

# 长茎葡萄蕨藻水提物体外抗氧化活性和对人肝细胞 L02 氧化损伤的保护作用

林香<sup>1</sup>, 任天宇<sup>1</sup>, 周梅兰<sup>1</sup>, 高瑞丽<sup>1</sup>, 邹雄<sup>2</sup>, 刘忠群<sup>1</sup>, 肖晔<sup>1</sup>, 谢曦<sup>1</sup>, 王蓉<sup>1</sup>, 宋彦廷<sup>1</sup>, 胡文婷<sup>1\*</sup>

(1. 海南大学药学院, 热带生物资源教育部重点实验室, 海南海口 570228)

(2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

**摘要:** 该文研究了长茎葡萄蕨藻水提物 (CLE) 体外抗氧化作用, 并考察其减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人肝细胞 L02 氧化损伤的能力。测其成分与含量, 通过超氧阴离子和羟自由基来评价 CLE 的体外抗氧化能力; 采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导建立 L02 细胞氧化损伤模型, 以 CLE 进行干预, CCK8 法检测细胞存活率, 试剂盒检测胞外乳酸脱氢酶 (LDH)、谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 活力以及胞内还原型谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 含量, 荧光探针检测细胞内活性氧 (ROS) 的变化。CLE 中总多糖、总三萜、总多酚和总黄酮含量分别为 205.01、28.32、27.02 和 15.72 mg/g, CLE 对超氧阴离子和羟自由基均具有较好的清除作用, 其半抑制率浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为 0.94 mg/mL 和 2.20 mg/mL。与模型组相比, CLE (22.5 μg/mL 和 45.0 μg/mL) 干预提高了 L02 细胞的存活率, 并降低了细胞上清中 LDH、AST 和 ALT 活力以及细胞内 ROS 水平和 MDA 含量, 提高了 GSH 含量; 其中当添加 45.0 μg/mL 的 CLE 后, 细胞存活率显著提高了 20.09%, ROS 和 MDA 含量分别降低至模型组的 63.23% 和 63.20%, GSH 含量提高了 164.02%。由结果可知, CLE 具有较强的体外抗氧化活性, 可改善 L02 细胞氧化损伤, 发挥细胞保护作用。

**关键词:** 长茎葡萄蕨藻; L02 细胞; 氧化损伤; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2023)08-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.8.1300

## Antioxidant Activity of Water Extracts of *Caulerpa lentillifera* and Their Protective Effects against Oxidative Damage of Human L02 Cells

LIN Xiang<sup>1</sup>, REN Tianyu<sup>1</sup>, ZHOU Meilan<sup>1</sup>, GAO Ruili<sup>1</sup>, ZHOU Xiong<sup>2</sup>, LIU Zhongqun<sup>1</sup>, XIAO Ye<sup>1</sup>, XIE Xi<sup>1</sup>, WANG Rong<sup>1</sup>, SONG Yanting<sup>1</sup>, HU Wenting<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Key Laboratory of Tropical Biological Resources and Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, China)

(2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** To evaluate the antioxidant activity of water extracts of *Caulerpa lentillifera* (CLE), and to investigate their ability to reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human L02 cells, the composition and content of CLE was measured, and the *in vitro* antioxidant effects of CLE were evaluated using superoxide anion and hydroxyl radical scavenging experiments. An oxidative damage model of L02 cells was established by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction, and the cell counting kit-8 method was used to determine the survival rate after CLE treatment. The activities of extracellular lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) and the concentrations of intracellular malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) were determined using commercial kits. Fluorescent probes were used to detect changes in the intracellular

引文格式:

林香,任天宇,周梅兰,等.长茎葡萄蕨藻水提物体外抗氧化活性和对人肝细胞 L02 氧化损伤的保护作用[J].现代食品科技,2023,39(8):

1-9

LIN Xiang, REN Tianyu, ZHOU Meilan, et al. Antioxidant activity of water extracts of *Caulerpa lentillifera* and their protective effects against oxidative damage of human L02 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 1-9

收稿日期: 2022-08-11

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31902418); 海南省自然科学基金高层次人才项目 (322RC590); 海南大学科研启动基金项目 (KYQD (ZR) 19108)

作者简介: 林香 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物资源开发利用, E-mail: 2545532336@qq.com

通讯作者: 胡文婷 (1981-), 女, 博士, 正高级实验师, 研究方向: 海洋生物资源开发利用, E-mail: huwt\_0@hainuhainanu.edu.cn

reactive oxygen species (ROS) levels. The concentrations of total polysaccharides, total triterpenes, total polyphenols, and total flavonoids in radical scavenging abilities, with half-maximal inhibitory concentrations of 0.94 mg/mL and 2.20 mg/mL, respectively. Compared with the model group, the CLE-treated groups (at 22.5  $\mu\text{g/mL}$  and 45.0  $\mu\text{g/mL}$ ) demonstrated higher L02 cell survival rate, reduced LDH, AST, and ALT activities in the cell supernatant, lower intracellular ROS levels and MDA concentration, and increased GSH concentration. With the addition of 45.0  $\mu\text{g/mL}$  of CLE, the cell survival rate was significantly increased by 20.09%, whereas the ROS levels and MDA concentrations decreased to 63.23% and 63.20%, respectively, of their concentrations in the model group. Meanwhile, the GSH concentration increased by 164.02%. These results suggest that CLE have strong antioxidant activity *in vitro*, and possess the ability to mitigate oxidative damage of L02 cells and provide cytoprotective effects.

**Key words:** *Caulerpa lentillifera*; L02 cells; oxidative damage; anti-oxidation

当机体受到外源性或内源性氧化物质的刺激时, 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 (ROS) 堆积<sup>[1]</sup>。过量富集的 ROS 攻击细胞中的蛋白质、脂质和 DNA 等大分子物质, 产生细胞毒性, 造成氧化损伤<sup>[2]</sup>。外源性补充抗氧化剂可以帮助有效清除多余的自由基, 预防或减缓 ROS 引起的氧化应激造成的伤害。据报道, 多种合成抗氧化剂具有一定的潜在毒性和致癌作用, 因此寻找天然来源的抗氧化剂受到研究者越来越多的关注<sup>[3-6]</sup>。海藻中生物活性化合物丰富, 是获得天然抗氧化物质的重要来源之一<sup>[7]</sup>。长茎葡萄蕨藻 (*Caulerpa lentillifera*) 属于绿藻门中蕨藻属, 是一种高蛋白、高膳食纤维、低脂肪、低热能, 且富含矿物质的天然优质藻类食品<sup>[8,9]</sup>。目前, 在我国的福建、海南等地, 长茎葡萄蕨藻人工养殖处于逐步推广阶段<sup>[10,11]</sup>。长茎葡萄蕨藻在原产地日本民间被称作“长寿藻”, 成分分析表明其含有丰富的多糖、酚类、不饱和脂肪酸及藻藻红素、 $\beta$ -胡萝卜素等抗衰老和抗氧化物质<sup>[12,13]</sup>。现代药理作用研究显示, 长茎葡萄蕨藻对多种与氧化应激密切相关的疾病, 如炎症、心血管疾病、糖尿病、肥胖症, 均有潜在的治疗作用, 能够提高机体抗氧化水平, 是极具开发潜力的药食兼用藻类资源<sup>[14,15]</sup>。然而, 针对长茎葡萄蕨藻的抗氧化活性及氧化应激损伤保护效应的研究仍鲜有报道, 有待对其深入研究。

