物质和作用机制<sup>[10]</sup>。

本文以栾树籽油为研究对象, 首次从体外细胞实验和体内动物实验两方面, 建立 NAFLD 细胞和动物模型, 考察栾树籽油对 NAFLD 的保护作用, 以期为进一步促进栾树资源的开发和综合利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

栾树籽油, 由陕西省西安市未央区西安医学院校区采集的饱满的栾树籽压榨制得。人正常肝细胞

系 Lo-2, 由中国科学院上海细胞生物研究所提供, 在含 10% 胎牛血清的培养基中置于 37℃ 培养箱中进行培养, 隔天传代 1 次。雄性昆明小鼠 30 只, 饲养于西安医学院基础研究所 SPF 级实验动物室屏障环境, 实验动物使用许可证号为 SYXK (陕) 2022-004。

RPMI Medium Modified 1640 培养基、RIPA 裂解液, 赛默飞世尔生物制品北京有限公司; 胎牛血清, ExCell Bio 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), Sigma 公司; 二甲基亚砷 (DMSO)、棕榈酸钠 (PA), Aladdin 公司; 胰酶细胞消化液, Biosharp 公司; 青链霉素混合液, Servicebio 公司; 油酸钠 (OA), 源叶生物有限公司; 改良油红 O 染色试剂盒, Solarbio 公司; 总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

AX224ZH 电子天平, 奥豪斯仪器 (上海) 有限公司; CJ-2S 双人双面 (垂直) 净化工作台, 天津泰斯特仪器有限公司; Thermo 3111 二氧化碳培养箱, Olympus 公司; 1530 自动全波长酶标仪, Thermo Scientific 公司; TDL-40B 离心机, 上海安亭科学仪器厂; 移液器, Eppendorf 公司; 96 孔板, Nest Biotechnology 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 栾树籽油对 NAFLD 细胞的影响

##### 1.2.1.1 体外 NAFLD 细胞模型建立及干预

经预实验, 以质量分数 5% 牛血清白蛋白溶液 (BSA) 作为脂肪酸的结合试剂。将油酸钠与棕榈酸钠以质量比 2:1 混合后, 溶于质量分数 5% 的 BSA 溶液中, 作为脂肪酸造模剂以诱导 Lo-2 建立 NAFLD 细胞模型, 最终确定脂肪酸造模剂的浓度为 1 mmol/L。

取对数生长期的 Lo-2 细胞接种于 96 孔板中

(RPMI Medium Modified 1640 培养基),置于 37℃、含 5% (体积分数) CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,待细胞贴壁后,除空白组外,均加入 1 mmol/L 的脂肪酸造模剂,培养 24 h 以造模。将造模成功的 NAFLD 细胞分为模型组和栲树籽油组,栲树籽油组加入不同量的栲树籽油(加量以最终每单位细胞培养液体系中的栲树籽油体积计),空白组、模型组和栲树籽油组均继续培养 24 h 后检测相关指标。

#### 1.2.1.2 MTT 法检测 NAFLD 细胞存活率

向按 1.2.1.1 方法得到的空白组、模型组和栲树籽油组中避光加入 MTT,于 37℃ 避光培养 4 h,将孔内液体吸干,加入 DMSO 并振荡 15 min,使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度。按式(1)计算细胞存活率( $Y$ )。

$$Y = (A_1 - A_0) / (A_2 - A_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中: $A_1$  为各实验组的吸光度; $A_0$  为空白孔(板底值)的吸光度; $A_2$  为空白组的吸光度。

#### 1.2.1.3 油红 O 染色

将待分析的细胞中培养液弃去,PBS 洗涤 2~3 次;用质量浓度 4 g/100 mL 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤 2~3 次;再用油红 O 染色 30 min,体积分数 60% 的异丙醇分化 30~60 s,PBS 洗涤 2~3 次;镜下观察细胞内红色脂滴,拍照记录。

