

# 蓝莓黑醋栗枸杞决明子复合物对眼部细胞氧化应激损伤的保护作用

王欢, 王敏\*, 刘竹青, 何运辉, 石举然, 邹圣灿  
(青岛琛蓝健康产业集团有限公司, 山东青岛 266000)

**摘要:** 探讨了蓝莓黑醋栗枸杞决明子复合物 (Blueberry, Blackcurrant, Medlar, Cassia Seed Complex, LHGJ) 对丙酮醛 (Methylglyoxal, MGO) 诱导的人视网膜上皮细胞 (Retinal Pigment Epithelium, APRE-19) 氧化应激损伤的保护作用。以 MGO 诱导 ARPE-19 细胞氧化应激损伤建立细胞模型, 给予不同质量浓度 LHGJ 复合物处理。利用 CCK-8 法检测细胞活力, 采用荧光显微镜检测细胞活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 含量、采用酶联免疫法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) 测定一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 含量、比色法测定谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione Peroxidase, GSH-Px) 及羟胺法测定超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 活性。实验结果表明, ARPE-19 细胞可经 0.80 mmol/L MGO 诱导氧化应激损伤模型。诱导 ARPE-19 细胞经 0.10、1.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 复合物处理后, 细胞活力增加 23.03% 与 21.23%, 具有高度显著差异 ( $P < 0.001$ )。0.01、0.10、10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 复合物使 ROS 的荧光强度显著降低 1.02、1.28、2.37 倍 ( $P < 0.05$ ), 0.01、0.10、10  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 复合物使 NO 的生成量显著降低 13.24、15.23、16.24  $\mu\text{mol/g prot}$  ( $P < 0.05$ ); 1.00、10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 复合物使 SOD 活性显著与极显著升高 6.01、7.43 U/mg ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 1.00 与 10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 复合物显著增加了 GSH-Px 活力 14.32 及 25.42 U/mg ( $P < 0.05$ )。LHGJ 复合物对 MGO 导致的 ARPE-19 细胞氧化应激损伤具有保护作用, 可为 LHGJ 进一步开发提供理论依据。

**关键词:** 眼部; 氧化应激; 保护作用

文章编号: 1673-9078(2024)01-47-53

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.1613

## Protective Effect of a Complex of Blueberry, Blackcurrant, Medlar and Cassia Obtusifolia Against Oxidative Stress Injury in Retinal Epithelial Cells

WANG Huan, WANG Min\*, LIU Zhuqing, HE Yunhui, SHI Juran, ZOU Shengcan

(Qingdao Chenlan Health Industry Group Co. Ltd., Qingdao 266000, China)

**Abstract:** To study the protective effect of blueberry, blackcurrant, medlar, cassia seed complex (LHGJ) against the oxidative stress injury in human retinal epithelial cells (APRE-19) induced by methylglyoxal (MGO). The ARPE-19 cell model was established through inducing oxidative stress by MGO, and LHGJ solutions at different concentrations were used to treat the cells. Cell viability was determined by the CCK-8 method, the reactive oxygen species (ROS) content in cells was measured by the fluorescence microscopy method, the nitric oxide (NO) content was measured by enzyme-

引文格式:

王欢,王敏,刘竹青,等.蓝莓黑醋栗枸杞决明子复合物对眼部细胞氧化应激损伤的保护作用[J].现代食品科技,2024,40(1):47-53.

WANG Huan, WANG Min, LIU Zhuqing, et al. Protective effect of a complex of blueberry, blackcurrant, medlar and cassia obtusifolia against oxidative stress injury in retinal epithelial cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1):47-53.

收稿日期: 2022-12-27

作者简介: 王欢 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 17862898013@163.com

通讯作者: 王敏 (1985-), 女, 硕士, 研究方向: 海洋及中药活性成分及功能食品开发, E-mail: minwang@chenland.com

linked immunosorbent assay (ELISA), the glutathione peroxidase (GSH-PX) content was measured by colorimetry, and the superoxide dismutase (SOD) activity was measured by the hydroxylamine method. The results showed that oxidative stress injury in ARPE-19 cells could be induced by 0.80 mmol/L MGO. The induced ARPE-19 cells were then treated with 0.10 or 1.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ complex, which increased the cell viability by 23.03% and 21.23%, respectively ( $P<0.001$ ). LHGJ complex solutions at 0.01, 0.10 and 10.00  $\mu\text{g/mL}$  significantly ( $P<0.05$ ) reduced the fluorescence intensity of ROS (by 1.02, 1.28 and 2.37 times, respectively), LHGJ complex solutions at 0.01, 0.10 and 10.00  $\mu\text{g/mL}$  significantly ( $P<0.05$ ) decreased NO production (by 13.24, 15.23 and 16.24  $\mu\text{mol/g prot.}$ , respectively), LHGJ complex solutions at 1.0 and 10.00  $\mu\text{g/mL}$  significantly ( $P<0.05$ ) increased the activity of SOD (by 6.01 and 7.43 U/mg, respectively) ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and the content of GSH-Px (by 14.32 and 25.42 U/mg, respectively) ( $P<0.05$ ). LHGJ complex can protect ARPE-19 cells against oxidative stress injury induced by MGO, which provides a theoretical basis for further development of LHGJ complex.

