

# 紫花芸豆肽修复H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对HepG2细胞的氧化应激损伤

马 萍, 程天赋, 郭增旺, 周 义, 王 欣, 曹冬梅\*  
(黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319)

**摘 要:** 目的: 研究紫花芸豆肽 (*Phaseolus vulgaris* peptides, PVPs) 对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的HepG2细胞氧化损伤的保护作用及其作用机制。方法: 体外培养HepG2细胞, 实验分为空白组、模型组 (正常培养24 h后加2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激1 h) 以及PVPs低、中、高剂量组 (分别用50、100、200 µg/mL PVPs处理24 h后, 加2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激1 h), 采用水溶性四唑盐法 (WST-1法) 检测细胞增殖率, 流式细胞仪检测胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 酶联免疫吸附测定法检测胞内抗氧化酶系活力, Western blot法检测凋亡蛋白表达量。结果: PVPs能缓解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>导致的HepG2细胞生长抑制, 降低胞内ROS、丙二醛水平, 提高超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶活力, 并且下调p53、Caspase-3蛋白表达量。结论: PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的HepG2细胞氧化损伤具有一定的保护作用, 能抑制凋亡蛋白的表达, 同时可以调节细胞的氧化还原系统、清除胞内ROS、提高胞内抗氧化酶系的活力。

**关键词:** 紫花芸豆肽; 氧化应激; 抗氧化酶系; 凋亡蛋白

## Cytoprotective Effect of *Phaseolus vulgaris* Peptides against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Damage in HepG2 Cells

MA Ping, CHENG Tianfu, GUO Zengwang, ZHOU Yi, WANG Xin, CAO Dongmei\*  
(College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

**Abstract:** The purpose of this experiment was to investigate the protective effect of *Phaseolus vulgaris* peptides (PVPs) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in HepG2 cells and to elucidate the underlying mechanism. HepG2 cells were cultured *in vitro*, which were divided into blank group, model group (subjected to 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation for 1 h after 24 h culture under normal conditions), and low-, medium- and high-dose PVPs (subjected to 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation for 1 h after 24 h culture in the presence of PVPs at 50, 100 and 200 µg/mL) groups. The cell proliferation rate was measured by WST-1 assay, the reactive oxygen species (ROS) level by flow cytometry, and the intracellular antioxidant enzyme activity by enzyme linked immunosorbent assay, and the expression of apoptotic proteins by Western blot. The results showed that PVPs could alleviate growth inhibition induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HepG2, reduce the levels of ROS and intracellular malondialdehyde, increase superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activity, and down-regulate p53 and caspase-3 protein expression. In conclusion, PVPs has a protective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in HepG2 cells through inhibiting the expression of apoptotic proteins, regulating the cellular redox system, scavenging intracellular reactive oxygen species, and increasing intracellular activity of antioxidant enzymes.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris* peptides; oxidative stress; antioxidant enzyme system; apoptosis protein

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181103-030

中图分类号: O629.72; TS210.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 01-0175-08

收稿日期: 2018-11-03

基金项目: 黑龙江省科技厅应用技术研究及开发计划项目 (GZ13B003); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12541586)  
第一作者简介: 马萍 (1980—) (ORCID: 0000-0001-6748-9478), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为杂粮产品研究与开发。

E-mail: map1999@163.com

\*通信作者简介: 曹冬梅 (1969—) (ORCID: 0000-0001-9985-3633), 女, 教授, 博士, 研究方向为杂粮产品研究与开发。

E-mail: caodong3018@sina.com

引文格式:

马萍, 程天赋, 郭增旺, 等. 紫花芸豆肽修复H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对HepG2细胞的氧化应激损伤[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 175-182.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181103-030. <http://www.spkx.net.cn>

MA Ping, CHENG Tianfu, GUO Zengwang, et al. Cytoprotective effect of *Phaseolus vulgaris* peptides against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in HepG2 cells[J]. Food Science, 2020, 41(1): 175-182. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181103-030. <http://www.spkx.net.cn>

