

软枣猕猴桃原花青素对 H_2O_2 诱导细胞损伤的预保护作用

石浩^{1,2}, 王仁才¹, 庞立¹, 王琰¹, 王芳芳¹

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410128)

(2. 湖南应用技术学院农林科技学院, 湖南常德 415100)

摘要: 研究软枣猕猴桃中原花青素类化合物对过氧化氢损伤人永生表皮细胞 (HaCat) 的保护作用。以浏阳市大围山软枣猕猴桃为试材, 以体外培养的HaCat细胞为实验对象。试验分为3组, 分别为对照组、过氧化氢损伤组、处理组(软枣猕猴桃原花青素 5~1000 $\mu\text{g/mL}$ 预处理), 以细胞内细胞存活率(凋亡率)、SOD(超氧化物歧化酶)、GSH-PX(谷胱甘肽过氧化物酶)、ROS(活性氧簇)、Nrf2 基因及其蛋白表达水平为综合评价指标, 评价其抗氧化性强弱。实验结果表明: 当加入原花青素类化合物对细胞进行预保护后, 5~500 $\mu\text{g/L}$ 浓度的原花青素对损伤细胞的存活率为 77% 左右, 较模型组提高了 2.88 倍。处理组细胞内SOD(10.46 U/mg prot)、GSH-PX 水平(33.83 U/mg prot)较模型组升高了 108.28%、137.48%, 且存在明显差异($p < 0.05$); 而ROS水平显著下降, 与模型组(96.21)相比细胞内平均荧光强度下降了 48.60%。此时Nrf2 基因及其蛋白表达量分别为 1.40、35.11 较模型组分别提高了 63.93%、80.70%。这说明软枣猕猴桃中原花青素类化合物对 H_2O_2 造成HaCat细胞的氧化损伤具有一定的预保护作用, 可进一步将其开发成相应的天然有效抗氧化剂产品应用于市场中。

关键词: 软枣猕猴桃; 原花青素; H_2O_2 诱导; 细胞损伤; 预保护作用

文章编号: 1673-9078(2019)01-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.001

Preprotective Effect of *Actinidia arguta* Proanthocyanidins on the Cell Injured by Drogen Peroxide

SHI Hao^{1,2}, WANG Ren-cai¹, PANG Li¹, WANG Yan¹, WANG Fang-fang¹

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals, Changsha 410128, China)

(2. College of Agriculture and Forestry, Hunan Applied Technology University, Changde 415100, China)

Abstract: The protective effect of *Actinidia arguta* Proanthocyanidinss on the Human immortalized epidermal cells (HaCat) injured by drogen peroxide was investigated. *Actinidia arguta* in Dawei Mountain of Liuyang was used as test material and HaCat cells cultured *in vitro* were used as the experimental objects. The experiment was divided into three groups: control group, hydrogen peroxide injury group and treatment group (pretreatment with 5~1000 $\mu\text{g/mL}$ proanthocyanidins of *Actinidia arguta*), the cell survival rate (apoptosis rate), SOD (superoxide dismutase), GSH-PX (glutathione peroxidase), ROS (reactive oxygen species), Nrf2 gene and protein expression level were measured to evaluate their antioxidant activity. Results showed that when the proanthocyanidins were added to the cells to protect the cells, the survival rate of the injured cells was about 77% at the concentration of 5~500 $\mu\text{g/L}$ proanthocyanidins, which was 2.88 times higher than that in the model group. The levels of SOD (10.46 U/mg prot) and GSH-PX (33.83 U/mg prot) in the treatment group were 108.28% and 137.48% higher than those in the model group ($p < 0.05$), respectively. The level of ROS decreased significantly, and the average intracellular fluorescence intensity decreased by 48.60% compared with the model group (96.21). Meanwhile, the expression of Nrf2 and its protein were 1.40 and 35.11, respectively, which were 63.93% and 80.70% higher than that in the model group. These indicated that procyanidins in *Actinidia chinensis* have a preprotective effect on oxidative damage of HaCat cells induced by H_2O_2 and can be further developed into natural and effective antioxidant

收稿日期: 2018-09-26

基金项目: 湖南省研究生科研创新项目(CX2017B357); 湖南省科技厅重点专项(2017NK2071)

作者简介: 石浩(1988-), 男, 博士研究生, 研究方向: 植物资源高值化利用

通讯作者: 王仁才(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物资源高值化利用

products to be used in the industry.

Key words: *Actinidia arguta*; proanthocyanidins; H_2O_2 induced; cell injury; preprotective effect

软枣猕猴桃(*Actinidia arguta* Sieb. et Zucc.)为科猕猴桃属,属于多年生落叶藤本植物,是九种光果猕猴桃种类之一,主要分布在中国东北、华北、山东及长江流域^[1]。软枣猕猴桃成熟后果皮、果肉呈现红紫色,含有的原花青素类物质非常丰富^[2]。具相关研究报道软枣猕猴桃中还含有其它大量的次生代谢产物如,黄酮类、生物碱类、多酚类、花青苷类、活性多糖类、萜类、不饱和脂肪酸^[3-6]等。原花青素是一类含有多酚羟基的物质,是目前国际上公认的清除人体内自由基有效的天然抗氧化剂,一般呈现红棕色末,气微、味涩,溶于水和大多有机溶剂,它具有较强抗氧化、防止动脉粥样硬化、延缓衰老的作用^[7-9]。自由基(free radical, FR)化学上也称为“游离基”,由于自由基属于体内的一种高能分子,能在细胞膜间穿梭,破坏细胞膜,降低细胞活性,加速细胞内沉积物的生成,引发各种并发症,加速机体衰老^[10]。同时随着当前环境污染的日益严重,精神、物质生活压力的增加以及长时间、大剂量的食用高脂肪、高热量、高蛋白的食物,这些都直接或间接导致人体内自由基含量的增加^[11,12],因此在控制机体内自由基数量方面的研究是非常具有必要性的。

