

山柰酚-3-*O*-芸香糖苷对H₂O₂诱导的HepG2细胞氧化损伤的保护作用

焦文雅, 牛雪美, 柳书玉, 冯家辉, 王向红*
(河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000)

摘要: 为了探究山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 (Kaempferol-3-*O*-rutinoside, K3R) 对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用, 通过体外模型系统分析其调控机制。以 10、20、30 μmol·L⁻¹ K3R 预处理 24 h 后, 给予 400 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 诱导 4 h, 分别对各组的细胞活力、活性氧、氧化损伤情况及抗氧化能力进行检测, 采用 Annexin V-FITC/PI 和 TUNEL 染色法评估细胞凋亡, 并通过 Western blot 分析抗氧化 (HO-1、NQO1)、凋亡 (Bax、Caspase3、Bcl-2) 及 MAPK/NF-κB 通路相关蛋白表达。结果显示, K3R 保护组细胞活力显著提升至 99.93%, ROS 趋近于正常水平, 并增强抗氧化酶活性, 减少细胞凋亡。使 HO-1、NQO1 和 Bcl-2 蛋白表达上调, Bax 和 Caspase3 蛋白表达下调, 并能抑制 MAPK/NF-κB 通路中 P38、JNK、ERK1/2 及 NF-κB p65 的磷酸化水平。综上所述, K3R 通过抑制 MAPK/NF-κB 通路激活、增强抗氧化能力及调控凋亡相关蛋白, 有效减轻 H₂O₂ 诱导的细胞氧化损伤, 为在抗氧化功能食品及药物开发中的应用提供了理论依据。

关键词: 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷; 氧化应激; 细胞凋亡; 保护作用

文章编号: 1673-9078(2026)04-76-84

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.4.0100

Protective Effects of Kaempferol-3-*O*-Rutinoside against H₂O₂-induced Oxidative Stress Injury in HepG2 Cells

JIAO Wenya, NIU Xuemei, LIU Shuyu, FENG Jiahui, WANG Xianghong*

(College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: To investigate the protective effects of kaempferol-3-*O*-rutinoside (K3R) against H₂O₂-induced oxidative damage in HepG2 cells, the regulatory mechanisms of such effects were systematically analyzed using an *in vitro* model. After pre-treatment with 10, 20, and 30 μmol·L⁻¹ K3R for 24 hours, the cells were exposed to 400 μmol·L⁻¹ H₂O₂ for four hours. Cellular viability, reactive oxygen species (ROS) levels, oxidative damage status, and antioxidant capacity were assessed across experimental groups. Apoptosis was evaluated using Annexin V-FITC/PI staining and TUNEL assays. Western blotting was performed to analyze the expression of antioxidant proteins (HO-1 and NQO1), apoptosis-related proteins (Bax, Caspase3, and Bcl-2), and key components of the MAPK/NF-κB signaling pathway. The results demonstrated that cell viability was significantly increased to 99.93% in the K3R-protected groups, accompanied by reduced ROS levels approaching normal ranges, enhanced antioxidant enzyme activity, and effective suppression of apoptosis. HO-1, NQO1, and Bcl-2 expressions were upregulated, whereas Bax and Caspase3 expressions

引文格式:

焦文雅, 牛雪美, 柳书玉, 等. 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷对H₂O₂诱导的HepG2细胞氧化损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2026, 42(4): 76-84.

JIAO Wenya, NIU Xuemei, LIU Shuyu, et al. Protective effects of kaempferol-3-*O*-rutinoside against H₂O₂-induced oxidative stress injury in HepG2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(4): 76-84.

收稿日期: 2025-01-21; 修回日期: 2025-05-06; 接受日期: 2025-05-12

基金项目: 河北省三期蔬菜产业技术体系创新团队贮运保鲜与加工岗位专家 (HBCT2023100206)

作者简介: 焦文雅 (1996-), 女, 博士, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: jiaowenya0320@163.com

通讯作者: 王向红 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: wangxianghong73@sina.com

were downregulated. Furthermore, phosphorylation of P38, JNK, ERK1/2, and NF- κ B p65 in the MAPK/NF- κ B pathway was effectively inhibited. In summary, K3R alleviates H₂O₂-induced oxidative damage in HepG2 cells by suppressing MAPK/NF- κ B pathway activation, enhancing antioxidant capacity, and regulating apoptosis-related proteins. This study provides a theoretical basis for the application of K3R in the development of antioxidant functional foods and drugs.

Key words: kaempferol-3-*O*-rutinoside; oxidative stress; apoptosis; protective effect

肝脏是人体内新陈代谢和排毒的主要器官,同时肝脏又非常容易受到外界环境的影响引发肝损伤^[1]。在外部因素的作用下,出现肝脏应激、肝功能发生异常的组织病变过程即为肝损伤,长此以往会导致各种慢性肝病。尽管慢性肝病的诱因有很多,但几乎都以氧化应激增加为特征^[2]。因此降低肝脏氧化应激是延缓肝脏损伤发生与发展的重要途径。氧化应激反应是由于细胞中活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的产生和清除之间发生不平衡引起的^[3]。生理学条件下,ROS处于低水平时,被认为是细胞内信号传导的介质和氧化还原信使,与抗氧化系统保持动态平衡。在病理条件下,ROS一旦出现过量就会使细胞大分子受到氧化损伤,进而导致细胞死亡^[4]。

大量实验和临床证据表明,天然植物来源的生物活性化合物对改善慢性肝病具有很大的潜力,而这些成分多为多酚和黄酮类化合物,是良好的抗氧化剂,能够有效发挥抗氧化作用,改善肝脏氧化应激^[5,6]。K3R是一种果蔬和中药材中常见的黄酮类化合物,具备多种生理活性,在保肝护胆、抗菌消炎、降尿酸、抗糖化和神经保护等方面表现出显著功效,具有广阔的开发应用前景^[7]。且K3R是潜在的天然抗氧化剂,曾有研究对银杏叶提取物中的抗氧化成分进行鉴定,结果表明K3R是其主要抗氧化成分之一,具有较高的抗氧化活性^[8]。另一项研究表明,从中药中分离得到的K3R能够改善四氯化碳诱导的小鼠肝毒性,表明K3R对于急性氧化性肝损伤具有保护作用^[9]。

尽管K3R已有研究初步证明了K3R的护肝功效,但仍缺乏K3R深入系统性的研究,其护肝作用机理的研究尚待完善。本研究以K3R为研究对象,深入探究K3R对H₂O₂诱导的HepG2细胞的保护作用。分别从细胞活力、氧化损伤、抗氧化物酶系活力、细胞凋亡等方面评价其护肝作用并从蛋白水平揭示其作用机制。有望促进在K3R在功能食品、制药和营养食品工业中的综合和增值利用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

