吴川, 王雯曦, 王潇萌, 等. 黑皮鸡枞菌提取物改善游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂质代谢及氧化应激异常 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(10): 447−455. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050117

WU Chuan, WANG Wenxi, WANG Xiaomeng, et al. *Oudemansiella raphanipies* Extract Ameliorates Free Fatty Acid-induced Abnormallities of Lipid Metabolism and Oxidative Stress in HepG2 Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(10): 447−455. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050117

·营养与保健·

黑皮鸡枞菌提取物改善游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂质代谢及氧化应激异常

吴　川[1], 王雯曦[1], 王潇萌[1], 黄少林[1], 王浩楠[1], 阴文娅[1], 黄　藩[2,*]
（1.四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院, 四川成都 610041;
2.四川省农业科学院茶叶研究所, 四川成都 610066）

摘　要: 目的：揭示黑皮鸡枞菌提取物（*Oudemansiella raphanipies* extract，ORE）改善脂代谢紊乱的潜力和作用机制。方法：采用游离脂肪酸（Free fatty acids，FFA）诱导 HepG2 细胞脂质堆积模型，研究 ORE 对肥胖相关肝脂肪变性的影响。利用油红 O 染色法检测细胞内脂滴形成情况，生化试剂盒法检测各组细胞相关指标，同时利用 qRT-PCR 和 Western Blotting 进一步探索 ORE 改善脂质代谢的分子机制。结果：ORE 能减少 HepG2 细胞的脂质积累，使 C/EBPα、PPAR-γ、SREBP-1c、FAS 等脂肪生成相关基因以及蛋白的表达减少，此外 ORE 降低了活性氧（Reactive oxygen species，ROS）和丙二醛（Malondialdehyde，MDA）的水平并提高了超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase，SOD）以及过氧化氢酶（Catalase，CAT）活性。结论：ORE 能够改善脂质沉积 HepG2 细胞的脂质代谢水平，其机制可能是通过下调 C/EBPα、PPAR-γ 从而进一步抑制 SREBP-1c/FAS 合成通路。同时 ORE 也改善了 HepG2 细胞的氧化应激水平，可能与清除 ROS、MDA 并提高 SOD 以及 CAT 活性从而调节细胞氧化还原系统有关。

关键词: 黑皮鸡枞菌, HepG2 细胞, 游离脂肪酸, 脂质代谢, 氧化应激
中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)10−0447−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050117
本文网刊:

Oudemansiella raphanipies Extract Ameliorates Free Fatty Acid-induced Abnormallities of Lipid Metabolism and Oxidative Stress in HepG2 Cells

WU Chuan[1], WANG Wenxi[1], WANG Xiaomeng[1], HUANG Shaolin[1], WANG Haonan[1], YIN Wenya[1], HUANG Fan[2,*]
（1.West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;
2.Tea Research Institute of Sichuan Academy of Agricultural Science, Chengdu 610066, China）

Abstract: Objective: This study aimed to investigete the potential and molecular mechanisms of *Oudemansiella raphanipies* extract (ORE) in ameliorating lipid metabolism dysregulation. Methods: A lipid accumulation model was established in HepG2 cells using free fatty acids (FFA) to investigate the effects of ORE on obesity-associated hepatic steatosis. Oil red O staining were used to detect lipid deposition within cells. Relevant cellular parameters were measured using biochemical assay kits. Furthermore, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting were employed to elucidate the molecular mechanisms underlying ORE's improvement of lipid metabolism. Results: ORE effectively reduced lipid accumulation in HepG2 cells. It significantly downregulated the expression of

收稿日期: 2025−05−14
基金项目: 四川省农业科学院 10+9 自主创新拓展研究计划（“10+9”ZZCX-116）。
作者简介: 吴川（2002−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 营养与疾病, E-mail: wuchuan1@stu.scu.edu.cn。
*** 通信作者:** 黄藩（1989−）, 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: 474844276@qq.com。

adipogenesis-related genes and proteins, including C/EBPα, PPARγ, SREBP-1c, and FAS. Additionally, ORE significantly reduced reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) levels while enhanced the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Conclusion: ORE can improve the lipid metabolism level of lipid-deposited HepG2 cells. The underlying mechanism may be achieved by downregulating C/EBPα and PPAR-γ to further inhibit the SREBP-1c/FAS synthesis pathway. Concurrently, ORE alleviates oxidative stress in HepG2 cells, potentially through reducing ROS, MDA, enhancing SOD and CAT activities, thereby modulating the cellular redox system.

Key words: *Oudemansiella raphanipies*; HepG2 cells; free fatty acids; lipid metabolism; oxidative stress

肥胖已经成为全球性的公共卫生问题，肥胖者由于体内脂肪组织过度积累扩张，脂肪细胞的脂解活性会显著增强，从而释放大量游离脂肪酸（Free fatty acids, FFA）入血，其中约 60% 的肝脏脂质是来源于外周脂肪组织的脂解产物[1−2]。大量的 FFA 通过门静脉系统后优先进入肝脏，当摄入量超过肝脏氧化和极低密度脂蛋白（Very low-density lipoprotein, VLDL）输出能力时，导致 TG 在肝细胞内异位沉积，逐渐形成非酒精性脂肪肝（Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD），其核心病理机制涉及 FFA 过度摄取导致脂质蓄积与氧化应激失衡[3−5]。据统计，中国的 NAFLD 患病率已接近 30%，且患病率在逐年上升[6−7]。目前，治疗像 NAFLD 这类脂代谢相关疾病常常需要长期用药来控制血脂水平。但药物的副作用也难以避免，例如他汀类、贝特类等调脂药物会导致肝功能损害[8]，而黑皮鸡枞菌提取物因富含多糖、黄酮、多酚等多种天然活性成分，可以通过清除自由基、抑制脂质过氧化及调控抗氧化酶活性改善细胞的氧化应激状态[9−10]，是除了常规药物治疗外，能够同时兼顾疗效与安全的天然物质，在辅助降脂方面具有巨大的潜力。魏奇等[11] 发现黑皮鸡枞菌多糖可通过上调 SOD 活性，降低脂质过氧化物 MDA 含量，从而减少脂质堆积细胞的氧化应激，保护肝脏和其他器官免受氧化损伤。此外，其通过减轻肝纤维化和脂肪变性，可以改善 NAFLD[12]。张晨[13] 发现黑皮鸡枞菌乙酸乙酯层提取物中富含甲基橙皮苷、根皮素、漆黄素和木犀草素等黄酮类成分，可以通过下调 SREBP-1c、FAS 等基因的表达，减少肝脏 TG 和 TC 的合成。

