

南瓜籽油通过PI3K/Akt/NF- κ B信号通路对BPH-1细胞氧化应激和炎症水平的改善作用

黄梦丽, 周爱梅*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 为探究不同提取方法制备的南瓜籽油对 BPH-1 细胞的体外抑制作用, 该研究以连续相变萃取技术、超临界流体萃取技术和螺旋压榨法制备的南瓜籽油为样品, 测定细胞存活率、划痕愈合率、活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和一氧化氮 (NO) 含量, 以及分析 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路表达水平。结果显示, 三种提取方法制备的南瓜籽油呈剂量依赖性抑制 BPH-1 细胞存活率和划痕愈合率, 降低氧化应激指标 ROS 和 MDA 的分泌量以及炎症因子 TNF- α 和 NO 的释放量, 同时下调 PI3K、Akt、NF- κ B mRNA 的表达量。其中, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下连续相变萃取技术制备的南瓜籽油组 BPH-1 细胞中的 ROS 相对含量为 68.56%、MDA 含量为 0.48 $\text{nmol}\cdot(\text{mg prot})^{-1}$ 、TNF- α 释放量为 60.99 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、NO 释放量为 4.32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 相比于空白组分别降低了 31.44%、85.92%、78.04%、71.49%, 同时显著低于超临界流体萃取技术和螺旋压榨法制备的南瓜籽油组 ($P<0.05$)。综上, 南瓜籽油具有较好的体外抗前列腺增生活性, 其作用机制与抑制 BPH-1 细胞的增殖和迁移, 改善氧化应激和炎症水平, 以及下调 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路表达有关, 该研究结果有助于全面理解南瓜籽油抗前列腺增生活性与机制, 为开发相关功能性食品提供理论基础。

关键词: 南瓜籽油; 前列腺增生; 氧化应激; 炎症; PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路

文章编号: 1673-9078(2026)01-24-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.1.1559

Ameliorative Effects of Pumpkin Seed Oil on Oxidative Stress and Inflammatory Levels in BPH-1 Cells through the PI3K/Akt/NF- κ B Signaling Pathway

HUANG Mengli, ZHOU Aimei*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Pumpkin seed oil prepared using continuous phase transition extraction, supercritical fluid extraction, and screw pressing was used to explore the *in vivo* inhibitory effect of pumpkin seed oil prepared using various extraction methods on BPH-1 cells. The cell survival rate, scratch healing rate, reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and nitric oxide (NO) content were measured, and the expression level of the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway was analyzed. The results showed that the pumpkin seed oil prepared using the three extraction methods inhibited the survival rate and scratch healing rate of BPH-1 cells in a dose-dependent manner. Additionally, they reduced the secretion of oxidative stress indicators ROS and MDA, and the release of inflammatory factors TNF- α and NO, and down-regulated the expression of PI3K, Akt, and NF-

引文格式:

黄梦丽,周爱梅.南瓜籽油通过PI3K/Akt/NF- κ B信号通路对BPH-1细胞氧化应激和炎症水平的改善作用[J].现代食品科技,2026,42(1):24-32.

HUANG Mengli, ZHOU Aimei. Ameliorative effects of pumpkin seed oil on oxidative stress and inflammatory levels in BPH-1 cells through the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(1): 24-32.

收稿日期: 2024-10-18; 修回日期: 2025-04-17; 接受日期: 2025-04-21

基金项目: 广州市科技计划项目 (202206010129)

作者简介: 黄梦丽 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: 2098615509@qq.com

通讯作者: 周爱梅 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学与营养及水产品与农产品精深加工, E-mail: zhouam@scau.edu.cn

κ B mRNA. Among them, the relative content of ROS in BPH-1 cells of the pumpkin seed oil group prepared using continuous phase transition extraction at $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mass concentration was 68.56%, the MDA content was $0.48 \text{ nmol}\cdot(\text{mg prot})^{-1}$, the release of TNF- α was $60.99 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the release of NO was $4.32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. These values were 31.44%, 85.92%, 78.04%, and 71.49% lower than those in the control group, respectively, and were significantly lower than the pumpkin seed oil groups prepared using supercritical fluid extraction and screw pressing ($P<0.05$). In summary, pumpkin seed oil has good anti-prostatic hyperplasia activity *in vitro*. The mechanism of this effect is associated with the inhibition of BPH-1 cell proliferation and migration, the ameliorative effect on oxidative stress and inflammatory levels, and the downregulation of the expression of the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. The results contribute to a comprehensive understanding of the anti-prostatic hyperplasia activity of pumpkin seed oil and its mechanism, providing a theoretical basis for the development of related functional foods.

Key words: pumpkin seed oil; prostatic hyperplasia; oxidative stress; inflammation; PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway

前列腺增生 (Benign Prostatic Hyperplasia, BPH) 是一种进展性泌尿系统疾病, 主要是由前列腺上皮细胞和基质细胞非恶性过度生长和增殖导致的膀胱出口梗阻和尿道受压^[1], 中老年男性发病率较高, 严重影响了患者的身体健康及生活质量。前列腺疾病的预防和治疗已列入我国重大疾病研究的行列, 临床主要以手术治疗和药物治疗为主^[2], 但手术给病人造成的痛苦较大, 药物又具有多种副作用和不良反应, 因此寻求更加安全有效的天然活性物质是前列腺疾病治疗的重要发展趋势。

BPH-1 细胞是从前列腺增生患者经手术切除的组织中分离出的一种前列腺增生上皮细胞系, 于 1995 年由 S.W.Hayward 等首次分离鉴定得到^[3], 被广泛应用于研究多种化合物对前列腺增生的促进或抑制作用。磷脂酰肌醇 3-激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (Protein Kinase B, PKB 也称 Akt) 信号通路是通过一系列下游底物的丝氨酸或苏氨酸磷酸化介导的细胞内信号转导途径, 激活后能够抑制细胞凋亡、促进细胞增殖^[4]。核因子- κ B (Nuclear Factor Kappa-B, NF- κ B) 可以调控多种基因的表达, 在正常的前列腺组织中存在少量活性 NF- κ B, 但增生组织会出现 NF- κ B 的过度活化现象^[5], 二者在前列腺增生的发生和发展中具有重要作用。研究表明前列腺增生的发病机制与氧化应激和炎症反应有关, 机体的氧化还原状态失衡和慢性炎症反应会导致前列腺组织损伤和促炎因子的释放, 最终造成前列腺增生疾病^[6]。