芸豆学名菜豆, 是豆科菜豆属的小宗杂粮作物<sup>[1]</sup>, 是栽培面积仅次于大豆的食用豆类作物之一<sup>[2]</sup>。紫花芸豆是黑龙江省种植量最大的一个品种, 其富含蛋白质、多糖、花色苷、维生素等多种营养成分, 还含有皂苷、尿毒酶等独特成分, 具有提高人体自身免疫力、激活淋巴细胞、抑制肿瘤细胞发展、促进脱氧核苷酸合成等功能, 是开发高档食品及功能性食品的优质原料<sup>[3-5]</sup>。

当机体受到外源性或内源性氧化物质损伤时, 体内自由基产生和清除的动态平衡就会遭到破坏, 从而引起ROS在体内堆积并产生细胞毒性作用<sup>[6]</sup>。自由基水平过高时会氧化细胞膜、代谢酶系、蛋白质和DNA等物质, 还会诱导细胞凋亡, 对机体的细胞及器官造成损伤<sup>[7-9]</sup>。研究表明, 自由基与衰老、炎症、癌症、心血管疾病等都有密切的关系<sup>[10-12]</sup>, 因此, 开发具有清除自由基的功能性食品和药物日益受到重视。抗氧化肽是指具有抗氧化功能的生物活性肽, 由于具有分子质量小、生物活性高、抗原性低、易吸收等特点而被广泛研究<sup>[13-14]</sup>。大量研究表明, 食源性蛋白酶解物如大米蛋白肽、小麦蛋白肽、大豆蛋白肽等具有抗氧化活性, 能够清除自由基<sup>[15-21]</sup>, 但是对生物活性肽是如何通过调控凋亡蛋白通路进行协作发挥抗氧化活性的研究还较少。本课题组前期制备了紫花芸豆抗氧化肽, 并通过体外实验评价了其抗氧化活性, 发现双酶水解得到的紫花芸豆肽(*Phaseolus vulgaris* peptides, PVPs)具有体外抗氧化活性<sup>[21]</sup>。为了系统准确地评价PVPs的抗氧化活性及其作用机制, 本实验采用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞构建细胞氧化应激损伤模型, 采用水溶性四唑盐法(WST-1法)检测细胞增殖率, 流式细胞仪检测胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, 酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测胞内抗氧化酶系活性, Western blot法检测PVPs对细胞凋亡通路的影响, 以此评价PVPs的抗氧化活性并探索其作用机理, 从而为PVPs的功能性食品开发和抗氧化活性肽的作用机制研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

紫花芸豆产地黑龙江省齐齐哈尔市依安县, 蛋白质量分数19.17%, 由国家杂粮工程技术研究中心提

供; 紫花芸豆蛋白由本实验室通过碱提酸沉法<sup>[22]</sup>制得, 纯度92.2%。

人肝癌细胞HepG2 哈尔滨医科大学; DMEM高糖液体培养基、青霉素/链霉素 美国Hyclone公司; 胎牛血清 浙江天杭生物科技有限公司; 胰蛋白酶消化液 美国Gibco公司; 1×磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、BCA蛋白质浓度测定试剂盒(增强型)、RIPA细胞裂解液、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)测定试剂盒、凝胶试剂盒 碧云天生物技术研究; 兔抗p53单克隆抗体、兔抗Caspase-3单克隆抗体、鼠抗Caspase-3单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的抗鼠二抗 美国CST公司。

### 1.2 仪器与设备

CO<sub>2</sub>细胞培养箱、高速冷冻离心机 美国Thermo Fisher公司; 多功能酶标仪 上海三科仪器有限公司; FACS Calibur流式细胞仪 美国BD公司; EVOS荧光显微镜 美国Life Technologies公司; 半干转膜仪、电泳槽、ChemiDoc XRS+化学发光成像系统 美国Bio-Rad公司; TS-2000A多用脱色摇床 海门其林贝尔仪器制造有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 PVPs的制备

