

不同方法制备的人参产物对过氧化氢诱导的HepG2细胞氧化损伤的保护作用

胡亦柠¹, 杨继国^{1,2*}, 周星辰³, 黎剑⁴, 孙学科⁴

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室河源分中心, 广东河源 517000)

(3. 井凡(广州)生物科技有限公司, 广东广州 510640) (4. 东莞徐记食品有限公司, 广东东莞 523118)

摘要: 该文以五年园参为原料, 采用直接提取法、微生物发酵法和酶法制备人参产物, 通过体外抗氧化活性和细胞保护作用考察不同方法制备的人参产物抗氧化效果差异。结果发现, 3种方法制备的人参产物均能清除自由基, 对 DPPH、ABTS⁺ 和羟基自由基的清除率最高分别为 97.80%、93.70% 和 99.46%, 使用 600 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 H_2O_2 损伤诱导 HepG2 细胞 2 h 后, 细胞存活率为 52.68%, 符合建模要求。当人参产物质量浓度为 200 mg/L 时, 细胞存活率最高且均大于 95%。结果显示, 3种人参产物均能显著提高受损 HepG2 细胞的存活率 ($P<0.01$), 降低一氧化氮 (NO) 和丙二醛 (MDA) 水平, 提高胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活力和谷胱甘肽过氧化物 (GSH) 含量, 且人参酶解物组作用效果最为显著, 细胞存活率为 98.10%。体外抗氧化和细胞试验显示, 不同方法制备的人参提取物、人参发酵物和人参酶解物都具有明显的抗氧化作用, 其中人参酶解物的抗氧化效果最好。该研究成果可为人参抗氧化产品的制备提供参考。

关键词: 微生物发酵; 酶解; 人参; HepG2 细胞; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2025)06-33-41

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.6.0527

Protective Effects of Ginseng Products Prepared Using Different Methods Against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage in HepG2 Cells

HU Yining¹, YANG Jiguo^{1,2*}, ZHOU Xingchen³, LI Jian⁴, SUN Xueke⁴

(1. School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Heyuan Branch, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Heyuan 517000, China)

(3. Jingji (Guangzhou) Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510640, China)

(4. Dongguan Hsu Fu Chi Food Co. Ltd., Dongguan 523118, China)

引文格式:

胡亦柠, 杨继国, 周星辰, 等. 不同方法制备的人参产物对过氧化氢诱导的HepG2细胞氧化损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(6): 33-41.

HU Yining, YANG Jiguo, ZHOU Xingchen, et al. Protective effects of ginseng products prepared using different methods against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in HepG2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(6): 33-41.

收稿日期: 2024-04-22

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2021B0707010002); 河源市科技计划项目 (河科平台 2022 大专项 010); 岭南现代农业科学与技术广东省实验室河源分中心自主科研项目 (DT20220004)

作者简介: 胡亦柠 (1998-), 女, 硕士, 研究方向: 生物转化, E-mail: yining-hu@qq.com

通讯作者: 杨继国 (1977-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 食品生物化学, E-mail: yangjig@scut.edu.cn

Abstract: Five-year-old cultivated ginseng was processed into ginseng products through direct extraction, microbial fermentation, and enzymatic hydrolysis. The antioxidant effects of these ginseng products were investigated and compared by measuring their *in vitro* antioxidant activities and cytoprotective effects. The results showed that all ginseng products prepared using the three methods of interest could scavenge free radicals, and the highest DPPH, ABTS⁺, and hydroxyl radical scavenging rates were 97.80%, 93.70%, and 99.46%, respectively. The cell survival rate of HepG2 cells was 52.68% after inducing damage with 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 2 h, which satisfied the modeling requirements. The highest cell survival rates (exceeding 95%) were observed when the cells were treated with 200 mg/L ginseng products, regardless of the production method. All three ginseng products could significantly increase the survival rate of damaged HepG2 cells ($P<0.01$), reduce the levels of nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA), and increase the activity of intracellular superoxide dismutase (SOD) and the content of glutathione peroxidase (GSH). In particular, the ginseng products obtained through enzymatic hydrolysis demonstrated the most significant effects, with a cell survival rate of 98.10%. *In vitro* antioxidant activity and cell experiments demonstrated that ginseng extracts, fermentation products, and hydrolysates prepared using different methods all have apparent antioxidant effects. Among them, ginseng hydrolysates exhibited the most remarkable effects. This study provides a reference for the development of antioxidant ginseng products.

Key words: microbial fermentation; enzymatic hydrolysis; ginseng; HepG2 cells; antioxidant

人参皂苷是人参发挥药效的主要活性物质，是一种四环三萜类物质，由糖和苷元缩合而成^[1,2]。当人参皂苷发生水解，水解去掉部分或全部糖基，称为稀有人参皂苷。研究发现，稀有人参皂苷具有比人参皂苷更高的生物学活性，已成为抗癌天然药物的热门研究方向。而稀有人参皂苷属于人参皂苷的次级代谢产物，在人参提取物中含量极低，通常需要通过皂苷转化法制备而成^[2,3]。目前常用的稀有皂苷制备方法有化学法和生物法，其中生物法是食品药品研究领域的主流制备方法，包括微生物转化和酶法转化^[4]。

氧化应激是指当机体由于某些原因，机体内氧化产物与抗氧化系统不平衡的一种应激状态。这种状态会导致体内蛋白质、脂质、核酸等生物大分子发生氧化损伤，使机体无法进行正常的代谢^[5]。当细胞氧化产物如丙二醛（MDA）、活性氧（ROS）和活性氮（RNS）等物质过量，会导致氧化应激，从而导致机体衰老、炎症或者发生多种慢性疾病，非酶和酶促抗氧化剂可预防和修复由活性氧和活性氮造成的细胞损伤，降低氧化应激导致的疾病风险，增强免疫系统功能^[6,7]，抗氧化对维持机体健康具有十分重要的作用。

