

紫茺菁乙醇提取物对 Caco-2 细胞氧化损伤的保护作用

宋家乐^{1,2,3}, 钱波^{1,3}, 王程强^{1,3}, 曾榛^{1,3}, 桂中玉^{1,3}, 周燕园⁴

(1. 桂林医学院公共卫生学院, 广西桂林 541100) (2. 东南大学公共卫生学院, 江苏南京 210009)

(3. 广西高校预防医学重点实验室, 广西桂林 541100) (4. 桂林医学院药学院, 广西桂林 541100)

摘要: 探讨紫茺菁乙醇提取物(BREE)的体外抗氧化能力及其对人肠上皮 Caco-2 细胞氧化损伤保护效果。二苯代苦味酰基自由基(DPPH)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除率与总还原力评估 BREE 的体外抗氧化力。过氧化氢(H_2O_2 , 150 $\mu\text{mol/L}$)建立 Caco-2 细胞氧化损伤模型评估 BREE 的细胞保护效果。受损细胞生存率的影响以 MTT 法测定。细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平依说明用试剂盒测定。硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)含量。2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠法测定细胞内活性氧(ROS)水平。酶联法测定白介素(Interlukin, IL)-1 β 和 IL-8 的水平。BREE 具有较强的自由基(DPPH 和 $\cdot\text{OH}$)清除力和总还原力。BREE 能显著抑制 H_2O_2 造成的细胞死亡, 提高受损细胞中抗氧化物酶(SOD、CAT 和 GSH-Px)活性, 降低受损细胞内 MDA 与 ROS 的生成, 并抑制 IL-1 β 和 IL-8 的分泌。结果提示, BREE 具有较强的体外抗氧化能力, 能增强细胞内源性抗氧化酶的活力显著改善 H_2O_2 引发的 Caco-2 细胞氧化应激损伤并降低炎症反应。

关键词: 紫茺菁乙醇提取物; 抗氧化能力; 氧化应激; 肠上皮细胞; 炎症

文章编号: 1673-9078(2018)06-32-38

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.005

Protective Effect of *Brassica rapa* var L Ethanol Extract on Oxidative Damage of Caco-2 Cells

SONG Jia-le^{1,2,3}, QIAN Bo^{1,3}, WANG Cheng-qiang^{1,3}, ZENG Zhen^{1,3}, GUI Zhong-yu^{1,3}, ZHOU Yan-yuan⁴

(1.School of Public and Health, Guilin Medical University, Guilin 541100, China)(2.School of Public and Health, Southeast University, Nanjing 210009, China)(3.Guangxi Colleges and University Key Laboratory of Preventive Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541100, China)(4.School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541100, China)

Abstract: The *in vitro* antioxidant activity and protective effect of *Brassica rapa* ethanol extracts (BREE) on oxidative damage of Caco-2 cells were investigated. *In vitro* antioxidant capability of BCEE was evaluated according to the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl radicals($\cdot\text{OH}$) scavenging ability, and reducing power assay, respectively. Cellular protective effect of BREE was investigated using a model of intestinal epithelial Caco-2 cells induced oxidative stress by hydrogen peroxide (H_2O_2 , 150 $\mu\text{mol/L}$) of. Cell viability was determined by MTT assay. The intracellular levels of superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined by commercial assay kits according the manuscripts. The intracellular levels of malondiadehycle (MDA) and reactive oxygen specisis (ROS) were determined by thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) and dichloro-dihydro-fluorescein diacetate(DCFH-DA) assay, respectively. The levels of interlukin (IL)-1 β and IL-8 were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits. BREE exhibited a great activity of scavenging DPPH and $\cdot\text{OH}$ radicals, and also showed a strong reducing power. BREE significantly increased the cell viability and activities of SOD, CAT and GSH-Px in cells. In addition, BREE also effectively decreased the intracellular levels of ROS and MDA, and reduced the secretion of IL-1 β and IL-8 in Caco-2 cells treated with H_2O_2 . These results suggested that the BREE exhibited a good *in vitro* antioxidant activity. BREE treatment could enhance the activities of endogenous antioxidant enzymes, which could attenuate the oxidative damage and reduce the inflammation reaction in Caco-2 cells treated with H_2O_2 .

