

豨薟草多糖通过调控 P62-Keap1-Nrf2 信号通路 缓解氧化应激的作用机制研究

李咏华¹, 曾利杰¹, 吴锦云¹, 孟君¹, 黄燕燕^{2*}, 李梦娜^{2*}

(1. 广州白云山医药集团股份有限公司白云山何济公制药厂, 广东广州 510410)

(2. 佛山大学食品科学与工程学院, 广东省食品智能制造重点实验室, 广东佛山 528225)

摘要: 天然多糖作为绿色生物大分子, 在调节机体免疫、缓解氧化损伤及维护组织稳态方面展现出独特潜力。为探讨豨薟草多糖 (*Siegesbeckia orientalis* L. polysaccharide, SIE-III) 的体外抗氧化活性及其作用机制。通过化学抗氧化法测定 SIE-III 对 DPPH、ABTS⁺、OH 和 O₂⁻ 自由基的清除能力, 利用 H₂O₂ 诱导 RAW264.7 细胞建立氧化应激模型, 评价 SIE-III 的细胞保护作用及对氧化应激因子、活性氧水平、Nrf2 核转位及 Nrf2/Keap1/P62 信号通路相关蛋白和基因表达的影响。结果表明, SIE-III 在化学体系中具有一定浓度依赖性的自由基清除能力, 对 O₂⁻、ABTS⁺、DPPH 和 OH 半数抑制浓度 (IC₅₀) 别为 3.16、2.18、3.15 和 3.97 mg mL⁻¹, 但弱于阳性对照 Vc; 在细胞模型中, SIE-III 无细胞毒性, 可显著提高 H₂O₂ 诱导的细胞存活率至 93.63%, 同时, 可降低活性氧水平, 提升 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 GSH 含量, 减少 MDA 生成 ($P < 0.05$)。机制研究表明, SIE-III 可显著上调 P62、Nrf2、HO-1、NQO1、SOD1 和 CAT 的 mRNA 及蛋白表达, 下调 Keap1 表达并促进 Nrf2 核转位 ($P < 0.05$)。综上, SIE-III 的抗氧化作用可能与 P62-Keap1-Nrf2 信号通路激活有关, 为开发天然抗氧化剂提供了理论依据。

关键词: 豨薟草多糖; 体外抗氧化活性; 氧化应激; P62-Keap1-Nrf2 信号轴

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.6.0552

Mechanism Study of *Siegesbeckia orientalis* L. Polysaccharide in Alleviating Oxidative Stress by Regulating the P62-Keap1-Nrf2 Signaling Pathway

LI Yonghua¹, ZENG Lijie¹, WU Jinyun¹, MENG Jun¹, HUANG Yanyan^{2*}, LI Mengna^{2*}

(1. Baiyunshan HejiGong Pharmaceutical Factory, Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holdings Co. Ltd., Guangzhou 510410, China)(2. School of Food Science and Engineering, Foshan University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Intelligent Food Manufacturing, Foshan 528225, China)

Abstract: Natural polysaccharides, as green biomacromolecules, possess unique potential in modulating immune function, mitigating oxidative damage and maintaining tissue homeostasis. The present study was conducted to explore the *in vitro* antioxidant activity and underlying mechanism of *Siegesbeckia orientalis* L. polysaccharide III (SIE-III). The scavenging abilities of SIE-III against DPPH radicals, ABTS cation radicals, hydroxyl radicals (OH) and superoxide anion radicals (O₂⁻) were measured by chemical antioxidant assays. An oxidative stress model was constructed using H₂O₂-challenged RAW264.7 cells. The cytoprotective effects of SIE-III were assessed in this cell model, and its impacts on oxidative stress-related factors, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, nuclear translocation of Nrf2, as well as the gene and protein expression associated with the Nrf2/Keap1/P62 signaling pathway were also investigated. It was shown that radical scavenging effects of SIE-III in chemical systems were presented in a concentration-dependent manner. The IC₅₀ values of SIE-III for scavenging O₂⁻, ABTS⁺, DPPH and ·OH were 3.16, 2.18, 3.15 and 3.97 mg mL⁻¹, respectively, which were higher than those of the positive

收稿日期: 2026-03-13; 修回日期: 2026-05-15; 接受日期: 2026-05-15

基金项目: 企业委托项目 (KH25138)

作者简介: 李咏华 (1977-), 女, 硕士, 高级制药工程师, 研究方向为: 药用辅料研发与质量标准化, E-mail: liyonghua@byshjg.com

通讯作者: 黄燕燕 (1992-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为: 预制食品微生物利用与控制, E-mail: huang_yanyan@fosu.edu.cn; 共同通讯作者: 李梦娜 (2000-), 女, 硕士, 研究方向为: 预制食品微生物利用与控制, E-mail: mengnlimo@126.com

control vitamin C (Vc). No cytotoxicity was detected for SIE-III in the cellular experiment. The survival rate of H_2O_2 -damaged cells was significantly elevated to 93.63% after SIE-III intervention. Meanwhile, intracellular ROS levels were reduced obviously. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), together with glutathione (GSH) content were increased, whereas the generation of malondialdehyde (MDA) was suppressed ($P<0.05$). Mechanistic studies demonstrated that the mRNA and protein expression of P62, Nrf2, HO-1, NQO1, SOD1 and CAT were markedly upregulated by SIE-III. The expression of Keap1 was downregulated, and the nuclear translocation of Nrf2 was facilitated simultaneously ($P<0.05$). In summary, the antioxidant effect of SIE-III may be associated with the activation of the P62-Keap1-Nrf2 signaling pathway, and a theoretical basis is provided for the development of natural antioxidants.

Key words: *Siegesbeckia orientalis* L. Polysaccharide; *in vitro* antioxidant activity; oxidative stress; P62-Keap1-Nrf2 signaling axis

氧化应激是指机体因自由基过度积累与抗氧化防御系统失衡所引发的病理生理状态,其本质是促氧化-抗氧化稳态的破坏^[1]。在正常生理状态下,活性氧(Reactive oxygen species, ROS)主要由线粒体电子呼吸链及多种氧化酶适量生成,并参与细胞信号传导与免疫调节^[2]。然而,在内源性(如炎症反应、线粒体功能障碍)和外源性(如紫外线辐射、环境污染、不良饮食)因素协同作用下,ROS的过度积累会引发链式反应,大量自由基攻击蛋白质、脂质和DNA等生物大分子,导致细胞结构与功能损伤,进而推动多种慢性疾病的发生与发展^[3,4]。大量研究证实,过量的自由基会引发血管内皮功能障碍,从而导致缺血性心脏病^[5];同样,氧化应激亦可通过直接损伤胰岛 β 细胞、抑制胰岛素分泌,并干扰胰岛素信号通路(如IRS-1/Akt轴),加剧胰岛素抵抗,在2型糖尿病的发生与恶化中发挥核心驱动作用^[6]。因此,为了应对氧化应激所带来的健康挑战,开发高效安全的抗氧化物质具有重要意义。