我国具有丰富的南瓜籽资源, 但目前南瓜籽的加工仍以炒货等初加工产品为主, 精深加工水平和产品附加值低、没有充分体现南瓜籽的营养价值和市场价值。研究发现南瓜籽中的油脂含量大约占干质量的 35%~64%^[7], 南瓜籽油除了富含不饱和脂肪酸外, 还含有维生素、矿物质、植物甾醇、角鲨烯、多酚和类胡萝卜素等营养物质^[8], 具有抗炎^[9]、改善心血管疾病^[10]、缓解肝损伤^[11]、恢复运动员糖代谢^[12]等功能作

用, 但目前鲜见南瓜籽油抗前列腺增生活性的研究, 其作用机制尚不明确。此外, 市面上销售的南瓜籽油大多是由超临界流体萃取技术 (Supercritical Fluid Extraction, SFE) 和螺旋压榨法 (Screw Pressing, SP) 制备^[13], 提取工艺对南瓜籽油活性成分的含量及组成影响较大, 然而针对不同提取方法制备的南瓜籽油体外抗前列腺增生活性差异的研究还未见报道。本课题组前期研究发现^[14], 采用连续相变萃取技术 (Continuous Phase Transition Extraction, CPE) 制备的南瓜籽油总酚、类胡萝卜素、甾醇、锌、不饱和脂肪酸等活性成分含量显著高于 SFE 和 SP 南瓜籽油 ($P<0.05$), 表明 CPE 有助于南瓜籽油活性成分的溶出, 提高油脂品质。因此, 通过进一步对比分析不同提取方法制备的南瓜籽油活性差异, 有望为改善前列腺增生疾病提供新策略。

本研究采用人前列腺增生细胞 BPH-1 为研究模型, 探究连续相变萃取技术、超临界流体萃取技术和螺旋压榨法制备的南瓜籽油对 BPH-1 细胞的体外抑制作用, 通过测定细胞存活率、划痕愈合率、活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 和一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 的变化, 以及 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路表达分析, 为全面认识南瓜籽油抗前列腺增生活性及其作用机制提供数据及理论支撑, 有利于南瓜籽油精深加工及其在健康食品领域中的开发和应用。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

BPH-1 细胞由上海沪震生物科技有限公司提供; 南瓜籽, 品种为裸仁一号, 产自新疆乌鲁木齐市, 南瓜籽油的三种制备工艺参考文献^[14]; DMEM 高糖培养基、青-链霉素、质量分数 0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清、

二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffered Saline, PBS), Gibco 公司; 非那雄胺, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 细胞裂解液、NO 试剂盒, 上海碧云天生物科技有限公司; 二喹啉甲酸 (Bicinchoninic Acid, BCA) 蛋白质定量试剂盒、MDA 试剂盒、ROS 试剂盒, 南京建成生物有限公司; 肿瘤坏死因子- α 试剂盒, 上海源叶生物科技有限公司; PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR 试剂盒, 南京诺维赞生物科技股份有限公司。

AL104 型万分之一电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; EnSpire2003 型多功能酶标仪, 美国 Perkin-Elmer 公司; CCL-1708-8 型恒温 CO₂ 培养箱, 新加坡 ESCO 公司; BSD200 型倒置生物显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司; MH-2 型微量振荡器, 海门市其林贝尔仪器公司; SMA4000 型微量紫外分光光度计, 美林恒通仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组

取适量胎牛血清与 DMEM 高糖培养基混匀, 然后加入适量青-链霉素混合液, 配制成细胞培养液 (含体积分数 10% 胎牛血清, 体积分数 1% 青-链霉素)。BPH-1 细胞培养在含 10 mL 细胞培养液的细胞培养皿 (直径 5 cm) 中, 并置于细胞培养箱中 (37 °C、体积分数 5% CO₂), 定期更换培养液, 待细胞融合度至 80% 以上进行传代, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

实验分组: 空白对照组: BPH-1 细胞培养在细胞培养液中作为空白对照组。阳性对照组: 取适量非那雄胺溶解在细胞培养液中, 配制成质量浓度为 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的非那雄胺细胞培养液作为阳性对照组。南瓜籽油组: 分别取连续相变萃取技术、超临界流体萃取技术和螺旋压榨法制备的南瓜籽油, 以质量分数 0.5% DMSO 为助溶剂, 溶解于细胞培养液中, 配制成质量浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液, 之后取适量母液, 加到细胞培养液中制成不同质量浓度的南瓜籽油细胞培养液, 依次分为连续相变萃取技术制备的南瓜籽油组 (CPE)、超临界流体萃取技术制备的南瓜籽油组 (SFE) 和螺旋压榨法制备的南瓜籽油组 (SP)。

1.2.2 南瓜籽油对BPH-1细胞存活率的影响

采用 MTT 法测定细胞存活率。BPH-1 细胞以每毫升 5×10^4 个的密度接种于 96 孔板中, 每孔 200 μL , 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。

将其分为南瓜籽油组 (接种细胞, 加入不同浓度的南瓜籽油细胞培养液), 阳性组 (接种细胞, 加入非那雄胺细胞培养液), 空白组 (不接种细胞) 和对照组 (接种细胞) 加等量的细胞培养液, 每孔 200 μL , 每组设置 6 个平行, 于细胞培养箱中培养 24 h 后去除培养液, 每孔加入 MTT 溶液 (质量浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 100 μL , 避光孵育培养 4 h 后, 吸去孔内培养液, 每孔加入 150 μL 的 DMSO 溶液, 震荡 5~10 min, 使结晶物充分溶解, 在 490 nm 波长的酶标仪上测定各孔的吸光值, 细胞存活率按式 (1) 计算:

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

式中:

R——细胞存活率, %;

A₁——实验组吸光值;

A₂——对照组吸光值;

A₀——空白组吸光值。

1.2.3 南瓜籽油对BPH-1细胞划痕愈合率的影响

采用划痕损伤实验分析细胞的迁移能力。取 24 孔板, 用马克笔在背面画三条直线, 将每个孔划分为 4 个视野, BPH-1 细胞以每毫升 2×10^5 个的密度接种于 24 孔板中, 每孔 1 mL, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。待细胞间较紧密地连接成单层后, 用 200 μL 枪头垂直在 24 孔的中央划一道痕迹, 吸出原培养液, 再每孔加 1 mL PBS 洗两次以除净未贴壁细胞。各加入 1 mL 相应南瓜籽油细胞培养液、非那雄胺细胞培养液、空白组仅加入 1 mL 细胞培养液。每组设置 3 个平行, 分别测量 0 h 和 24 h 的划痕创面愈合情况, 使用专业图像软件 Image J 测量创面面积, 划痕愈合率按式 (2) 计算:

$$R = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R——划痕愈合率, %;

W₀——0 h 的划痕面积;

W_t——24 h 的划痕面积。

1.2.4 TNF- α 、NO、MDA分泌量的测定

BPH-1 细胞以每毫升 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后弃去培养液。根据 1.2.2 的细胞存活率实验结果计算南瓜籽油对 BPH-1 细胞增殖的半数抑制浓度 (Half Maximal Inhibitory Concentration, IC₅₀), 选取质量浓度为 25、50、75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的南瓜籽油培养液处理细胞, 并设空白对照组与非那雄胺阳

性对照组, 每组设置 3 个平行, 置于细胞培养箱内继续培养 24 h 后, 根据试剂盒说明书分别测定 TNF- α 、NO、MDA 的含量。

1.2.5 ROS相对含量的测定

采用 DCFH-DA 法测定细胞内 ROS 水平。BPH-1 细胞以每毫升 2×10^5 个的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h 后弃去培养液。用质量浓度为 25、50、75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的南瓜籽油培养液处理细胞, 并设空白对照组与非那雄胺阳性对照组, 各组用药干预 24 h 后, 弃去培养液, 加入 100 μL PBS 润洗三遍, 每孔加入含有摩尔浓度 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFH-DA 的细胞培养液, 于培养箱中反应 30 min 后, 去除含有 DCFH-DA 的细胞培养液。然后加入 100 μL PBS 润洗三遍, 洗去未结合的 DCFH-DA, 每孔加入 100 μL PBS 重悬细胞, 采用多功能荧光酶标仪于激发波长 485 nm 和发射波长 530 nm 条件下测定荧光强度, 反映细胞产生活性氧 ROS 的相对含量。

1.2.6 PI3K/Akt/NF- κ B通路相关基因mRNA表达水平的测定

BPH-1 细胞以每毫升 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h 后弃去培养液。用质量浓度为 25、50、75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的南瓜籽油培养液处理细胞, 并设空白对照组与非那雄胺阳性对照组, 各组用药干预 24 h 后, 采用 RNA 提取试剂盒提取细胞组织总 RNA, 并计算 RNA 浓度和纯度, 使用逆转录试剂盒对符合要求的 RNA 进行逆转录, 得到 cDNA。然后使用 PCR 试剂盒进行 RT-qPCR 检测, 以 β -actin 作为内参基因, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR引物序列表		
Table 1 RT-qPCR primer sequence table		
基因		序列 (5'-3')
PI3K	forward	CTGGTAGACGATGACGAGGATT
	reverse	CACTACAGAGCAGGCATAGCA
Akt	forward	GCTTCTACGGTGCGGAGATTGTGT
	reverse	GTCCGTTATCTTGATGTGCCCGTC
NF- κ B	forward	CAGTGTATCGGTGGTCAGTGT
	reverse	GGATGATGTTGGCAGCAATGG
β -actin	forward	GCAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	reverse	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG

1.3 统计学分析

采用 SPSS Statistics 24.0 软件进行数据处理, 采

用 Duncan 检验进行显著性分析, 图片采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘制, 以 $P<0.05$ 表示差异显著, 以 $P>0.05$ 表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 南瓜籽油对BPH-1细胞存活率的影响

采用 MTT 法测定 CPE、SFE、SP 南瓜籽油在不同浓度情况下对 BPH-1 细胞存活率的影响。结果显示, 南瓜籽油对 BPH-1 细胞存活率具有抑制作用, 且呈现剂量依赖性。当南瓜籽油质量浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, CPE、SFE、SP 南瓜籽油对 BPH-1 细胞的抑制作用差异不显著 ($P>0.05$), 但超过 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后 CPE 南瓜籽油优势明显, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 CPE 南瓜籽油细胞存活率为 49.61%, 相比于空白组降低了 50.39%, 相比于 SFE 和 SP 南瓜籽油组分别降低了 16.65% 和 27.93%, 对 BPH-1 细胞的抑制作用显著大于 SFE 和 SP 南瓜籽油 ($P<0.05$)。多种活性成分在预防和治疗前列腺增生疾病中具有重要意义, Choi 等^[15]研究发现花青素可以抑制前列腺细胞的增殖, Wang 等^[16]研究发现番茄红素能够抑制 BPH-1 细胞的增殖, Macoska^[17]研究发现 β -谷甾醇可以促进前列腺上皮细胞的凋亡。锌在人体内直接参与核酸与蛋白质合成、细胞的分化增殖和许多重要的代谢途径, 充足的锌有助于合成男性荷尔蒙, 维持前列腺的正常功能^[18]。前期研究发现 CPE 南瓜籽油中总酚含量高达 1 333.80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、类胡萝卜素含量为 8.41 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、甾醇含量为 2.59 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、锌含量为 9.61 $\text{mg}/100\text{ g}$, 有效提高了油脂品质^[14], 提示高活性南瓜籽油有助于降低 BPH-1 细胞存活率, 减轻细胞过度增殖造成的增生症状。

