

圣草酚抑制自由基诱导的生物大分子损伤及对肝癌细胞HepG2毒性的作用

张亦凡, 刘功关, 刘茜, 刘学波*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 研究圣草酚体外清除自由基的活性; 采用2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)诱导牛血清白蛋白(BSA)、大鼠肝组织及质粒DNA构建过氧化反应模型, 以蛋白羰基化、丙二醛(MDA)生成量和DNA断裂为指标, 研究圣草酚对自由基损伤蛋白质、脂质、DNA 3种生物大分子的作用; 通过MTT法检测圣草酚对肝癌细胞HepG2的毒性。结果表明: 25~200 $\mu\text{mol/L}$ 的圣草酚具有较强的DPPH自由基清除作用, IC_{50} 值为95.7 $\mu\text{mol/L}$, 但清除羟自由基能力较弱。圣草酚呈浓度依赖性抑制脂质、蛋白质、DNA的氧化损伤。400 $\mu\text{mol/L}$ 的圣草酚作用48h能显著地降低肝癌细胞HepG2细胞活力。结论: 圣草酚能有效地清除DPPH自由基, 抑制自由基损伤生物大分子及肝癌细胞HepG2的活力。

关键词: 圣草酚; 自由基; 蛋白损伤; 脂质过氧化; DNA断裂; 细胞毒性

Inhibitory Effect of Eriodictyol on Free Radical-induced Damage to Biological Macromolecules and Its Cytotoxicity on HepG2 Cells

ZHANG Yi-fan, LIU Gong-guan, LIU Qian, LIU Xue-bo*

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The *in vitro* free radical-scavenging activity of eriodictyol was evaluated against DPPH and hydroxyl free radicals. The protective effect of eriodictyol on free radical-induced damage to protein, lipid and DNA were evaluated based on oxidation models of BSA, rat liver tissue and plasmid DNA induced by AAPH and its cytotoxicity on HepG2 cells was assessed by MTT assay. The results showed that eriodictyol in the concentration range of 25 to 200 $\mu\text{mol/L}$ had strong scavenging activity against DPPH free radical with a median inhibitory concentration (IC_{50}) of 95.7 $\mu\text{mol/L}$. However, the scavenging activity on hydroxyl free radical was weaker. The inhibitory effect of eriodictyol on oxidative damage to protein, lipid and DNA induced by free radicals was in a dose-dependent manner. Similarly, eriodictyol could significantly reduce the viability of HepG2 cells in a dose-dependent manner. Therefore, eriodictyol has the capability to scavenge DPPH free radicals and inhibit macromolecular damage induced by free radicals. It also can significantly reduce the viability of HepG2 cells.

Key words: eriodictyol; free radical; protein damage; lipid peroxidation; DNA strand breakage; cytotoxicity

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)17-0126-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201317028

活性氧是机体生命活动过程中生物化学反应的中间产物。在正常情况下, 体内的活性氧产生和消除处于动态平衡之中。当它在体内产生过多或消除过慢, 就会大量聚集, 这些活性氧可以与蛋白质、脂质及核酸等生物大分子发生反应, 使其结构、性质和功能发生改变, 从而影响细胞正常生理功能, 最终导致细胞变性坏死、组织及器官损伤, 诱发多种疾病^[1], 如动脉粥样硬化、糖尿病、帕金森病、癌症^[2]。

抗氧化剂因其抵抗活性氧的作用在预防及治疗氧化

应激相关疾病中具有巨大潜力。鉴于人工合成抗氧化剂的局限性和毒性, 从植物资源中提取天然抗氧化剂, 研究其功能活性成为当前食品科学界研究的热点。

圣草酚(eriodictyol)是广泛分布于水果和蔬菜^[3-5]中的黄酮类化合物, 主要存在于柠檬和花生中^[6]。黄酮类化合物作为自由基受体及链终止剂可发挥抗氧化活性, 羟基位置及羟化程度与黄酮类化合物抗氧化能力有重要的关系, B环上有邻二酚羟基的黄酮抗氧化活性最强^[7]。根据圣草酚的化学结构可知, 圣草酚是B环上具有邻二酚羟基

收稿日期: 2012-10-31

作者简介: 张亦凡(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品功能与营养化学。E-mail: zhangyfj@sina.com

