

一种复合主食对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用

聂贝贝^{1,2} 罗武^{1,2} 郭盛祥^{1,3} 蔺姝^{1,3} 刘东波^{1,2,4}

(1. 湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南大学, 湖南 长沙 410082; 3. 国家中医药管理局亚健康干预技术实验室, 湖南 长沙 410128; 4. 湖南省代谢性疾病医学营养干预技术工程研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘要: [目的] 探究一种复合主食 (compound staple food, CSF) 对 H_2O_2 诱导人体肝癌细胞 (HepG2) 的氧化损伤的保护作用及机制。[方法] 通过 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除试验评估 CSF 的体外抗氧化能力。采用 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞建立氧化应激模型, 利用 CCK-8 法测定其对细胞存活率的影响; 通过检测活性氧 (ROS)、线粒体膜电位 (JC-1)、丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 含量, 评估 CSF 对细胞氧化应激的影响, 采用细胞流式检测 CSF 对细胞凋亡的影响, 通过 Western Blot 分析氧化损伤相关蛋白 (Nrf2、HO-1、NQO-1、Bax、Bcl2) 的表达变化。[结果] CSF 能够有效清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基。与模型组相比, 治疗组提高了 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞存活率, 降低了 ROS 水平, 减缓了线粒体膜电位下降, 增加了 SOD 活性, 降低了 MDA 含量, 并减轻了 Nrf2 核易位。CSF 处理可减少细胞凋亡率, 与模型组相比细胞凋亡率减少了 8%。Western Blot 结果表明, CSF 可上调 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 的表达, 增加 Bcl2 水平, 并下调 Bax 表达。[结论] CSF 通过激活 Nrf2/HO-1 通路、调节 Bcl2/Bax 通路改善 H_2O_2 导致的 HepG2 细胞氧化损伤。

关键词: 复合主食; HepG2 细胞; 氧化应激; 细胞凋亡; H_2O_2

Protective effect of a compound staple food against oxidative damage in HepG2 cells

NIE Beibei^{1,2} LUO Wu^{1,2} GUO Shengxiang^{1,3} LIN Shu^{1,3} LIU Dongbo^{1,2,4}

(1. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Hunan University, Changsha, Hunan 410082, China; 3. State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410128, China; 4. Hunan Provincial Engineering Research Center of Medical Nutrition Intervention Technology for Metabolic Diseases, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: [Objective] To explore the protective effect and mechanism of a compound staple food (CSF) against H_2O_2 -induced oxidative damage in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2). [Methods] The *in vitro* antioxidant capacity of CSF was evaluated using DPPH and ABTS radical scavenging assays. An oxidative stress model was established by inducing HepG2 cells with H_2O_2 , and the effect of CSF on cell viability was measured by the CCK-8 assay. The impact of CSF on cellular oxidative stress was assessed by measuring reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (JC-1), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) levels. The effect of CSF on apoptosis was detected by flow cytometry. Expression changes of oxidative damage-related proteins (Nrf2, HO-1, NQO-1, Bax, and Bcl-2) were analyzed by Western blot. [Results] CSF effectively scavenged DPPH and ABTS radicals. Compared with the model group, CSF treatment increased the viability of H_2O_2 -induced HepG2 cells, reduced ROS levels, slowed the decline of mitochondrial membrane potential, increased SOD activity, decreased MDA content, and alleviated Nrf2 nuclear translocation. CSF treatment reduced the apoptosis rate by 8% compared with the model group. Western blot results showed that CSF upregulated the expression of Nrf2, HO-1, and NQO-1, increased Bcl-2 levels, and downregulated Bax expression. [Conclusion] CSF improves H_2O_2 -induced oxidative damage in HepG2

基金项目: 郴州国家可持续发展议程创新示范区建设项目 (编号: 2023sfq38); 长沙市科技项目 (编号: kh1801123)

通信作者: 刘东波 (1971—), 男, 湖南农业大学教授, 博士。E-mail: liudongbo@hunau.net

收稿日期: 2024-11-12 **改回日期:** 2025-06-20

引用格式: 聂贝贝, 罗武, 郭盛祥, 等. 一种复合主食对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品与机械, 2025, 41(10): 132-140.

Citation: NIE Beibei, LUO Wu, GUO Shengxiang, et al. Protective effect of a compound staple food against oxidative damage in HepG2 cells[J]. Food & Machinery, 2025, 41(10): 132-140.

cells by activating the Nrf2/HO-1 pathway and regulating the Bcl-2/Bax pathway.

Keywords: compound staple food; HepG2 cells; oxidative stress; cell apoptosis; H₂O₂

据国际糖尿病联盟(IDF)统计,近年来糖尿病的患病率呈持续上升趋势,且发病年龄逐渐年轻化^[1]。在糖尿病的发病过程中,肝脏的正常功能受到严重影响,其中肝脏氧化应激和肝脏细胞凋亡起了关键作用。长期高血糖状态会使肝脏内活性氧(ROS)生成过多,导致氧化应激^[2]。过多的 ROS 攻击肝脏细胞的生物膜、蛋白质和核酸等生物大分子,破坏细胞的正常结构和功能^[3]。同时,氧化应激还会激活一系列细胞内信号通路,诱导细胞凋亡^[4]。肝脏细胞凋亡会减少具有正常糖代谢功能的肝细胞数量,进一步损害肝脏的糖代谢调节能力,从而加剧糖尿病的病情发展^[5]。

核因子红细胞 2 相关因子 Nrf2/HO-1 通路是重要的抗氧化信号通路,在应激状态下从 Keap1 结合的聚合物中释放出来转移到细胞核中,通过结合 HO-1 等基因的启动子序列而使其转录,最终激活细胞的抗氧化程序^[6]。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白,它能够通过抑制线粒体释放细胞色素 C 等凋亡因子,从而阻止细胞凋亡^[7];与之相反,Bax 是一种促凋亡蛋白,当细胞受到凋亡刺激时 Bax 会发生构象改变,从细胞质转移到线粒体膜上进而激活一系列下游的凋亡信号通路,最终导致细胞凋亡^[8];Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 蛋白家族的两个重要成员,在细胞凋亡中起关键作用^[9]。