该研究通过测定了1,1-二苯基-2-苦肟基（DPPH）、2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸（ABTS⁺）和羟基自由基（-OH）清除率来反映人参提取物、人参发酵物和人参酶解物的体外抗氧化活性。过氧化氢（ H_2O_2 ）可作为细胞内外的氧化刺激

物质，在不同的细胞膜稳定扩散，适合用于建立氧化应激模型^[8,9]。HepG2细胞来源于一名15岁的白人男性肝癌标本，是从其中分离出的高度分化，无病毒的细胞，其代谢活性和生物转化活性均与人体原代肝细胞相似，故常作为细胞模型用于体外研究，HepG2细胞可以被强氧化性物质诱导发生氧化损伤，但损伤可被合适的抗氧化剂修复^[9-11]。研究通过 H_2O_2 诱导HepG2细胞发生氧化损伤，采用人参提取物，人参发酵物和人参酶解物进行给药，探究不同生物法制备的人参产物对HepG2细胞的保护作用。并通过测定不同细胞组的氧化应激指标和胞内抗氧化酶活性，探究不同生物法制备所得人参产物的抗氧化作用差异。该研究旨在更好的发挥稀有人参皂苷在医药学方面的药用价值，为后续人参抗氧化产品开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

5年园参，井几（广州）生物科技有限公司；HepG2细胞（人肝癌细胞）细胞，保存于华南协同创新研究院； β 葡聚糖酶、DPPH、ABTS，上海源叶生物科技有限公司；DMEM培养基、胎牛血清（FBS）、青霉素-链霉素、PBS缓冲液、0.25%胰蛋白酶消化液，美国Gibco公司；水溶性维生素E（Trolox），美国Sigma公司；一氧化氮（NO）测定试剂盒、细胞丙二醛（MDA）测定试剂盒、微量

还原型谷胱甘肽 (GSH) 测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; RIPA 裂解液、细胞增殖与毒性检测试剂盒 (CCK-8)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; 其他分析纯试剂, 天津大茂试剂厂。

1.2 主要仪器设备

SQ510C 灭菌锅, 日本 YAMATO 公司; WH-90A 微型漩涡振荡器, 上海振荣科学仪器有限公司; SpectraMax i3x 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; HERACELL 150i CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; BDS400 倒置显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

三种人参产物均为实验室自制, 方法如下:

人参提取物: 取 5 年园参进行粉碎, 过 150 目筛后, 按 1:10 料液比, 加入纯净水于 100 °C 浸提 3 h, 冷却至室温后在 8 000 r/min 下离心 15 min 取上清液。

人参发酵物: 取人参提取物 200 mL, 按 1×10^7 接种量接入植物乳杆菌, 于 37 °C 发酵 7 d 后灭菌。

人参酶解物: 取人参提取物 200 mL, 按质量分数 0.5% 添加 β 葡聚糖酶, 于 55 °C 酶解 24 h 后灭酶。

为便于操作以及保证人参产物的稳定性, 使用真空冷冻设备将制备的三种人参产物进行冻干, 制成人参产物冻干粉进行后续实验。

1.3.2 不同人参产物的体外抗氧化活性测定

1.3.2.1 对 DPPH 自由基清除率的测定

DPPH 自由基清除率的测定方法如下^[12], 用乙醇作溶剂分别将抗坏血酸、人参提取物、人参发酵物、人参酶解物冻干粉配成质量浓度为 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 mg/mL 的溶液, 其中抗坏血酸乙醇溶液为阳性对照, 以无水乙醇做空白对照。准确吸取待测样品 100 μ L 于 96 孔板中, 迅速加入 100 μ L DPPH (0.2 mmol/L) 溶液混合均匀, 室温避光反应 30 min, 使用酶标仪在 517 nm 处测量吸光值, 试验做 3 次平行, DPPH 自由基清除率按以下公式计算:

$$E = \left(1 - \frac{A_s - A_{s'}}{A_c} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

E ——自由基清除率, %;

A_s ——样品反应液的吸光度值;

$A_{s'}$ ——人参样品与无水乙醇混合后的吸光度值;

A_c ——无水乙醇与 DPPH 溶液混合后的吸光度值。

1.3.2.2 对 ABTS⁺ 自由基清除率的测定

ABTS⁺ 自由基清除率的测定方法如下^[13], 取 7 mmol/L ABTS 溶液 50 mL 和 140 mmol/L 过硫酸钾溶液 0.88 mL 混合, 避光静置过夜, 配置成 ABTS 储备液。使用前用无水乙醇将储备液稀释至 734 nm 波长吸光度为 0.70 ± 0.02 。待测样品处理同 1.3.2.1, 准确吸取待测样品 50 μ L 于 96 孔板中, 迅速加入 100 μ L ABTS 溶液混合均匀, 室温避光反应 6 min, 使用酶标仪在 734 nm 处测量吸光度, 试验做 3 次平行, 计算公式同 1.3.2.1, 式中 A_c 表示无水乙醇与 ABTS 反应液混合后的吸光度值。

1.3.2.3 对羟基自由基清除率的测定

待测样品处理同 1.3.2.1, 但溶剂为超纯水。羟基自由基清除率的测定方法如下^[14], 分别取 7.5 mmol/L FeSO₄、H₂O₂ 和用无水乙醇溶解的 7.5 mmol/L 水杨酸溶液各 30 μ L 和样品液 100 μ L 混匀, 于 37 °C 孵育 30 min。使用酶标仪在 510 nm 处测量吸光度, 试验做 3 次平行, 计算公式同 1.3.2.1, 式中 A_s 表示样品与用 30 μ L 超纯水代替 30 μ L H₂O₂, 混合后的吸光度值; A_c 表示用 100 μ L 超纯水代替 100 μ L 样品溶液混合后的吸光度值。

