

紫苏多糖体外抗氧化活性及对肝细胞氧化损伤的保护作用

王士博, 孔令雪, 刘金娟

(江苏师范大学 生命科学学院, 江苏 徐州 221116)

摘要:旨在为紫苏饼粕的高值化利用提供参考,以采用水提醇沉法从紫苏粕中提取的紫苏多糖(PMP)为原料,检测其对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH \cdot)和亚硝酸盐(NO_2^-)的清除能力,考察其体外抗氧化活性;同时,使用 H_2O_2 建立LO2细胞氧化损伤模型,在细胞水平上探讨PMP的抗氧化能力,并进一步研究PMP对LO2肝细胞氧化应激损伤的保护作用机制。结果表明:PMP对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、DPPH \cdot 、 NO_2^- 均具有一定的清除能力,其 EC_{50} 分别为964.59、6376.84、333.55、275.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$;LO2细胞氧化损伤模型的构建条件为 H_2O_2 浓度800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理时间24 h;PMP可显著提高 H_2O_2 诱导损伤的LO2细胞活力,当PMP质量浓度为1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞活力可提高至92.46%;在保护LO2细胞氧化损伤机制方面,PMP显著降低 H_2O_2 诱导的细胞内活性氧(ROS)生成水平,提升线粒体膜电位,提高细胞内谷胱甘肽(GSH)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性,减少丙二醛(MDA)的含量,并通过显著上调凋亡蛋白Bcl-2的表达和下调Bax的表达改善氧化应激损伤引起的细胞凋亡,提高细胞的增殖活性。综上,PMP表现出一定的自由基清除活性以及对 H_2O_2 氧化损伤的LO2细胞的保护作用。

关键词:紫苏多糖;自由基清除;肝细胞;氧化应激;细胞凋亡

中图分类号:TS206;TS209

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2024)09-0120-08

In vitro antioxidant activity of polysaccharide from perilla seed meal and its protective effects against oxidative stress – induced damage of hepatocytes

WANG Shibo, KONG Lingxue, LIU Jinjuan

(School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China)

Abstract: To provide reference for the high-value utilization of perilla seed meal, perilla polysaccharide (PMP) prepared from perilla seed meal by water solution and alcohol precipitation was used as material, and its *in vitro* antioxidant activity was analyzed by detecting the scavenging rate of hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH \cdot), nitrite (NO_2^-). At the same time, H_2O_2 was used to establish LO2 hepatocyte damage model, and the antioxidant ability of PMP was investigated in cellular level. The protective mechanism of PMP on LO2 hepatocytes oxidative stress damage was further studied. The results showed that PMP had certain scavenging ability to $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, DPPH \cdot and NO_2^- , and their EC_{50} values were 964.59, 6376.84, 333.55, 275.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. A concentration of 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 treatment for 24 h was

收稿日期:2023-06-05;修回日期:2024-05-17

基金项目:国家自然科学基金(81603150);江苏师范大学研究生科研与实践创新计划(2022XKT0895)

作者简介:王士博(1982),女,硕士研究生,研究方向为食品生物技术(E-mail) 2385711981@qq.com。

通信作者:刘金娟,副教授(E-mail) jllbest@jsnu.edu.cn。

selected as the construction condition for the oxidative damage model of LO2 cells. PMP could significantly increase the viability of LO2 cells with H_2O_2 -induced damage, and the cell viability increased to 92.46% when the PMP mass concentration was 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In terms of

the mechanism of protecting LO2 cells from oxidative damage, PMP significantly reduced the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) induced by H_2O_2 , increased mitochondrial membrane potential, increased the content of glutathione (GSH) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in cells, reduced the level of malondialdehyde (MDA), and improved the apoptosis caused by oxidative stress damage by significantly up-regulating the expression of apoptotic protein Bcl-2 and down-regulating the expression of Bax. In summary, PMP exhibit certain free radical scavenging activity and protective effects on LO2 cells damaged by H_2O_2 .

Key words: perilla polysaccharide; free radical scavenging; hepatocytes; oxidative damage; cell apoptosis

氧化应激是指机体内氧化-抗氧化能力系统失去平衡,导致体内过多的活性氧(ROS)积累,体内的大分子物质(蛋白质、脂质和核酸等)受到损伤,最终引起疾病的发生^[1]。ROS过量积累是酒精性肝损伤、药物性肝损伤等多种肝脏疾病发生的特征之一^[2]。某些肝毒性药物主要是产生过量的ROS,抑制线粒体内过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性,从而引起线粒体损伤,进而促发细胞凋亡与炎症,最终导致肝损伤^[3]。在酒精性肝病中,酗酒引起的过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子(O_2^-)的过量产生会导致线粒体氧化应激,导致细胞膜发生氧化,增加膜的通透性,诱导细胞凋亡^[4]。在非酒精性脂肪肝中,局部炎症引起ROS爆发,导致脂质过氧化、细胞因子释放,导致线粒体损伤和细胞凋亡^[5]。因此,筛选能有效调控氧化应激引起肝细胞损伤的抗氧化剂,是预防和辅助治疗肝脏疾病的有效手段之一。研究表明,植物多糖具有抗氧化活性,可调节机体内自由基水平,同时也可增强机体免疫力,有助于维持机体的氧化动态平衡^[5]。由于植物多糖毒副作用小,其抗氧化活性日益受到关注。