长期以来,丁基羟基茴香醚(Butylated Hydroxyanisole, BHA)、二丁基羟基甲苯(Butylated Hydroxytoluene, BHT)等合成抗氧化剂已被广泛使用,但潜在的安全性问题促使研究者目光转向于来源更加安全的天然产物^[7]。在此背景下,植物多糖因其来源广泛、安全性高及良好的生物活性,已成为天然抗氧化剂研究的热点^[8]。其抗氧化机制主要依赖于分子中的活性基团作为氢供体,通过氢原子转移途径直接淬灭自由基(如OH $\cdot$ 、DPPH $\cdot$ 、ABTS $^{+}$ 等),从而有效阻断脂质过氧化链式反应,然而这一过程与多糖分子链结构密切相关^[9]。尤其在结构复杂的多糖中,构效关系尤为明显。果胶多糖含有同型半乳糖醛酸聚糖(Homogalacturonan, HG)、鼠李糖半乳糖醛酸聚糖-I(Rhamnogalacturonan-I, RG-I)和鼠李糖半乳糖醛酸聚糖-II(Rhamnogalacturonan-II, RG-II)等结构域,具有抗氧化、免疫调节等多种生物活性^[10-12]。其中, RG-I结构域在多糖的抗氧化活性中起着关键作用。Lu等^[13]从莲雾中提取的RG-I富集果胶多糖含有较高比例的半乳糖(Gal)、阿拉伯糖(Ara)和半乳糖醛酸(GalA),并表现出体外抗氧化及免疫调节活性。Qiao等^[14]研究指出,蓝莓果胶多糖中高度分支的RG-I侧链可通过提供丰富的活性位点,显著增强其自由基清除能力。此外, Ma等^[15]研究证实, RG-I结构域及其高度分支的中性糖侧链是西瓜皮果胶发挥抗氧化活性的核心结构单元,进一步从结构层面揭示了RG-I域在抗氧化过程中的核心作用。

豨薟草(*Siegesbeckia orientalis* L.)为菊科豨薟属多年生草本植物,作为祛风湿、强筋骨的传统药材,近年来其抗炎作用受到广泛关注。Guo等^[16]研究发现,其50%乙醇提取物在LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症模型中,可显著抑制前列腺素 E_2 (PGE $_2$)的分泌,并下调诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧酶-2(COX-2)及多种炎症因子的基因表达。机制研究表明,该作用与调控IRAK1/4-TRAF3/6信号轴,进而抑制AP-1、NF- κ B及IRF3等关键转录因子的核转位有关。郑春雨等^[17]的体内研究进一步证实,豨薟草水提取物可通过抑制JNK/p-JNK信号通路的磷酸化,下调转录因子c-Jun/AP-1的活性,从而减少肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等促炎因子的生成。然而现有研究多集中于小分子萜类^[18]与黄酮类^[19]成分,对其多糖组分的研究仍属空白。

基于RG-I结构域在多糖抗氧化活性中的重要作用,本研究以课题组前期从豨薟草中分离纯化获得的一种RG-I型酸性果胶多糖SIE-III为研究对象^[20]。目前,尽管多种含有RG-I结构域的多糖已被证实具有良好的抗氧化活性,但关于豨薟草多糖(*Siegesbeckia orientalis* L. Polysaccharide, SIE-III)抗氧化作用的研究尚未见报道。为此,本章通过 H_2O_2 诱导RAW264.7细胞氧化损伤模型及体外化学法,系统评价SIE-III的体外抗氧化活性,并探讨其作为天然抗氧化剂的应用潜力,以期豨薟草多糖的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

豨薟草 (*Siegesbeckia orientalis* L.) 由广州白云山医药集团股份有限公司白云山何济公制药厂提供。CCK-8 试剂盒, 购自 Meilunbio 公司; 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒、髓过氧化物酶 (MPO) 试剂盒、还原型谷胱甘肽 (GSH) 测试盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒、自由基清除能力试剂盒, 购自上海酶联免疫生物科技有限公司; 活性氧试剂盒、山羊血清, 购自碧云天生物科技有限公司; DAPI 染料, 购自 Merck KGaA 公司。

HT165R 台式高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; q9225 荧光定量 PCR 仪, 北京酷搏科技有限公司; NanoDrop2000 超微量分光光度计, Thermo 公司; B75442 流式细胞仪, Beckman 公司; CO₂ 恒温培养箱, Panasonic 公司; JS-1070P 化学发光仪, 上海培清科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SIE-III 化学抗氧化活性测定

通过 DPPH[·]、ABTS^{·+}、OH[·] 和 O₂⁻ 自由基清除能力试剂盒测定 SIE-III (1~5 mg·mL⁻¹) 的化学抗氧化活性, 并以相同浓度的 Vc 作为阳性对照。

1.2.2 SIE-III 的细胞毒性及其在 H₂O₂ 诱导下抗增殖测定

取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 重悬并调整细胞质量浓度后, 以每孔 5 000 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 培养 24 h 以确保细胞完全贴壁。随后进行分组干预: 对照组、H₂O₂ (500 μmol·L⁻¹) 组、不同浓度 SIE-III (50~400 μg·mL⁻¹) 单独处理组、H₂O₂ (500 μmol·L⁻¹) 与不同浓度 SIE-III (50~400 μg·mL⁻¹) 共处理组, 以及 H₂O₂ (500 μmol·L⁻¹) 与 Vc (100 μg·mL⁻¹) 阳性对照组^[21,22]。所有组别均干预 24 h。干预结束后, 弃去原培养基, 每孔加入含 10% (φ) CCK-8 试剂的新鲜培养基 100 μL。于培养箱中继续孵育 2 小时后, 使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度值。

1.2.3 氧化应激因子测定

使用试剂盒检测细胞上清中 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 及 MDA 的浓度。

1.2.4 细胞内 ROS 含量的测定

收集六孔板中的细胞, 以 PBS 洗涤后, 使用 0.25% (m/V) 胰酶消化, 待细胞形态变圆并有部分悬浮时, 加入完全培养基终止消化。吹打制备单细胞悬液, 转移至流式管中, 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清。使用无血清培养基将 ROS 荧光探针 DCFH-DA (激发波长/发射波长为 488 nm/525 nm) 按 1:1000 比例稀释至终质量浓度 10 μmol·L⁻¹, 重悬细胞并于 37 °C 避光孵育 20 min。离心后以无血清培养基洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞的探针。最后用 200 μL PBS 重悬细胞, 在流式细胞仪上选用 FITC 通道, 先以空白管校准仪器, 随后检测各实验组荧光强度 (MFI), 以反映细胞内 ROS 水平。

1.2.5 Nrf2 核转位

细胞经柠檬酸缓冲液 (pH 值 6.0) 微波热修复抗原后, 经 PBS 漂洗并进行透膜处理。随后, 以 10% (φ) 山羊血清封闭非特异性位点。滴加兔源 Nrf2 一抗 (ABC1onal, A2547, 按 1:200 稀释), 4 °C 湿盒内孵育过夜。次日经 PBS 充分洗涤, 滴加二抗 HRP 标记山羊抗兔, 避光室温孵育 50 min。洗涤后, 滴加现配的酪胺盐荧光素 (TSA) 反应液于含 0.003% (φ) H₂O₂ 的 PBST 中, 室温避光反应 20 min。复以 DAPI 染细胞核 10 min, 经 PBS 漂洗后以抗荧光淬灭封片剂封片, 于荧光显微镜下观察并采集图像, 红色荧光 (CY3) 表示 Nrf2 蛋白, 蓝色 (DAPI) 表示细胞核, 二者共定位信号 (紫红色) 反映 Nrf2 核内转位程度^[23]。

