

9-11-2024

Investigating the inhibitory effect of β -Rb₁-Lip on lipid droplet accumulation in 3T3-L1 adipocytes

YOU Xiaoyan

College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

LIU Hui

College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China

DUAN Xu

College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China, duanxu_dx@163.com

See next page for additional authors

Follow this and additional works at: <https://www.ifoodmm.cn/journal>

Recommended Citation

Xiaoyan, YOU; Hui, LIU; Xu, DUAN; and Yue, CHEN (2024) "Investigating the inhibitory effect of β -Rb₁-Lip on lipid droplet accumulation in 3T3-L1 adipocytes," *Food and Machinery*: Vol. 40: Iss. 7, Article 1.

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2023.81195

Available at: <https://www.ifoodmm.cn/journal/vol40/iss7/1>

This Fundamental Research is brought to you for free and open access by Food and Machinery. It has been accepted for inclusion in Food and Machinery by an authorized editor of Food and Machinery.

Investigating the inhibitory effect of β -Rb₁-Lip on lipid droplet accumulation in 3T3-L1 adipocytes

Authors

YOU Xiaoyan, LIU Hui, DUAN Xu, and CHEN Yue

人参皂苷 Rb₁脂质体的制备及对脂肪细胞中脂滴积聚的抑制作用

Investigating the inhibitory effect of β -Rb₁-Lip on lipid droplet accumulation in 3T3-L1 adipocytes

尤晓颜^{1,2} 刘 慧¹ 段 续¹ 陈 玥²

YOU Xiaoyan^{1,2} LIU Hui¹ DUAN Xu¹ CHEN Yue²

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

摘要: [目的] 制备 β -谷甾醇修饰的人参皂苷 Rb₁ 脂质体 (β -Rb₁-Lip), 减少 Rb₁ 降解并增强人参皂苷 Rb₁ 降脂效果。[方法] 采用薄膜水合法制备了 β -谷甾醇修饰的人参皂苷 Rb₁ 脂质体, 利用 MTT 法评估脂质体的生物安全性, 借助油红 O 染色试验和酶标仪测量 TG 含量, 考察了脂质体 β -Rb₁-Lip 对脂肪细胞 3T3-L1 的脂滴积聚抑制作用。[结果] 制备的 β -Rb₁-Lip 脂质体的包封率为 83.74%, 平均粒径为 198 nm, β -Rb₁-Lip 在 12 h 内 Rb₁ 释放率约为 80%, 表现出良好的缓释效果。对于降脂活性, 50 μ mol/L 的 β -Rb₁-Lip 表现出显著的细胞内脂滴抑制率, 与同浓度 Rb₁ 单体相比, β -Rb₁-Lip 对 3T3-L1 细胞内脂滴的抑制效果更为显著, 且对细胞没有毒副作用。[结论] β -Rb₁-Lip 具有包封率高、粒径小和缓释效果明显的特征, 能够持续释放活性成分人参皂苷 Rb₁, 增强其降脂功效并减少用量。

关键词: 人参皂苷 Rb₁; β -谷甾醇; 3T3-L1 前脂肪细胞; 脂滴积聚; 脂质体

Abstract: [Objective] β -Sitosterol-modified ginsenoside Rb₁ liposomes (β -Rb₁-Lip) were prepared to reduce the degradation of Rb₁ and enhance the lipid-lowering effects of ginsenoside Rb₁. [Methods] β -sitosterol-modified ginsenoside Rb₁ liposomes were prepared by the thin-film hydration method. The biosafety of the liposomes was assessed using the MTT assay. The inhibition of

lipid droplet accumulation in 3T3-L1 adipocytes by β -Rb₁-Lip was investigated using Oil Red O staining and triglyceride (TG) content measurement with an enzyme-linked immunosorbent assay. [Results] The prepared β -Rb₁-Lip liposomes had an encapsulation efficiency of 83.74% and an average particle size of 198 nm. The release rate of Rb₁ from β -Rb₁-Lip was about 80% within 12 hours, demonstrating a good sustained-release effect. Regarding lipid-lowering activity, β -Rb₁-Lip at 50 μ mol/L showed a significant inhibitory rate of intracellular lipid droplets. Compared to the same concentration of Rb₁ monomer, β -Rb₁-Lip had a more significant inhibitory effect on the accumulation of lipid droplets in 3T3-L1 cells and did not exhibit cytotoxicity. [Conclusion] β -Rb₁-Lip has high encapsulation efficiency, small particle size, and obvious sustained-release characteristics. It can continuously release the active component ginsenoside Rb₁, enhance its lipid-lowering efficacy, and reduce the dosage, providing support for the development of Rb₁ lipid-lowering products.

