

# 松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用

戴应和<sup>1,2</sup>, 张丽梅<sup>3</sup>, 杨淑贤<sup>1</sup>, 杨晓璐<sup>3</sup>, 龙小琴<sup>2</sup>, 袁经权<sup>2,4</sup>, 易蔚<sup>2\*</sup>, 曹丽<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001; 3. 新时代健康产业(集团)有限公司, 北京 102206; 4. 广西药用植物园, 南宁 530023)

**[摘要]** 目的:探讨松花粉对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导人肝癌 HepG2 细胞应激性氧化损伤的保护作用。方法:将 HepG2 细胞分为正常组, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组和样品干预组。样品干预组用不同浓度的松花粉预处理 HepG2 细胞 12 h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组和样品干预组用 400 μmol·L<sup>-1</sup> 过氧化氢氧化损伤细胞 2 h, 产生氧化应激损伤。采用噻唑蓝(MTT)比色法检测 HepG2 细胞活力; 微板法检测细胞内活性氧(ROS), 超氧化物歧化酶(SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性, 乳酸脱氢酶(LDH)及丙二醛(MDA)含量; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测抗氧化通路中关键基因核因子 E2 相关因子 2(Nrf2), Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1), 谷氨酸半胱氨酸连接酶(GCL)和血红素氧合酶-1(HO-1)蛋白的表达水平, 以评价松花粉对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用。结果: MTT 结果显示, 与正常组比较, 松花粉(80, 40, 20, 10, 5 mg·L<sup>-1</sup>)对 HepG2 细胞没有毒性; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组中 ROS, LDH 及 MDA 的水平显著升高(P < 0.01), SOD 和 GSH-Px 的活性显著降低(P < 0.01)。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较, 松花粉干预组中 ROS, LDH 及 MDA 的水平显著降低(P < 0.05, P < 0.01), SOD 和 GSH-Px 的活性显著升高(P < 0.05, P < 0.01)。Western blot 结果显示, 松花粉显著上调 Nrf2, HO-1 和 GCL 的蛋白表达, 并下调 Keap1 的蛋白表达。结论: 质量浓度 5~20 mg·L<sup>-1</sup> 松花粉可有效保护 400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HepG2 细胞应激性氧化损伤。其机制可能与调节 SOD, GSH-Px 活性, ROS, LDH, MDA 水平有关, 同时与调控抗氧化通路中关键基因 Nrf2, Keap 1, HO-1, GCL 蛋白的表达水平有关。

**[关键词]** 松花粉; HepG2 细胞; 抗氧化; 氧化应激

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0167-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190167

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1603.080.html>

**[网络出版时间]** 2017-07-11 16:03

## Protective Effect of Pollen Pini on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Damage in HepG2 Cells

DAI Ying-he<sup>1,2</sup>, ZHANG Li-mei<sup>3</sup>, YANG Shu-xian<sup>1</sup>, YANG Xiao-jun<sup>3</sup>, LONG Xiao-qin<sup>2</sup>,  
YUAN Jing-quan<sup>2,4</sup>, YI Wei<sup>2\*</sup>, CAO Li<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 3. New Era Health Industry (Group) Co. Ltd., Beijing 102206, China; 4. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of Pollen Pini on oxidative damage of HepG2 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Method:** HepG2 cells were divided into normal control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> model group and intervention group. HepG2 cells of the intervention group were pretreated with different concentrations of Pollen Pini for 12 h. Then, to produce oxidative stress, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> model group and the intervention group were treated with 400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to damage cells for 2 h. Cell viability was measured by methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

**[收稿日期]** 20170425(010)

**[第一作者]** 戴应和, 在读硕士, 从事中药药理学研究, Tel:13520276958, E-mail:daiyinghez@126.com

**[通讯作者]** \* 易蔚, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药与药膳的开发及应用研究, Tel:13507714940, E-mail:183457740@qq.com;

\* 曹丽, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事肿瘤药理学研究, Tel:18911565885, E-mail:leao@implad.ac.cn