**Key words:** eyes; oxidative stress; protection

眼部是人体感受与传递外界信息的初始媒介, 由于代谢旺盛, 导致其容易遭受一系列氧化影响, 出现氧化应激现象<sup>[1,2]</sup>。氧化应激表现为细胞氧化与抗氧化作用失衡的机体状态, 即当机体活性氧水平过高时, 脂质与蛋白质等生物大分子自动启动链式反应, 细胞活动中断, 导致的眼部视觉功能障碍症状<sup>[3,4]</sup>。已有研究表明<sup>[5-7]</sup>, 外源性抗氧化剂对眼部氧化应激损伤具有保护作用。

一些天然来源的产物被证实可保护眼部氧化应激损伤, 其中蓝莓、黑醋栗、枸杞、决明子最具代表性<sup>[8-10]</sup>。蓝莓花色苷为蓝莓主要活性成分, 具有保护眼部氧化应激损伤作用。张卓睿等<sup>[11]</sup>研究发现, 蓝莓花色苷可显著减低血乳酸及丙二醛的含量。除此之外, 蓝莓花色苷也可以显著增强超氧化物歧化酶与谷胱甘肽过氧化物酶的活力, 抑制下游产物 NF- $\kappa$ B 的大量生成, 实现防止氧化损伤的作用<sup>[12]</sup>。黑醋栗, 被广泛应用于食品、医药与保健品中。黑醋栗的活性物质花色苷可以在脱氢化作用下与自由基结合, 终止自由基链式反应; 也可与金属催化剂通过螯合反应抑制过氧化现象<sup>[13]</sup>。枸杞与决明子为国家卫健委批准的药食同源。《本草纲目》中对枸杞的记载为: “补肾生精, 养肝, 明目安神”。枸杞多糖能显著提升酶促抗氧化体系酶活力, 抑制过氧化产物丙二醛生成与积累, 使得机体氧化速度与程度显著降低, 缓解眼部氧化应激损伤<sup>[14,15]</sup>。《神农本草经》中对决明子的记载为 “久服益精, 轻身”。决明子中蒽醌类可通过三条途径实现眼部氧化应激损伤保护作用: 抑制眼部晶状体细胞中醛糖还原酶的活性; 抑制氧化糖基化末端产物的生成; 抑制视网膜细胞中氧化 DNA 改性及亚硝基酪氨酸积累<sup>[16,17]</sup>。

虽然大量研究已经明确了 4 种天然产物的眼部氧化应激保护作用机理, 但缺乏对天然产物作为保

护眼部氧化应激活性功能食品的产业化开发。此外, 4 种具有眼部氧化应激保护活性的天然产物安全性及眼部氧化应激保护作用效果仍旧未知。因此为进一步将理论研究转化实际生产, 本试验选择蓝莓、黑醋栗、枸杞及决明子提取物为原料 (主要成分为花色苷、多糖及蒽醌), 复配白砂糖及食用香精, 制备营养复方制剂——蓝莓黑醋栗枸杞决明子复合物 (Blueberry, Blackcurrant, Medlar, Cassia Seed Complex, LHGJ)。之后通过丙酮醛 (Methylglyoxal, MGO) 诱导人视网膜色素上皮细胞 (Retinal Pigment Epithelium, APRE-19) 氧化应激损伤建立细胞模型, 并给与不同质量浓度蓝莓黑醋栗枸杞决明子复合物处理。采用荧光显微镜检测细胞活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 含量、采用酶联免疫法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISE) 测定一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 含量、采用比色法测定谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione Peroxidase, GSH-Px) 活力及采用羟胺法测定超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 活力。研究 LHGJ 复合物对眼部细胞氧化应激损伤的作用, 期为 LHGJ 复合物的进一步开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

蓝莓、黑醋栗提取物 (规格 30:1), 西安晋恒化工有限公司; 黑枸杞、决明子提取物: (规格 30:1), 陕西嘉禾有限公司; 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准品 (色谱级), 上海甄淮生物科技有限公司; 葡萄糖 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; APRE-19 细胞, 中国上海科学院细胞库; DMEM/F12

(Dulbecco's Modified Eagle Media : Nutrient Mixture F-12, DMEM/F12) 1:1 细胞培养液, 美国 GIBCO 公司; 胎牛血清 (分析纯), 四季春生物公司; CCK-8 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) 试剂盒, 日本同仁化学研究所; ROS 检测试剂盒 (2',7-dichlorofluorescein diacetate), 美国 Abcam 公司; SOD、NO、GSH-Px 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