紫苏 [*Perilla frutescens* (L.) Britt.] 为唇形科紫苏属,一年生草本植物,在我国有大量分布。我国关于紫苏的记载最早始于公元前300年,现在紫苏和紫苏籽均在国家卫生健康委员会公布的“药食同源”名单中^[6]。紫苏籽是紫苏的干燥成熟果实,富含油脂,还含有黄酮、多酚等多种活性成分,具有多种潜在的保健和药理作用^[7]。目前,国内外关于紫苏籽的利用主要是提取油脂。紫苏饼粕是紫苏籽制油后的副产物,大部分直接作为饲料,或直接丢弃,不仅造成资源浪费,而且污染环境。紫苏饼粕中含有多糖、黄酮、多酚等活性物质^[8]。目前,对紫苏饼粕中多糖的研究主要集中于其提取工艺,而对其功

能方面,特别是抗氧化护肝的研究报道较少。

本研究测定了紫苏多糖(PMP)对羟自由基($\cdot OH$)、超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)、亚硝酸盐(NO_2^-)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH \cdot)的清除作用,并且建立 H_2O_2 诱导LO2细胞氧化损伤模型,探讨PMP对肝细胞的保护作用,并且进一步研究其作用机制,以期为紫苏饼粕的高值化利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

紫苏多糖(多糖含量大于95%),采用水提醇沉法^[9]从紫苏粕中提取;LO2细胞,中国科学院上海生命科学院;胎牛血清、DMEM完全培养基,美国Gibco公司;ROS检测试剂盒、JC-1检测试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;SOD、CAT、谷胱甘肽(GSH)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,美国Bioworld公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器与设备

BS110S型电子天平,超纯水机,5418型离心机,HH型电热恒温水槽,IBE2000显微镜,DM5000正置荧光显微镜,CO₂细胞培养箱,微孔板检测仪,电泳仪及转膜仪。

1.2 实验方法

1.2.1 PMP体外抗氧化活性研究

$\cdot OH$ 清除率,采用邻二氮菲-Fe²⁺氧化法^[10]测定; $O_2^- \cdot$ 清除率,采用邻苯三酚自氧化法^[10]测定;DPPH \cdot 清除率,参考陈子涵等^[11]的方法测定; NO_2^- 清除率,采用盐酸萘乙二胺法^[11]测定。

1.2.2 PMP 抗 LO2 肝细胞氧化应激损伤能力研究

1.2.2.1 细胞培养

将 LO2 细胞培养于 DMEM 完全培养基中,于 37℃、5% (体积分数,下同) CO₂ 恒温培养箱中培养。当细胞长至 70% ~ 80% 时,进行传代,取对数期细胞进行以下实验。

1.2.2.2 PMP 安全剂量的筛选

取对数期 LO2 细胞接种于含有 DMEM 完全培养基的 96 孔板中,每孔接种量为 2×10^5 个/mL,培养 24 h,待 LO2 细胞贴壁后,弃去培养基,加入含不同质量浓度 PMP 的 DMEM 完全培养基,继续培养 24 h,采用 Alamar blue 法^[11]测定 LO2 细胞活力,以细胞活力不小于 95% 确定 PMP 的安全使用剂量。

1.2.2.3 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞氧化损伤模型的建立

将对数期 LO2 细胞接种于含有 DMEM 完全培养基的 96 孔板中,每孔接种量为 2×10^5 个/mL,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,弃去培养基,加入含不同浓度 H₂O₂ 的 DMEM 完全培养基,分别处理一定时间,采用 Alamar blue 法^[11]测定 LO2 细胞活力,确定建模所需的 H₂O₂ 浓度和处理时间。

1.2.2.4 PMP 对 H₂O₂ 氧化损伤 LO2 细胞活力的影响

将对数期 LO2 细胞接种于含有 DMEM 完全培养基的 96 孔板中,每孔接种量为 2×10^5 个/mL,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h,待细胞贴壁后,分为对照组、模型组、PMP 处理组 (200、400、800、1 000 μg/mL)。其中 PMP 处理组弃去培养基后,用含有不同质量浓度 PMP 的 DMEM 完全培养基干预 2 h,弃去 PMP 处理组与模型组中的培养基,加入含建模所需浓度 H₂O₂ 的 DMEM 完全培养基处理一定时间 (1.2.2.3 建模确定的处理时间)。然后,采用 Alamar blue 法^[11]测定各组 LO2 细胞活力,同时利用倒置显微镜观察各组的细胞形态。

1.2.2.5 PMP 对 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞内 ROS 产生的影响

采用 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内 ROS 的水平^[12]。按照 1.2.2.4 中的方法处理细胞,胰酶消化后收集细胞,每孔加入终浓度为 5 μmol/L 的 DCFH-DA 荧光探针,于 37℃ 下避光反应 20 min,离心去上清,磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 2 次后, PBS 重悬,在荧光显微镜下观察细胞的荧光强度。