前期临床试验^[10]表明,一种复合主食(compound staple food,CSF)结合间歇性禁食能有效缓解糖尿病 1 年以上;动物试验^[11]结果显示,CSF 结合间歇性能量限制可增强胰岛功能、调节肠道菌群组成。然而,CSF 是否通过改善肝脏细胞的氧化损伤而起着改善糖尿病的作用尚不清楚。试验拟通过研究 CSF 对 H₂O₂ 诱导人体肝癌细胞(HepG2)的氧化损伤的保护作用及机制,以期 CSF 改善糖尿病提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

人肝癌细胞系(HepG2):国家中医药管理局亚健康干预技术实验室;

DMEM 细胞培养基、0.25% EDTA-胰蛋白酶:赛默飞世尔科技有限公司;

胎牛血清:以色列 Biological Industries 公司;

Loading Buffer:上海爱必信生物科技有限公司;

NQO-1 蛋白抗体、HO-1 蛋白抗体、Bcl2 蛋白抗体、Bax 蛋白抗体:大连万类生物科技有限公司;

通用抗体(Antibody):武汉爱博泰克生物科技有限公司;

DPPH、ABST、CCK-8 试剂盒、ECL 化学发光试剂盒、

Nrf2 蛋白抗体、总 SOD 活性检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器设备

倒置荧光显微镜:Leica 型,徕卡显微系统上海贸易有限公司;

全波段酶标仪:Infinite M200 PRO 型,帝肯上海贸易有限公司;

小型蛋白垂直电泳设备:VE-180A 型,上海天能科技有限公司;

无菌培养箱:SHEL-LAB 3503-2 型,广州南方生化医学仪器有限公司;

超净台:Thermo Scientific Heraguard ECO 型,赛默飞世尔科技有限公司;

旋涡混匀仪:VORTBX-5 型,海门市其林内尔仪器制造有限公司。

1.3 复合主食来源及提取

选用的复合主食(CSF)为课题组研发的代餐食品,其以大米粉、玉米粉、小米粉、青稞粉、紫薯粉、红薯粉、马铃薯粉、荞麦粉、燕麦粉、藜麦粉、高直链玉米淀粉为主原料,以苦瓜粉、菠菜粉、复合粉(葛根、枸杞、山药、蛹虫草、桑叶、茯苓、麦芽糊精)、南瓜粉、魔芋粉、绿豆粉、大豆蛋白粉为辅料;将主、辅原料按照质量比 80:20~80:40 均匀混合并粉碎至 60~200 目,主原料与水的质量比为 100:25~100:65 均匀调质处理,采用分段式电子束照射,再进行造粒、烘干和冷却处理得到具有多元组分的慢消化淀粉颗粒^[12]。CSF 营养成分见表 1。

表 1 CSF 营养成分表

Table 1 CSF nutrients

项目	每 100 g	NRV/%
能量	1 566 kJ	19
蛋白质	7.2 g	12
脂肪	1.7 g	3
碳水化合物	81.2 g	27
钠	50 mg	3

为获得 CSF 的活性成分,称取 10 g 的粉末,溶解于 240 mL 的 70% 甲醇提取液中,放于摇床上振荡(200 r/min)提取,每 30 min 涡旋一次,每次持续 30 s,共涡旋 6 次;超声(40 kHz,功率 200 W)提取 3 次,每次 15 min。用微孔滤膜(0.45 μm)过滤样品,在 40 ℃下减压浓缩,将浓缩的 CSF 提取物放入-80 ℃冰箱冻成固态然后于真空冷冻干燥机(40 ℃减压浓缩,-80 ℃冻干成粉末)中冻干

成粉末,备用。

1.4 CSF 的自由基清除能力

1.4.1 DPPH 自由基清除率 参照辛婷等^[13]的方法并稍作修改。取 100 μL DPPH 溶液(150 $\mu\text{mol/L}$)与 100 μL CSF 提取物混合(10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1 000, 2 000, 4 000 $\mu\text{g/mL}$),用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)配制,室温避光反应 30 min,517 nm 测吸光度。按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$R_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R_1 ——DPPH 自由基清除率, %;

A_1 ——CSF 提取物+DPPH 的吸光度;

A_2 ——PBS 缓冲液+DPPH 吸光度;

A_3 ——CSF 提取物+PBS 缓冲液的吸光度。

1.4.2 ABTS 自由基清除率 参照张双等^[14]的方法并稍作修改。将 ABTS 溶液与过硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)原液等体积混合,取 50 μL 与 50 μL CSF 提取物(10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1 000, 2 000, 4 000 $\mu\text{g/mL}$)反应 10 min, 414 nm 测吸光度,按式(2)计算 ABTS 自由基清除率。

$$R_2 = \left(1 - \frac{A_4 - A_5}{A_6}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R_2 ——ABTS 自由基清除率, %;

A_4 ——CSF 提取物+ABTS 的吸光度;

A_5 ——PBS 缓冲液+ABTS 吸光度;

A_6 ——CSF 提取物+PBS 缓冲液的吸光度。

1.4.3 H_2O_2 自由基清除能力 参照赵玉红等^[15]的方法并稍作修改。取不同浓度的 CSF 提取物(50, 100, 200, 500, 1 000, 2 000, 4 000 $\mu\text{g/mL}$)各 100 μL ,加入 900 μL 的 H_2O_2 溶液[20 $\mu\text{mol/L}$,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)配制],混匀后室温孵 10 min。以 PBS 代替 CSF 提取物作为空白对照组,以 PBS 代替 H_2O_2 溶液作为溶剂对照组。在 300 nm 处测定吸光度,按式(3)计算 H_2O_2 自由基清除率。

$$R_3 = \left(1 - \frac{A_7 - A_8}{A_9}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

R_3 —— H_2O_2 自由基清除能力, %;

A_7 ——CSF 提取物+ H_2O_2 的吸光度;

A_8 ——PBS 缓冲液+ H_2O_2 吸光度;

A_9 ——CSF 提取物+PBS 缓冲液的吸光度。

1.5 细胞培养和处理

HepG2 细胞复苏后采用 DMEM 完全培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基),培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温湿润培养箱中。当细胞融合度达到 80%~90% 时,用胰酶消化传代,取对数生长期的细胞用于

