

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.60036

二氢杨梅素及其酰化衍生物对肝细胞氧化损伤的保护作用

The protection effect of dihydromyricetin and its acylated derivatives on oxidative damage of hepatocytes

杜宝双¹ 陈尚卫¹ 李玥² 朱松¹

DU Bao-shuang¹ CHEN Shang-wei¹ LI Yue² ZHU Song¹

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122;

2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. Food College, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:目的: 考察二氢杨梅素(DHM)及其衍生物对肝细胞氧化损伤的保护作用。方法: 建立 L02 细胞过氧化氢损伤模型, 通过酶法酰化修饰 DHM 得到不同亲脂性的 DHM 衍生物, 再通过测定活性氧(ROS)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)水平、线粒体膜电位和 Caspase 3 水平评估 DHM 及其衍生物对肝损伤细胞的保护作用。结果: 除 3-O-月桂酰化二氢杨梅素外, 其余衍生物处理后的肝损伤细胞中活性氧(ROS)、乳酸脱氢酶(LDH)的释放和丙二醛(MDA)水平显著降低, 抗氧化酶系水平升高, 线粒体膜电位升高, Caspase 3 水平降低, 其中 3-O-辛酰化二氢杨梅素的保护效果最好。结论: 中等链长二氢杨梅素衍生物有较好的护肝效果。

关键词: 二氢杨梅素; 衍生物; 肝细胞; 氧化损伤

Abstract: Objective: This study aimed to investigate the protective effect of dihydromyricetin (DHM) and its derivatives on oxidative damage of hepatocytes. **Methods:** The hydrogen peroxide damage model of L02 cells was established. DHM derivatives with different lipophilicity were obtained by enzymatic acylation of DHM. The levels of reactive oxygen species (ROS), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), and mitochondrial membrane potential and Caspase 3 were measured to evaluate the protective effect of DHM and its derivatives on damaged hepatocytes. **Results:**

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31871794)

作者简介: 杜宝双, 女, 江南大学在读硕士研究生。

通信作者: 朱松(1979—), 男, 江南大学研究员, 博士。

E-mail: zhusong@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2022-04-05

Except for 3-O-lauroyl-DHM, the level of reactive oxygen species (ROS) the release of lactate dehydrogenase (LDH) and the level of malondialdehyde (MDA) and Caspase 3 in damaged hepatocytes treated with other derivatives decreased significantly, while the levels of antioxidant enzymes and the mitochondrial membrane potential increased. Of which, 3-O-octanoyl-DHM showed the best protective effect. **Conclusion:** Dihydromyricetin derivatives with medium chain length have better liver protection effect.

Keywords: dihydromyricetin; derivatives; hepatocytes; oxidative damage

大部分的肝损伤疾病如肝硬化、肝纤维化等, 都伴随着由细胞氧化应激以及脂质过氧化^[1]引起的肝细胞氧化损伤。

二氢杨梅素(DHM)是一种苷元类黄酮化合物, 主要来源于药食同源植物显齿蛇葡萄^[2], 具有抗菌、抗氧化、抗炎、护肝、调节糖代谢等生物功能^[3-4]。有研究发现二氢杨梅素可以通过调节抗氧化指标和抗炎因子抑制氧化应激从而减轻小鼠肝脏氧化损伤^[5], 且在油酸诱导的 L02 细胞和 HepG2 细胞肝脂肪变性模型中, 二氢杨梅素具有抑制细胞凋亡、脂质积累和氧化应激的作用^[6]。但由于二氢杨梅素亲脂性差, 在生物体系中不易透过脂质双分子层, 使其转运吸收缓慢, 限制了其在肝脏中的利用。

目前, 可以通过酰化修饰提高 DHM 的脂溶性, 即选择合适的酰基供体取代二氢杨梅素分子上对其活性影响较小的羟基基团, 进而降低其极性^[7]。其中, 酶法酰化是常用的酰化方法, 该方法绿色环保、过程简单且选择性强^[8]。因此研究拟建立人正常肝细胞氧化损伤模型, 通过酶法酰化修饰 DHM 得到不同亲脂性的 DHM 衍生物,

考察 DHM 及其衍生物对肝细胞氧化损伤模型的保护机制,以期对二氢杨梅素应用于生物体系提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

二氢杨梅素、槲皮素:纯度>98%,合肥博美生物科技有限公司;

固定化脂肪酶(Lipozyme TL IM):250 U/g,诺维信生物技术有限公司;