1.3.3 HepG2 细胞培养

HepG2 细胞用含 15% FBS (胎牛血清)、1% 双抗 (青霉素-链霉素) 的高糖 DMEM 培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中恒温培养 3~5 d, 当贴壁细胞长至细胞培养瓶的 80%~90% 时进行传代, 将 HepG2 细胞连续传两代以恢复细胞活性^[15]。

1.3.4 H₂O₂ 细胞损伤实验

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 用含有 15% FBS 和 1% 双抗的高糖 DMEM 完全培养液悬浮细胞, 将细胞密度调整为每毫升 1×10^5 个, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔接种 100 μ L, 于 37 °C、 $\phi=5\%$ CO₂ 培养箱中恒温培养 24 h^[16, 17]。将细胞随机分为对照组、实验组和空白对照组。

用完全培养基将 H₂O₂ 配成浓度为 100、200、400、600、800 和 1 000 μ mol/L 浓度的 H₂O₂ 工作液, 并用 0.22 μ m 无菌滤膜过滤 H₂O₂ 工作液。弃去细胞上清液, 实验组分别加入 100 μ L 不同浓度的 H₂O₂ 工作液, 每个浓度设置 3 个复孔, 对照组加入 100 μ L

DMEM 完全培养液, 继续孵育 2 h 后, 加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 2 h, 用酶标仪检测 450 nm 处吸光度。空白组仅加入不含细胞的 100 μL DMEM 完全培养液。细胞存活率按以下公式计算:

$$R = \frac{A_s - A_0}{A_c - A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R ——细胞存活率, %;

A_s ——实验组样品吸光值;

A_c ——对照组样品吸光值;

A_0 ——空白组样品吸光值。

1.3.5 不同人参产物细胞毒性实验

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 用含有 15% FBS 和 1% 双抗的高糖 DMEM 完全培养液悬浮细胞, 将细胞密度调整为每毫升 1×10^5 个, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔接种 100 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中恒温培养 24 h。将细胞随机分为对照组、实验组和空白对照组。

用完全培养基将水溶性维生素 E、人参提取物、人参发酵物、人参酶解物配成质量浓度为 25、50、100、200、400 和 500 mg/L 的工作液, 并用 0.22 μm 无菌滤膜过滤 VE 和人参工作液。弃除细胞上清液, 实验组分别加入 100 μL 不同质量浓度的人参工作液, 每个质量浓度设置 3 个复孔, 对照组加入 100 μL DMEM 完全培养液, 继续孵育 4 h 后, 加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 2 h, 用酶标仪检测 450 nm 处吸光度。空白组仅加入不含细胞的 100 μL DMEM 完全培养液。细胞存活率计算公式同 1.3.4。

1.3.6 不同人参产物细胞保护实验

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 用含有 15% FBS 和 1% 双抗的高糖 DMEM 完全培养液悬浮细胞, 将细胞密度调整为每毫升 1×10^5 个, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔接种 100 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中恒温培养 24 h。

弃去细胞上清液, 将细胞随机分为: 对照组、模型组、阳性对照 (VE) 组、人参提取物组、人参发酵物组、人参酶解物组, 每组设置 3 个复孔。对照组每孔加入 100 μL DMEM 培养液, 各给药组分别加入一定质量浓度的 (具体质量浓度由 1.3.5 实验结果得出) VE 和 3 种人参工作液 90 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 4 h。除对照组以外, 其他组加入每孔终浓度为 1.3.4 细胞损伤实验中细胞半数致死率浓度的 H_2O_2 的培养液 10 μL , 培养 2 h

建立氧化损伤模型。加入 10 μL CCK-8 试剂继续孵育 2 h, 用酶标仪检测 450 nm 处吸光度。空白组仅加入不含细胞的 100 μL DMEM 完全培养液。细胞存活率计算公式同 1.3.4。

1.3.7 氧化损伤模型 HepG2 细胞 NO、MDA、SOD、GSH 的测定

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 按细胞密度每毫升 1×10^6 个, 接种 1 mL 于 25 cm^2 细胞培养瓶, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中恒温培养 24 h。实验方法参照 1.3.6, 收集各组细胞培养上清液, 按照 NO 测定试剂盒说明书进行具体操作, 测定 NO 释放水平。随后向细胞培养瓶中分别加入 100 μL 含 PMSF 的 RIPA 裂解液, 冰浴裂解 10 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液备用, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各组蛋白水平, 并严格按照试剂盒说明书进行操作, 采用 MDA、SOD 和 GSH 试剂盒测定各组细胞中的 MDA 含量和 GSH、SOD 酶活力^[18,19]。

1.3.8 统计学分析

所有试验重复 3 次, 试验结果用平均值 \pm 标准偏差表示。运用 SPSS 处理试验数据, 显著性水平设定值为 0.05, $P < 0.05$ 表示差异显著。使用 Origin 2023 软件进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 不同人参产物的抗氧化活性测定

DPPH \cdot 是一种稳定且低廉的自由基, 故 DPPH \cdot 常作为抗氧化指标, 用于草药提取物或化学物的体外抗氧化性测定^[20]。由图 1a 可知, 人参提取物、人参发酵物、人参酶解物都具有对 DPPH 自由基的清除能力, 且其 DPPH 自由基清除能力呈现出剂量依赖, 但经过不同处理方式得到的人参产物对 DPPH 自由基的清除能力具有差异, 人参发酵物和酶解液的 DPPH \cdot 清除能力优于人参提取物。