后续试验。

1.6 细胞活力

HepG2 细胞(1×10^4 /孔)培养于 96 孔板中,待细胞贴壁后,根据不同分组同时加入 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ CSF 提取物培养 24 h,再换成 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 6 h 后,每孔加入 10 μL CCK8 试剂,避光孵育 1 h 后于 450 nm 处用酶标仪检测 OD 值($n=6$)。按式(4)计算细胞活力。

$$C = \frac{A_{10} - A_{11}}{A_{12} - A_{11}} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

C ——细胞活力, %;

A_{10} —— H_2O_2 +CCK-8 工作液、CSF 提取物+ H_2O_2 +CCK-8 工作液吸光度;

A_{11} ——CCK8 工作液吸光度;

A_{12} ——DMEM 高糖培养基+CCK8 工作液吸光度。

1.7 ROS 含量分析

根据细胞状态调整至适当密度,取 500 μL 细胞悬液接种至经贴壁处理的 24 孔细胞培养板中,加入 50, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 CSF 提取物预处理 24 h。然后,加入 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ,再孵育 6 h。用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 遍,加入 10 μL 500 $\mu\text{g/mL}$ 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCF-DA),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗 3 遍,每孔加入 1 mL PBS,使用荧光显微镜拍摄图像。

1.8 线粒体膜电位检测

根据细胞状态调整至适当密度,取 500 μL 细胞悬液接种至经贴壁处理的 24 孔细胞培养板中。细胞生长稳定后,50, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 CSF 提取物培养 24 h 再换成 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 6 h。PBS 洗涤后,加入 1 mL 的 JC-1 染色工作液,充分混匀,于细胞培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$)中孵育 20 min;荧光显微镜下观察并拍照。

1.9 抗氧化相关酶活性测定

将细胞等量(5×10^4 个/孔)接种于 6 孔板中待细胞生长稳定后,治疗组用 50, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 CSF 提取物培养 24 h 再换成 0.6 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 6 h。用预冷 PBS 洗涤 2 次,用刮刀裂解,12 000 $\times g$ 离心 10 min。裂解液中总蛋白含量用 BCA 测定试剂盒检测。收集处理后的各组细胞,按照试剂盒说明书步骤进行操作,检测各组 HepG2 细胞上清液中的丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平。

1.10 Annexin V/PI 双染法检测细胞流式

将细胞等量(5×10^4 个/孔)接种于 6 孔板中待细胞生长稳定后,治疗组用 50, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 CSF 提取物培养 24 h 再换成 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 6 h。收集对数生长期的细胞,用胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液。然后用 PBS 洗涤细胞 1~2 次;按照试剂盒说明书,将 Annexin V-FITC(异硫氰酸荧光素标记的 Annexin V)和 PI 用适当的缓冲液进行稀释。取 100 μL 的细胞悬液,加入 5 μL

Annexin V-FITC 和 10 μL PI 轻轻混匀。然后在室温下避光孵育 10~15 min。孵育结束后,向细胞悬液中加入 400 μL 的结合缓冲液,以适当的流速将细胞悬液上样到流式细胞仪中。

1.11 Western Blot 分析

细胞接种于 6 孔板,密度为适宜,培养 24 h 待其贴壁后,细胞生长稳定后,治疗组加入 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 CSF 提取物预处理 24 h,再换成 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 6 h;模型组只加入 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 6 h。随后移除培养基,加入适量细胞裂解液,收取总蛋白。使用 BCA 蛋白测定试剂盒估计细胞裂解液中的蛋白质浓度。估计完成后,每个裂解物的 20 μg 蛋白质在凝胶上进行电泳。最后,加入适量的显影液,通过多色荧光成像系统观察目的蛋白的表达情况。

1.12 统计分析

所有试验数据均采用 GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Prism, RRID:SCR_002798) 进行分析,并以均数 $\pm$ 标准误差 (SEM) 表示。

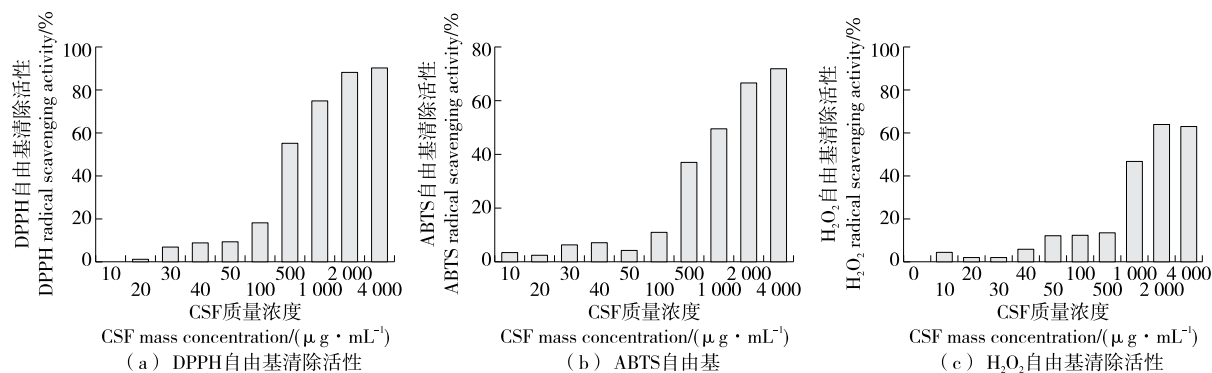


图 1 CSF 抗氧化活性

Figure 1 Antioxidant activity of CSF

2.2 CSF 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 的保护作用

如图 2(a) 所示, H_2O_2 以浓度依赖的方式降低 HepG2 细胞的活力, 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 明显抑制了 HepG2 细胞的存活率, 可使细胞活力降低至对照组的 60% 左右, 所以以 600 $\mu\text{mol/L}$ 的作为后续的造模质量浓度。CSF 质量浓度高达 1 600 $\mu\text{g/mL}$ 时, 与不加药物的对照组相比, 无明显的细胞毒性作用, 见图 2(b)。结合 CSF 的体外抗氧化活性, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的 CSF 被用于 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞抗氧化试验。

