

辣木叶水提取物对 H₂O₂ 致 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用

蔡小华¹, 李小伟², 李国坤¹, 苏立杰¹, 陈晓熠¹, 吴鑫兰^{1*}

(1. 广州医科大学公共卫生学院, 广东广州 511436) (2. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 该研究从细胞水平对辣木叶水提取物的抗氧化活性进行研究。以过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 诱导氧化损伤的人体肝癌细胞 (Human hepatoma cell, HepG2 cell) 为模型, 加入不同浓度的辣木叶水提取物进行保护干预, 利用 MTT 法测定细胞存活率, 同时测定超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醛 (MDA) 等抗氧化活性指标, 探究辣木叶水提取物对 H₂O₂ 诱导氧化损伤细胞的保护作用。结果表明, 辣木叶水提取物可明显提高经 H₂O₂ 诱导损伤的 HepG2 细胞存活率 ($p < 0.05$), 其中高浓度辣木叶水提取物 (500 和 600 $\mu\text{g/mL}$) 可使细胞存活率恢复到接近 100%。此外, 与模型组相比, 不同剂量辣木叶水提取物可明显提高 HepG2 细胞的 GSH-Px、SOD 活性水平 ($p < 0.05$) 和降低细胞的 MDA 含量 ($p < 0.05$), 其中 GSH-Px 含量提高了 20.77%~151.74%, SOD 活力提高了 22.24%~139.07%, MDA 含量下降了 12.51%~34.04%, 且其变化程度具有剂量依赖效应。综上所述, 辣木叶水提取物在细胞水平具有一定的抗氧化活性, 研究结果可为辣木叶抗氧化功能产品的开发提供参考依据。

关键词: 辣木叶水提取物; H₂O₂; HepG2 细胞; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2021)10-62-69

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0120

Protective Effects of an Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Leaves against H₂O₂-Induced Oxidative Damage in HepG2 Cells

CAI Xiao-hua¹, LI Xiao-wei², LI Guo-kun¹, SU Li-jie¹, CHEN Xiao-yi¹, WU Xin-lan^{1*}

(1.School of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

(2.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The antioxidant activity of an aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves was investigated at the cellular level. Taking human hepatoma cells (HepG2 cells) injured by hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress as the model, and the administration with different concentrations of the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves was for protective intervention. MTT method was used to measure the cell survival rate, and the antioxidant activity indexes such as levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA) were determined, to evaluate the protective effect of the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves against H₂O₂-induced oxidative damage in cells. The results showed that the survival rate of the HepG2 cells injured by H₂O₂ increased significantly ($p < 0.05$) by the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves, with the cell survival rate recovered almost 100% at high concentrations of the aqueous *Moringa oleifera* leaf extract (500 and 600 $\mu\text{g/mL}$). In addition, compared with the model group, the administration of the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves increased significantly ($p < 0.05$) the activities of GSH-Px and SOD and decreased significantly ($p < 0.05$) the MDA contents in a dose-dependent manner: increase by 20.77%~151.74% for GSH-Px, increase by 22.24%~139.07% for SOD, and decrease by 12.51%~34.04% for MDA. In summary, the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves has certain antioxidant activity at the cellular level,

引文格式:

蔡小华, 李小伟, 李国坤, 等. 辣木叶水提取物对 H₂O₂ 致 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(10): 62-69, +111

CAI Xiao-hua, LI Xiao-wei, LI Guo-kun, et al. Protective effects of an aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves against H₂O₂-induced oxidative damage in HepG2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 62-69, +111

收稿日期: 2021-02-02

基金项目: 广东省教育厅青年创新人才类项目 (2017KQNCX166); 广东省医学科研基金项目 (A2019327); 广州医科大学大学生实验室开放项目 (2018 年度)

作者简介: 蔡小华 (1998-), 女, 学士, 研究方向: 天然产物活性研究, E-mail: 13421770036@163.com

通讯作者: 吴鑫兰 (1988-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养, E-mail: 2016990009@gzhu.edu.cn

which can provide a reference for the development of antioxidant products of *Moringa oleifera* leaves.

Key words: aqueous extract of *Moringaoleifera* leaves; H₂O₂; HepG2 cells; antioxidant activity

机体生长代谢过程中产生的自由基具有多种生理功能,如预防感染、调节细胞信号传导等^[1,2]。但是,当机体受到外源性或内源性氧化物质损伤时,体内自由基产生和清除的动态平衡就会遭到破坏,从而引起活性氧在体内堆积并产生细胞毒性作用,这一非正常的生理状态即为氧化应激。过多的自由基会氧化细胞膜、代谢酶系、蛋白质和DNA等物质,还会诱导细胞凋亡,对机体的细胞及器官造成损伤^[3,4]。越来越多的证据已表明,氧化应激介导的氧化损伤与许多疾病的发生有关,特别是与心血管疾病、糖尿病、神经退行性疾病、癌症等高发疾病密切相关^[5-7]。这些疾病严重损害了患者的身体健康,造成了沉重的经济负担,并给人口老龄化问题带来更大的压力和挑战。因此,开发具有清除自由基的功能性食品和药物日益受到重视^[8-10]。