山柰酚-3-*O*-芸香糖苷(纯度 $\geq 98\%$, HPLC),四

川维克奇生物科技有限公司; HepG2 细胞, 武汉普诺赛生命科技有限公司; 谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; H2DCFDA, 美国 MedChemExpress 公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒, 上海贝博生物科技有限公司; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, 苏州优逸兰迪生物科技有限公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒, 上海雅酶生物医药科技有限公司; 兔抗 p38、p-P38 (phospho T180+Y182)、ERK1/2、p-ERK1/2 (phospho T202+T185)、JNK、p-JNK (phospho Y185+Y185+Y223)、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 (phospho S536)、NQO1、HO-1、Bax、Bcl-2、Caspase-3 单克隆抗体, 英国 Abcam 公司; 兔抗 GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗, 武汉三鹰生物技术有限公司; 其他试剂均为分析纯。

CB160 CO₂ 培养箱, 德国 Binder 公司; ECLIPSE Ts2 倒置显微镜, 日本 Nikon 仪器公司; 1500-823 酶标仪, 美国 Thermo Scientific 公司; Novo cyte2060 型流式细胞分析仪, 安捷伦科技有限公司; LSM900 激光共聚焦显微镜, 德国蔡司集团; JY600E 电泳仪、JY-SCZ2+ 电泳槽, 北京君意东方电泳设备有限公司; Trans-Blot[®] SD 半干转膜仪, 美国 Bio-Rad 公司; Tanon-4600SF 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞实验

HepG2 细胞在含有 10% (V/V) FBS 的 MEM 培养液中培养, 置于 37 °C、 $\phi=5\%$ CO₂ 的细胞培养箱中。待细胞贴壁生长至 80% 以上时进行传代, 生长至对数期后进行实验。

1.2.2 细胞活力测定

调整细胞密度为每毫升 5×10^4 个接种于 96 孔板内, 培养 24 h 后每孔加入 20 μ L 0.5% (m/V) 的 MTT 溶液, 孵育 4 h 后吸弃原有液体, 加入 150 μ L DMSO^[10]。室温下轻微振荡 10 min, 于 490 nm 波长处测定吸光度, 计算细胞存活率。

1.2.3 K3R对HepG2细胞氧化损伤的保护作用

按照 1.2.2 的方法接种细胞, 培养 24 h 后, 将其随机分为五组, 对照组 (CK)、模型组 (H_2O_2)、K3R 保护组 (10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。按照分组, K3R 保护组中分别加入 MEM 培养液配制的 10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 K3R 溶液进行预处理, 对照组和模型组加入 MEM 培养基作对照处理。预处理 24 h 后, 除对照组加入 MEM 培养基外, 其余组细胞的培养液均换为 MEM 培养液配制的浓度为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液, 继续培养 4 h。培养结束后, 测定细胞活力。

1.2.4 K3R对HepG2细胞氧化损伤的影响

1.2.4.1 细胞内ROS的测定

以每毫升 8×10^4 个的接种量接种细胞于 96 孔板内, 根据 1.2.3 中的方法处理细胞。弃去废液, 用 MEM 清洗 3 次, 每孔加入 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFH-DA 探针工作液 100 μL , 在细胞培养箱避光孵育 30 min, 之后用 MEM 清洗细胞 2 次, 以去除孔板中残留 DCFH-DA^[11]。于激发 / 发射波长 485 nm/528 nm 处测定荧光 OD 值。

1.2.4.2 细胞内ALT、AST和LDH的活性检测

调整细胞密度为每毫升 8×10^4 个接种于 96 孔板内, 根据 1.2.3 中的方法处理细胞。处理完成后, 按照 ALT、AST 和 LDH 试剂盒说明书进行检测。

1.2.5 K3R对HepG2细胞抗氧化能力的测定

操作同 1.2.4.2, 并按照试剂盒说明书检测 SOD 活性和 GSH、MDA 含量。

1.2.6 K3R对氧化应激诱导的HepG2细胞凋亡的影响

1.2.6.1 Annexin V-FITC/PI染色法检测细胞凋亡

将细胞以每毫升 8×10^4 个的接种量接种于 6 孔板中并进行不同浓度的 K3R 预处理以及 H_2O_2 的诱导, 处理结束后收集并离心获取细胞沉淀, 经 PBS 洗涤 2 次后, 加入 400 μL 的 1 $\times$ Annexin V 结合液重悬细胞, 随后依次加入 5 μL Annexin V-FITC 染色液和 10 μL PI 染色液分别孵育 15 min 和 5 min, 用流式细胞仪进行检测^[12]。

1.2.6.2 TUNEL法检测细胞凋亡

将细胞以每毫升 5×10^4 个的接种量接种于激光共聚焦培养皿中并处理完成后, 用 PBS 洗涤, 加入 4% (V/V) 多聚甲醛固定 30 min。随后洗涤 2 次, 加入 0.2% (V/V) Triton X-100 通透 20 min, 洗涤完成后加入 50 μL TUNEL 反应液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 30 min。弃去反应液依次用 PBS 和 Triton X-100 充分清洗。再加入质量浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DAPI 染液避光孵育 5 min, 待染色完成后弃去染液并清洗。加入 PBS

保持细胞湿润, 于激光共聚焦显微镜下观察^[13]。

1.2.7 Western Blot法检测细胞蛋白水平

将细胞以每毫升 8×10^4 个的接种量接种于 6 孔板中处理后, 弃去原培养液, 收集细胞样本经裂解液充分裂解, 离心取上清用 BCA 法检测蛋白浓度。取等量蛋白加入 5 $\times$ 预染液于 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 使其变性。经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离目的蛋白, 根据分子量找到目的蛋白, 半干法将其转印到 NC 膜上, 加入封闭液室温下封闭 2 h。TBST 洗涤后加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, 次日加入二抗于摇床上室温孵育 1 h。充分洗涤后将 ECL 化学发光试剂均匀覆盖于 NC 膜上, 于发光成像系统显影留像, 利用 Image J 软件分析条带的灰度值^[14]。