肝脏是人体重要的代谢器官, 肝细胞中含有大量的线粒体, 受到氧化应激容易形成过量的 ROS 堆积, 使细胞遭到严重的氧化损伤<sup>[16,17]</sup>。近年来许多研究表明, 氧化应激可能是多种肝病, 包括脂肪肝、肝炎、肝纤维化和肝癌等共同发病机制<sup>[18]</sup>。阻断氧化应激是缓解肝脏疾病发生的有效途径之一。 $\text{H}_2\text{O}_2$  是生物体内最常见的活性氧分子, 易透过细胞膜与细胞内铁离子结合产生高活性的自由基, 从而诱导细胞产生过量的 ROS, 而且易于获得, 是氧化应激模型中最常用的氧化剂之一<sup>[19]</sup>。本研究测定了长茎葡萄蕨藻水提取物 (CLE) 中总多糖、总三萜、总多酚和总黄酮含量<sup>[20-22]</sup>, 考察 CLE 对自由基的清除作用, 并采用  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 L02

人肝细胞构建氧化损伤模型, 从细胞水平探讨 CLE 缓解氧化应激的能力, 为长茎葡萄蕨藻用于干预氧化应激相关疾病以及功能性食品开发提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

CPY-180 二氧化碳培养箱, 天津莱玻特瑞仪器设备有限公司; AE31AEFL-INV 倒置荧光显微镜, 厦门麦克奥迪实业集团有限公司; MultiskanFC 酶标仪, 美国 Biotek Instruments; Centrifuge 5430R 低温高速离心机, 德国 Eppendorf; MaXterile47 高压灭菌锅, 日本 Hirayama; UV1800 紫外可见分光光度计, 翱艺仪器有限公司; FJ200-S 高速分散匀质机, 星源科技有限公司。

RPMI1640 培养液, 上海碧艾; 胎牛血清, 上海煊翎; CCK-8 试剂盒、0.25% 胰蛋白酶消化液、青霉素混合液, 武汉赛维尔; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, Biosharp; 还原型谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒、乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒、谷丙转氨酶 (ALT) 检测试剂盒、谷草转氨酶 (AST) 检测试剂盒, 南京建成; 活性氧 ROS 检测荧光探针 DHE, 江苏凯基生物; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 样品与细胞株

正常人肝 L02 细胞, 海南大学药学院生化药物实验室保存。

长茎葡萄蕨藻, 由海南文昌龙楼淇水湾养殖场提供。取新鲜的长茎葡萄蕨藻用流水冲洗, 除去其他杂质, 滤干。以 1:1 (g/mL) 的比例加入纯水, 高速分散匀质机破碎, 室温放置 2 h, 4  $^{\circ}\text{C}$  静置过夜, 双层纱布过滤, 6 000 r/min 离心 20 min, 上清通过截留分子量为 1 000 u 的透析袋, 冻干, 即得长茎葡萄蕨藻水提取物干粉, 放入 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 CLE 中总多糖、总三萜、总多酚及总黄酮

#### 含量测定

#### 1.3.1 总多糖含量测定

以葡萄糖为标准品,采用蒽酮-硫酸法<sup>[23]</sup>测定 CLE 中总多糖含量,在 0.01~0.06 mg/mL 浓度范围内呈现较好的线性关系,获得标准曲线方程: $Y=9.2057X+0.1335$  ( $R^2=0.991$ )。结果换算为每克干基中所含的多糖相当于葡萄糖的毫克数。

#### 1.3.2 总三萜含量测定

以齐墩果酸为标准品,采用香草醛-浓硫酸法<sup>[24]</sup>测定 CLE 中总三萜含量,在 0.0046~0.092 mg/mL 浓度范围内呈现较好的线性关系,获得标准曲线方程: $Y=4.7599X+0.2201$  ( $R^2=0.9921$ )。结果换算为每克干基中所含的三萜相当于齐墩果酸的毫克数。

#### 1.3.3 总多酚含量测定

以没食子酸为标准品,采用福林-酚法<sup>[25]</sup>测定 CLE 中总多酚含量,在 0.012~0.192 mg/mL 浓度范围内呈现较好的线性关系,获得标准曲线方程: $Y=4.776X+0.0667$  ( $R^2=0.9998$ )。其中  $Y$  为吸光度,  $X$  为浓度,结果换算为每克干基中所含的多酚相当于没食子酸的毫克数。

#### 1.3.4 总黄酮含量测定

以芦丁为标准品,采用亚硝酸钠-硝酸铝法<sup>[26]</sup>测定 CLE 中总黄酮含量,在 0.08~0.48 mg/mL 浓度范围内呈现较好的线性关系,获得标准曲线方程: $Y=1.3385X+0.0019$  ( $R^2=0.9993$ )。结果换算为每克干基中所含的黄酮相当于芦丁的毫克数。

### 1.4 抗氧化活性检测

#### 1.4.1 超氧阴离子自由基清除能力测定

在 Chen 等<sup>[27]</sup>的方法基础上略作修改。在 3 mL 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 值 8.4)中加入 0.2 mL 样品,25 °C 反应 10 min,在相同温度下,加入 12  $\mu$ L 预热的 30 mmol/L 邻苯三酚溶液反应 4 min,然后快速在 320 nm 波长处测定吸光度记为  $A_1$ ;以蒸馏水代替样品,测定吸光度记为  $A_2$ ;Tris-HCl 缓冲液记为  $A_0$ 。以同浓度抗坏血酸(Vc)溶液作为阳性对照。清除率按公式(1)计算。

$$C_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_0}{A_2}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$C_1$ ——超氧阴离子清除率, %;