To evaluate the protective effect of Pini Pollen on HepG2 cells, cell viability, intracellular reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities, lactate dehydrogenase (LDH) and malondialdehyde (MDA) contents were detected. In addition, the expressions of key genes nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2), Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1 (Keap 1), heme oxygenase-1 (HO-1), glutamate-cysteine ligase (GCL) in antioxidant pathway were determined by western blot. **Result:** MTT results showed that, compared with normal control group, the cytotoxicity of Pollen Pini groups (80, 40, 20, 10, 5 mg·L<sup>-1</sup>) were non-toxic. The contents of ROS, LDH and MDA in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ), while the activities of SOD and GSH-Px were significantly depressed ( $P < 0.01$ ). Compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> model group, the contents of ROS, LDH and MDA in the intervention group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), whereas the activities of SOD and GSH-Px were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Western blot results indicated that pollen pini up-regulated protein expressions of Nrf2, HO-1 and GCL, but down-regulated the expression of Keap1 protein. **Conclusion:** The 5-20 mg·L<sup>-1</sup> of Pollen Pini can effectively protect 400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress damage in HepG2 cells. The mechanism may be related to regulation of the activity of SOD, GSH-Px activity, ROS, LDH and MDA levels, and protein expressions of key genes Nrf2, Keap 1, HO-1, and GCL in the antioxidant pathway.

[ **Key words** ] Pollen Pini; HepG2 cell; anti-oxidation; oxidative stress

氧化应激是由于机体氧化系统和抗氧化系统失衡,导致自由基过多,并作用于生物大分子,导致细胞组织结构发生破坏性损伤<sup>[1]</sup>。氧化应激损伤会产生大量的活性氧(reactive oxygen species,ROS)和自由基,引发脂质过氧化反应生成丙二醛(malonic dialdehyde,MDA);使细胞膜通透性增强,促进胞内乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)向外释放;引发自由基链反应,损耗大量的超氧化物歧化酶(super oxide dismutase,SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)等抗氧化剂,最终导致细胞死亡<sup>[2-4]</sup>。现代医学研究表明,ROS和自由基是造成细胞衰老退化的重要因素,也是导致氧化衰老、炎症和肿瘤等疾病发生的重要原因<sup>[5]</sup>。核转录因子(NF)-E2 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor 2,Nrf2)和它的胞质接头蛋白 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1,Keap 1)是细胞抗氧化反应的中枢调节者,Nrf2 通过与抗氧化反应元件(antioxidant response element,ARE)相互作用,诱导编码谷氨酸半胱氨酸连接酶(glutamate-cysteine ligase,GCL)和血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)抗氧化蛋白和Ⅱ相解毒酶的表达,在细胞的防御保护中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。Keap 1-Nrf2/ARE 信号通路是目前发现调节抗氧化防御机制最重要的内源性抗氧化通路,与保护氧化应激损伤有着密切的关系<sup>[7]</sup>。因此,有效调节 Keap 1-Nrf2/ARE 信号通路,并降低 ROS 和清除自由基,提

高抗氧化剂活性是改善细胞抵抗氧化和延缓衰老的重要途径。

松花粉是我国马尾松的纯净花粉,含有丰富的各类营养素和多活性多酚类化合物<sup>[8]</sup>。是一种天然的抗氧化植物,古人称:“松柏之气可使人长寿”<sup>[9]</sup>。研究表明,松花粉具有调节机体活动、促进新陈代谢和消除自由基的能力,能有效预防机体氧化衰老<sup>[10-11]</sup>;自由基和过氧化是造成肝脏疾病的重要原因<sup>[12-14]</sup>。松花粉抗氧化的研究已经有不少报道,但对肝细胞氧化应激性损伤的保护作用仍缺乏研究。因此,本研究以松花粉为研究对象,用过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导人肝癌 HepG2 细胞建立应激性氧化损伤模型,探讨松花粉对氧化应激肝损伤的保护作用,为松花粉的深度开发和进一步充分利用提供一定依据。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人肝癌细胞株 HepG2,细胞来源于一名 15 岁的白人少年的肝癌组织(中国医学科学院基础研究所细胞库)。