丁酸乙 烯酯、己酸乙 烯酯、辛酸乙 烯酯和己酸乙 烯酯:东京化成工业株式会社;

30%过氧化氢(H₂O₂)、甲基叔丁基醚:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

PMSF 蛋白酶抑制剂、ROS 试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、RIPA 细胞裂解液、Caspase 3 活性检测试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司;

胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素双抗(100×)、磷酸缓冲液(PBS):Thermo Fisher Scientific 公司;

MTT 试剂盒、LDH 检测试剂盒、BCA 试剂盒、MDA 检测试剂盒、总 SOD 活性检测试剂盒、CAT 检测试剂盒、GSH-PX 检测试剂盒:南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

倒置荧光显微镜:ECLISE Ti2 型,美国尼康公司;

高速冷冻离心机:Centrifuge 5415R 型,德国艾本德公司;

雪花制冰机:FMB40 型,无锡沃信有限公司;

全波长酶标仪:Multiskan GO1510 型,赛默飞科技有限公司;

磁力搅拌器:RET 型,IKA 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 DHM 衍生物制备 在反应瓶中依次加入 10 mL 甲基叔丁基醚,0.18 mmol DHM 和 0.4 U/mg DHM 的固定化脂肪酶,再分别加入 3.6 mmol 不同碳链的脂肪酸乙 烯酯,上述反应体系在 50 °C、200 r/min 下反应 72 h。然后分离纯化样品,冷冻干燥后得到 5 种 3-O-酰化二氢杨梅素,分别为 3-O-乙 酰化二氢杨梅素(C2-DHM)、3-O-丁 酰化二氢杨梅素(C4-DHM)、3-O-己 酰化二氢杨梅素(C6-DHM)、3-O-辛 酰化二氢杨梅素(C8-DHM)和 3-O-月 桂 酰化二氢杨梅素(C12-DHM)。

1.3.2 H₂O₂ 损伤浓度确定 在 96 孔板中培养(7×10⁵个/孔,100 μL)24 h,将细胞分成 2 组,一组加入 100 μL 不完全培养基(含 1%双抗但不含 FBS),另一组加入 100 μL 含 H₂O₂(200,300,400,500,600 μmol/L)的培养基。孵育 4 h 后,按照 MTT 试剂盒说明书检测细胞增殖情况。选择细胞存活率在 50%左右的 H₂O₂ 浓度构建肝细胞氧化损伤模型。

1.3.3 肝细胞氧化损伤模型建立 将 L02 细胞分为损伤

组、保护组和对照组,置于 96 孔板中培养(1×10⁴个/孔,100 μL)24 h。随后往保护组加入 100 μL 含 DHM 或 DHM 衍生物(3.25,7.50,15.00,30.00 μmol/L)的培养基,对照组和损伤组中加入 100 μL 不完全培养基,孵育 24 h。孵育结束后,保护组和损伤组中均加入 100 μL 含适宜损伤浓度 H₂O₂ 的培养基,对照组中加入同等体积的不完全培养基,孵育 4 h,按照 MTT 试剂盒说明书检测各组细胞增值情况。选择细胞存活率最高的样品浓度作为最佳保护浓度。同时,选择槲皮素做为阳性对照。

1.3.4 DHM 及其衍生物对细胞内氧化损伤相关理化指标的影响

(1) ROS、LDH、MDA、CAT、MDA、SOD 和 GSH-PX:在 6 孔板中培养 L02 细胞(3×10⁵个/孔,2 mL)24 h,保护组中加入 2 mL 含最佳浓度样品的培养基,对照组和损伤组加入同等体积的不完全培养基,孵育 24 h 后,损伤组和保护组加入 2 mL 含 H₂O₂(400 μmol/L)的培养基,对照组加入同等体积的不完全培养基,再孵育 4 h 后吸去上清,PBS 清洗两遍。按照相应的试剂盒说明书检测培养基中 ROS、LDH、MDA、CAT、MDA、SOD 和 GSH-PX 水平,用倒置荧光显微镜拍照。

(2) 线粒体膜电位:在 6 孔板中培养 L02 细胞(3×10⁵个/孔,2 mL)24 h,保护组中加入 2 mL 含最佳浓度样品的培养基,损伤组和对照组中加入同等体积的不完全培养基,继续孵育 24 h 后,保护组和损伤组中加入 2 mL 含损伤浓度适宜的 H₂O₂ 培养基,对照组中加入同等体积的不完全培养基,再孵育 4 h 后,加入含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液处理 30 min,用移液枪吸取裂解液至离心管中,离心(15 000 r/min)得上清液。按照线粒体膜电位试剂盒说明书进行检测,使用荧光倒置显微镜进行拍照。