为了进一步探究 CSF 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤的保护效果, CSF 预处理 HepG2 细胞 24 h, 然后单独使用 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞 6 h。如图 2(c) 所示, CSF 显著减少了 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞毒性, 且高浓度的 CSF 保护作用更好, 说明 CSF 可有效保护 HepG2 细胞免受 H_2O_2 的损伤, 其机制可能与其抗氧化能力有关。结果表

2 结果与分析

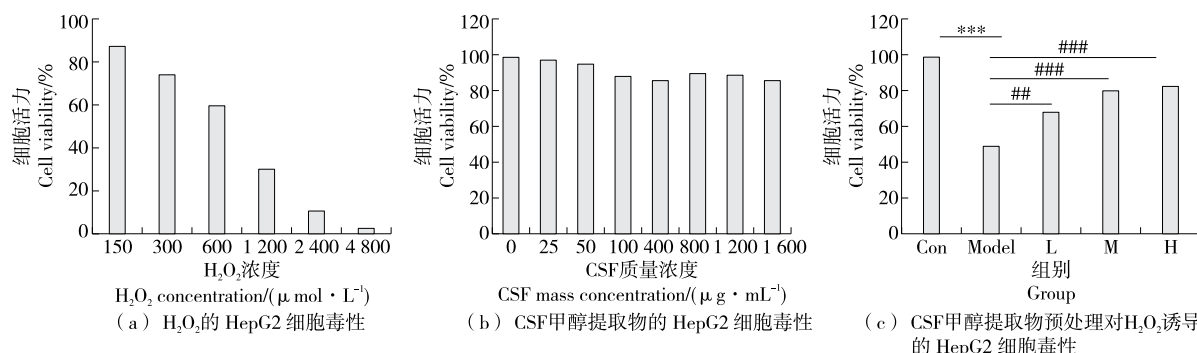
2.1 CSF 对 DPPH 自由基、ABTS 自由基、 H_2O_2 自由基的清除作用

如图 1(a)、图 1(b) 所示, CSF 以浓度依赖的方式清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基, 当 CSF 质量浓度超过 500 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其 DPPH 自由基清除率超过 60%; 当 CSF 质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其 ABTS 自由基清除率达到 50%。这与马艺超^[16]的糯米抗氧化活性成分及体外消化特性研究中相同浓度的糙米对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除率相比, CSF 的抗氧化活性更高, 并且都远远高于相同浓度下精米的; 与李静等^[17]研究的 20 种黑米抗氧化活性相比, CSF 的抗氧化能力比大多数品种黑米强, 说明 CSF 可有效清除 ABTS 自由基和 DPPH 自由基, 具有较强的抗氧化能力, 其抗氧化能力比相同浓度下的普通大米更好。如图 1(c) 所示, CSF 对 H_2O_2 自由基的清除率随着其质量浓度的增大而增加, 与马雪等^[18]超声辅助酶法提取玉米胚芽粕水解蛋白及其抗氧化活性中 H_2O_2 自由基清除能力结果相似。

明, CSF 不是在细胞外清除 H_2O_2 达到减少细胞毒性的作用, 其对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞的保护作用可能与 CSF 提前激活了 HepG2 细胞内抗氧化途径以抵抗 H_2O_2 对细胞的毒害作用有关。

2.3 CSF 对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化应激的影响

ROS 产生过多可引发氧化应激, 对细胞、组织和器官造成损伤, 而机体的抗氧化防御机制则在一定程度上可以对抗氧化应激^[19]。ROS 水平升高可引发线粒体和细胞功能障碍、代谢紊乱和细胞凋亡^[20-21]。在整个研究过程中使用的 CSF 分别为低剂量组 (50 $\mu\text{g/mL}$) 和高剂量组 (200 $\mu\text{g/mL}$)。如图 3 所示, 与对照组相比, 模型组 H_2O_2 处理后能显著增加 HepG2 细胞氧化应激水平, 细胞中 ROS 的绿色荧光强度明显大于对照组, 说明 H_2O_2 促进了 HepG2 细胞内 ROS 的产生。与模型组相比, CSF 治疗组能显著降低 HepG2 细胞中 ROS 的荧光强度, 说明 CSF 预处理能改善



L、M、H 分别为低剂量组 (50 $\mu\text{g/mL}$)、中剂量组 (100 $\mu\text{g/mL}$)、高剂量组 (200 $\mu\text{g/mL}$)；与正常对照组相比，***表示 $P < 0.001$ ；与 Model 组相比，##表示 $P < 0.01$ ，###表示 $P < 0.001$

图 2 CSF 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞的胞内保护效果

Figure 2 Intracellular protective effect of CSF on H_2O_2 -induced HepG2 cells

H_2O_2 诱导 HepG2 细胞的氧化应激，且高剂量组比低剂量组的效果更好。细胞 ROS 水平与线粒体功能密切相关^[22]，ROS 的过量产生会导致线粒体膜电位的丧失^[23]。为进一步研究 CSF 提取物在 H_2O_2 刺激下是否能保护线粒体的功能，采用 JC-1 荧光染色法测定线粒体膜电位的变化。如图 4 所示，与对照组相比， H_2O_2 处理导致线粒体膜电位的下降，红色荧光增加；CSF 治疗组红色荧光明显减少，且高剂量组效果更为明显；表明 CSF 预处理减少了 H_2O_2 引起的线粒体膜电位的下降，维持线粒体膜电位的稳定性，减少线粒体通透性转换孔的开放，减缓氧化应激损伤^[24]。综上，CSF 预处理缓解了 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞氧化应激。

为了进一步探讨 CSF 提取物对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞抗氧化能力的影响，对 HepG2 细胞 MDA 及 SOD 的活性进行检测。由图 5(a) 可知，与对照组相比， H_2O_2 诱导能明显促进 HepG2 细胞 MDA 的生成，MDA 生成量比对照组明显高；与模型组相比，治疗组能明显降低 HepG2 细胞中 MDA 的生成。由图 5(b) 可知，与对照组相比，模型组 H_2O_2 刺激能显著降低 HepG2 细胞中 SOD 的活性；与模型组相比，治疗组 CSF 提取物预处理后能提高 HepG2 细胞 SOD 的活性。这与郭笑等^[25]对药食同源药材蛹虫草提取物抗氧化作用的研究结果相似。综上，CSF 提取物提高了抗氧化酶 SOD 的活性，显著降低了 MDA 水平，且高浓度的效果比低浓度的更好，这证明 CSF 能减少由 H_2O_2 诱导的氧化应激。