抗氧化功效的评价方法包括传统的化学方法、细胞方法、动物模型法和人体志愿者法^[13]。目前以细胞为基础的活性筛选模型,在天然产物抗氧化活性评价研究中逐步得到应用,其中细胞法主要是选用皮肤的相关细胞为测试对象,测量经氧化损伤诱导后,抗氧化物质清除体内自由基的能力来评价其抗氧化的强弱^[14]。细胞法可对氧化应激所造成的损伤进行分子水平的了解,对于抗氧化物质的评价也更接近人体实际作用^[15]。HaCat 细胞保留了表皮全层的分化能力,与正常人角质细胞非常接近,且其培养方法与原代细胞培养相比相对简单,可以不限次数的传代^[16,17]。故选取 HaCat 细胞建立 H_2O_2 氧化损伤模型,并用此模型进行抗氧化物质的相关评价与研究。本文以湖南省浏阳市大围山软枣猕猴桃为原料,进行多指标深入分析软枣猕猴桃原花青素对人体细胞抗氧化能力的效果,探索其抗氧化作用机理,为今后原花青素类抗氧化食品、保健品、化妆品的开发利用提供理论依据。目前猕猴桃为我国南方地区分布及栽培的主要经济林产业之一,其资源的开发与果实中功效成分的综合利用成为猕猴桃产业持续高效发展的重要保证,也是目前湖南偏远农村地区重点扶贫项目之一。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

软枣猕猴桃,湖南浏阳市大围山野生嫁接驯化品种;原花青素标准品、硫酸铁铵、正丁醇、盐酸、氯仿、三羟甲基氨基甲烷、过硫酸铵、十二烷基硫酸钠、四甲基乙二胺,国药集团;吐温-20、MTT (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) (Sigma公司); HaCat 细胞,源自长沙湘雅医院;1640 高糖培养基、牛血清蛋白、二甲基亚砷、胰酶消化液, Gibco 公司; BCA Protein Assay Kit, 康为世纪生物科技有限公司; GSH-PX/SOD 检测试剂盒,南京建成生物科技有限公司; S0033 活性氧检测试剂盒,碧云天生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒,凯基生物; HRP goat anti-rabbit IgG, Proteintech 公司。

1.2 仪器与设备

全自动酶标洗板机、多功能酶标分析仪,汇松科技有限公司;自动平衡离心机,湘仪集团有限公司;直热式二氧化碳培养箱,上海三腾仪器有限公司;倒置生物显微镜,北京中显恒业仪器仪表有限公司;流式细胞分析仪, BD FACSCalibur 公司;倒置生物显微镜,北京中显恒业仪器有限公司;冷冻干燥机, Thermo Savant 公司;低速离心机、摇床、精密电子天平,常熟市双杰测试仪器厂。

1.3 供试样的制取

软枣猕猴桃果实干燥粉末经 70% 的乙醇溶液超声提取,提取液经浓缩后加入 1/3 体积的 Sevag 试剂(氯仿:正丁醇=4:1(V:V))混合震荡 20 min 后静置 15 min,除去水层与溶剂交界处的变性蛋白质;滤液经 X-5 大孔吸附树脂和聚酰胺层析柱相继洗脱,显色法跟踪收集洗脱液,得到初步纯化原花青素溶液,将其冷冻干燥成粉末,粉末呈现红棕色、其纯度为 82.36%。

1.4 原花青素物质剂量的筛选

使用无菌的 PBS 溶解实验物质,室温下避光存放 24 h,混匀后使用 0.22 μ m 针头滤器过滤除菌,储存于 4 $^{\circ}$ C 待用。有效期 4 周。其中原花青素设 0、5、10、30、50、100、300、500、8000、1000 μ g/mL 共 10 个剂量组,放入培养箱孵化 24 h。每个剂量组 5 个复孔。

1.5 原花青素对H₂O₂导致的氧化损伤的预保

护作用研究

在 1.4 实验结果基础上, 筛选出 7 个浓度原花青素类物质先对 HaCat 细胞进行预保护, 再加入 100 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 诱导浓度进行损伤, 考察实验物质对 HaCat 细胞氧化损伤预保护作用强弱^[18,19]。

1.5.1 MTT(四唑盐)比色法试验

从-18℃冰箱中取出已配置好的MTT溶液, 置于 37℃水浴。自培养箱中取出培养板, 向每孔加入 20 μL MTT溶液, 避光。置于培养箱中继续孵化 4 h。孵化后, 每孔加入 150 μL 的DMSO, 置于振荡器上, 振荡 5 min后, 于Bio-Tek酶标仪上读数, 波长为 490 nm。按下式计算细胞活性:

$$\text{细胞活性} = \frac{\text{测试OD值} - \text{调零OD值}}{\text{对照OD值} - \text{调零OD值}} \times 100\%$$