ABTS $^{+\cdot}$ 是一种稳定的自由基, 抗氧化剂可与 ABTS $^{+\cdot}$ 中的阳离子发生反应, 在 734 nm 处有最大吸收峰, 其强度随抗氧化剂的效果增强而减弱^[21]。由图 1b 可知, 不同处理方式得到的人参产物都对 ABTS $^{+}$ 自由基具有清除能力, 且清除率呈现出剂量依赖。当人参产物质量浓度为 2 mg/mL 时, 人参提取物、人参发酵物、人参酶解物的清除率分别为 62.08%、58.46%、45.36%。当人参产物质量浓度大于 4 mg/mL 时, 人参发酵物、人参酶解物的清除率

则均高于人参提取物。

羟基自由基属于活性氧(ROS)的一种自由基形态,具有强氧化性,可攻击细胞核或线粒体中的DNA,导致细胞损伤^[7]。由图1c可知,在人参产物质量浓度为2~20 mg/mL范围内时,不同处理方式得到的人参产物都具有较高的羟基自由基清除率,清除率呈现出一定剂量依赖性。当人参产物质量浓度为2 mg/mL时,不同处理方式得到的人参产物对羟基自由基的清除率均高于70%,分别为74.64%、91.51%、88.22%。

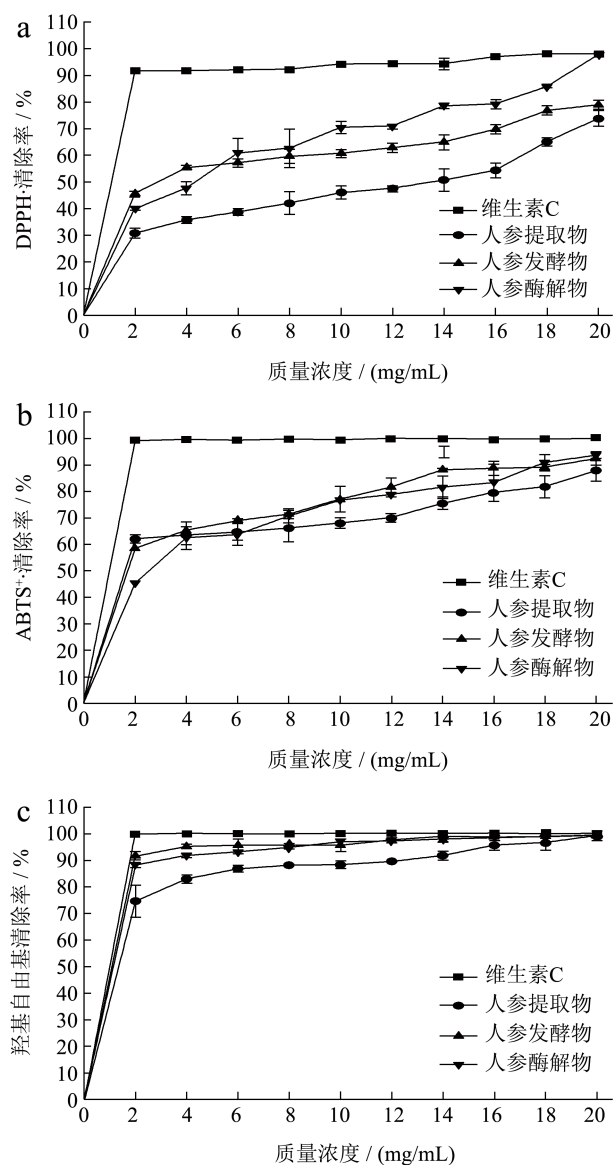


图1 不同人参产物的抗氧化活性

Fig.1 Antioxidant activity of different ginseng products

实验通过体外抗氧化方法,测定了人参产物对DPPH·、ABTS·+和羟基自由基的清除率,发现在一定的范围内,三种人参产物的清除率随着浓度的增大而增大,呈现出正相关的现象^[22]。且经过生

物转化(微生物发酵和生物酶解)后的人参提取物对不同自由基的清除能力均有不同程度的提升,人参酶解物对DPPH·自由基的清除能力优于人参发酵物,但两者对于ABTS·+和羟基自由基的清除能力无显著差异。王崑仑等^[23]研究西洋参抗氧化能力发现,经过裂褶菌固态发酵后的西洋参能提高总人参皂苷、粗多糖、总黄酮和稀有人参皂苷的含量,增强其抗氧化能力,对DPPH·和ABTS·+清除能力均优于未发酵西洋参。

2.2 H₂O₂对HepG2细胞活力的影响

H₂O₂是具有强氧化性质的中性氧化物,是活性氧(ROS)分子之一,能穿过细胞膜引起细胞氧化应激,故常作为诱导剂,用于细胞建立氧化应激损伤模型^[17,24]。实验用完全培养基将H₂O₂配成浓度为100、200、400、600、800和1 000 μmol/L的H₂O₂工作液,对HepG2细胞作用2 h,H₂O₂诱导HepG2细胞氧化应激损伤模型的结果如图2所示。实验发现,HepG2细胞存活率随H₂O₂浓度增加而下降,当浓度为600 μmol/L时,HepG2细胞存活率为52.68%,细胞存活率接近半数致死率,与张聪等^[6]研究中的H₂O₂半数抑制浓度400 μmol/L接近,且与对照组(0 μmol/L H₂O₂)相比具有统计学意义($P<0.05$),因此HepG2细胞建立氧化应激损伤模型的最佳条件是采用浓度为600 μmol/L的H₂O₂作用2 h。