1.2.6 Nrf2 核转位、Keap1、p62 相关蛋白表达水平测定

取含蛋白酶抑制剂的裂解液提取蛋白, BCA 法测定蛋白质质量浓度后, 取 40 μg 蛋白经 5×上样缓冲液变性, 用 SDS-PAGE 电泳分离。蛋白电转至经甲醇活化的 PVDF 膜。转膜完成后, 以 5% (φ) 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜。所用一抗包括: Nrf2 (ABC1onal, A2547, 1:200)、Keap1 (Affinity, AF5266, 1:1 000)、P62 (华安生物, HA721171, 1:2 000)、GAPDH (Proteintech, 60004-1-Ig, 1:10 000) 及 Histone H3 (Proteintech, 17168-1-AP, 1:2 000)。TBST 洗涤后, 加入二抗 HRP 标记山羊抗兔或 HRP 标记山羊抗鼠, 室温孵育 30 min, 以 GAPDH 作为胞浆蛋白内参, 以 Histone H3 作为核蛋白内参。ECL 化学发光法显影, 成像系统采集图像, IPWIN60 软件分析条带灰度值。

1.2.7 SOD1、CAT、Nrf2、HO-1、NQO1 的 mRNA 表达水平测定

RAW 264.7 细胞经 1 mL Trizol 裂解后，加入 250 μ L 三氯甲烷，离心分离；上清液经 0.8 倍体积异丙醇沉淀，RNA 沉淀用 75% (φ) 乙醇洗涤两次，最后以 RNase-free water 溶解，并于 55 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。提取的 RNA 于 -80 $^{\circ}$ C 保存。反转录在 20 μ L 体系中进行，程序为 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min、85 $^{\circ}$ C 保持 5 s。所得 cDNA 进行 qPCR 分析，反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s，随后 40 个循环的 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s。以 GAPDH 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	Product length	序列 (5' to 3')
GAPDH	133	F-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG
		R-TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT
CAT	163	F-AAGATTGCCTTCTCCGGGTG
		R-GACATCAGGTCTCTGCGAGG
HO-1	110	F-GCTAGCCTGGTGCAAGATAC
		R-AAGCTGAGAGTGAGGACCCA
Nrf2	182	F-CTGAACCTCCTGGACGGGACTA
		R-CGGTGGGTCTCCGTAAATGG
NQO1	83	F-GGTAGCGGCTCCATGTACTC
		R-CGCAGGATGCCACTCTGAAT
SOD1	184	F-ATGGCGATGAAAGCGGTGTG
		R-CTGCACTGGTACAGCCTTGTG

1.2.8 数据统计与分析

数据采用 SPSS 27.0.1 (SPSS Inc, Chicago, USA) 进行统计分析 ($n=3$, 以平均值 $\pm$ 标准差表示)，组间采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Tukey 检验 ($P<0.05$)。GraphPad Prism 10.2.3 (GraphPad Software, San Diego, USA) 绘图。

2 结果与讨论

2.1 SIE-III的体外化学抗氧化活性评价及作用机制分析

本研究系统评价了 SIE-III 的体外抗氧化活性及其作用机制。结果如图 1 所示，SIE-III 对 DPPH、ABTS⁺、OH 和 O₂⁻ 自由基的清除作用均表现出浓度依赖性。为进一步比较 SIE-III 对不同自由基的清除能力，根据不同浓度下自由基清除率计算 IC₅₀ 值，其数值越低，说明样品清除该自由基的能力越强^[24]。结果显示，SIE-III 对 ABTS⁺ 的清除能力最强 (2.18 mg mL⁻¹)、其次为 DPPH· (3.15 mg mL⁻¹) 和 O₂⁻· (3.16 mg mL⁻¹)，而对 OH 的清除率相对较低 (3.97 mg mL⁻¹)，说明 SIE-III 在不同自由基体系中的响应存在差异。杨龙宇等^[25]在茶树鲜叶多糖研究中观察到相似模式，纯化多糖组分 CSTP-1 和 CSTP-2 对 O₂⁻ 的清除能力均显著高于对 OH 的清除能力，提示该现象可能与多糖自身结构及不同自由基反应体系特性有关。前期结构表征显示，SIE-III 呈无定形结构并具有三股螺旋构象，可能有利于维持分子链的空间稳定性，并影响活性基团的暴露程度及其与自由基的接触效率^[26]。这一抗氧化机制可能归因于多糖分子中的羟基和糖醛酸基等官能团既可通过氢原子转移机制直接提供氢原子，也可通过电子转移机制供给电子，从而将自由基还原为稳定分子^[9,27]。值得注意的是，SIE-III 整体的化学抗氧化活性均显著低于阳性对照 Vc。刘冰等^[28]研究黑果枸杞多糖时也发现，虽然各提取温度条件下的 LRP 均表现出良好的自由基清除活性，但 Vc 的清除率始终显著高于所有多糖组分。这可能是由于 Vc 属于小分子抗氧化剂，其电子供体能力和反应扩散效率更高^[29]。

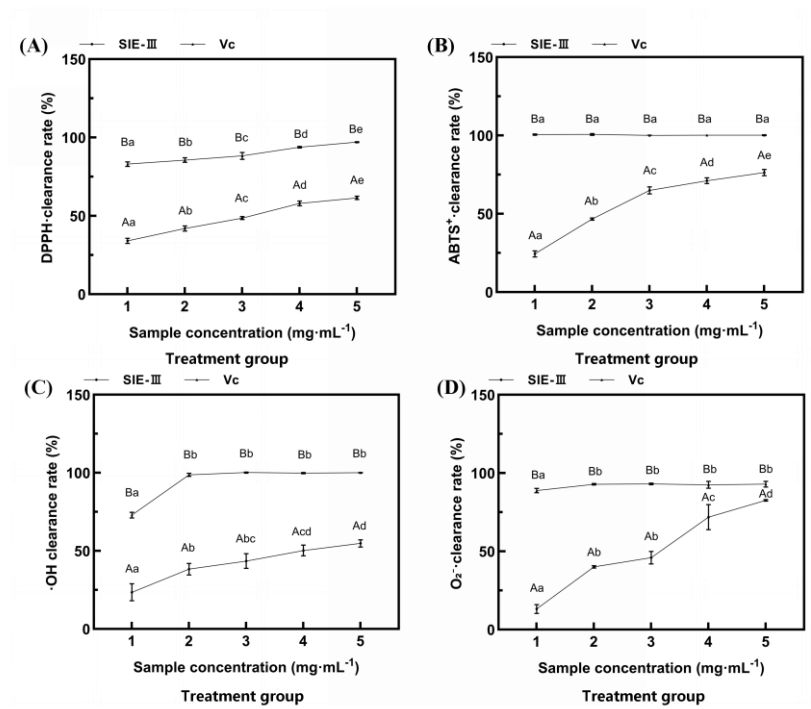


图 1 SIE-III 的体外化学抗氧化活性

Fig.1 *In vitro* chemical antioxidant activity of SIE-III

注：(A) DPPH·自由基清除活性；(B) ABTS⁺·自由基清除活性；(C) ·OH 自由基清除活性；(D) O₂·⁻自由基清除活性。大写字母表示不同处理组间的显著性差异 ($P<0.05$)，小写字母表示同处理组之间的显著性差异 ($P<0.05$)。