收稿日期: 2018-01-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560530、81760589); 广西壮族自治区自然科学基金资助项目 (2016GXNSFC380026); 桂林医学院引入人才科研启动基金 (04010150001); 2017 年教育部中西部高等学校青年骨干教师国内访问学者计划资助

作者简介: 宋家乐 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子营养学和功能性食品学

通讯作者: 周燕园 (1976-), 女, 副教授, 研究方向: 食品理化检测新技术

Key words: *brassica rapa* var L ethanol extracts; antioxidant activity; oxidative stress; intestinal epithelial cells; inflammation

紫苜蓿(*Brassica rapa* var L)又称蔓菁、大头菜、卜留克或恰玛古(维吾尔语),属十字花科芸苔属芜菁种两年生植物,主产地为我国新疆、西藏和东北地区,目前全国范围内都有种植。芜菁是传统的药食同源植物,其食用部分为地下肉质根。研究发现,芜菁含有丰富的多糖、皂苷、酚类、硫代葡萄糖苷类化合物及挥发油等功能性成分^[1],具有抗衰老^[2]、抗缺氧^[3,4]、体内抗氧化^[5]、抗肿瘤^[6]和降血糖功效^[7,8]等功效。

过度的氧化应激所导致的各种组织和细胞中细胞膜结构的改变,细胞代谢酶类和功能蛋白失活、遗传物质的损伤以及细胞发生脂质过氧化反应都是各种退行性疾病发生的主要原因^[9]。在人体中,肠道不仅仅担负有消化功能,同时也是氧化应激损伤的主要靶器官之一。氧化应激会扰乱小肠上皮细胞的正常生理功能,造成其所构成的物理性肠道屏障功能丧失,并导致肠腔内细菌、毒素及其他有害物质进入血液系统引发肠道溃疡,结肠炎并直接造成结-直肠癌等重大疾病的发生^[10]。

目前,就紫苜蓿对于肠道上皮细胞氧化应激损伤后的保护作用的研究鲜见报道。人结肠癌 Caco-2 细胞因其存在有与正常小肠上皮细胞类似的紧密连接、微绒毛等相关结构,并具有相关代谢酶系和分泌功能等特点而被认为是一株用于研究肠道屏障损伤与修复机制的经典细胞系^[11]。因此,本实验拟利用 H₂O₂ 处理 Caco-2 人结肠癌上皮细胞制备细胞氧化损伤模型,研究紫苜蓿乙醇提取物对细胞氧化损伤的保护并探讨可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、脱氧核糖、硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、过氧化氢(H₂O₂)、抗坏血酸、脱氧核糖和叔丁基对苯二酚(tertiary butylhydroquinone, TBHQ):美国 Sigma 公司;DMEM 高糖型细胞培养液、青霉素-链霉素双抗、胰蛋白酶-EDTA 消化液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, DCFH-DA)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS):美国

Thermo Scientific 公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒:南京建成生物工程研究所;IL-1 β 与 IL-8 试剂盒:美国 Cloud colon 公司;Bio-Rad Quick Start Bradford 试剂盒:美国 Bio-Rad 公司。其他化学试剂均为国产分析纯。新鲜紫苜蓿样品购自桂林市蔬菜科学研究所。

1.2 仪器与设备

EYELAN-1001S 真空旋转蒸发器:东京理化器械株式会社;Biotek Elx808 酶标仪:美国伯腾仪器有限公司;756S 紫外可见分光光度计:上海棱光技术有限公司;Thermo 3110 二氧化碳细胞培养箱:美国 Thermo 公司;AL204 电子分析天平:梅特勒-托利多公司上海有限公司;电热恒温水浴锅 HWS-28:上海一恒科学仪器有限公司;FLUOstar OPTIMA 荧光酶标仪:德国 BMG 公司。

1.3 实验细胞株

Caco-2 人结肠腺癌细胞系(源自中国科学院上海细胞资源中心)由桂林医学院生物技术学院邹先琼教授馈赠。

1.4 紫苜蓿乙醇提取物的制备

新鲜紫苜蓿可食部去除杂叶后,以双蒸水冲洗并行真空冷冻干燥。冻干的紫苜蓿经粉碎后过 60 目筛备用。取紫苜蓿粉(100 g)中加入 500 mL 乙醇后在室温条件下搅拌浸提 6 h。滤液经 3000 r/min 离心 15 min 后弃渣收集上清,50 °C 真空减压旋转蒸发后,制成紫苜蓿乙醇提取物(收率为 41.2%), -80 °C 储存待用。

1.5 紫苜蓿乙醇提取物的体外抗氧化能力

1.5.1 DPPH 自由基清除能力测定

在 100 μ L 不同浓度的紫苜蓿乙醇提取物中加入等量的 DPPH 标准液(150 μ mol/L)后混匀,室温避光处反应 30 min,酶标仪测定 517 nm 处值并计算清除率。清除率(%)=[1-(A_{样品组}-A_{样品空白组})/A_{空白组}] \times 100%。

1.5.2 \cdot OH 自由基清除能力测定

不同浓度的紫苜蓿乙醇提取物(200 μ L)中,分别加入脱氧核糖(60 mmol/L), H₂O₂(10 mmol/L), PBS(50 mmol/L, pH 7.5), 氯化铁溶液(1 mmol/L), EDTA 溶液(1.04 mmol/L)和抗坏血酸溶液(4 mmol/L)各 200