$A_0$ ——Tris-HCl 缓冲液在 320 nm 波长处的吸光度;

$A_1$ ——样品在 320 nm 波长处的吸光度;

$A_2$ ——以蒸馏水代替样品在 320 nm 波长处的吸光度。

#### 1.4.2 羟自由基清除能力测定

羟自由基清除的测定参考 Li 等<sup>[28]</sup>和朱月等<sup>[29]</sup>的方法并稍作改进。取不同浓度的样品溶液 1 mL,分别加入 1 mL 硫酸亚铁(6 mmol/L),1 mL 水杨酸-无水乙醇(6 mmol/L),1 mL  $H_2O_2$ (6 mmol/L),涡旋混匀,37 °C 恒温水浴 15 min,测定 510 nm 吸光度,记为  $A_1$ ;以蒸馏水代替样品,测定吸光度记为  $A_0$ ;以蒸馏水代替水杨酸-无水乙醇,测定吸光度记为  $A_2$ 。以 Vc 作为阳性对照,对羟自由基清除率按公式(2)计算。

$$C_2 = \left(1 - \frac{A_4 - A_5}{A_3}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$C_2$ ——羟自由基清除率, %;

$A_3$ ——以蒸馏水代替样品在 510 nm 处测定的吸光度;

$A_4$ ——样品在 510 nm 处测定的吸光度;

$A_5$ ——以蒸馏水代替水杨酸-无水乙醇在 510 nm 处测定的吸光度。

### 1.5 CLE 对氧化损伤细胞增殖的影响

#### 1.5.1 不同浓度 CLE 对 L02 细胞存活率的影响

将处于对数生长期的 L02 细胞,用胰酶消化后加入 1640 培养基,倒置显微镜下计数,调节细胞个数为每孔  $5 \times 10^3$  个接种于 96 孔板,在含有 5%  $CO_2$  的 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h,弃细胞培养液,加入含有 5% 血清 1640 培养基配制的不同浓度的 CLE (0.0、22.5、45.0、90.0、180.0  $\mu$ g/mL),培养 8 h 后去掉上清液,采用 CCK8 方法检测细胞存活率。

#### 1.5.2 $H_2O_2$ 诱导 L02 细胞氧化损伤模型的建立

取对数生长期的 L02 细胞,胰酶消化后以每孔  $5 \times 10^3$  个的浓度,接种于 96 孔板中培养 24 h,弃细胞培养液,加入用含有 5% 血清的 1640 培养基配置的  $H_2O_2$  溶液,终浓度分别为 0 (空白组)、200、400、600、800、1 000  $\mu$ mol/L。继续培养 8 h,采用 CCK8 法检测细胞存活率,确定  $H_2O_2$  的最适浓度。

#### 1.5.3 CLE 对氧化损伤 L02 细胞的保护作用

取对数期 L02 细胞调整浓度至每孔  $5 \times 10^3$  个,每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔板。随机分为 5 组,包括对照组、 $H_2O_2$  组 (400  $\mu$ mol/L)、 $H_2O_2+22.5$   $\mu$ g/mL CLE 组、 $H_2O_2+45.0$   $\mu$ g/mL CLE 组和  $H_2O_2+90.0$   $\mu$ g/mL CLE 组。待细胞贴壁后,用 5% 血清的 1640 培养基配制不同浓度的药物。对照组添加含有 5% 血清的 1640 培养基, $H_2O_2$  培养组加入含有 400  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  的培养基, $H_2O_2+CLE$  组用 400  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  与不同质量浓度的

CLE (22.5、45.0、90.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 同时处理细胞, 继续培养 8 h, 采用 CCK8 法检测细胞存活率。

### 1.6 CCK8 法检测细胞存活率

在相同条件处理下设置空白组、对照组和实验组, 将 96 孔板中各组培养的细胞上清液去掉。空白组、对照组和实验组加入用含有 5% 血清的 1640 培养基 100  $\mu\text{L}$  (含有 10% 的 CCK8 溶液), 在含有 5%  $\text{CO}_2$  的 37  $^\circ\text{C}$  恒温培养箱中放置 2 h, 在 450 nm 处测量各组吸光度, 其中空白组的吸光度值记为  $\text{OD}_0$ , 实验组记为  $\text{OD}_1$ , 对照组记为  $\text{OD}_2$ , 细胞存活率按公式 (3) 计算。

$$L = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_0}{\text{OD}_2 - \text{OD}_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

$L$ ——细胞存活率, %;

$\text{OD}_0$ ——空白组在 450 nm 处的吸光度值;

$\text{OD}_1$ ——实验组在 450 nm 处的吸光度值;

$\text{OD}_2$ ——对照组在 450 nm 处的吸光度值。

### 1.7 细胞上清液中 LDH、AST、ALT 水平检测

采用试剂盒对细胞泄露的 LDH、AST、ALT 进行检测。设置对照组、 $\text{H}_2\text{O}_2$  培养组 (400  $\mu\text{mol/L}$ )、 $\text{H}_2\text{O}_2$ +低浓度 CLE 组 (22.5  $\mu\text{g/mL}$ )、 $\text{H}_2\text{O}_2$ +高浓度 CLE 组 (45.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 和 CLE (45.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 组, 将 L02 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁之后给药处理细胞后培养 8 h, 收集细胞培养液, 按照试剂盒的说明检测。

### 1.8 细胞内 ROS 含量的测定

将 L02 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁之后按照 1.7 节分组给药处理细胞后, 去除培养液, 用 PBS 清洗 L02 细胞, 按照试剂盒说明, 加入用无血清的 1640 培养液稀释的 DHE 荧光探针, 37  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min, PBS 清洗 3 次, 荧光显微镜下观察拍照, 用 ImageJ 软件分析各组细胞的荧光强度, 以对照组计算相对荧光强度。

### 1.9 细胞内 MDA、GSH 水平检测

将 L02 细胞接种于 6 孔板中, 按 1.7 节给细胞分组和给药后收集细胞, 按照试剂盒说明进行检测, BCA 法蛋白定量。

### 1.10 数据处理

实验数据采用 Prism 9.3.0 软件进行统计分析, 数据表示为平均值 (mean)  $\pm$  标准差 (SD), 多样本间采用 one way-ANOVA 进行单因素方差分析, 进一步

两两比较采用 LSD-t 检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CLE 中总多糖、总三萜、总多酚及总黄酮含量