1.3 数据处理

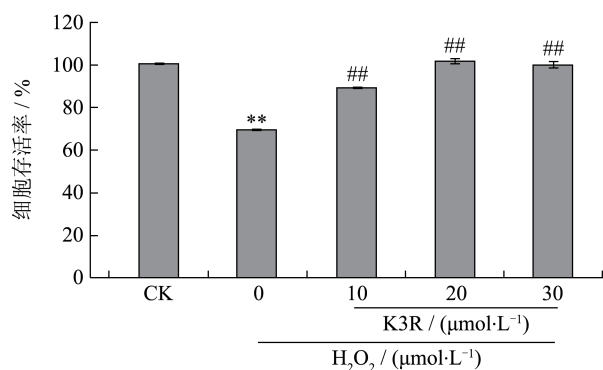
实验结果以平均值 $\pm$ 标准偏差的方式呈现, 使用单因素方差分析 (ANOVA) 方法对定量数据进行组间差异的统计学分析。 $P<0.05$ 为差异性显著, $P<0.01$ 为差异性极显著。利用 GraphPad Prism 9 软件作图。

2 结果与分析

2.1 K3R对 H_2O_2 诱导的HepG2细胞氧化损伤的保护作用

2.1.1 K3R对 H_2O_2 诱导的HepG2细胞活力的影响

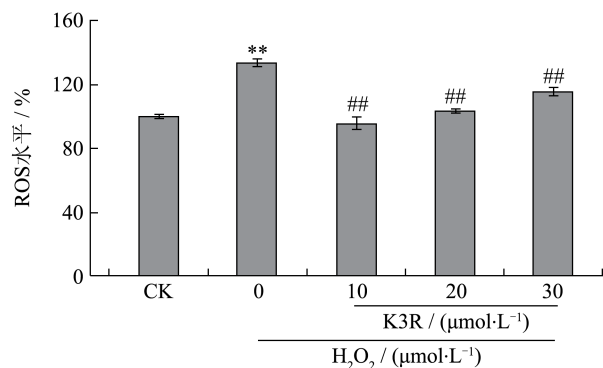
HepG2 细胞内具备多种抗氧化酶的内源性功能, 是评估各种毒素引起的氧化损伤和保护细胞免受氧化损伤相关机制研究的重要细胞模型^[15]。 H_2O_2 因其容易渗透细胞膜产生羟基和氧自由基造成氧化损伤, 常被用来构建体外氧化应激模型^[16]。为探究 K3R 对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用, 在 H_2O_2 诱导损伤之前使用不同浓度的 K3R 对 HepG2 细胞进行预处理。如图 1 所示, 与对照组相比, 经 H_2O_2 处理过的细胞, 细胞存活率显著下降。与 H_2O_2 损伤组相比, 经过不同浓度的 K3R 预处理过的细胞, 存活率均显著, 当 K3R 浓度为 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率提升至 99.93% ($P<0.01$)。结果表明, K3R 预处理能够有效提高 H_2O_2 诱导引起的细胞活力降低, 证实其对 H_2O_2 引起的 HepG2 细胞氧化损伤具有保护作用。既往研究报道, K3R 能够提高 H_2O_2 损伤的 H9c2 心肌细胞活力, 通过缓解氧化应激发挥心脏保护效应^[17]。结合本研究中 K3R 在肝细胞模型中展现的抗损伤特性, 进一步支持了 K3R 通过缓解氧化应激发挥细胞保护作用的机制。

图 1 K3R 对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞存活率的影响Fig.1 Effect of K3R on survival rate of HepG2 cells induced by H₂O₂

注: ** 与 CK 组相比差异极显著 ($P < 0.01$); ## 与 H₂O₂ 组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 下图同。

2.1.2 K3R对H₂O₂诱导的HepG2细胞内ROS水平的影响

ROS 是正常生理代谢副产物, 参与体内信号传导和维持细胞平衡^[18]。当 ROS 产生过量, 会打破细胞内的氧化还原平衡, 导致氧化应激反应, 进而引发氧化损伤, 最终导致细胞凋亡^[19]。为此本研究基于 DCFH-DA 荧光探针法来表征细胞内的 ROS 水平, 从而反应细胞的氧化损伤程度。如图 2 所示, 与对照组相比, H₂O₂ 损伤组的 ROS 水平显著升高, 是对照组的 1.34 倍 ($P < 0.01$), 这说明 H₂O₂ 能够诱导 HepG2 细胞产生较多的 ROS, 从而促进细胞内氧化应激反应。而经过 K3R 预处理的细胞 ROS 水平均显著降低, 趋近于正常水平。表明 K3R 预处理可显著抑制 H₂O₂ 刺激下细胞内 ROS 的过量生成, 有效缓解氧化应激反应, 保护细胞免受损伤。有研究证实在 H9c2 细胞损伤模型中, K3R 同样能够通过抑制 ROS 产生, 减轻氧化应激损伤, 表明 K3R 对 ROS 的产生起抑制作用^[20]。

图 2 K3R 对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞内 ROS 水平的影响Fig.2 Effects of K3R on ROS level in H₂O₂-induced HepG2 cells