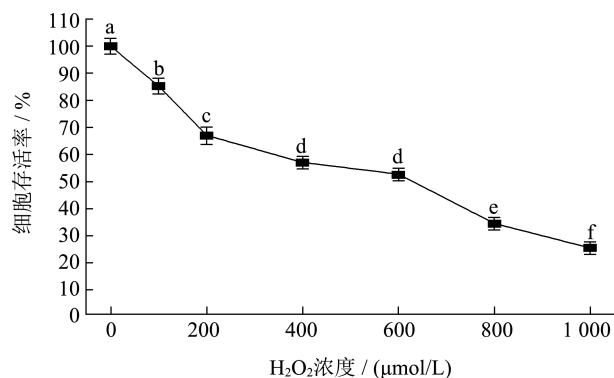


图2 不同浓度H₂O₂损伤后HepG2细胞存活率

Fig.2 Survival rates of HepG2 cells after injured by different concentrations of H₂O₂

注:不同小写字母表示各组之间的显著性差异($P<0.05$)。

2.3 不同人参产物对HepG2细胞活力的影响

实验分别用完全培养基将水溶性维生素E、3种人参冻干粉配成质量浓度为25、50、100、200、400和500 mg/L的工作液,使用此工作液对HepG2

细胞培养 4 h 作为给药组, 使用完全培养基作为对照组, 探究不同质量浓度的不同人参产物对 HepG2 细胞的毒性作用, 结果如图 3 所示。结果可得, 以对照组细胞存活率为 100%, 当 VE 和人参产物质量浓度为 0~200 mg/L 时, HepG2 细胞存活率在 95%~120% 范围内, 其中阳性对照 VE 组和人参发酵物较空白对照组差异显著 ($P<0.05$) 且细胞存活率与给药质量浓度呈现正相关, 说明此质量浓度范围内 VE 和人参产物不具有细胞毒性。当给药质量浓度达到 400 mg/L 和 500 mg/L 时, HepG2 细胞存活率明显下降, 存活率均低于 80%, 说明高质量浓度给药具有细胞毒性。这可能是因为高质量浓度的人参产物中含有高质量浓度人参皂苷, 而高质量浓度人参皂苷对细胞表现为促凋亡作用^[25]。给药质量浓度为 200 mg/L 时, 各给药组细胞存活率均达到最大值, 故选用此质量浓度进行后续实验。

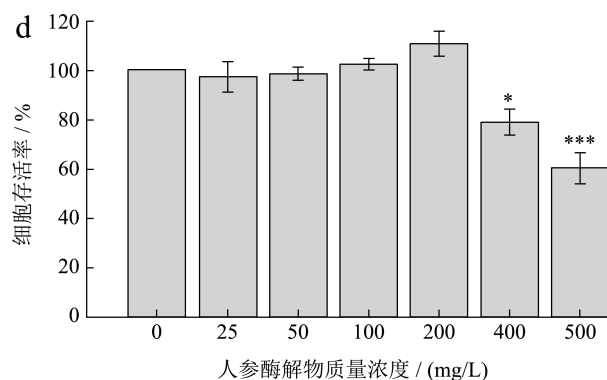
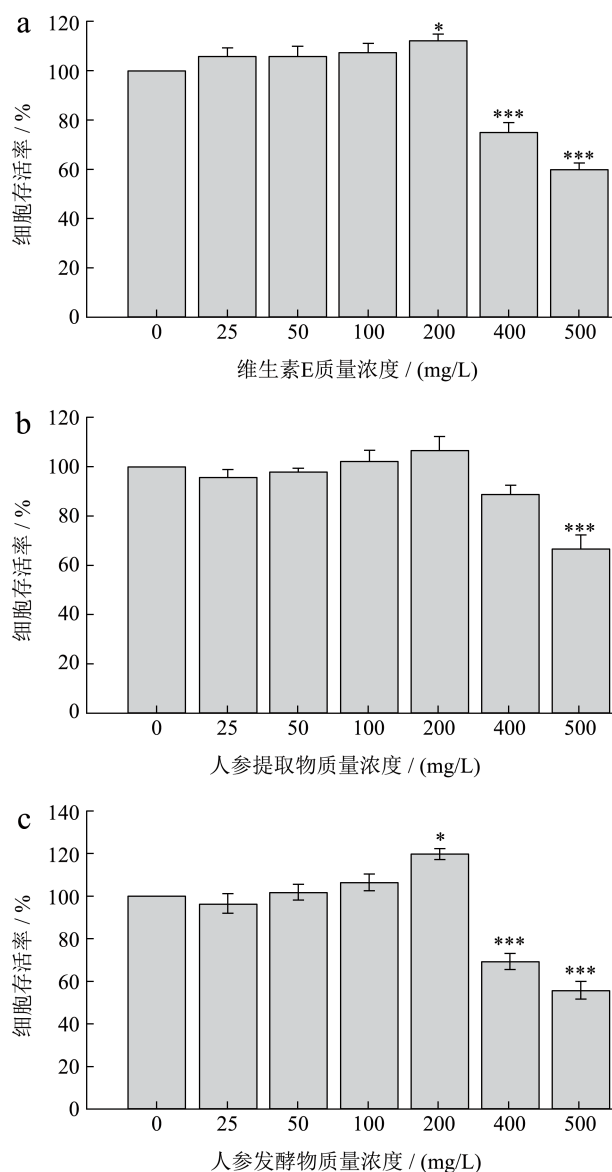


图 3 不同人参产物对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.3 Effects of different ginseng products on the survival rate of HepG2 cells

注: 与空白对照组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

2.4 不同人参产物对氧化损伤模型HepG2细胞活力的影响

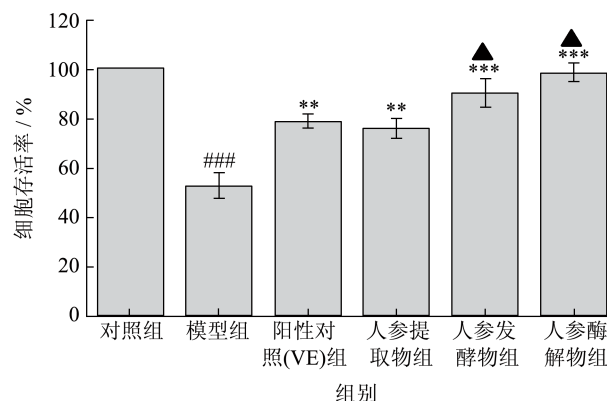


图 4 不同人参产物对氧化损伤模型 HepG2 细胞活力的影响

Fig.4 Effects of different ginseng products on the viability of HepG2 cells in oxidative damage model