(3) Caspase 3:试验步骤参照 1.2.4,并按试剂盒说明书测定 Caspase 3 相对活性水平。

1.3.5 数据分析 使用 Microsoft Excel 和 Origin 2018 处理数据和绘图,并使用 IBM SPSS Statistics 22 进行显著性分析(P<0.05),所有试验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 过氧化氢损伤浓度

由图 1 可知,在 200~600 μmol/L 的浓度范围内,相同的孵育时间下,随着 H₂O₂ 浓度的增大,细胞存活率逐渐下降。一般情况下,选择细胞存活率在 50%左右的浓度或者孵育时间构建细胞氧化损伤模型^[9],因此,选择浓度 400 μmol/L 的 H₂O₂ 建模,在此浓度下孵育 4 h 细胞存活率约为 45%。

2.2 DHM 及其衍生物浓度对氧化损伤肝细胞的保护作用

由图 2 可知,在 3.25,7.50 μmol/L 浓度下,DHM 及

其衍生物处理组的细胞存活率均低于槲皮素处理组;而在 15,30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,C8-DHM 处理组的细胞存活率高于槲皮素处理组,而其他衍生物包括 DHM 处理组的细胞存活率低于槲皮素处理组,这表明,在此浓度下,C8-DHM 对肝细胞氧化损伤的保护效果高于槲皮素。在 3.25~30.00 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内,DHM 及其衍生物处理组的细胞存活率均高于损伤组,且随着浓度的增大,DHM 和 C2-DHM 处理组的细胞存活率逐渐升高;其他衍生物处理组的细胞存活率则先升高后降低。在 15 $\mu\text{mol/L}$ 时各组的细胞存活率最高,其中 C8-DHM 处理组的细胞存活率最高,达到了 88.81%,即 C8-DHM 对细胞氧化损伤的保护效果最为明显。随着亲脂性的提高,DHM 衍生物更容易与细胞膜结合并穿过细胞膜,进而参与到细胞内的自由基产生的反应过程中发挥活性,起到保护肝细胞、提高细胞活力的作用;而当取代碳链达到一定长度后,空间位阻增大,阻碍衍生物进入细胞内部且限制其与自由基的接触,从而影响了活性的发挥。

2.3 DHM 及其衍生物对细胞内 ROS 水平的影响

采用 DCFH-DA 荧光探针法检测 ROS 水平,以 DCF 荧光图像中绿色强弱作为评判。荧光图像中绿色荧光强度越弱表示 ROS 水平越低,反之则表示 ROS 水平越

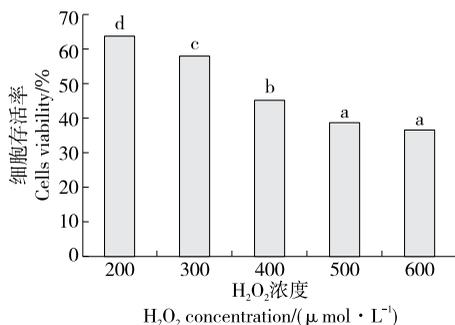
高^[10]。荧光结果为对照组的图像中几乎无绿色荧光,而 H_2O_2 损伤组的绿色荧光强度明显增强,可见损伤组的细胞被 H_2O_2 刺激后产生并累积了过量的 ROS;相较于损伤组,DHM 及其衍生物处理组的荧光强度明显减弱,表明 DHM 及其衍生物均能抑制细胞内 ROS 的产生。当取代碳链长度从 C0 增加到 C8 时,细胞内的荧光强度越来越弱,ROS 水平逐渐降低;取代碳链长度从 C8 增加到 C12 时,细胞内的荧光强度稍有增强,ROS 水平提高。

2.4 DHM 及其衍生物对细胞 LDH 释放的影响

由图 3 可知,与损伤组相比,DHM 及其衍生物处理组细胞培养液中的 LDH 水平明显下降($P < 0.05$),且随着取代碳链长度的增长,细胞胞外 LDH 的活性呈先降低后升高的趋势,其中,C8-DHM 处理组细胞培养液中 LDH 的活性最低,降到了 384.56 U/L。综上,DHM 及其衍生物可以通过保护细胞膜以提高细胞活力,其中,C8-DHM 的效果最好。