*通信作者: 刘学波(1975—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品功能与营养化学。E-mail: xuebolu@nwsuaf.edu.cn

的黄酮,推测圣草酚是一种潜在的抗氧化活性很强天然抗氧化剂。国内外鲜有对圣草酚生物活性及药理活性的研究报道,目前研究表明,圣草酚具有抗炎、镇痛、改善糖尿病及糖尿病并发症^[8-11]的作用,对圣草酚抗氧化活性、抗癌活性及其作用机理的研究十分有限。因此本实验拟系统地探讨圣草酚体外抗氧化活性,及其对肝癌细胞HepG2的毒性作用,旨在为圣草酚在功能性食品领域及抗肝癌药物的开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

成年Wistar大鼠由西安交通大学医学院实验动物中心提供;质粒pBR322 DNA购自华美生物工程公司;人肝癌细胞HepG2由中国科学院上海细胞库提供。

圣草酚(纯度>98%) 上海永恒生物技术有限公司;牛血清白蛋白(BSA)、2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、琼脂糖、溴化乙锭 美国Sigma公司;Anti-DNP、Anti-Rabbit 美国Santa Cruz公司;噻唑兰(MTT)、2,4-二硝基苯肼(DNPH) 美国Amresco公司。

1.2 仪器与设备

680酶标仪、165-8001垂直电泳槽、水平电泳槽和ChemiDoc XRS化学发光成像系统 美国Bio-Rad公司;QYC110台式恒温振荡器 上海福玛公司;AUY220万分之一天平 日本岛津公司;微量移液枪德国Eppendorf公司;3110型细胞培养箱 美国Thermo Scientific公司。

1.3 方法

1.3.1 清除DPPH自由基能力的测定

参考Mishra等^[12]的方法略有改动。依次于离心管中加入98μL甲醇溶液再吸取2μL不同浓度的圣草酚乙醇溶液,最后均用甲醇补齐到200μL,充分混匀,室温下避光静置30min,点样于96孔板,用酶标仪在波长517nm测定其吸光度记为 A_i ;同时以198μL的甲醇溶液与2μL圣草酚溶液混合后的吸光度记为 A_j ;以100μL的DPPH溶液与100μL的甲醇溶液混合后的吸光度记为 A ;以200μL甲醇溶液的吸光度记为 A_0 。按公式(1)计算圣草酚清除DPPH自由基的能力。

$$\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A - A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 清除羟自由基能力的测定

参照陈金娥等^[13]的方法略有改动。依次于离心管中加入96μL MilliQ、4μL圣草酚乙醇溶液、100μL FeSO_4 、100μL H_2O_2 溶液,混合均匀,在室温下静置10min,再加入100μL水杨酸,37℃水浴反应30min,点样于96孔板,

510nm波长处测定吸光度,记为 A_i ;同时以296μL MilliQ与4μL乙醇溶液,100μL水杨酸混合后的吸光度记为 A ,按公式(2)计算圣草酚清除羟自由基的能力。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A - A_i}{A} \times 100 \quad (2)$$

1.3.3 圣草酚对AAPH诱导BSA蛋白羰基化作用的测定

依次于离心管中加入0.6mg/mL 50μL BSA蛋白溶液,1μL圣草酚乙醇溶液,29μL PB溶液,混合均匀,37℃孵育30min,再加入20μL AAPH溶液(终浓度100mmol/L)为实验组(C~E),37℃水浴6h;同时以50μL BSA溶液与1μL乙醇溶液,49μL PB混合液作为阳性对照(A);以50μL BSA溶液、1μL乙醇溶液、29μL PB、20μL AAPH混合液作为阴性对照(B)。反应结束后,Western blotting检测蛋白羰基化程度。

1.3.4 圣草酚对AAPH诱导肝匀浆羰基化作用的测定

Wistar大鼠,雌雄兼用,禁食一夜,次日断颈处死,取其肝脏,然后用冷的生理盐水反复冲洗。剪碎后加入pH7.4的PB缓冲液、10mmol/L蛋白酶抑制剂(PMSF)、硫酸链霉素,置于冰水浴中用玻璃匀浆器制成10%的肝匀浆,与4℃、4000r/min离心10min处理后,弃去沉淀,取上清液再于4℃、10000r/min离心15min,取上清,于-2℃保存备用。