注: 与空白对照组比较, ### $P<0.001$; 与模型组比较 ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与人参提取物组比较 ▲ $P<0.05$ 。

实验使用完全培养基配制的质量浓度为 200 mg/L 的维生素 E、人参提取物、人参发酵物、人参水解物进行给药先干预 HepG2 细胞 4 h, 再加入终浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用 2 h 建立 HepG2 细胞损伤模型, 测定各组细胞存活率, 结果如图 4 所示。与空白对照组比较, 模型组 HepG2 细胞活力显著降低 ($P<0.001$), 细胞存活率为 52.58%, 说明 HepG2 细胞氧化损伤模型建模成功。与模型组相比, 各给药组的细胞存活率均有显著性差异, 能不同程度的提高 HepG2 细胞存活率 (均有 ($P<0.01$)), 给药组细胞存活率分别为 78.69%、75.97%、90.12% 和 98.10%, 说明给药组能减少 H_2O_2 所造成的细胞氧化损伤。张聪等^[6]研究也表明了人参皂苷 RH1、F1、

RD、RO 和 RE 预处理后的 HepG2 细胞在受到 H_2O_2 氧化损伤时细胞存活率均有所升高。与人参提取物组相比, 人参发酵物组和人参酶解物组细胞存活率显著提高 ($P<0.05$), 说明生物转化后的人参提取物具有更好的 HepG2 细胞保护作用, 且生物酶法处理的人参产物细胞保护作用优于生物发酵法, 可能是因为生物酶法能更专一高效地将人参提取物中的皂苷转化为稀有人参皂苷, 人参酶解物组稀有人参皂苷含量更高, 故显示出更强的细胞保护作用^[26]。

2.5 不同人参产物对氧化损伤模型HepG2细胞NO水平的影响

一氧化氮 (NO) 作为活性氮 (RNS) 的一种形式, 可进一步刺激炎症的发生^[27], 故 NO 水平能反应细胞氧化损伤程度^[7]。实验使用不同人参产物给药组和 H_2O_2 建立了 HepG2 细胞损伤模型, 测定各组细胞培养液中的 NO 释放水平, 结果如图 5 所示。实验结果显示, 各实验组的 NO 释放水平均大于空白对照组。模型组 NO 释放水平为 $29.19 \mu\text{mol/g prot}$, 与空白对照组相比, 差异极显著 ($P<0.01$), 说明氧化损伤细胞模型建模成功; 与模型组相比, 各给药组均能明显降低细胞培养液中的 NO 释放水平, NO 释放水平均低于 $24 \mu\text{mol/g prot}$, 其中阳性 (VE) 对照组差异显著 ($P<0.05$), 三种人参产物组差异极显著 ($P<0.01$)。

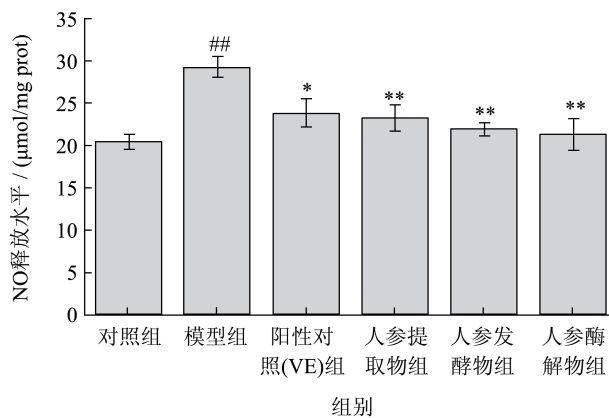


图 5 不同人参产物对氧化损伤模型 HepG2 细胞 NO 水平的影响

Fig.5 Effects of different ginseng products on NO levels in HepG2 cells of oxidative damage model

注: 与空白对照组比较, $###P<0.01$; 与模型组比较 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

2.6 不同人参产物对氧化损伤模型HepG2细胞MDA含量的影响

当细胞受到强氧化剂 H_2O_2 刺激时, 细胞会发

生氧化应激, 导致细胞内丙二醛 (MDA) 水平增加, 故 MDA 常作为反映细胞内氧化状态的测定指标^[28]。实验使用不同人参产物给药组和 H_2O_2 建立了 HepG2 细胞损伤模型, 测定各组细胞内 MDA 含量, 结果如图 6 所示。实验结果显示, 与空白对照组相比, 模型组的 MDA 含量增加了 1.32 倍 ($P<0.001$), 说明氧化损伤模型建模成功。各给药组均能不同程度的降低细胞内的 MDA 含量 ($P<0.001$), 减少 H_2O_2 对 HepG2 细胞的氧化损伤程度, 说明维生素 E 和人参产物对氧化应激状态的 HepG2 细胞具有保护作用。