辣木(*Moringa oleifera*)原产于印度,其属于辣木科辣木属多年生植物,具有十分丰富而全面的营养价值。大量研究表明,辣木(包括辣木叶、辣木根和辣木籽等)具有良好的生理活性^[11,12],引起了全世界的广泛关注。我国卫生部于2012年批准辣木叶为新资源食品。现有的数据显示:辣木叶含有丰富的类黄酮以及多酚类物质,使其具有较强的抗氧化活性^[13]。例如,Silih等^[14]利用体外实验对不同季节的辣木叶以及同一辣木不同部位叶子的抗氧化活性进行了比较,发现冬季采收的辣木叶会比夏季所采收的辣木叶具有更强的抗氧化活性。国内学者周伟等^[15]利用乙醇对辣木叶的抗氧化活性物质进行提取并用体外化学方法评价其抗氧化活性,发现辣木叶醇提取物对DPPH、ABTS和OH自由基均具有较好的清除效果。目前,国内外关于辣木叶抗氧化活性主要是利用体外化学方法进行研究。但是,体外化学方法缺乏生物相关性、生物的复杂机制、作用因素和体内代谢等方面的条件。因此,本研究旨在以过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)诱导氧化损伤的人体肝癌细胞(HepG2 cell)为模型,从细胞水平上测定辣木叶的细胞水平抗氧化能力,在细胞层面上进一步丰富辣木叶抗氧化活性的评价结果。本文以细胞的存活率、细胞内主要的抗氧化酶中的超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase, GSH-Px)的活力,以及非酶系统中的丙二醛(Malonaldehyde, MDA)的含量变化来评价辣木叶的抗氧化能力,从而为辣木叶的功

能性食品开发及其抗氧化作用机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

GSH-Px检测试剂盒、总SOD活性检测试剂盒、MDA检测试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、细胞裂解液,碧云天生物技术公司;PBS缓冲液、DMEM基础培养基、胰蛋白酶溶液、青霉素/链霉素(即双抗)、胎牛血清,美国GIBCO公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT),美国Amresco公司;二甲基亚砜(DMSO)溶液,美国Sigma公司;30% H₂O₂溶液,市售分析纯;新鲜辣木叶,厦门天竺实业发展有限公司;HepG2细胞,华南理工大学食品科学与工程学院提供。

1.2 仪器与设备

Multiskan FC酶标仪,美国Thermo公司;SKE-14S超声均质机,宁波市鄞州硕利仪器有限公司;FD-1A-80真空冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;DK-8D恒温水浴箱,上海一恒科学仪器有限公司;Allegra X-22R离心机,上海宾智生物科技有限公司;MF52-LED倒置显微镜,广州市明美光电技术有限公司;BNP-80C CO₂培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;SW-CJ-1FD超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 辣木叶水提物的制备

采用台式真空冷冻干燥机对新鲜辣木叶进行冷冻,冷冻干燥条件为:温度-80℃,工作压力3MPa,干燥时长1d。干燥完成后,将辣木叶进行研磨粉碎过筛后,按以下条件进行超声浸提:时间30min、浸提温度70℃、浸提料液比1:40,制得浸提液后趁热过滤备用。

1.3.2 细胞的培养

(1)从液氮罐中取出待复苏的肝癌细胞,立即放入37℃的恒温水浴锅中,左右快速摆动使其在2min内迅速溶解,取出后用75%的酒精棉球擦拭冻存管外壁的水渍并进行消毒处理,放入超净工作台待用。

(2)将溶解后的细胞冻存液快速吸入工作台中心已

准备好的离心管中,加入 2 mL DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清及 1%双抗溶液),800 r/min 离心 5 min。

(3) 弃去上清,向离心管中加入 5 mL 完全细胞培养基,轻轻吹打均匀后用移液枪转移到灭菌过的细胞培养瓶中,移入 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

(4) 待细胞生长较满,约长到培养瓶底部面积的 80%~90%左右即可进行传代,弃去培养瓶上清液后加入 1 mL 胰酶到培养瓶中,消化 2 min,弃去瓶中的胰酶后加入 3 mL 的完全细胞培养基并用移液枪将细胞缓慢地吹打下来并充分混匀,转移到离心管中 800 r/min 离心 5 min,弃去上清加入 3 mL 培养基,混匀后取 3 个培养瓶每个培养瓶中吸入 1 mL 细胞悬液,再加入 3 mL 培养基,重新放回到培养箱中培养。传代几次待细胞生长稳定后即可进行后续实验。