**1.2 药物及试剂** 松花粉采自浙江千岛湖,经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定,为松科植物马尾松 *Pinus massoniana* 的干燥花粉。DMEM 培养基和胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 12100-500,T1300);特级胎牛血清(北京元亨圣马生物技术研究所,批号 150903);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 298-93-1);二甲基亚砷(美国 Amresco 公司,批号 67-68-5);总 ROS

检测试剂盒,超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒,丙二醛(MDA)测试盒,乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(南京建成生物科技有限公司,批号分别为E004,A001-1,A005,A003-4,A020-2);高灵敏度化学发光检测试剂盒,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒,BCA蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为CW0049M,CW0022M,CW0014S);Nrf2,Keap 1,GCL和HO-1抗体(美国Santa Cruz公司,批号分别为sc-722,sc-365626,sc-271330,sc-136960);辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔抗体,辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠抗体, $\beta$ -actin鼠单克隆抗体(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为CW0157S,CW0152S,CW0096M)。

**1.3 仪器** 5410型二氧化碳培养箱(美国NAPCO公司);MQX200型酶标仪(美国Bio-Tek公司);BCN-1360型生物洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司);CKX41倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);Labofuge 400R离心机(德国Heraeush公司);156-8001型垂直电泳仪,ChemiDoc MP型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 松花粉对 HepG2 细胞增殖的影响** 取对数期的细胞,以  $1.0 \times 10^5$  个/孔接种于 96 孔板内,每孔加入 100  $\mu$ L。培养 24 h 后,将细胞分为正常组和样品干预组,样品干预组换无血清的含不同质量浓度松花粉的培养基,为 5, 10, 20, 40, 80, 160  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每个质量浓度设 5 个复孔,加药后, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h, 加入 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MTT 溶液 100  $\mu$ L, 继续培养 4 h 后,弃上清,每孔再加入 DMSO 200  $\mu$ L 溶解,摇床上震动 10 min,然后用酶标仪在 570 nm 波长处测定吸光度 A,并计算细胞生长存活率。另设空白孔(只加松花粉),排除药物干扰。

$$\text{细胞生长存活率} = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

**2.2 不同浓度不同时间松花粉对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 HepG2 细胞存活率的影响** 采用朱丽等<sup>[15]</sup>和本教研室前期建立的  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 HepG2 细胞应激性氧化损伤模型<sup>[16]</sup>,测定松花粉对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 HepG2 细胞存活率的影响:生长至对数期的细胞,以  $1.0 \times 10^5$  个/孔接种于 96 孔板内,每孔加入 100  $\mu$ L。培养 24 h 后,将细胞分为正常组、模型组和样品干预组,样品干预组换无血清的含不同质量浓度松花粉的培养

基,分别为 160, 80, 40, 20, 10, 5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每组 5 个复孔,加药后, 37  $^{\circ}\text{C}$  分别孵育 6, 12, 24 h 后,弃培养基,模型组和样品干预组每孔加入 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 孵育 2 h,弃上清,加入 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MTT 溶液 100  $\mu$ L,继续培养 4 h 后,弃上清,每孔再加入 DMSO 200  $\mu$ L 溶解,混匀后,用酶标仪在 570 nm 波长处测定 A,并计算细胞生长存活率。另设空白孔(只加松花粉),排除药物干扰。

**2.3 松花粉对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HepG2 细胞中细胞上清液中 ROS, MDA, SOD, GSH-Px, CAT 和 LDH 水平的影响** 实验分为正常组,  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理组,  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 受试药松花粉低、中、高(5, 10, 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,将对数期 HepG2 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 24 孔板,孵育 24 h 后,加药,置 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育箱分别培养 12 h 后,去掉培养基,模型组和样品干预组加 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 2 h,收集上清液,然后按试剂盒说明书测定 SOD, GSH-Px 活性及 ROS, MDA 和 LDH 的含量。