1.2.2.6 PMP 对 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞内线粒体膜电位变化的影响

按照 1.2.2.4 中的方法处理细胞后获得细胞悬

液,按照 JC-1 检测试剂盒说明书处理后于荧光显微镜下观察 LO2 细胞内线粒体红、绿荧光强度变化情况。

1.2.2.7 PMP 对 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞培养液内 LDH 活性的影响

按照 1.2.2.4 中的方法处理细胞后,取细胞培养上清液作为样本,利用 LDH 检测试剂盒检测样品中 LDH 活性。

1.2.2.8 PMP 对 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞内抗氧化酶系的影响

按照 1.2.2.4 中的方法处理细胞,胰酶消化后收集细胞,加入 RIPA 细胞裂解液,取上清液作为样本,采用 GSH、SOD、MDA 和 CAT 检测试剂盒检测细胞内 GSH、SOD、MDA 和 CAT 活性。

1.2.2.9 PMP 对 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞凋亡的影响

按照 1.2.2.4 中的方法处理细胞后,收集细胞,采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞的凋亡情况。

1.2.2.10 PMP 对 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞内凋亡相关蛋白表达量的影响

按照 1.2.2.4 中的方法处理细胞后,收集细胞,提取细胞总蛋白,运用 Western blot 进行相关蛋白表达量的检测^[13]。

1.2.3 数据处理

每个实验均重复 3 次,结果以“平均值 ± 标准偏差”表示,采用 SPSS 16.0 软件对数据进行分析, $p < 0.05$ 具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 PMP 体外抗氧化活性

·OH 是一种氧化能力很强的自由基,几乎可以与所有生物大分子发生反应,反应速度快,是造成组织脂质过氧化、核酸断裂、蛋白质和多糖分解,导致细胞坏死或突变的一种活性氧自由基,因此·OH 清除能力可以作为体外抗氧化活性评价的重要指标。O₂⁻·清除能力也是体外抗氧化活性评价的重要指标。DPPH·是一种相对稳定的自由基,也常用来评价抗氧化剂的抗氧化活性。NO₂⁻会在人体中合成亚硝酸胺,对人体产生一定的损伤,还可刺激肿瘤细胞的生长。测定了 PMP 对·OH、O₂⁻·、DPPH·和 NO₂⁻的清除率,结果如表 1 所示。

由表 1 可知,PMP 质量浓度为 62.5 ~ 1 000 μg/mL 时,·OH 清除率为 8.78% ~ 49.70%,PMP 对·OH 的清除能力随着其质量浓度的增加而总体逐渐增强,具有明显的剂量依赖性,其 EC₅₀ 为 964.59 μg/mL。这

与朱建飞等^[14]研究发现的PMP对·OH有一定的清除作用的研究结果一致。

表1 PMP对自由基及亚硝酸盐的清除能力

自由基/ 亚硝酸盐	清除率/%					EC ₅₀ /(μg/mL)
	62.5 μg/mL	125 μg/mL	250 μg/mL	500 μg/mL	1 000 μg/mL	
·OH	8.78 ± 1.32	22.17 ± 1.50	22.03 ± 1.13	40.18 ± 0.97	49.70 ± 2.10	964.59
O ₂ ⁻ ·	3.40 ± 0.42	5.17 ± 1.21	10.30 ± 1.03	11.26 ± 0.80	21.76 ± 1.09	6 376.84
DPPH·	12.40 ± 0.73	33.61 ± 2.71	45.79 ± 2.13	57.16 ± 3.82	72.95 ± 4.19	333.55
NO ₂ ⁻	32.00 ± 0.42	47.26 ± 1.27	49.40 ± 1.23	56.06 ± 0.97	60.75 ± 2.19	275.24

注:EC₅₀指的是清除率为50%时所对应的PMP质量浓度

由表1可知,PMP质量浓度为62.5~1 000 μg/mL时,O₂⁻·清除率为3.40%~21.76%,PMP对O₂⁻·的清除能力呈现一定的剂量依赖性,另外,其EC₅₀为6 376.84 μg/mL,说明PMP对O₂⁻·的清除能力很弱。朱建飞等^[14]研究表明,在低质量浓度范围内PMP的O₂⁻·清除率随其质量浓度的升高呈现上升趋势,而超过一定质量浓度后O₂⁻·清除率呈下降趋势,当PMP质量浓度达到1 mg/mL时,反而促进了自由基的形成,O₂⁻·清除率呈负值,该结果与本研究结果有些不同,可能是因为提取方法不同导致的多糖结构和组成不同所致。

由表1可知,PMP质量浓度为62.5~1 000 μg/mL时,DPPH·清除率为12.40%~72.95%,PMP对DPPH·的清除能力表现出一定的剂量依赖性,其EC₅₀为333.55 μg/mL。

由表1可知,PMP质量浓度为62.5~1 000 μg/mL时,NO₂⁻清除率为32.00%~60.75%,PMP对NO₂⁻的清除能力具有一定的剂量依赖性,其EC₅₀为275.24 μg/mL。