2.1.3 K3R对H₂O₂诱导的HepG2细胞内ALT、AST和LDH活性的影响

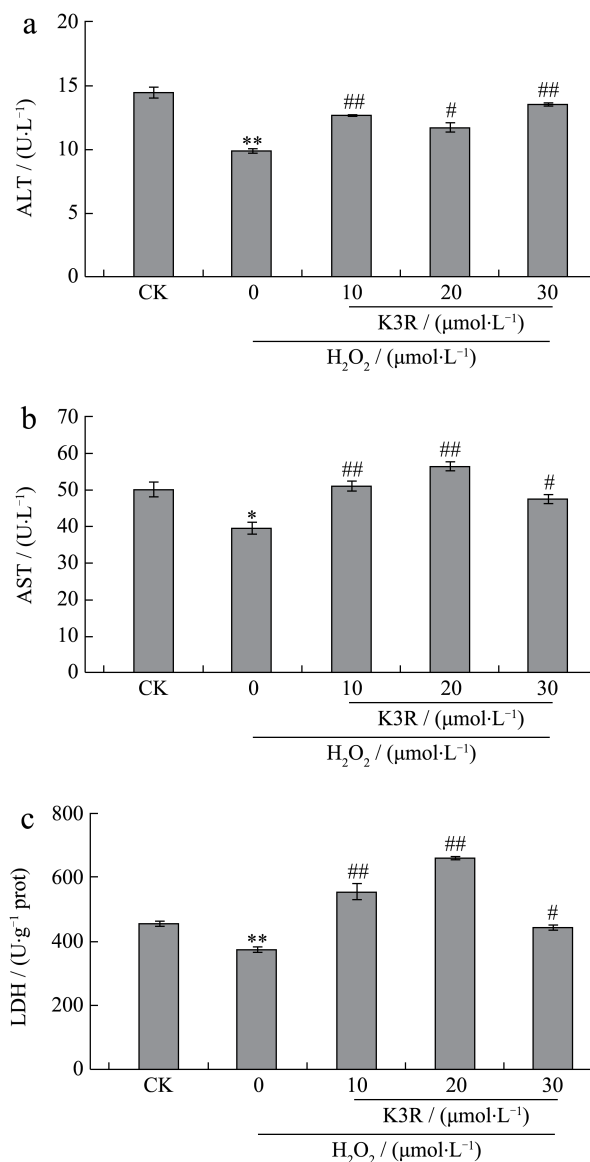


图 3 K3R 对细胞内 AST, ALT 和 LDH 活性的影响

Fig.3 Effect of K3R on intracellular AST, ALT and LDH activities

注: * 与 CK 组相比差异显著 ($P < 0.05$); # 与 H₂O₂ 组相比差异显著 ($P < 0.05$), 下图同。

细胞在氧化损伤过程中会将细胞内的 ALT、AST、LDH 等胞内酶释放到培养基中, 所以细胞内其活性大小可反映细胞的损伤或死亡程度^[21]。本文探究了 K3R 预处理后的细胞经 H₂O₂ 诱导损伤后, 细胞内 ALT、AST 和 LDH 水平的变化。结果如图 3 所示, 与对照组相比, 模型组细胞内的 ALT、AST 和 LDH 的活性均显著降低, 表明 H₂O₂ 诱导损伤促进了胞内酶向胞外释放。而经过 K3R 预处理过的细胞内的 ALT、AST 和 LDH 的活性均有不同程度的回升, 表明 K3R 可以

有效降低 H_2O_2 对细胞造成的损伤, 从而起到保护细胞免受氧化损伤的作用。

2.2 K3R对 H_2O_2 诱导的HepG2细胞抗氧化能力的影响

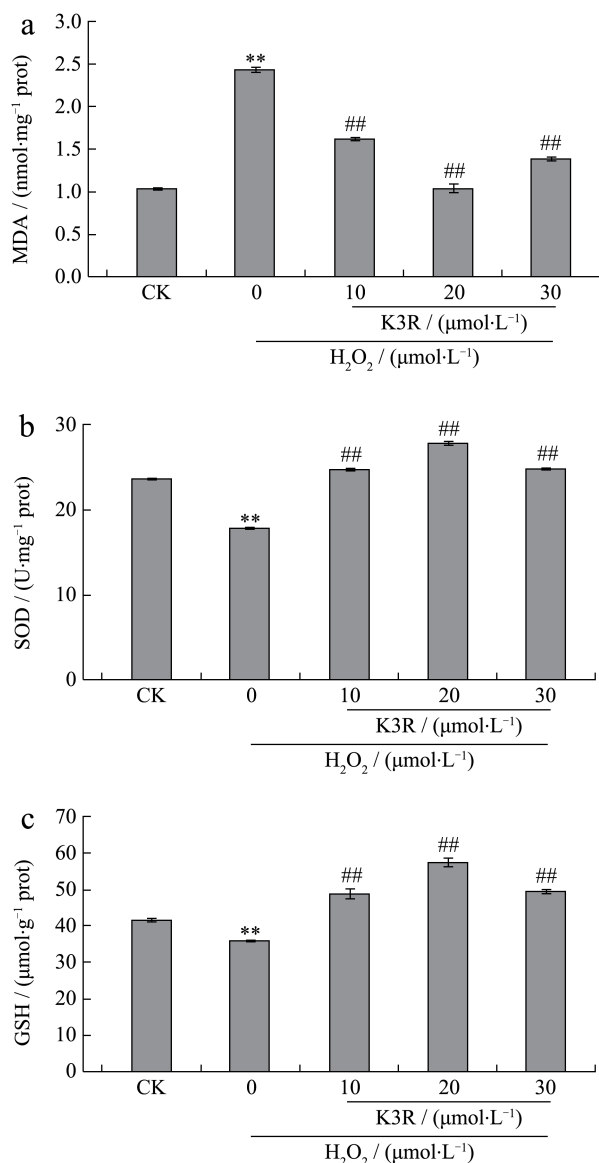


图4 K3R对 H_2O_2 诱导的HepG2细胞内MDA含量、SOD活力和GSH含量的影响

Fig.4 Effects of K3R on MDA, SOD and GSH activity in H_2O_2 -induced HepG2 cells

MDA、SOD和GSH是表征细胞抗氧化能力的重要指标, 对细胞氧化与抗氧化平衡起重要作用。机体内MDA的主要来源是自由基与脂质间的过氧化反应, 会对细胞产生毒性^[22]。如图4a所示, 对照组细胞的MDA含量处于一个较低的水平, 说明正常细胞的氧化还原水平处于正常状态, 经 H_2O_2 诱导后的细胞内MDA水平显著提高至对照组的2.4倍 ($P < 0.01$), 表

明细胞受到氧化损伤促进细胞内MDA的产生。与模型组相比, 经K3R预处理的细胞内MDA含量显著降低。SOD作为细胞内源性抗氧化物酶, 能够通过清除机体内过多的ROS和MDA来维持机体内氧化平衡, 保护机体免受氧化损伤^[23]。GSH可以和机体产生的ROS反应生成 H_2O , 维持机体正常的免疫系统功能^[24]。因此一旦GSH被消耗, 机体内的氧化平衡状态就会遭到破坏, 进而造成氧化应激。如图4b和4c所示, 与对照组相比, H_2O_2 模型组细胞内SOD和GSH的含量显著降低, 表明 H_2O_2 诱导促进细胞内氧化应激反应的发生。而K3R预处理使这一现象被显著改善, 表明K3R能够缓解 H_2O_2 诱导的细胞氧化应激水平, 进而减小对细胞造成的氧化损伤。