#### 1.2.1.4 TG 含量测定

将待分析的细胞中培养液弃去,PBS 洗涤 2~3 次,用胰酶细胞消化液消化后,收集细胞,以 1 000 r/min 离心 3 min,用 PBS 洗涤沉淀 2 次,以 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min 后,按 TG 测定试剂盒要求进行检测。

### 1.2.2 栲树籽油对 NAFLD 小鼠的影响

#### 1.2.2.1 NAFLD 小鼠模型的建立及给药

小鼠在温度 22~25℃、相对湿度 50%~70%、12 h/12 h 明暗交替下适应性饲养 1 周,期间小鼠自由进食饮水。将小鼠随机分为空白组和造模组,空白组 10 只全程饲喂基础饲料,造模组 20 只给予高脂饲料(配方为 60% 基础饲料、1% 胆固醇、18% 蛋黄粉、20% 猪油、1% 猪胆盐),喂养 10 周造模(经预实验,通过尾取血测定血脂水平,判断 NAFLD 造模成功)。将造模成功的小鼠随机分为模型组和栲树籽油组,每组 10 只,给药剂量参考前期预实验结果,栲树籽油组灌胃给予 0.1 mL/10 g,空白组和模型组灌胃给予等量生理盐水,连续给药 7 d,每天记录体质量和进食饮水变化情况。

#### 1.2.2.2 血清处理及 TC、TG、ALT、AST 检测

小鼠给药完毕后眼球取血,静置 0.5 h 后以

3 000 r/min 离心 10 min,取上清液按测定试剂盒要求检测血清 TC、TG、ALT、AST。

#### 1.2.2.3 肝脏处理及肝指数测定

小鼠给药完毕后立即处死并迅速摘除完整肝脏,滤纸吸干肝脏表面液体,称取质量。右肝纵切 1/2,用质量浓度 4 g/100 mL 的多聚甲醛固定,剩余肝组织用生理盐水冲洗后迅速冻存。按式(2)计算肝指数( $I$ )。

$$I = m_1 / m_2 \times 100\% \quad (2)$$

式中: $m_1$  为肝脏质量,g; $m_2$  为小鼠体质量,g。

#### 1.2.2.4 脂肪肝病理诊断标准

取固定后的肝脏组织,切取 10 mm × 10 mm 大小,依次脱水、染色(HE 染色)、拍照,分析肝脏组织结构病理变化。

#### 1.2.2.5 肝脏组织 TC、TG、ALT、AST 测定

取 100 mg 肝脏组织加 1 mL 生理盐水,研磨匀浆,按测定试剂盒要求检测 TC、TG、ALT、AST。

### 1.2.3 数据处理

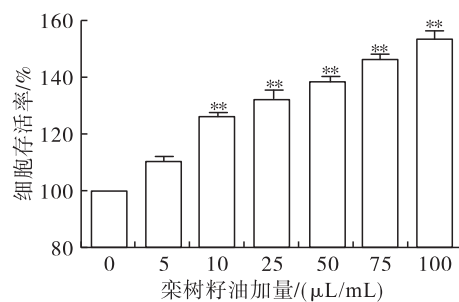
采用 SPSS 统计学软件处理,实验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间均数的比较采用  $t$  检验,组间两两比较采用  $q$  检验, $p < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 栲树籽油对 NAFLD 细胞的保护作用

#### 2.1.1 栲树籽油对 Lo-2 细胞活性的影响

正常 Lo-2 细胞加栲树籽油培养 24 h,再按 1.2.1.2 方法检测细胞存活率,考察栲树籽油干预对 Lo-2 细胞存活率的影响,结果如图 1 所示。



注:未加栲树籽油时的细胞存活率以 100% 计;\*\*表示与未加栲树籽油比较  $p < 0.01$ 。下同

图 1 栲树籽油干预对 Lo-2 细胞存活率的影响

由图 1 可知,Lo-2 细胞存活率随着栲树籽油加量的增加而增加。在 0~100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  范围内,栲树籽油对 Lo-2 细胞表现出一定的增殖作用,表明栲树籽油可能具有促进肝脏修复和再生的潜能。