2.4 CSF 对 HepG2 细胞 Nrf2/HO-1/NQO1 信号通路的影响

先前的研究^[24]表明，Nrf2/HO-1 信号通路可减少细胞中 ROS 的产生。正常情况下，Nrf2 固定在细胞质中，与蛋白 Keap1 结合呈低活性状态，而在抗氧化应激状态下 Nrf2 与 Keap1 解离，磷酸化活化后进入细胞核，促进抗氧化分子 HO-1 的表达^[26]。在免疫荧光染色试验中，绿色荧光标记 Nrf2 蛋白，细胞核中较强的绿色荧光信号提示 Nrf2 核易位增加^[27]。如图 6 所示，在 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞中，模型组中细胞核 Nrf2 明显增多；治疗组胞质中绿色荧光

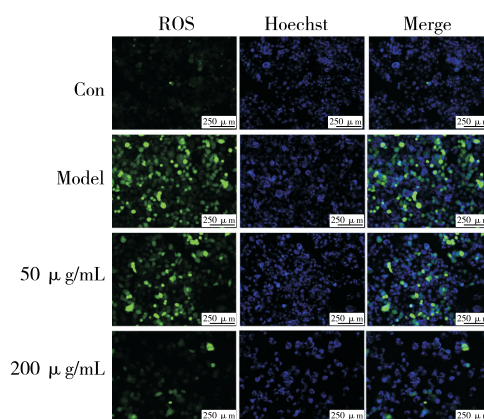


图 3 DCF 荧光强度定量分析 ROS 水平

Figure 3 Quantitative analysis of ROS levels by DCF fluorescence intensity

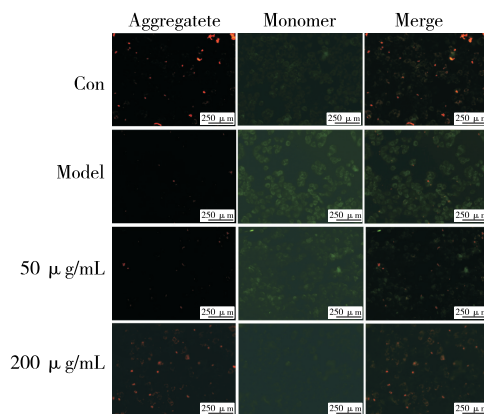
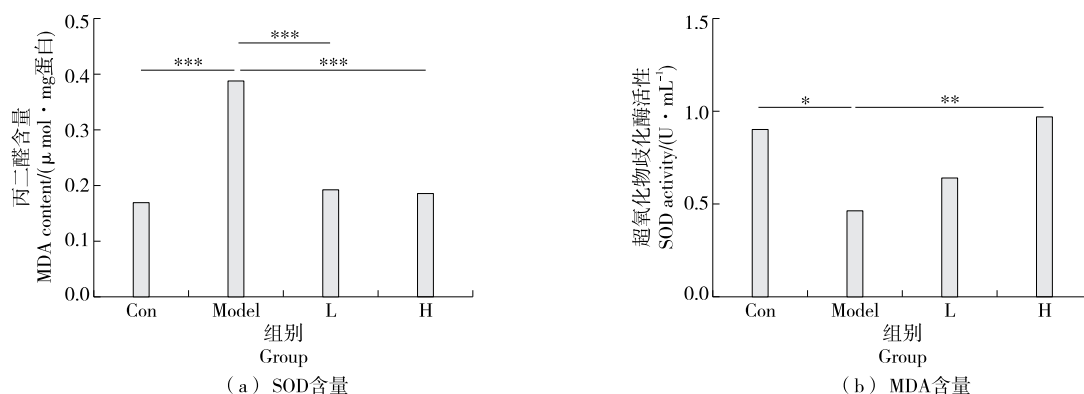


图 4 JC-1 染色追踪线粒体膜电位荧光成像

Figure 4 JC-1 staining for fluorescence imaging tracking of mitochondrial membrane potential

明显增强，证明 Nrf2 从核内易位到胞质内。所以 CSF 预处理通过抑制 Nrf2 核易位增强来减轻氧化应激。

如图 7 和图 8 所示，与对照组相比，模型组中抗氧化



L、M 分别为低剂量组 (50 μg/mL)、高剂量组 (200 μg/mL); 与 Model 组相比, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$

图 5 SOD 和 MDA 含量分析

Figure 5 Analysis of SOD activity and MDA content

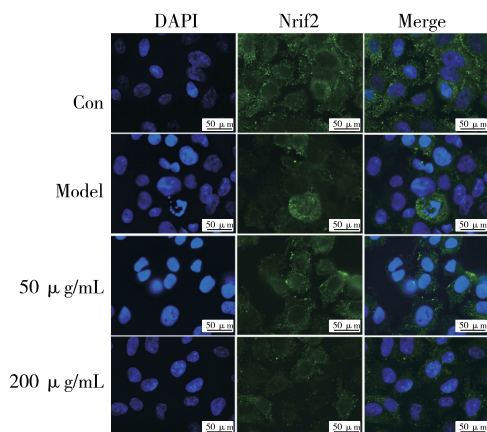


图 6 Nrf2 免疫荧光

Figure 6 Nrf2 immunofluorescence

蛋白 Nrf2、HO-1 和 NQO1 显著下调; 而与模型组相比, 治疗组 Treat (200 μg/mL 的高剂量组 CSF 提取物) Nrf2、HO-1 和 NQO1 又有所上调。表明 CSF 提取物通过对 Nrf2/HO-1/NQO1 信号通路激活的影响来缓解 H₂O₂ 刺激产生的氧化应激。