近年来，HepG2 细胞因其保留的肝细胞代谢特征和操作可控性，已成为解析脂毒性机制及筛选干预手段的重要体外细胞平台[4,14]。李娟等[15] 发现，棕榈酸（PA）与油酸（OA）以 1∶2~2∶1 比例联合刺激可模拟体内脂质代谢紊乱环境，通过抑制脂肪酸 β 氧化、上调 SREBP-1c/FAS 等合成通路，诱导细胞内 TG 蓄积及 ROS 水平升高。因此本研究采用 PA∶OA 为 1∶2 的 0.5 mmol/L FFA 诱导 HepG2 细胞 24 h 构建脂肪堆积模型[16−17]，通过油红 O 定量、TG/TC、HDL-C/LDL-C 微量法检测脂质代谢相关指标，同时检测 ROS/MDA/SOD/CAT 等氧化应激相关指标，并对相关基因及蛋白表达进行测定，探究 ORE 改善脂质代谢的作用通路，系统评价 ORE 对脂质代谢以及氧化应激的双向调节作用，为 ORE 在改善脂质堆积和氧化应激方面的研究提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

HepG2 细胞　由四川大学生物治疗国家重点实验室馈赠于课题组，并保种置于−80 ℃ 冰箱中；黑皮鸡枞菌　盛宝阁食品有限公司；油酸　美国 Sigma-Aldrich 贸易有限公司；辛伐他汀（Simvatatin）　北京索莱宝科技有限公司；噻唑蓝（MTT）　德国 BIO-Froxx 公司；DMEM 高糖培养基　美国 Hyclone 公司；胎牛血清　美国 ZETA Life 公司；棕榈酸、油红 O 染色试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇（Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C）、高密度脂蛋白胆固醇（High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C）、活性氧（Reactive oxygen species, ROS）试剂盒　北京索莱宝科技有限公司；谷丙转氨酶（Alanine Transaminase, ALT）、谷草转氨酶（Aspartate Aminotransferase, AST）、甘油三酯（Triglyceride, TG）、总胆固醇（Total cholesterol, TC）、超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）、过氧化氢酶（Catalase, CAT）、丙二醛（Malondialdehyde, MDA）试剂盒　南京建成科技有限公司；ABScript Neo RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover　武汉爱博泰克生物科技有限公司；荧光定量 PCR-AceQ qPCR SYBR Green MasterMix　南京诺维赞生物科技有限公司；RIPA 裂解液及抑制剂　上海碧云天生物技术有限公司；Ulrasignal 超敏 ECL 化学发光底物　北京四正柏生物科技有限公司；抗体：SREBP-1c、PPARγ、FAS　购自杭州华安生物技术有限公司；抗体 C/EBPα　购自美国 Cell Signaling Technology 公司；β-actin 和山羊抗兔/鼠 IgG　购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1510 全波长酶标仪　德国 Thermo Fisher 公司；VCX130 超声波破碎仪　美国 SONICS 公司；Centrifuge 5424 R 离心机　德国 Eppendorf 公司；Eclipse Ti-U 倒置荧光显微镜　日本 Nikon 公司；9505 水浴锅　美国 Poly Science 公司；CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪　美国 BIO-RAD；Cavoy Mini P-4 蛋白质电泳槽及电泳电源　北京凯元信瑞仪器有限公司；ChemiDoc XRS+化学发光成像系统　美国 BIO-RAD 公司；SCIENTZ-50F/A 真空冷冻干燥机　宁波新芝生物科技股份有限公司；SCIENTZ-

SB25-12DTD 超声波仪　宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　ORE 的提取制备　将黑皮鸡枞菌用真空冷冻干燥机进行干燥，粉碎并通过 40 目筛后按料液比 1∶42(g/mL)将其粉末与 82% 乙醇混合。随后参考栗铭鸿等[18] 以及苗晶囡等[19] 提取方法使用超声波仪(300 W, 40 kHz)在 70 ℃ 下提取 117 min。结束后，将上清液过滤以获得粗提物，通过旋转蒸发去除乙醇后，再用石油醚和二氯甲烷提取。提取结束后合并有机相，通过真空去除溶剂后，依次用溶剂 A(石油醚∶乙酸乙酯，5∶1，v/v)和溶剂 B(二氯甲烷∶甲醇，9∶1，v/v)让其通过硅胶柱色谱进行洗脱。最后，将洗脱液合并，通过真空去除溶剂并冻干后获得最终的提取物。

1.2.2　细胞培养与分组　HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素溶液的高糖 DMEM 培养基，在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。将细胞分别记为空白对照组(Control)，模型组(Model)，辛伐他汀组(FFA+SV)，ORE 低、中、高剂量组(依次记为 FFA+ORE-L、FFA+ORE-M、FFA+ORE-H)。空白对照组仅加入含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素溶液的完全培养基；模型组加入终浓度 0.5 mmol/L FFA 溶液；辛伐他汀组：同时加入终浓度 0.5 mmol/L FFA 和 40 μmol/L 的辛伐他汀[20]；ORE-L、ORE-M、ORE-H 同时加入终浓度 0.5 mmol/L FFA 以及不同浓度 ORE 溶液，培养 24 h 进行后续实验，除空白对照组外的其余各组溶液均由含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素溶液的完全培养基进行配制。

1.2.3　MTT 法检测细胞存活率　取对数生长期 HepG2 细胞以 1×10^5/mL 浓度接种于 96 孔板，培养 24 h，分别加入不同终浓度(5、10、15、20、25、30、35、40、45 μg/mL)ORE 处理，37 ℃、5% 二氧化碳培养 24 h；培养时间结束后，取出 96 孔板，超净工作台中避光条件下向每孔加入 20 μL MTT 溶液，放入细胞培养箱中继续避光培养 2~4 h。培养完成后，沿边缘吸出孔中原有培养基，并加入 150 μL DMSO，放置于摇床上振荡 10 min，使得孔板底部结晶溶解，待溶解完全后，将 96 孔板置于酶标仪中，设置波长为 570 nm 测定其吸光度值。细胞存活率计算公式如下：

$$细胞存活率(\%)=\frac{OD_{实验组}}{OD_{对照组}}\times100$$

式中，$OD_{实验组}$表示不同浓度 ORE 组的吸光度；$OD_{对照组}$表示对照组的吸光度。

1.2.4　细胞油红 O 染色　按“1.2.2”项方法诱导 HepG2 脂肪堆积细胞模型以及分组加样干预，孵育完成后取出六孔板，弃去原有培养基，PBS 清洗两次后，吸除培养液，4% 多聚甲醛放置 30 min，加入 60% 异丙醇漂洗 20~30 s；吸除多余异丙醇，再加入 500 μL 油红 O 染色液，染色 30 min；弃去染液后加入 1 mL 蒸馏水清洗 2~5 次清除多余的染液后重新加入 500 μL 蒸馏水覆盖细胞，于显微镜下观察细胞内脂滴染色情况；观察结束后弃去蒸馏水，加入 500 μL DMSO，置于摇床上 10 min，待染料溶解后，以每孔 100 μL 加入 96 孔板，每组三个复孔，酶标仪于 490 nm 处测吸光度值。