依次于离心管中加入50μL 10%的肝匀浆,1μL圣草酚乙醇溶液,29μL PB溶液,混合均匀,37℃孵育30min,再加入20μL AAPH溶液(终浓度50mmol/L)为实验组(C~F),37℃水浴6h;同时以50μL肝匀浆与1μL乙醇溶液,49μL PB混合液作为阳性对照(A);以50μL肝匀浆、1μL乙醇溶液、29μL PB、20μL AAPH混合液作为阴性对照(B)。反应结束后,Western blotting检测蛋白羰基化程度。

1.3.5 圣草酚对AAPH诱导肝匀浆脂质过氧化作用的测定

参照TBA法间接测定脂质过氧化产生的丙二醛(MDA)量以反映过氧化程度,参照杨建雄等^[14]的方法测定。依次于离心管中加入115μL 10%的肝匀浆,1μL圣草酚乙醇溶液,4μL PB溶液,混合均匀,37℃孵育30min,再加入30μL AAPH溶液(终浓度100mmol/L)为实验组(C~F),37℃水浴6h,做成肝匀浆反应液;同时以115μL肝匀浆与1μL乙醇溶液,34μL PB混合液作为阳性对照(A);以115μL肝匀浆、1μL乙醇溶液、4μL PB、30μL AAPH混合液作为阴性对照(B)。

取上述100μL肝匀浆反应液,加入100μL 20% TCA和250μL 0.67% TBA,混合均匀,95℃水浴15min。注意观察离心管内液体颜色的变化,对比不同处理管内溶液的色差。反应结束后,冷却至室温,4000r/min离心10min。取上清液,测定其在532nm波长处的吸光度,再根据MDA-TBA二者结合物的吸光系数($\epsilon = 15600 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{cm})$)

来计算MDA的含量,以单位质量蛋白中MDA的纳摩尔数来表示^[15]。

1.3.6 圣草酚对AAPH诱导DNA氧化损伤作用的测定

依次于离心管中加入7μL PB溶液,1μL不同浓度的圣草酚,1μL pBR322DNA,37℃水浴中孵育30min后,加入1μL AAPH(终浓度5mmol/L)为实验组(C~E),37℃水浴反应4h。同时以8μL PB溶液与1μL乙醇溶液,1μL质粒DNA混合液作为阳性对照(A);以7μL PB溶液、1μL乙醇溶液、1μL质粒DNA、1μL AAPH混合液作为阴性对照(B)。反应结束后电泳,并于凝胶成像分析系统中观察照相。

1.3.7 圣草酚对HepG2细胞毒性作用的测定

MTT法,将一定浓度的细胞接种到96孔板中,每孔100μL细胞液,于37℃、5% CO₂培养箱中进行贴壁培养24h后弃去培养液并用无血清清洗。然后加入用RPMI 1640培养基稀释到不同浓度圣草酚溶液,每孔100μL,每组均设6复孔,继续培养48h后弃去培养液并用无血清清洗。每孔加入5mg/mL 10μL MTT溶液和100μL无血清培养基,培养4h后,小心吸去培养基。最后每孔加入100μL DMSO,充分溶解后用酶标仪测量各孔在波长490nm处的光密度(OD)。同时设置不加圣草酚的对照组,按公式(3)计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{处理组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \times 100 \quad (3)$$

1.4 数据处理

每个实验重复3次,实验数据用Microsoft Excel 2007处理,SPSS16.0软件进行统计学分析,显著水平 P 设定为0.05。

2 结果与分析

2.1 圣草酚清除DPPH自由基的能力

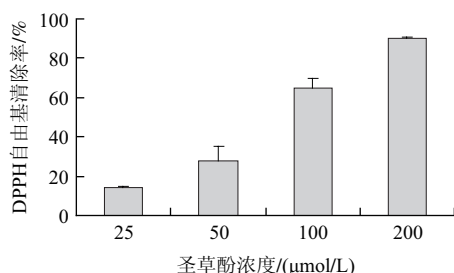


图1 圣草酚清除DPPH自由基的作用

Fig.1 Scavenging effect of eriodictyol on DPPH free radical

由图1可知,圣草酚有效的清除DPPH自由基,且清除率随圣草酚浓度的升高而增加,在圣草酚浓度达到200μmol/L时清除率为90.4%,IC₅₀值为95.7μmol/L。