2.3 K3R对 H_2O_2 诱导的HepG2细胞凋亡的影响

2.3.1 Annexin V-FITC/PI染色法检测K3R对细胞凋亡的影响

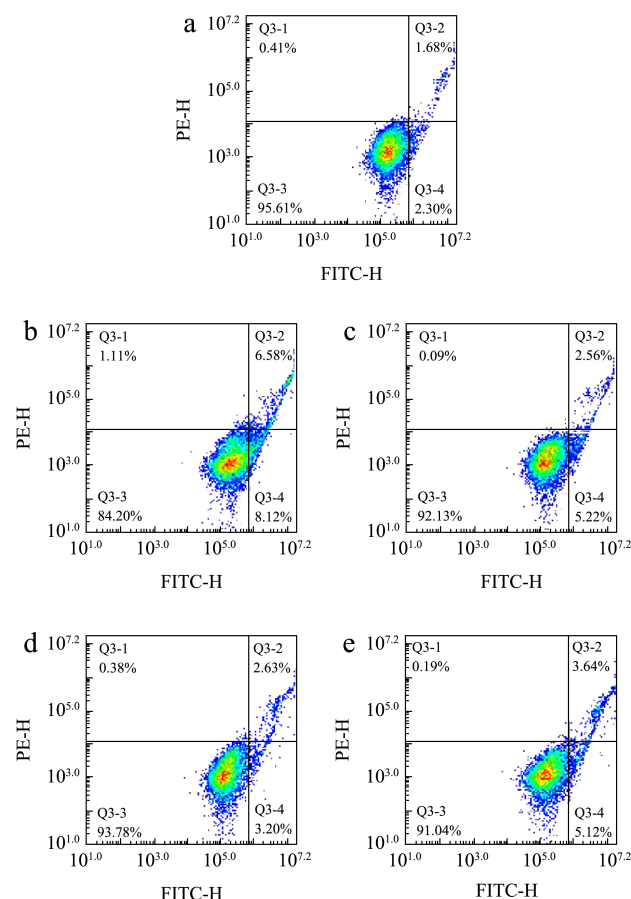


图5 Annexin V-FITC/PI染色法检测细胞凋亡情况

Fig.5 Detection of apoptosis by Annexin V-FITC/PI staining

注: a、b、c、d分别展示了对照组、模型组和K3R保护组(10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞的凋亡情况。

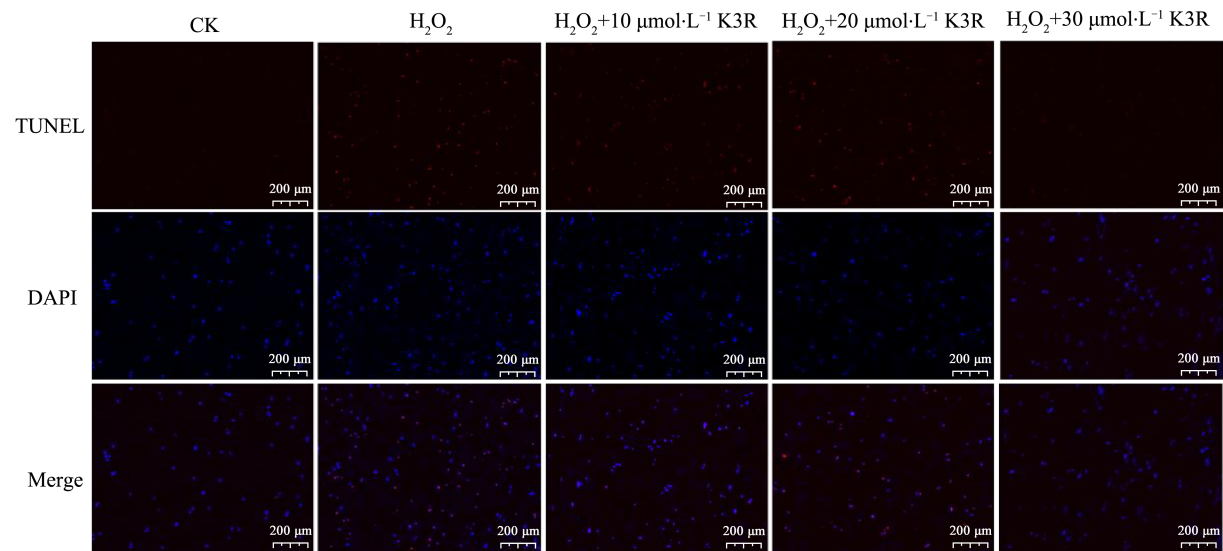


图 6 TUNEL 染色法检测细胞凋亡情况

Fig.6 Detection of apoptosis by TUNEL staining

细胞凋亡是评估氧化损伤的一个重要指标^[25]。对 HepG2 细胞进行 K3R 预处理和 H₂O₂ 诱导后使用 Annexin V-FITC/PI 染色法检测各组细胞凋亡的情况。如图 5 所示，图中四个象限中左上代表机械损伤，左下代表正常活细胞，右上和右下依次为晚期凋亡细胞和早期凋亡细胞。与对照组相比，H₂O₂ 损伤后凋亡细胞明显增多，K3R 预处理后细胞的晚期凋亡率和早期凋亡率均有不同程度的降低，表明 K3R 处理可以有效减少细胞凋亡，减轻氧化应激导致的细胞损伤。

2.3.2 TUNEL 染色法检测K3R对细胞凋亡的影响

如图 6 所示，使用 TUNEL 和 DAPI 染料对细胞凋亡进行染色和分析。TUNEL 可以对凋亡的细胞进行原位染色，染色后的凋亡细胞会发出红色荧光。DAPI 染料可以穿透细胞膜并与双链 DNA 结合，当与细胞结合时，它会发出蓝色荧光^[26]。结果表明，对照组中细胞数最多，红色荧光很少，细胞核呈均匀圆形，染色质分布均匀，无明显凋亡特征。然而，H₂O₂ 诱导后，细胞数量减少，细胞内部产生大量红色荧光，表明存在大量凋亡细胞，一些细胞核体积减少，呈现收缩形状，在 DAPI 染色中，收缩的凋亡细胞核发出更明亮的蓝色荧光，说明细胞在氧化应激下发生了严重的细胞凋亡。与 H₂O₂ 组相比，K3R 处理后，细胞的红色荧光呈剂量依赖性下降，细胞数量增加。实验结果表明，K3R 处理可减轻 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞凋亡。