Keywords: ginsenoside Rb₁; β -sitosterol; 3T3-L1 preadipocytes; lipid droplet accumulation; liposome

高脂血症是一种代谢性疾病, 其特征是血液中脂质水平升高, 临床表现为甘油三酯 (TG)、胆固醇、低密度脂蛋白升高 (LDL-C), 高密度脂蛋白降低 (HDL-C)。高脂血症是动脉粥样硬化的主要危险因素之一, 该疾病表现为血管内脂质斑块的形成, 最终导致血管狭窄和阻塞^[1]。这不仅增加了心脏病和中风的风险, 还可能导致其他心血管疾病^[2]。此外, 高脂血症还与代谢性疾病如糖尿病、肥胖等密切相关^[3]。合理的饮食、适度的运动、戒烟和限

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 31200035)

作者简介: 尤晓颜, 男, 河南科技大学副教授, 博士。

通信作者: 段续 (1973—), 男, 河南科技大学教授, 博士。

E-mail: duanxu_dx@163.com

收稿日期: 2023-12-01 改回日期: 2024-05-16

制酒精摄入是管理高脂血症的重要方式^[4]；而对于一些尤其是在改变生活方式后仍患有高脂血症的人，可以使用降脂药物，如他汀类药物、胰岛素抵抗调节剂等，以维持体内正常血脂水平。

人参皂苷 Rb_1 是一种甾体皂苷化合物，是人参的主要活性成分，具有良好的营养和药用价值^[5]。已有研究报道其具有多种生物学功能，包括降脂、抗高血糖、减轻胰岛素抵抗和调节代谢功效等^[6-8]。课题组在前期研究中也发现， Rb_1 具有较好的体内糖脂代谢调节能力， Rb_1 干预后显著降低大鼠血清的 LDL-C、TG 和 TC 的水平，对 HDL-C 水平无影响。与 HFD 组相比， Rb_1 干预后糖化血清蛋白 (GHb) 显著降低，同时血糖有显著下降趋势；此外，在油红 O 染色与 H&E 染色试验中， Rb_1 治疗组使大鼠肝组织中的脂滴聚集显著减少，同时附睾脂肪细胞显著变小，表明其在开发预防治疗高脂血症的保健食品/药品方面具有良好的潜力^[9]。然而，由于人参皂苷在胃酸环境中容易被分解，且肠道黏膜透过性较低，导致口服后其生物利用度受限，制约了其口服制剂的临床应用。为了提高人参皂苷 Rb_1 生物利用度，有研究人员尝试采用纳米递送系统解决该问题，如 Liu 等^[5,10] 通过提高 Rb_1 在纳米胶囊中的包封率约为 99.79%，从而提高 Rb_1 的口服利用度。这些研究为克服人参皂苷 Rb_1 在实践应用中的限制提供了有益的解决方案。

植物甾醇是一种天然的降脂活性物质，其中 β -谷甾醇作为植物甾醇中最为重要的成分之一，具备多种生理活性，能够降低体内胆固醇水平，通过抑制胆固醇吸收促使体内血脂含量降低^[11]。由于 β -谷甾醇分子结构与胆固醇相似，可以替代构建脂质体的主要成分——胆固醇。一方面可以增强磷脂双层的物理和化学性质，同时降低胆固醇可能引发的与补体激活相关的过敏反应和心血管副作用，如肺动脉高压等^[12-13]；另一方面，可以发挥 β -谷甾醇的降脂功能，通过与 Rb_1 联用达到协同增强降脂能力的效果，改善 Rb_1 的生物利用度。尽管目前已有研究^[5,10] 表明通过纳米载体系统可以有效改善或提高人参皂苷 Rb_1 的生物利用度，但关于人参皂苷与植物甾醇联合用于纳米递送系统的构建以提高人参皂苷 Rb_1 的降脂效果及其生物利用度的相关研究还鲜有报道。

研究基于脂质体的两亲性、无毒性 and 生物相容性等特点，结合 β -谷甾醇与人参皂苷 Rb_1 的降脂特性，制备出 β -谷甾醇修饰的 Rb_1 脂质体。并通过结构表征与细胞生物学评价等手段对脂质体的结构与降脂活性进行分析，为人参皂苷 Rb_1 降血脂产品的开发应用提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人参皂苷 Rb_1 ：纯度 98%，上海源叶生物科技有限

公司；

谷甾醇：纯度 70%，上海金穗生物科技有限公司；

L - α -磷脂酰胆碱：纯度 95%，南通飞宇生物科技有限公司；

油红 O 干粉：纯度 $\geq 75\%$ ，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；

小牛血清：美国 Sigma-Aldrich 公司；

DMEM 高糖培养基和丙酮酸钠 100 mmol/L、必需氨基酸 NEAA 溶液 (MEM 无酚红)、青霉素—链霉素—谷氨酰胺 (100 $\times$) 溶液和丙酮酸钠 100 mmol/L：赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司；

多聚甲醛：纯度 4%，上海麦克林生化科技股份有限公司；

无血清细胞冻存液：北京索莱宝生物有限公司；

台盼蓝染色液：0.4%，北京索莱宝生物有限公司；

DMEM (含 $NaHCO_3$ 1.5 g/L) 培养基：赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司；

3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)：纯度 99%，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；

胰岛素：纯度 27 USP/mg，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；

二甲基亚砜：纯度 $\geq 99.9\%$ ，北京索莱宝生物有限公司。

1.2 主要仪器

电子天平：AB104-N 型，梅特勒托利多科技 (中国) 有限公司；

二氧化碳培养箱：BB150-2TCS-L 型，赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司；

超高效液相色谱：ACQUITY Arc 型，沃特世科技有限公司；

倒置荧光显微镜：IX73 型，奥林巴斯光学工业股份有限公司；

超声波细胞粉碎机：JY 92-II DN 型，宁波新芝生物科技股份有限公司；

旋转蒸发仪：N-1300 型，上海爱郎仪器有限公司；

Countess 3 全自动细胞计数仪：AMQAF2000 型，赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司；