1.3.3 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型建立

取处于对数生长期的 HepG2 细胞,使用含有 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养液稀释成 1×10⁵ cells/mL;在 96 孔板每个孔中加入 100 μL 细胞悬液,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h,弃去上清液,用 PBS 润洗两次,加入 100 μL 浓度分别为 100、200、300、400、500、600、800 μmol/L 用无血清 DMEM 培养基稀释的 H₂O₂ 溶液到板孔中,每组溶液设置 6 个复孔^[16]。另设调零组:不加细胞培养,加入 100 μL 无血清 DMEM 培养基;空白对照组:加细胞培养 24 h,弃去上清后加入 100 μL 无血清 DMEM 培养基。弃去上清液,用 PBS 润洗两次,加入用无血清 DMEM 培养基配制的 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液 100 μL,继续放入培养箱 4 h 后,吸尽上清,用 PBS 润洗两遍,再向每孔加入 100 μL 的 DMSO,酶标仪中 37 °C 孵育 10 min,在 570 nm 下测量 96 孔板的吸光值。根据实验结果计算细胞的半数抑制浓度,使用较为接近半数抑制浓度的 H₂O₂ 浓度作为接下来的造模试剂^[17]。根据以下公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{实验组OD值} - \text{调零组OD值}}{\text{空白组OD值} - \text{调零组OD值}} \times 100\%$$

1.3.4 MTT 法检测辣木叶水提取物对细胞增殖的影响

取处于对数生长期的 HepG2 细胞,使用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养液稀释成 1×10⁵ cells/mL;在 96 孔板每个孔中加入 100 μL 细胞悬液,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h,弃去上清液,用 PBS 润洗两次,加入 100 μL 浓度分别为

100、200、400、500、600、800、1000 μg/mL 用无血清 DMEM 培养基稀释的辣木叶水提取物到板孔中(作为药物处理组),每组溶液设置 6 个复孔。同上,另设调零组(不加 HepG2 细胞,只加等量的 DMEM 培养液)和空白对照组。弃去上清液,用 PBS 润洗两次,加入用无血清 DMEM 培养基配制的 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续放入培养箱 4 h 后,吸尽上清,用 PBS 润洗两遍,再向每孔加入 100 μL 的 DMSO,酶标仪中 37 °C 孵育 10 min,在 570 nm 下测量每孔的吸光值,计算细胞存活率。

1.3.5 MTT 法检测辣木叶水提取物对细胞的保护作用

参照 1.3.4 方法将细胞均匀的接种到 96 孔板中。细胞随机分为 8 组:空白对照组、调零组(不加 HepG2 细胞,只加等量的 DMEM 培养液)、H₂O₂ 模型组、不同浓度辣木水提取物保护组(100、200、400、500、600 μg/mL)。按照上述分组,培养 24 h 后弃去上清,用 PBS 润洗两次。在保护组加入 100 μL 不同浓度辣木水提取物,在空白对照组、阴性对照组和 H₂O₂ 模型组的每个孔中加入 100 μL 无血清的 DMEM 高糖培养基,将 96 孔板转移至 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中。培养 24 h 后弃去上清,用 PBS 润洗两次。在 H₂O₂ 模型组和保护组中加入 100 μL H₂O₂(400 μmol/L,用无血清 DMEM 培养基稀释)溶液;在空白对照组、调零组中加入 100 μL 无血清的 DMEM 高糖培养基。将 96 孔板转移至 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养 4 h,弃去上清,用 PBS 润洗两次。加入用无血清 DMEM 培养基配制的 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液 100 μL,继续放入培养箱 4 h 后,吸尽上清,用 PBS 润洗两遍,再向每孔加入 100 μL 的 DMSO,酶标仪中 37 °C 孵育 10 min,在 570 nm 下测量每孔的吸光值,计算细胞存活率。

1.3.6 辣木叶水提取物对 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞抗氧化酶活力相关指标的影响

取处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔培养板,每孔细胞浓度为 2.5×10⁵ cells/mL,接种体积为每孔 1 mL,培养 24 h 后,按照空白对照组、调零组(不加 HepG2 细胞,只加等量的 DMEM 培养液)、H₂O₂ 模型组、不同浓度辣木水提取物保护组进行实验。各保护组分别加入 1 mL 浓度为 100、200、400、500、600 μg/mL 辣木水提取物预处理 24 h,空白对照组、调零组、H₂O₂ 模型组加入等体积的无血清的 DMEM 高糖培养基处理 24 h。弃去上清液,用 PBS 润洗两次,各保护组以及 H₂O₂ 模型组再加入 1 mL H₂O₂(400 μmol/L,用无血清 DMEM 培养基稀释)

干预 4 h; 空白对照组、调零组中加入等体积无血清的 DMEM 高糖培养基进行处理。干预结束后用 PBS 清洗 2 次, 然后每孔加入 150 μL 细胞裂解液, 用细胞刮刀将每孔中细胞全部刮净后收集到离心管中, 12000 g 离心 10 min, 取上清液备用^[18]。参照相关试剂盒要求, 测定细胞所含的 BCA 蛋白浓度、所含 MDA 水平、SOD 活性、GSH-Px 活性等相关氧化损伤的指标^[19,20]。

1.3.7 数据分析

所有测定实验均重复至少三次, 实验结果以平均值 \pm 标准偏差 (SD) 表示。数据通过 IBM SPSS Statistics 19.0 进行单因素方差分析, 并以 Duncans 多重比较法进行显著性差异的分析, 不同的字母表示了不同组别之间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同浓度辣木叶水提取物对 HepG2 细胞存活率的影响

表 1 辣木叶水提取物的主要抗氧化活性成分^[21]

Table 1 The main antioxidant components of the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves^[21]