PVPs参照课题组前期的研究方法<sup>[21]</sup>制备。工艺路线为: 紫花芸豆蛋白→加水(底物质量分数为7%)→热处理(95℃、10 min)→冷却→调至pH 10、50℃→加质量分数7%胰蛋白酶→恒温恒pH值水解4.5 h→灭酶(95℃、10 min)→冷却→调至pH 9、60℃→加质量分数7%碱性蛋白酶→恒温恒pH值水解3 h→灭酶(95℃、10 min)→透析脱盐12 h→冷冻干燥→PVPs

所得PVPs的纯度为93.2%, 分子质量分布集中在6 kDa以下。

#### 1.3.2 细胞培养与分组

将HepG2细胞置于含有质量分数10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的DMEM(高糖)培养基中, 于37℃、5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养, 待细胞数量达到80%~90%后吸去培养液, 用PBS冲洗

一次, 加入1 mL胰蛋白酶消化3 min, 进行传代培养。将处于对数生长期的细胞接种于培养板中培育4 h后更换培养基, 除去未贴壁细胞并对其进行分组<sup>[23]</sup>。正常对照组: 不加PVPs和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>干预处理, 只加入与实验组PVPs和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>相同体积的PBS; 氧化应激模型组: 不加PVPs干预, 加入与实验组PVPs相同体积的PBS溶液培养24 h后, 加入终浓度为2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液刺激1 h; 实验组: PVPs低剂量组 (PVPs-L)、PVPs中剂量组 (PVPs-M)、PVPs高剂量组 (PVPs-H), 采用终质量浓度分别为50、100、200 μg/mL PVPs干预24 h后, 加入终浓度为2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液刺激1 h。

### 1.3.3 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞增殖率的影响

参照臧琳等<sup>[24]</sup>的方法并略加改动。采用WST-1法检测细胞增殖率。选取对数生长期的HepG2细胞接种于96孔板内, 每孔体积100 μL, 接种密度为 $2.0 \times 10^3$ 个/mL, 置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养, 按照1.3.2节分组方法处理细胞, 弃培养液, 每孔加入10 μL的WST-1溶液, 混匀, 于细胞培养箱内孵育2 h, 振荡充分混匀后, 用酶标仪以450 nm为检测波长、630 nm为参考波长测定吸光度, 按下式计算各组细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{样品组吸光度}}{\text{对照组吸光度}} \times 100$$

### 1.3.4 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞胞内ROS水平的影响

参考Wang Wei等<sup>[25]</sup>的方法并略加改动。选取对数生长期的HepG2细胞接种于6孔板内, 每孔体积2 mL, 接种密度为 $1.0 \times 10^5$ 个/mL, 置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养, 按照1.3.2节分组方法处理细胞后, 每孔加入终浓度10 μmol/L的DCFH-DA荧光探针, 37℃避光反应20 min后吸去探针, 用预冷的PBS洗涤细胞2次, 随后采用胰蛋白酶消化液消化细胞, 离心除去上清液, PBS重悬细胞, 并采用流式细胞仪测定活细胞的ROS含量。

### 1.3.5 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞MDA水平的影响

参考刘艳等<sup>[26]</sup>的方法, 并略加改动。选取对数生长期的HepG2细胞接种于6孔板内, 每孔体积2 mL, 接种密度为 $1.0 \times 10^5$ 个/mL, 置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养, 按照1.3.2节分组方法处理细胞后, 每孔加入100 μL细胞裂解液使细胞裂解, 于4℃、 $1600 \times g$ 下离心10 min, 取上清液作为样本, 参照MDA测定试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书对细胞内的MDA和蛋白质进行定量测定。

### 1.3.6 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞胞内抗氧化酶系活力的影响

参照臧琳等<sup>[24]</sup>的方法并略加改动。选取对数生长期的HepG2细胞接种于6孔板内, 每孔体积2 mL, 接种密度为 $1.0 \times 10^5$ 个/mL, 置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养, 按照1.3.2节分组方法处理细胞后, 用预冷PBS洗涤1次,