μL 。37 °C 水浴 1 h 后,加入 1% TBA 溶液(1 mL)和 2.8% TCA 溶液(1 mL)并继续在 90 °C 水浴条件下反应 30 min 后用分光光度计测定 $\text{OD}_{532\text{nm}}$ 值计算清除率。清除率($\%$)= $[1-(A_{\text{样品组}}-A_{\text{样品空白组}})/A_{\text{空白组}}] \times 100\%$ 。

1.5.3 总还原力测定

适量样品用 PBS(20 mmol/L, pH 6.6)配成 1 mL 的样品液后,加入 1 mL 铁氰化钾溶液(10 mg/mL)混匀。50 °C 水浴中孵育 20 min 后加入 200 μL 的 TCA 溶液(100 mg/mL), 3000 r/min 条件下离心 10 min。上清液(0.5 mL)中加入等量蒸馏水和 0.1 mL 的氯化铁溶液(1 mg/mL)混匀,分光光度计测定 $\text{OD}_{700\text{nm}}$ 值。

1.6 紫萹菁乙醇提取物对细胞氧化损伤的保护效果

1.6.1 细胞培养及分组

Caco-2 细胞用 DMEM 细胞培养液(含 10%FBS 与 1%青-链霉素双抗液)置于 37 °C、5% CO_2 环境下湿化培养。细胞贴壁长至培养皿 80%时,胰蛋白酶-EDTA 液按比例消化传代,取指数期细胞用于实验。以 DMEM 培养液(含 150 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2)处理细胞 4 h 制备损伤细胞模型。模型细胞以不同质量浓度的紫萹菁乙醇提取物(10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$)继续培养 24 h 并进行后续实验。正常组为未经过任何处理的正常 Caco-2 细胞。

1.6.2 MTT 法测定细胞存活率及 LDH 脱氢酶水平

细胞按前述分组处理并进行 24 h 培养后,弃孔内培养基并加入终质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 试剂(100 μL)继续培养 4 h。培养结束后弃上清液,每孔加入 DMSO(100 μL)避光振荡 30 min,测定 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 后按公式:细胞生存率($\%$)= $\text{OD}_{\text{样品组}}/\text{OD}_{\text{正常组}} \times 100$ 来计算细胞生存率。

1.6.3 样品对细胞内 MDA 生成量的测定

细胞用预冷的 PBS 冲洗 3 次,细胞刮刀收集细胞后,加入细胞裂解液在冰上裂解细胞。细胞裂解液(500 μL)与反应液(15%的 TCA 与 0.67%TBA 混合液, 400 μL)充分混匀后在 95 °C 水浴中孵育 20 min。待冷却后,加入异丙醇(3 mL)提取色素并测定 $\text{OD}_{532\text{nm}}$,试剂盒定量细胞总蛋白量。按照公式 MDA 生成量($\mu\text{mol/mg protein}$)= $[\text{MDA 含量}(\mu\text{mol/mL}) \times 1.5 \text{ mL}] / \text{总蛋白质含量}(\text{mg})$ 计算 MDA 生成量。

1.6.4 样品对细胞内 ROS 水平的测定

依前述处理细胞后,加入 DMEM 培养液(DCFH-DA, 20 $\mu\text{mol/L}$)在 37 °C 条件下孵育 20 min,

PBS 冲洗细胞 2 次后收集细胞。在激发波长为 485 nm,发射波长为 530 nm 的条件下用 FLUOstar OPTIMA 荧光酶标仪测定荧光强度,按照公式:相对 ROS 水平/ $\%$ = $\text{荧光强度}_{\text{样品处理组}}/\text{荧光强度}_{\text{正常组}} \times 100$ 进行计算。

1.6.5 样品对细胞内抗氧化酶(SOD、CAT 和 GSH-Px)活力的测定

取适量经过处理的细胞裂解液按照 SOD、CAT 和 GSH-Px 测定试剂盒说明书步骤操作。细胞内总蛋白用 Bio-Rad 蛋白质定量试剂盒测定。细胞内抗氧化酶活力用细胞内总蛋白量进行校正并以酶比活力单位(U/mg pro)表示。