活性成分种类	含量 / (mg/g 干提取物)
多酚	56.50 \pm 1.10
黄酮	3.80 \pm 0.20

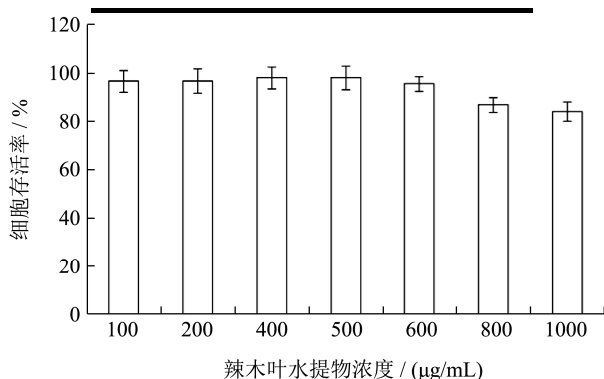


图 1 辣木叶水提取物对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves on the viability of HepG2 cells

本实验中辣木叶水提取物的制备采用超声辅助水提法进行制备。据报道, 辣木叶水提取物主要的活性成分为多酚和黄酮, 其含量如表 1 所示, 不同的提取条件会略有差异^[21]。本实验采用 MTT 法来测定不同浓度的辣木叶水提取物对细胞存活率的影响。实验中选取了不同浓度的辣木叶水提取物 (100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、600 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、

1000 $\mu\text{g/mL}$), 分别测定了其对于 HepG2 细胞存活率的影响。由图 1 可以看出, 与正常的细胞相比, 低浓度辣木叶水提取物 HepG2 细胞的存活率影响并不明显 (对 HepG2 细胞的抑制率 $\leq 6\%$); 但在较高浓度时, 即辣木叶水提取物的浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ 和 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时, HepG2 细胞的存活率与对照组相比具有明显的下降趋势 ($p < 0.05$), 此时细胞的存活率仅为 86.80% 和 84.08%, 对细胞的存活率有比较明显的抑制作用。因此, 为了尽可能避免辣木叶水提取物本身对细胞造成的毒性干扰作用, 后续实验使用低浓度的辣木叶水提取物 ($\leq 600 \mu\text{g/mL}$) 进行干预实验。

2.2 不同浓度 H_2O_2 对 HepG2 细胞增殖的影响

H_2O_2 是一种重要的活性氧分子, 它形成的超氧阴离子自由基能使细胞膜上的脂质物质和蛋白发生氧化反应, 还能与胞内的铁离子反应生成 $\cdot\text{OH}$ 等自由基, 造成细胞氧化应激状态和组织损伤, 因此常作为体外氧化应激损伤的造模药物^[22]。本实验通过添加 0~800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 不同浓度的 H_2O_2 对 HepG2 细胞进行氧化损伤, 筛选合适的 H_2O_2 剂量建立氧化损伤模型。由图 2 可知, 加入 H_2O_2 后其对细胞造成明显的损伤, 随着 H_2O_2 浓度的增加, HepG2 细胞的存活率显著下降。尤其是在高浓度的 H_2O_2 (即 800 $\mu\text{mol/L}$) 作用下, 细胞存活率只有空白对照组的 21.00%。

在利用 H_2O_2 建立氧化损伤细胞模型中, 过高浓度的 H_2O_2 对细胞造成会促使细胞发生不可逆转的损伤, 不利于后期药物对其进行修复。因此, 研究多数选择细胞半数抑制浓度附近的 H_2O_2 剂量来建立氧化损伤模型^[23,24]。例如, Yi 等人^[25]发现 H_2O_2 对 HepG2 细胞半数抑制浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$, 后续实验利用 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导建立氧化应激细胞模型。本次实验结果如图 2 所示, 可计算出细胞半数抑制浓度为 408.73 $\mu\text{mol/L}$, 故后续实验选择使用浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 对细胞进行处理建立氧化损伤模型。

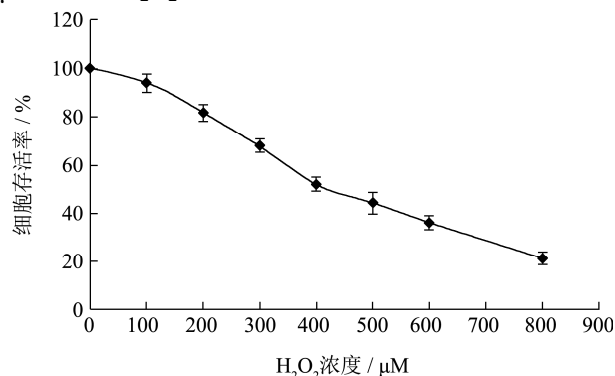


图 2 H_2O_2 对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of H_2O_2 on the viability of HepG2 cells

2.3 辣木叶水提物对氧化损伤 HepG2 细胞的保护作用

采用 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 对 HepG2 细胞进行氧化损伤建模后, 添加 0~600 $\mu\text{g/mL}$ 不同浓度的辣木叶水提物进行干预实验, 研究辣木叶对氧化损伤 HepG2 细胞的保护作用。如图 3 所示, 与没有经 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理的空白对照组相比, 用 H_2O_2 处理过的模型组细胞存活率显著降低 ($p<0.05$)。在加入不同浓度的辣木叶水提物后, 受氧化损伤的 HepG2 细胞存活率显著上升, 且随着辣木水提物浓度的升高, 细胞的存活率也逐渐升高。特别是当辣木叶水提物浓度达到 500 和 600 $\mu\text{g/mL}$ 时, HepG2 细胞存活率恢复到接近正常组的水平, 存活率将近 100%。