1.5.2 DCFH-DA 荧光探针染色实验

采用二氯荧光素 (DCFH-DA) 标记法^[20]。将细胞处理后, 按照 1:1000 用无血清培养液稀释DCFH-DA, 使终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。去除细胞培养液, 消化离心 (1000 r/min, 5~10 min) 收集细胞, 加 1 mL DCFH-DA工作液, 37℃细胞培养箱内孵育 20 min。孵育后用PBS洗两次, 充分去除细胞外DCFH-DA, 以降低背景荧光的干扰, 于 1000 r/min离心 5 min, 收集沉淀用流式细胞仪在激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm处测定荧光强度。

1.5.3 ROS检测

按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。去除细胞培养液, 加入适当体积稀释好的 DCFH-DA。加入的体积以能充分盖住细胞为宜。37℃细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。用胰酶消化收集在流式细胞仪观察检测。

1.5.4 细胞凋亡测定

用不含 EDTA 的胰酶消化收集、用磷酸缓冲盐溶液洗涤细胞 2 次, 每次 2000 r/min 离心 5 min, 收集约 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 细胞, 加入 500 μL 的 Binding buffer 悬浮细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide, 混匀, 室温、避光, 反应 5~15 min, 1 h 内, 在流式细胞仪观察检测。

1.6 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性测定实验

1.6.1 BCA法测定蛋白质浓度

用与待测蛋白样品相一致的稀释液稀释 BSA (牛血清白蛋白) 得到 BSA 标准品, 计算 BCA (二喹啉甲酸) 工作液总量, 根据计算出的 BCA 工作液需要总量, 将 BCA-A 和 BCA-B 按照 50:1 体积比配制 BCA 工作液。将稀释好的 BSA 标准品和待测蛋白样品各 25 μL 分别加到作好标记的 96 孔板微孔中, 每孔加入 200 μL BCA 工作液, 充分混匀, 盖上 96 孔板盖, 37℃孵育 30 min, 冷却至室温, 用酶标仪在 562 nm 处测定每个样品及 BSA 标准品的吸光值, 绘制标准曲线。由标准曲线计算样品中蛋白浓度。

1.6.2 酶活性的测定

将细胞悬液置于-80℃冷冻 30 min后, 37℃水浴 5 min, 按此操作反复冻融细胞 4 次, 以充分破坏细胞并使其释放出细胞成分, 2500 r/min离心 20 min, 仔细收集上清液。取样本溶液加入 96 孔板中, 设对照孔, 对照空白孔, 测定孔, 测定空白孔四种。按照南京建成生物工程研究所SOD、GSH-PX试剂盒测试说明书要求, 添加各孔样品, 最后使用酶标仪分别在波长 450 nm、412 nm处读取OD值, 并计算酶活性。

1.7 原花青素对 H₂O₂ 诱导 HaCat 细胞 Nrf2 基因表达的影响

(1) 引物序列:

Human actin-F: 5'-ACCCTGAAGTACCCCATCG AG-3'; Human actin-R: 5'-AGCACAGCCTGGATAGC AAC-3';

product length: 224 bp。

Human NRF2-F: 5'-TCAGCGACGGAAAGAGTA TGA-3'; Human NRF2-R: 5'-CCACTGGTTTCTGAC TGG ATGT-3';

product length: 174 bp。

(2) 体系组成: 实时定量 PCR 分析。每个样本每个指标 3 个孔, 共 30 μL 体系。反应体系为 Template (反转录产物) 1 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ Primer A/B (引物) 各 0.5 μL 、PCR H₂O 13 μL 、2X SYBGREEN PCR Master Mix (实时荧光定量 PCR 预混液) 15 μL 。

(3) 定量 PCR 扩增程序: 95℃预变性 10 min, 95℃变性 15 s, 60℃退火 60 s, 进行 40 个循环。熔解曲线分析 60~95℃。

1.8 原花青素对 H₂O₂ 诱导 HaCat 细胞蛋白表达量的影响

HaCat 细胞经 H₂O₂ 后, 分别用 5、50、500 μg/mL 软枣猕猴桃原花青素处理, 另外一个空白组和一个模型组, 供 5 组。采用 Western blot 测定 NRF2 β-actin 作为内参, 重复 3 次。

1.9 数据分析

数据采用 Origin 制图, 运用 SAS 9.0 统计软件进行分析。满足正态性分布且方差齐的两组之间差异的比较用两组独立样本的 *t* 检验, 多组之间差异的比较用单因素的方差分析, 图表中不同字母表示 $\alpha=0.05$ 具有显著性差异, $p<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 原花青素物质剂量筛选

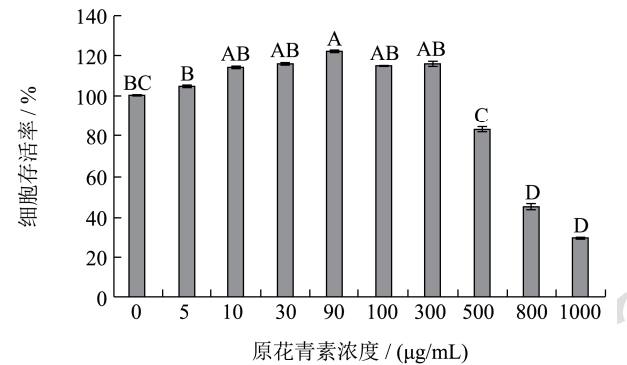


图 1 不同浓度原花青素对HaCat细胞活性的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of Proanthocyanidinss on the activity of HaCat cells