由表 1 可知, CLE 中总多糖的含量最高, 为 205.01 mg/g, 其次是总三萜和总多酚, 并且含有一定的总黄酮成分。已有较多研究表明, 海藻中富含多糖、萜类和酚类等活性物质, 是其作为自由基清除剂发挥作用以及预防生物体氧化损伤的物质基础<sup>[30]</sup>。Jesumani 等<sup>[31]</sup>从马尾藻中提取得到的多糖和多酚, 均具清除羟自由基作用。梁惠等<sup>[32]</sup>研究表明凹顶藻萜提取物表明具有较强的抗氧化活性, 可有效阻止脂质过氧化反应, 提高机体抗氧化能力。李静等<sup>[33]</sup>从大叶藻提取得到的大叶藻黄酮可有效清除羟自由基。另外, 有研究表明, 以乙醇为溶剂对冷冻干燥后的长茎葡萄蕨藻进行提取, 获得的醇提物总酚含量为 2.04 mg/g<sup>[34]</sup>, 黄酮类化合物的含量为 4.93 mg/g<sup>[35]</sup>。本研究以水为溶剂获得的提取物中含有丰富的水溶性多糖成分和一定的萜类物质, 而且总多酚 (27.02 mg/g) 和总黄酮 (15.72 mg/g) 的含量均高于醇提物。

表 1 CLE 中总多糖、总三萜、总多酚及总黄酮含量

Table 1 Contents of total polysaccharides, total triterpenes,

total phenols and total flavonoids of CLE

| 活性成分 | 含量/(mg/g)         |
|------|-------------------|
| 总多糖  | 205.01 $\pm$ 6.93 |
| 总三萜  | 28.32 $\pm$ 2.36  |
| 总多酚  | 27.02 $\pm$ 1.53  |
| 总黄酮  | 15.72 $\pm$ 2.11  |

### 2.2 CLE 的抗氧化活性

生物体内的氧自由基是含有不成对电子的原子或基团, 其中最主要、最具破坏性的是羟自由基和超氧阴离子自由基。在生物系统中, 酶的正常催化过程或氧化压力下产生的超氧阴离子自由基是自由基连锁反应的启动者, 促使其他类型自由基的形成, 引发各种生理和病理过程, 如衰老、癌变等<sup>[36]</sup>。羟自由基是氧自由基中最活泼的自由基, 去除羟自由基对于防止肌体内蛋白质、DNA 和核酸等化合物的损伤至关重要。自由基清除剂可以保护细胞免受或减缓自由基引发的氧化损伤。由图 1 可知, CLE 具有清除超氧阴离子和羟自由基的能力, 当质量浓度为 0.5 mg/mL 时的清除

能力均强于相同浓度的 Vc。在 0.5~3.0 mg/mL 的范围内, CLE 对超氧阴离子和羟自由基的清除能力随着浓度的增加逐渐增强, 在 1.0~3.0 mg/mL 的质量浓度范围内清除能力低于 Vc。当质量浓度为 3.0 mg/mL 时, CLE 对超氧阴离子和羟自由基清除率分别达到 69.30%和 77.05%。通过曲线拟合得到 CLE 对超氧阴离子和羟自由基的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.94、2.20 mg/mL。陈琳琳等<sup>[37]</sup>以不同方法从长松藻、铁钉菜和鼠尾藻获得的提取物对羟自由基具有明显的清除作用。邵海艳等<sup>[38]</sup>研究了总状蕨藻水溶性成分的抗氧化活性, 当质量浓度为 3 mg/mL 时对羟自由基的清除率为 70.86%。Fauzice 等<sup>[39]</sup>从喇叭藻提取得到褐藻糖胶, 质量浓度为 2 mg/mL 时对超氧阴离子和羟自由基清除率分别是 8.9%和 53.4%。本研究以长茎葡萄蕨藻水提物为研究对象, 发现其在低浓度下即对羟自由基和超氧阴离子均表现出良好的清除能力。长茎葡萄蕨藻有较强的抗氧化活性, 具有开发成天然抗氧化产品的潜力。

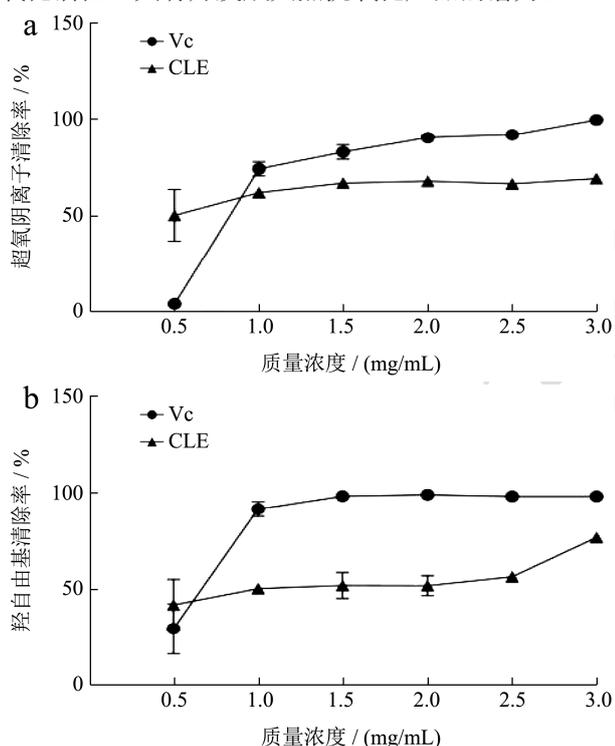


图1 CLE对超氧阴离子(a)和羟自由基(b)的清除能力  
Fig.1 The scavenging capacity of CLE for superoxide anion (a) and hydroxyl radical (b)

### 2.3 不同浓度的 CLE 对 L02 细胞存活率影响

采用 CCK8 法研究 CLE 对 L02 细胞增殖率的影响, 结果见图 2。在 CLE 质量浓度为 0.0~180.0 μg/mL 范围内, 其细胞存活率与对照组相比均无显著性差异 ( $P>0.05$ )。结果表明当 CLE 的质量浓度低于 180.0 μg/mL 时不影响 L02 细胞的增殖, 对细胞无毒性。