2.5 DHM 及其衍生物对 MDA 水平的影响

由图 4 可知,与损伤组相比,DHM 及其衍生物处理组的 MDA 水平显著降低($P < 0.05$),除 C2-DHM 处理组外,其余衍生物处理组的 MDA 水平均低于 DHM 处理



小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)
图 1 H_2O_2 对 L02 细胞存活率的影响

Figure 1 Effects of H_2O_2 on the survival rate of L02 cells

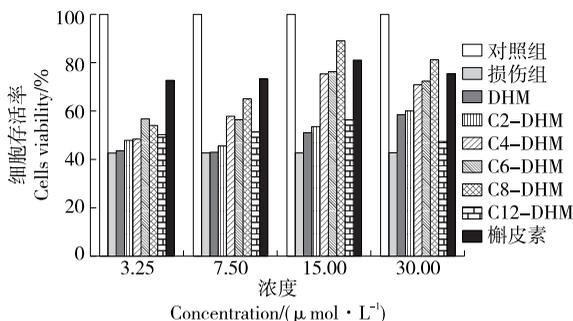
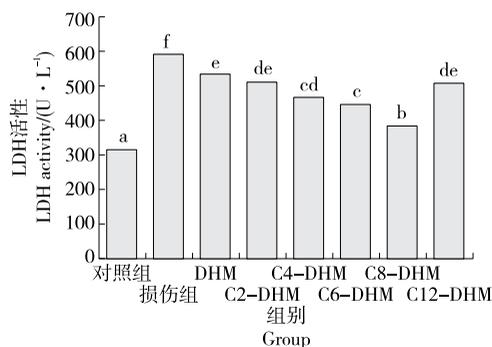


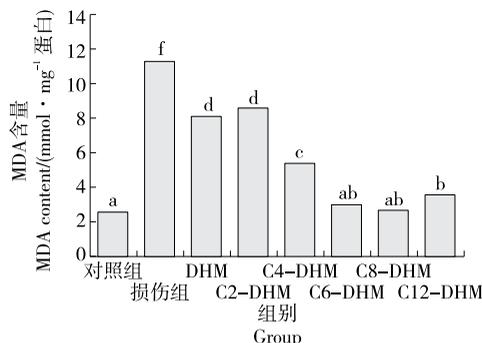
图 2 DHM 及其衍生物对 L02 细胞氧化损伤模型的保护作用

Figure 2 Protective effects of DHM and its derivatives on the oxidative damage model of L02 cells



小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 3 DHM 及其衍生物对细胞外 LDH 水平的影响
Figure 3 Effects of DHM and its derivatives on the level of extracellular LDH



小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 4 DHM 及其衍生物对 MDA 水平的影响
Figure 4 Effects of DHM and its derivatives on MDA levels