2.2 PMP抗肝LO2细胞氧化应激损伤能力

2.2.1 PMP对LO2细胞活力的影响

按1.2.2.2方法考察PMP质量浓度对LO2细胞活力的影响,结果如图1所示。

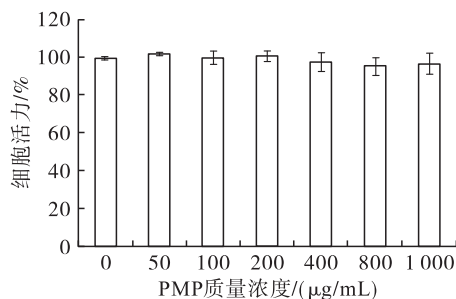


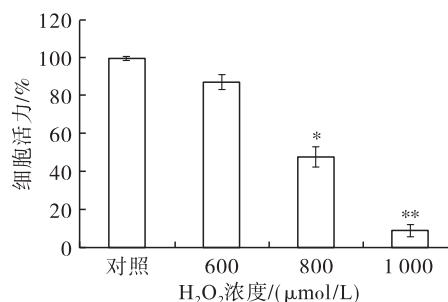
图1 PMP质量浓度对LO2细胞活力的影响

由图1可知,在0~1 000 μg/mL质量浓度范围内,PMP对LO2细胞活力无显著影响($p > 0.05$),PMP质量浓度为1 000 μg/mL时,LO2细胞活力为92.46%,上述结果说明PMP在此质量浓度范围内

对LO2细胞无明显毒性作用,后续研究在PMP质量浓度200~1 000 μg/mL范围内进行。

2.2.2 H₂O₂诱导LO2细胞氧化损伤模型的建立

H₂O₂是一种重要的活性氧分子,通常用于建立体外氧化损伤模型,而细胞活力的降低是成功建立氧化损伤模型的重要标志之一。按1.2.2.3方法,在H₂O₂处理24 h的条件下,考察H₂O₂浓度对LO2细胞活力的影响,结果如图2所示。



注:*表示与对照组(不加H₂O₂)相比具有显著差异($p < 0.05$);**表示与对照组相比具有极显著差异($p < 0.01$)。图3同

图2 H₂O₂浓度对LO2细胞活力影响

由图2可知,不同浓度H₂O₂处理LO2细胞24 h后对细胞的活力均有一定的抑制作用,但与对照组相比,H₂O₂浓度为600 μmol/L时不具有显著差异,H₂O₂浓度为800 μmol/L时具有显著差异,H₂O₂浓度为1 000 μmol/L时具有极显著差异。因此,选择H₂O₂浓度为800 μmol/L进行建模。

按1.2.2.3方法,采用H₂O₂浓度为800 μmol/L,分别处理12、24、36 h,考察H₂O₂处理时间对LO2细胞活力的影响,结果如图3所示。

由图3可知,不同处理时间下800 μmol/L的H₂O₂对LO2细胞的生长均有一定的抑制作用,且细胞活力随处理时间的延长而降低。赵辉等^[15]报道,体外氧化损伤细胞模型的细胞活力通常控制在50%~70%。本研究中,当H₂O₂浓度和处理时间分别为800 μmol/L和24 h时,LO2细胞活力达到(50.86 ± 3.06)%。因此,本研究确定LO2细胞氧化

损伤模型建立条件为 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h。

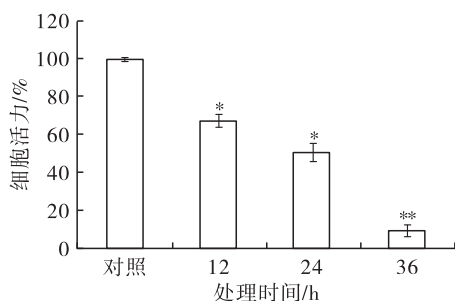


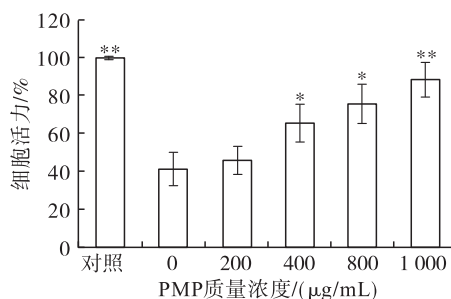
图3 H_2O_2 处理时间对 LO2 细胞活力的影响

2.2.3 PMP 对 H_2O_2 氧化损伤 LO2 细胞的保护作用

按照 1.2.2.4 方法,考察 PMP 对 H_2O_2 氧化损伤 LO2 细胞活力的影响,结果如图 4 所示。

由图 4 可知, H_2O_2 诱导 LO2 细胞活力降至 $(43.34 \pm 6.37)\%$,经不同质量浓度 PMP 预处理干预,LO2 细胞活力均有一定程度的上升,且与 PMP 质量浓度呈正向关系,当 PMP 质量浓度为 1 000