注: 图中大写字母不同表示各处理间差异性显著, $p<0.05$, 下同。

不同浓度(5~1000 μg/mL)的原花青素对HaCat细胞活性的影响存在一定的差异。由图 1 可知, 在浓度为 5~500 μg/mL 的范围内, 原花青素对细胞的影响较小, 细胞存活率均略大于 100%, 当原花青素浓度超过 500 μg/mL 时, 对细胞的生长表现出了一定的抑制作用, 例如当浓度在 800 μg/mL 时, 细胞存活率仅为

44.64%, 当处理浓度超过 500 μg/mL 后对细胞的存活率出现显著降低情况, 可能是高浓度不利于细胞生长、代谢^[21], 因此选择≤500 μg/mL 的 7 个原花青素梯度进一步研究其对 H₂O₂ 导致的细胞氧化损伤的预保护作用。

2.2 原花青素对H₂O₂ 氧化损伤模型的预保护

2.2.1 对HaCat细胞存活率的影响

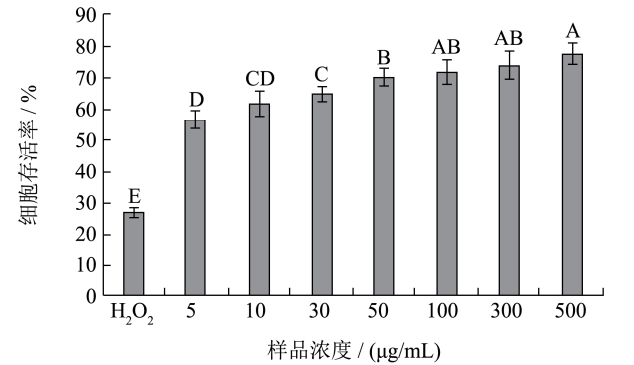


图 2 不同浓度原花青素对H₂O₂ 氧化损伤的保护作用

Fig.2 protective effect of different concentrations of Proanthocyanidinss on H₂O₂ oxidative damage

在用 100 μmol/L H₂O₂ 处理 24 h, 所造成的细胞氧化损伤模型中, 不同浓度原花青素对HaCat细胞的预保护作用强弱存在差异。由图 2 可知, 模型组细胞的存活率仅为 26.82%, 当原花青素进行与保护作用后, 细胞存活率具有明显的提高, 且随浓度的增加细胞存活率亦有相应增加的趋势; 当原花青素浓度为 5 μg/mL 时, 细胞存活率为 56.09%、500 μg/mL 时达到了 77.47%, 相对于模型组来说细胞存活率分别提高了 2.09 倍和 2.88 倍。这可能是原花青素所含多较多的酚羟基可有效的清除 H₂O₂ 所产生自由基, 降低自由基对细胞的损伤^[22]。因此后文选择原花青素物浓度在 5、50、500 μg/mL 分别作为低浓度、中、高浓度剂量组进行后续的相关研究。

2.2.2 原花青素对H₂O₂ 诱导HaCat细胞凋亡比率的影响

表 1 原花青素对H₂O₂ 诱导HaCat细胞凋亡的影响

Table 1 Effect of proanthocyanidins on H₂O₂ induced apoptosis in HaCat cells

Group	UR/%	LR/%	Apoptosis (UR+LR) /%
Blank	1.40	1.50	2.90
H ₂ O ₂ (100 μmol/L)	4.13	5.13	9.26
Sample (5 μg/mL)	2.30	3.38	5.68
Sample (50 μg/mL)	1.87	2.36	4.23
Sample (500 μg/mL)	1.64	1.57	3.21

注: UR: 晚期凋亡 (%); LR: 早期凋亡 (%).