组,可见,亲脂性的提高可以使 DHM 更容易进入细胞内阻止过氧化反应的发生,从而避免细胞的损伤,其中 C6-DHM 和 C8-DHM 的效果最好。

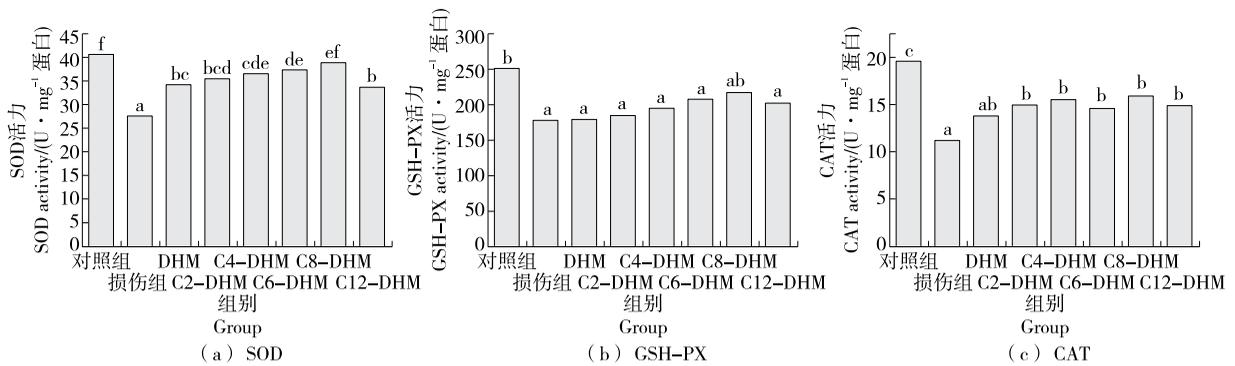
2.6 DHM 及其衍生物对细胞中抗氧化酶系的影响

由图 5 可知,相较于 H_2O_2 损伤组, DHM 及其衍生物处理组的 SOD、GSH-PX 和 CAT 活力均有所提高;衍生物处理组中,除 C12-DHM 外,其余衍生物处理组的 3 种抗氧化酶的活力均高于 DHM 处理组。总体上看,随着取代碳链的延长,3 种抗氧化酶的活力呈先升高后降低的趋势, C8-DHM 对 3 种抗氧化酶活力的提高效果最为明显。因此, DHM 及其衍生物对细胞内 ROS 的清除能力与细胞内的抗氧化酶系有关,而亲脂性一定程度的提高有利

于 DHM 进入细胞上调相关的抗氧化酶活力。

2.7 DHM 及其衍生物对线粒体膜电位的影响

通过 JC-1 荧光探针检测的红绿荧光变化可评估线粒体膜电位的下降程度。由荧光结果可知,相比于对照组,损伤组基本上整体呈现绿色荧光,表明其线粒体膜电位显著降低;相较于损伤组, DHM 及其衍生物组的红色荧光程度增强,而且衍生物处理组的红色荧光程度高于 DHM 处理组,表明 DHM 及其衍生物能够抑制线粒体膜电位的下降,且衍生物组的细胞线粒体膜电位高于 DHM 处理组,其中,经 C8-DHM 处理的细胞图像中几乎无绿色荧光,表明其能显著抑制线粒体膜电位的下降,从而阻止早期的细胞凋亡。



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 5 DHM 及其衍生物对抗氧化相关酶活的影响

Figure 5 Effects of DHM and its derivatives on the activity of antioxidant related enzymes

2.8 DHM 及其衍生物对 Caspase 3 水平的影响

由图 6 可知, Caspase 活性相对水平依次为对照组 \approx DHM 处理组 $>$ C2-DHM 处理组 $>$ C12-DHM 处理组 $>$ C4-DHM 处理组 $>$ C6-DHM 处理组 \approx C8-DHM 处理组 $>$ 空白组, 5 种衍生物处理组的 Caspase 3 相对活性水平显著低于 DHM 处理组, 其中 C6-DHM 和 C8-DHM 处理组的 Caspase 3 相对活性水平最低, 表明中等链长的亲脂性衍

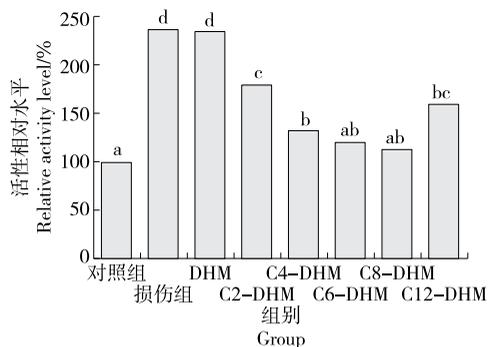
生物可显著增强 DHM 抑制 Caspase 3 活性的能力。

3 结论

通过构建 L02 细胞过氧化氢损伤模型, 考察了二氢杨梅素及其衍生物对肝细胞损伤的保护效果。除 3-O-月桂酰化二氢杨梅素 (C12-DHM) 外, 其余衍生物处理组对 L02 细胞的保护作用均高于 DHM, DHM 衍生物能通过调节细胞内的抗氧化通路减少活性氧的产生和积累, 其中 3-O-辛酰化二氢杨梅素 (C8-DHM) 对 L02 细胞氧化损伤的保护效果最为显著。关于二氢杨梅素及其衍生物对细胞氧化损伤的保护作用机制只探讨了线粒体通路中的关键位点, 接下来会进一步考察对其他通路如内质网通路、死亡受体通路等的影响。

参考文献

- [1] 郑洁静, 续洁琨, 江涛, 等. 藤茶总黄酮对拘束负荷引起小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(10): 1 249-1 253. ZHENG Jie-jing, XU Jie-kun, JIANG Tao, et al. Protective effect of total flavonoids of rattan tea on liver injury induced by restraint load in mice[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2006, 22(10): 1 249-1 253.



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 6 DHM 及其衍生物对 Caspase 3 水平的影响

Figure 6 Effects of DHM and its derivatives on Caspase 3 levels

(下转第 150 页)