1.2.5　细胞内 ATL、AST 含量测定　按“1.2.2”项方法诱导 HepG2 脂肪堆积细胞模型以及分组加样干预，孵育完成后取出六孔板，弃去原有培养基，PBS 清洗两次后每孔加入 1 mL PBS，用细胞刮刀将大部分细胞刮落，随后将细胞悬液转入离心管内，进行离心(1000 r/min, 10 min)，完成后弃去上清，加入 1 mL PBS 重悬，离心(1000 r/min, 10 min)，重复两次，弃上清，获得细胞沉淀。向管内加入 100 μL PBS，冰水浴下超声制备匀浆液。然后按照试剂盒说明书检测各组细胞内 ATL、AST 含量。

1.2.6　细胞内 TC、TG 含量测定　按照“1.2.5”的方法处理细胞后，按照试剂盒说明书检测各组细胞内 TC、TG 含量。

1.2.7　细胞内 HDL-C、LDL-C 含量测定　按“1.2.2”项方法诱导 HepG2 脂肪堆积细胞模型以及分组加样干预，孵育完成后取出六孔板，弃去原有培养基，PBS 清洗两次后每孔加入 1 mL PBS，用细胞刮刀将大部分细胞刮落，随后将细胞悬液转入离心管内，进行离心(1000 r/min, 10 min)，完成后弃去上清，获得细胞沉淀，加入提取液冰水浴下超声制备匀浆液后离心(10000 r/min, 10 min)，取上清液按照试剂盒检测各组细胞内 HDL-C、LDL-C 含量。

1.2.8　细胞内 ROS 水平测定　按“1.2.2”项方法诱导 HepG2 脂肪堆积细胞模型以及分组加样干预，孵育完成后取出六孔板，弃去原有培养基，PBS 清洗三次后，每孔加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA 探针溶液，37 ℃ 细胞培养箱内孵育 25 min 后用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，每孔加入 1 mL PBS 后在倒置荧光显微镜观察并拍照。

1.2.9　细胞内 MDA 含量及 SOD、CAT 活性测定　按“1.2.2”项方法诱导 HepG2 脂肪堆积细胞模型以及分组加样干预，孵育完成后取出六孔板，按照试剂盒说明书对细胞内 MDA 含量及 SOD、CAT 活性进行检测。

1.2.10　RT-qPCR 检测目的基因相对表达　按“1.2.2”项方法诱导 HepG2 脂肪堆积细胞模型以及分组加样干预，孵育完成后取出六孔板，收集细胞，提取总 RNA，按照逆转录试剂盒说明书逆转录得到互补 cDNA，以此为模板于荧光定量 PCR 仪分别检测脂质代谢相关基因的 mRNA 相对表达量，以 *β-actin* 为内参。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法计算目的基因相对表达量，引物序列如表 1 所示。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

引物名称	引物序列(5'→3')
β-Actin	F: TCAAGAAAGGGTGTAACGCAACTA
	R: CGACAGGATGCAGAAGGAGAT
C/EBPα	F: TGGACAAGAACAGCAACGAGTA
	R: ATTGTCACTGGTCAGCTCCAG
PPARγ	F: AGGCCTTGGAAGCCCTACTA
	R: CAGCAACCTCTGCGAGTCTC
SREBP-1c	F: GTGGAGAGAAGCGCACAG
	R: TGTTGCAGAAAGCGAATGTAG
FAS	F: CTAGGTTTGATGCCTCCTTCTT
	R: ATGGCTTCATAGGTGACTTCC

1.2.11 Western blotting 检测相关蛋白的表达 按“1.2.2”项方法诱导 HepG2 脂肪堆积细胞模型以及分组加样干预孵育完成后取出六孔板，弃去原有培养基，PBS 清洗两次后，每孔加入 1 mL PBS，用细胞刮刀将大部分细胞刮落，随后将细胞悬液转入离心管内，进行离心（1000 r/min，10 min），完成后弃去上清，每孔加入 RIPA 裂解液 100 μL，冰上裂解 30 min，每隔 10 min 涡旋一次，然后在冰水浴中超声裂解细胞直至液体澄清，超声完成后，离心（13500 r/min，10 min，4 ℃），吸取管中上清液保存用于进行蛋白定量。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，5% 脱脂牛奶封闭 1 h，TBST 洗涤 3 次，根据分子量裁剪条带并分别加入 *β*-actin（1∶10000）、PPAR*γ*（1∶1000）、C/EBP*α*（1∶1000）、SREBP-1c（1∶2000）、FAS（1∶5000）抗体中，4 ℃ 孵育过夜，取出条带 TBST 洗涤 3 次，二抗（1∶10000）室温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，加入 ECL 显影液后在曝光仪进行曝光。

1.3 数据处理

所有结果以平均值±标准差（$\overline{X}$±SD）表示，每个实验至少重复三次。数据统计分析以及图表通过 Excel、GraphPad Prism9.5、Image J 完成。通过单因素方差分析（one-way ANOVA）和 Dunnett's *t* 检验分析组间差异，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 ORE 对 HepG2 细胞存活率的影响

MTT 实验结果显示，ORE 浓度在 5~25 μg/mL 范围内时 HepG2 细胞的细胞存活率保持在 95% 以上，而当 ORE 溶液浓度达到 30 μg/mL 后细胞存活率显著下降至 85% 以下（$P<0.001$），对细胞产生损害，见图 1。结合 MTT 实验结果并参考刘亚迪等[21]用芦丁干预 HepG2 细胞的剂量，最终选择了 5、10、20 μg/mL 三个浓度分别作为低、中、高剂量进行后续干预实验。

2.2 ORE 对 HepG2 细胞脂肪积累的影响

如图 2A 所示，与空白对照组相比，模型组细胞内脂滴数量增多，颜色明显，ORE 干预后细胞内脂滴数量减少，红色较模型组变浅。阳性药辛伐他汀干预后，细胞内脂滴数量也有减少，颜色变浅。如图 2B 所示，对各组细胞内染料的含量进行定量分析发现结果与显微镜下观察基本一致，模型组染料的吸光度较空白对照组明显增加（$P<0.001$），而 ORE 干预后能够显著降低 FFA 干预后细胞内脂质的积累（$P<0.01$，$P<0.001$，$P<0.05$），其染料吸光度分别下降 28.61%、30.32%、19.91%。