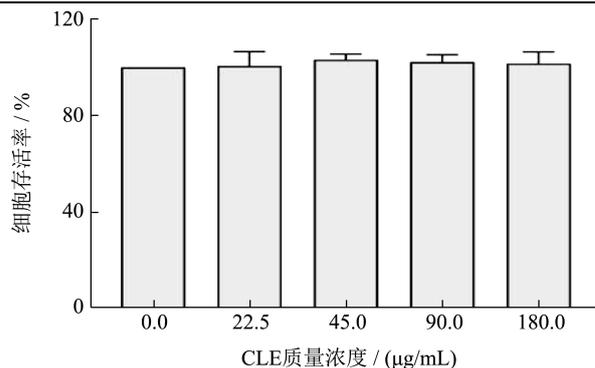


图2 CLE对L02细胞存活率的影响

Fig.2 Effects of CLE on the survival rate of L02 cells

### 2.4 CLE 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 L02 细胞氧化损伤的影响

以 0~1 000 μmol/L 不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 L02 细胞 8 h, 结果如图 3 所示, 随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的升高, 细胞活力逐渐下降。当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 400 μmol/L 时细胞存活率显著降低, 细胞存活率为 51.67% ( $P<0.01$ )。当浓度达到 1 000 μmol/L 时, L02 细胞的存活率仅为 26.33% ( $P<0.01$ )。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度过高时会对细胞造成不可逆转的损伤, 不利于药物干预对其进行修复。因此, 选择浓度 400 μmol/L 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 L02 细胞氧化损伤的最佳浓度。

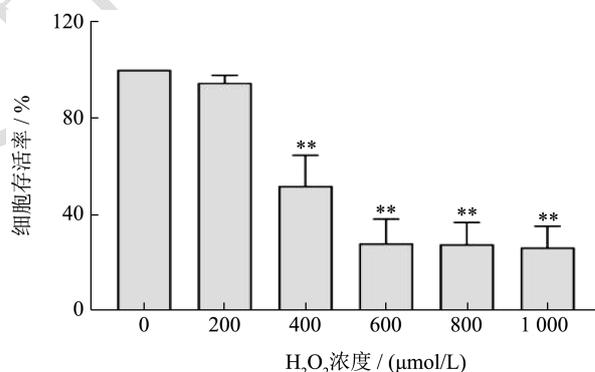


图3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理对L02细胞存活率的影响

Fig.3 The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment on the survival rate of L02 cells

注: 与正常对照组相比, \*\* $P<0.01$ 。

CLE 对 L02 细胞氧化损伤的保护作用如图 4。与对照组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培养组的存活率显著降低, 其存活率为 49.81% ( $P<0.01$ ); 在经过 22.5 μg/mL、45.0 μg/mL 和 90.0 μg/mL 的 CLE 干预之后, L02 细胞存活率均有不同程度地回升, 分别为 60.87%、69.90%和 62.50%, 质量浓度为 45.0 μg/mL 的 CLE 对 L02 细胞氧化损伤保护能力最强, 细胞存活率与模型组相比显著提升。当再继续加大 CLE 的质量浓度至 90 μg/mL 时, 对氧化损伤的 L02 细胞保护作用略有降低。可能是由于造模后致细胞受损, 此时过多的外源物质对细胞造成较

大负担, 导致存活率出现下降<sup>[40]</sup>。吴伟等<sup>[41]</sup>采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致细胞氧化损伤后, 低浓度枸杞多糖的保护效果优于高浓度的枸杞多糖。梁曾恩妮等<sup>[42]</sup>研究表明圣草次昔对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致 HUVEC 细胞氧化损伤的保护作用未表现出剂量关系, 随着圣草次昔浓度的增大, 保护作用有所降低。故而采用 22.5 μg/mL 和 45.0 μg/mL 的 CLE 作为干预浓度进行后续实验。

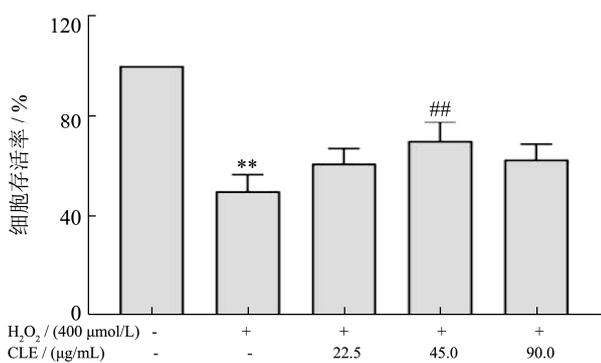


图4 CLE对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤L02细胞存活率的影响

Fig.4 Effects of CLE on the survival rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured L02 cells

注: 与正常对照组相比, \*\**P*<0.01; 与模型组相比, #*P*<0.05, ##*P*<0.01。

## 2.5 CLE对氧化损伤L02细胞培养上清中

### LDH、AST、ALT活性的影响

当细胞受到氧化应激、炎症等因素影响时, 细胞膜被破坏, 细胞内的酶类物质大量释放到体液中, 使细胞外 LDH、AST、ALT 水平急剧升高<sup>[43]</sup>。由图 5 可见, 与对照组相比, 经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, LDH 活力升高至 158.77%, AST 和 ALT 活力分别升高至 197.54% 和 328.34% (*P*<0.01)。使用 22.5 μg/mL 和 45.0 μg/mL CLE 干预后, L02 细胞培养上清中的 LDH 活力降低到 81.14% (*P*<0.05) 和 51.16% (*P*<0.01); AST 活力降到 53.94% 和 45.64% (*P*<0.01), ALT 活力降到 43.95% 和 34.41% (*P*<0.01)。细胞培养上清中的 LDH、AST、ALT 释放量可反映出细胞氧化损伤程度。郑峰等<sup>[44]</sup>建立 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 L02 细胞氧化损伤模型, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组细胞上清液中 LDH、AST、AST 显著升高, 大豆异黄酮处理后, 活性水平显著降低。在王倩等<sup>[45]</sup>的研究中发现番茄红素能显著降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 L02 细胞培养上清中 LDH、AST、AST 酶活性。本实验结果与上述研究类似, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的模型组 LDH、AST、ALT 漏出明显增多, CLE 干预后均出现显著降低, 说明 CLE 可以缓解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的肝细胞氧化损伤。