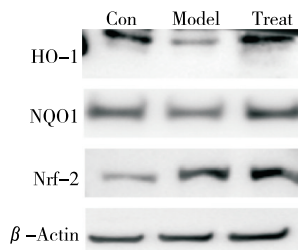
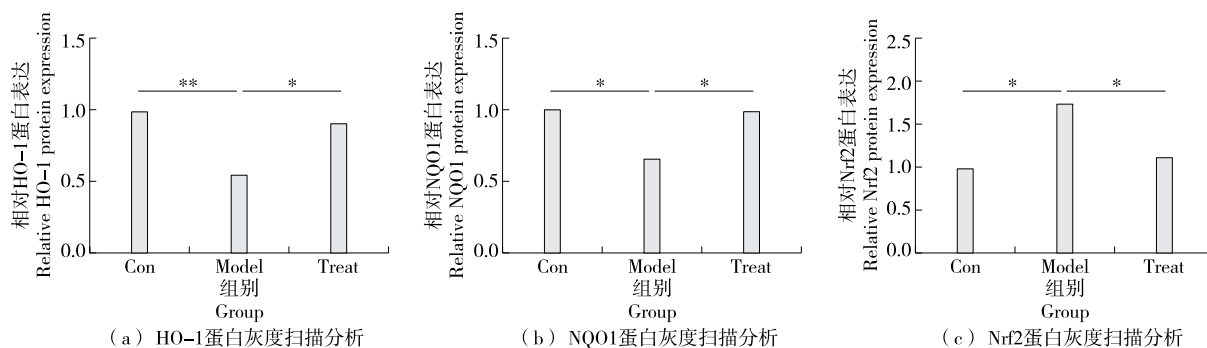


图 7 Western blotting 检测 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达

Figure 7 Detection of the expression of Nrf2, NQO1 and HO-1 proteins by Western blot

2.5 CSF 对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞损伤凋亡的影响

细胞凋亡被称为程序性细胞死亡, 是受损或无功能细胞自我毁灭的自然调控过程^[28]。如图 9 所示, 对照组细胞凋亡率为 9.97%, 模型组凋亡率达到 20.02%, 50 μg/mL CSF 治疗组的细胞凋亡率为 15.38%, 200 μg/mL CSF 治疗组的细胞凋亡率为 12%; 与模型组相比, 治疗组细胞凋亡率 CSF 预处理 HepG2 细胞可减轻由过氧化氢遇到的细胞凋亡, 且高浓度组的效果更佳。这与梁盈等^[29]大米活性肽对氧化损伤 HUVEC 细胞凋亡流式检测结果相似, 综



与 Model 组比较, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$

图 8 Western blotting 检测核蛋白 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 蛋白灰度扫描分析

Figure 8 Grayscale scanning analysis of nuclear proteins HO-1, NQO1 and Nrf2 detected by Western blot

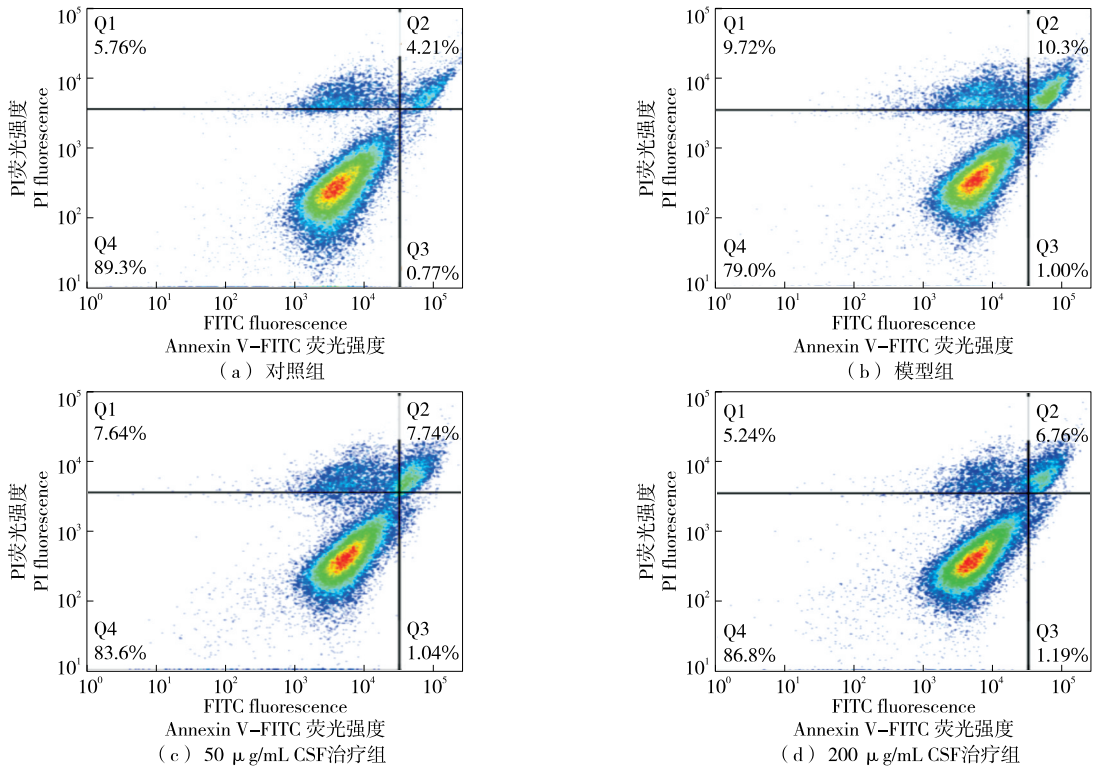


图 9 细胞凋亡流式

Figure 9 Flow cytometry of cell apoptosis

上,CSF对 H_2O_2 诱导的HepG2细胞损伤凋亡有保护作用。

Bcl-2与Bax蛋白是细胞存活与凋亡方面较为常见的衡量指标,其中Bcl-2有抗凋亡的能力,Bax有促进凋亡的特性。一旦Bax出现过度表达的情况,凋亡细胞针对死亡信号所产生的反应就会变得更强;Bcl-2过度表达对细胞凋亡起到抑制作用^[30]。如图10和图11所示,与对照组相比,模型组的抗凋亡蛋白Bcl2明显下调,促凋亡蛋白Bax明显上调;经过200 $\mu\text{g/mL}$ CSF处理后,Bcl2蛋白明显上调,而Bcl2蛋白含量明显下调。所以CSF预处理可减轻