1.6.6 样品对细胞内炎性细胞因子 IL-1 β 与 IL-8 分泌水平的测定

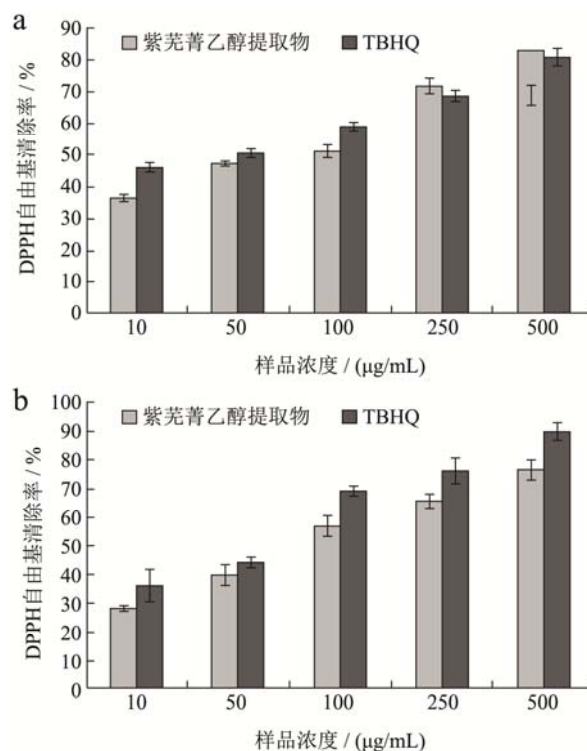
细胞接种到培养板并依前述方法处理后,4 °C 下收集细胞培养上清液。取适量培养上清液按照 IL-1 β 与 IL-8 测定试剂盒说明书步骤操作并用细胞总蛋白含量作校正。

1.7 数据处理与统计分析

本研究中,所有实验均重复 3 次,结果以均值(means) \pm 标准偏差(SD)表示。所得实验数据运用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析与统计处理, $p < 0.05$ 为具有统计差异。

2 结果与讨论

2.1 紫萹菁乙醇提取物的体外抗氧化能力



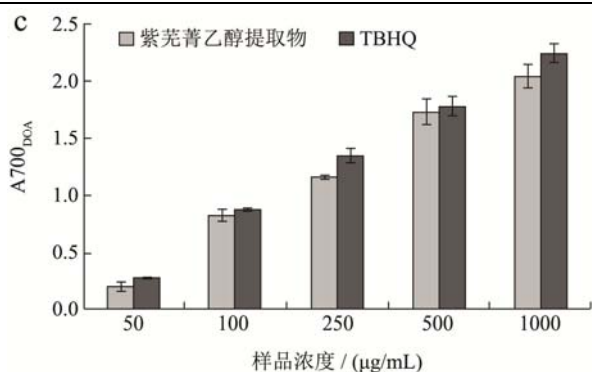


图1 紫萹菁乙醇提取物的体外 DPPH (a) 和 ·OH (b) 自由基的清除能力与总还原力 (c)

Fig.1 The radical scavenging (DPPH and ·OH) activities and total reducing power of BREE in vitro

DPPH 自由基清除能力实验是一种常用于检测物质是否具有抗氧化性的体外定性实验^[7]。·OH 自由基除本身的化学性质活泼之外，还具有极强的生物大分子破坏力。紫萹菁乙醇提取物对 DPPH 和·OH 自由基都具有较好的清除能力，且清除力随提取物质量浓度的增高而增加显著(图 1)。其中，较高浓度的紫萹菁乙醇提取物(250 µg/mL 和 500 µg/mL)清除 DPPH 的能力要略强于人工合成抗氧化剂 TBHQ。而·OH 自由基清除能力方面，紫萹菁乙醇提取物则要弱于 TBHQ(图 1b)。

具有较强还原能力的物质依靠自身提供电子与自由基进行配对从而降低自由基活性可以从某种程度上间接反映出其体外抗氧化能力的强弱^[8]。随着紫萹菁

乙醇提取物浓度的增加，其总还原力也随之增强，并呈现出剂量效应关系(图 1C)。但是，紫萹菁乙醇提取物的总还原能力与 TBHQ 相比较弱。

2.2 紫萹菁乙醇提取物的对 H₂O₂ 所致 Caco-2 细胞生存率和细胞 LDH 释放水平的影响

如表 1 所示，经 4 h 的 H₂O₂(150 µmol/L)直接处理后显著造成 Caco-2 细胞生存率下降(p<0.05)。而紫萹菁乙醇提取物处理可以明显改善受损细胞的生存率(表 1)。紫萹菁对受损 Caco-2 细胞的保护效果随其乙醇提取物的质量浓度增加而增强，并呈现出显著的剂量效应关系(p<0.05)。在经 100 µg/mL 和 200 µg/mL 的紫萹菁乙醇提取物处理后，细胞的生存率分别达到 75.6%和 83.2%。生存率分别较未经处理的模型细胞生存率增高 1.56 倍和 1.72 倍。正常情况下，乳酸脱氢酶(LDH)属于一种稳定存在细胞内部的酶，一旦细胞遭受应激损伤后能迅速释放到细胞外。因此，LDH 是一种常用于衡量细胞激损伤后的生物指标物^[9]。较正常细胞相比，H₂O₂(150 µmol/L)处理显著造成 Caco-2 细胞内的 LDH 外溢(p<0.05)。而紫萹菁乙醇提取物处理可以显著抑制受损 Caco-2 细胞中 LDH 的溢出，且抑制效果存在显著的剂量效应关系(p<0.05)。高浓度紫萹菁乙醇提取物(100 µg/mL 和 200 µg/mL)分别处理细胞后，细胞 LDH 溢出水平分别较未经处理的模型细胞 LDH 溢出水平降低 43%和 52%。