### 1.1.2 仪器与设备

Thermo Fisher Multiskan FC 酶标仪, 上海赛默飞世尔仪器有限公司; L-500 离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; Advantage 超纯水仪, 德国 Merck Millipore 公司; BSA224S-WC 电子天平 (精密度 0.000 1), 赛多利斯贸易有限公司; MODEL C-SHG1 荧光显微镜, 上海尼康仪器有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 LHGJ复合物的制备

蓝莓、黑醋栗、枸杞与决明子提取物过 100 目筛, 之后按照蓝莓提取物 5.50 g/100 g、黑醋栗提取物 10.00 g/100 g、枸杞提取物 36.50 g/100 g、决明子提取物 45.50 g/100 g、白砂糖 2.48 g/100 g、葡萄香精 0.02 g/100 g 的标准, 进行称取, 混合均匀, 分装每袋 4.50 g, 可得成品。

### 1.2.2 LHGJ复合物总花色苷、粗多糖及蒽醌含量测定

#### 1.2.2.1 pH值示差法测定总花色苷含量

参考 Wang 等<sup>[18]</sup>的方法并稍作调整。LHGJ 复合物经体积分数 0.1% 盐酸的甲醇溶液溶解并配置为 1 mg/mL 的溶液, 之后采用紫外分光光度计对 LHGJ 复合物进行全波长测定 (200~1 200 nm), 确定最大吸收波长为 516 nm。LHGJ 复合物溶液分别采用 pH 值 4.5 缓冲液 (1 mol/L CH<sub>3</sub>COONa 溶液、1 mol/L HCl 溶液与 H<sub>2</sub>O 以 100:60:90 (V:V:V) 的比例进行配制) 与 pH 值 1.0 缓冲液 (0.2 mol/L KCl 溶液与 0.2 mol/L HCl 溶液以 25:67 (V:V) 的比例进行配制) 稀释 100 倍, 37 °C 平衡 1 h, 紫外分光光度计测定 LHGJ 复合物于 516 nm 处吸光度, 利用 700 nm 处吸光度进行校正, 总花色苷含量按照式 (1) 计算:

$$F = \frac{A-B}{a-b} \times \frac{1}{\varepsilon \times L} \times W \times D \times \frac{V}{M} \times 1000 \quad (1)$$

式中:

$F$ —总花色苷含量, mg/g;

$A$ —pH 值 1.0 缓冲液稀释后于 516 nm 处所测得吸光度;

$B$ —pH 值 1.0 缓冲液稀释后于 700 nm 处所测得吸光度;

$a$ —pH 值 4.5 缓冲液稀释后于 516 nm 处所测得吸光度;

$b$ —pH 值 4.5 缓冲液稀释后于 700 nm 处所测得吸光度;

$\varepsilon$ —矢车菊素 -3-O- 葡萄糖苷的摩尔消光系数, 26900 L/(mol·cm);

$L$ —光程, 1 cm;  $W$  为矢车菊素 -3-O- 葡萄糖苷的相对分子量, 449.2 g/mol;

$D$ —稀释倍数;

$V$ —总提取液体积, L;

$M$ —样品质量, g。

#### 1.2.2.2 苯酚硫酸法测定LHGJ复合物粗多糖含量

根据《保健食品功效成分检测方法》<sup>[19]</sup>对 LHGJ 复合物中粗多糖含量进行测定。以葡萄糖为标准品绘制标准曲线, 样品经溶解后依次加入浓硫酸与体积分数 6% 的苯酚, 剧烈晃动, 待反应完全, 测定 490 nm 处吸光值。

#### 1.2.2.3 醋酸镁-甲醇法测定LHGJ复合物蒽醌含量

称取 LHGJ 复合物 1 g 于烧瓶中, 加入 50 mL 氯仿进行 85 °C 水浴回流 2 h, 之后挥发干氯仿, 加入 0.5% 醋酸镁 - 甲醇进行溶解, 之后采用质量分数 0.5% 醋酸镁 - 甲醇法<sup>[20]</sup>对 LHGJ 复合物蒽醌含量进行测定。

## 1.2.3 分组及药物处理

### 1.2.3.1 APRE-19细胞培养

APRE-19 细胞经液氮罐取出后, 转移至培养于 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 g/L 链霉素的 DMEM/F12 培养基中, 放入 37 °C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱中培养, 进行细胞复苏。每天对培养液进行更换至 APRE-19 细胞生长至细胞融合度 90% 左右, 对其进行传代处理, 选取对数期生长细胞进行后续试验。

### 1.2.3.2 MGO及LHGJ复合物对APRE-19细胞活力的影响

取对数生长期的 APRE-19 细胞, 分为对照组与 MGO 组、LHGJ 复合物组, 以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞的标准接种 96 孔板, 接种 24 h 后弃去完全培养基。对照组 APRE-19 细胞中加入无血清培养基, MGO 组 APRE-19 细胞中分别加入 0.25、0.50、1、2、4 mmol/L MGO 溶液, LHGJ 复合物组 APRE-19 细胞中分别加入 0.01、0.1、1、10、100 μg/mL