2.2 圣草酚清除羟自由基的能力

由图2可知,圣草酚对羟自由基的清除能力较弱。在圣草酚浓度达到100μmol/L时,羟自由基清除率仅为

13.3%。在100~500μmol/L范围内,清除率不再明显变化。与圣草酚清除DPPH自由基的能力相比,清除羟自由基的能力较弱。

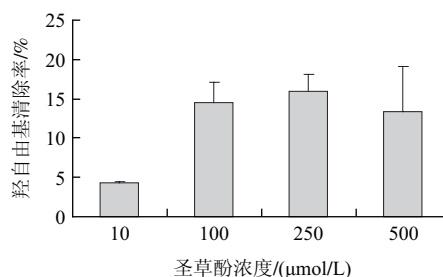
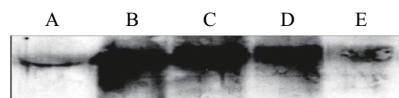


图2 圣草酚清除羟自由基的作用

Fig.2 Scavenging effect of eriodictyol on hydroxyl free radical

2.3 圣草酚抑制AAPH诱导BSA蛋白羰基化的能力



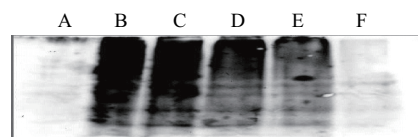
A.阳性对照组; B.阴性对照组; C~E.圣草酚浓度分别为1、50、100μmol/L。

图3 圣草酚抑制AAPH诱导的BSA蛋白羰基化的作用

Fig.3 Inhibitory effect of eriodictyol on AAPH-induced carbonylation of BSA protein

蛋白质氧化损伤的反应中,许多都涉及到蛋白质羰基的产生,目前蛋白质羰基的形成已经成为判定蛋白质氧化损伤的重要标志^[16-17]。由图3可知,与阳性对照组相比,AAPH明显地诱导蛋白质羰基含量的上升,而圣草酚呈浓度依赖性显著抑制了AAPH诱导的蛋白羰基生成。结果表明圣草酚可有效的抑制蛋白氧化损伤。

2.4 圣草酚抑制AAPH诱导肝匀浆蛋白羰基化的能力



A.阳性对照组; B.阴性对照组; C~F.圣草酚浓度分别为10、50、100、500μmol/L。图5同。

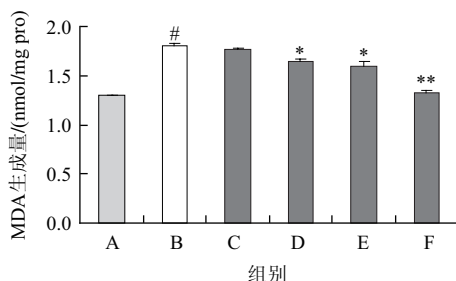
图4 圣草酚抑制AAPH诱导的肝匀浆蛋白羰基化的作用

Fig.4 Inhibitory effect of eriodictyol on AAPH-induced carbonylation of liver homogenate

肝脏是人体内最主要的代谢器官,通过多种反应进行物质代谢,如氧化反应、水解反应、还原反应、结合反应,是产生较多自由基的组织。肝脏内的蛋白质、脂质等生物大分子很容易受到自由基攻击而导致各种肝脏疾病。实验通过制备大鼠肝匀浆,用AAPH诱导肝匀浆损伤模型检测圣草酚对肝匀浆内蛋白质、脂质氧化损伤影响。由图4可知,与阳性对照组相比,AAPH诱导可显著增加肝匀浆蛋白质羰基化程度。而经圣草酚处理,可明

显抑制该体系蛋白羰基化, 且抑制作用随其浓度的增加而增强。圣草酚浓度为500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 蛋白羰基化几乎完全被抑制。

2.5 圣草酚抑制AAPH诱导肝匀浆MDA的生成能力



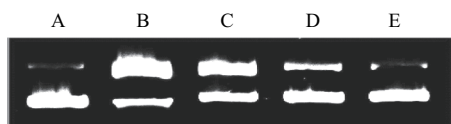
*.与阴性对照组相比, 差异显著($P<0.05$); **.与阴性对照组相比, 差异极显著($P<0.01$); #.与阳性对照组相比, 差异显著($P<0.05$).