弃去PBS, 刮下细胞转移到1.5 mL离心管中, 离心弃上清液, 加入细胞裂解液, 4℃,  $12000 \times g$ 离心10 min。取上清液按照试剂盒说明书检测SOD、GSH-Px及过氧化氢酶(catalase, CAT)活力, 余下部分采用BCA法进行蛋白浓度测定。

### 1.3.7 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞的胞内凋亡蛋白表达量的影响

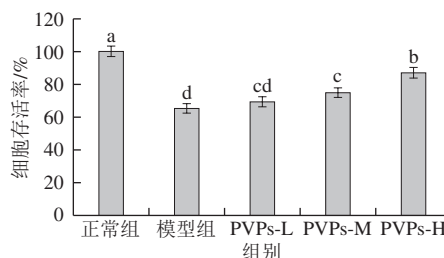
参照Han等的方法<sup>[27]</sup>并略加改动。选取对数生长期的HepG2细胞接种于6孔板内, 每孔体积2 mL, 接种密度为 $1.0 \times 10^5$ 个/mL, 置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养, 按照1.3.2节分组方法处理细胞后, 加入100 μL RIPA细胞裂解液提取细胞总蛋白, BCA法进行蛋白浓度测定, 配制质量分数10%分离胶和5%浓缩胶, 上样, 恒压50、80、120 V电泳各30 min, 半干法转膜, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 一抗4℃孵育过夜, 二抗室温孵育1 h, 暗室中加发光染料底物混合物1 mL于膜上显色1 min, 曝光显影, 结果采用Image Lab软件进行定量分析。

### 1.4 数据统计与分析

实验数据采用平均值±标准差表示。实验数据使用SPSS 19.0软件进行统计分析, 用方差分析法进行显著性检验, 组间比较采用Tukey法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞存活率的影响



小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

图1 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞氧化损伤的抑制作用

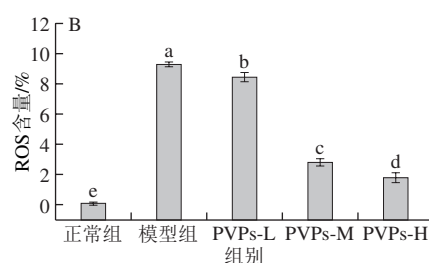
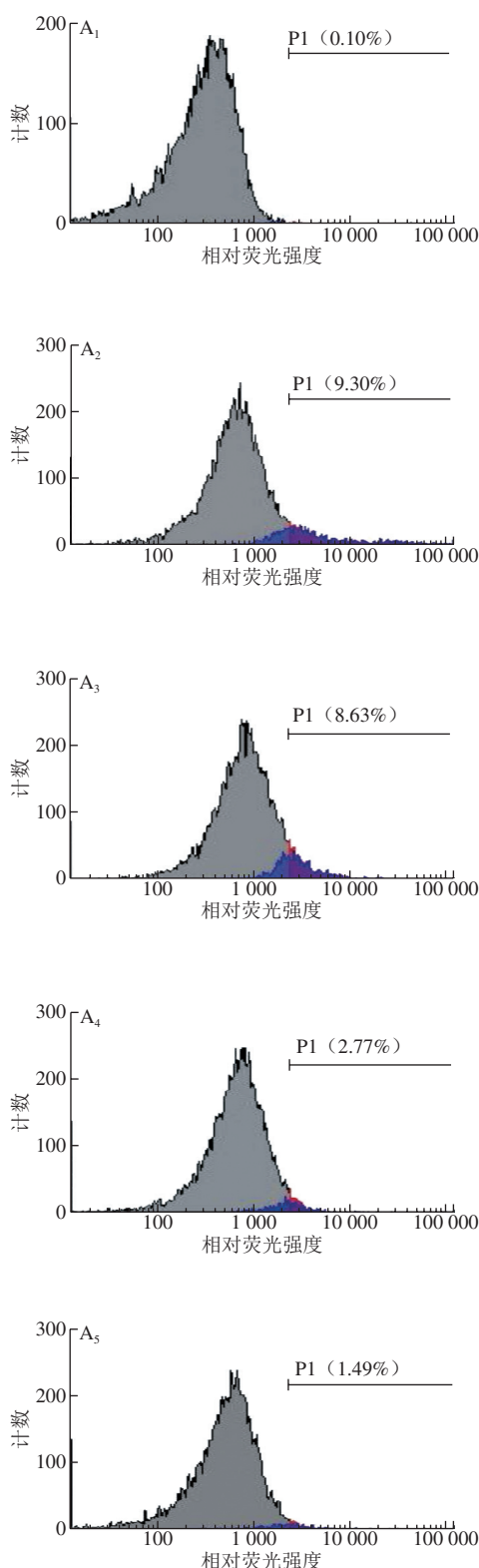
Fig. 1 Effect of PVPs on viability of HepG2 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