细胞存活率是反映外界环境对细胞损伤程度的最直观指标。氧化应激的环境能导致胞内活性氧水平的升高, 对 HepG2 细胞造成氧化损伤进而诱导细胞凋亡^[26,27]。细胞存活率越高, 说明 HepG2 细胞受到的氧化损伤越小。因此, 细胞的存活率经常被用来反应天然活性成分的抗氧化能力。例如, Zhang 等^[22]发现大米蛋白水解物可将 H_2O_2 损伤细胞的存活率从 50% 提高到 90%, 说明该大米蛋白水解物具有较强的抗氧化活性。本研究中, 对 HepG2 细胞添加 100~600 $\mu\text{g/mL}$ 的辣木叶水提物进行预培养后, HepG2 细胞存活率从 50.12% 提高到 60%~99.51%。由此可知, 一定浓度范围内的辣木叶水提物对 H_2O_2 诱导损伤的 HepG2 细胞有良好的保护作用, 能缓解 H_2O_2 对 HepG2 细胞的氧化应激损伤。

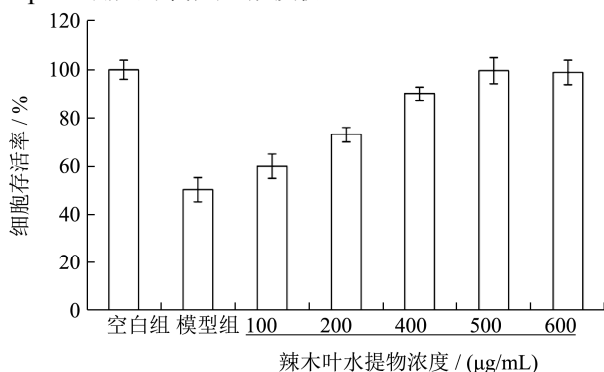


图 3 辣木叶水提物对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves on viability of HepG2 cells with damage induced by H_2O_2

2.4 辣木叶水提物对氧化损伤 HepG2 细胞内 SOD 的作用效果

SOD 是一类具有特殊生理活性的物质, 也是生物体内清除自由基的最主要的物质之一。SOD 作为机体内清除自由基的第一道防线, 主要清除细胞内的超氧阴离子自由基, 催化其发生歧化反应, 将超氧化物转化为 H_2O_2 和 H_2O , 进而达到保护细胞免受自由基损伤的目的^[28,29]。SOD 在生物体内的水平高低也是反映生物体衰老与死亡的一个直观指标, 其活力水平反应机体清除氧自由基的能力高低^[30]。

结果如图 4 所示, 与空白对照组细胞 SOD 活力 (138.84 U/mg 蛋白) 相比, 用 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后的氧化应激模型组细胞的 SOD 活力下降明显 (48.78 U/mg 蛋白), 下降幅度非常大。这表明该浓度下的 H_2O_2 能破坏细胞的氧化调节系统, 降低胞内抗氧化酶系的活力, 致使胞内的氧化动态平衡失衡, 导致细胞发生不可逆的氧化损伤。同时, 这也进一步证明本实验氧化应激细胞模型成功构建。与模型组相比, 不同剂量的辣木叶水提物对细胞进行预培养后, 能够显著地抑制 H_2O_2 所引起的细胞 SOD 含量的降低 ($p<0.05$)。辣木叶水提物的加入, 使细胞的 SOD 活力从模型组的 48.78 U/mg 蛋白升高至 59.63~116.62 U/mg 蛋白, 提高幅度为 22.24%~139.07%, 且提高水平呈现剂量依赖关系。这表明辣木叶水提物能显著缓解 H_2O_2 所引起 HepG2 胞内 SOD 水平的降低, 进而发挥抗氧化应激功能。

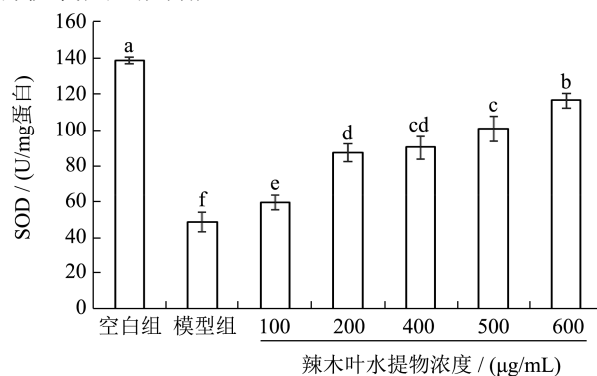


图 4 辣木叶水提物对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞 SOD 活力的影响

Fig.4 Effect of the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves on SOD activity in HepG2 cells induced by H_2O_2