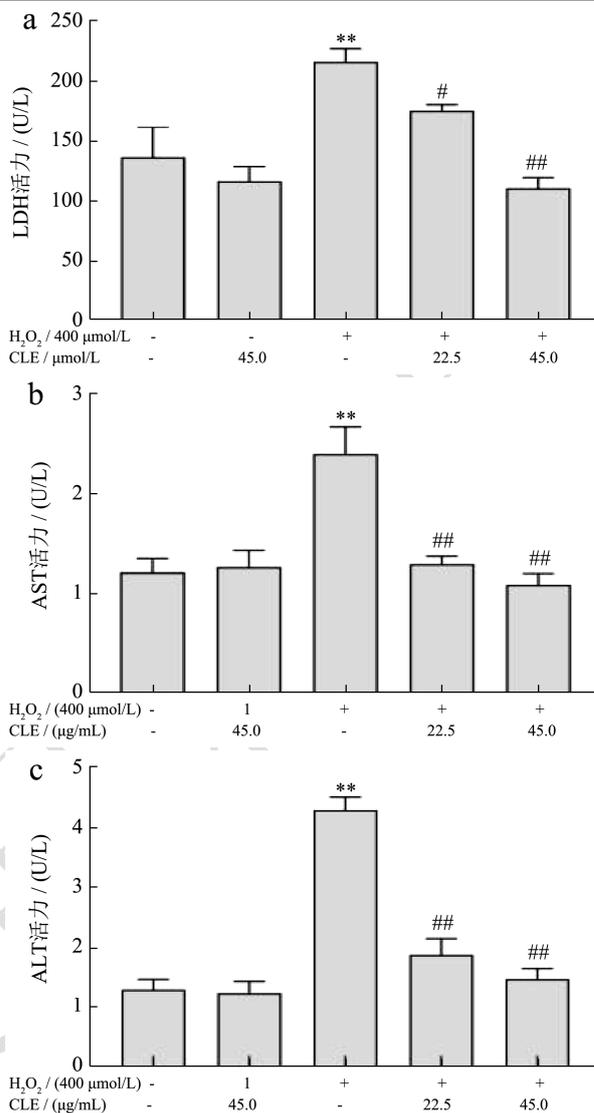


图5 CLE对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>培养条件下L02细胞培养上清中LDH(a)、AST(b)、ALT(c)水平的影响

Fig.5 Effects of CLE on LDH (a), AST (b) and ALT (c) levels in the supernatant of L02 cells cultured with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

注: 与正常对照组相比, \*\**P*<0.01; 与模型组相比, #*P*<0.05, ##*P*<0.01。

## 2.6 CLE对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导L02细胞内ROS、MDA

### 和GSH含量的影响

ROS 是生物有氧代谢过程中产生的一种中间产物, 在机体内发挥着重要作用。细胞内抗氧化系统通过清除氧自由基或抑制细胞氧化过程, 从而保持 ROS 的平衡<sup>[46]</sup>。ROS 作为一种常见的细胞氧化损伤标志性因子, 常用来判断外源性物质对机体的影响情况<sup>[47]</sup>。由图 6 可见, 加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的细胞荧光明显增强, 荧光强度是正常组的 2.50 倍。经 CLE 孵育后的细胞,

分别降为模型组的 68.97%、63.23% ( $P<0.01$ ), 说明 CLE 可以抑制  $H_2O_2$  诱导 L02 细胞中 ROS 的产生。

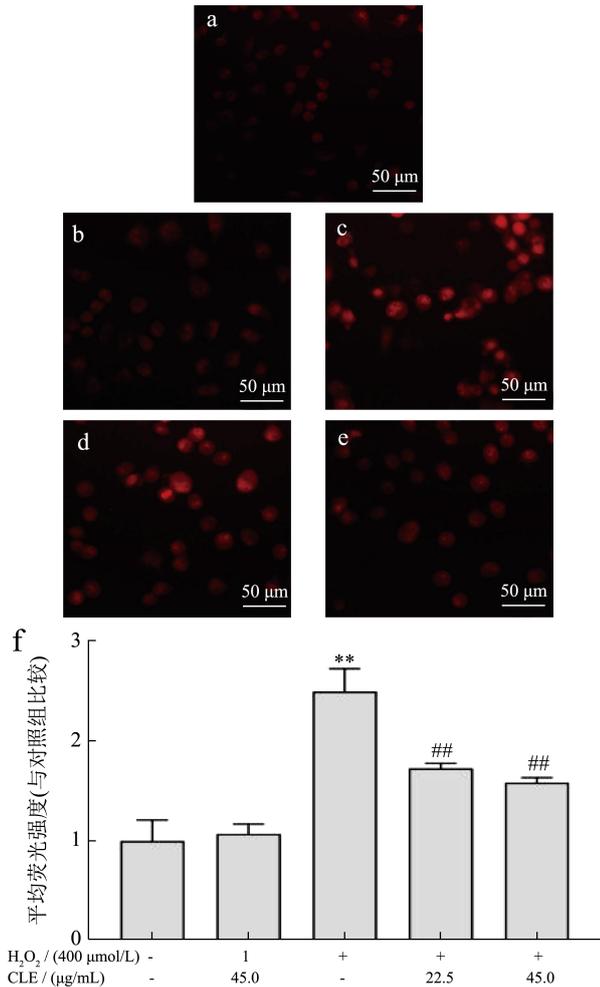


图 6 CLE 对 L02 细胞内 ROS 含量的影响

Fig.6 Effects of CLE on intracellular ROS content in L02 cells

注: a 为对照组; b 为 CLE 组; c 为  $H_2O_2$  组; d 为低浓度 CLE 组; e 为高浓度 CLE 组; f 为荧光强度平均值。与正常对照组相比,  $**P<0.01$ ; 与模型组相比,  $\#P<0.05$ ,  $###P<0.01$ 。

CLE 对 L02 细胞内 MDA、GSH 含量的影响如图 7。 $H_2O_2$  诱导氧化损伤组的细胞内 GSH 水平明显降低, MDA 含量明显升高, 与对照组相比均有显著性差异 ( $P<0.01$ )。与  $H_2O_2$  的诱导氧化损伤组相比, 22.5  $\mu\text{g/mL}$  和 45.0  $\mu\text{g/mL}$  CLE 组的 MDA 分别降至 84.71% ( $P>0.05$ ) 和 63.20% ( $P<0.01$ ); 细胞内的 GSH 含量显著增加, 分别是模型组 GSH 含量的 1.45 和 1.64 倍 ( $P<0.01$ )。MDA 作为体内脂质过氧化的标志性产物, 其含量的高低反应出机体受到氧化损伤程度<sup>[48]</sup>。GSH 是细胞内重要的非酶类抗氧化物质, 具有清除自由基、降低 ROS 水平和阻断组织氧化损伤等多种生理功能<sup>[49]</sup>。细胞内 MDA 和 GSH 的水平可以反应细胞所处的氧化还原状态。杜毅超等<sup>[50]</sup>研究发现芹菜素显著降低 L02 细胞内 ROS 和 MDA 含量。在 Ou