由图1可知, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的模型组细胞存活率仅为 $(65.24 \pm 3.01)\%$ , 与正常组相比显著下降 ( $P < 0.05$ ), 这表明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞构建的氧化应激模型成功; 与模型组相比, PVPs中、高剂量组可以显著提高H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>构建氧化应激模型的细胞存活率 ( $P < 0.05$ ), 显著缓解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起HepG2细胞的增殖抑制, 且呈现剂量-效应关系。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是构建氧化应激细胞模型的重要刺激原之一, 能直接氧化细胞膜上的蛋白质和脂类物质, 还能自由穿透细胞膜, 与胞内铁离子结合反应生成羟自由基等自由基, 进而诱导细胞凋亡并造成组织损伤<sup>[28]</sup>。模型组中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对HepG2细胞的增殖产生了显著的抑制作用,



但中、高剂量的PVPs培养HepG2细胞后显著降低了 $H_2O_2$ 对细胞存活率的抑制作用。这表明PVPs能在一定程度上对HepG2细胞起到保护作用,能缓解 $H_2O_2$ 对HepG2细胞的氧化应激损伤。

## 2.2 PVPs对 $H_2O_2$ 诱导HepG2细胞胞内ROS含量的影响



A、B.分别为相对荧光强度和ROS含量;下标1~5.分别为正常组、模型组、PVPs-L组、PVPs-M组、PVPs-H组。

图2 PVPs对 $H_2O_2$ 诱导HepG2细胞胞内ROS含量的影响

Fig. 2 Effect of PVPs on ROS level in  $H_2O_2$ -induced HepG2 cells

当机体受到外界刺激时,巨噬细胞中的线粒体能够通过呼吸爆发机制产生少量的ROS,促进其发挥吞噬和酶解的生理功能<sup>[29-30]</sup>。但在病理条件下,机体内的ROS升高到一定水平且氧化应激机制不足以调控其回归到正常水平时,将对细胞的核酸、蛋白质、生物膜造成氧化损伤,从而诱导细胞发生损伤和凋亡<sup>[31]</sup>。在HepG2细胞处理后装载ROS探针DCFH-DA,并使用流式细胞仪对胞内ROS水平进行检测,ROS可以氧化胞内无荧光的DCFH转变成荧光DCF。因此,通常以正常细胞作为内参,以发生荧光信号强度改变的细胞数占总细胞数的比值表征细胞内的ROS水平,偏移量越大代表荧光强度越高,比例越高代表ROS水平越高。由图2可知,与正常组相比,模型组的ROS含量显著升高( $P<0.05$ );低、中、高剂量的PVPs显著降低了胞内ROS含量( $P<0.05$ ),且呈现剂量-效应关系。这表明PVPs可以减轻 $H_2O_2$ 诱导HepG2细胞胞内ROS含量的升高,从而发挥其抗氧化应激的功能,减轻ROS对细胞和机体引发的氧化损伤。