表 1 紫萹菁乙醇提取物对 H₂O₂ 所致 Caco-2 细胞生存率和细胞 LDH 释放水平的影响

Table 1 Effects of BREE on the cell viability and LDH levels in intestinal Caco-2 cells treated with H₂O₂

组别	紫萹菁乙醇提取物浓度/(µg/mL)	细胞生存率/%	LDH 释放水平/(U/mg protein)
正常组		100.00±0.00	14.04±1.26
紫萹菁乙醇提取物处理组	0	48.33±1.90*	59.89±1.73*
	10	58.63±2.48*	48.75±1.51*
	50	69.20±2.12*#	41.22±1.26*#
	100	75.68±2.52*#	34.11±1.70*#
	200	83.22±2.13*#	29.02±0.91*#

注：与正常组相比较，*表示 p<0.05；与未经紫萹菁乙醇提取物处理组比较，#表示 p<0.05。

2.3 紫萹菁乙醇提取物对 H₂O₂ 所致 Caco-2 细胞内 ROS 水平和 MDA 含量的影响

细胞内部过度蓄积的 ROS 是造成细胞正常生理反应失调，也是引发 DNA 断裂，造成细胞凋亡，甚至是细胞死亡的重要因素之一^[10]。如表 2 示，H₂O₂(150 µmol/L)处理能显著造成 Caco-2 细胞内 ROS 水平升高(p<0.05)。而经不同浓度紫萹菁乙醇提取物(10 µg/mL、

50 µg/mL、100 µg/mL 和 200 µg/mL)处理后，细胞内 ROS 生成水平呈显著的下降趋势。损伤细胞内 ROS 水平在经高浓度萹菁乙醇提取物(200 µg/mL)处理后降至最低(238.98%)，即较模型细胞中 ROS 水平下降了 34%。MDA 是细胞内不饱和脂肪酸发生过氧化反应生成所产生的氧化终产物，也是常用于评估细胞氧化损伤的程度的生物指示物之一，具有较强的生物毒性^[11]。H₂O₂ 显著造成 Caco-2 细胞中 MDA 含量升高(p<0.05)。经不同浓度紫萹菁乙醇提取物(10 µg/mL、

50 μg/mL、100 μg/mL 和 200 μg/mL)处理后, 受损细胞中所 MDA 含量呈递减趋势, 且与模型组相比较具有显著性差异($p<0.05$)。高浓度紫萹菁乙醇提取物(100 μg/mL 和 200 μg/mL)分别处理细胞后, 细胞中 MDA

水平分别较未经处理的模型细胞中 MDA 水平降低 33%和 37%。结果提示, 紫萹菁乙醇提取物能有效抑制氧化应激所致细胞脂质过氧化反应并降低 ROS 水平的升高。

表 2 紫萹菁乙醇提取物对 H₂O₂所致 Caco-2 细胞内 ROS 水平和 MDA 含量的影响

Table 2 Effects of BREE on the ROS and MDA levels in intestinal Caco-2 cells treated with H₂O₂

组别	紫萹菁乙醇提取物浓度/(μg/mL)	MDA 含量/(μmol/mg protein)	ROS 水平/%
正常组		0.42 ± 0.04	100.00 ± 0.00
紫萹菁乙醇提取物处理组	0	2.77 ± 0.16*	361.73 ± 11.11*
	10	2.35 ± 0.17*#	313.30 ± 8.72*
	50	2.06 ± 0.08*#	292.05 ± 8.58*#
	100	1.85 ± 0.06*#	261.85 ± 12.49*#
	200	1.75 ± 0.09*#	238.98 ± 19.32*#

注: 与正常组相比较, *表示 $p<0.05$; 与未经紫萹菁乙醇提取物处理组比较, #表示 $p<0.05$ 。

2.4 紫萹菁乙醇提取物对 H₂O₂ 所致 Caco-2 细胞内 CAT、SOD 和 GSH-Px 酶的影响

许多临床疾病的发生往往与体内过多的活性氧积聚所引发的氧化-抗氧化平衡失衡有关^[12]。SOD、CAT 和 GSH-Px 等细胞内源性抗氧化酶在生命体对抗氧化应激损伤过程中发挥着至关重要的作用^[13]。如表 3 所示, H₂O₂ 处理显著抑制 Caco-2 细胞中 SOD, CAT 和 GSH-Px 的酶活性。相反, 经不同浓度紫萹菁乙醇提取物处理 24 h 后, 受损细胞内 SOD, CAT 和 GSH-Px 等酶的活性逐渐增高, 且较未经紫萹菁乙醇提取物处理过的损伤模型组相比具有显著性差异($p<0.05$)。高浓度紫萹菁乙醇提取物(100 μg/mL 和 200 μg/mL)分别处理细胞后, 细胞中 SOD 水平分别较模型细胞中 SOD