2.5 辣木叶水提物对氧化损伤 HepG2 细胞内 GSH-Px 活力的影响

GSH-Px 是机体内重要的过氧化物分解酶, 能催化 GSH 将 H_2O_2 等过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 从而保护细胞膜的结构和功能免受过氧化物的干扰和破坏^[30,31]。GSH-Px 的含量高低反映了细胞中自由基的数量多少: 自由基含量越低, 其对细胞的毒害

作用就越小, 机体受到的氧化损伤就越低^[32]。

如图 5 所示, 与正常对照组相比, 加入 H_2O_2 后细胞的 GSH-Px 酶活性呈现显著下降 ($p < 0.05$), 其酶活力值仅为正常对照组的 50.42%。这表明该浓度下的 H_2O_2 对细胞造成了较为严重的氧化损伤, 细胞内的抗氧化酶 GSH-Px 的活性被破坏。当采用不同浓度的辣木叶水提取物对细胞进行预孵育处理后, 细胞 GSH-Px 含量显著上升 ($p < 0.05$)。与模型组相比, 不同浓度辣木叶水提取物使细胞 GSH-Px 含量提高了 20.77%~151.74%。此外, 随着辣木叶水提取物浓度的升高, GSH-Px 的水平也越来越接近正常水平。这说明辣木叶水提取物可提高 GSH-Px 的活性, 从而有利于催化 GSH 对氢过氧化物的还原反应, 阻断体内脂质过氧化, 保护细胞免受氧化损伤的作用。

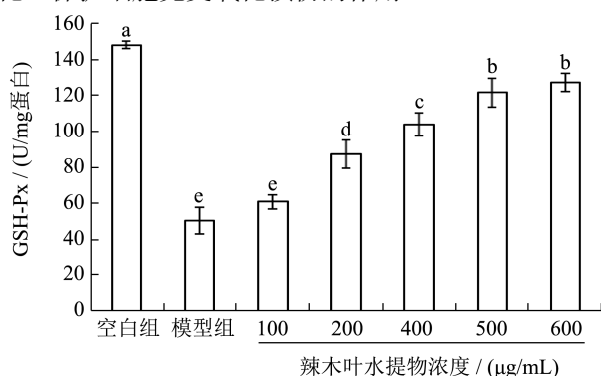


图 5 辣木叶水提取物对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞 GSH-Px 活力的影响

Fig.5 Effect of the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves on GSH-Px activity in HepG2 cells induced by H_2O_2

2.6 辣木叶水提取物对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞

MDA 水平的影响

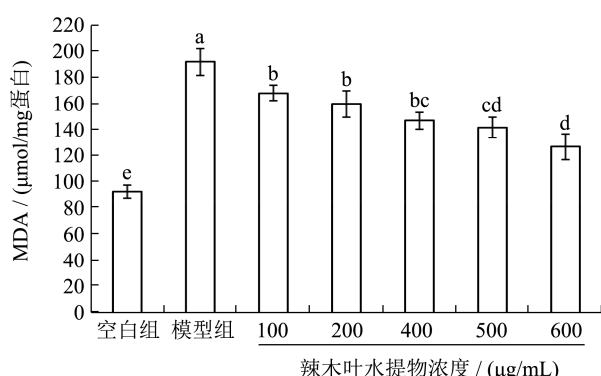


图 6 辣木叶水提取物对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞 MDA 浓度的影响

Fig.6 Effect of the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves on MDA content in HepG2 cells induced by H_2O_2

机体存在天然的氧化调控系统, 在正常状态下能够抵抗一定程度的外界氧化应激刺激, 维持机体氧化应激的动态平衡, 从而避免外界对机体造成的氧化损

伤^[33]。但是, 当氧化应激程度较为强烈, 且机体的抗氧化系统不足以弥补时, 细胞膜上饱和脂肪酸首先会发生氧化反应。而 MDA 则是细胞膜上的脂类被氧化后所生成的一个重要代谢产物。它的产生可能会导致细胞代谢和功能障碍, 甚至死亡^[34,35]。MDA 作为一种对机体有毒性和副作用的分子, 其在细胞中的含量可以反映机体中脂质过氧化程度, 从而能够间接地反映细胞的氧化损伤程度^[36,37]。因此, MDA 的测定可用来对氧自由基介导的细胞损伤进行评价。

通过 MDA 试剂盒测定了辣木叶水提取物对细胞内 MDA 含量的影响, 结果如图 6 所示。 H_2O_2 处理的模型对照组细胞产生的 MDA 水平在所有组别细胞中是最高的, 与空白对照组相比升高了 108.11% ($p < 0.05$), 增幅非常明显。然而, 当不同浓度的辣木叶水提取物加入到细胞并经过预孵育处理后, 细胞内的 MDA 水平相比于模型对照组有了显著的降低, 其下降幅度为 12.51%~34.04%, 且呈现剂量效应。这表明 HepG2 细胞经 H_2O_2 处理后细胞膜发生了较严重的损伤, 而辣木叶水提取物能显著缓解活性氧对细胞膜脂质氧化损伤的影响, 能减轻自由基对机体的氧化应激损伤, 进而能提高机体对外界氧化应激的调控能力。这与之前辣木叶水提取物能缓解 H_2O_2 所引起的细胞存活率降低、GSH-Px 和 SOD 等酶类水平下降的结果相一致。