$\mu\text{g/mL}$ 时,细胞活力可极显著提高到 92.46%。结果说明 PMP 对 H_2O_2 诱导 LO2 细胞的氧化损伤具有一定的保护作用。



注: * 表示与模型组(PMP 质量浓度为 0)相比具有显著差异($p < 0.05$); ** 表示与模型组相比具有极显著差异($p < 0.01$)。下同

图4 PMP 质量浓度对 H_2O_2 氧化损伤 LO2 细胞活力的影响

通过光学显微镜观察 LO2 细胞形态,结果如图 5 所示。

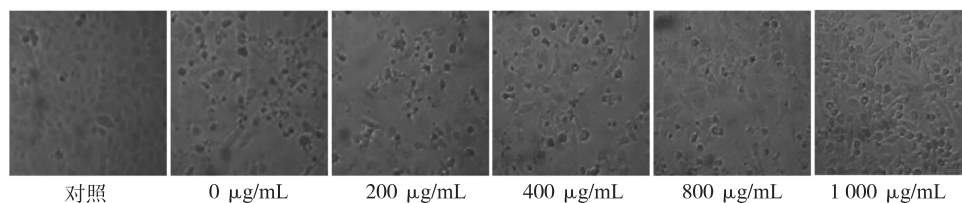


图5 PMP 质量浓度对 H_2O_2 氧化损伤 LO2 细胞形态的影响(400 ×)

由图 5 可知:对照组中 LO2 细胞生长状态良好,大部分细胞贴壁生长,细胞间衔接紧密;模型组(H_2O_2 氧化损伤组)中 LO2 细胞生长状态较差,死细胞明显增多,细胞数量明显减少,贴壁性降低,细胞出现明显皱缩或膨大;与模型组相比,PMP 预处理在一定程度上能够改善 LO2 细胞的生长状态,随着 PMP 质量浓度的增加,细胞密度显著增加。因此,PMP 能有效改善 H_2O_2 诱导 LO2 细胞氧化损伤的细胞形态,说明 PMP 对 H_2O_2 诱导 LO2 细胞的氧化损

伤具有一定的保护作用。

2.2.4 PMP 对 H_2O_2 氧化损伤 LO2 细胞内 ROS 的改善作用

H_2O_2 作为一种强氧化剂,当细胞受到 H_2O_2 刺激时,线粒体内会产生大量的 ROS,引发氧化应激,导致线粒体功能障碍,最终引起细胞凋亡、自噬和坏死等。按照 1.2.2.5 方法检测 LO2 细胞内 ROS 的水平,结果如图 6 所示。

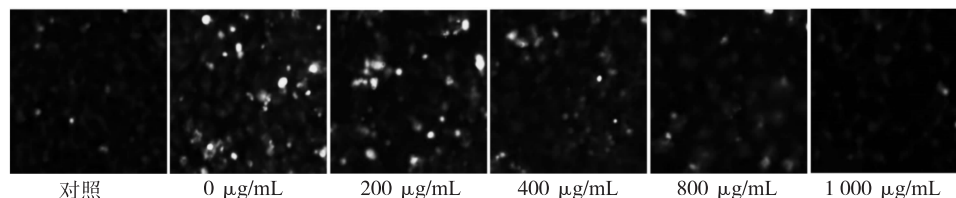


图6 PMP 质量浓度对 H_2O_2 诱导氧化损伤 LO2 细胞内 ROS 水平的影响

由图 6 可知,与对照组相比,模型组中 ROS 水平显著增加,说明细胞内氧化应激效果显著,模型构建成功。与模型组相比,不同质量浓度 PMP 预处理后 LO2 细胞内 ROS 水平逐渐降低,且呈剂量依赖效应。结果说明,PMP 可降低 H_2O_2 引起的胞内 ROS

水平升高,进而降低 ROS 引起的氧化损伤。另外,肝脏是 ROS 攻击的主要器官,并且肝脏细胞对氧化应激相关的分子敏感性也高^[16],本研究结果显示 PMP 对于氧化性肝损伤具有一定的保护作用,提示 PMP 具有开发为护肝产品的潜力。

2.2.5 PMP对H₂O₂氧化损伤的LO2细胞线粒体膜电位变化的影响

当过量的ROS引起细胞内氧化应激时,线粒体膜电位降低,线粒体膜的通透性增加,会导致细胞早期凋亡。按照1.2.2.6方法检测PMP对H₂O₂氧化损伤的LO2细胞线粒体膜电位变化的影响,结果如图7所示。

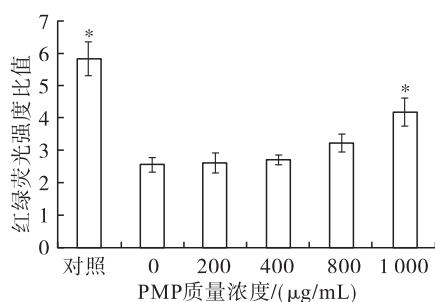


图7 PMP质量浓度对H₂O₂氧化损伤LO2细胞线粒体膜电位的影响

由图7可知:与对照组相比,模型组细胞内绿色荧光强度增强,红色荧光强度减弱,说明细胞处于凋亡早期,线粒体膜电位下降;与模型组相比,随PMP质量浓度的升高,PMP处理组细胞中绿色荧光强度逐渐减弱而红色荧光强度增强,说明线粒体膜电位上升,早期凋亡细胞减少。结果说明,PMP能有效提升H₂O₂引起的LO2细胞线粒体膜电位下降,抑制细胞凋亡。