高速离心机：5425R 型，艾本德 (上海) 国际贸易有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 脂质体的制备 采用薄膜水和法制备脂质体，将 β -谷甾醇、 L - α 磷脂酰胆碱按照 10 : 50 (毫克数) 的质量比添加，使用二氯甲烷分别充分溶解后，加入圆底烧瓶中。在 48 $^{\circ}C$ 下，通过旋转蒸发仪真空蒸发除去圆底烧瓶中的二氯甲烷，待在瓶底形成一层脂质薄膜。真空干燥 2 h

后,二氯甲烷被充分去除,将 5 mL 溶解有 10 mg 人参皂苷 Rb₁ 的 pH 7.4 的磷酸缓冲液加入圆底烧瓶,在 50 ℃ 下于旋转蒸发仪旋转使瓶壁上的薄膜水化 1 h,均匀分布在缓冲溶液中。将制得的混悬液在室温下使用超声细胞粉碎机超声 10 min,其中仪器功率为 270 W,3 s 超声,5 s 休息,防止功率过大液体发热,损坏仪器影响破碎效率。最后,将制备好的脂质体溶液置于 4 ℃ 冰箱保存^[14]。

1.3.2 脂质体的形态观察 使用 2% 磷钨酸水溶液负染法制备待测样品。取 10 μL 纳米脂质体溶液,小心将样品滴于 300 目纯碳膜铜网格上 10 min,使用滤纸将过量的溶液擦除,将铜网放到 2% 的磷钨酸水溶液上 1 min,水洗后吸干表面多余水分。然后在 80 kV 加速电压下,用 Hitachi HT7700 型透射电镜对其进行观察并拍照^[15]。

1.3.3 脂质体粒径、多分散系数(PDI)、Zeta 电位测定

通过使用 Zetasizer Nano ZS(Malvern instruments, UK)的动态光散射(DLS)技术分析脂质体悬浮液的粒度、多分散指数(PDI),分析脂质体的制备是否成功。在测定之前,用去离子水将样品稀释 10 倍以避免多重散射效应,然后将稀释样品转移到聚苯乙烯试管中,所有测量均在 25 ℃ 下进行,介质折射率为 1.333,之后记录 Size 和 PDI,所有样品设置 3 个平行^[16]。取不同人参皂苷 Rb₁ 脂质体溶液使用去离子水稀释 10 倍,取 1 mL 置于 Zeta 电位样品池中,用马尔文 Nano-ZS90 型电位仪分析测定所制备脂质体的 Zeta 电位。

1.3.4 包封率测定 采用间接法测定包封率(entrapment efficiency, EE)。取 400 μL 脂质体溶液加到超滤管中,于高速离心机离心制备完成的脂质体,转速为 5 741 r/min,离心时间为 30 min。离心完成后,收集下清液,并使用 0.22 μm 滤膜过滤后,采用高效液相色谱法(HPLC),测定下清液中游离的人参皂苷 Rb₁ 含量,记为 W_f;取 100 μL Rb₁ 脂质体溶液,加入 900 μL 甲醇破乳,涡旋振荡 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,使用 0.22 μm 滤膜过滤后,采用高效液相色谱法测定总人参皂苷 Rb₁ 含量,记为 W_z;通过破乳计算的总药物量减去游离的(未包封的)药物含量,按式(1)计算脂质体的包封率。所有测定均包含 3 个平行样品。

$$E = (W_z - W_f) / W_z \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

E——包封率, %;

W_z——脂质体中 Rb₁ 包封的总含量, mg;

W_f——游离的人参皂苷 Rb₁ 的含量, mg。

1.3.5 脂质体的体外模拟药物释放 将 1 mL Rb₁ 脂质体溶液置于能截留相对分子质量 > 8 000 的溶质的透析袋中,将透析袋置于 30 mL PBS(pH 7.4)磷酸缓冲液中,37 ℃ 恒温水浴搅拌,分别于 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 h 处,取 1 mL 透析外介质,并使用 0.22 μm

滤膜过滤,通过 HPLC 检测不同时间段从脂质体中释放出来的 Rb₁ 含量,每次取样后再补加相同体积新鲜磷酸缓冲液到透析外液,保证介质体积不变, HPLC 检测峰面积代入绘制的标准曲线计算 Rb₁ 浓度,得到药物在不同时间点的累计释放量,绘制药物流随时间的释放曲线。

1.3.6 傅里叶红外光谱 将制备好的含有冻干剂的样品于 -80 ℃ 冰箱预冻后置于真空冷冻干燥机干燥后,称取适量无水溴化钾晶体于玛瑙研钵中研磨,直至晶体呈现细腻的粉末状。分别取冻干产物和溴化钾放置于玛瑙研钵中混匀研磨直至无颗粒状^[15]。手动压片,将成片放入红外光谱工作站内,具体参数设置:光谱范围 400 ~ 4 000 cm⁻¹,分辨率 4 cm⁻¹,扫描 64 次,即可开始测试并记录。根据扫描范围和透射率进行作图,对比研究脂质体包裹前后的特征官能团之间差异。分析之前记录背景光谱。