**2.4 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测松花粉对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HepG2 细胞中抗氧化蛋白(Nrf2, Keap 1, GCL, HO-1)的表达水平** 实验分为正常组,  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理组,  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 受试药松花粉低、中、高(5, 10, 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,将 HepG2 细胞以  $5 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板,孵育 24 h 后,加药,置 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育箱培养 12 h 后,去掉培养基,模型组和样品干预组每孔加入含有 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  无血清培养基,置 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h,弃上清液,加胰蛋白酶消化,收集细胞,离心,用 PBS 洗 1 次,加细胞裂解液,4  $^{\circ}\text{C}$  低温 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。对裂解的细胞总蛋白上清液,用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度,将各组的蛋白浓度调到同一水平。制备 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离胶,每孔加蛋白样品,经电泳后通过半干式电转仪将分离的蛋白转到硝酸纤维素滤膜上。将膜用 5% 脱脂牛奶含有 0.1% 聚山梨酯-20 的(TBST)在摇床上封闭 2 h,加入一抗(Nrf2, Keap 1, GCL 和 HO-1 抗体稀释比例分别为 1:500, 1:1 000, 1:1 000, 1:500)后 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜,用 TBST 洗膜 3 次,每次 15 min;加入二抗(1:2 000 稀释),放在摇床孵育 2 h,用 TBST 洗 3 次,每次 15 min,然后加入发光显色剂 ECL 显色,用凝胶成像系统扫描分析白条带灰度值,计算各目标蛋白条带与内参照  $\beta$ -actin 的比值。

**2.5 统计学分析** SPSS 13.0 软件统计分析各组数据。组间比较用单因素方差分析,计量资料组间比较用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 松花粉对 HepG2 细胞增殖的影响** 由结果可知,各质量浓度组存活率都在 90% 以上,在 160, 10 mg·L<sup>-1</sup>还具有一定的增殖作用。说明松花粉在 5~160 mg·L<sup>-1</sup>内对 HepG2 细胞均无明显的毒性作用。见表 1。

表 1 松花粉对 HepG2 细胞增殖的影响

Table 1 Cytotoxicity of pollen pini on HepG2 cells

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	12 h $A(\bar{x} \pm s, n=5)$	存活率/%
正常	-	1.38 ± 0.032	100
松花粉	160	1.39 ± 0.045	101
	80	1.28 ± 0.012	93
	40	1.31 ± 0.073	94
	20	1.34 ± 0.057	97
	10	1.41 ± 0.061	102
	5	1.36 ± 0.041	99

表 2 不同质量浓度不同时效松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HepG2 细胞的保护作用

Table 2 Protective effect of pollen pini with different concentrations and times on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced HepG2 cells

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	$A(\bar{x} \pm s, n=5)$			存活率/%		
		6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
正常	-	0.850 ± 0.034	1.320 ± 0.046	1.44 ± 0.036	100	100	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤	-	0.493 ± 0.050 <sup>1)</sup>	0.781 ± 0.032 <sup>1)</sup>	0.825 ± 0.092 <sup>1)</sup>	58	59 <sup>1)</sup>	57 <sup>1)</sup>
松花粉	160	0.413 ± 0.029	0.605 ± 0.021	0.664 ± 0.041	49	46	46
	80	0.462 ± 0.042	0.709 ± 0.047	0.766 ± 0.068	54	54	53
	40	0.506 ± 0.027	0.774 ± 0.058	0.842 ± 0.040	60	59	58
	20	0.572 ± 0.041 <sup>3)</sup>	0.912 ± 0.043 <sup>3)</sup>	0.954 ± 0.076 <sup>3)</sup>	67 <sup>1)</sup>	69 <sup>1)</sup>	66 <sup>1)</sup>
	10	0.553 ± 0.080 <sup>3)</sup>	0.871 ± 0.037 <sup>3)</sup>	0.928 ± 0.082 <sup>3)</sup>	65 <sup>1)</sup>	66 <sup>1)</sup>	64 <sup>1)</sup>
	5	0.528 ± 0.080 <sup>2)</sup>	0.842 ± 0.037 <sup>3)</sup>	0.902 ± 0.037 <sup>3)</sup>	62 <sup>2)</sup>	64 <sup>2)</sup>	63 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P < 0.01;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.05,<sup>3)</sup>P < 0.01(表 3~6 同)。