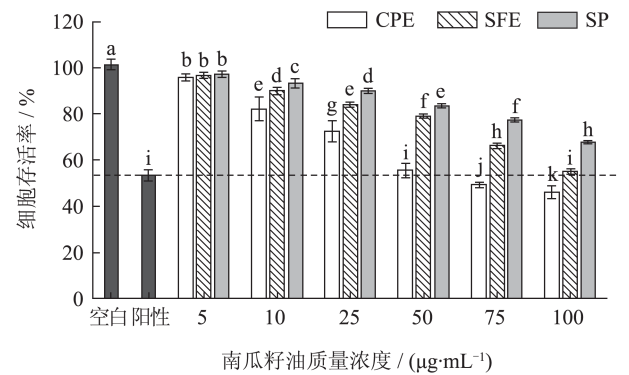


图 1 南瓜籽油对 BPH-1 细胞存活率的影响
Fig.1 Effects of pumpkin seed oil on the survival rate of BPH-1 cells

注: 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。图 3~6 同。

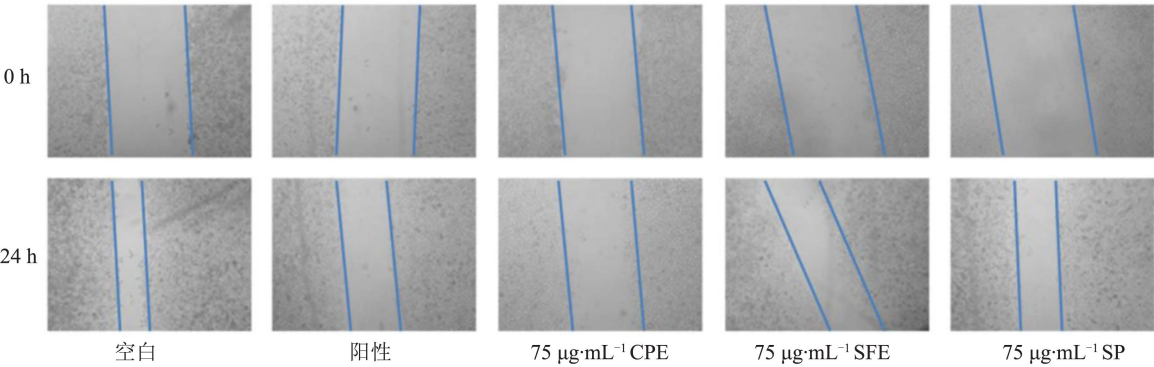


图 2 划痕修复效果对比图（倒置显微镜，×100）

Fig.2 Scratch repair effect comparison diagram (inverted microscope, ×100)

注：蓝色条带内为划痕损伤区域；空白组用培养基处理，阳性组用非那雄胺处理。

2.2 南瓜籽油对BPH-1细胞划痕愈合率的影响

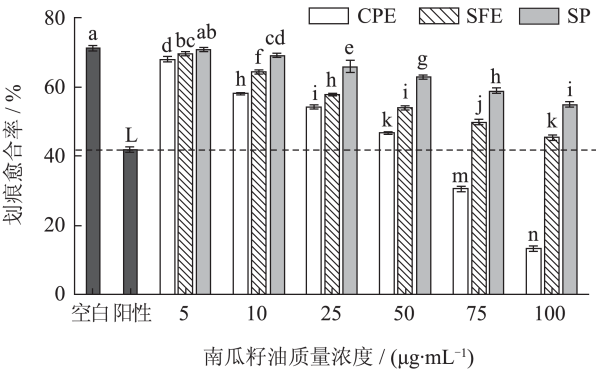


图 3 南瓜籽油对 BPH-1 细胞划痕修复效果对比

Fig.3 Comparison of the scratch repair effect of pumpkin seed oil in BPH-1 cells

人类前列腺的组织学组成包括上皮细胞和纤维肌间质，在解剖学上可以将前列腺分为三个腺区：外周区、中央区和移行区，其中移行区细胞的过度分化和增殖会诱导上皮细胞血管生成及炎症反应^[19]，因此抑制 BPH-1 细胞的迁移是改善前列腺增生疾病的关键。通过建立划痕损伤模型，测定 CPE、SFE、SP 南瓜籽油在不同质量浓度情况下对 BPH-1 细胞迁移的影响，研究结果如图 2、3 所示，南瓜籽油能够抑制 BPH-1 细胞向损伤区域迁移、生长，且随着浓度的升高作用效果越显著 ($P<0.05$)。在 BPH-1 细胞受损 24 h 后，CPE 南瓜籽油所有作用浓度的细胞划痕愈合率均有所下降，其中 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度时划痕愈合率仅为 13.38%，相比于空白组降低了 57.93%，相比于 SFE 和 SP 南瓜籽油组分别降低了 32.17% 和 41.70%，差异显著 ($P<0.05$)。在 $5\sim100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质量浓度范围内，CPE 南瓜籽油能够显著降低 BPH-1 细胞的划痕愈合率，而 SFE 和 SP 南瓜籽油虽然也有效果，但抑制作用显著低于 CPE 南瓜籽油 ($P<0.05$)。郑靓怡等^[20]研

究发现升降通癃方处理后能够降低细胞划痕区域的覆盖面积，明显减弱 BPH-1 细胞的运动迁移能力。Consoli 等^[21]将不同质量浓度的石榴提取物作用于 BPH-1 细胞后发现能够显著抑制划痕愈合率，且以剂量依赖性方式观察到细胞迁移的减少。综上所述，南瓜籽油可以通过抑制划痕损伤的 BPH-1 细胞生长、迁移，进而抑制其增生进程，其中 CPE 南瓜籽油效果最佳。