1.3.7 3T3-L1 前脂肪细胞的诱导 将前脂肪细胞 3T3-L1 于细胞培养瓶培养至细胞密度为 70%~80%,将细胞接种于 6 孔板,每孔接种量 1 × 10⁵,使用生长液使细胞长到 100% 融合时并再生长 48 h(记为第 0 天),将细胞培养在含有 0.5 mmol/L IBMX, 1 μg/mL 胰岛素, 1 μmol/L DEX 和 2 μmol/L 罗格列酮的诱导液培养基中培养 2 d,可以看到细胞由融合态的圆形变得更加纤细。后将培养基更换为 1 μg/mL 胰岛素脂肪细胞维持培养基 3 d,由于细胞中开始产生游离的脂肪酸,培养液开始逐渐变黏稠,3 d 之后再使用分化液培养基继续培养 8 d(每 2 d 换培养基一次),之后,脂肪细胞被诱导成功,此时细胞表现出脂肪细胞表型。

1.3.8 细胞毒性试验 3T3-L1 前脂肪细胞按 5 000 个/孔种在 96 孔板上,将细胞与不同浓度 Rb₁ 脂质体(10, 50, 100, 200 μmol/L)共同孵育,并以空白组作为对照与细胞一起孵育,培养 24 h 后进行细胞毒性测试。使用酶标仪测量 490 nm 处的吸光度,并将结果转化为细胞存活率百分比,评估细胞活力。

1.3.9 脂肪细胞中 TG 的含量 油红 O 染色原理:油红 O 为脂溶性染料,在脂肪内能高度溶解,可特异性地使组织内甘油三酯等中性脂肪着色。前脂肪细胞在诱导分化剂的作用下分化为成熟脂肪细胞后,采用油红 O 染色可使分化的细胞内脂质特异性着色,而未分化的细胞和细胞内非脂质聚集的部分不能着色,甘油明胶封片可长期保存。用负载 Rb₁ 的纳米脂质体处理分化的 3T3-L1 细胞 24 h,用磷酸盐缓冲液 PBS 轻柔洗涤细胞 3 次。4% 多聚甲醛在室温下固定 1 h(10% 甲醛 30 min)。再次洗涤使用 PBS 和 60% 异丙醇分别洗涤细胞多次并干燥。使用质量浓度为 0.5 g/100 mL 的油红 O 工作液染色 1 h。蒸馏水漂洗去除未染色的染料并干燥,在倒置显微镜下观察染色的脂滴并拍照。100% 的异丙醇溶解脂滴

15 min(可使用摇床震荡),使用酶标仪在 510 nm 处测量其吸光度测量 TG 含量。

1.4 数据处理

数据和图表使用 GraphPad Prism 8.0 软件生成,数据表示为 Mean±SD。平均值采用非配对 *t* 检验进行比较,显著性水平设定为 0.05($P<0.05$),所有测量值重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 脂质体形态及其理化性质

采用透射电镜对荷载 Rb_1 的脂质体 β - Rb_1 -Lip 和未荷载 Rb_1 的空载脂质体 β -Lip 的形态进行观察。如图 1 所示,两种脂质体均呈现球状结构, β -Lip 外形圆润光滑, β - Rb_1 -Lip 外层凹凸,内层存在明显的包裹结构,这与人参皂苷 Rb_1 包裹在脂质体的亲水性内核中有关。与 β -Lip 相比, β - Rb_1 -Lip 的粒径及 Zeta 电位无明显变化,这与两者的粒径分布结果相一致。由表 1 可知, β - Rb_1 -Lip 的粒径、多分散指数、Zeta 电位和包封率分别为 (197.37 ± 0.98) nm、 0.16 ± 0.02 、 (-0.83 ± 0.05) mV 和 83.73%。杨艳芳等^[17]研究发现,纳米粒子的膜透过性与其粒径有关,随粒径增加透膜效率降低,粒径 500 nm 以上的粒子很难跨越极性上皮细胞进入循环系统,粒径为 20~200 nm 的脂质体是局部药物通过细胞间渗透途径进入活表皮的最佳状态。 β - Rb_1 -Lip 的粒径低于 200 nm,表明其具有良好的透膜效果。

2.2 β - Rb_1 -Lip 的体外释放效果

以游离人参皂苷 Rb_1 (FR b_1) 为对照,对脂质体 β - Rb_1 -Lip 的体外释放效果进行了测定,结果如图 2 所示。游离人参皂苷 Rb_1 在前 3 h 内即从透析袋内向外部

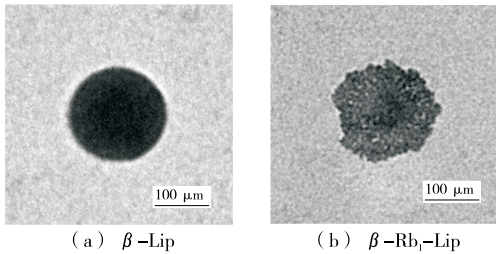


图 1 β -Lip 和 β - Rb_1 -Lip 的形态观察
Figure 1 Structural morphology of liposomes β -Lip and β - Rb_1 -Lip

表 1 β -Lip 和 β - Rb_1 -Lip 的理化性质特征				
Table 1 Physicochemical properties of β -Lip and β - Rb_1 -Lip				
样品	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%
β -Lip	196.35 ± 4.37	0.24 ± 0.01	-0.82 ± 0.68	—
β - Rb_1 -Lip	196.37 ± 0.98	0.16 ± 0.02	-0.83 ± 0.05	83.73