LHGJ 复合物溶液, 孵育 18 h。

### 1.2.3.3 LHGJ复合物对MGO诱导APRE-19细胞活力的影响

取对数生长期的 APRE-19 细胞, 分为对照组、MGO 组、MGO+0.01  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 组、MGO+0.10  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 组、MGO+1.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 组、MGO+10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 组, 以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞的标准接种 96 孔板, 接种 24 h 后弃去完全培养基。对照组与 MGO 组 APRE-19 细胞中加入无血清培养基, MGO+ 不同质量浓度 LHGJ 组的 APRE-19 细胞中分别加入 0.01、0.10、1.00、10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 复合物溶液, 孵育 6 h 后, MGO 组与 MGO+ 不同质量浓度 LHGJ 组继续加入 MGO。使 MGO 最终浓度为 0.08 mmol/L, 孵育 18 h。

### 1.2.4 CCK-8检测细胞活力

取对数生长期的 APRE-19 细胞, 按照 1.2.3.2 与 1.2.3.3 分组以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞的标准接种 96 孔板。培养 24 h 后, 加入 CCK-8 试剂 (CCK-8: 无血清培养基 = 1:9) 100  $\mu\text{L}$ , 孵育 3 h, 测定 450 nm 处吸光度值, 并计算细胞活力。

### 1.2.5 细胞氧化应激水平检测

#### 1.2.5.1 ROS含量测定

参考甘婧<sup>[21]</sup>的方法, 并稍作调整。APRE-19 细胞经磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer, PBS) 洗涤后, 加入最终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  活性氧荧光探针 (2',7'-dichlorofluorescein Diacetate, DCFH-DA), 37  $^{\circ}\text{C}$  黑暗处孵育 30 min 后进行无血清细胞培养液洗涤去除多余探针, 荧光显微镜参数设置为激发波长 485 nm 与发射波长 528 nm, 观察 ROS 荧光强度。

#### 1.2.5.2 NO含量、GSH-Px及SOD活力测定

根据试剂盒说明书, 对 APRE-19 细胞裂解液采用羟胺法测定 SOD 活力, 采用 ELISE 法测定 NO 含量, 采用比色法测定 GSH-Px 活力。

### 1.2.6 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件对试验数据进行统计分析, 采用 Origin 2020 进行绘图。以  $t$  检验进行显著性分析,  $P < 0.05$  差异性显著,  $P < 0.01$  差异性极显著,  $P < 0.001$  差异性高度显著。试验重复 3 次, 数据以平均值  $\pm$  标准差表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 总花色苷、粗多糖与蒽醌含量的测定

蓝莓与黑醋栗中的花色苷及枸杞与决明子中的

多糖是 LHGJ 复合物主要的活性物质。因此本研究对 100 g LHGJ 复合物中总花色苷与多糖含量进行测定。由表 1 可知, 3 次提取工艺中每 100 g LHGJ 复合物总花色苷含量为 2.01 g/100 g, 总多糖含量为 22.69 g/100 g, 蒽醌含量为 0.99 g/100 g。且均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1 总花色苷、粗多糖与蒽醌含量

Table 1 Total anthocyanins, crude polysaccharides and anthraquinone content

物质含量/(g/100 g)	样品批号			平均值
	1	2	3	
总花色苷 (以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷计)	1.98	2.01	2.03	2.01 $\pm$ 0.07
粗多糖 (以葡萄糖计)	22.72	22.67	22.69	22.69 $\pm$ 0.15
蒽醌 (以 1,8-二羟基蒽醌计)	1.01	0.98	0.97	0.99 $\pm$ 0.05

## 2.2 APRE-19细胞活力

### 2.2.1 LHGJ复合物对APRE-19细胞活力的影响

根据 APRE-19 细胞活力对 LHGJ 复合物安全质量浓度进行筛选, 结果如图 1 所示, 0、0.01、0.10、1.00、10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 复合物对 APRE-19 细胞存活率的影响不具有显著性 ( $P > 0.05$ ), 表明 0~10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 对 APRE-19 细胞不具有毒性作用。当 100.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 复合物对 APRE-19 细胞进行处理时, APRE-19 细胞存活率下降 15.43%, 呈现高度显著性 ( $P < 0.001$ ), APRE-19 细胞毒性作用明显。因此, 选取 0.01、0.10、1.00、10.00  $\mu\text{g/mL}$  进行细胞试验。