2.3 南瓜籽油对BPH-1细胞ROS、MDA水平的影响

前列腺增生是系统老化的局部表现之一，ROS 含量升高在老化中起着重要作用。机体过量产生的 ROS 会降低内源性抗氧化酶的活性，破坏细胞膜结构，造成机体氧化还原状态失衡，进而刺激前列腺细胞过度增殖，降低 ROS 可能是前列腺增生治疗的新方向^[22]。本研究测定了不同提取方法制备的南瓜籽油作用后 BPH-1 细胞中 ROS 的相对含量，结果如图 4a 所示，相比于空白组， 25 、 50 、 $75\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三个质量浓度下 CPE 南瓜籽油均显著抑制了 ROS 的分泌量 ($P<0.05$)，且呈现一定的剂量依赖性。其中 $75\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的 CPE 南瓜籽油组 ROS 相对含量为 68.56%，与阳性药物非那雄胺组无显著性差异 ($P>0.05$)，相比于空白组降低了 31.44%。在此浓度下，SFE 组和 SP 组细胞 ROS 的相对含量分别为 75.88% 和 88.35%，CPE 组相比于二者分别降低了 7.32% 和 19.79%，差异显著 ($P<0.05$)。Choi 等^[23]研究发现前列腺增生大鼠体内的抗氧化酶活性显著降低，超氧自由基含量显著升高，提示氧化应激会诱导前列腺增生。以上结果说明南瓜籽油可以改善细胞 ROS 过量产生的状况，并可能进一步阻碍炎症反应的发展，其中 $75\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CPE 南瓜籽油效果最佳。

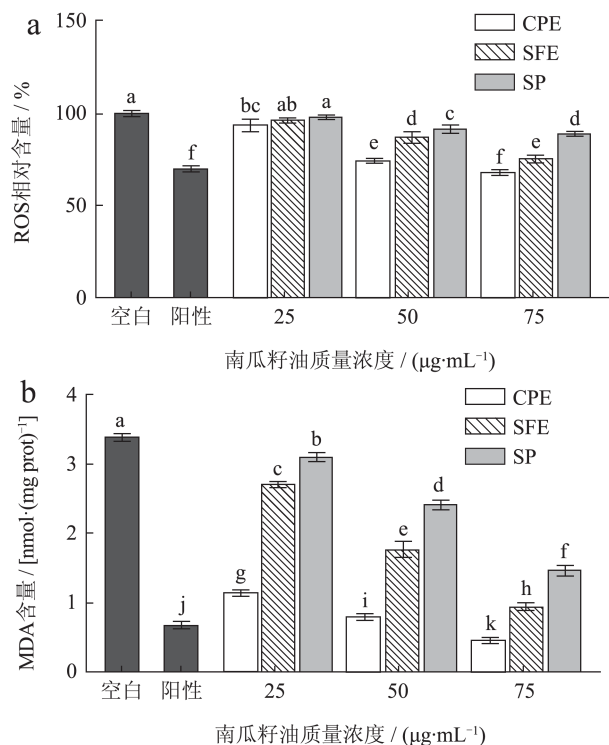


图4 南瓜籽油对 BPH-1 细胞 ROS、MDA 水平的影响

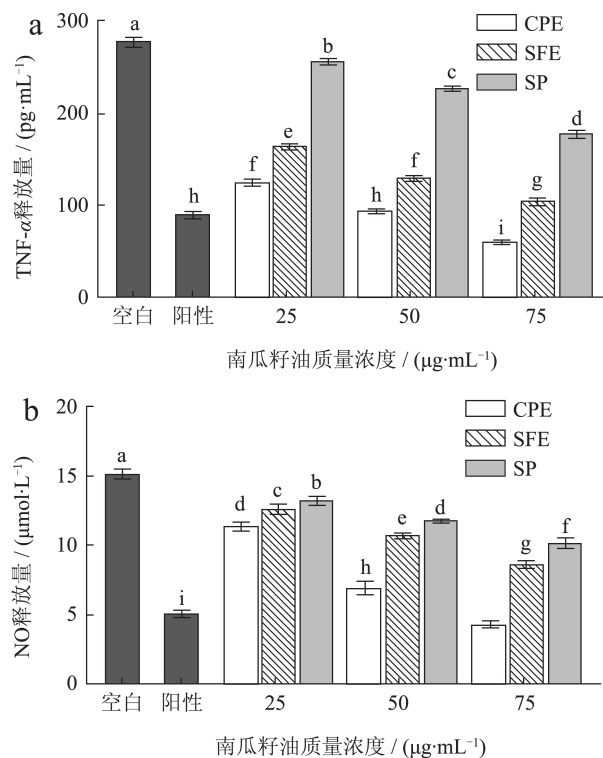
Fig.4 Effects of pumpkin seed oil on ROS and MDA levels in BPH-1 cells

MDA 是脂质过氧化反应产生的代谢物, 具有细胞毒性, 其含量高低与机体产生的氧化应激强度和细胞损伤有关^[24]。王琳琳等^[25]调查发现 BPH 患者体内 MDA 含量显著升高, 表明 MDA 水平升高造成的氧化应激紊乱是前列腺增生发生的独立危险因素。本研究测定了不同提取方法制备的南瓜籽油作用于 BPH-1 细胞后 MDA 的分泌量, 结果如图 4b 所示, 三种提取方法制备的南瓜籽油干预后细胞中 MDA 含量均显著下降 ($P < 0.05$), 且随着南瓜籽油浓度的升高抑制效果逐渐增强。其中, 空白组细胞中 MDA 含量为 $3.41 \text{ nmol} \cdot (\text{mg prot})^{-1}$, $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度时 CPE 南瓜籽油组 MDA 含量为 $0.48 \text{ nmol} \cdot (\text{mg prot})^{-1}$, 显著低于阳性药物非那雄胺组, 相比于空白组降低了 85.92%、相比于 SFE 和 SP 南瓜籽油分别降低了 50.00% 和 67.79%, 作用效果更佳。唐益文等^[26]研究发现前列腺炎大鼠模型血清中 ROS、MDA 水平显著高于空白组, 间接证实了氧化应激状态对前列腺组织损伤明显。以上结果表明南瓜籽油抗前列腺增生活性可能与修复前列腺组织氧化应激损伤, 清除过氧化物等病理产物, 从而缓解前列腺增生症状有关。