水平增高 1.52 倍和 1.61 倍。SOD 除可以直接清除细胞内积聚的自由基, 阻断细胞膜多价不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 以此抑制 MDA 和 4-羟基壬烯酸(4-hydroxynonenal, HNE)等细胞毒性物质的生成^[14]。在 GSH-Px 酶活力方面, 高浓度紫萹菁乙醇提取物(100 μg/mL 和 200 μg/mL)可使处理后细胞中 GSH-Px 水平分别较模型细胞中 GSH-Px 水平增高 1.63 倍和 1.72 倍。细胞内非酶性抗氧化物质谷胱甘肽(GSH)则能在 GSH-Px 的作用下转变为氧化型谷胱甘肽, 从而参与将有毒的过氧化物还原成羟基化合物过程。同时, GSH-Px 还能与 CAT 一起促 H₂O₂ 分解生成水, 保障细胞正常生理功能, 维持细胞相关结构来对抗氧化应激损伤^[15]。此外, 高浓度紫萹菁乙醇提取物(100 μg/mL 和 200 μg/mL)可使处理后细胞中 CAT 水平分别较模型细胞中 CAT 水平增高 1.86 倍和 1.87 倍。

表 3 紫萹菁乙醇提取物对 H₂O₂所致 Caco-2 细胞内 CAT、SOD 和 GSH-Px 酶的影响

Table 3 Effects of BREE on the CAT, SOD and GSH-Px levels in intestinal Caco-2 cells treated with H₂O₂

组别	紫萹菁乙醇提取物浓度/(μg/mL)	CAT 活力/(U/mg pro)	SOD 活力/(U/mg pro)	GSH-Px 活力/(U/mg pro)
正常组		2.71 ± 0.21	10.72 ± 0.24	5.40 ± 0.13
紫萹菁乙醇提取物处理组	0	1.25 ± 0.15*	5.32 ± 0.09*	2.22 ± 0.12*
	10	1.53 ± 0.05*	6.59 ± 0.21*#	2.81 ± 0.15*#
	50	1.86 ± 0.08*	7.52 ± 0.22*#	3.42 ± 0.30*#
	100	2.33 ± 0.10*#	8.09 ± 0.10*#	3.62 ± 0.11*#
	200	2.36 ± 0.32*#	8.59 ± 0.33*#	3.83 ± 0.12*#

注: 与正常组相比较, *表示 $p<0.05$; 与未经紫萹菁乙醇提取物处理组比较, #表示 $p<0.05$ 。

2.5 紫萹菁乙醇提取物对 H₂O₂ 所致 Caco-2 细胞内 IL-1β 和 IL-8 分泌水平的影响

如图 2 所示, 150 μmol/L 的 H₂O₂ 处理能显著造成 Caco-2 上皮细胞内炎性细胞因子 IL-1β 和 IL-8 的过度

分泌($p<0.05$)。经不同浓度(10 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 和 200 μg/mL)的紫萹菁乙醇提取物处理后, 受损 Caco-2 细胞中 IL-1β 与 IL-8 的分泌被抑制, 并呈现一定的剂量效应关系。其中, 高浓度紫萹菁乙醇提取物(100 μg/mL 和 200 μg/mL)可使处理后细胞中 IL-1β 水平分别较模型细胞中 IL-1β 水平降低 45.9%和

55.2%。在 IL-8 水平方面,高浓度紫苜蓿乙醇提取物可使处理后细胞中 IL-8 水平分别较模型细胞中 IL-8 水平降低 52.3%和 70.6%。IL-1 β 和 IL-8 等炎性细胞因子的过度活化是诱发肠道组织内炎症发生的重要因素之一^[16,17], 同时也在溃疡性结肠(ulcerative colitis)和克罗恩病(Crohn's disease)这两类主要的肠道炎症疾患(intestinal bowel disease, IBD)及其 IBD 相关性结肠癌变(IBD associated colorectal carcinogenesis)的病理生理发生过程中扮演着非常重要的角色^[18]。抑制 IL-1 β 和 IL-8 炎症细胞因子的过度表达,可以降低肠道组织炎性环境,缓解 IBD 症状并能降低 IBD 相关癌变的发生风险^[19-21]。