2.2 SIE-III生物安全性及其对 H₂O₂ 诱导细胞氧化损伤的保护作用

如图 2A 所示，与 Control 组相比，不同浓度 SIE-III 对 RAW264.7 细胞存活率均无显著影响，表明 SIE-III 没有细胞毒性作用，具有良好的生物安全性。图 2B 结果所示，H₂O₂ 模型组细胞存活率较 Control 组显著下降，表明 H₂O₂ 成功诱导细胞氧化损伤模型，导致细胞大量死亡。经过 SIE-III 干预后，细胞存活率上升。其中在 100 μg·mL⁻¹ 浓度下细胞存活率达 93.63%，接近阳性对照 Vc 组 (96.34%) 这一发现与 Sowa 等^[30]的研究结果相类似，该研究报道刺苞菊属提取物 H₂O₂ 诱导的细胞氧化损伤具有显著保护作用，细胞存活率恢复至 85%。表明 SIE-III 在 H₂O₂ 诱导的氧化应激模型中可有效保护细胞，提高细胞的存活率。

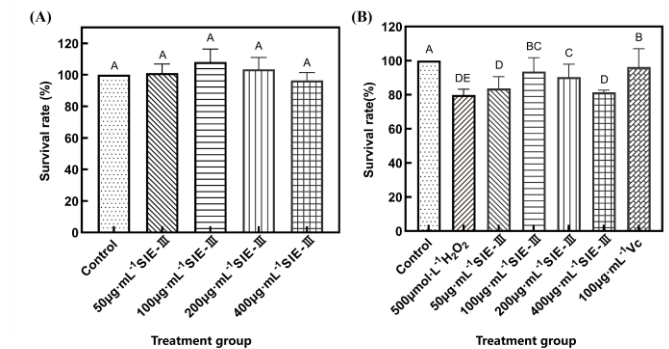


图 2 SIE-III 对 RAW264.7 细胞的细胞毒性及其对 H₂O₂ 诱导下细胞存活率的影响

Fig.2 Cytotoxicity of SIE-III on RAW264.7 cells and its protective effect on cell viability under H₂O₂ induction

注：(A) 细胞毒性；(B) H₂O₂ 诱导下的细胞保护作用。不同大写字母表示组间具有显著性差异 ($P<0.05$)。下图同。

2.3 SIE-III通过激活内源性抗氧化系统缓解氧化应激

基于化学抗氧化活性结果分析,本研究进一步从细胞层面揭示了 SIE-III的抗氧化机制。如图 3 所示, H₂O₂ 组细胞的抗氧化防御系统较 Control 组受到显著破坏,具体表现为 SOD、CAT 及 GSH-Px 活性均显著降低,并伴随着 GSH 水平明显下降。这一系列抗氧化系统的失衡加剧了细胞内氧化应激水平,导致脂质过氧化终产物 MDA 含量显著上升,这表明细胞膜结构遭受了严重的氧化损伤^[31]。经 SIE-III干预后,100 μg·mL⁻¹ 浓度表现出最佳保护效果,能同时提升 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性,并有效恢复细胞内 GSH 含量。这种多靶点的调控作用有助于重建细胞的氧化还原稳态,从而抑制自由基链式反应,降低脂质过氧化程度,最终实现对细胞膜结构的有效保护^[32]。

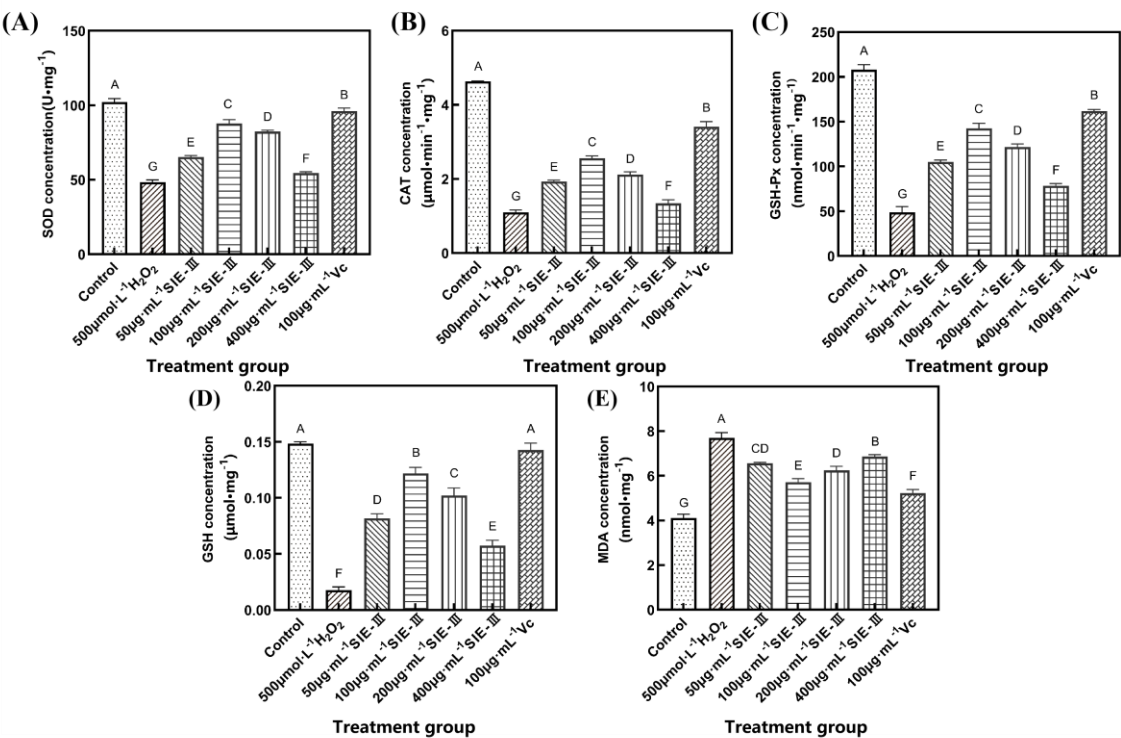


图 3 SIE-III对 H₂O₂诱导的 RAW264.7 细胞氧化应激因子表达的影响

Fig.3 Effects of SIE-III on the expression of oxidative stress factors in H₂O₂-induced RAW264.7 cells