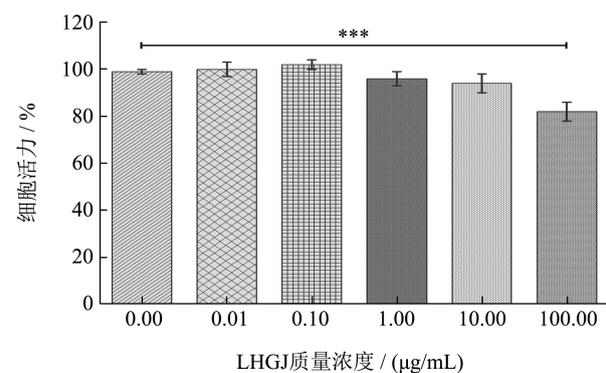


图 1 LHGJ 复合物质量浓度对 APRE-19 细胞活力的影响

Fig.1 Effects of different mass concentrations of LHGJ complex on the viability of APRE-19 cells

注: \*\*\* 表示差异性高度显著,  $P < 0.001$ 。

### 2.2.2 MGO对APRE-19细胞活力的影响

根据 APRE-19 细胞活力对 MGO 诱导浓度进行

筛选,结果如图2所示。APRE-19细胞活力抑制率随MGO浓度的增加呈现明显上升,通过GraphPad Prism 6.0软件进行曲线拟合,得到MGO作用APRE-19细胞半数抑制浓度为0.77 mmol/L,考虑到具体实验操作,选择浓度为0.80 mmol/L的MGO对APRE-19细胞进行诱导建立细胞损伤模型。

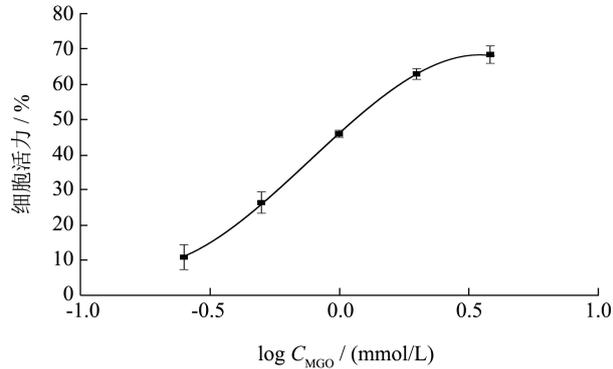


图2 MGO浓度对APRE-19细胞活力的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of MGO on the viability of APRE-19 cells

### 2.2.3 LHGJ复合物对MGO诱导APRE-19细胞活力的影响

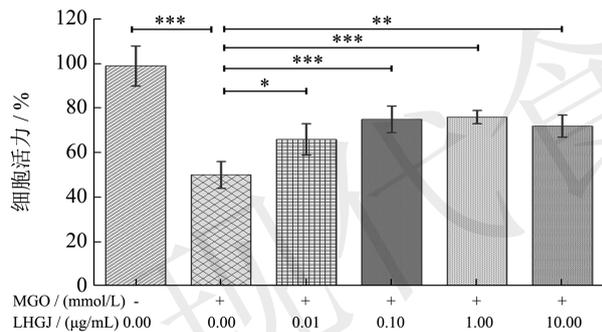


图3 LHGJ复合物质量浓度对MGO诱导APRE-19细胞活力的影响

Fig.3 Effects of LHGJ complex at different mass concentrations on MGO-induced viability of APRE-19 cells

注:\*表示差异性显著, $P<0.05$ ;\*\*表示差异性极显著, $P<0.01$ ;\*\*\*表示差异性高度显著, $P<0.001$ 。

MGO诱导APRE-19细胞经0.01、0.10、1.00、10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ复合物处理后,细胞存活率见图3。与MGO组相比,LHGJ各质量浓度组均能提高APRE-19细胞活力,具有统计学意义。其中0.01  $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度提高效果具有显著性( $P<0.05$ ),10  $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度具有极显著性( $P<0.01$ ),0.10与1.00  $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度提高效果具有高度显著性( $P<0.001$ ),分别提高21.23%与23.03%。说明LHGJ复合物对氧化应激损伤APRE-19细胞活力具有有效的保护作用。

## 2.3 LHGJ复合物对MGO诱导APRE-19细胞抗氧化能力的影响

### 2.3.1 LHGJ复合物对MGO诱导APRE-19细胞ROS生成量的影响

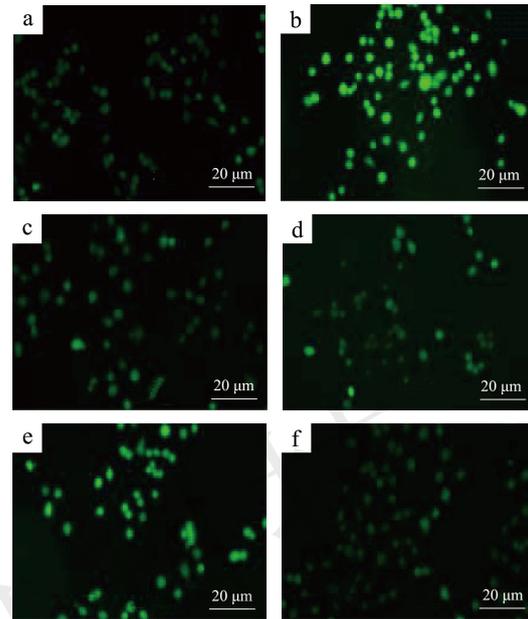


图4 LHGJ复合物质量浓度对MGO诱导APRE-19细胞ROS水平的影响

Fig.4 Effects of LHGJ complex at different mass concentrations on MGO-induced ROS level in APRE-19 cells