2.2.6 PMP对H₂O₂氧化损伤LO2细胞培养液中LDH活性的影响

LDH是一种存在于细胞内的酶,它在细胞受到损伤时会释放到细胞外。因此,检测细胞培养上清

液中的LDH活性变化可以作为评估细胞损伤或死亡的一种方法。按照1.2.2.7方法检测PMP对H₂O₂氧化损伤LO2细胞培养液中LDH活性的影响,结果如图8所示。

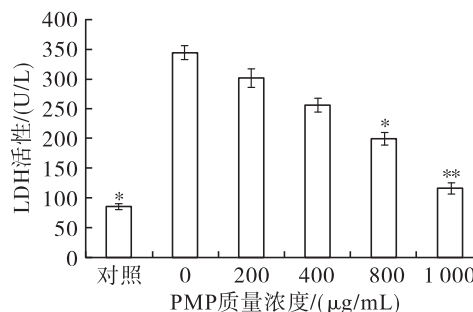


图8 PMP质量浓度对H₂O₂氧化损伤LO2细胞培养液中LDH活性的影响

由图8可知,与对照组相比,模型组细胞培养液中LDH活性上调,而不同质量浓度的PMP预处理后,细胞培养液中LDH活性下降,说明PMP对H₂O₂诱导LO2细胞的氧化损伤具有一定的保护作用。研究表明,氧化应激参与肝损伤的发生和发展,被认为是急性肝脏疾病的病理生理基础,与肝癌的发生密切相关^[17],因此PMP对于肝损伤具有一定的保护作用。

2.2.7 PMP对H₂O₂氧化损伤LO2细胞内SOD、CAT、GSH、MDA的影响

ROS的产生和细胞内的抗氧化酶系和非酶类抗氧化物的表达有关。按照1.2.2.8方法,考察PMP对H₂O₂氧化损伤LO2细胞内SOD、CAT、GSH、MDA的影响,结果如图9所示。

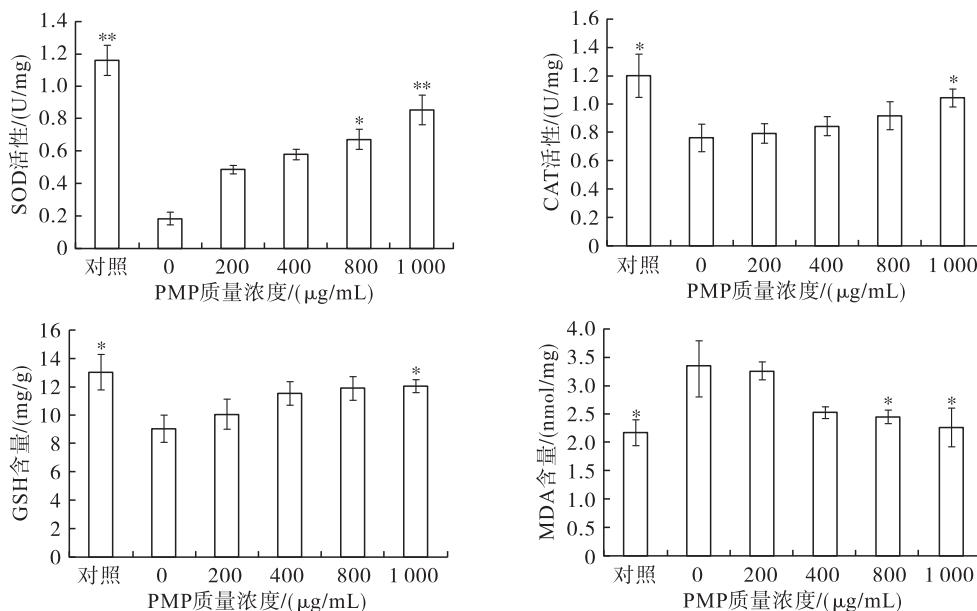


图9 PMP质量浓度对H₂O₂氧化损伤LO2细胞内SOD、CAT、GSH、MDA的影响

由图 9 可知:与对照组相比,模型组中 GSH 含量、CAT 和 SOD 活性均显著或极显著降低,MDA 含量显著升高;与模型组相比,随 PMP 质量浓度的升高,PMP 处理组中 SOD、CAT 活性、GSH 含量逐渐升高,MDA 含量逐渐降低。CAT 和 SOD 是细胞内抗氧化酶的重要组成部分,共同防御细胞氧化应激,清除 ROS,阻止脂质过氧化,提高机体的抗氧化能力^[18]。GSH 是细胞内的非酶类抗氧化物,通过清除自由基等发挥抗氧化功能,同时 GSH 的含量可直接反映机体对外界氧化应激损伤的调控能力^[16]。MDA 是脂质氧化的终产物,其含量可反映细胞膜脂质过氧化的程度。本研究表明,PMP 能显著提高 H₂O₂ 氧化损伤 LO2 细胞内 SOD 和 CAT 的活力以及 GSH 水平,有效清除胞内产生的 ROS,阻止脂质的过氧化,从而显著降低 MDA 水平,达到保护 LO2 肝细胞免受 H₂O₂ 损伤的作用。该结果与 PMP 能缓解 H₂O₂ 所引起的细胞活力降低和 ROS 水平增加的结果相呼应。研究表明,植物多糖可通过调节细胞外激酶途径上调抗氧化酶活性,进而防止氧化应激引起的细胞损伤^[19-20],本研究结果验证了这一结论。