注: (A) SOD; (B) CAT; (C) GSH-Px; (D) GSH; (E) MDA。

2.4 SIE-III对 H₂O₂ 诱导的细胞内 ROS 积累的抑制作用

为进一步评估 SIE-III的抗氧化活性,本研究通过流式细胞术检测了 H₂O₂ 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞内 ROS 水平。如图 4、5 所示,与 Control 组相比, H₂O₂ 组的 ROS 水平显著上升, FITC-A 直方图上表现通道荧光峰明显右移且分布宽泛,表明 H₂O₂ 成功诱导细胞氧化应激^[33]。值得注意的是,经 100 μg·mL⁻¹ SIE-III干预后,ROS 水平被显著抑制,荧光峰显著向左回调。这一结果表明, SIE-III具有显著的 ROS 清除能力,其分子机制可能源于分子中的活性基团可直接清除 ROS; 同时通过激活 Nrf2 等信号通路,上调 SOD、CAT 等内源性抗氧化酶表达^[34]。此外,阳性对照 Vc 组也表现出显著抑制效果。

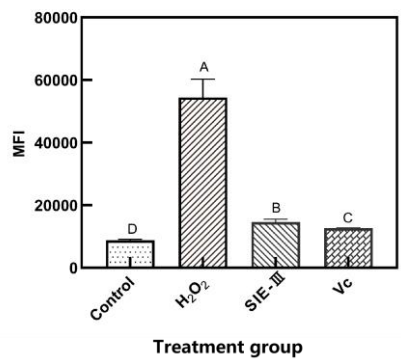


图 4 细胞内 ROS 平均荧光强度
Fig.4 Average fluorescence intensity of ROS in cells

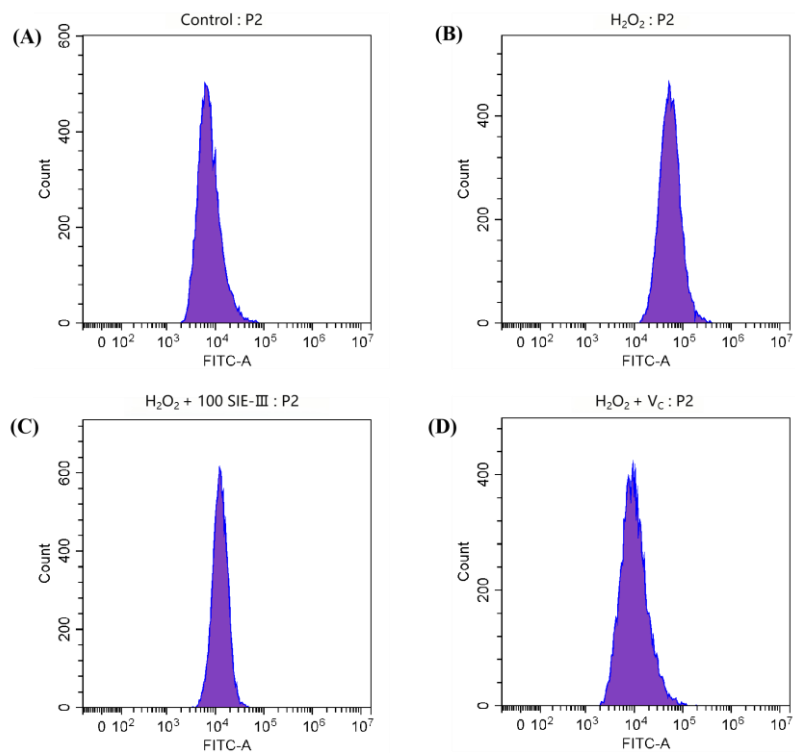


图 5 SIE-III 对 H₂O₂ 诱导的 RAW264.7 细胞内活性氧水平的影响
Fig.5 Effect of SIE-III on intracellular reactive oxygen species levels in H₂O₂-induced RAW264.7 cells

注: (A) Control; (B) H₂O₂; (C) SIE-III; (D) Vc (A) Control; (B) H₂O₂; (C) SIE-III; (D) Vc。

2.5 SIE-III对 H₂O₂ 诱导的 Nrf2 核转位的抑制作用

为阐明 SIE-III在细胞氧化应激中的调控机制,本研究通过免疫荧光技术观察了 Nrf2 的亚细胞定位变化。结果如图 6 所示,在 Control 组细胞中, Nrf2 主要分布于细胞质内,细胞核内荧光信号较弱,表明在生理状态下 Nrf2 与其抑制蛋白 Keap1 结合,处于非活化状态^[35]。经 H₂O₂ 处理后,细胞呈现典型的氧化应激形态, Nrf2 荧光强度明显增强,且在细胞核内出现可见的荧光信号积累,表明氧化应激可部分激活 Nrf2 的核转位过程,启动细胞内源性抗氧化防御机制^[36]。值得注意的是, SIE-III干预显著增强了 Nrf2 在细胞核内的荧光强度,其紫红色共定位信号明显高于 H₂O₂ 组,表明 SIE-III 能够有效促进 Nrf2 从细胞质向细胞核的转位过程。与此同时,阳性对照 Vc 组表现出较 SIE-III 组更为显著的 Nrf2 核转位增强效应,表明其在该信号通路的激活中具有更强的调控效力。