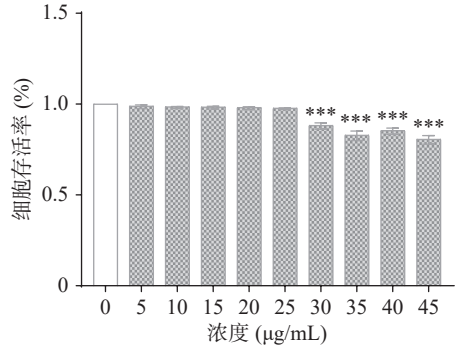


图 1 ORE 对 HepG2 细胞活力的影响

Fig.1 Effects of ORE on the activity of HepG2 cells

注：*表示与对照组（0 μg/mL）比较：*$P<0.05$；**$P<0.01$；***$P<0.001$。

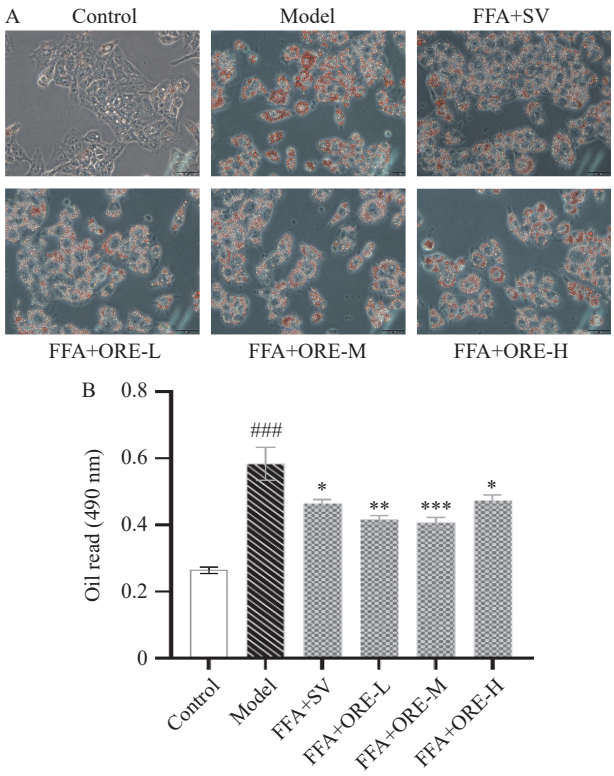


图 2 ORE 对 FFA 诱导的 HepG2 细胞内脂滴的影响（油红 O 染色，20×）

Fig.2 Effect of ORE intervention on FFA induced lipid droplets in HepG2 cells (Oil red O staining, 20×)

注：#表示和空白对照组比较，*表示和模型组比较：#$P<0.05$；##$P<0.01$；###$P<0.001$；*$P<0.05$；**$P<0.01$；***$P<0.001$。

2.3 ORE 对 HepG2 细胞损伤的影响

细胞中脂质的积累会损害细胞功能，造成细胞损伤。通过检测细胞中 ALT 和 AST 的含量来评估

ORE 对细胞损伤的作用。ALT 和 AST 是肝损伤的生物标志物，当肝细胞受损时，ALT 和 AST 含量会显著升高，因此被广泛应用于肝损伤评价[22−23]。图 3 结果显示，FFA 诱导使得细胞内 ALT、AST 含量上升（P<0.001），造成细胞损伤，而不同剂量 ORE 干预后 ALT 含量分别下降了 11.86%、27.41%、18.28%，AST 含量分别下降了 34.54%、21.21%、11.88%，ORE 中、高剂量显著降低了细胞内 ALT 和 AST 含量（P<0.05，P<0.01），从而产生了细胞保护作用。

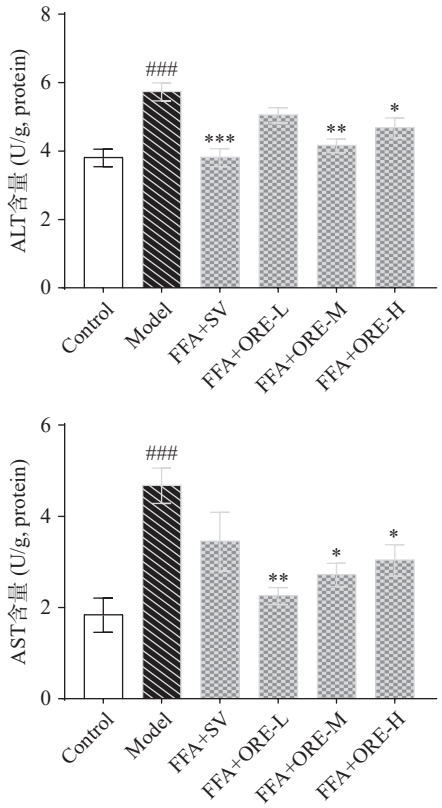


图 3　ORE 降低 FFA 引起的 HepG2 细胞损伤

Fig.3　ORE reduces FFA-induced damage to HepG2 cells

注：#表示和空白对照组比较，*表示和模型组比较：$^{\#}P$<0.05；$^{\#\#}P$<0.01；$^{\#\#\#}P$<0.001；*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001，图 4~图 7 同。

2.4　ORE 对 FFA 干预后 HepG2 细胞中 TG、TC 水平的影响

为了明确 ORE 的降脂作用，对细胞内 TG 和 TC 的含量进行了测定。图 4 结果表明，与对照组相比，模型组细胞内 TG、TC 的含量显著增加（P<0.001）；而与模型组相比，低、中、高剂量 ORE 干预后 TG 含量分别下降了 66.05%、69.27%、63.42%，能够显著降低 TG 的含量（P<0.01）。同时中、高剂量的 ORE 干预后 TC 含量分别下降了 50.91%、47.41%，能够显著降低细胞内的 TC 含量（P<0.05）。

2.5　ORE 对 FFA 干预后 HepG2 细胞中的 LDL-C 以及 HDL-C 水平的影响

HDL-C 主要作用是将周围组织的胆固醇运送到肝脏进行分解，对机体有一定的保护作用，而 LDL-C 的作用则相反[24]。为深入探究 ORE 的降脂作用，检测了细胞内 HDL-C 和 LDL-C 的含量。结果表明，