2.4 南瓜籽油对 BPH-1 细胞 TNF- α 、NO 水平的影响

机体发生炎症反应时, TNF- α 是出现最早的起关

键作用的炎症因子, 在前列腺组织炎症反应中发挥重要作用, 能够诱导基质细胞分泌炎症因子, 造成前列腺组织损伤^[27]。熊永高等^[28]研究发现手术能明显降低 BPH 患者血清中的 TNF- α 水平, 提示 TNF- α 参与前列腺增生发生和发展的可能。本研究测定了不同提取方法制备的南瓜籽油作用于 BPH-1 细胞后 TNF- α 的释放量, 结果如图 5a 所示, 不同提取方法制备的南瓜籽油均显著抑制了 TNF- α 的释放量 ($P < 0.05$), 且呈现一定的剂量依赖性。其中, 空白组 BPH-1 细胞中 TNF- α 含量为 $277.77 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度下 CPE 南瓜籽油组 TNF- α 的释放量仅为 $60.99 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、SFE 组为 $105.04 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、SP 组为 $177.78 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, CPE 南瓜籽油的抑制效果相较于 SFE 和 SP 南瓜籽油组分别降低了 41.94% 和 65.69%, 相较于空白组和阳性药物非那雄胺组分别降低了 78.04% 和 32.97%。宋冠慧等^[29]研究发现克癯胶囊能显著降低 BPH 大鼠前列腺组织中 TNF- α 的表达水平, 达到抑制炎症的作用。以上结果说明南瓜籽油可以降低促炎细胞因子水平, 减少炎症因子的分泌, 缓解前列腺组织损伤程度, 从而改善 BPH。

图5 南瓜籽油对 BPH-1 细胞 TNF- α 、NO 水平的影响Fig.5 Effects of pumpkin seed oil on TNF- α and NO levels in BPH-1 cells

NO 在人体正常生理状态下稳定且含量较少, 但在炎症部位高浓度状态的 NO 参与多种炎症信号传导, 能够促进炎症反应和组织损伤^[30], 用于治疗 BPH

的早期研究药物中就包含通过干扰 NO 信号通路发挥作用的药物^[31]。本研究测定了不同提取方法制备的南瓜籽油作用于 BPH-1 细胞后 NO 的释放量,结果如图 5b 所示,经过不同质量浓度的南瓜籽油作用后,细胞内 NO 含量明显下降 ($P < 0.05$),且随着南瓜籽油浓度的升高抑制效果逐渐增强。其中空白组细胞 NO 的释放量为 $15.15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,阳性药物非那雄胺组为 $5.15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下 CPE 南瓜籽油组的 NO 释放量为 $4.32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,相比于空白组降低了 71.49%,作用效果显著优于阳性药物非那雄胺组 ($P < 0.05$),且相比于 SFE 和 SP 南瓜籽油组分别降低了 50.23% 和 57.31%,差异较为显著 ($P < 0.05$)。颜丽珊等^[32]研究发现总酚酸能够降低细胞中的 NO 含量,抑制炎症因子的过度释放,进而改善炎症反应。以上结果说明南瓜籽油可以较好地调节细胞内 NO 的水平,降低炎症反应,从而减轻前列腺组织的损伤程度。

2.5 南瓜籽油对 BPH-1 细胞 PI3K、Akt、NF- κ B mRNA 表达的影响

PI3K/Akt 信号通路是通过一系列下游底物的丝氨酸或苏氨酸磷酸化介导的细胞内信号转导途径,在细胞的生长、增殖、凋亡、血管生成等过程中发挥着重要作用^[33]。NF- κ B 是一种蛋白质复合物,可以通过调控多种基因的表达^[34],参与机体免疫、炎症反应、细胞分化及凋亡等多种生物进程。PI3K/Akt 是 NF- κ B 信号通路的上游,PI3K/Akt 信号通路激活可导致 NF- κ B 的活化,二者在前列腺增生的发生和发展中扮演着关键角色。本研究测定了不同提取方法制备的南瓜籽油作用于 BPH-1 细胞后 PI3K、Akt、NF- κ B mRNA 表达情况,结果如图 6 所示,与空白组相比,三种提取方法制备的南瓜籽油在 $25\sim 75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质量浓度范围内均能显著抑制 PI3K、Akt、NF- κ B 基因的表达水平,且呈现剂量依赖性。其中 $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度时 CPE 南瓜籽油的作用效果最佳,其抑制效果显著优于 SFE 和 SP 南瓜籽油组以及阳性药物非那雄胺组 ($P < 0.05$)。邝浩等^[35]研究发现灵泽片能负向调控 PI3K/Akt 信号通路,降低 PI3K、Akt 和 Bcl-2 蛋白表达量,升高 Bax 蛋白表达量,抑制细胞增殖和促进细胞凋亡,从而治疗前列腺增生疾病。Wang 等^[36]研究发现姜黄油能够通过抑制 NF- κ B 通路的激活,抑制促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的分泌,从而降低 BPH-1 细胞的增殖。有研究表明控制 PI3K/Akt 信号通路的磷酸化水平能够下调 NF- κ B 相关蛋白的活性,进一步抑制前列腺细胞的增殖和迁移^[37]。以上结果提示南瓜

籽油可以通过下调 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路,抑制 BPH-1 细胞过度增殖,降低炎症因子的分泌,进而改善前列腺增生问题。