2.4 K3R对HepG2细胞内抗氧化蛋白和凋亡蛋白表达的影响

氧化应激诱导的细胞损伤通过激活凋亡信号通路

触发程序性细胞死亡^[27]。在氧化应激条件下，线粒体膜通透性改变导致凋亡启动因子释放至胞浆，进而激活下游关键蛋白酶 Caspase-3，最终启动细胞凋亡程序^[28]。Bax 和 Bcl-2 分别是 Bcl-2 蛋白家族中的促凋亡蛋白和抑凋亡蛋白。在生理状态下，Bax 与 Bcl-2 的表达维持稳定，抑制线粒体凋亡通路；而当细胞接受凋亡刺激（如氧化应激）时，Bax 蛋白从胞浆向线粒体转位，促使线粒体凋亡因子释放。此时若 Bax/Bcl-2 比值显著升高，则打破平衡向促凋亡方向倾斜^[29]。基于上述机制，本研究通过检测 H₂O₂ 刺激后 Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 等关键蛋白的表达变化，揭示氧化应激诱导细胞凋亡的分子调控路径。结果如图 7b~d 所示，与对照组对比，细胞经过 H₂O₂ 诱导后，Caspase-3 和 Bax 蛋白的表达量明显增加，而 Bcl-2 的蛋白表达量明显下降。经过 K3R 预处理的细胞，与模型组相比 Caspase-3 和 Bax 蛋白的表达量明显的被抑制，同时对 Bcl-2 的表达有了明显的促进作用。以上结果表明，K3R 可以抑制 H₂O₂ 引起的细胞凋亡。

HO-1 和 NQO1 均属于抗氧化酶，当细胞内发生氧化应激时，HO-1 和 NQO1 可以催化细胞产生内源性保护物质，从而起到抗氧化作用^[30]。为了探究 K3R 对细胞内抗氧化蛋白表达的影响，评价 K3R 的抗氧化活性，本文对 HO-1 和 NQO1 蛋白的表达情况进行了检测。结果如图 7e 和 7f 所示，同对照组相比，HepG2 细胞经 H₂O₂ 诱导后，HO-1 和 NQO-1 蛋白表达水平显著降低，而经 K3R 预处理过的细胞，HO-1 和 NQO1 的蛋白表达水平有所升高。表明 K3R 能够促进细胞内抗氧化蛋白的表达，来达到减轻氧化损伤保护细胞的目的。

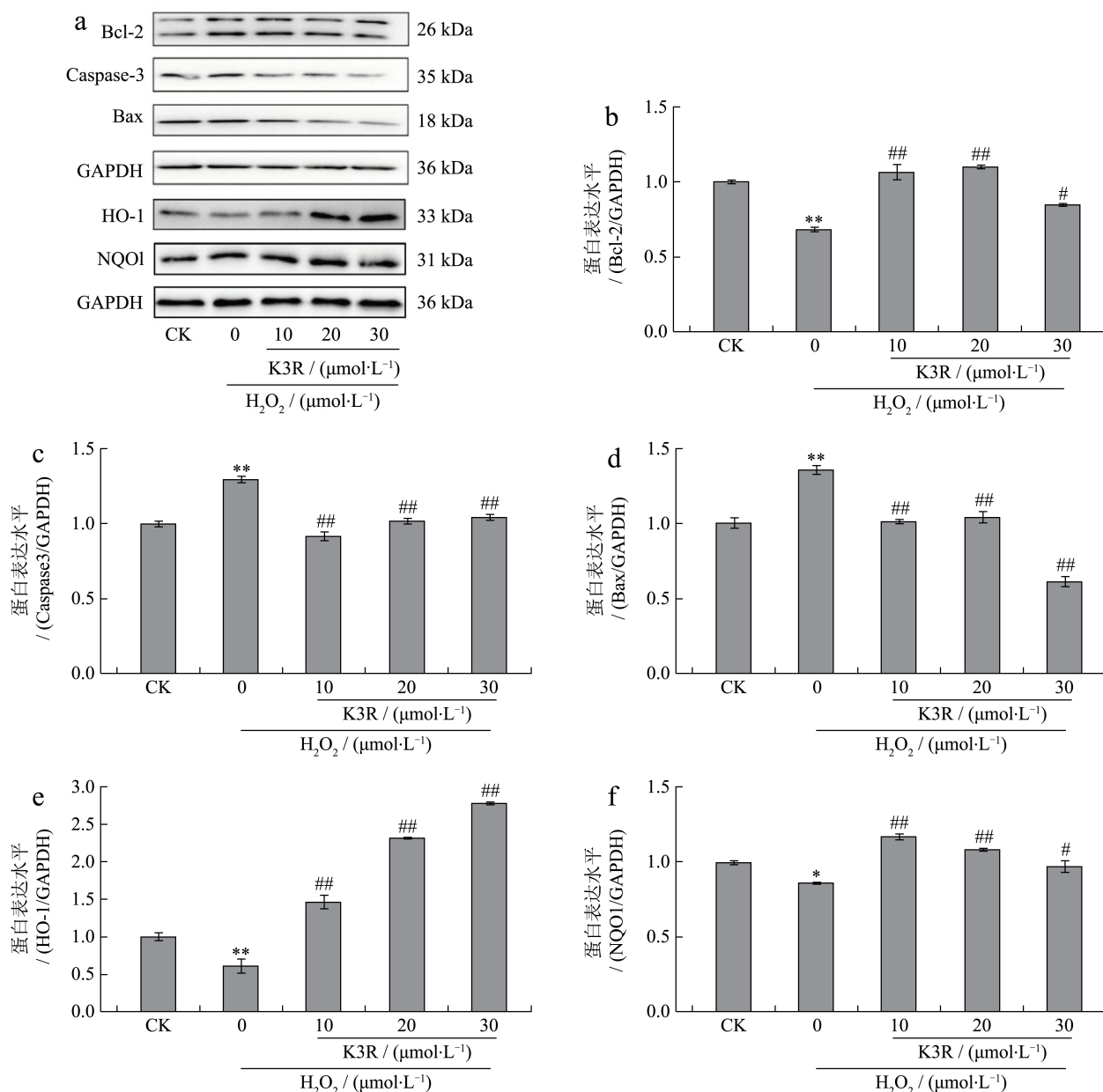


图 7 K3R 对细胞内凋亡蛋白和抗氧化蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of K3R on the expression of apoptotic and antioxidant proteins in cells

2.5 K3R对HepG2细胞MAPK/NF- κ B信号通路的影响

HO-1 作为肝脏保护的关键调控因子, 其表达受 MAPK 信号通路与 NF- κ B 通路的协同调控^[30]。ERK、JNK、p38 属于 MAPK 级联反应中的重要家族成员, 通过磷酸化级联反应传递氧化应激信号, 激活下游转录因子, 进而结合 HO-1 启动子区域诱导其表达^[31]。此外, HO-1 表达还受氧化还原敏感转录因子的调节, 如激活 B 细胞的核转录因子 κ B 核 (NF- κ B)。在氧化应激刺激下, NF- κ B 从细胞质转位至细胞核, 直接启动 HO-1 转录, 同时与 MAPK 通路通过激酶交互作用协同增强 HO-1 的诱导效应, 共同参与细胞凋亡、炎