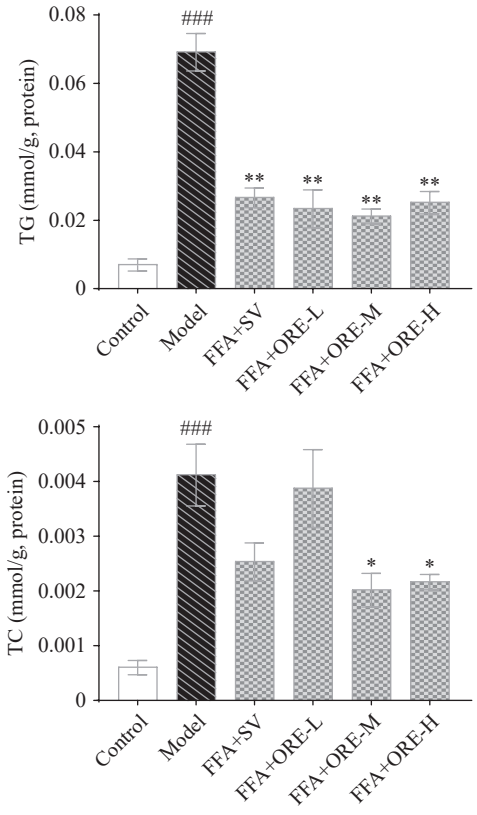


图 4　ORE 对 HepG2 细胞内 TG、TC 水平的影响

Fig.4　Effect of ORE intervention on intracellular TG and TC levels in HepG2 cells

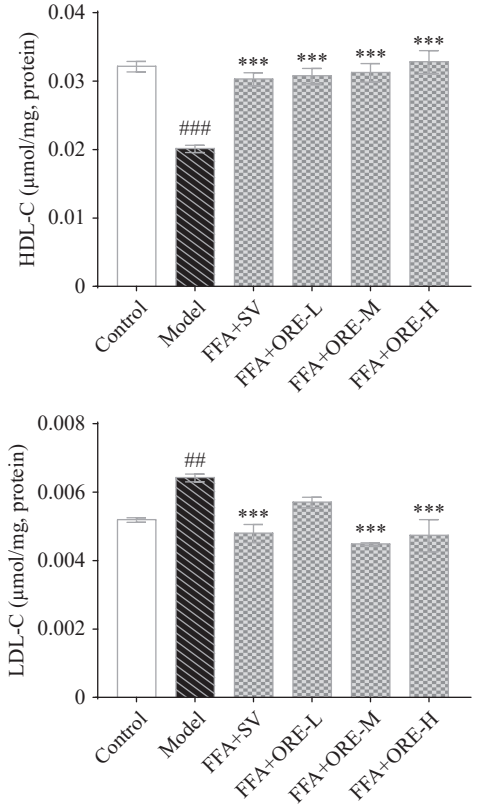


图 5　ORE 对 HepG2 细胞 HDL-C、LDL-C 水平的影响

Fig.5　Effect of ORE intervention on intracellular HDL-C and LDL-C levels in HepG2 cells

与空白对照组相比，模型组 HDL-C 含量降低了 37.34%，LDL-C 含量增加了 23.61%；而与模型组相

比，低、中、高剂量组的 HDL-C 含量分别升高了 52.76%、55.05%、62.82%，LDL-C 含量分别下降了 11.13%、30.15%、26.17%，逆转了模型组的趋势。结果表明 ORE 可缓解 FFA 引起的 HepG2 细胞内 HDL-C 和 LDL-C 水平的异常变化，同时可以看出中等剂量的 ORE 在降低 LDL-C 含量上表现出更好的效果（P<0.001），维持细胞内胆固醇水平的相对恒定（图 5）。

2.6 ORE 对 FFA 干预后 HepG2 细胞中的 ROS 水平的影响

ROS 会攻击多不饱和脂肪酸（Polyunsaturated fatty acid, PUFA）的双键，生成 MDA，破坏膜结构并引发炎症，而在肥胖和糖尿病中，脂肪组织中 ROS 水平升高会导致脂解异常，如游离脂肪酸释放过多和胰岛素信号通路受损[25−26]。如图 6A 所示，与空白对照组相比，模型组细胞的荧光强度显著增强；与模型组相比，ORE 各剂量组的荧光强度都有不同程度的下降，且相较于辛伐他汀组效果更明显。图 6B 是用 Image J 软件对各组荧光强度进行定量分析，结果与倒置荧光显微镜下观察的一致，模型组 ROS 荧光强度较空白对照组显著升高（P<0.001）；与模型组相比，辛伐他汀组以及 ORE 各剂量组的 ROS 荧光强度分别降低了 25.44%、42.54%、59.11%、52.45%，相对于低剂量和高剂量，中剂量的 ORE 展现出较好的降低 ROS 活性氧的能力（P<0.001）。

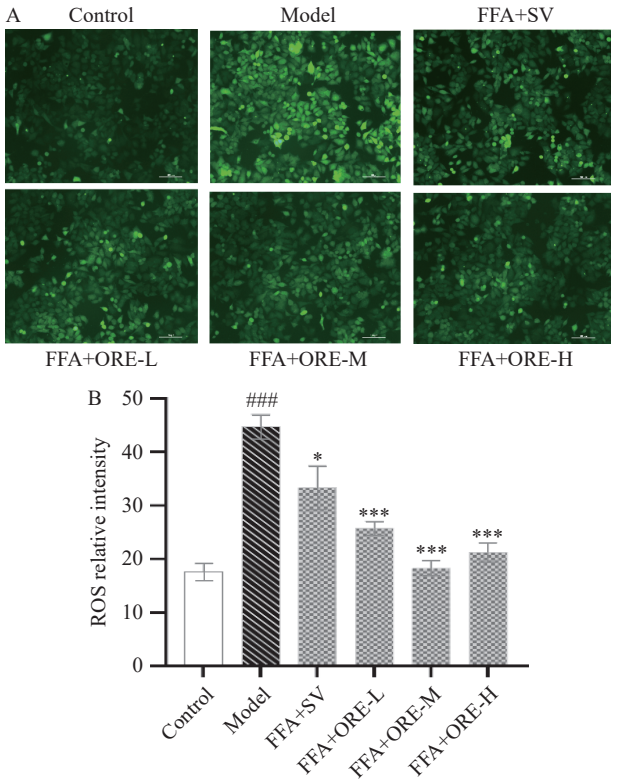


图 6 ORE 对 HepG2 细胞 ROS 的影响（荧光染色，10×）

Fig.6 Effect of ORE on intracellular ROS in HepG2 cells (fluorescence staining, 10×)