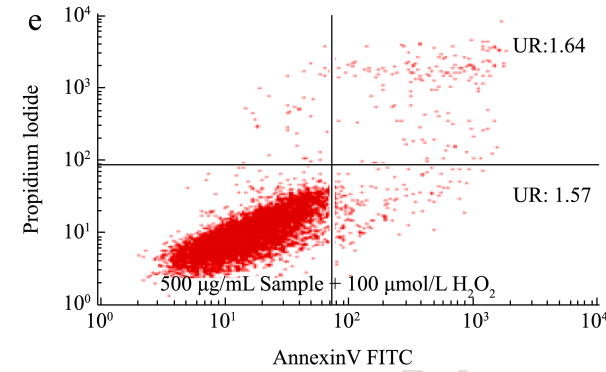
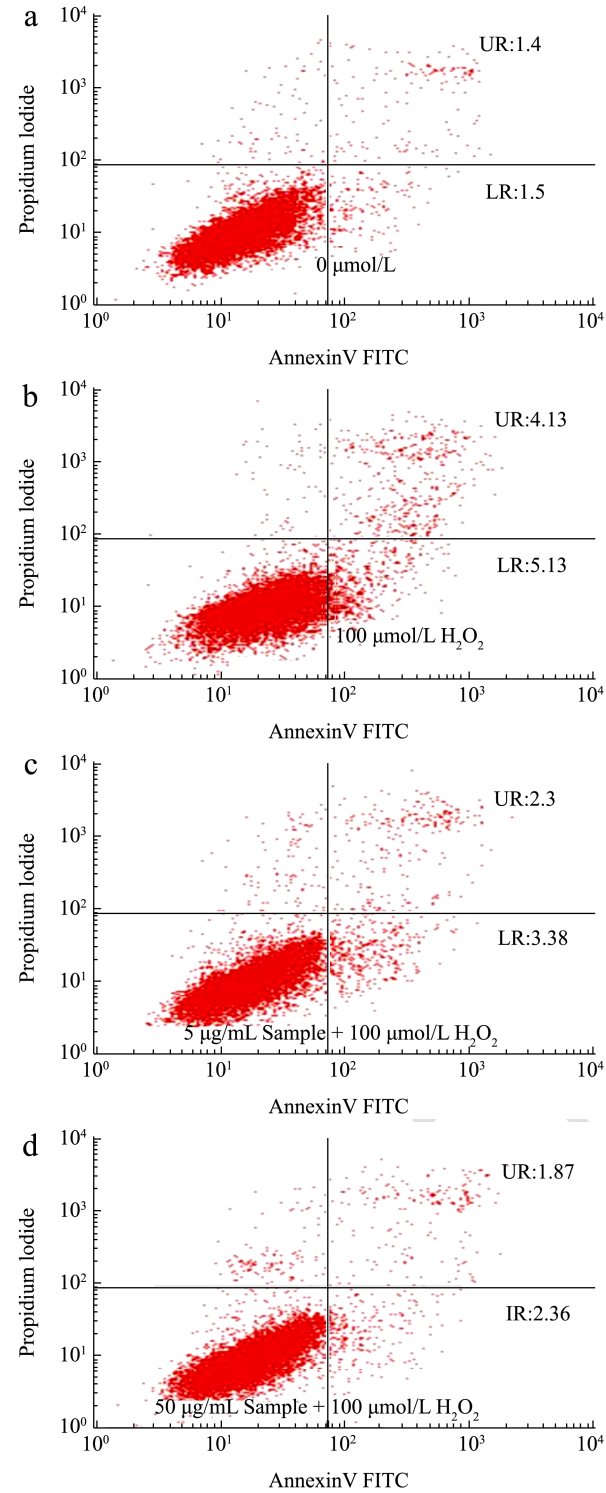


图3 原花青素对H₂O₂诱导HaCaT细胞凋亡的影响

Fig.3 The effect of proanthocyanidins on the apoptosis of HaCaT cells induced by H₂O₂

注: X轴 Annexin V FITC 为膜联蛋白 V 的异硫氰酸荧光素, Y 轴 Propidium Iodide 为碘化丙啶; a 图为空白对照组; b、c、d、e 图分别表示 100 μmol/L H₂O₂、5 μg/mL 原花青素+100 μmol/L H₂O₂、50 μg/mL 原花青素+100 μmol/L H₂O₂ 和 500 μg/mL 原花青素+100 μmol/L H₂O₂ 处理组。

胞凋亡比率实验的测定可进一步验证原花青素对 HaCat 细胞存活率的影响结果。原花青素对 H₂O₂ 诱导 HaCat 细胞凋亡比率的影响如表 1、图 3 所示。由表 1 和图 3 可知, 空白对照组细胞凋亡比率仅为 2.90%, 而经 H₂O₂ 处理后细胞凋亡比率值最高, 达到了 9.26%, 当经过原花青素预处理后, 细胞凋亡比率明显的降低, 且与浓度呈现一定正相关性, 浓度越高细胞凋亡比率也就相应越低, 当原花青素浓度在 500 μg/mL 时细胞凋亡比率降低到了 3.21%。说明原花青素对 HaCat 细胞具有较强的保护作用, 其实验结果也与细胞存活率的结果大相一致。

2.3 原花青素对细胞内相关抗氧化酶及ROS

水平的影响

2.3.1 对细胞内SOD、GSH-PX抗氧化酶水平的影响

不同组处理间SOD、GSH-PX值表现出具有较大的差异, 见表 2 所示。

表 2 H₂O₂ 损伤及抗氧化物质对细胞内SOD、GSH-PX、ROS水平的影响

Table 2 Effects of H₂O₂ damage and antioxidant on intracellular SOD, GSH-PX, ROS level ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Group	SOD/(U/mg prot) value	GSH-PX/(U/mg prot) value	ROS value
Blank	23.73±0.48 ^a	83.69±10.44 ^a	35.24±1.98 ^d
H ₂ O ₂ (100 μmol/L)	10.46±0.42 ^d	33.83±13.63 ^c	96.21±6.43 ^a
Sample (5 μg/mL)	14.77±1.36 ^c	41.83±8.38 ^{bc}	70.47±1.44 ^b
Sample (50 μg/mL)	20.29±0.81 ^b	67.80±11.09 ^{ab}	56.23±1.2 ^c
Sample (500 μg/mL)	21.13±2.15 ^{ab}	82.98±7.95 ^a	49.45±3.55 ^{cd}