目前, 国内外学者均已通过体外化学方法分析了辣木叶水提取物、醇提取物以及乙酸乙酯提取物等不同方法提取物的抗氧化活性^[38,39]。例如, 国内学者陈庆钊等^[40]利用超声波辅助提取辣木叶总黄酮并测定其 DPPH 自由基的清除能力, 发现其具有较强的抗氧化活性, 其清除 DPPH 自由基的能力随着浓度的升高而增强; 国外学者 Garcia-Beltran 等^[41]同样发现辣木叶水提取物和醇提取物均具有较强的自由基清除能力, 且具有剂量依赖效应。本研究从细胞层面上, 发现了辣木叶水提取物具有较强的抗氧化活性, 其抗氧化活性具有剂量依赖效应, 与上述研究结果一致。辣木叶水提取物中主要含有黄酮、多酚、多糖、蛋白质等成分^[38]。其中, 研究认为, 辣木叶水提取物中的抗氧化活性成分主要为多酚及黄酮^[21]。因此, 辣木叶水提取物对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞损伤具有保护作用, 可能的原因是其具有较为丰富的多酚及黄酮物质。

目前, 在细胞氧化应激模型建立后, 针对天然活性物质抗氧化能力的评价指标主要有细胞内主要抗氧化酶酶活力的变化 (如 SOD、GSH-Px、过氧化氢酶等) 和非酶系统相关产物的含量变化 (如 MDA 和 GSH 等)^[42]。本实验发现辣木叶水提取物可降低胞内 MDA 水平, 提高 GSH-Px 和 SOD 等酶类的活性, 表明辣木

叶水提物可能通过减轻细胞膜脂质的氧化程度、提高胞内抗氧化酶系的活力等途径提高机体的抗氧化能力,从而增强对外界氧化应激的调控。

3 结论

本实验以辣木叶水提物为研究对象,以 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞构建氧化应激损伤模型,分别从细胞存活率、胞内 MDA 水平和抗氧化酶系活力等方面探讨辣木叶水提物对氧化应激损伤的修复作用。结果表明:辣木叶水提物能显著缓解 H_2O_2 引起的 HepG2 细胞存活率的降低和胞内 MDA 水平的升高,提高抗氧化酶 GSH-Px 和 SOD 的活力,从而提高细胞抗氧化能力。以上研究表明,辣木叶水提物具有较强的细胞抗氧化活性,这为后续辣木叶对细胞抗氧化的作用机制研究提供了基础,也为辣木叶抗氧化功能产品的开发提供理论依据。

参考文献

- [1] Zhang X, Fu Y, Li H, et al. H3 relaxin inhibits the collagen synthesis via ROS - and P2X7R - mediated NLRP3 inflammasome activation in cardiac fibroblasts under high glucose [J]. Journal of Cellular & Molecular Medicine, 2018, 22(3): 1816-1825
- [2] Hancock J T, Desikan R, Neill S J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways [J]. Biochemical Society Transactions, 2001, 29(2): 345-349
- [3] Chikara S, Nagaprasanth L D, Singhal J, et al. Oxidative stress and dietary phytochemicals: role in cancer chemoprevention and treatment [J]. Cancer Letters, 2018, 413: 122-134
- [4] Yampakdee S, Benjakul S, Kristinsson H G, et al. Preventive effect of Nile tilapia hydrolysate against oxidative damage of HepG2 cells and DNA mediated by H_2O_2 and AAPH [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(10): 6194-6205
- [5] Pisoschi A M, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 46(31): 55-74
- [6] Hybertson B M, Gao B, Bose S K, et al. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2011, 32(4-6): 234-246
- [7] Chen B, Zhao J, Zhang R, et al. Neuroprotective effects of natural compounds on neurotoxin-induced oxidative stress and cell apoptosis [J]. Nutritional Neuroscience, 2020, 3: 1-22
- [8] Wang L, Ding L, Yu Z, et al. Intracellular ROS scavenging and antioxidant enzyme regulating capacities of corn gluten meal-derived antioxidant peptides in HepG2 cells [J]. Food Research International, 2016, 90: 33-41
- [9] Piovesana S, Capriotti A L, Cavaliere C, et al. Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2018, 410: 3425-3444
- [10] Chiaino E, Micucci M, Cosconati S, et al. Olive leaves and hibiscus flowers extracts-based preparation protect brain from oxidative stress-induced injury [J]. Antioxidants, 2020, 9(9): 806
- [11] Padayachee B, Baijnath H. An updated comprehensive review of the medicinal, phytochemical and pharmacological properties of *Moringa oleifera* [J]. South African Journal of Botany, 2020, 129: 304-316
- [12] Saucedo-Pompa S, Torres-Castillo J A, Castro-López C, et al. *Moringa* plants: bioactive compounds and promising applications in food products [J]. Food Research International, 2018, 111: 438-450
- [13] Mengfei L, Junjie Z, Xiaoyang C. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 47: 469-479
- [14] Sllih M C, Chang C M, Kang S M, et al. Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of *Moringa oleifera* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(9): 6077-6088
- [15] 周伟,刘能,林丽静,等.辣木叶乙醇提取物的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2017,33(10):149-156
ZHOU Wei, LIU Neng, LIN Li-jing, et al. Antioxidant activity of ethanol extracts from *Moringa oleifera* leaves [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(10): 149-156
- [16] Kimatu B M, Fang D, Zhao L, et al. *Agaricus bisporus* peptide fractions confer cytoprotective ability against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 and Caco-2 cells [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 14: 2503-2519
- [17] Tsai W C, Chang H C, Yin H Y, et al. The protective ability and cellular mechanism of *Koeleruteria henryi* Dummer flower extract against hydrogen peroxide-induced cellular oxidative damage [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2020, 47: 89-99
- [18] Wang H, Cheng J, Wang H, et al. Protective effect of apple