#### 2.1.2 栲树籽油对 NAFLD 细胞活性的影响

按 1.2.1.1 和 1.2.1.2 方法,考察栲树籽油干预对 NAFLD 细胞存活率的影响,结果如图 2 所示。

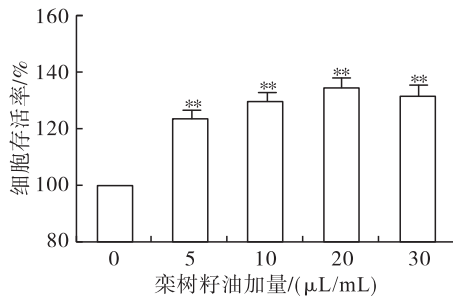


图2 栳树籽油干预对NAFLD细胞存活率的影响

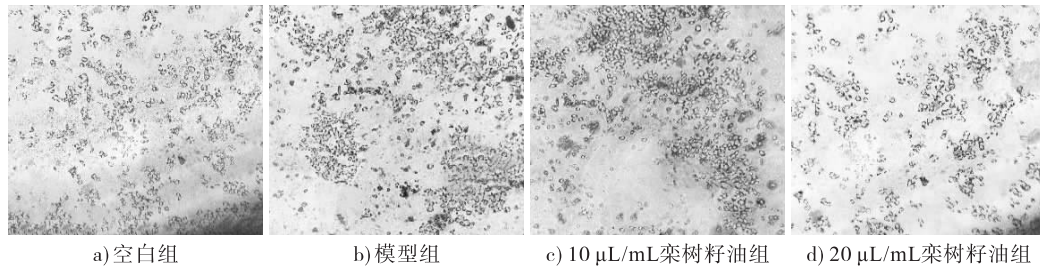


图3 Lo-2细胞油红O染色图(100×)

由图3可知,空白组细胞整体呈透明状态,几乎没有脂质堆积,而NAFLD模型组细胞内可见明显红色脂滴形成,加入10 μL/mL栳树籽油时,其细胞内红色脂滴有一定的减少,加入20 μL/mL栳树籽油时,其细胞内红色脂滴明显减少,说明栳树籽油可以在一定程度上减少游离脂肪酸诱导的细胞内脂滴的形成。

#### 2.1.4 栳树籽油对Lo-2细胞TG含量的影响

肝脏细胞从血液中吸收游离脂肪酸和内源性合成的脂肪酸,最终会以TG的形式存储,当TG在肝脏细胞内过度积累将会导致NAFLD的发生。栳树籽油干预对NAFLD细胞内TG含量的影响如表1所示。

表1 栳树籽油干预对NAFLD细胞内TG含量的影响

组别	TG/(mmol/g)
空白组	0.223 ± 0.053
模型组	0.931 ± 0.048**
10 μL/mL 栳树籽油组	0.821 ± 0.044#
20 μL/mL 栳树籽油组	0.627 ± 0.039#

注:模型组与空白组比较,\*表示 $p < 0.05$ ,\*\*表示 $p < 0.01$ ;栳树籽油组与模型组比较,#表示 $p < 0.05$ 。下同

由表1可知:各组细胞TG含量与油红O染色结果(图3)一致;与空白组相比,模型组细胞内TG含量升高;与模型组相比,栳树籽油组细胞内TG含量显著降低,且呈现剂量依赖关系。

## 2.2 栳树籽油对NAFLD小鼠肝脏的保护作用

### 2.2.1 小鼠体质量、肝脏质量及肝指数变化

实验期间统计小鼠体质量,比较各组小鼠体质量变化,结果如表2所示。

由图2可知,栳树籽油作用于NAFLD细胞后,细胞存活率明显增加。栳树籽油加量为20 μL/mL时细胞存活率最高,而栳树籽油加量为30 μL/mL时,细胞存活率略有下降,说明当栳树籽油达到一定浓度后其对NAFLD的保护作用降低。