注: 小写字母代表 5 个处理组间相比, $p<0.05$ 。

由表 2 可知,当用采用 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 对细胞产生氧化损伤后,酶值非常低,只有空白对照组SOD值 (23.73 U/mg prot) 的 44.05%、GSH-PX值 (83.69 U/mg prot) 的 40.42%。当加入原花青素对细胞进行提前预保护后,细胞内的酶值有所增加,原花青素处理组分别增加了 102.08%、145.25%, 这明原花青素对 H_2O_2 造成的HaCat氧化损伤有较好的预保护作用。细胞体内氧自由基清除酶活性的增加,可能是因为原花青素可有效增强某些抗氧化基因的表达所致^[23,24],从而加强了相应抗氧化酶的数量和活性。高浓度原花青素 (500 $\mu\text{g/mL}$) 处理组与低浓度原花青素 (5 $\mu\text{g/mL}$) 处理组对HaCat细胞的保护作用具有一定的性差异 ($p<0.05$),同时也间接说明在原花青素 500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的范围类,对细胞的预保护能力效果较好。

2.3.2 对细胞内ROS水平的影响

不同组处理间ROS值同样表现出具有较大的差异,见表 2、图 4 所示。

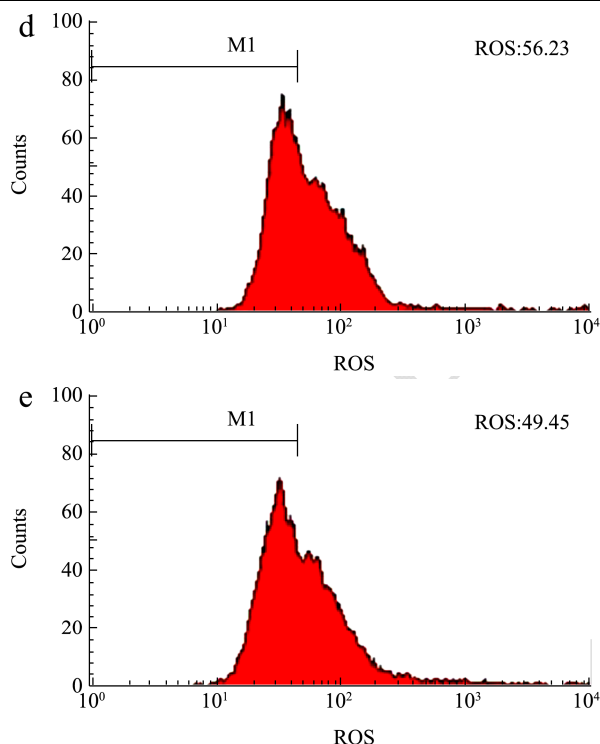
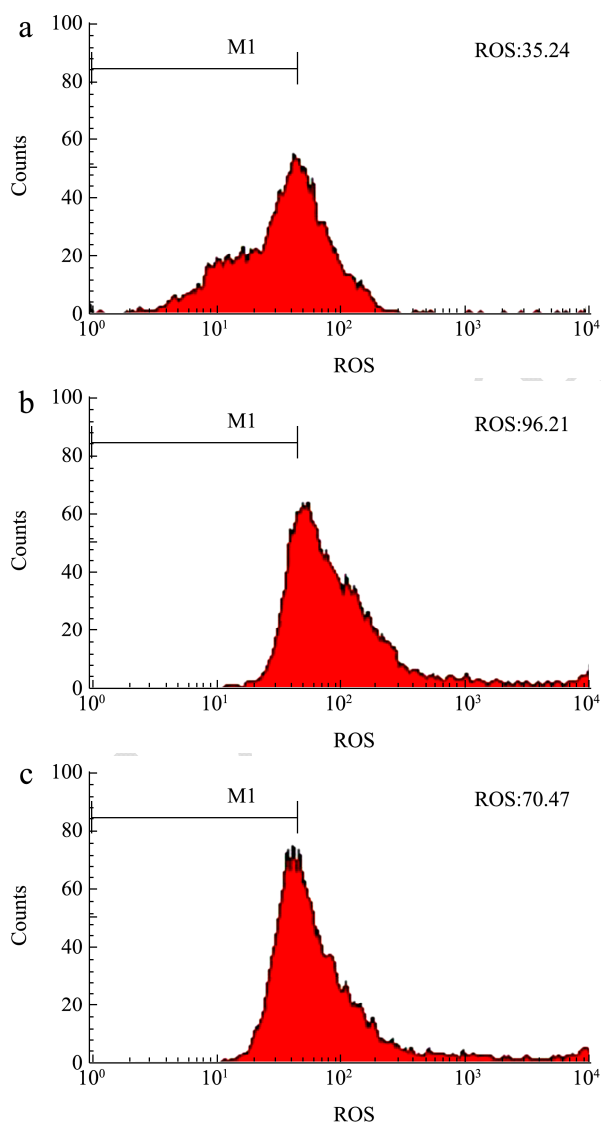