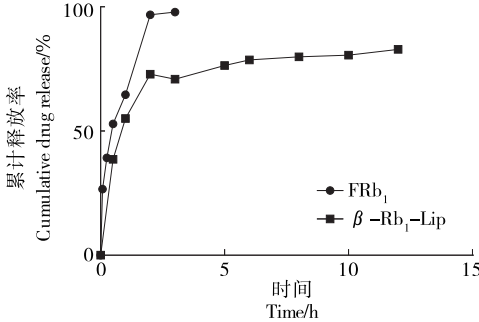


图 2 游离人参皂苷 Rb_1 和 β - Rb_1 -Lip 的体外药物释放曲线
Figure 2 The cumulative drug release of liposomes and free Rb_1

快速释放完毕(释放率 100%),表明透析袋对药物释放没有保留效应^[10]。与之相比较,脂质体 β - Rb_1 -Lip 荷载的人参皂苷 Rb_1 则具有明显的缓释效果,在前 2 h 内 β - Rb_1 -Lip 组显示 Rb_1 快速释放,可能是样品中部分游离的 Rb_1 及附着在脂质体表面未封装的 Rb_1 在模拟体外释放过程中从透析袋中突释^[18]。随后, Rb_1 释放率缓慢增加,在 12 h 时 β - Rb_1 -Lip 中 Rb_1 释放率约为 80%,表现出明显的缓释效果,可能是由于脂质体的双分子层对 β - Rb_1 -Lip 中的 Rb_1 起到了屏障保护作用,可以促进药物的长期吸收,从而提高其生物利用度^[19]。

2.3 傅里叶红外光谱分析

采用 FTIR 对脂质体 β - Rb_1 -Lip 在不同波长下的红外辐射吸收特性进行分析,对其结构进行表征。 Rb_1 单体和脂质体 β - Rb_1 -Lip 的 FTIR 光谱图如图 3 所示。 Rb_1 单体的红外光谱在 $3\,366\text{ cm}^{-1}$ 处有一个宽吸收峰,这是—OH 基团拉伸振动特征峰,在 $2\,944\text{ cm}^{-1}$ 处的峰对应— CH_2 基团的拉伸振动,C=O 和 C—O—C 键分别位于 $1\,647.7\text{ cm}^{-1}$ 处和 $1\,038, 1\,074, 1\,162\text{ cm}^{-1}$ 处。—CH 的弯曲振动出现在 $1\,387.9, 626\text{ cm}^{-1}$ 6 个环中。相对于 Rb_1 单体,脂质体 β - Rb_1 -Lip 在 $2\,944\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰增强, $1\,647.7\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰发生偏移,可能是由于磷脂分子与 β -谷甾醇和 Rb_1 单体通过氢键发生相互作用;此外,与空

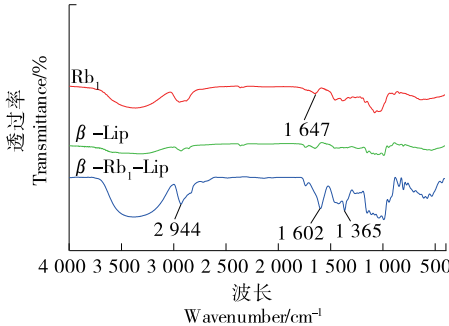


图 3 Rb_1 、 β -Lip 及 β - Rb_1 -Lip 的傅里叶红外光谱图
Figure 3 FT-TR spectra of Rb_1 , β -Lip and β - Rb_1 -Lip

白的 β -Lip 相比在 $1\ 602\ \text{cm}^{-1}$ 处出现吸收峰增强,在 $1\ 365\ \text{cm}^{-1}$ 处—CH 弯曲振动增强,可能是因为 Rb₁ 包裹在脂质体中使得脂质体的红外辐射吸收特性发生了变化^[20]。

2.4 细胞毒性试验

在 3T3-L1 细胞增殖分化过程中,使用不同剂量(10, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$)的 β -Rb₁-Lip 脂质体处理 3T3-L1 细胞 24 h 后,通过 MTT 检测试剂盒检测不同浓度的 β -Rb₁-Lip 脂质体对 3T3-L1 脂肪细胞活力是否有影响。如图 4 所示,不同浓度 β -Rb₁-Lip 脂质体对 3T3-L1 脂肪细胞生长增殖无明显毒副作用,且各组之间差异不显著,表明脂质体 β -Rb₁-Lip 在所选取的浓度范围内生物兼容性较好,可以用于后续研究。

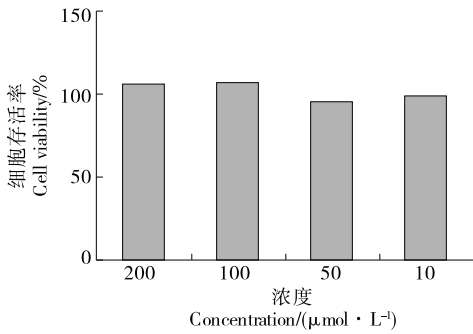


图 4 β -Rb₁-Lip 的 MTT 检测

Figure 4 The MTT assay of β -Rb₁-Lip

2.5 3T3-L1 前脂肪细胞的诱导及脂质体干预后脂滴积聚情况

采用 IPS 诱导的方式,对 3T3-L1 前脂肪细胞进行诱导,如图 5 所示,脂肪细胞在诱导之前呈梭形,未见明显脂滴;培养诱导 10 d 后,细胞由梭形变圆,出现小圆形脂