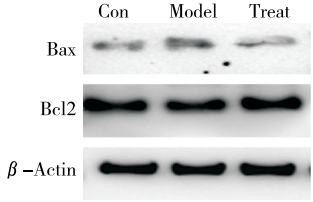
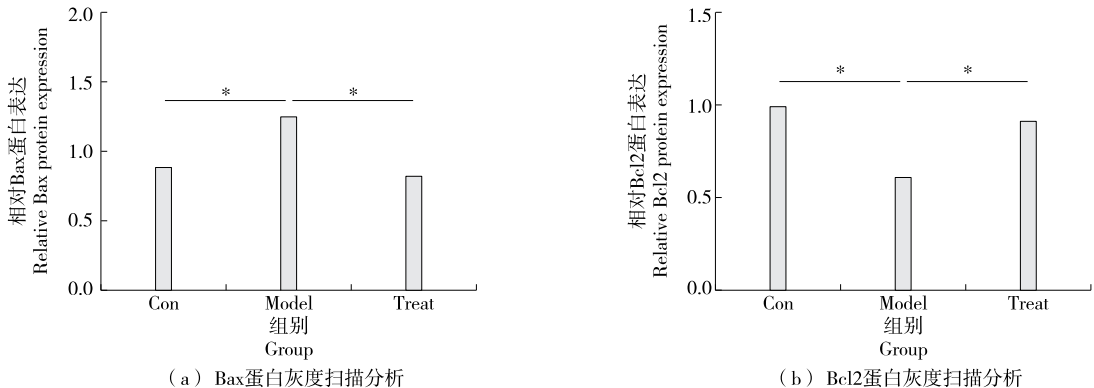


图 10 Western blotting 检测核蛋白 Bcl2、Bax 表达

Figure 10 Detection of the expression of nuclear proteins Bcl2 and Bax by Western blot



*表示与 Model 比较 $P < 0.05$

图 11 Western blotting 检测核蛋白 Bcl2、Bax 灰度扫描分析

Figure 11 Grayscale scanning analysis of nuclear proteins Bcl2 and Bax detected by Western blot

HepG2 细胞凋亡损伤。

3 结论

该研究从氧化应激和细胞凋亡的角度探讨了一种复合主食对肝细胞氧化损伤的保护作用。研究表明,该复合主食预处理能够有效清除人体肝癌细胞中由 H_2O_2 诱导产生的活性氧,并通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,促进超氧化物歧化酶等抗氧化酶的表达,从而抑制活性氧和丙二醛的生成。此外,复合主食还通过调节 Bcl-2 与 Bax 蛋白的平衡,减轻细胞凋亡。综上,复合主食具有显著的抗氧化和抗凋亡作用,能够有效保护人体肝癌细胞免受氧化损伤。

参考文献

- [1] 陈京蓉, 罗书全, 赖英旭, 等. 重庆市成年居民膳食蛋白质摄入与 2 型糖尿病的相关性分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2025, 36(1): 79-82.
CHEN J R, LUO S Q, LAI Y X, et al. Correlation between dietary protein intake and type 2 diabetes in adult residents of Chongqing[J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2025, 36(1): 79-82.
- [2] LOUVET A, MATHURIN P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2015, 12(4): 231-242.
- [3] LAI J Q, ZHAO L L, HONG C, et al. Baicalein triggers ferroptosis in colorectal cancer cells via blocking the *JAK2/STAT3/GPX4* axis[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2024, 45(8): 1 715-1 726.
- [4] 张晓东, 李文冬, 陈景荷, 等. 山茱萸总苷抑制高糖诱导的人肾小管上皮细胞系 HK-2 凋亡和氧化损伤[J]. 基础医学与临床, 2024, 44(12): 1 644-1 650.
ZHANG X D, LI W D, CHEN J H, et al. Total cornus officinalis glycosides inhibit high glucose-induced cell apoptosis and oxidative damage of human renal tubular epithelial cell line HK-2[J]. Basic and Clinical Medicine, 2024, 44(12): 1 644-1 650.
- [5] KARKUCINSKA-WIECKOWSKA A, SIMOES I C M, KALINOWSKI P, et al. Mitochondria, oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: a complex relationship[J]. European Journal of Clinical Investigation, 2022, 52(3): e13622.
- [6] HE M H, PAN H, CHANG R C, et al. Activation of the *Nrf2/HO-1* antioxidant pathway contributes to the protective effects of Lycium barbarum polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage[J]. Public Library of Science One, 2014, 9(1): e84800.
- [7] 李春娣, 张薇, 张玲, 等. 丹参酮 IIA 对 Lewis 肺癌小鼠 *Bcl-2* 及 *Bax* 表达的影响[J]. 当代医学, 2011, 17(3): 39-40.
LI C D, ZHANG W, ZHANG L, et al. Effect of tanshinone IIA on expression of *Bcl-2* and *Bax* in Lewis lung cancer mice[J]. Contemporary Medicine, 2011, 17(3): 39-40.
- [8] HE B, WU F, LI X H, et al. Mitochondrial dependent pathway is involved in the protective effects of carboxymethylated chitosan on nitric oxide-induced apoptosis in chondrocytes[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2020, 20(1): 23.
- [9] 陈桂玲, 廖晓凤, 孙鹏涛, 等. 澳洲茄碱通过调控 *Bcl-2/Bax/caspase-3* 信号通路促进非小细胞肺癌发生凋亡[J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(6): 1 109-1 116.
CHEN G L, LIAO X F, SUN P T, et al. Solasonine promotes apoptosis of non-small cell lung cancer by regulating the *Bcl-2/Bax/caspase-3* pathway[J]. Journal of Southern Medical University, 2024, 44(6): 1 109-1 116.
- [10] YANG X, ZHOU J L, SHAO H G, et al. Effect of an intermittent calorie-restricted diet on type 2 diabetes remission: a randomized controlled trial[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2023, 108(6): 1 415-1 424.
- [11] LUO W, ZHOU J L, YANG X, et al. A Chinese medical nutrition therapy diet accompanied by intermittent energy restriction alleviates type 2 diabetes by enhancing pancreatic islet function and regulating gut microbiota composition[J]. Food Research International, 2022, 161: 111744.
- [12] 刘东波, 李坚, 王蕾, 等. 一种具有多元组分的慢消化淀粉颗粒及其加工方法: CN114617220B[P]. 2022-06-17.
LIU D B, LI J, WANG L, et al. A slowly digestible starch granule with multiple components and its processing method: CN114617220B[P]. 2022-06-17.
- [13] 辛婷, 王钊, 李长滨, 等. 发酵法制备蛹虫草多肽工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2025, 41(4): 148-154.
XIN T, WANG Z, LI C B, et al. Optimization of the preparation process of *Cordyceps militaris* polypeptides through fermentation technology and evaluation of antioxidant activity[J]. Food & Machinery, 2025, 41(4): 148-154.
- [14] 张双, 韩荣欣, 王欣, 等. 酸枣仁蛋白的不同蛋白酶解产物功能特性及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 31-39.
ZHANG S, HAN R X, WANG X, et al. Study on the functional properties and antioxidant activities of different enzymatic hydrolysates of ziziphi spinosae semen protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 31-39.
- [15] 赵玉红, 金秀明, 韩睿. 鹿茸多糖分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 155-158.
ZHAO Y H, JIN X M, HAN R. Purification and antioxidant activity of polysaccharide from velvet antler[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(12): 155-158.
- [16] 马艺超. 粳米抗氧化活性成分及体外消化特性[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023: 45-58.
MA Y C. Antioxidant active components and digestive properties invitro of japonica rice[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2023: 45-58.
- [17] 李静, 焦雪, 华泽田, 等. 20 种黑米的总酚含量与抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(20): 25-29.