2.2.8 PMP 对 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞凋亡的影响

细胞受到外界的刺激可能会破坏体内氧化应激的平衡状态,导致细胞内 ROS 水平增加,对 LO2 细胞造成氧化损伤,进而导致细胞凋亡。按照 1.2.2.9 方法,考察 PMP 对 H₂O₂ 氧化损伤 LO2 细胞凋亡的影响,结果如图 10 所示。

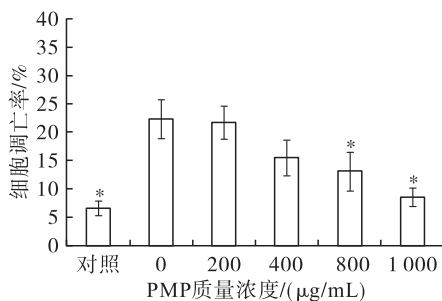


图 10 PMP 质量浓度对 H₂O₂ 诱导氧化损伤的 LO2 细胞凋亡的影响

由图 10 可知:与对照组相比〔细胞凋亡率(6.58 ± 1.25)%〕,模型组 LO2 细胞凋亡率显著增加〔细胞凋亡率(22.34 ± 3.41)%〕;与模型组相比,不同质量浓度的 PMP 预处理干预后,细胞凋亡率逐渐降低,PMP 质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞凋亡率为(8.53 ± 1.59)%。结果表明,PMP 能有效抑制 H₂O₂ 诱导的 LO2 细胞凋亡进而缓解细胞的氧化损伤,该结果与前面的结果相呼应。研究表明,香菇多糖通过调控氧化应激和凋亡对非酒精性脂肪肝起到

保护作用^[21],当归多糖通过抑制氧化应激和肝细胞凋亡对布洛芬引起的肝损伤起到保护作用^[22],说明一些植物多糖可以抑制细胞凋亡,从而对肝损伤起到保护作用,与本研究结果一致。

2.2.9 PMP 对 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞内凋亡相关蛋白表达的影响

研究表明,H₂O₂ 可以激活线粒体介导的凋亡途径,导致氧化损伤,激活 Bcl-2 家族,引起细胞的凋亡^[23]。为探究 PMP 对 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞损伤的保护机制,按照 1.2.2.10 方法,检测细胞凋亡相关蛋白的表达,结果如图 11 所示。

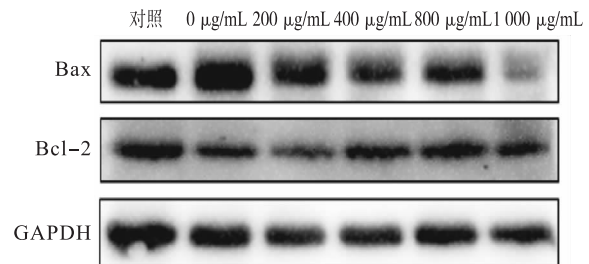


图 11 PMP 质量浓度对 H₂O₂ 诱导氧化损伤 LO2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

由图 11 可知:与对照组相比,模型组 Bcl-2 与 Bax 含量的比值显著下调($p < 0.05$);与模型组相比,PMP 处理组均能显著上调 Bcl-2 与 Bax 含量的比值($p < 0.05$)。H₂O₂ 激活线粒体凋亡通路,导致 LO2 细胞存活率降低,而 PMP 可显著抑制 H₂O₂ 诱导 LO2 细胞内凋亡相关蛋白表达,因而 PMP 可通过协助细胞抵御氧化应激对线粒体和 DNA 的损伤,降低细胞氧化损伤和提高机体抗氧化应激的调控能力。

3 结论

PMP 对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 NO_2^- 、DPPH \cdot 均具有一定的清除能力,其 EC₅₀ 分别为 964.59、6 376.84、275.24、333.55 $\mu\text{g/mL}$ 。另外,以 LO2 细胞建立氧化应激模型,全面分析了 PMP 对 H₂O₂ 诱导氧化 LO2 细胞损伤保护作用,结果表明,PMP 通过调控线粒体介导的凋亡信号通路保护 LO2 细胞免受 H₂O₂ 引起的氧化损伤,达到保护肝损伤的作用。本研究关于 PMP 的抗氧化活性检测仅处在体外和细胞实验阶段,后期可对动物体内实验进一步研究。

参考文献:

- [1] PANAGOPOULOS J, KARABARBOUNIS A, YAKYMENKO I, et al. Human-made electromagnetic fields: Ion forced-oscillation and voltage-gated ion channel dysfunction, oxidative stress and DNA damage [J/OL]. Int J Oncol, 2021, 59(5): 92[2023-06-05]. <https://doi.org/10.>