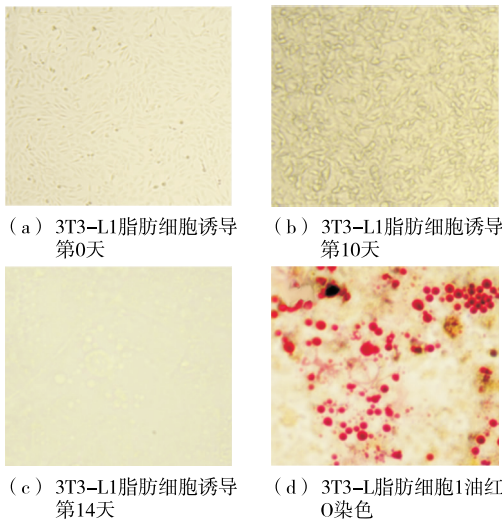
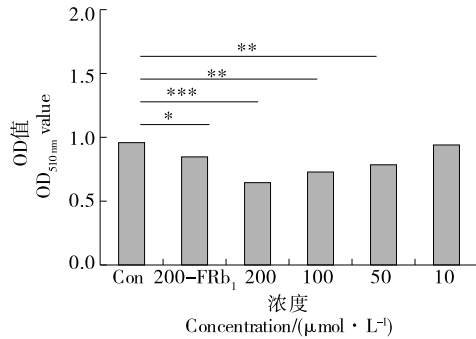


图 5 3T3-L1 脂肪细胞的诱导

Figure 5 Induction of 3T3-L1 adipocytes

滴;继续诱导 2 d,细胞变得更大,多为圆形或椭圆形,胞浆内脂滴随之变多;诱导第 14 天,80% 以上的细胞内出现大量脂滴。与此同时,在对照组细胞中出现明显的“环状”脂滴,证明 3T3-L1 前脂肪细胞在第 14 天被成功诱导成为成熟的脂肪细胞。从图 6 可以看出,与空白对照组相比较,200 $\mu\text{mol/L}$ 游离的单体 Rb₁ 组(对照组)中脂滴堆积面积减少,通过酶标仪测量 TG 含量,发现二者差异显著。由图 7 可知,与对照组相比,相同浓度的 Rb₁ 脂质体组中脂滴堆积面积减少,表明同浓度的脂质体对



* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图 6 3T3-L1 脂肪细胞的 TG 含量测定
Figure 6 Determination of TG content of 3T3-L1 adipocytes

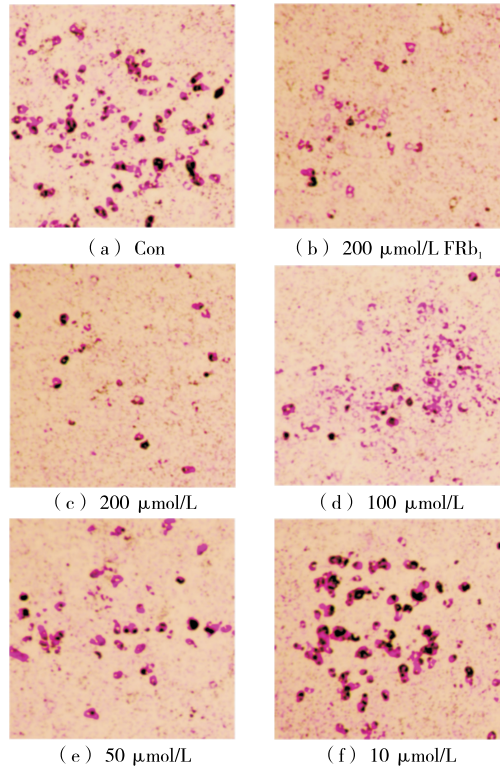


图 7 3T3-L1 脂肪细胞油红 O 染色结果

Figure 7 Results of oil red O staining of 3T3-L1 adipocytes

3T3-L1 脂肪细胞中脂滴生成的抑制率大于相同浓度游离的人参皂苷 Rb_1 。此外, 50 $\mu\text{mol/L}$ 脂质体的脂滴抑制率大于 200 $\mu\text{mol/L}$ 游离 Rb_1 的, 结果具有显著性 ($P < 0.05$)。与体外释放结果相吻合, 脂质体 $\beta\text{-}Rb_1\text{-Lip}$ 对 3T3-L1 脂肪细胞脂滴的抑制作用优于相同浓度的游离单体 Rb_1 。

3 结论

采用薄膜水和法制备了谷甾醇修饰的人参皂苷 Rb_1 脂质体, 通过对脂质体进行结构与性质表征发现加入人参皂苷 Rb_1 后脂质体结构发生明显变化, 脂质体表面粗糙, 形状由圆润变得不规则; 此外, 脂质体具有较小的粒径和较高的包封率, 有较好的缓释特性。试验结果表明, 随着人参皂苷 Rb_1 浓度增加, 谷甾醇修饰的人参皂苷 Rb_1 脂质体对 3T3-L1 无明显细胞毒性, 可以用于后续试验的探究。与游离人参皂苷 Rb_1 相比, 相同浓度人参皂苷 Rb_1 脂质体对脂滴生成的抑制作用更好, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的人参皂苷 Rb_1 脂质体对脂滴积聚的抑制作用显著大于 200 $\mu\text{mol/L}$ 游离人参皂苷 Rb_1 。