2.7 ORE 对 HepG2 细胞内 MDA 水平及 SOD、CAT 活性的影响

如表 2 所示，与空白对照组相比，模型组细胞内的 MDA 含量显著升高（P<0.001），SOD、CAT 活性显著下降（P<0.001）。与模型组相比，辛伐他汀组以及 ORE 中、高剂量组的 MDA 含量显著下降（P<0.01），低剂量没有显著性差异；辛伐他汀组以及 ORE 低、中剂量组能显著升高 SOD 的活性（P<0.01），高剂量组没有显著性差异；ORE 低、中剂量组能显著升高 CAT 的活性（P<0.05），辛伐他汀以及高剂量组没有显著性差异。

表 2 ORE 对 MDA 水平及 SOD、CAT 活性水平的影响

Table 2 Effects of ORE intervention on intracellular MDA levels and SOD and CAT activity levels

组别	MDA（nmol/mg, pro）	SOD（U/mg, pro）	CAT（U/mg, pro）
Control	0.039±0.001	1.733±0.069	0.158±0.006
Model	0.241±0.004$^{\#\#\#}$	1.050±0.064$^{\#\#\#}$	0.079±0.003$^{\#\#\#}$
FFA+SV	0.217±0.008**	1.449±0.094**	0.096±0.005
FFA+ORE-L	0.238±0.001	1.337±0.079**	0.101±0.005*
FFA+ORE-M	0.211±0.009**	1.393±0.010**	0.137±0.009***
FFA+ORE-H	0.210±0.003**	1.246±0.090	0.091±0.007

注：#表示和空白对照组组比较，*表示和模型组组比较：$^{\#}P$<0.05；$^{\#\#}P$<0.01；$^{\#\#\#}P$<0.001；$^{*}P$<0.05；$^{**}P$<0.01；$^{***}P$<0.001。

2.8 ORE 对 HepG2 细胞内脂质代谢相关基因的影响

如表 3 的 RT-qPCR 结果所示，与空白对照组相比，模型组 *C/EBPα*、*PPARγ*、*SREBP-1c*、*FAS* 基因的 mRNA 水平显著升高（P<0.01）；与模型组相比，辛伐他汀组以及 ORE 各处理组 *PPARγ*、*C/EBPα*、*SREBP-1c*、*FAS* 基因的 mRNA 水平均显著下降（P<0.01）。

表 3 HepG2 细胞脂质代谢相关基因表达量

Table 3 Gene expression levels related to lipid metabolism in HepG2 cells

组别	*C/EBPα*	*PPARγ*	*SREBP-1c*	*FAS*
Control	1.142±0.088	1.001±0.003	1.003±0.004	1.057±0.086
Model	3.381±1.007$^{\#\#}$	2.345±0.053$^{\#\#\#}$	1.761±0.128$^{\#\#\#}$	6.161±0.476$^{\#\#\#}$
FFA+SV	1.526±0.198**	1.271±0.487**	0.900±0.099**	2.218±0.131***
FFA+ORE-L	1.385±0.171**	1.151±0.153**	1.170±0.089**	1.388±0.094***
FFA+ORE-M	1.127±0.173**	0.872±0.182**	0.881±0.194**	1.686±0.364***
FFA+ORE-H	1.683±0.275**	0.990±0.405**	0.607±0.137**	2.508±0.124***

注：#表示和空白对照组组比较，*表示和模型组组比较：$^{\#}P$<0.05；$^{\#\#}P$<0.01；$^{\#\#\#}P$<0.001；$^{*}P$<0.05；$^{**}P$<0.01；$^{***}P$<0.001。

2.9 ORE 对 HepG2 细胞内脂质代谢相关蛋白的影响

基于 RT-qPCR 的结果，对相应的蛋白表达进行了检测，如图 7A、图 7B 所示，与空白对照组相比，模型组 C/EBPα、PPARγ 的蛋白水平显著上升（P<0.05）；与模型组相比，辛伐他汀组以及 ORE 各处理组显著降低了细胞内 C/EBPα、PPARγ、蛋白的表达（P<0.01）。为了进一步探究 C/EBPα、PPARγ 的变化是否对 SREBP-1c 以及 FAS 的蛋白表达产生影响，利用蛋白免疫印迹法对 SREBP-1c、FAS 的蛋

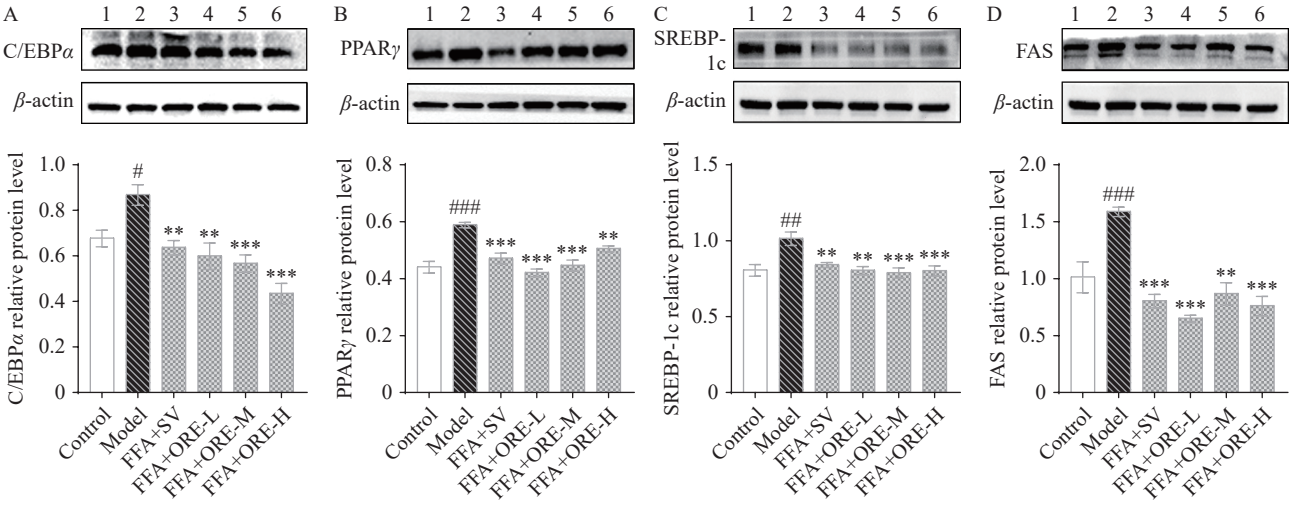


图 7　ORE 对脂质代谢相关蛋白表达水平的影响

Fig.7　Effect of ORE on the expression levels of lipid metabolism-related proteins