图 4 原花青素对 H_2O_2 损伤的 HaCat 细胞内 ROS 水平影响

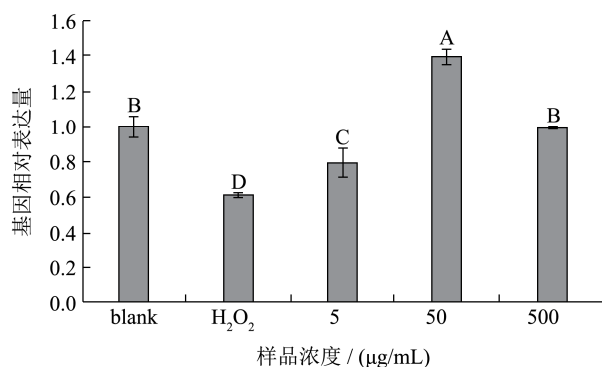
Fig.4 The effect of proanthocyanidins on ROS level in HaCat cells damaged by H_2O_2

注: X 轴 Annexin V FITC 为膜联蛋白 V 的异硫氰酸荧光素, Y 轴 Propidium Iodide 为碘化丙啉; a 图为空白对照组; b、c、d、e 图分别表示 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 、5 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素+100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 、50 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素+100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素+100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组。

由表 2、图 4 可知,用 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 造成氧化损伤模型后,细胞内的 ROS 水平明显增高,相对于空白对照组 ROS 值 (35.24),模型组的平均荧光强度增加了 2.73 倍;当加入抗氧化物质原花青素进行预保护后,细胞内的 ROS 水平较模型组降低了 48.60%,表明原花青素对 H_2O_2 造成的 HaCat 细胞氧化损伤有一定的预保护作用。这可能是因为原花青素可有效的预防细胞来自 H_2O_2 的损伤,一方面原花青素清除细胞外自由基的能力比较大,另一方面细胞自身所产生的自由基少,这与 Anna^[25]等的研究结果基本一致。但相对于空白对照组,ROS 水平均具有一定程度的升高,从而说明两者对 H_2O_2 损伤的保护作用并不完全。不同浓度间原花青素对 HaCat 细胞的预保护作用差别大,高、中浓度原花青素组比低浓度原花青素组对 HaCat 细胞保护作用的效果好。

2.4 原花青素对 H_2O_2 诱导 HaCat 细胞凋亡基因

Nrf2 表达量的影响

图5 原花青素对H₂O₂诱导HaCat细胞凋亡基因表达的影响Fig.5 Effect of proanthocyanidins on the expression of apoptotic genes induced by H₂O₂ in HaCat cells

抗氧化基因Nrf2表达量的多少直接决定了细胞抗氧化能力的大小,是有效反应出细胞活性大小的指标之一。不同浓度原花青素对H₂O₂诱导HaCat细胞Nrf2基因表达量的影响如图5所示。空白对照组对细胞基因表达量为1.0,此时模型对照组对细胞表达量仅为0.61,细胞经原花青素处理后细胞基因的表达量均有显著的提高,其中50 μg/mL处理的效果最好,且具有一定促进作用,此时基因表达量为1.40,其次是500

μg/mL处理组,基因表达量为0.99。细胞体内抗氧化基因表达量的提高可能是因为细胞经原花青素预处理后,受H₂O₂损伤的程度小,自身活力较强,基因表达不受影响;另有可能是因为原花青素可直接促进、激发抗氧化基因的表达^[26,27]。

2.5 原花青素对H₂O₂诱导HaCat细胞凋亡蛋白表达量的影响

不同浓度原花青素对H₂O₂诱导HaCat细胞凋亡蛋白表达量的影响如表3所示。空白组蛋白表达量最高,达到56.85,模型对照组最低,仅为19.43。细胞经50 μg/mL原花青素处理后蛋白表达了有明显的提高,且与5 μg/mL原花青素处理组间具有显著性差异($p<0.05$),蛋白表达量分别为35.11,与500 μg/mL处理组效果不具有显著性差异($p>0.05$),说明并不是原花青素处理的浓度越高越好。其蛋白表达量的实验结果刚好与上文Nrf2表达量、氧自由基酶活性等的结果基本上对应吻合。

表3 原花青素对H₂O₂诱导HaCat细胞凋亡蛋白表达量的影响Table 3 Effect of proanthocyanidins on the expression of apoptosis protein induced by H₂O₂ in HaCat cells

Group	Blank	H ₂ O ₂	Actinidia arguta/(μg/mL)		
			5	50	500
Nrf2	56.85±1.22 ^a	19.43±0.93 ^d	29.01±1.45 ^c	35.11±1.22 ^b	33.84±4.3 ^{bc}
β-actin	97.31±2.2 ^a	96.64±3.26 ^a	94.50±5.6 ^{ab}	90.81±2.1 ^b	75.38±4.22 ^c
Nrf2/β-actin	0.58	0.20	0.31	0.39	0.45

注:小写字母代表5个处理组间相比, $p<0.05$ 。

3 结论

软枣猕猴桃中原花青素类物质是一类植物中天然次生代谢产物,本文以HaCat细胞为研究载体,通过各项指标综合分析,发现其对HaCa细胞具有较强的保护作用。当软枣猕猴桃中原花青素类物质在浓度为50~500 μg/mL时,具有提高细胞存活率、较强清除细胞内氧自由基、增加细胞内抗氧化酶含量,以及有效促进NRF2基因及其蛋白表达的作用,可有效的保护H₂O₂对HaCat细胞所造成的损伤。软枣猕猴桃原花青素类物质作为一种较强的氧化损伤保护剂,为今后相关天然抗氧化性保健食品(软枣猕猴桃原花青素类物质)的开发和利用提供了一定的理论依据。同时本实验结果目前处于细胞水平的研究阶段,尚且不能全面反映药物在人体内的吸收代谢过程,后续可通过动物实验及相关的药理学、药效实验,进一步推断其具体抗氧化性损伤和体内保护效果的机制。