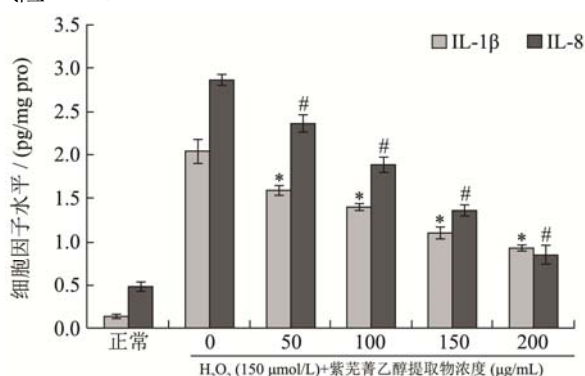


图2 紫苜蓿乙醇提取物对 H₂O₂ 所致氧化损伤 Caco-2 细胞中 IL-1 β 与 IL-8 分泌水平的影响

Fig.2 Effects of BREE on the secretion levels of IL-1 β and IL-8 levels in intestinal Caco-2 cells treated with H₂O₂

注: *与 H₂O₂ 模型组比较 $p < 0.05$, #与 H₂O₂ 模型组比较 $p < 0.05$ 。

3 结论

本研究通过体外自由基清除实验和总还原力测定来评估紫苜蓿乙醇提取物的体外抗氧化能力。利用 H₂O₂ 诱发人小肠上皮 Caco-2 细胞氧化损伤模型来研究紫苜蓿乙醇提取物对氧化应激损伤细胞的保护作用。本研究结果提示紫苜蓿乙醇提取物对体外自由基(DPPH 和 ·OH)具有较强的清除能力,并具有较强的总还原力。在细胞研究水平上,紫苜蓿乙醇提取物能显著抑制 H₂O₂ 所引起的 Caco-2 细胞死亡,提高受损细胞的生存率。此外,紫苜蓿乙醇提取物不仅能够提高受损细胞中 SOD、CAT 和 GSH-Px 等三种重要内源性抗氧化物酶活性,同时还能显著抑制受损细胞中应激损伤标志物 MDA 和 ROS 的生成。本研究结果提示,增强细胞内源性抗氧化物酶的活性可能是紫苜蓿乙醇提取物对氧化应激损伤细胞具有保护作用的潜在机制之一。在今后的研究中,应从分子层面针对紫苜蓿乙醇提取物是否对参与调控特定的信号通路以对抗外源

刺激物所诱发的细胞氧化应激损伤展开研究。

参考文献

- [1] 宋曙辉,刘庞源,何洪巨,等.不同品种芜菁营养成分及硫苷含量分析[J].营养学报,2016,38(6):610-612
SONG Shu-hui, LIU Pang-yuan, HE Hong-ju, et al. Analysis of Nutritional Components and Glucosinolates in Turnip [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2016, 38(6): 610-612
- [2] 王花,卮国雁,张萍,等.高原药食两用植物芜菁醚提取物对衰老小鼠免疫器官和 SOD、MDA、GSH-Px 水平的影响[J].时珍国医国药,2014,25(221):58-60
WANG Hua, NIE Guo-yan, ZHANG Ping, et al. Effects of plateau region plant Brassica rapa ether extracts to immune organ and SOD MDA and GSH-Px of the aging-model mice [J]. Lishizhen Medicine and Metrical Medica Reaserch, 2014, 25(221): 58-60
- [3] 刘晔峰,龚凌霄,刘连亮,等.西藏芜菁营养成分测定及提高缺氧耐受性的动物实验研究[J].食品工业科技,2012,33(9):412-416
LIU Ye-feng, GONG Ling-xiao, LIU Lian-liang, et al. Determination on nutritional content of Tibetan turnip (*Brassica rapa L.*) and experimental study on improvement of mice hypoxia tolerance [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(9): 412-416
- [4] 张英,唐伟敏,尼玛,等.西藏芜菁及其加工制品增强人体低氧耐受性的实验研究[J].食品科学,2014,35(3):178-182
ZHANG Ying, TANG Wei-min, NI Ma, et al. Effects of Tibetan Turnip and its processed products on human tolerance to hypoxia [J]. Food Science, 2014, 35(3): 178-182
- [5] 杨保求,马飞军,蒲云峰.新疆芜菁皂苷的体内抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2016,37(16):6-10
YANG Bao-qiu, MA Fei-jun, PU Yun-feng. *In vivo* antioxidant activity of Saponins extracted from Brassica Campestris L [J]. Food Research and Development, 2016, 37(16): 6-10
- [6] 陈卓尔,古娜娜·对山别克,乌英,等.新疆芜菁水提物抗肿瘤活性初步研究[J].西北药学杂志,2016,31(3):264-267
CHEN Zhuo-er, Gunana DUISHANBIEKE, WU Ying, et al. Study on the anti-tumor effect of aqueous extract from Brassica rapa L [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2016, 31(3): 264-267
- [7] 姚星辰,陈湘宏,段雅彬,等.芜菁正丁醇提取物对四氧嘧啶型糖尿病小鼠血糖的影响[J].天然产物研究与开发,2015,27(4):706-709
YAO Xing-chen, CHEN Xiang-hong, DUAN Ya-bin, et al.