症和氧化应激反应等细胞反应的调节^[30]。因此, 在明确 K3R 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞保护作用的基础上, 进一步探究其调节机制, 对 MAPK/NF- κ B 信号通路关键蛋白的表达进行了分析。结果如图 8 所示, 经 H_2O_2 诱导后细胞内 P38、JNK 和 ERK1/2 蛋白的磷酸化水平显著提高, 使得 MAPK 信号途径被激活进而促进氧化应激反应的发生。而 K3R 预处理过的细胞其磷酸化水平显著降低, 降低细胞内氧化损伤程度。同时, H_2O_2 诱导还促进了 NF- κ B p65 的磷酸化水平, 激活 NF- κ B 通路促进下游炎症因子的分泌。而 K3R 预处理能够显著改善这一现象。在一项药物改善脑缺血再灌注损伤的研究中表明, 药物能够通过调节 MAPK/

NF-κB 通路相关蛋白的表达抑制 SH-SY5Y 细胞的氧化应激水平来减轻脑损伤^[32]。在本研究中, K3R 参与了 MAPK/NF-κB 通路的调节, 通过抑制通路关键蛋白的磷酸化, 缓解氧化应激对细胞的氧化损伤。

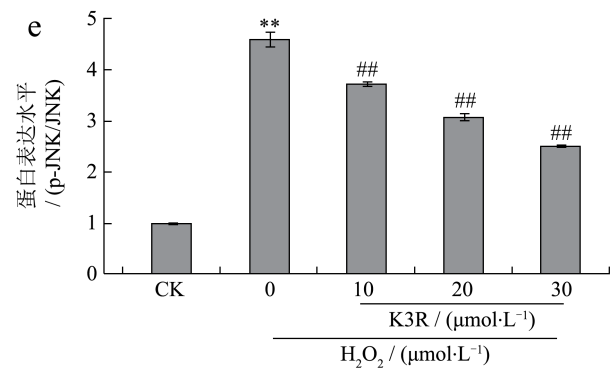
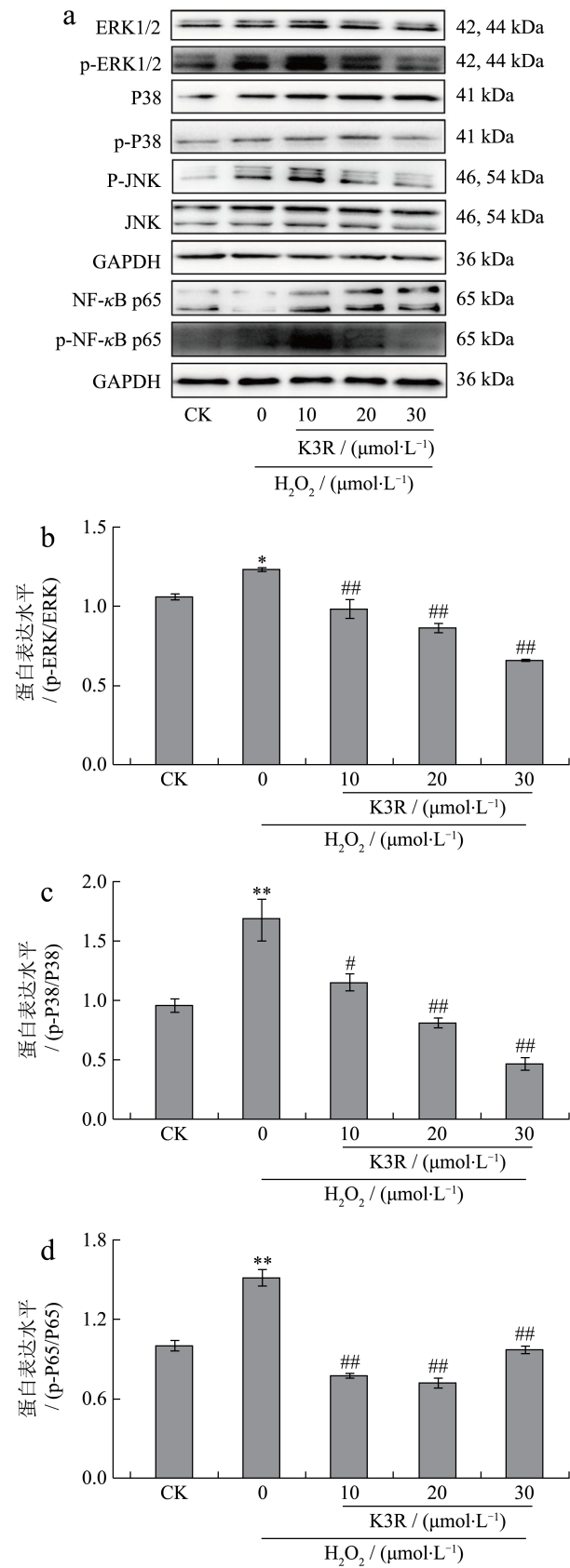


图 8 K3R 对 HepG2 细胞 MAPK 和 NF-κB 信号通路的影响
Fig.8 Effect of K3R on MAPK and NF-κB signalling pathways in HepG2 cells

3 结论

本研究系统阐明了 K3R 对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用。实验表明, K3R 显著恢复细胞活力、降低 ROS 生成及 MDA 积累, 通过上调 SOD 和 GSH 水平重建细胞内氧化还原稳态。在细胞凋亡调控层面, K3R 调节 Caspase-3、Bax、Bcl-2 凋亡蛋白表达, 有效降低细胞凋亡率, 同时诱导 HO-1 和 NQO1 等 II 相解毒酶表达, 增强细胞抗氧化防御能力。机制研究进一步揭示, K3R 通过抑制 MAPK 信号通路 (P38/JNK/ERK1/2) 及 NF-κB p65 的磷酸化, 缓解氧化应激反应发挥保护效应。本研究结果为 K3R 改善氧化损伤保护肝功能的功效机制研究提供理论基础, 对推动天然产物在肝脏健康领域的应用具有潜在价值。

参考文献

[1] MACHADO I F, MIRANDA R G, DORTA D J, et al. Targeting oxidative stress with polyphenols to fight liver diseases [J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2023, 12(6): 1212.

[2] PRIYANKA B, NIYANSHI G, VANESSA C, et al. Oxidative stress-induced liver damage and remodeling of the liver vasculature [J]. The American Journal of Pathology, 2023, 193(10): 1400-1414.