注：1~6 分别代表：Control、Model、FFA+SV、FFA+ORE-L、FFA+ORE-M、FFA+ORE-H。

白表达水平进行了检测，如图 7C、图 7D 所示，与空白对照组相比，模型组 SREBP-1c、FAS 的蛋白水平显著上升（P<0.01）；与模型组相比，辛伐他汀组以及 ORE 各处理组显著降低了细胞内 SREBP-1c、FAS 蛋白的表达（P<0.01）。

3　讨论与结论

C/EBPα、PPARγ 是脂质合成启动的两个关键基因，李蓉等[27] 和 Alcalde 等[28] 发现，C/EBPα 通过其启动子的 C/EBP 结合位点自我激活并持续表达，进而刺激 PPARγ 的转录，在 C/EBPα 缺失的脂肪细胞中，PPARγ 无法被诱导，导致脂滴积累减少和胰岛素信号缺陷。同时，C/EBPα 和 PPAR-γ 在脂肪分化过程中能形成正反馈环路，Han 等[29] 发现，C/EBPα 通过结合 PPARγ 启动子直接诱导其表达，而 PPARγ 激活后进一步增强 C/EBPα 的转录。同时 Pettinelli 等[30] 发现 PPAR-γ 还可通过结合 FAS 启动子上的 PPAR 反应元件直接诱导其表达，也能通过上调 SREBP-1c 的表达增强脂质合成。结果表明，与模型组比较，ORE 各处理组 *C/EBPα*、*PPARγ* 基因以及蛋白的表达水平在 FFA 诱导的脂肪堆积 HepG2 细胞中被显著抑制，并进一步抑制了 SREBP-1c、FAS 基因以及蛋白的表达，从而抑制了脂质的生成。

同时有文献表明，氧化应激是脂质代谢紊乱的重要驱动因素之一，氧化应激会增加 ROS 的产生，导致脂质过氧化、细胞毒性、线粒体功能障碍等，从而加剧脂质代谢紊乱[31−32]，而 ROS 会激活 SREBP-1c，进一步促进脂肪酸合成酶 FAS 的表达，增加脂质合成并进一步加剧线粒体氧化应激[33]。与此同时，ROS 会攻击细胞膜中的 PUFA，引发脂质过氧化链式反应，生成终产物 MDA。MDA 作为脂质过氧化的核心生物标志物，其水平升高直接反映氧化应激程度，同时也与 NAFLD 的严重程度成正相关[25−26,34]，而 SOD 是清除超氧阴离子的关键酶，其活性下降，会削弱细胞清除 ROS 的能力[35]。实验结果显示，与模型组比较，ORE 能够提高 SOD、CAT 活性，并降低 MDA、ROS 的水平，从而改善 FFA 诱导的 HepG2 细胞的氧化应激水平。值得探讨的一个点是，在大部分结果中 ORE 的剂量与其效应并非呈现一种剂量效应依赖关系，而是中等剂量效果更好，比如在油红 O 染色结果以及 TG、TC、ALT、LDL-C 和氧化应激等相关指标中相较于低剂量和高剂量，中等剂量的 ORE 处理细胞后表现出更好的效果。某些生物过程可能涉及多步骤或非线性机制，使得中等剂量更有效，同时脂质代谢的调控涉及多个基因、信号通路和代谢途径，其调控机制复杂，可能涉及非线性调控、反馈回路或信号交叉作用。因此，ORE 的剂量效应关系可能呈现“抛物线”的形式，涉及非线性调控、反馈回路或信号交叉作用，所以呈现出低剂量和高剂量的效应不如中等剂量。

综上，本研究为 ORE 改善脂质堆积作用提供了基本的理论依据，其能够改善 FFA 诱导的脂质堆积 HepG2 细胞的脂质代谢水平，其机制可能是通过下调 C/EBPα、PPAR-γ 从而进一步抑制 SREBP-1c/FAS 合成通路来实现的，同时也改善了 HepG2 细胞的氧化应激水平，可能与清除 ROS、提高 SOD 以及 CAT 活性从而调节细胞氧化还原系统有关。然而本文只从脂质合成方面探究了 ORE 改善 HepG2 细胞脂质代谢的机制，后续可以在脂质分解以及脂肪酸 β 氧化等方面探索其可能的潜在作用机制，同时进一步研究其改善 HepG2 细胞氧化应激水平的关键蛋白以及相关上下游信号因子的表达，阐明 ORE 基于基因-蛋白-代谢物层面调控氧化应激的作用机制。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] PERRY R J, SAMUEL V T, PETERSEN K F, et al. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes[J]. Nature, 2014, 510(7503): 84−91.

[2] GUAN Dongyin, XIONG Ying, BORCK P C, et al. Diet-induced circadian enhancer remodeling synchronizes opposing hepatic lipid metabolic processes[J]. Cell, 2018, 174(4): 831-842. e12.

[3] MORISHITA S, TOMITA K, ONO T, et al. Lactoferrin attenuates fatty acid-induced lipotoxicity via Akt signaling in hepatocarcinoma cells[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2015, 93(6): 566−573.

[4] 李建超, 钟颖, 李荣荣, 等. 基于肝脂调控为核心的中药调血脂活性和评价方法研究[J]. 中草药, 2023, 54(10): 3158−3166. [LI J C, ZHONG Y, LI R R, et al. Research on the activity and evaluation methods of traditional Chinese medicine for regulating blood lipids based on hepatolipid regulation as the core[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(10): 3158−3166.]

[5] SAKERS A, de SIQUEIRA M K, SEALE P, et al. Adipose-tissue plasticity in health and disease[J]. Cell, 2022, 185(3): 419−446.

[6] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, PAIK J M, et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): A systematic review[J]. Hepatology, 2023, 77(4): 1335−1347.

[7] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. Nature Medicine, 2018, 24(7): 908−922.

[8] 牛亚芊芊, 郭丹杰. 调脂药物的不良反应及其处理措施[J]. 中国全科医学, 2016, 19(36): 4416−4419. [NIU Y Q Q, GUO D J. Adverse reactions of lipid-regulating drugs and their treatment[J]. Chinese Journal of General Practice, 2016, 19(36): 4416−4419.]

[9] 安晓雯, 王彦立, 杨子怡, 等. 黑皮鸡枞菌营养与质构特性分析及其抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 236−242. [AN X W, WANG Y L, YANG Z Y, et al. Analysis of nutritional and textural properties of black trumpet chicken fungus and evaluation of its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(5): 236−242.]