图5 圣草酚抑制AAPH诱导的肝匀浆MDA生成的作用

Fig.5 Inhibitory effect of eriodictyol on AAPH-induced MDA production in liver homogenate

脂质过氧化产物是造成细胞膜结构和细胞损伤的重要原因之一。MDA是脂质过氧化的主要降解产物, 因此, 通过测定生物体MDA含量可间接指示脂质过氧化的水平。由图5可知, 圣草酚对肝匀浆MDA的生成有明显的抑制作用, 且呈浓度依赖。圣草酚有效的抑制脂质过氧化作用可能是由于其中含有的酚羟基具有提供电子的能力, 使脂质氧化过程中产生的脂质自由基失活, 从而中断其引起进一步氧化的链式反应。

2.6 圣草酚抑制AAPH诱导pBR322DNA氧化损伤的能力



A.阳性对照组; B.阴性对照组; C~E.圣草酚浓度分别为1、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 。

图6 圣草酚抑制AAPH诱导的pBR322 DNA链断裂的作用

Fig.6 Inhibitory effect of eriodictyol on AAPH-induced DNA strand breakage

pBR322DNA主要以超螺旋型存在, 当受到氧化损伤断链时, 质粒超螺旋的DNA会先打开一条核酸链而解为环状, 当损伤程度进一步加强时, 两条核酸链会被同时打开而线型化, 电泳后位于超螺旋和开环之间^[18]。图6中未处理的pBR322DNA主要为超螺旋状(泳道的下部条带), 经AAPH处理后, pBR322DNA发生氧化损伤而转化为开环状(泳道的上部条带)。经圣草酚处理后, 明显抑制了DNA氧化断裂, 且随着浓度的升高, 对pBR322 DNA超螺旋结构的保护作用增强。当圣草酚浓度达到100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 几乎完全抑制了DNA链的断裂, 表明圣草酚对DNA氧化损伤具有一定位地保护作用。

2.7 圣草酚抑制HepG2细胞活性的作用

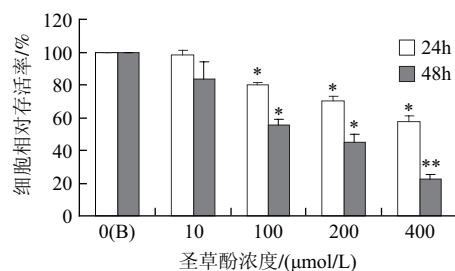


图7 圣草酚抑制HepG2细胞活性的作用

Fig.7 Inhibitory effect of eriodictyol on the viability of HepG2 cells

癌细胞与正常细胞相比一个主要差异表现在细胞的增殖与凋亡失控。抑制癌细胞增殖与诱导癌细胞凋亡被认为是药物具备抗癌效果的一个主要标准^[19]。目前, 临床采用的化疗、药物疗法等治疗肿瘤其作用机制之一就是诱导肿瘤细胞凋亡^[20]。人肝癌细胞系HepG2自建立以来, 已成为进行抗癌药物筛选及研究肝癌发病机制的重要细胞系, 目前, 该细胞系已经广泛应用于基因表达、内源性物质作用机制、外源性物质影响以及病毒感染机制的研究中。由图7可知, 圣草酚处理24、48h均呈浓度依赖性降低HepG2细胞存活率, 浓度达到400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞相对存活率分别为57.45%、22.36%。与24h处理组相比, 圣草酚48h处理组能有效地抑制HepG2细胞活性。

3 结论

在正常情况下, 体内的自由基产生和消除处于动态平衡之中。自由基在生物体内具有参与吞噬病原体, 参与机体免疫和环核苷酸的生物合成, 调节细胞增殖与分化, 参与细胞信号转导等重要的生理功能。当体内自由基积累时造成氧化应激, 过多的自由基攻击细胞造成蛋白质、脂质过氧化和核酸断裂, 进而影响细胞的正常功能, 最终导致肿瘤等慢性疾病的发生^[21]。研究证实, 抗氧化物质可通过捕获和中和自由基、干预自由基作用的通路而抑制自由基对机体的伤害。