- 3892/ijo.2021.5272.
- [2] VILLANUEVA - PAZ M, MORÁN L, LÓPEZ - ALCÁNTARA N, et al. Oxidativestress in drug - induced liver injury (DILI): From mechanisms to biomarkers for use in clinical practice [J/OL]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(3): 390 [2023 - 06 - 05]. <https://doi.org/10.3390/antiox10030390>.
- [3] CHOI J H, JIN S W, LEE G H, et al. Rutaecarpine protects against acetaminophen - induced acute liver injury in mice by activating antioxidant enzymes [J/OL]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(1): 86 [2023 - 06 - 05]. <https://doi.org/10.3390/antiox10010086>.
- [4] MANSOURI A, GATTOLLIAT C H, ASSELAH T. Mitochondrial dysfunction and signaling in chronic liver diseases[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(3): 629 - 647.
- [5] SOTO - ANGONA Ó, ANMELLA G, VALDÉS - FLORIDO M J, et al. Non - alcoholic fatty liver disease (NAFLD) as a neglected metabolic companion of psychiatric disorders: Common pathways and future approaches[J/OL]. *BMC Med*, 2020, 18(1): 261 [2023 - 06 - 05]. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01713-8>.
- [6] YU H, QIU J F, MA L J, et al. Phytochemical and phytopharmacological review of *Perilla frutescens* L. (Labiatae), a traditional edible - medicinal herb in China [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 108(pt b): 375 - 391.
- [7] AHMED H M. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological investigations of *Perilla frutescens* (L.) Britt [J/OL]. *Molecules*, 2018, 24(1): E102 [2023 - 06 - 05]. <https://doi.org/10.3390/molecules24010102>.
- [8] DISSOOK S, UMSUMARNGS, MAPOUNG S, et al. Luteolin - rich fraction from *Perilla frutescens* seed meal inhibits spike glycoprotein S1 of SARS - CoV - 2 - induced NLRP3 inflammasome lung cell inflammation via regulation of JAK1/STAT3 pathway: A potential anti - inflammatory compound against inflammation - induced long - COVID [J/OL]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 1072056 [2023 - 06 - 05]. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1072056>.
- [9] 张慧慧, 李灿, 刘会平, 等. 肉桂多糖的提取纯化及体外抗氧化和降血糖活性分析[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(7): 15 - 24.
- [10] 王钰, 周一萍, 汤运嘉, 等. 麻疯树籽仁/壳乙醇提取物的体外抗氧化活性[J]. *中国油脂*, 2022, 47(7): 83 - 87, 108.
- [11] 陈子涵, 刘金娟. 六种食用菌体外抗氧化及抗细胞增殖活性研究[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(11): 104 - 108.
- [12] 石浩, 丁仁惠, 黄谦, 等. 富硒油茶籽油对 H₂O₂ 诱导 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. *中国油脂*, 2019, 44(1): 61 - 66.
- [13] 王士博, 刘金娟. 香蕉皮抗氧化和抑制人肝癌 HepG2 细胞活性研究[J]. *生物技术进展*, 2023, 13(1): 140 - 145.
- [14] 朱建飞, 邓亚霞, 冉咏兰, 等. 紫苏粕多糖 PWPS 的抗氧化活性研究[J]. *重庆工商大学学报(自然科学版)*, 2012, 29(12): 83 - 86.
- [15] 赵辉, 孟炜, 易述红, 等. 体外 LO2 肝细胞氧化损伤模型的构建[J]. *器官移植*, 2014, 5(4): 242 - 246, 250.
- [16] 廖月, 何毅怀, 罗亚文. 氧化应激在急性肝损伤中的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(10): 2402 - 2407.
- [17] SEEN S. Chronic liver disease and oxidative stress: Narrative review [J]. *Expert Rev Gastroent Hepatol*, 2021, 15(9): 1021 - 1035.
- [18] CECERSKA - HERYC E, SUROWSKA O, HERYC R, et al. Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients: A review [J]. *Clin Biochem*, 2021, 93: 1 - 8.
- [19] YUAN R S, TAO X, LIANG S, et al. Protective effect of acidic polysaccharide from *Schisandra chinensis* on acute ethanol - induced liver injury through reducing CYP2E1 - dependent oxidative stress [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 537 - 542.
- [20] YU T D, HE Y N, CHEN H T, et al. Polysaccharide from *Echinacea purpurea* plant ameliorates oxidative stress - induced liver injury by promoting Parkin - dependent autophagy [J/OL]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154311 [2023 - 06 - 05]. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154311>.
- [21] DU T, FANG Q, ZHANG Z, et al. Lentinan protects against nonalcoholic fatty liver disease by reducing oxidative stress and apoptosis via the PPAR α pathway [J/OL]. *Metabolites*, 2022, 12(1): 55 [2023 - 06 - 05]. <https://doi.org/10.3390/metabo12010055>.
- [22] CAO P, SUN J, SULLIVAN M A, et al. *Angelica sinensis* polysaccharide protects against acetaminophen - induced acute liver injury and cell death by suppressing oxidative stress and hepatic apoptosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 1133 - 1139.
- [23] MA Z L, ZHANG W W, WU Y R, et al. Cyclophilin A inhibits A549 cell oxidative stress and apoptosis by modulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J/OL]. *Biosci Rep*, 2021, 41(1): bsr20203219 [2023 - 06 - 05]. <https://doi.org/10.1042/bsr20203219>.