[10] LIU Qin, ZHU Mengjuan, GENG Xueran, et al. Characterization of polysaccharides with antioxidant and hepatoprotective activities from the edible mushroom *Oudemansiella radicata*[J]. Molecules, 2017, 22(2): 234.

[11] 魏奇, 翁馨, 吴艳钦, 等. 食用菌多糖降脂活性及其作用机制的研究进展[J]. 食品科技, 2021, 46(9): 190−194. [WEI Q, WENG X, WU Y Q, et al. Research progress on lipid-lowering activity and mechanism of polysaccharides in edible fungi[J]. food Science and Technology, 2021, 46(9): 190−194.]

[12] JIANG H, ZHU H, HUO G, et al. Oudemansiella raphanipies polysaccharides improve lipid metabolism disorders in murine high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease[J]. Nutrients, 2022, 14(19).

[13] 张晨. 黑皮鸡枞总黄酮提取工艺优化及功效成分鉴定[D]. 成都: 成都大学, 2023. [ZHANG C. Optimization of extraction process and identification of total flavonoids in *Oudemansiella raphanipies*[D]. Chengdu: Chengdu University, 2023.]

[14] 梁蕊, 滕景芳, 李钊, 等. 原代肝细胞脂肪变性细胞模型的构建[J]. 医学研究与教育, 2021, 38(2): 1−7. [LIANG R, TENG J F, LI Z, et al. Construction of a cell model of steatosis of primary hepatocytes[J]. Medical Research and Education, 2021, 38(2): 1−7.]

[15] 李娟, 张中乐, 吴嘉珍, 等. 黄芩苷对高脂诱导 HepG2 细胞脂肪沉积及 SIRT1 相关因子表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(2): 258−262. [LI J, ZHANG Z L, WU J Z, et al. Effects of baicalin on lipid deposition and SIRT1 related factors expression in HepG2 cells induced by high lipid[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2021, 37(2): 258−262.]

[16] 谢燕, 李贵平, 段月阳, 等. 泽泻提取物改善游离脂肪酸诱导的 HepG2 脂肪变性细胞模型的脂质代谢及氧化应激异常[J]. 中草药, 2024, 55(6): 2002−2012. [XIE Y, LI G P, DUAN Y Y, et al. Alisma extract improves lipid metabolism and oxidative stress abnormalities in HepG2 fatty degeneration cell models induced by free fatty acids[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2024, 55(6): 2002−2012.]

[17] GARCIA-MORENA D, FERNANDEZ-CANTOS M V, ESCALERA S L, et al. *In vitro* influence of specific bacteroidales strains on gut and liver health related to metabolic dysfunction-associated fatty liver disease[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2025, 17(3): 1498−1512.

[18] 栗铭鸿, 李官浩, 朴守焕, 等. 鸡枞菌不同溶剂提取物成分分析及抗氧化作用研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(1): 144−148. [18] LI M H, LI G H, PU S H, et al. Component analysis and antioxidant activity of extracts from different solvents of chicken mushroom[J]. Food & Machinery, 2018, 34(1): 144−148.]

[19] 苗晶囡, 董嘉木, 刘树民, 等. 黑皮鸡枞菌多糖超声辅助提取条件优化及抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(12): 109−116. [MIAO J N, DONG J M, LIU S M, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions and antioxidant activity of polysaccharides from black-skinned chicken mushrooms[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(12): 109−116.]

[20] VERMA K, MAKWANA S, PALIWAL S, et al. Simvastatin ameliorates oxidative stress levels in HepG2 cells and hyperlipidemic rats[J]. Current Research in Pharmacology and Drug Discovery, 2022, 3: 100088.

[21] LIU Yadi, SUN Zhongyan, DONG Ruixue, et al. Rutin ameliorated lipid metabolism dysfunction of diabetic NAFLD via AMPK/SREBP1 pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 126: 155437.

[22] SHERMAN M S, GOESSLING W. Discovery of biophysical rate laws from the electronic health record enables real-time liver injury estimation from transaminase dynamics[J]. Cell Reports Medicine, 2024, 5(11): 101828.

[23] YAO Yijun, LI Zhifang, QIN Bowen, et al. Evaluation of the intracellular lipid-lowering effect of polyphenols extract from highland barley in HepG2 cells[J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(1): 454−461.

[24] XU J J, CHEN J, LIU Y X, et al. The impact of LDL-C/HDL-C ratio on severity of coronary artery disease and 2-year outcome in patients with premature coronary heart disease: results of a prospective, multicenter, observational cohort study[J]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2023, 51(7): 702−708.

[25] ZHANG Meijian, ZHAO Meihui, QING Yudie, et al. Study on immunostimulatory activity and extraction process optimization of polysaccharides from *Caulerpa lentillifera*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 677−684.

[26] ABOU-RJEILEH U, CONTRERAS G A. Redox regulation of lipid mobilization in adipose tissues[J]. Antioxidants, 2021, 10(7): 1090.

[27] RONG Li, ZOU Junyan, RAN Wei, et al. Advancements in

the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Frontiers in Endocrinology, 2023, 13: 1087260.

[28] ALCALDE M, TORO R, BONET F, et al. Role of microRNAs in arrhythmogenic cardiomyopathy: Translation as biomarkers into clinical practice[J]. Translational Research, 2023, 259: 72−82.

[29] HAN Y, QI L, LI M, et al. Ajuba functions as a co-activator of C/EBPβ to induce expression of PPARγ and C/EBPα during adipogenesis[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2022, 539: 111485.

[30] PETTINELLI P, VIDELA L A. Up-regulation of PPAR-γ mRNA expression in the liver of obese patients: An additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011, 96(5): 1424–1430.

[31] ARROYAVE-OSPINA J C, WU Zongmei, GENG Yana, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: Implications for prevention and therapy[J]. Antioxidants, 2021, 10(2): 174.

[32] PEDROZA-DIAZ J, ARROYAVE-OSPINA J C, SERNA SALAS S, et al. Modulation of oxidative stress-induced senescence during non-alcoholic fatty liver disease[J]. Antioxidants, 2022, 11(5): 975.

[33] MA Yuanqiang, LEE G, HEO S Y, et al. Oxidative stress is a key modulator in the development of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Antioxidants, 2022, 11(1): 91.

[34] VERMA P, RISHI B, GEORGE N G, et al. Recent advances and future directions in etiopathogenesis and mechanisms of reactive oxygen species in cancer treatment[J]. Pathology and Oncology Research, 2023, 29: 1611415.

[35] MORE G K, MAKOLA R T. *In-vitro* analysis of free radical scavenging activities and suppression of LPS-induced ROS production in macrophage cells by *Solanum sisymbriifolium* extracts[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 6493.