表 3 有效范围内的松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞存活率的影响

Table 3 Effect of pollen pini on survival rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cells induced by HepG2

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	12 h $A(\bar{x} \pm s, n=5)$	存活率/%
正常	-	1.360 ± 0.046	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤模型	-	0.792 ± 0.032 <sup>1)</sup>	58 <sup>1)</sup>
松花粉	80	0.781 ± 0.021	57
	40	0.829 ± 0.047	61
	20	0.954 ± 0.058 <sup>3)</sup>	70 <sup>3)</sup>
	10	0.921 ± 0.041 <sup>3)</sup>	68 <sup>3)</sup>
	5	0.891 ± 0.080 <sup>3)</sup>	66 <sup>3)</sup>

**3.4 松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞中 ROS,**

**3.2 不同质量浓度、不同作用时间松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HepG2 细胞的存活率的影响** 与正常组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组存活率明显下降 (P < 0.01); 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较,松花粉干预组在 40~160 mg·L<sup>-1</sup>存活率低于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组,说明高浓度的松花粉能够加重对 HepG2 的损伤随着浓度的降低存活率逐渐升高;5~20 mg·L<sup>-1</sup>作用 12 h 比较显著 (P < 0.05, P < 0.01),在 20 mg·L<sup>-1</sup>时保护效果最佳,存活率达到了 69%,比 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组高出了 10%。说明 5~40 mg·L<sup>-1</sup>松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞具有良好的保护作用。见表 2。

**3.3 松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞存活率的影响** 5~40 mg·L<sup>-1</sup>松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞具有良好的保护作用,在 20 mg·L<sup>-1</sup>时保护效果最佳,存活率达到了 70%,比 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组高出了 12%。见表 3。

**MDA 和 LDH 含量的影响** 与正常组比较,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组中 ROS,MDA 和 LDH 的含量显著升高 (P < 0.01),与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组比较,松花粉低、中、高浓度干预组可显著降低受损 HepG2 细胞内 ROS,MDA 和 LDH 的表达水平 (P < 0.05, P < 0.01),并呈浓度依赖的趋势,高浓度干预组十分显著。由此揭示了松花粉可通过降低 ROS,MDA 和 LDH 水平对受损的 HepG2 细胞起到保护作用。见表 4。

**3.5 松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞中 SOD 和 GSH-PX 活性的影响** 与正常组比较,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组的 SOD,GSH-Px 2 种抗氧化酶的活性显著下降 (P < 0.01);与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组比较,松花粉(5,

表 4 松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞中 ROS,MDA,LDH 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Effects of pollen pine on contents of ROS, MDA and LDH in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	ROS /%	MDA/μmol·L <sup>-1</sup>	LDH /U·L <sup>-1</sup>
正常	-	102.251 ± 3.347	3.835 ± 0.251	842.315 ± 37.367
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤模型	-	447.672 ± 4.782 <sup>1)</sup>	5.134 ± 0.214 <sup>1)</sup>	6 989.472 ± 76.875 <sup>1)</sup>
松花粉干预	5	420.674 ± 4.112 <sup>2)</sup>	4.474 ± 0.213 <sup>2)</sup>	1 354.273 ± 57.866 <sup>3)</sup>
	10	370.676 ± 4.194 <sup>3)</sup>	4.256 ± 0.174 <sup>3)</sup>	1 137.244 ± 41.356 <sup>3)</sup>
	20	342.335 ± 3.682 <sup>3)</sup>	4.113 ± 0.151 <sup>3)</sup>	583.732 ± 39.657 <sup>3)</sup>

10,20 mg·L<sup>-1</sup>) 预处理均可增强内源性抗氧化酶 SOD,GSH-Px 的活性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),证实了松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用及其抗氧化活性。见表 5。