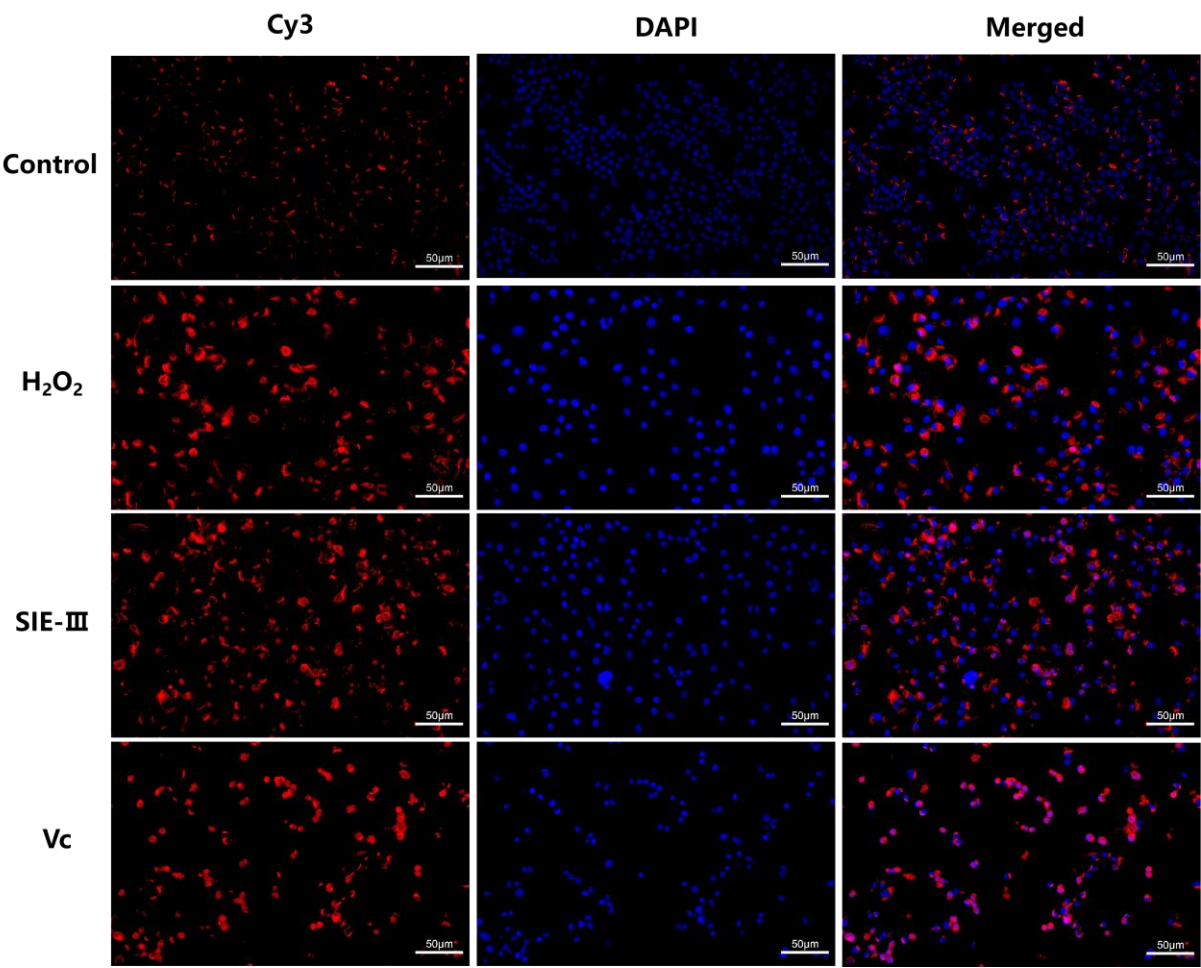


图 6 Nrf2 免疫荧光共定位染色图

Fig.6 Nrf2 immunofluorescence co-localization staining

2.6 SIE-III 对 Nrf2/Keap1/P62 信号通路的调控作用

基于上述发现，本研究进一步从蛋白表达层面深入探讨了 SIE-III 对 Nrf2/Keap1 信号通路的调控机制(图 7)。结果表明，在 H₂O₂ 诱导的氧化应激条件下，Nrf2 核蛋白表达显著升高，提示细胞启动了内源性抗氧化防御反应^[37]。SIE-III 干预进一步增强了 Nrf2 的核内表达，尽管其促进效果略低于阳性对照 Vc，但仍可有效促进 Nrf2 的核转位，提示其具有明显的转录激活潜力。与此同时，Nrf2 总蛋白表达亦呈上升趋势，表明 SIE-III 可能同时通过增强 Nrf2 的表达及其核转位来发挥抗氧化功能。在蛋白表达层面，自噬相关蛋白 P62 的表达在 SIE-III 与 Vc 干预组中均显著上调，表明自噬途径可能被激活。Mo 等^[38]研究表明，P62 作为连接自噬与抗氧化信号的关键接头蛋白，可竞争性结合 Keap1 减少其对 Nrf2 的抑制作用，从而促进 Nrf2 的释放与核转位。与此一致，Keap1 蛋白在 SIE-III 与 Vc 处理组中均显著下调，提示了 SIE-III 的抗氧化作用可能与 P62-Keap1-Nrf2 信号通路激活有关。上述蛋白表达结果与前期研究中 SIE-III 提升 SOD、CAT 及 GSH-Px 酶活性、减少 ROS 积累相互印证，提示 SIE-III 可能通过激活内源性抗氧化防御系统发挥细胞保护作用。

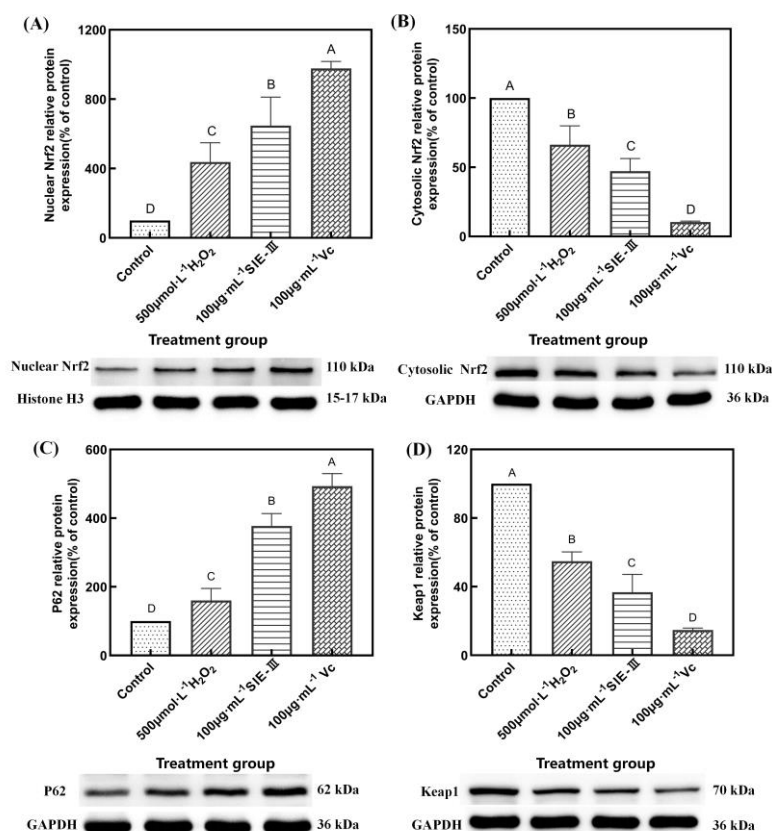


图7 SIE-III通过 Nrf2/Keap1/P62 信号通路发挥抗氧化作用

Fig.7 SIE-III exerts antioxidant effects through the Nrf2/Keap1/P62 signaling pathway

注：(A) Nuclear Nrf2 蛋白表达；(B) Cytosolic Nrf2 蛋白表达；(C) P62 蛋白表达；(D) Keap 1 蛋白表达。

2.7 SIE-III通过激活 Nrf2 通路拮抗氧化应激

如图8所示，与Control组相比， H_2O_2 可显著抑制Nrf2、HO-1、NQO1、SOD1和CAT的mRNA表达，表明细胞此时处于氧化应激状态，从而导致细胞内源性抗氧化防御功能受损^[39]。此结果与前期研究中 H_2O_2 诱导的SOD、CAT酶活性下降、GSH下降及ROS上升等表现相一致。经过SIE-III干预后，Nrf2被显著激活，进而启动下游一系列抗氧化酶基因的转录，包括显著上调HO-1、NQO1、SOD1和CAT的mRNA水平。白明健等^[40]采用弯颈霉多糖（TSP）干预 H_2O_2 诱导的MIN6细胞损伤，结果显示TSP能通过增加Nrf2表达量来提升细胞抗氧化能力，减轻自由基对细胞的损伤，其作用机制与本研究结果相互印证。与此同时，SIE-III为含RG-I结构域的果胶多糖，其高度分支的中性糖侧链及相对较低的分子量（20.831 kDa），可能有利于与巨噬细胞表面模式识别受体相互作用或促进细胞摄取，进而调控Nrf2介导的氧化还原信号转导^[41,42]。结果表明，SIE-III作为一种有效的Nrf2通路激活剂，能够通过启动细胞自身的抗氧化防御系统，在多靶点上协同对抗 H_2O_2 诱导的氧化应激。进一步揭示其在治疗氧化应激相关疾病方面的巨大潜力。