## 2.3 PVPs对 $H_2O_2$ 诱导HepG2细胞MDA水平的影响

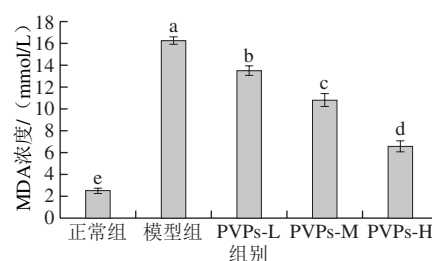


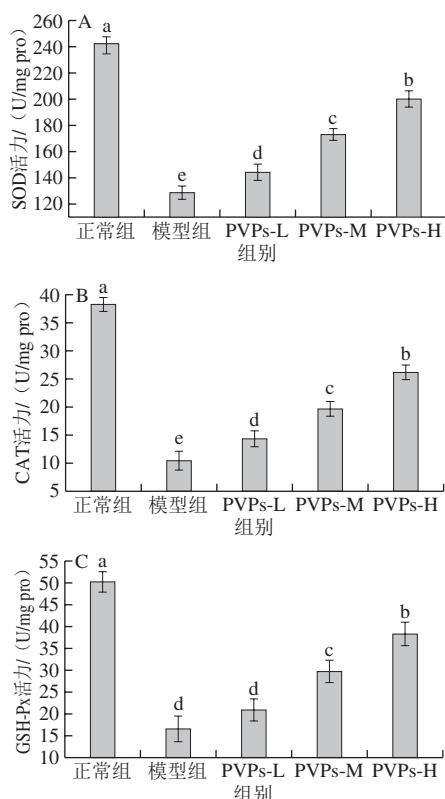
图3 PVPs对 $H_2O_2$ 诱导HepG2细胞MDA浓度的影响

Fig. 3 Effect of PVPs on MDA concentration in HepG2 cells induced by  $H_2O_2$

MDA是生物体内的脂质物质受到自由基氧化而生成的最终氧化产物。ROS极易氧化细胞膜中的不饱和脂肪酸,形成脂质自由基,从而引发脂质过氧化作用导致细胞膜发生损伤,引起MDA水平升高,因此MDA水平直接反映了细胞膜受到自由基氧化损伤的严重程度<sup>[32]</sup>。由图3可知, $H_2O_2$ 诱导的模型组MDA水平与正常组相比显著上升( $P<0.05$ );与模型组相比,低、中、高剂量的PVPs均显著抑制 $H_2O_2$ 引起的氧化应激模型细胞MDA浓度的

上升 ( $P<0.05$ ), 且呈现剂量-效应关系。模型组MDA水平显著升高表明其细胞受到ROS刺激后, 细胞膜发生严重损伤; 而PVPs能显著降低细胞的MDA水平, 表明PVPs能对抗ROS引发的脂质氧化作用, 具有减轻自由基对机体氧化应激损伤的活性。

#### 2.4 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞抗氧化酶系活力的影响



A~C. 分别为SOD、CAT和GSH-Px活力。

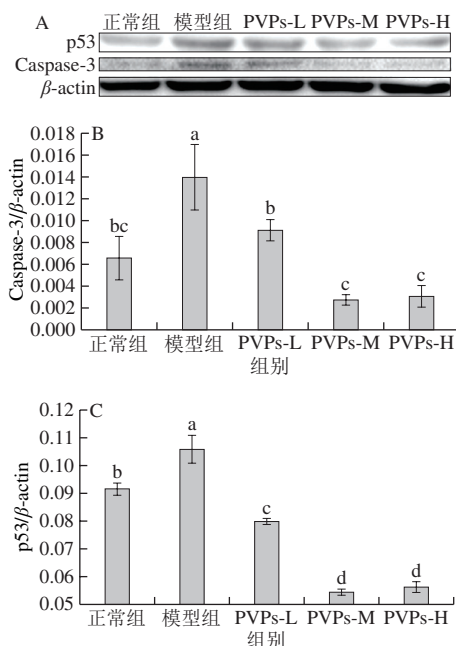
图4 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞抗氧化酶系活力的影响