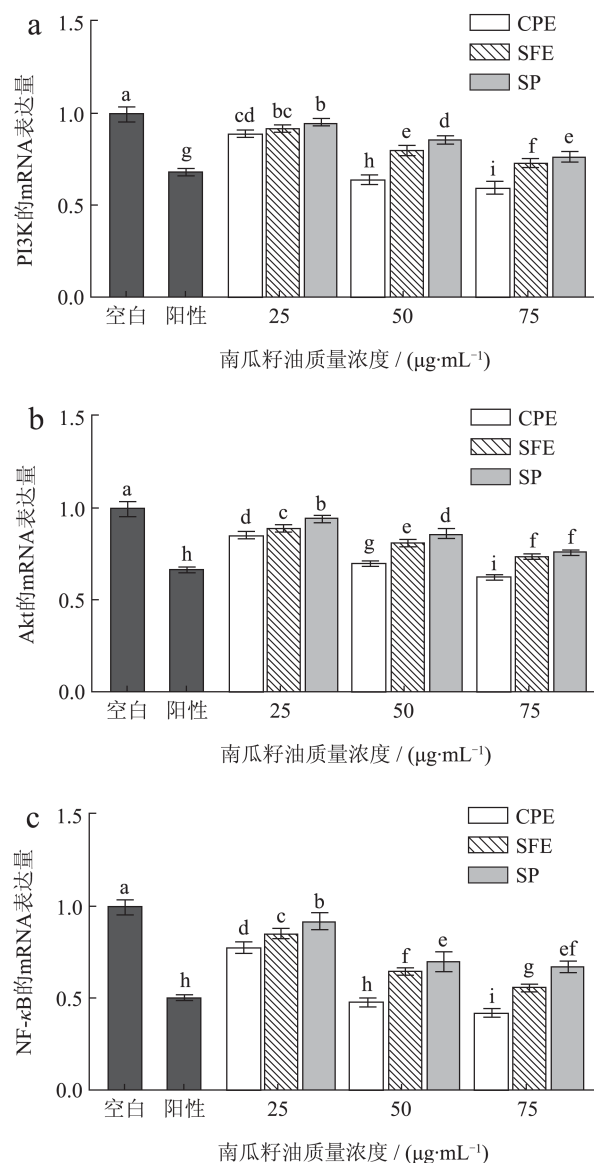


图 6 南瓜籽油对 BPH-1 细胞 PI3K、Akt、NF- κ B mRNA 表达的影响

Fig.6 Effects of pumpkin seed oil on the expression of PI3K, Akt and NF- κ B mRNA in BPH-1 cells

3 结论

本研究采用 BPH-1 细胞为评价模型,以连续相变萃取技术、超临界流体萃取技术和螺旋压榨法制备的南瓜籽油为样品,探究不同提取方法制备的南瓜籽油对细胞存活率、划痕愈合率的影响,进一步通过细胞 ROS、MDA、TNF- α 和 NO 含量以及 PI3K/Akt/NF- κ B 通路分析其体外抗前列腺增生活性。结果显

示, 三种提取方法制备的南瓜籽油均具有较好的体外抗前列腺增生活性, 不同剂量南瓜籽油处理后能够抑制 BPH-1 细胞的增殖和迁移能力, 且呈现剂量依赖性。在 $25\sim 75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内可以降低 ROS 和 MDA 的分泌量, 起到改善氧化应激的效果, 同时降低 TNF- α 和 NO 的释放量, 减轻炎症反应水平。此外, 南瓜籽油干预后可以下调 BPH-1 细胞中 PI3K、Akt、NF- κ B mRNA 的表达量, 显著抑制了 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路的激活, 从而发挥其抗前列腺增生活性。前期研究发现 CPE 南瓜籽油总酚、类胡萝卜素、甾醇、锌、不饱和脂肪酸含量显著高于 SFE 和 SP 南瓜籽油 ($P<0.05$), 结合该研究中 CPE 南瓜籽油对 BPH-1 细胞的作用效果显著优于 SFE 和 SP 南瓜籽油 ($P<0.05$), 可以推断南瓜籽油中的活性成分与其抗前列腺增生活性具有密切联系, 其作用机制可能与调控 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路的表达, 抑制 BPH-1 细胞的增殖和迁移能力, 降低氧化应激和炎症因子的合成有关。该实验研究结果可以为南瓜籽油的体外抗前列腺增生活性提供科学依据, 利用南瓜籽油开发多元化功能性产品有望在前列腺增生疾病的临床治疗中提供应用潜力。BPH 细胞模型可以用于体外活性筛选, 适合病因学机制研究, 然而代表体内前列腺增生的复杂病理过程尚存在一定的局限性, 在今后的研究中可以进行多靶点、多途径的功能性验证, 为南瓜籽油在食品及其他领域的开发利用提供更多的数据支持。