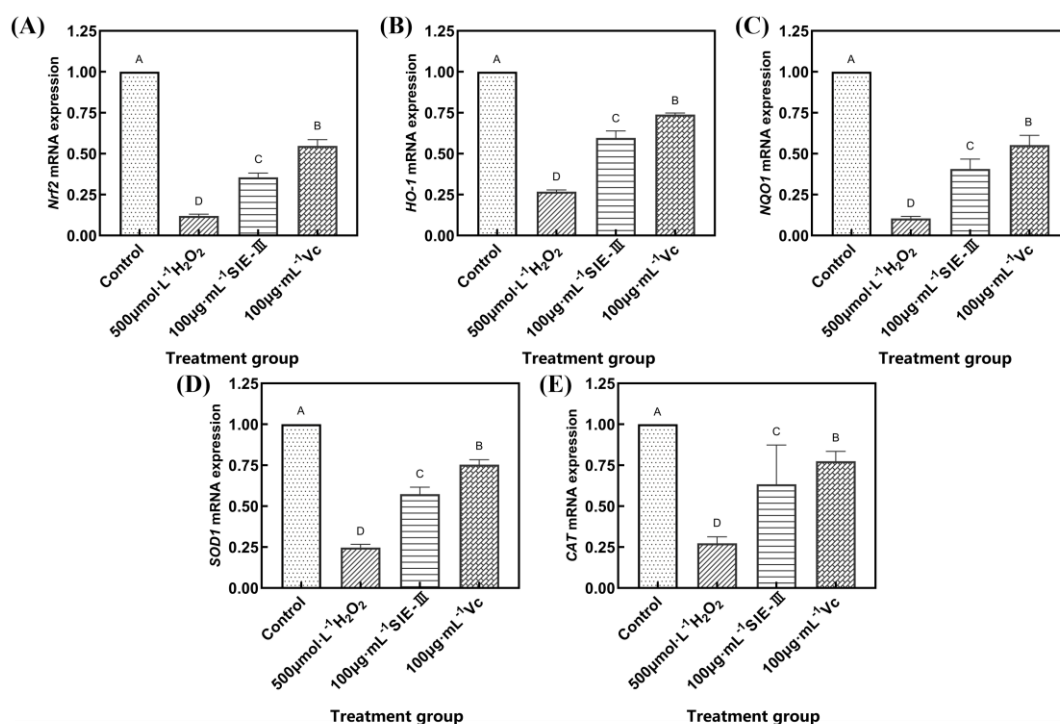


图 8 SIE-III 对 RAW264.7 细胞中抗氧化相关基因 mRNA 表达的影响

Fig.8 Effects of SIE-III on the mRNA expression of antioxidant-related genes in RAW264.7 cells

注: (A) *Nrf2*; (B) *HO-1*; (C) *NQO1*; (D) *SOD1* 和 (E) *CAT*。

3 结论

本研究系统从化学抗氧化活性、细胞保护作用及分子机制三个层面评价了猴头菇多糖 SIE-III 的抗氧化效应。在化学体系中, SIE-III 表现出广谱的自由基清除能力, 但其直接抗氧化活性弱于 Vc; 而在细胞模型中, SIE-III 展现出显著的生物学保护效应, 提示其抗氧化机制并非主要依赖于直接清除作用, 而是与细胞内源性抗氧化防御系统的调节密切相关。机制研究进一步表明, SIE-III 可上调自噬接头蛋白 P62 表达并下调 Keap1 表达, 促进 Nrf2 核转位, 进而激活下游包括 *HO-1*、*NQO1*、*SOD1*、*CAT* 在内的关键抗氧化基因转录表达。最终, 协同增强了细胞内抗氧化酶活性, 恢复 GSH 水平, 抑制 ROS 积累与脂质过氧化, 从而系统重建细胞的氧化还原稳态。上述结果提示, SIE-III 的抗氧化效应可能与其 RG-I 型结构特征密切相关。SIE-III 具有分支侧链、糖醛酸残基及三股螺旋构象等结构特征, 可能同时影响其化学清除效率及细胞内的生物利用度。综上, 本研究以含 RG-I 结构域的猴头菇多糖为对象, 初步证实其具有体外自由基清除能力和 H_2O_2 诱导细胞氧化损伤保护作用, 并提示其保护效应可能与 P62-Keap1-Nrf2 信号通路激活有关, 为同类 RG-I 型果胶多糖的抗氧化机制研究提供了参考。需要指出的是, 本研究主要基于体外化学抗氧化实验和 H_2O_2 诱导的 RAW264.7 细胞模型, SIE-III 在体内作用尚未在本研究中呈现, 其关键作用靶点及构效关系需进一步研究。基于 SIE-III 来源天然、安全性较高及对细胞氧化损伤的良好保护作用, 未来可进一步探索其在功能食品、天然抗氧化剂及药食同源产品开发中的应用潜力。

参考文献

- [1] RAGURAMAN V, L S A, J J, et al. Sulfated polysaccharide from *Sargassum tenerrimum* attenuates oxidative stress induced reactive oxygen species production in *in vitro* and in zebrafish model [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 203: 441-449.
- [2] LIU X, HUANG L, ZHANG X, et al. Polysaccharides with antioxidant activity: extraction, beneficial roles, biological mechanisms, structure-function relationships, and future perspectives: a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 300: 140221.
- [3] WEINBERG S E, CHANDEL N S. Mitochondria reactive oxygen species signaling in immune responses [J]. Immunity, 2025, 58(8): 140221.