综上所述, 薄膜水和法能够成功制备出谷甾醇修饰对 3T3-L1 细胞无明显毒副作用的人参皂苷 Rb_1 脂质体; 该脂质体可以抑制成熟脂肪细胞中脂滴积聚, 推测具有预防肥胖及相关并发症潜力。

参考文献

- [1] NORDESTGAARD B G. Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from epidemiology, genetics, and biology[J]. *Circulation Research*, 2016, 118(4): 547-563.
- [2] KARR S. Epidemiology and management of hyperlipidemia[J]. *Am J Manag Care*, 2017, 23: S139-S148.
- [3] KHAN S S, PETITO L C, HUANG X. Body mass index, adverse pregnancy outcomes, and cardiovascular disease risk[J]. *Circ Res*, 2023, 133: 725-735.
- [4] JACOBSON T A, ITO M K, MAKI K C. National lipid association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia part 1: full report[J]. *Clin Lipidol*, 2015, 9(2): 129-169.
- [5] LIU Y, ZHU H Y, ZHOU W, et al. Anti-inflammatory and anti-gouty-arthritic effect of free ginsenoside Rb_1 and nano ginsenoside Rb_1 against MSU induced gouty arthritis in experimental animals[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 332: 109285.
- [6] ZHOU R R, HE D, ZHANG H C, et al. Ginsenoside Rb_1 protects against diabetes-associated metabolic disorders in Kkay mice by reshaping gut microbiota and fecal metabolic profiles [J]. *Ethnopharmacol*, 2023, 303: 115997.
- [7] 马艺鑫, 宁顺宇, 陈丝, 等. 基于 N-糖基化修饰组学探究人参皂苷 Rb_1 改善高脂血症大鼠脂代谢紊乱机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2023, 43(9): 1 100-1 107.
- [8] MA Y X, NING S Y, CHEN S, et al. Exploring the mechanism of ginsenoside Rb_1 to improve lipid metabolism disorder in hyperlipidaemic rats based on N-glycosylation modification histology[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2023, 43(9): 1 100-1 107.
- [9] ZHOU P, XIE W J, HE S B, et al. Ginsenoside Rb_1 as an anti-diabetic agent and its underlying mechanism analysis [J]. *Cells*, 2019, 8(3): 204-222.
- [10] ZOU H, ZHANG M, ZHU X T, et al. Ginsenoside Rb_1 improves metabolic disorder in high-fat diet-induced obese mice associated with modulation of gut microbiota[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 826487.
- [11] DU L X, LU H L, XIAO Y F, et al. Preparation, characterization and in vivo pharmacokinetic study of ginsenoside Rb_1 -PLGA nanoparticles[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 18472.
- [12] 卢婧霞, 郑祖国, 徐志猛, 等. 植物甾醇降血脂机制研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(21): 4 552-4 559.
- [13] LU J X, ZHENG Z G, XU Z M, et al. Progress in the study of lipid-lowering mechanism of phytosterols[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44(21): 4 552-4 559.
- [14] NIYONZIMA N, HALVORSEN B, SPORSHEIM B. Complement activation by cholesterol crystals triggers a subsequent cytokine response[J]. *Mol Immunol*, 2017, 84: 43-50.
- [15] WANG G F, GUAN L H, ZHOU D. Serum high-density lipoprotein cholesterol is significantly associated with the presence and severity of pulmonary arterial hypertension: a retrospective cross-sectional study[J]. *Adv Ther*, 2020, 37(5): 2 199-2 209.
- [16] LIU W L, LIU J H, LIU W, et al. Improved physical and in vitro digestion stability of a polyelectrolyte delivery system based on layer-by-layer self-assembly alginate-chitosan-coated nanoliposomes[J]. *Agric Food Chem*, 2013, 61(17): 4 133-4 144.
- [17] CUI T T, JIA A R, YAO M K, et al. Characterization and caco-2 cell transport assay of chito-oligosaccharides nano-liposomes based on layer-by-layer coated[J]. *Molecules*, 2021, 26(14): 4 144-4 159.
- [18] RAFIEE Z, BARZEGAR M, SAHARI M A. Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high-valued phenolic compounds of pistachio green hull extract [J]. *Food Chemistry*, 2017, 220: 115-122.
- [19] 杨艳芳, 谢向阳, 杨阳, 等. 粒径与表面电荷影响脂质体体内药物靶向递送的研究进展[J]. *药学报*, 2013, 48(11): 1 644-1 650.
- [20] YANG Y F, XIE X Y, YANG Y, et al. Advances in the study of particle size and surface charge affecting in vivo targeted drug delivery by liposomes[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2013, 48(11): 1 644-1 650.