- LI J, JIAO X, HUA Z T, et al. Total phenolic contents of 20 varieties of black rice and antioxidant activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(20): 25-29.
- [18] 马雪, 张雅娜, 郭丽, 等. 超声辅助酶法提取玉米胚芽粕水解蛋白及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(10): 165-170.
- MA X, ZHANG Y N, GUO L, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of maize germ meal hydrolyzed protein with antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2024, 45(10): 165-170.
- [19] 肖红, 罗红, 张宇菲, 等. 丹酚酸 B 对 2 型糖尿病小鼠心肌病氧化应激的作用及机制[J]. 贵州医科大学学报, 2024, 49(8): 1 093-1 109.
- XIAO H, LUO H, ZHANG Y F, et al. Effect of salvianolic acid B on oxidative stress in mice with type 2 diabetic cardiomyopathy and its mechanism[J]. Journal of Guizhou Medical University, 2024, 49(8): 1 093-1 109.
- [20] YU W, FU Y C, ZHOU X H, et al. Effects of resveratrol on H₂O₂-induced apoptosis and expression of SIRT3 in H9c2 cells [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2009, 107(4): 741-747.
- [21] SAADA H N, SAID U Z, MEKY N H, et al. Grape seed extract vitis vinifera protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats[J]. Phytotherapy Research, 2009, 23(3): 434-438.
- [22] 申屠路媚, 牟艳玲. 线粒体功能障碍机制及其相关疾病研究进展[J]. 生命科学, 2018, 30(1): 87-93.
- SHENTU L M, MOU Y L. Research progress in mitochondrial dysfunction and its related diseases[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2018, 30(1): 87-93.
- [23] 雷义, 金文达, 陈锋. 活性氧与线粒体损伤[J]. 南华大学学报(医学版), 2006(5): 648-649, 657.
- LEI Y, JIN W D, CHEN F. Reactive oxygen species and mitochondrial damage[J]. Journal of Nanhua University (Medical Edition), 2006(5): 648-649, 657.
- [24] 陈秀楠, 王瑞琦, 单红英, 等. 槲皮素通过抑制 p38 MAPK/NOX4 信号通路减轻 H₂O₂ 诱导的人子宫内膜基质细胞氧化应激损伤[J]. 四川大学学报(医学版), 2024, 55(3): 552-558.
- CHEN X N, WANG R Q, SHAN H Y, et al. Quercetin alleviates H₂O₂-induced oxidative stress damage to human endometrial stromal cells by inhibiting the p38 MAPK/NOX4 signaling pathway[J]. Journal of Sichuan University (Medical Sciences), 2024, 55(3): 552-558.
- [25] 郭笑, 林睿, 叶思萍, 等. 蛹虫草活性成分的提取分离及体外抗氧化作用研究[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(5): 357-362.
- GUO X, LIN R, YE S P, et al. Extraction and separation of active components from *Cordyceps militaris* and antioxidant effect *in vitro*[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2022, 57(5): 357-362.
- [26] HAS A L, ALOTAIBI M F, BIN-JUMAH M, et al. Olea europaea leaf extract up-regulates Nrf2/ARE/HO-1 signaling and attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat kidney[J]. Biomedecine & Pharmacotherapie, 2019, 111: 676-685.
- [27] 张妮, 陈兰英, 骆瑶, 等. 降香新黄酮 latifolin 通过 Nrf2/HO-1 通路抗 H9c2 细胞缺氧复氧损伤作用研究[J]. 中药材, 2019, 42(7): 1 629-1 634.
- ZHANG N, CHEN L Y, LUO Y, et al. Study on the antihypoxia-reoxygenation injury effect of latifolin, a new flavonoid from *Dalbergia odorifera*, on h9c2 cells via Nrf2/HO-1 pathway[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2019, 42(7): 1 629-1 634.
- [28] KIM G N, JANG H D. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009, 1 171: 530-537.
- [29] 梁盈, 王荣, 田明慧, 等. 大米活性肽对 H₂O₂ 诱导 HUVEC 氧化损伤的保护作用研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(12): 1-5, 11.
- LIANG Y, WANG R, TIAN M H, et al. The protective effects research of RBP on oxidative damage in HUVEC induced by H₂O₂[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2016, 31(12): 1-5, 11.
- [30] 王瑞楠, 马宏婷, 铁芳芳, 等. 葫芦巴碱对 H₂O₂ 诱导 LO2 肝细胞氧化损伤的保护作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(2): 294-299.
- WANG R N, MA H T, TIE F F, et al. Protective effect and mechanism of trigonelline on oxidative injury of LO2 hepatocytes and its mechanism[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2023, 39(2): 294-299.