表 5 松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞中 SOD 和 GSH-Px 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 5 Effect of pollen pine on levels of SOD and GSH-Px in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	SOD /U·mL <sup>-1</sup>	GSH-Px /U·mg <sup>-1</sup>
正常	-	39.234 ± 1.441	126.871 ± 8.292
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤模型	-	29.117 ± 1.712 <sup>1)</sup>	47.926 ± 3.583 <sup>1)</sup>
松花粉干预	5	33.626 ± 1.471 <sup>3)</sup>	57.527 ± 3.642 <sup>2)</sup>
	10	36.371 ± 1.816 <sup>3)</sup>	77.343 ± 4.465 <sup>3)</sup>
	20	39.037 ± 1.335 <sup>3)</sup>	107.172 ± 5.625 <sup>3)</sup>

表 6 松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞中抗氧化蛋白 (Nrf2,Keap 1,GCL,HO-1) 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of pollen pine on expression of antioxidant protein (Nrf2, Keap 1, GCL, HO-1) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced HepG2 cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	Nrf2/β-actin	Keap 1/β-actin	GCL/β-actin	HO-1/β-actin
正常	-	0.447 ± 0.121	0.524 ± 0.131	0.766 ± 0.132	0.884 ± 0.086
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤模型	-	0.558 ± 0.136	1.227 ± 0.126 <sup>1)</sup>	0.747 ± 0.142	0.585 ± 0.079 <sup>1)</sup>
松花粉干预	5	0.831 ± 0.117 <sup>3)</sup>	1.067 ± 0.088 <sup>2)</sup>	0.741 ± 0.137	0.675 ± 0.131
	10	0.866 ± 0.141 <sup>3)</sup>	0.862 ± 0.125 <sup>3)</sup>	0.737 ± 0.145	0.765 ± 0.146 <sup>2)</sup>
	20	1.067 ± 0.131 <sup>3)</sup>	0.672 ± 0.125 <sup>3)</sup>	1.369 ± 0.089 <sup>3)</sup>	1.133 ± 0.103 <sup>3)</sup>

质过氧化等反应,破坏细胞结构,其过程易于获得且性质相对稳定的特点,成为了研究细胞氧化损伤的重要工具<sup>[17]</sup>。HepG2 细胞是来源于人肝胚细胞瘤的一种肿瘤细胞,它所含的生物转化代谢酶与人正常肝实质细胞具有同源性,并保留了该酶的完整性和稳定性,因此常被广泛应用于体外实验的筛选<sup>[18]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可直接或转变为·OH 作用于 HepG2 细胞引起显著的氧化损伤<sup>[19-20]</sup>。因此本实验采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HepG2 细胞的氧化应激模型评价松花粉的保护作用。研究结果表明单一松花粉处理 HepG2 细胞发现其对细胞无明显毒性作用;当不同质量浓

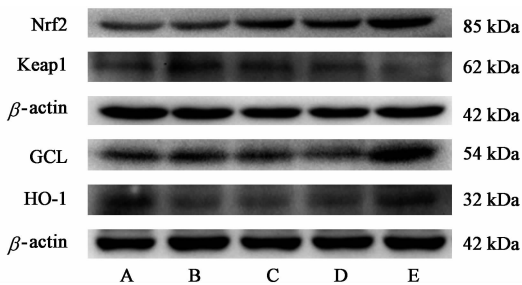
度松花粉和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共同作用于 HepG2 细胞时,松花粉能够提高 HepG2 细胞的存活率。提示松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HepG2 细胞氧化损伤具有保护作用。

3.6 松花粉对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞中抗氧化蛋白(Nrf2,Keap 1,GCL,HO-1)表达水平的影响与正常组比较,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组 Keap 1 的表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ),且 HO-1 的表达水平降低 ( $P < 0.01$ ),Nrf2 和 GCL 的表达水平无明显差异;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组比较,松花粉(5,10,20 mg·L<sup>-1</sup>)能够增加 Nrf2 的表达水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且松花粉(20 mg·L<sup>-1</sup>)可上调 HO-1 和 GCL 的表达水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );并降低 Keap 1 的表达水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 6,图 1。