注:(a)对照组;(b)MGO组;(c)MGO+0.01  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ组;(d)MGO+0.10  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ组;(e)MGO+1.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ组;(f)MGO+10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ组。

机体可接受含量范围内的ROS对于维持生理正常活动有重要作用。但机体氧化应激状态时,ROS大量释放至超过机体可抵御含量时,细胞出现氧化损伤。荧光探针DCFH-DA穿过细胞膜后,在细胞内酯酶作用下水解为DCFH,细胞内积累的ROS氧化无荧光状态DCFH为绿色荧光,因此,通过检测绿色荧光强度反映细胞内ROS生成量,结果为图4所示。与对照组相比,MGO干预能显著增加ARPE-19细胞氧化应激水平,细胞中ROS的荧光强度增大为对照组的2.89倍,具有显著性差异( $P<0.05$ )。与MGO组对比,除1.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ复合物外,其余各组均能显著降低ARPE-19细胞中ROS的荧光强度( $P<0.05$ ),具体表现为0.01、0.10、10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ复合物组细胞中ROS的荧光强度分别降低为MGO组的1.02、1.28、2.37倍。说明一定剂量质量浓度的LHGJ复合物可抑制体内ROS的生成,从而达到对眼部细胞氧化

应激现象的保护作用。徐文流等<sup>[22]</sup>等将枸杞、决明子、桑葚等进行复配,发现 1 mg/kg 复合物可以降低 ROS 水平 25.62%,这与本文研究一致。此外,目前没有研究过 4 种物质复合物对 ROS 生成的作用,但有研究表明单独的蓝莓与黑醋栗花色苷、枸杞多糖、决明子蒽醌均可通过下调炎症因子基因的表达或增强抗氧化酶系活性,降低细胞内 ROS 水平<sup>[23-26]</sup>。因此推测 LHGJ 复合物可通过不同的分子机制降低细胞 ROS 的生成,达到保护细胞氧化应激的作用。

### 2.3.2 LHGJ复合物对MGO诱导APRE-19细胞NO含量、GSH-Px与SOD活力的影响

机体的氧化应激现象是指抗氧化酶系统接受氧化刺激信号后,通过自我调整与修复,减少对细胞的氧化损伤<sup>[27]</sup>。为了进一步探讨 LHGJ 复合物对 MGO 诱导 APRE-19 细胞抗氧化能力的影响,对 APRE-19 细胞 NO 含量、GSH-Px 及 SOD 的活性进行检测。由图 5a 所知,与空白组相比, MGO 诱导能明显促进 ARPE-19 细胞 NO 的生成 ( $P<0.01$ ), NO 生成量是正常组的 2.53 倍。与 MGO 模型组相比,除 1.00  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度 LHGJ 复合物以外, 0.01、0.10、10.00  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度均能降低 ARPE-19 细胞中 NO 的生成,具体表现为分别降低 13.24、15.23、16.24  $\mu\text{mol/g prot}$ ,具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。说明一定剂量质量浓度的 LHGJ 复合物可抑制体内 NO 的生成。此外,目前还没有研究针对蓝莓、黑醋栗、枸杞及决明子复合物对 NO 的作用效果,但有研究表明 50~150 mg/kg 的决明子提取物给药可以将 NO 含量降低 6~17  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[28]</sup>。

SOD 是机体抵御外界氧化应激的第一道防线, GSH-Px 是机体内重要的过氧化物分解酶,可以催化 GSH 与过氧化物还原为无害羟基物质,从而发挥一直眼部细胞氧化损伤的作用<sup>[1]</sup>。由图 5b 所知,与对照组相比, MGO 干预能显著降低 ARPE-19 细胞中 SOD 的活性 ( $P<0.01$ ); 与 MGO 组相比, LHGJ 复合物能剂量依赖性的提高 ARPE-19 细胞 SOD 的活性,其中 0.10、1.00、10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 复合物处理后, ARPE-19 细胞中 SOD 的活性分别显著升高 5.23 ( $P<0.05$ )、6.01 ( $P<0.01$ )、7.43 U/mg ( $P<0.01$ )。由图 5c 所知,与对照组相比, MGO 干预能显著抑制 ARPE-19 细胞中 GSH-Px 的活力 ( $P<0.05$ ), 与 MGO 组相比, LHGJ 复合物能剂量依赖性的提高 ARPE-19 细胞 GSH-Px 的活力。其中, 1.00、10.00  $\mu\text{g/mL}$  LHGJ 复合物处理后, ARPE-19 细胞中 GSH-Px 的活力分别升高