(下转第 80 页)

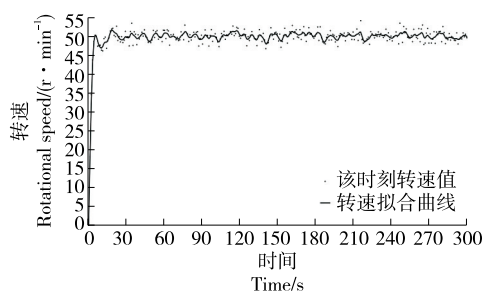


图 7 揉捻机样机及转速测试曲线图

Figure 7 Twisting machine prototype and speed test curve diagram

3 种系统进行仿真试验。结果表明,在茶叶揉捻桶转速控制中,引入模糊 PID 的系统综合性能最优,且其抗干扰能力最强,满足转速精确恒定控制的要求。后续将进一步研究揉捻过程中的其他因素与揉捻桶转速之间的相互影响关系,提高模型精度。

参考文献

- [1] 杨晓平. 茶叶生产与加工机械化[J]. 现代农机, 2012(5): 24-25.
YANG X P. Mechanization of tea production and processing[J]. Modern Agricultural Machinery, 2012(5): 24-25.
- [2] 赵进, 张越, 赵丽清, 等. 茶叶揉捻机组自动控制系统设计[J]. 中国农机化学报, 2019, 40(2): 140-144.
ZHAO J, ZHANG Y, ZHAO L Q, et al. Design of automatic control system for tea disc-roller [J]. Journal of Chinese Agricultural Mechanization, 2019, 40(2): 140-144.
- [3] DI S, CHENG C L, PENG S. Robust fuzzy model predictive control for energy management systems in fuel cell vehicles[J]. Elsevier Ltd, 2020, 98: 104364.
- [4] 曹成茂, 吴正敏, 梁闪闪, 等. 茶叶杀青机双模糊控制系统设计与试验[J]. 农业机械学报, 2016, 47(7): 259-265.
CAO C M, WU Z M, LIANG S S, et al. Design and experiment of double fuzzy control system for tea cylinder water-removing machine[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2016, 47(7): 259-265.
- [5] 高育森, 任金波, 李梅娟, 等. 基于模糊 PID 控制的茶叶炭焙烘焙机设计与试验[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 96-101.
GAO Y S, REN J B, LI M J, et al. Design and test of tea charcoal roasting machine based on fuzzy PID control[J]. Food & Machinery, 2021, 37(3): 96-101.
- [6] 唐伟, 王立忠, 庄健, 等. 无刷直流电机的模糊自整定 MRPID 转速控制方法研究[J]. 中国机械工程, 2021, 32(15): 1 786-1 792, 1 800.
TANG W, WANG L Z, ZHUANG J, et al. Study on fuzzy self-tuning MRPID control method in rotating speed control of BLDCM [J]. China Mechanical Engineering, 2021, 32(15): 1 786-1 792, 1 800.
- [7] 吴斌, 付鹏. 基于模糊分数阶 PID 的电动汽车换挡过程转速控制[J]. 北京工业大学学报, 2022, 48(10): 1 069-1 077.
WU B, FU P. Rotating speed control of electric vehicle during gear shift process based on fuzzy fractional PID[J]. Journal of Beijing University of Technology, 2022, 48(10): 1 069-1 077.
- [8] JIN X, CHEN K K, ZHAO Y, et al. Simulation of hydraulic transplanting robot control system based on fuzzy PID controller[J]. Measurement, 2020, 164: 108023.
- [9] SOMWANSHI D, BUNDELE M, KUMAR G, et al. Comparison of Fuzzy-PID and PID controller for speed control of DC motor using LabVIEW[J]. Procedia Computer Science, 2019, 152: 252-260.
- [10] 任玲, 王宁, 曹卫彬, 等. 番茄钵苗整排取苗手定位的模糊 PID 控制[J]. 农业工程学报, 2020, 36(8): 21-30.
REN L, WANG N, CAO W B, et al. Fuzzy PID control of manipulator positioning for taking the whole row seedlings of tomato plug seedlings[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2020, 36(8): 21-30.
- [11] 罗一, 石艳. 基于模糊 PID 控制的窖池温度监控设计[J]. 食品与机械, 2023, 39(3): 85-90.
LUO Y, SHI Y. The environment monitoring system of cellar based on fuzzy PID control[J]. Food & Machinery, 2023, 39(3): 85-90.
- [12] 姚颖飞, 陈学庚, 纪超, 等. 基于模糊 PID 控制的玉米精量播种机单体驱动器设计与试验[J]. 农业工程学报, 2022, 38(6): 12-21.
YAO Y F, CHEN X G, JI C, et al. Design and experiments of the single driver for maize precision seeders based on fuzzy PID control[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2022, 38(6): 12-21.
- [13] 张雁, 李彦明, 刘翔鹏, 等. 水稻直播机自动驾驶模糊自适应控制方法[J]. 农业机械学报, 2018, 49(10): 30-37.
ZHANG Y, LI Y M, LIU X P, et al. Fuzzy adaptive control method for autonomous rice seeder[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(10): 30-37.

(上接第 6 页)

- [18] ZHANG J, HAN X Z, LI X, et al. Core-shell hybrid liposomal vesicles loaded with panax notoginsenoside: preparation, characterization and protective effects on global cerebral ischemia/reperfusion injury and acute myocardial ischemia in rats[J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 4 299-4 310.
- [19] 周柳莎, 胡香莲, 俞瑜媛, 等. 荞麦糖肽脂质体的制备及其稳定性和缓释研究[J]. 中国粮油学报, 2024, 39(4): 119-130.
ZHOU L S, HU X L, YU Y Y, et al. Preparation, stability and sustained release of buckwheat glycopeptide liposomes[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2024, 39(4): 119-130.
- [20] HOANG T, RAMADASS K, LOC T T. Novel drug delivery system based on ginsenoside Rb₁ loaded to chitosan/alginate nanocomposite films[J]. Nanosci Nanotechnol, 2019, 19(6): 3 293-3 300.