### 2.1.3 栳树籽油对Lo-2细胞脂质堆积的影响

按1.2.1.1和1.2.1.3方法,显微镜下观察栳树籽油干预对NAFLD细胞内脂质含量的影响,结果如图3所示。

表2 栳树籽油对NAFLD小鼠体质量的影响

组别	体质量/g		体质量增长率/%
	始	终	
空白组	26.49 ± 0.85	29.00 ± 0.45	9.58 ± 4.14
模型组	26.13 ± 0.51	36.92 ± 2.29*	41.34 ± 9.14
栳树籽油组	26.44 ± 0.67	29.93 ± 1.12#	13.23 ± 4.23

实验发现:造模期间,空白组小鼠体质量呈稳定平缓的上升趋势,而模型组小鼠体质量上升趋势明显,栳树籽油组小鼠从给药第3天开始体质量下降。由表2可知,实验结束时,模型组小鼠与空白组比较,体质量差异显著,栳树籽油组小鼠与模型组比较,体质量差异显著。实验结束时,空白组小鼠肝脏颜色鲜红且脏器边缘锐利;模型组小鼠肝脏表面颜色轻微暗沉,边缘圆润,表面目视有黄白色小点;栳树籽油组小鼠肝脏表面轻微发黄,边缘圆润,未观察到黄白色小点。栳树籽油对NAFLD小鼠肝脏质量及肝指数的影响如表3所示。

表3 栳树籽油对NAFLD小鼠肝脏质量及肝指数的影响

组别	体质量/g	肝脏质量/g	肝指数/%
空白组	29.00 ± 0.45	1.99 ± 0.03	6.87 ± 0.18
模型组	36.92 ± 2.28*	2.22 ± 0.08*	6.03 ± 0.35*
栳树籽油组	29.93 ± 1.12#	2.11 ± 0.04#	7.06 ± 0.32#

由表3可知,与空白组比较,模型组小鼠体质量、肝脏质量和肝指数均显著增加,与模型组比较,栳树籽油组小鼠体质量和肝脏质量均显著降低,说明栳树籽油干预可以显著控制高脂饲料引起的小鼠体质量增长,降低小鼠肝脏质量。



## 2.2.2 小鼠血清和肝脏组织生化指标变化

### 栎树籽油对 NAFLD 小鼠血清和肝脏组织生化

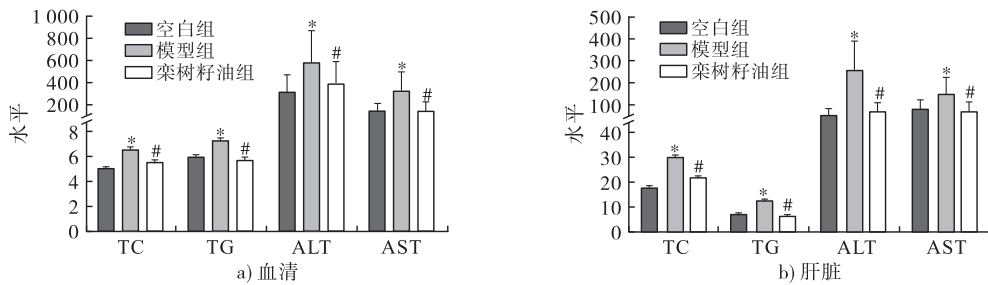


图4 栎树籽油对 NAFLD 小鼠生化指标的影响

由图4可知,与空白组比较,模型组小鼠血清和肝脏组织中 TC、TG、ALT、AST 水平显著升高,与模型组比较,栎树籽油组小鼠血清和肝脏组织中 TC、TG、ALT、AST 水平显著降低,表明栎树籽油具有一