等<sup>[51]</sup>的研究中, C-藻蓝蛋白干预能够降低四氯化碳诱导 L02 细胞氧化损伤产生的 ROS 以及 MDA 水平, 提高 GSH 含量, 发挥保护细胞的作用。本研究中, CLE 干预显著提高 L02 细胞内具有还原能力的 GSH 含量, 有效清除过多的 ROS, 并阻止细胞内脂质过氧化, 从而缓解氧化应激、保护细胞免受氧化损伤。

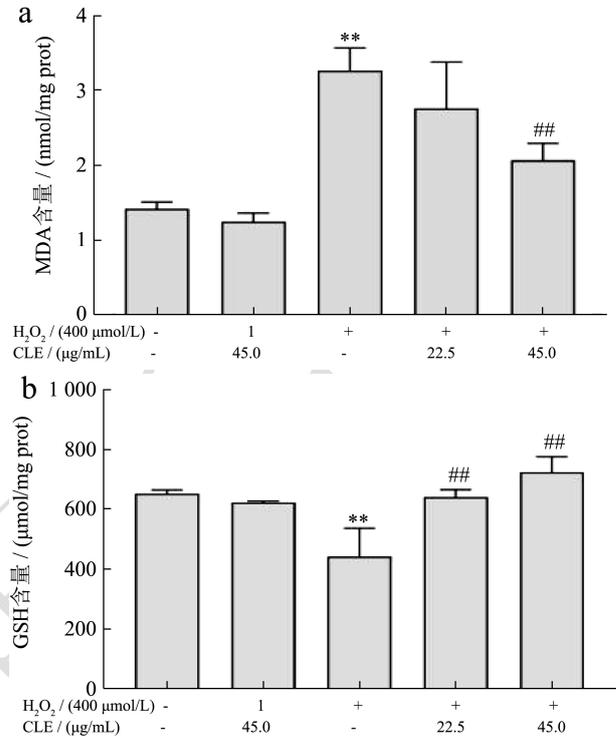


图 7 CLE 对  $H_2O_2$  培养条件下 L02 细胞 MDA (a)、GSH (b) 含量的影响

Fig.7 Effects of CLE on MDA (a) and GSH (b) content of L02 cells under  $H_2O_2$  culture

注: 与正常对照组相比,  $**P<0.01$ ; 与模型组相比,  $\#P<0.05$ ,  $###P<0.01$ 。

### 3 结论

CLE 中含有丰富的多糖、萜类、多酚和黄酮类活性成分, 在体外对超氧阴离子和羟自由基均有一定的清除作用。CLE 在质量浓度为 0.0~180.0  $\mu\text{g/mL}$  的范围内, 对正常的 L02 细胞活力无影响。对受到  $H_2O_2$  诱导产生氧化应激损伤的 L02 细胞, CLE 能够显著提高细胞生存率。CLE 使  $H_2O_2$  培养条件下的细胞培养液上清中 LDH、AST、ALT 活性显著降低, 提示 CLE 处理能够改善氧化损伤导致的细胞膜通透性改变、减少酶类漏出。同时, CLE 处理组细胞内的 ROS 显著减少, GSH 含量显著增加, MDA 含量显著降低, 表明 CLE 能够增强细胞抗氧化防御能力、降低细胞脂质过氧化水平, 减轻 ROS 生成增多引起的 L02 细胞损伤。

综合以上结果, CLE 有较好的抗氧化能力, 可增加 L02 细胞内非酶类抗氧化物质水平并抑制脂质过氧化反应导致的膜系统损伤, 增强细胞对氧化应激的耐受能力。本研究结果展现了以水为溶剂获得的长茎葡萄蕨藻提取物具有良好的抗氧化效果, 为进一步探索其抑制氧化应激的作用机制奠定了理论基础, 为后续长茎葡萄蕨藻抗氧化功能产品的开发提供参考依据。

## 参考文献

- [1] Chang C Y, Shen C Y, Kang C K, et al. Taurine protects HK-2 cells from oxidized LDL-induced cytotoxicity via the ROS-mediated mitochondrial and p53-related apoptotic pathways [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2014, 279(3): 351-363.
- [2] Luderer U. Ovarian toxicity from reactive oxygen species [J]. *Vitamins & Hormones*, 2014, 94: 99-127.
- [3] 高静.天然抗氧化剂及其协同作用[J].食品安全质量检测学报,2020,11(6):1859-1864.
- [4] Ito N, Fukushima S, Haqlwara A, et al. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats234 [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1983, 70(2): 343-345.
- [5] Oikawa S, Nishino K, Inoue S, et al. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1998, 56(3): 361-370.
- [6] M A Lewis, D G Yoerg, J L Bolton, et al. Alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA by quinonemethides derived from 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 1996, 9(8): 1368-1374.
- [7] Pinteus S, Silva J, Alves C, et al. Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal) [J]. *Food Chemistry*, 2017, 218: 591-599.
- [8] Nagappan T, Vairappan C S. Nutritional and bioactive properties of three edible species of green algae, genus *Caulerpa* (Caulerpaceae) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(2): 1019-1027.
- [9] Paul N A, Neveux N, Magnusson M, et al. Comparative production and nutritional value of "sea grapes"-the tropical green seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *C. racemosa* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(4): 1833-1844.
- [10] 林国清.长茎葡萄蕨藻养殖技术初探[J].科学养鱼,2012,2: 41-43.
- [11] 张媚健,马钰荣,车馨怡,等.海南长茎葡萄蕨藻营养成分分析及其免疫刺激活性研究[J].食品科技,2019,44(5):90-96.
- [12] 向江波,邓建朝,杨贤庆,等.响应面法优化微波辅助提取长茎葡萄蕨藻中蕨藻红素[J].食品与发酵工业,2016,42(6): 209-214.
- [13] Balasubramaniam V, Chelyn L J, Vimala S, et al. Carotenoid composition and antioxidant potential of *Eucheuma denticulatum*, *Sargassum polycystum* and *Caulerpa lentillifera* [J]. *Heliyon*, 2020, 6(8): e04654.
- [14] Sharma B R, Dong Y R. Anti-diabetic effects of *Caulerpa lentillifera*: stimulation of insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells and enhancement of glucose uptake in adipocytes [J]. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*, 2014, 7: 575-580.
- [15] Mza C, Mz A, Yq C, et al. Study on immunostimulatory activity and extraction process optimization of polysaccharides from *Caulerpa lentillifera* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 143: 677-684.
- [16] Scuhmacker P T. Reactive oxygen species in cancer: A dance with the devil [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(2): 156-157.
- [17] Labunskyy V M, Gladyshev V N. Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 19(12): 1362-1372.
- [18] 贾岩,金欢欢,李蒙蒙,等.肝细胞程序性坏死在肝损伤中的研究进展[J].中国药理学通报,2017,33(12):1651-1655.
- [19] Warinhomhoun S, Muangnoi C, Buranasudja V, et al. Antioxidant activities and protective effects of dendropachol, a new bisbibenzyl compound from *Dendrobium pachyglossum*, on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 252.
- [20] 蔡小华,李小伟,李国坤,等.辣木叶水提物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.
- [21] 林陈强,林戎斌,陈济琛,等.棘托竹荪菌盖提取物的抗氧化活性[J].食用菌学报,2013,20(2):32-36.
- [22] 钟千贵,陈天赐,邱铭锰,等.无柄灵芝提取物中营养成分及体外抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2020,41(19):321-326.
- [23] Zhou R R, Huang J H, He D, et al. Green and efficient extraction of polysaccharide and ginsenoside from American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) by deep eutectic solvent extraction and aqueous two-phase system [J]. *Molecules*, 2022, 27: 3132.
- [24] 张华丽,朱军,高桂花,等.山东肿足蕨总三萜的提取工艺优化研究[J].中药材,2012,35(4):648-650.
- [25] 李利华.苹果皮不同溶剂提取物抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2012,28(11):1470-1473.
- [26] Zhang Y, Sun X, Vidyarthi S K, et al. Active components and