- Effect of N-butanol extract of *Brassica rapa* on blood glucose level of alloxan-induced diabetic mice [J]. *Natural Product Research and Development*, 2015, 27(4): 706-709
- [8] 陈湘宏,刘燕,翁裕馨,等. 芜菁挥发油对高脂高糖小鼠降血糖的作用机制[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2014, 52(12): 20-23
CHEN Xiang-hong, LIU Yan, WENG Yu-xin, et al. Hypoglycemic mechanism of volatile oil of plateau plant *Brassica rapa* L. in hyperlipidemic and hyperglycemic mice [J]. *Journal of Shandong University (Health Science)*, 2014, 52(12): 20-23
- [9] Li B, Zani A, Martin Z, et al. Intestinal epithelial cell injury is rescued by hydrogen sulfide [J]. *Journal of Pediatric Surgery*, 2016, 51(5): 775-778
- [10] König J, Wells J, Cani P D, et al. Human intestinal barrier function in health and disease [J]. *Clinical & Translational Gastroenterology*, 2016, 7(10): e196
- [11] Chen S W, Zhu J, Zuo S, et al. Protective effect of hydrogen sulfide on Tnf- α and Ifn- γ -induced injury of intestinal epithelial barrier function in Caco-2 monolayers [J]. *Inflammation Research*, 2015, 64(10): 789-797
- [12] 赵敏,刘冬妍. ROS 在高氧肠道中的作用[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2016, 25(8): 948-951
ZHAO Min, LIU Dong-yan. Role of ROS in the hyperoxia intestinal tract [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2016, 25(8): 948-951
- [13] 郭玉文,曹婧然,何立杰. 细胞水平的抗氧化机制研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(1): 13-16
GUO Yu-wen, CAO Jing-ran, HE Li-jie. Research progress in antioxidation mechanism on cellular level [J]. *Medical Recapitulate*, 2016, 22(1): 13-16
- [14] Magdalena K, Katarzyna P G, Alicja J, et al. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes [J]. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 2016, 36(6): 1-17
- [15] Casimirri E, Stendardo M, Bonci M, et al. Biomarkers of oxidative-stress and inflammation in exhaled breath condensate from hospital cleaners [J]. *Biomarkers*, 2016, 21(2): 115-122
- [16] Zhao P, Zhou R U, Zhu X, et al. Matrine attenuates focal cerebral ischemic injury by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in mice [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015, 36(3): 633-644
- [17] 谭彬,赵已未. 溃疡性结肠炎患者血清 IL-13、IL-8 的水平变化及意义[J]. *临床医学工程*, 2012, 19(4): 581-582
TAN Bing, ZHAO Yi-wei. Serum contents of IL-13 and IL-8 in the patients with ulcerative colitis and the clinical significance [J]. *Clinical Medical & Engineering*, 2012, 19(4): 581-582
- [18] 易蕊,常娟,刘晓艳,等. TNF- α 、IL-6 及 IL-8 在不同程度溃疡性结肠炎患者血清中的表达及意义[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(14): 2641-2644
YI Rui, CHANG Juan, LIU Xiao-yan, et al. Expressions and significance of TNF- α , IL-6 and IL-8 in patients with ulcerative colitis at different degrees [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 15(14): 2641-2644
- [19] Voronov E, Apte RN. IL-1 in Colon Inflammation, Colon carcinogenesis and invasiveness of colon cancer [J]. *Cancer Microenvironment*, 2015, 8(3): 187-200
- [20] 潘晓菲,孟存英. 白细胞介素与炎症性肠病关系的研究进展[J]. *中国综合临床*, 2017, 33(6): 572-576
PAN Xiao-fei, MENG Cun-ying. Research progress in the relation between interleukin and inflammatory bowel disease [J]. *Clinical Medicine of China*, 2017, 33(6): 572-576
- [21] 朱锋,王晓兵,刘适,等. CXC 趋化因子受体 2 和白细胞介素-8 在炎症性肠病患者中的表达及其意义[J]. *胃肠病学*, 2016, 21(6): 331-335
ZHU Feng, WANG Xiao-bing, LIU Shi, et al. Expressions and significance of CXC chemokine receptor type 2 and interleukin-8 in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology*, 2016, 21(6): 331-335