- phlorizin on hydrogen peroxide - induced cell damage in HepG2 cells [J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(4): e13052
- [19] Vinkovi T, Paraikovi N, Koji M T, et al. Superior protective effects of *in vitro* propagated green garlic against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human hepatoma cells [J]. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 2020, 71(2): 130-137
- [20] Athmouni K, Belhaj D, Feki A E, et al. Optimization, antioxidant potential, modulatory effect and anti-apoptotic action in of *Euphorbia bivonae* polysaccharides on hydrogen peroxide-induced toxicity in human embryonic kidney cells HEK293 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 482-491
- [21] Kittikhun K, Wisuta C, Choowong A. Effects of *Moringa oleifera* leaf extracts and its bioactive compound gallic acid on reducing toxicities of heavy metals and metalloids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Chemosphere, 2020, 270: 128659
- [22] Zhang X, Wang L, Lu H, et al. Preservation of hydrogen peroxide-induced oxidative damage in HepG-2 cells by rice protein hydrolysates pretreated with electron beams [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 8415
- [23] Kim H R, Kim J E, Yun W B, et al. Protective effect of oil extracted from *Neophocaena asiaorientalis* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells [J]. Fisheries Science, 2019, 85(8): 867-876
- [24] SAl-Oqail M M, Farshori N N, Al-Sheddi E S, et al. Petroselinum sativum protects HepG2 cells from cytotoxicity and oxidative stress induced by hydrogen peroxide [J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(4): 2771-2780
- [25] Yi G, Din J U, Zhao F, et al. Effect of soybean peptides against hydrogen peroxide induced oxidative stress in HepG2 cells via Nrf2 signaling [J]. Food & Function, 2020, 11(2): 2725-2737
- [26] Zhang Z, Ren Z, Chen S, et al. ROS generation and JNK activation contribute to 4-methoxy-TEMPO-induced cytotoxicity, autophagy, and DNA damage in HepG2 cells [J]. Archives of Toxicology, 2018, 92(2): 717-728
- [27] Huang J, Huang A, Poplawski A, et al. PAK2 activated by Cdc42 and caspase 3 mediates different cellular responses to oxidative stress-induced apoptosis [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2020, 1867(4):118645
- [28] Park C, Lee H, Noh J S, et al. Hemistepsin A protects human keratinocytes against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2020, 691: 108512
- [29] Amri F, Ghouili I, Amri M, et al. Neuroglobin protects astroglial cells from hydrogen peroxide - induced oxidative stress and apoptotic cell death [J]. Journal of Neurochemistry, 2017, 140(1): 151-169
- [30] Du C, Guo Y, Cheng Y, et al. Torulene and torularhodin, protects human prostate stromal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage through the regulation of Bcl-2/Bax mediated apoptosis [J]. Free Radical Research Communications, 2017, 51(2): 113-123
- [31] Leguo Z, Tao W, Opeyemi Joshua O, et al. N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine from *Cordyceps cicadae* attenuates hydrogen peroxide induced oxidative toxicity in PC12 cells [J]. Metabolic Brain Disease, 2019, 34(5): 1325-1334
- [32] Gao J, Xu Y, Zhang J, et al. *Lithocarpus polystachyus* Rehd. leaves aqueous extract protects against hydrogen peroxide-induced SH-SY5Y cells injury through activation of Sirt3 signaling pathway [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 42(6): 3485-3494
- [33] Qi Z, Wang Z, Zhou B, et al. A new ocotillol-type ginsenoside from stems and leaves of *Panax quinquefolium* L. and its anti-oxidative effect on hydrogen peroxide exposed A549 cells [J]. Natural Product Research, 2020, 34(17): 2474-2481
- [34] Wen Z, Xue R, Du M, et al. Hemp seed polysaccharides protect intestinal epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress [J]. International Journal of Biological Macro- Molecules, 2019, 135: 203-211
- [35] Xie J, Ye H, Du M, et al. Mung bean protein hydrolysates protect mouse liver cell line Nctc-1469 cell from hydrogen peroxide-induced cell injury [J]. Foods, 2019, 9(1): 14
- [36] Adnan M T, Amin M N, Uddin M G, et al. Increased concentration of serum MDA, decreased antioxidants and altered trace elements and macro-minerals are linked to obesity among Bangladeshi population [J]. Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews, 2019, 13(2): 933-938

(下转第 111 页)