- antioxidant activity of thirty-seven varieties of Chinese jujube fruits (*Ziziphus jujuba* Mill) [J]. International Journal of Food Properties, 2021, 24(1): 1479-1494.
- [27] Chen L, Huang G L. Extraction, characterization and antioxidant activities of pumpkin polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 770-774.
- [28] Li Y H, Jiang B, Zhang T, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH) [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 444-450.
- [29] 朱月,钟尉,赵雪梅,等.紫斑牡丹叶片多糖对羟自由基清除能力的比较[J].江苏农业科学,2016,44(11):341-342.
- [30] Diaz A C, Espino M L, Arzo N S, et al. Free radical scavenging activity of extracts from seaweeds *Macrocystis pyrifera* and *Undaria pinnatifida*: Applications as functional food in the diet of prawn *Artemesia longinaris* [J]. Latin American Journal of Aquatic Research, 2017, 45(1): 104-112.
- [31] Jesumani V, Du H, Pei P, et al. Comparative study on skin protection activity of polyphenol-rich extract and polysaccharide-rich extract from *Sargassum vachellianum* [J]. Plos One, 2020, 15(1): 0227308.
- [32] 梁惠,刘颖,韩磊,等.凹顶藻萜提取物对荷 H22 肿瘤小鼠氧化应激及 p53 和 MMP-9 表达的影响[J].中国药理学通报, 2011,27(8):1183-1184.
- [33] 李静,张朝辉,段筱杉,等.大叶藻黄酮对酒精性肝损伤的保护作用[J].水产学报,2016,40(5):799-806.
- [34] Nguyen V T, Ueng J P, Tsai C J. Proximate composition, total phenolic content, and antioxidant activity of seagrass (*Caulerpa lentillifera*) [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(7): C950-C958.
- [35] Yap W F, Tay V, Tan S H, et al. Decoding antioxidant and antibacterial potentials of Malaysian green seaweeds: *Caulerpa racemosa* and *Caulerpa lentillifera* [J]. Antibiotics-Basel, 2019, 8(3): 152.
- [36] Cadenas E, Davies K J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2000, 29(3-4): 222.
- [37] 陈琳琳,谢志新,魏东红,等.泉州湾 3 种大型海藻不同提取物的抗氧化活性比较[J].食品研究与开发,2017,38(23):18-25.
- [38] 邵海艳,吉宏武,章超桦,等.总状蕨藻水溶性成分的提取及其对羟自由基清除作用[J].食品研究与开发,2008,29(6):24-27.
- [39] Fauziee N A M, Chang L S, Mustapha W A W, et al. Functional polysaccharides of fucoidan, laminaran and alginate from Malaysian brown seaweeds (*Sargassum polycystum*, *Turbinaria ornata* and *Padina boryana*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167: 1135-1145.
- [40] 刘淑集,许旻,路海霞,等.牡蛎寡肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 L02 人肝细胞的保护作用[J].现代食品科技,2020,36(5):1-6.
- [41] 吴伟,薛姝婧,朱玲勤,等.枸杞多糖通过抗氧化及抗凋亡作用对过氧化氢致血管内皮细胞损伤的保护作用研究[J].时珍国医国药,2019,30(5):1047-1049.
- [42] 梁曾恩妮,汪秋安,张菊华,等.圣草次苷的合成及其对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用[J].食品科学,2021,42(15):159-166.
- [43] 尹学哲,王玉娇,尹基峰,等.草苈蓉多糖对张氏肝细胞氧化损伤保护作用[J].中国公共卫生,2017,33(6):972-974
- [44] 郑峰,金芳多,金梅花,等.大豆异黄酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致 L02 细胞损伤的保护作用[J].大豆科学,2020,39(3):458-463.
- [45] 王倩,王晓红,安晶晶,等.番茄红素对人肝 L02 细胞氧化损伤的保护作用及其机制[J].卫生研究,2018,47(2):281-285.
- [46] Rojas J, Buirtrago A. Antioxidant activity of phenolic compounds biosynthesized by plants and its relationship with prevention of neurodegenerative diseases - Science Direct [J]. Bioactive Compounds, 2019: 3-31.
- [47] Rahali F Z, Kefi S, Rebey I B, et al. Phytochemical composition and antioxidant activities of different aerial parts extracts of *Ferula communis* L [J]. Plant Biosystems, 2019, 153(2): 213-221.
- [48] 李浩铭,黄永杰,王永丽,等.姜黄素及其代谢修饰产物对 PC12 细胞氧化损伤的保护作用[J].食品科学,2020,41(15): 208-215.
- [49] Thangamani S, Eldesouky H E, Mohammad H, et al. Ebselen exerts antifungal activity by regulating glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) production in fungal cells [J]. BBA-General Subjects, 2017, 1861(1): 3002-3010.
- [50] 杜毅超,张浩,黄治伟,等.芹菜素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人肝细胞 L02 氧化损伤模型的影响[J].临床肝胆病杂志,2020,36(5):1077-1081.
- [51] Ou Y, Zheng S, Lin L, et al. Protective effect of C-phycoyanin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage *in vitro* and *in vivo* [J]. Chemico-Biological Interactions, 2010, 185(2): 94-100.