#### 4 讨论

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一种活性氧,也是体内重要的中间代谢产物,极易透过细胞膜进入细胞,与细胞内铁离子形成高活性的自由基,作用于生物大分子物质,导致脂

当机体受到氧化应激损伤时,ROS 和活性自由基增加,引发脂质过氧化反应生成大量的 MDA;细胞膜通透性改变,细胞内 LDH 酶向外释放;引发自由基链反应,损耗大量抗氧化剂(如 SOD,GSH-Px 等),最终导致细胞死亡<sup>[21]</sup>。因此,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞氧化应激损伤时,细胞存活率,ROS,MDA 生成量,LDH 释放率,SOD 活性,GSH 含量变化显著。本研究结果表明,松花粉可降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



A. 正常组; B.  $H_2O_2$  损伤模型组; C ~ E. 松花粉干预低、中、高质量浓度组

图 1 松花粉对  $H_2O_2$  诱导的 HepG2 细胞中抗氧化蛋白 (Nrf2, Keap 1, GCL, HO-1) 表达水平的影响

Fig. 1 Effect of pollen pine on expression of antioxidant protein (Nrf2, Keap 1, GCL, HO-1) in  $H_2O_2$  induced HepG2 cells

损伤细胞培养液中 ROS 和 LDH 的释放;降低 MDA 水平,提高 SOD, GSH-Px 活性和 GSH 含量。表明松花粉对  $H_2O_2$  诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用与增强细胞抗氧化酶活性、降低自由基水平相关的。

Keap 1-Nrf2/ARE 信号通路是调节机体氧化系统和抗氧化系统,并调控体内抗氧化防御机制的重要途径<sup>[22]</sup>。该信号通路可以通过编码 HO-1 和 GCL 内源性保护基因来实现对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用<sup>[23-24]</sup>。Nrf2 是调节细胞对抗源物质和氧化损伤的关键转录因子<sup>[25]</sup>。正常生理情况下, Nrf2 位于胞浆中与 Keap 1 结合形成复合体。当机体受到氧化应激损伤时,复合体受到攻击使 Nrf2 与 Keap 1 解离, Nrf2 进入细胞核与 ARE 结合,激活抗氧化酶 (HO-1, SOD, GSH-Px) 以及 II 相解毒酶的转录活性,从而发挥抗氧化损伤的作用,恢复细胞的内稳态<sup>[26-27]</sup>。因此本研究采用 Western blot 检测松花粉对  $H_2O_2$  诱导的 HepG2 细胞中抗氧化蛋白 (Nrf2, Keap 1, GCL, HO-1) 的表达水平;研究结果显示,松花粉 ( $5, 10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 能增加 Nrf2 的表达水平,且 HO-1 和 GCL 的表达均升高;降低 Keap1 的表达水平。说明经松花粉处理可能导致 HepG2 细胞胞质中的 Nrf2 从二聚体解离,进入核内,发挥抗氧化应激作用。进一步揭示了松花粉基于对 Keap 1-Nrf2/ARE 信号通路的调节,发挥对  $H_2O_2$  诱导 HepG2 细胞的氧化损伤的保护作用机制。

综上所述,  $5 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的松花粉对  $H_2O_2$  诱导 HepG2 细胞氧化损伤具有保护作用,其机制可能与增加损伤细胞中 SOD, GSH-Px 活性及降低 ROS, LDH, MDA 含量并调控 Keap 1-Nrf2/ARE 信号通路的关键蛋白 Nrf2, Keap 1, HO-1, GCL 表达水平有