Fig. 4 Effect of PVPs on antioxidant enzyme activity in HepG2 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

SOD、CAT和GSH-Px均为细胞抗氧化酶系中的重要组成部分, 在机体发挥抗氧化和维护氧化应激动态平衡中发挥着重要的作用<sup>[33-34]</sup>。SOD能催化过氧阴离子发生歧化反应从而发挥清除自由基的作用; CAT约占CAT体系总量的40%, 能催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成水和氧气, 是CAT体系的标志性酶; GSH-Px是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶, 其组成部分中的硒能催化GSH与过氧化物反应, 生成无毒的羟基化合物和氧化型谷胱甘肽, 促使对机体和细胞有毒有害的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 从而保护细胞和机体免受过氧化物的损伤; 机体内的抗氧化酶系活力直接反映了细胞在氧化应激环境下的动态平衡调节能力<sup>[35-37]</sup>。由图4可知, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞建立的氧化应激细胞模型的抗氧化酶系活力与正常组相比均显著降低 ( $P<0.05$ ); 与模型组相

比, PVPs低、中、高剂量组的SOD、CAT、GSH-Px活力均显著升高 ( $P<0.05$ ), 且呈现剂量-效应关系。这表明此浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>破坏了细胞的氧化调节动态平衡, 细胞自身的抗氧化代谢调控能力不足以应付外界刺激, 细胞受到严重的氧化应激损伤<sup>[33]</sup>; 而在PVPs培养24 h后细胞的抗氧化酶系活力均显著提高, 表明PVPs能减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对细胞抗氧化酶系的破坏作用, 减轻氧化应激损伤并提高对外界氧化应激的调控能力, 这也和之前PVPs能减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对细胞膜损伤的结果相一致。

#### 2.5 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞凋亡信号通路的影响



A~C. 分别为Western blot图、Caspase-3/β-actin和p53/β-actin比值。

图5 PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HepG2细胞Caspase-3、p53蛋白表达量的影响

Fig. 5 Effect of PVPs on the protein expression of caspase-3 and p53 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HepG2 cells

p53蛋白又称凋亡蛋白, 负责维持细胞基因组的完整性、DNA损伤的修复和细胞周期的运行, 主要介导DNA损伤后的细胞应激反应<sup>[38]</sup>。正常细胞内的p53蛋白含量较低, 当由于外界环境造成核内DNA损伤时胞内p53表达量上升, 调控细胞分裂周期停止于G1期, 自我修复发生损伤的基因, 若修复失败则与其他凋亡基因协同诱导细胞发生凋亡<sup>[39-40]</sup>。Caspases通路在所有细胞发生凋亡时都会被激活, 而Caspase-3是细胞发生凋亡的最终执行者。正常细胞内的Caspase-3蛋白处于非激活状态, 当细胞发生凋亡时, Caspase-3蛋白被激活转化裂解产生能诱导细胞凋亡的活性片段, 后者能进入核内激活核酸内切酶, 从而使DNA发生裂解, 进而诱导细胞凋亡<sup>[41-42]</sup>。由图5可知, 与正常组相比, 模型组胞内Caspase-3和p53表达量显著升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组相比, PVPs低、中、高剂量组的Caspase-3和p53

蛋白表达量均显著下降 ( $P < 0.05$ )。本实验结果表明此浓度的 $H_2O_2$ 诱导了HepG2细胞凋亡蛋白的表达, 而PVPs能抑制胞内凋亡蛋白的表达, 并且与浓度呈现正相关, 这和PVPs能显著缓解 $H_2O_2$ 引起HepG2细胞增殖抑制的作用结果相一致。