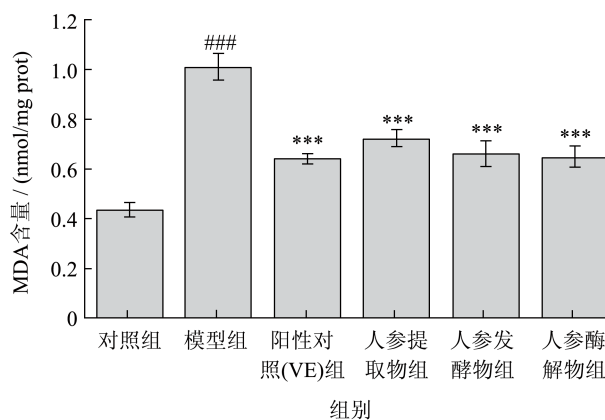


图 6 不同人参产物对氧化损伤模型 HepG2 细胞 MDA 含量的影响

Fig.6 Effects of different ginseng products on MDA content in HepG2 cells of oxidative damage model

注: 与空白对照组比较, $###P<0.001$; 与模型组比较 $***P<0.001$ 。

2.7 不同人参产物对氧化损伤模型HepG2细胞SOD酶活力的影响

超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 都是细胞内重要的酶促抗氧化剂, 能清除自由基, 预防和修复 ROS、RNS 所造成的细胞损伤, 提高机体抗氧化能力^[7]。实验使用不同人参产物给药组和 H_2O_2 建立了 HepG2 细胞损伤模型, 测定各组细胞内 SOD 活性, 结果如图 7 所示。实验结果显示, 与空白对照组相比, 模型组细胞在受到 H_2O_2 刺激后, SOD 活力显著降低 ($P<0.001$), 降幅为 47.50%。与模型组相比, 各给药组细胞内 SOD 活力极显著增加 ($P<0.001$), 人参产物组 SOD 活力增加幅度均大于维生素 E 组; 经过生物转化的人参提取物 SOD 活力大于未经处理的人参提取物, 但差异不具有统计学意义 ($P>0.05$)。表明生物转化后的人参提取物通过提高胞内 SOD 酶活以增强其抗氧化作用, 减少氧化应激所造成的细胞损伤。

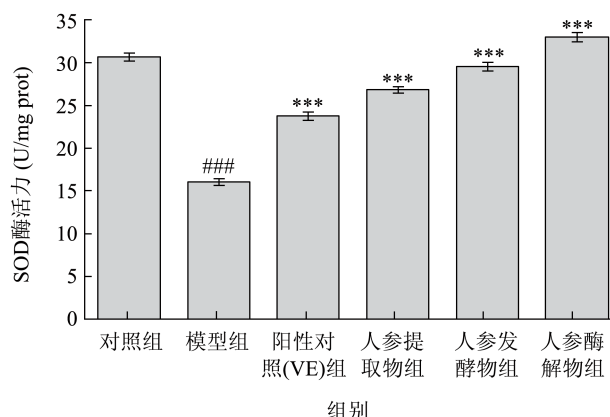


图7 不同人参产物对氧化损伤模型 HepG2 细胞 SOD 酶活力的影响

Fig.7 Effects of different ginseng products on SOD enzyme activity in HepG2 cells of oxidative damage model

注：与空白对照组比较，### $P < 0.001$ ；与模型组比较 *** $P < 0.001$ 。

2.8 不同人参产物对氧化损伤模型HepG2细胞GSH含量的影响

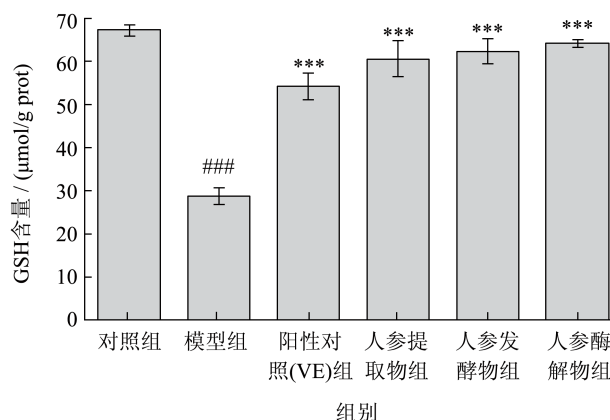


图8 不同人参产物对氧化损伤模型 HepG2 细胞 GSH 含量的影响

Fig.8 Effects of different ginseng products on GSH content in HepG2 cells of oxidative damage model

注：与空白对照组比较，### $P < 0.001$ ；与模型组比较 *** $P < 0.001$ 。

还原型谷胱甘肽 (GSH) 是体内最重要的非酶性抗氧化物，是谷胱甘肽过氧化物酶的底物，能清除细胞内的自由基，GSH 含量是衡量机体抗氧化能力的重要因素^[29]。通过测定 GSH 含量，可证明给药组预处理是否增加谷胱甘肽过氧化物酶的抗氧化活性。实验使用不同人参产物给药组和 H_2O_2 建立了 HepG2 细胞损伤模型，测定各组细胞内 GSH 含量，结果如图 8 所示。实验结果显示，与空白对照组相比，模型组 GSH 含量仅为 $28.77 \mu\text{mol/g prot}$ ，含量降低

了 57.28% ($P < 0.001$)，说明氧化损伤模型建模成功。与模型组相比，各给药组的 GSH 含量显著提高 ($P < 0.001$)，其中人参酶解物组的 GSH 含量最高，侧面反应人参酶解物具有最好的细胞保护效果，与 2.4 结论一致。

3 结论

经过生物转化 (生物发酵和生物酶解) 后的人参提取物对不同自由基的清除能力均有不同程度的提升，综合看人参酶解物的体外抗氧化能力最强。使用质量浓度为 200 mg/L 的维生素 E、人参提取物、人参发酵物和人参酶解物给药先干预 HepG2 细胞 4 h，再加入浓度为 $600 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用 2 h 建立 HepG2 细胞损伤模型，结果发现阳性 (VE) 对照组和不同人参产物组都是通过抑制 MDA 和 NO 的产生，同时增强抗氧化酶 SOD 活力和抗氧化物 GSH 含量，以减轻 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤。实验证明了三种人参产物均对 HepG2 细胞的有不同效果的保护作用，其中人参酶解物的保护效果最好，细胞存活率可达 98.10%，与模型组相比差异显著 ($P < 0.001$)。本研究使用不同方法制备的人参产物具有良好的抗氧化效果，可为后续人参原料进一步开发利用，人参抗氧化产品的制备和研究细胞氧化应激损伤治疗提供参考。