- 1904-1921.
- [4] TRIPATHI S, KHARKWAL G, MISHRA R, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling in heavy metals-induced oxidative stress [J]. *Heliyon*, 2024, 10(18): e37545.
- [5] WANG D, WANG J, LIU Y, et al. Roles of chinese herbal medicines in ischemic heart diseases (IHD) by regulating oxidative stress [J]. *International Journal of Cardiology*, 2016, 220: 314-319.
- [6] CHEN X, WANG Y, SHEN M, et al. The water-soluble non-starch polysaccharides from natural resources against excessive oxidative stress: a potential health-promoting effect and its mechanisms [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 171: 321-330.
- [7] XU X, LIU A, HU S, et al. Synthetic phenolic antioxidants: metabolism, hazards and mechanism of action [J]. *Food Chemistry*, 2021, 353: 129488.
- [8] CHEN N, ZHANG H, ZONG X, et al. Polysaccharides from *Auricularia auricula*: preparation, structural features and biological activities [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 247: 116750.
- [9] JI X, HOU C, YAN Y, et al. Comparison of structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from jujube (*Ziziphus jujuba* mill.) fruit [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 149: 1008-1018.
- [10] CHEN Y, WANG Y, XU L, et al. Ultrasound-assisted modified pectin from unripe fruit pomace of raspberry (*Rubus chingii* hu): structural characterization and antioxidant activities [J]. *LWT*, 2020, 134: 110007.
- [11] ZHU M, HUANG R, WEN P, et al. Structural characterization and immunological activity of pectin polysaccharide from kiwano (*Cucumis metuliferus*) peels [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 254: 117371.
- [12] WU D, CHEN S, YE X, et al. Enzyme-extracted raspberry pectin exhibits a high-branched structure and enhanced anti-inflammatory properties than hot acid-extracted pectin [J]. *Food Chemistry*, 2022, 383: 132387.
- [13] LU Y, HE S, ZHAO Z, et al. Structural characteristics, gelling properties, In vitro antioxidant activity and immunomodulatory effects of rhamnogalacturonan-I rich pectic polysaccharides alkaline-extracted from wax apple (*syzygium samarangense*) [J]. *Foods*, 2025, 14(7): 1227.
- [14] QIAO Y, SHEN Y, JIANG H, et al. Structural characterization, antioxidant and antibacterial activity of three pectin polysaccharides from blueberry [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 262: 129707.
- [15] MA X, CHENG X, DU Y, et al. Pectins rich in RG-I extracted from watermelon peel: physicochemical, structural, emulsifying, and antioxidant properties [J]. *Foods*, 2024, 13(15): 2338.
- [16] GUO H, ZHANG Y, CHENG B C, et al. An ethanolic extract of the aerial part of *Siegesbeckia orientalis* L. inhibits the production of inflammatory mediators regulated by AP-1, NF- κ B and IRF3 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *BioScience Trends*, 2018, 12(3): 331-337.
- [17] 郑春雨,于雪峰,陈水林,等.豨薟草水提取物对痛风性关节炎大鼠 JNK 信号通路影响[J].中国组织工程研究,2018,22(36):5816-5820.
- [18] 殷玥,张璇,呼小娜.HPLC-ELSD 同时测定腺梗豨薟草中 6 个二萜成分的含量[J].中国兽医杂志,2024,60(1):144-150.
- [19] 李祥欣,陈笛,孙军,等.豨薟草总黄酮对癫痫大鼠海马神经元损伤及 CREB/BDNF 信号通路的影响[J].中国老年学杂志,2023,43(15):3809-3813.
- [20] LI Y H, ZENG L J, WU J Y, et al. Plasma-assisted extraction of polysaccharides from *siegesbeckia orientalis* L.: optimization, purification, and structural characterization [J]. *Polymers*, 2026, 18(13): 1568.
- [21] WEN Z S, LIU L J, OUYANG X K, et al. Protective effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* against oxidative stress in RAW264.7 cells [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 68: 98-106.
- [22] SHAO P, CHEN X, SUN P. Chemical characterization, antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 105: 261-269.
- [23] WALTERS T S, MCINTOSH D J, INGRAM S M, et al. SUMO-modification of human Nrf2 at K110 and K533 regulates its nucleocytoplasmic localization, stability and transcriptional activity [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 2021, 55(2): 141-159.
- [24] OLUGBAMI J, GBADEGESIN M, ODUNOLA O. In vitro evaluation of the antioxidant potential, phenolic and flavonoid contents of the stem bark ethanol extract of *anogeissus leiocarpus* [J]. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2014, 43(Suppl 1): 101-109.

- [25] 杨龙宇,李虎,许鹏飞,等.夏秋季‘石佛翠’茶树鲜叶多糖提取、分离纯化与抗氧化活性研究[J].茶叶学报,2023,64(6):26-36.
- [26] 王强,刘红芝,钟葵.多糖分子链构象变化与生物活性关系研究进展[J].生物技术进展,2011,1(5):318-326.
- [27] WANG S, LI G, ZHANG X, et al. Structural characterization and antioxidant activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 291: 119524.
- [28] 刘冰,马静钰,李婷,等.提取温度对黑果枸杞多糖理化特性及抗氧化、免疫调节活性的影响[J].食品工业科技,2025,46(3):61-70.
- [29] PADAYATTY S J, LEVINE M. Vitamin C physiology: the known and the unknown and goldilocks [J]. Oral Diseases, 2016, 22(6): 463-493.
- [30] SOWA I, MOŁDOCH J, DRESLER S, et al. Phytochemical profiling, antioxidant activity, and protective effect against H₂O₂-induced oxidative stress of carlina vulgaris extract [J]. Molecules, 2023, 28(14): 5422.
- [31] CORDIANO R, DI GIOACCHINO M, MANGIFESTA R, et al. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: an update [J]. Molecules, 2023, 28(16): 5979.
- [32] HANUKOGLU I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells [J]. Drug Metabolism Reviews, 2006, 38(1-2): 171-196.
- [33] JÁVEGA B, HERRERA G, MARTÍNEZ-ROMERO A, et al. Flow cytometry of oxygen and oxygen-related cellular stress [J]. Oxygen, 2023, 3(2): 222-255.
- [34] WANG Z, XING L, WANG J, et al. Porcine liver peptide ameliorates ethanol-induced liver injury via the NQO1 and ACAA1 signaling pathway through regulating oxidative stress and lipid metabolism [J]. Food Bioscience, 2025, 74: 108046.
- [35] GHANIM B Y, QINNA N A. Nrf2/ARE axis signalling in hepatocyte cellular death [J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(5): 4039-4053.
- [36] TAN J, ZHENG Y, AHN G, et al. Antioxidant properties of low-molecular-weight *Ulva prolifera* polysaccharides against H₂O₂-induced oxidative damage in BRL 3A cells and zebrafish [J]. Food Chemistry, 2026, 501: 147475.
- [37] YANG M, XIAO Y, YAN Z, et al. *Poria cocos* polysaccharide and lotus seedpod polyphenols synergistically inhibit CRFK cell damage induced by magnesium ammonium phosphate via activating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Food Bioscience, 2025, 66: 106184.
- [38] MO S, CHEN T, SHEN M, et al. Polysaccharides from *Ficus pumila* L. alleviate cigarette smoke-induced cellular senescence via modulation of Nrf2-mediated redox [J]. Food Bioscience, 2026, 76: 108262.
- [39] FAN Y, WANG W, WANG X, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharide inhibits LPS-induced inflammatory injury to mammary epithelial cells [J]. Journal of Future Foods, 2023, 3(1): 49-54.
- [40] 白明健,周颖,程昊,等.中国弯颈霉多糖抗氧化和抑制氧化应激活性研究[J].食品工业科技,2024,45(2):333-341.
- [41] WU D, ZHENG X, HU W, et al. Anti-inflammation effects of highly purified low-mw RG-I pectins on LPS-activated macrophages [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2021, 26: 100283.
- [42] TAN H, CHEN W, LIU Q, et al. Pectin oligosaccharides ameliorate colon cancer by regulating oxidative stress- and inflammation-activated signaling pathways [J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 1504.