关,松花粉的保肝活性及抗氧化功能之间的关系仍需更深入的研究。

#### [参考文献]

- [1] 陈立立,唐雪,徐圆媛,等. 甲状腺素对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(9):935-940.
- [2] 张欣,赵新淮. 几种多酚化合物对  $H_2O_2$  和  $CCl_4$  诱导人肝细胞损伤的保护[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 262-266.
- [3] 刘红亮,胡磊,王靖凯,等. 槲皮素对  $H_2O_2$  损伤 PC12 细胞的保护效果与机制[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3):373-377.
- [4] 李炯,王忠彦,于敏.  $\delta$  阿片受体激活对过氧化氢损伤的心肌细胞的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2009, 23(6):431-435.
- [5] 吴其夏,余应年,卢建. 病理生理学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2003.
- [6] Magesh S, CHEN Y, HU L. Small molecule modulators of Keap 1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents [J]. Med Res Rev, 2012, 32(4): 687-726.
- [7] Zenkov N K, Menshchikova E B, Tkachev V O. Keap 1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target [J]. Biochemistry (Mosc), 2013, 78(1):19-36.
- [8] 赵霖,鲍善芬. 松花粉破壁前后显微形态和营养成分的研究[J]. 营养学报, 2001, 23(2):153-156.
- [9] 刘玉田,石丽花,屈学林,等. 松花粉抗氧化研究[C] // 花粉资源与开发利用研讨会论文集. 济南, 2006: 24-27.
- [10] 喻陆,史春夏. 松花粉对衰老小鼠肾脏线粒体 DNA 缺失突变的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1663-1666.
- [11] Starbuck J J. Unlock the power of seeds and bark [J]. Better Nutrition, 2000, 62(7): 66-69.
- [12] 刘玉田. 松花粉抗氧化研究[J]. 农业工程技术:农产品加工, 2008(4):24-27.
- [13] 范三红,秦婉宁,方楚楚. 油松花粉多酚抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2016(14):1-7.
- [14] 鲍善芬,丛涛, Illig J, 等. 松花粉抗氧化性的体外实验研究[J]. 营养学报, 2005, 27(6):487-490.
- [15] 朱丽,王攀,秦启联,等. 蝇蛆多肽对  $H_2O_2$  诱导的 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[C] // 中国毒理学会第六届全国毒理学大会论文集. 广州, 2013: 97-100.
- [16] 刘晨琪,朱乃亮,杨淑贤,等. 诸葛菜碱 I 对  $H_2O_2$  所致 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2017, 33(6):1-7.

- [17] 韩飞,周孟良. 过氧化氢诱导 HepG2 细胞产生氧化应激细胞模型的建立[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 55-57.
- [18] 金明,王玉娇,金梅花,等. 两种细胞建立肝细胞氧化损伤模型比较[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 324-326.
- [19] Tanaka Y, Kirita M, Abe Y, et al. Metabolic stability and inhibitory effect of *O*-methylated theaflavins on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human HepG2 cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2014, 78(7): 1140-1146.
- [20] 欧瑜,郑姗,林琳. 藻蓝蛋白对体外诱导 HepG2 细胞损伤的保护作用[J]. 药物生物技术, 2009, 16(5): 435-438.
- [21] Rakesh S U, Patil P R, Mane S R. Use of natural antioxidants to scavenge free radicals: a major cause of diseases. [J]. Int J Phar Res, 2010, 2(2): 1074-1081.
- [22] Zenkov N K, Menshchikova E B, Tkachev V O. Keap 1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target[J]. Biochemistry: Mosc, 2013, 78(1):19-36.
- [23] 胡存丽. 三氯乙烯对 HepG2 细胞的遗传毒性及氧化应激机制的研究[D]. 大连:大连医科大学, 2008.
- [24] 刘艳,张海欣,魏颖,等. 小麦低聚肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品与生物技术学报, 2015(6):599-604.
- [25] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap 1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution[J]. Genes Cells, 2011, 16(2):123-140.
- [26] ZHANG Z, ZHOU S, JIANG X, et al. The role of the Nrf2/Keap 1 pathway in obesity and metabolic syndrome [J]. Rev Endocr Metab Dis, 2015, 16(1):35-45.
- [27] SUN Z, ZHANG S, CHAN J Y, et al. Keap 1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2 [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(18):6334-6349.

[责任编辑 邹晓翠]