定的降低血脂和保护肝脏作用。

定的降低血脂和保护肝脏作用。

## 2.2.3 小鼠肝脏 HE 染色情况

小鼠肝脏 HE 染色情况如图5所示。

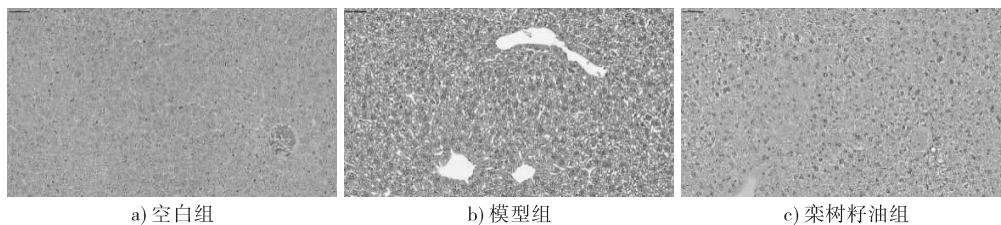


图5 肝脏组织 HE 染色图(40 ×)

由图5可知:空白组(正常组)小鼠肝脏组织细胞形态正常,边界清晰,排列整齐,细胞脂质未见异常;模型组小鼠肝脏组织可见大量肝细胞弥漫性的脂质空泡,细胞肿胀,大量的脂肪滴呈气球样积聚;栎树籽油组小鼠肝脏组织部分细胞呈现轻微脂质空泡,细胞排列较整齐,轻微炎症浸润。上述结果说明栎树籽油可以起到保护肝脏的作用。

## 3 结论

在体外细胞实验中,栎树籽油对 Lo-2 细胞表现出一定的促增殖作用,提示栎树籽油可能具有促进肝脏修复和再生的潜能,进一步通过游离脂肪酸建立 NAFLD 细胞模型,栎树籽油在一定浓度范围内可抑制细胞内的脂质堆积,抵抗游离脂肪酸引起的 Lo-2 细胞内 TG 水平的升高,控制游离脂肪酸引起的细胞内脂质水平的异常。体内实验通过高脂饮食饲养成功建立 NAFLD 小鼠模型,进而模拟人体给药途径,通过灌胃给药方式,观察到栎树籽油在一定时间内可以降低模型小鼠的体质量和肝脏质量,下调血清和肝脏组织中 TC、TG、ALT、AST 水平,保护肝脏组织形态,充分说明栎树籽油具有降低血脂、改善脂质沉积和保护肝脏的作用。

实验中发现,一定浓度范围内的栎树籽油可以有效抑制游离脂肪酸诱导的肝细胞内脂滴的形成,起到保护肝脏作用。但是,栎树籽油浓度过高是否会加重肝脏细胞内的脂质堆积压力还需进一步的研究。

## 参考文献:

- [1] 倪鸿昌,李俊,金涌,等.大鼠实验性高脂血症和高脂血症性脂肪肝模型研究[J].中国药理学通报,2004,20(6):703-706.
- [2] 严思思,刘翔燕,张琳玉,等.膳食油脂与非酒精性脂肪肝形成相关研究进展[J].中国油脂,2021,46(6):76-84.
- [3] 李璇,郑建仙.脂肪与心血管疾病相互关系最新进展及对食品工业的指导意义[J].食品与发酵工业,1998,24(1):74-79.
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第四十二卷 第一分册[M].北京:科学出版社,1993.
- [5] 温学,吴刚.复羽叶栎在广州市的应用探析[J].现代农业科技,2019(18):118-119,122.
- [6] 蔡喜悦,陈晓德,李朝政,等.干旱胁迫下外源钙对石灰岩地区复羽叶栎种子萌发的影响[J].应用生态学报,2013,24(5):1341-1346.
- [7] 林艳华,梁千慧,刘锦春.喀斯特地区适生树种复羽叶栎幼苗对干旱胁迫下异质生境的生长和光合响应[J].西南大学学报(自然科学版),2019(8):20-26.
- [8] 陕西省森林工业管理局.秦巴山区经济动植物[M].西安:陕西师范大学出版社,1990.
- [9] 曹丽敏,骆金艳,贺金,等.复羽叶栎种仁的脂肪酸及氨基酸组成分析[J].中国油脂,2020,45(4):134-137.
- [10] 郑蕾,赵子玥,杨文涛,等.基于网络药理学和分子对接探讨栎树种仁油治疗脂肪肝的作用机制[J].中国油脂,2023,48(7):99-102,119.