参考文献

- [1] LAUFER M, SHOENFELD S. Phytotherapy and natural agents in symptomatic benign prostatic hyperplasia (BPH) [J]. Harefuah, 2024, 163(1): 50-53.
- [2] WANG J, WU S K, WANG M S. Role of thulium laser and holmium laser in the surgical treatment of benign prostatic hyperplasia: a systemic review and meta-analysis [J]. Iranian Journal of Public Health, 2024, 53(3): 495-507.
- [3] HAYWARD S W, DAHIYA R, CUNHA G R, et al. Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1[J]. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 1995, 31(1): 14-24.
- [4] QIN W M, CAO L H, MASSEY I Y. Role of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac fibrosis [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2021, 476(11): 4045-4059.
- [5] NGUYEN D P, LI J Y, YADAV S S, et al. Recent insights into NF- κ B signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer [J]. Bju International, 2014, 114(2): 168-176.
- [6] 刘丹,白雪,刘桂敏,等.前列腺增生症发病机制的研究进展[J].实用临床医药杂志,2021,25(5):112-117.
- [7] 魏冰.南瓜籽油的开发和利用研究[J].粮油加工,2008,5:60-62.
- [8] HU Z C, HU C F, LI Y P, et al. Pumpkin seed oil: a comprehensive review of extraction methods, nutritional constituents, and health benefits [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2024, 104(2): 572-582.
- [9] DONG X J, CHEN J Y, CHEN S F, et al. The composition and anti-inflammatory properties of pumpkin seeds [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021, 15(2): 1834-1842.
- [10] AEKTHAMMARAT D, TANGSUCHARIT P, PANNANGPETCH P, et al. Moringa oleifera leaf extract enhances endothelial nitric oxide production leading to relaxation of resistance artery and lowering of arterial blood pressure [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 130: 110605.
- [11] RADIC I, MIRIC M, MIJOVIC M, et al. Protective effects of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed oil on rat liver damage induced by chronic alcohol consumption [J]. Archives of Biological Sciences, 2021, 73(1): 123-133.
- [12] 乔永月.南瓜籽油对运动员运动耐力及糖代谢能力的影响[J].中国油脂,2020,45(6):102-105.
- [13] HU T Y, ZHOU L, KONG F, et al. Effects of extraction strategies on yield, physicochemical and antioxidant properties of pumpkin seed oil [J]. Foods, 2023, 12(18): 3351.
- [14] 黄梦丽,彭成海,蔡舒,等.连续相变萃取南瓜籽油的工艺优化及其成分分析[J].食品工业科技,2024,45(17):163-173.
- [15] CHOI Y J, FAN M Q, TANG Y J, et al. *In vivo* effects of polymerized anthocyanin from grape skin on benign prostatic hyperplasia [J]. Nutrients, 2019, 11(10): 2444.
- [16] WANG S S, HE W J, LI W Z, et al. Combination of lycopene and curcumin synergistically alleviates testosterone-propionate-induced benign prostatic hyperplasia in sprague dawley rats via modulating inflammation and proliferation [J]. Molecules, 2023, 28(13): 4900.
- [17] MACOSKA J A. The use of beta-sitosterol for the treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia [J]. American Journal of Clinical and Experimental Urology, 2023, 11(6): 467-480.
- [18] RADHI G, HILAL N, ABDUL-AZIZ M. Testosterone and serum zinc levels in men with benign prostatic hyperplasia [J]. Georgian Medical News, 2023, 340-341: 81-86.
- [19] YAN Q X, WANG M, XIA H R, et al. Single-cell RNA-sequencing technology demonstrates the heterogeneity between aged prostate peripheral and transitional zone [J]. Clinical and Translational Medicine, 2022, 12(10): e1084.
- [20] 郑靓怡,胡黄金,杨妮,等.基于PI3K/AKT通路研究升降通癥方对前列腺增生细胞的影响[J].陕西中医,2023,44(5):566-570.
- [21] CONSOLI V, BURÒ I, GULISANO M, et al. Evaluation of the antioxidant and antiangiogenic activity of a pomegranate extract in BPH-1 prostate epithelial cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(13): 10719.
- [22] LEE M J, CHO Y N, HWANG Y, et al. Kaempferol alleviates mitochondrial damage by reducing mitochondrial reactive oxygen species production in lipopolysaccharide-induced prostate organoids [J]. Foods, 2023, 12(20): 3836.
- [23] CHOI Y, WEDAMULLA N E, KIM S, et al. Salvia miltiorrhiza bunge ameliorates benign prostatic hyperplasia through regulation of oxidative stress via Nrf-2/HO-1 Activation[J]. Journal of

- Microbiology and Biotechnology, 2023, 34(5): 1-14.
- [24] WEI Y, WANG J, HAN D, et al. Protective effect and mechanism of Maiwei Yangfei decoction on pulmonary fibrosis mice based on Nrf2 regulation of oxidative stress[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(24): 6682-6692.
- [25] 王琳琳,许丽丽,范君,等.氧化应激标志物与前列腺增生和前列腺癌的相关性[J].检验医学,2022,37(12):1135-1140.
- [26] 唐益文,王雄,周艳艳,等.益气活血托毒方对慢性非细菌性前列腺炎大鼠ROS、GSH-Px、MDA的影响[J].中医药导报,2023, 29(7):24-28.
- [27] LIEDTKE V, STÖCKLE M, JUNKER K, et al. Benign prostatic hyperplasia-A novel autoimmune disease with a potential therapy consequence [J]. Autoimmunity Reviews, 2024, 23(3): 103511.
- [28] 熊永高,彭丽红,解绪红,等.血清TNF- α 和IL-6水平与BPH伴组织学炎症的关系[J].深圳中西医结合杂志,2022,32(6):10-13.
- [29] 宋冠慧,樊丹平,李艳,等.克癭胶囊对良性前列腺增生模型大鼠的作用机制研究[J].中国中医基础医学杂志,2024,30(2):240-244.
- [30] NAH Y, SOBHA S, SARAVANAKUMAR G, et al. Nitric oxide-scavenging hyaluronic acid nanoparticles for osteoarthritis treatment [J]. Biomaterials Science, 2024, 12(6): 1477-1489.
- [31] KATSIMPERIS S, KAPRINIOTIS K, MANOLITSIS I, et al. Early investigational agents for the treatment of benign prostatic hyperplasia [J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2024, 33(4): 359-370.
- [32] 颜丽珊,邱新宇,康建英,等.天山雪莲总酚酸对脂多糖刺激的RAW264.7细胞炎症因子释放的影响及其机制研究[J].中国现代中药,2023,25(10):2109-2118.
- [33] LIU Q, LI Y, CHENG W. Research progress on the mechanism of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in multiple myeloma-reviewn [J]. Journal of Experimental Hematology, 2024, 32(1): 292-296.
- [34] GUO Q, JIN Y, CHEN X, et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9(1): 53.
- [35] 邝浩,彭爱进,王继升,等.基于PI3K/Akt通路探讨灵泽片对前列腺增生大鼠的干预机制[J].中国男科学杂志,2023,37(4):54-58.
- [36] WANG S, LI Y, LI W, et al. Curcuma oil ameliorates benign prostatic hyperplasia through suppression of the nuclear factor-kappa B signaling pathway in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 279: 113703.
- [37] HU J X, LUO H, XU Y G, et al. The prognostic significance of EIF3C gene during the tumorigenesis of prostate cancer [J]. Cancer Investigation, 2019, 37(4-5): 199-208.