参考文献

- [1] Liu Y H, Liu C J. current situation and potential of wild *Actinidia arguta* resources in Northeastern China [J]. Acta Horticulturae, 2015, 1096: 443-449
- [2] Cyboran-Mikołajczyk S, Ákos Csonka, Molnar J, et al. *In vitro* studies of anti-hemolytic and cytotoxic activity of procyanidin-rich extract from the leaves of *Actinidia arguta* [J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2017, 68, 171-177
- [3] Joonih W, Hyungin M, Okpyo Z. Phytochemical constituents of *Actinidia arguta* [J]. Korean Journal of Pharmacognosy, 2000: 357-363
- [4] Wojdylo, Aneta, Nowicka, et al. Phytochemical compounds and biological effects of *Actinidia* fruits [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 30: 194-202
- [5] Nieuwenhuizen N J, Chen X, Wang M Y, et al. Natural

- variation in monoterpene synthesis in kiwifruit: Transcriptional regulation of terpene synthases by NAC and Ethylene-insensitive3-like transcription factors [J]. *Plant Physiology*, 2015, 167(4): 1243-1258
- [6] Park H M, Son M W, Kim D H, et al. Fatty acid components of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta*) as IL-4 production inhibitor [J]. *Biomolecules & Therapeutics*, 2011, 19(1): 126-133
- [7] Zuo L L, Wang Z Y, Fan Z L, et al. Evaluation of antioxidant and antiproliferative properties of three *Actinidia* (*Actinidia kolomikta*, *Actinidia arguta*, *Actinidia chinensis*) extracts *in vitro* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(5): 5506-5518
- [8] Nishimura M, Okimasu Y, Miyake N, et al. Inhibitory effect of *Actinidia arguta* on mutagenesis, inflammation and two-stage mouse skin tumorigenesis [J]. *Genes & Environment*, 2016, 38(1): 25: 1-12
- [9] Timothy Mainardi S K L B. Complementary and alternative medicine: herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects [J]. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 2009, 123(2): 283-294
- [10] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39(1): 44-84
- [11] Aseervatham G S, Sivasudha T, Jeyadevi R, et al. Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans-an overview [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(7): 4356-4369
- [12] Getoff N. Anti-aging and aging factors in life. The role of free radicals [J]. *Radiation Physics & Chemistry*, 2007, 76(10): 1577-1586
- [13] ZHANG Ze-sheng, LU Ya-li, GAO Yun-feng. Research progress on biological model of antioxidant activity evaluation [J]. *China Food Additives*, 2015, 3: 178-183
- [14] Wolfe K L, KANG X, HE X, et al. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56 (18): 8418-8426
- [15] Yoon J J, Jeong J W, Choi E O, et al. Protective effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis in HaCat human skin keratinocytes [J]. *Excli Journal*, 2017, 16: 426-438
- [16] Afaq F, Syed D N, Malik A, et al. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects Human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007, 127(1): 222-232
- [17] Zaid M A, Afaq F, Syed D N, et al. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx [J]. *Photochemistry & Photobiology*, 2007, 83(4): 882-888
- [18] Bae S, Lee E J, Lee J H, et al. Oridonin protects HaCaT keratinocytes against hydrogen peroxide-induced oxidative stress by altering microRNA expression [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2014, 33(1): 185-193
- [19] Nguyen C N, Kim H E, Lee S G. Caffeoylserotonin protects human keratinocyte HaCat cells against H₂O₂-induced oxidative stress and apoptosis through upregulation of HO-1 expression via activation of the PI3K/Akt/Nrf2 pathway [J]. *Phytotherapy Research* Ptr, 2013, 27(12): 1810-1818
- [20] Smits E, Burveenich C, Heyneman R. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes [J]. 1997, 56(3-4): 259-269
- [21] He Y, Hu Y, Jiang X, et al. Cyanidin-3-O-glucoside inhibits the UVB-induced ROS/COX-2 pathway in HaCat cells [J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology*, 2017, 177:24-31
- [22] Mackenzie G G, Carrasquedo F, Delfino J M, et al. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells [J]. *Faseb Journal*, 2004, 18(1): 167-169
- [23] Sun Y, Cheng Z, Huang S, et al. Selenium polysaccharide SPMP-2a from *Pleurotus geesteranus* alleviates H₂O₂-induced oxidative damage in HaCat cells [J]. *Biomed Research International*, 2017, 2017: 1-9
- [24] Seo S H, Choi M O. Protective effects of *Lonicera japonica* Flos against hydrogen peroxidase-induced oxidative stress on Human keratinocyte, HaCat cells [J]. *The Korea Journal of Herbology*, 2013, 28(4): 57-62
- [25] Anna C, Josep Maria D B, Anna A A, et al. Grape seed procyanidins administered at physiological doses to rats during pregnancy and lactation promote lipid oxidation and up-regulate AMPK in the muscle of male offspring in adulthood [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2015, 26(9): 912-920

(下转第 88 页)