13.32 及 22.42 U/mg, 具有显著性 ( $P<0.05$ )。刘垚杰等<sup>[29]</sup>也研究发现,在枸杞剂量为 460 mg/kg·bw 时,枸杞、菊花与熟地黄组方对 ARPE-19 细胞 SOD 与 GSH-Px 活力提高 3.00、2.98 U/mg。本研究通过对比,可以发现 LHGJ 复合物对 SOD 与 GSH-Px 活力增加程度高于枸杞与熟地黄组方,这可能与 LHGJ 复合物中蓝莓花色苷的添加有关。尹利端等<sup>[30]</sup>研究发现,蓝莓花色苷各剂量组均能显著提高视网膜 SOD 的活性,也证实了蓝莓花色苷的有效添加。

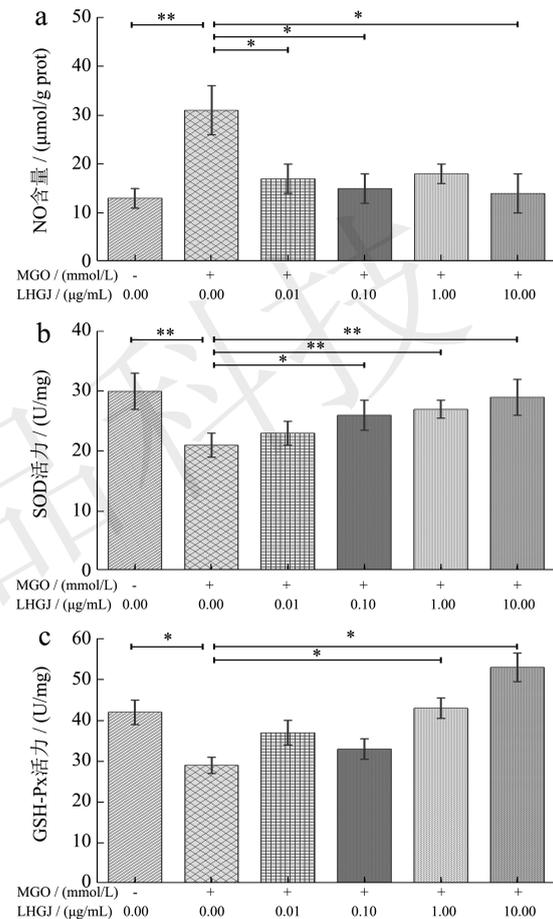


图5 LHGJ复合物质量浓度对MGO诱导APRE-19细胞NO含量(a)、SOD活力(b)与GSH-Px活力(c)的影响  
Fig.5 The effects of LHGJ complex at different concentrations on NO content (a), SOD activity (b) and GSH-Px activity (c) of APRE-19 cells induced by MGO

注: \*表示差异性显著,  $P<0.05$ ; \*\*表示差异性极显著,  $P<0.01$ 。

### 3 结论

本研究以蓝莓、黑醋栗、枸杞与决明子为原料进行配比制备 LHGJ 复合物,其质量浓度为 0~10.00  $\mu\text{g/mL}$  时,对 ARPE-19 细胞活力无影响,不存在潜在毒性。同时,以对照组与 MGO 诱导细胞氧化应激损伤模

型下细胞活力与抗氧化能力变化为研究指标,探究LHGJ复合物对眼部APRE-19细胞损伤的保护作用时,结果表明,LHGJ复合物可以保持氧化应激损伤状态ARPE-19细胞的生物学功能完整性,充分发挥其保护眼部细胞的作用,也将为LHGJ复合物在眼部保护领域的进一步开发应用提供理论依据。相比于其他天然复合物质的眼部保护作用,LHGJ复合物表现出更强的SOD与GSH-Px活力提高能力。综上,本研究进一步实现蓝莓、黑醋栗、枸杞与决明子的实际应用价值,为促进LHGJ复合物工业化生产奠定了基础。除此之外,由于SOD与GSH-Px作为皮肤黑色素生成的抑制因子,因此SOD与GSH-Px活力的提高可以用来缓解皮肤黑色素沉积,未来可进一步深入研究LHGJ复合物对皮肤美白的作用。