[3] ZHONG H, HUANG Z, LI L, et al. Selenomethionine supplementation mitigates liver dysfunction, oxidative injury and apoptosis through enhancing antioxidant capacity and inhibiting JNK MAPK pathway in piglets fed deoxynivalenol-contaminated diets [J]. Antioxidants, 2024, 28, 13(3): 295.

[4] ZHU Y Y, WANG K, JIA X Y, et al. Antioxidant peptides, the guardian of life from oxidative stress [J]. Medicinal Research Reviews, 2023, 44(1): 275-364.

[5] HAFIZA M J, FAHAD A A, FAIMA A K, et al. Silymarin: unveiling its pharmacological spectrum and therapeutic potential in liver diseases-a comprehensive narrative review [J]. Food Science & Nutrition, 2024, 12: 3097-3111.

[6] JAMSHID T, HOSSEIN H, MAHMOUD H, et al. A review of

- the hepatoprotective effects of hesperidin, a flavanon glycoside in citrus fruits, against natural and chemical toxicities [J]. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 28: 305-317.
- [7] MA Y C, LIU Y J, SUN A, et al. Intestinal absorption and neuroprotective effects of kaempferol-3-*O*-rutinoside [J]. *RSC Advances*, 2017, 7(50): 31408-31416.
- [8] HU C, WANG Y, DENG Y, et al. Identification and quantification of the antioxidants in Ginkgo biloba leaf [J]. *Biomed Chromatogr*, 2024, 38(11): e5980.
- [9] WANG Y, TANG C Y, ZHANG H. Hepatoprotective effects of kaempferol 3-*O*-rutinoside and kaempferol 3-*O*-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl₄-induced oxidative liver injury in mice [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2015, 23(2): 310-317.
- [10] 伍丽娜,白曼利,王碧生,等.常见类胡萝卜素对HepG2细胞紫外氧化损伤的影响[J].*食品研究与开发*,2023,44(10):26-31.
- [11] XU Z L, HU Q H, XIE M H, et al. Protective effects of peptide KSPLY derived from *Hericium erinaceus* on H₂O₂-induced oxidative damage in HepG2 cells [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2023, 12(5): 1893-1904.
- [12] TANG Y F, LIANG F, YAN Y, et al. Purification and identification of peptides from *Hydrilla verticillata* (Linn. f.) royle with cytoprotective and antioxidative effect against H₂O₂-treated HepG2 cells [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(8): 4170-4183.
- [13] XU H, GUO Y, LIU J X, et al. Idebenone antagonizes P53-mediated neuronal oxidative stress injury by regulating CD38-SIRT3 protein level [J]. *Neurochemical Research*, 2024, 49: 2491-2504.
- [14] LIANG N, SANG Y X, LIU W H, et al. Anti-inflammatory effects of gingerol on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells by inhibiting NF- κ B signalling pathway [J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 835-845.
- [15] PARDEEP K, ROBIN, G R M, et al. Progression of conventional hepatic cell culture models to bioengineered HepG2 cells for evaluation of herbal bioactivities [J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(6): 881-893.
- [16] PEI X D, HE Y N, WU Q L, et al. Novel antioxidant peptides derived from feather keratin alleviate H₂O₂-induced oxidative damage in HepG2 cells via Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 50: 20062-20072.
- [17] WANG M N, CAO Y G, WEI Y X, et al. Safflloflavone, a new flavonoid from the flowers of *Carthamus tinctorius* L. and its cardioprotective activity [J]. *Natural Product Research*, 2022, 36(13): 3317-3323.
- [18] ZHU Y Y, WANG K, JIA X Y, et al. Antioxidant peptides, the guardian of life from oxidative stress [J]. *Medicinal Research Reviews*, 2024, 44(1): 275-364.
- [19] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents [J]. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2020, 21(7): 363-383.
- [20] SHI L L, ZHAO X N, BAI J, et al. Kaempferol-3-*O*-rutinoside protects myocardial cell injury by inhibiting the TXNIP/NLRP3 pathway [J]. *Italian Journal of Food Science*, 2024, 36(3): 2668.
- [21] HE S Q, XU Z Y, LI J, et al. Peptides from Harpadon nehereus protect against hyperglycemia-induced HepG2 via oxidative stress and glycolipid metabolism regulation [J]. *Journal of Functional Foods*, 2023, 108: 105723.
- [22] CORDIANO R, GIOACCHINO D M, MANGIFESTA R, et al. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: An update [J]. *Molecules*, 2023, 28(16): 5979.
- [23] RAN K, WANG J, LI D, et al. Sustained-release of SOD from multivesicular liposomes accelerated the colonic mucosal healing of colitis mice by inhibiting oxidative stress [J]. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 2024, 243: 114143.
- [24] JIAO Y T, KANG Y R, WEN M Y, et al. Fast antioxidation kinetics of glutathione intracellularly monitored by a dual-wire nanosensor [J]. *Angewandte Chemie*, 2023, 62(51): e202313612.
- [25] DEMERDASH E M F, MINJAL H A, SAYED E A R, et al. Hepatoprotective effect of ethanolic pomegranate peel extract against levofloxacin via suppression of oxidative stress, proinflammation, and apoptosis in male rats [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2024, 27(9): 866-878.
- [26] TIAN Y Y, WANG J, QIN X R, et al. Narciclasine ameliorated T cell mediated acute liver injury through activating AMPK pathway [J]. *Cellular Immunology*, 2022, 382: 104631.
- [27] DIANA A B, MELANIE C, MELANIE G, et al. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species [J]. *Cryobiology*, 2018, 80: 170.
- [28] WANG J, SONG H, HUANG Y, et al. Protective effect of crocin on peroxidation-induced oxidative stress and apoptosis in IPEC-J2 cells [J]. *Environmental Toxicology*, 2024, 39(6): 3537-3547.
- [29] ZHANG W Y, ZHUANG S J, GUAN H, et al. New insights into the anti-apoptotic mechanism of natural polyphenols in complex with Bax protein [J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2023, 42(6): 11-13.
- [30] LI N, HAO L Y, LI S H, et al. Oxidative stress, genomic integrity, and liver diseases [J]. *Molecule*, 2022, 27(10): 3159.
- [31] LI Q T, FENG Y M, KE Z H, et al. KCNN4 promotes invasion and metastasis through the MAPK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Investigative Medicine*, 2019, 68(1): 68-74.
- [32] ZHOU L X, LUO X T. Shionone relieves oxygen-glucose deprivation/reoxygenation induced SH-SY5Y cells injury by inhibiting the p38 MAPK/NF- κ B pathway [J]. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 2024, 19: 435.