该研究发现圣草酚有很强的清除DPPH自由基的能力, 但对羟自由基的清除能力较弱。另一方面, 圣草酚可有效的保护AAPH诱导的蛋白质、脂质、DNA氧化损伤, 该保护作用可能是圣草酚通过清除自由基而抑制了自由基对生物大分子的攻击, 表明圣草酚有良好的抗氧化活性。研究中圣草酚可显著的抑制肝癌细胞的活性, 可能是通过其抗氧化作用使自由基含量低于生理水平, 从而抑制肝癌细胞的活性。

综上所述, 圣草酚可能通过清除自由基而抑制自由基诱导的生物大分子损伤, 同时圣草酚可显著抑制肝癌细胞的活性。该研究为进一步揭示圣草酚的抗氧化功能以及抗氧化功能与抗癌作用之间的联系提供了实验基础。

参考文献:

- [1] CHAUBAN V, JI L, CHAUHAN A. Anti-amyloidogenic, anti-oxidant and anti-apoptotic role of gelsolin in Alzheimer's disease[J]. Biogerontology, 2008, 9(6): 381-389.
- [2] VALKO M, RHODES C J, MONCOL J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer[J]. Chem Biol Inter-Act, 2006, 160(5): 1-40.
- [3] ISMAILI H, TORTORA S, SOSA S, et al. Topical anti-inflammatory activity of *Thymus willdenowii*[J]. J Pharm Pharmacol, 2001, 53: 1645-1652.
- [4] ISMAILI H, SOSA S, BRKIC D, et al. A topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonetii*[J]. J Pharm Pharmacol, 2002, 54: 1137-1140.
- [5] BACKHEET E Y, FARAG S F, AHMED A S, et al. Flavonoids and cyanogenic glycosides from the leaves and stem bark of *Prunus persica* L. Batsch (Meet Ghamr) peach local cultivar in Assiut region[J]. Bull Pharm Sci, 2003, 26: 55-66.
- [6] MINATO K, MIYAKE Y, FUKUMOTO S, et al. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver[J]. Life Sci, 2003, 72: 1609-1616.
- [7] 刘树兴, 赵芳. 从天然植物中开发抗氧化剂研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28: 179-182.
- [8] CLAUDIO B, GIAN M L, FILIPPO D, et al. Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84: 88-92.
- [9] LEE J K. Anti-inflammatory effects of eriodictyol in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 murine macrophages[J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(4): 671-679.
- [10] MATEUS F R, GABRIELA T, CRISTIANI I B W, et al. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81: 544-551.
- [11] ZHANG W Y, LEE J J, KIM Y, et al. Effect of eriodictyol on glucose uptake and insulin resistance *in vitro*[J]. Agric Food Chem, 2012, 60: 7652-7658.
- [12] MISHRA K, OJHA H, CHAUDHURY N K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH • assay: a critical review and results[J]. Food Chem, 2012, 130: 1036-1043.
- [13] 陈金娥, 丰慧君, 张海容. 红茶、绿茶、乌龙茶活性成分抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 62-66.
- [14] 杨建雄, 原江锋, 李发荣. 柿叶黄酮的体外抗氧化作用研究[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 215-217.
- [15] BABUSIKOVA E, HATOK J, DOBROTA D, et al. Age-related oxidative modifications of proteins and lipids in rat brain[J]. Neurochem Res, 2007, 32: 1351-1356.
- [16] STADTMAN E R. Protein oxidation and aging[J]. Science, 1992, 257: 1200-1224.
- [17] SMITH C D, CARNEY J M. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease[J]. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88: 10540-10543.
- [18] LIN Xin, YANG Dingjian, CAI Wenqing, et al. Endomorphins endogenous opioid peptides, provide antioxidant defenses in the brain against free radical-induced damage[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1639(3): 195-202.
- [19] THOMPSON C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267: 1456-1462.
- [20] 范维珂, 赵涌. 现代肿瘤学基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 171-185.
- [21] DATTA K, SINHA S, CHATTOPADHYAY P. Reactive oxygen species in health and disease[J]. Natl Med J India, 2000, 13(6): 304-310.