### 参考文献

- [1] 郭星,梅妍.视网膜光化学损伤机制的研究进展[J].四川解剖学,2012,20(4):61-64.
- [2] KUMAR RN, GEORGE BP, CHANDRAN R, et al. The influence of light on reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B in disease progression [J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2019, 8(12): 640.
- [3] COUCHA M, ELSHAER S L, ELDAHSHAN W S, et al. Molecular mechanisms of diabetic retinopathy: potential therapeutic targets [J]. *Middle East African Journal of Ophthalmology*, 2015, 22(2): 135-144.
- [4] BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism [J]. *Diabetes*, 2005, 54(6): 1615-1625.
- [5] KANG M, XIAO J L, ZHANG Y W, et al. Determining high-intensity sweeteners in white spirits using an ultrahigh performance liquid chromatograph with a photo-diode array detector and charged aerosol detector [J]. *Molecules*, 2019, 25(1): 1-14.
- [6] 陈慧,马璇,曹丽行,等.运动疲劳机制及食源性抗疲劳活性成分研究进展[J].食品科学,2020,41(11):247-258.
- [7] 谷炎培,韩建欣,姜春鹏,等.植物提取物延缓皮肤老化作用的研究进展[J].精细化工,2020,37(2):217-221,241.
- [8] KALT W, FORNEY C F, MARTIN A, et al. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(11): 4638-4644.
- [9] BRNDENBURG J P, GILES L V. Four days of blueberry powder supplementation lowers the blood lactate response to running but has no effect on time-trial performance [J]. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 2019, 29(6): 636-642.
- [10] 文光琴,聂飞,廖优江.蓝莓果实理化成分含量比较分析与功能评价[J].江西农业学报,2012,24(1):117-119.
- [11] 张卓睿,毛迪锐,高晗,等.蓝莓花青素对小鼠抗疲劳及体内抗氧化作用[J].食品科学,2017,38(21):207-211.
- [12] NAOMI O, MEGUMI Y, MIDORI N, et al. Ingestion of proanthocyanidins derived from Cacao inhibits diabetes-induced cataract formation in Rats [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2004, 229(1): 29-33.
- [13] 杨琴,漆国栋,伍亚民,等.川芎嗪对过氧化氢诱导星形胶质细胞氧化应激损伤的保护作用[J].第三军医大学学报,2021,43(3):226-233.
- [14] YI R, LIU X M, DONG Q. A study of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) extraction technology and its anti-aging effect [J]. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM*, 2013, 10(4): 171-174.
- [15] 李燕君,谭梅,张凤萍,等.枸杞沙棘浓浆缓解视疲劳作用研究[J].食品研究与开发,2018,39(19):175-179.
- [16] DAE S J, GA Y L, YOUNG S K, et al. Anthraquinones from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on protein glycation and aldose reductase [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30(11): 2207-2210.
- [17] HOU B, HE S Z, GONG Y, et al. Effect of obtusifolin administration on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2014, 70(3): 1655-1661.
- [18] WANG Y W, LUAN G X, ZHOU W, et al. Subcritical water extraction, UPLC-Triple-TO F/MS analysis and antioxidant activity of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr [J]. *Food Chemistry*, 2018, 249: 119-126.
- [19] 白鸿.保健食品功效成分检测方法[M].北京:中国中医药出版社,2011.
- [20] 谭丽容,代文豪,罗志锋,等.不同菌种发酵对巴戟天活性成分含量的影响[J].中国酿造,2018,37(12):121-125.
- [21] 甘婧.芹菜素通过调节氧化磷酸化及caspase信号途径缓解棒曲霉素诱导的人胚肾细胞凋亡[D].咸阳:西北农林科技大学,2017.
- [22] 徐文流,翁少全,徐海宁.一种浆果草本饮料对视神经挤压伤小鼠视网膜细胞及其抗氧化能力的影响[J].食品工业科技,2021,42(4):288-294.
- [23] 杨兆艳,胡红娟,李新,等.蓝莓花色苷对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导A549细胞氧化损伤的保护作用[J].中国食品学报,2021,21(12):33-45.
- [24] XIAO J, WANG F, LIONG E C, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides improve hepatic injury through NF $\kappa$ -B and NLRP3/6 pathways in a methionine choline deficient dietsteatohepatitis mouse model [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120(Pt B): 1480-1489.
- [25] 何宇,杨德,严宏.决明子总蒽醌调控Sirt1/PPAR $\gamma$ 通路对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导人晶状体上皮细胞氧化损伤的影响[J].中国中医眼科杂志,2022,32(2):94-99,106.
- [26] ZHAO S H, LAN X W, WU J Y, et al. Protocol of global incidence and progression of age-related macular degeneration: a systematic review [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98: e14645.
- [27] RAHMAN I, BISWAS S K, JIMENEZ L A, et al. Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2005, 7(1-2): 42-59.
- [28] 郑荣波,黄晓丹,何蓉蓉,等.决明子提取物对链脲佐菌素诱发糖尿病小鼠晶状体氧化应激状态的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(9):233-237.
- [29] 刘垚杰,刘莹,李丽维,等.复配药材对眼部光氧化应激的预防作用[J].食品安全质量检测学报,2020,11(17):6040-6044.
- [30] 尹利端,刘楚怡,仲米存,等.蓝莓提取物对小鼠视网膜光损伤的保护作用研究[J].安徽农业科学,2021,49(5):178-180,196.