参考文献

- [1] KIM D H. Chemical diversity of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium*, and *Panax notoginseng* [J]. Journal of Ginseng Research, 2012, 36(1): 1-15.
- [2] 刘涛. 人参酵素生物转化及发酵工艺研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- [3] 刘蓉, 许盼盼, 李仕琳, 等. 生物转化技术制备稀有人参皂苷的研究进展 [J]. 特产研究, 2019, 41(2): 114-117.
- [4] 孙美, 李继文, 马金颖, 等. 稀有人参皂苷的生物转化及其降血糖活性研究进展 [J]. 吉林农业大学学报, 2023, 45(6): 674-684.
- [5] 濮兴娜, 冯健, 郭晶, 等. 白刺叶提取物对 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎的缓解作用以及基于 HepG-2 细胞的抗氧化作用评估 [J]. 云南民族大学学报 (自然科学版), 2024, 36(9): 1-19.
- [6] 张聪, 刘迪, 张寒雪, 等. 人参皂苷对过氧化氢诱导的 HepG2 细胞损伤的保护作用 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2020, 46(5): 985-991.
- [7] PARCHETA M, SWISLOCKA R, ORZECOWSKA S, et al. Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties [J]. Materials (Basel),

- 2021, 14(8): 1984.
- [8] DEVI S, KUMAR N, KAPILA S, et al. Buffalo casein derived peptide can alleviates H₂O₂ induced cellular damage and necrosis in fibroblast cells [J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2017, 69(7): 485-495.
- [9] LI G S, ZHAN J Q, HU L P, et al. Identification of a new antioxidant peptide from porcine plasma by *in vitro* digestion and its cytoprotective effect on H₂O₂ induced HepG2 model [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 86: 104679.
- [10] SIMON D, ADEN D P, KNOWLES B B. Chromosomes of human hepatoma cell lines [J]. International Journal of Cancer, 1982, 30(1): 27-33.
- [11] 郑万财,党斌,张迹,等.基于转录组测序分析葡萄籽原花青素对HepG2细胞基因及其相关功能的影响[J].食品与机械,2024,40(3):188-195.
- [12] 崔歆印.三种柑橘的精油提取及其活性研究[D].上海:上海应用技术大学,2020.
- [13] 贾盟盟.艾纳香属植物精油提取、成分分析及其生物活性研究[D].广州:华南理工大学,2020.
- [14] 魏婷,郭晓萌,张焱.黑参多糖的抗氧化和抗肿瘤活性[J].现代食品科技,2023,39(3):55-65.
- [15] 王秋丹,赵凯迪,林长青.沙棘多糖对胰岛素抵抗HepG2细胞氧化应激的保护作用与机制[J].食品与机械,2022, 38(3):167-172.
- [16] PARK M, YOO J, LEE Y, et al. Ameliorative effects of black ginseng on nonalcoholic fatty liver disease in free fatty acid-induced HepG2 cells and high-fat/high-fructose diet-fed mice [J]. Journal of Ginseng Research, 2020, 44(2): 350-361.
- [17] 刘晓凤,卢晓琴,钟浩,等.人参皂苷对过氧化氢诱导的Caco-2细胞氧化损伤的保护作用[J].食品与发酵工业, 2024,50(7):46-50.
- [18] 罗苑,陈普,段小花,等.人参皂苷Rb3通过抗氧化应激对HT22细胞氧糖剥夺-复糖复氧损伤的保护作用[J].中国兽医杂志,2022,58(9):74-79.
- [19] 查雨锋,詹易,李婷,等.三七不同部位提取物体外抗氧化功效研究[J].中医学报,2022,37(1):142-148.
- [20] RUMPF J, BURGER R, SCHULZE M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 233: 123470.
- [21] MUNTEANU I G, APETREI C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review [Z]. 2021: 22.
- [22] 成会菊,张珏,刘心韵,等.皱叶莢蒾的化学成分及其抗氧化活性[J].现代食品科技.2024,40(8):168-177.
- [23] 王崑仑,管立军,高扬,等.裂褶菌发酵西洋参工艺优化及体外抗氧化能力研究[J].食品工业科技,2024,45(7):142-151.
- [24] YAO Y J, WANG H L, XU F R, et al. Insoluble-bound polyphenols of adlay seed ameliorate H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells via Nrf2 signalling [J]. Food Chemistry, 2020, 325: 126865.
- [25] YE J T, LI F T, HUANG S L, et al. Effects of ginsenoside Rb1 on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2019, 14(1): 259.
- [26] LI M J, HUANG Z X, ZHANG R, et al. Review of probiotics, gut microorganisms, and their enzymes involved in the conversion of ginsenosides [J]. Food Bioscience, 2024, 58: 103829.
- [27] 牛志强,李琦,刘亚男,等.人参皂苷F2对LPS诱导RAW264.7细胞炎症反应的改善作用[J].现代食品科技, 2024,40(1):27-33.
- [28] CHANG X W, DONG S, BAI W L, et al. Methylated metabolites of chicoric acid ameliorate hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress in HepG2 cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(7): 2179-2189.
- [29] LISTER I N E, GINTING C N, GIRSANG E, et al. Hepatoprotective properties of red betel (*Piper crocatum* Ruiz and Pav) leaves extract towards H₂O₂-induced HepG2 cells via anti-inflammatory, antinecrotic, antioxidant potency [J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2020, 28(10): 1182-1189.