### 3 讨论

机体生长代谢过程中产生的自由基具有多种生理功能, 如预防感染、激活细胞、信号传导等。但是过多的自由基能导致机体正常的细胞组织发生病变并引起氧化应激反应, 造成蛋白质损伤、DNA突变、细胞膜磷脂层氧化及低密度脂蛋白变性等损伤<sup>[43-44]</sup>, 并促进癌症、动脉粥样硬化和糖尿病等疾病的病理学发展<sup>[45-47]</sup>。自由基衰老学说提出, 机体的衰老是自由基在细胞内逐渐积累并引起过度氧化损伤而导致的。大量研究表明, 通过膳食补充抗氧化成分能够增强机体的防御能力, 帮助维持机体的氧化动态平衡。蛋白质是食物的重要组成部分, 其水解产物具有特殊的生理功能, 如大豆蛋白、鸡蛋蛋白、花生蛋白、绿豆蛋白等均具有极强的抗氧化能力。PVPs是采用双酶水解技术从紫花芸豆蛋白中提取得到的水溶性活性多肽, 前期研究表明, PVPs具有体外抗氧化活性, 但是体内抗氧化活性及其作用机制还尚未可知<sup>[21,48]</sup>。本实验为了深入研究开发紫花芸豆抗氧化生物活性肽, 进一步探讨了PVPs对HepG2细胞氧化应激损伤中的细胞存活率和抗氧化调节系统的影响。 $H_2O_2$ 是一种重要的ROS, 性质相对稳定, 常作为体外氧化应激损伤的造模药物。因此, 本实验以HepG2细胞作为研究对象、 $H_2O_2$ 为造模药物诱导建立氧化应激损伤模型, 通过细胞存活率、ROS水平、抗氧化物酶系活力及凋亡蛋白表达进行探讨, 分析PVPs的抗氧化活性及其作用机制。

细胞存活率是表征细胞状态的基础指标, 直接反映外界刺激对细胞的损伤程度。高浓度ROS能直接损伤HepG2细胞, 诱导细胞发生凋亡<sup>[39]</sup>。由细胞存活率和免疫印迹实验可知,  $H_2O_2$ 诱导能对细胞造成损伤并使其存活率显著下降, 并且能促进细胞内凋亡蛋白p53和Caspase-3表达量的显著升高。p53蛋白的生理学作用是当DNA发生损伤时, 其表达量升高, 调控细胞进行自我基因修复, 当损伤不可逆时则协同其他凋亡蛋白诱导细胞发生凋亡, 而Caspase-3蛋白是细胞凋亡的最终执行者<sup>[48-49]</sup>。这表明 $H_2O_2$ 能显著降低细胞存活率, 引起胞内DNA的损伤, 从而造成p53表达量的升高, 并与Caspase-3蛋白发生协同作用, 进而诱导细胞凋亡。而PVPs处理HepG2细胞显著降低了 $H_2O_2$ 对其存活率的抑制作用, 并且显著降低了胞内p53和Caspase-3蛋白的表达量。这表明PVPs能在一定程度上对HepG2细胞起到保护作用, 能通过抑制其

凋亡基因的表达和减轻ROS对胞内DNA的损伤, 从而缓解 $H_2O_2$ 对HepG2细胞的氧化应激损伤。

机体存在天然的抗氧化系统, 一定程度内的氧化应激刺激能被自身机体的抗氧化调节系统所补偿, 因而不会引起机体的损伤, 但当外界氧化应激源的刺激较为强烈并超出自身调节范围时, 细胞和组织就会受到氧化应激损伤<sup>[33]</sup>。MDA是细胞膜上不饱和脂肪酸被氧化时所生成的重要代谢产物, 可作为脂质过氧化程度的测定标准, 其水平的高低可间接反映出细胞受自由基损伤的程度。由图3可知, 该浓度下的 $H_2O_2$ 显著提高了细胞的MDA水平, 表明HepG2细胞受到了氧化应激损伤。而PVPs处理HepG2细胞显著降低了 $H_2O_2$ 所引起的MDA浓度升高, 表明PVPs能够帮助细胞抵御自由基对其的脂质氧化作用。机体内存在两类抗氧化系统能够调控氧化应激反应, 即酶抗氧化系统和非酶抗氧化系统<sup>[25]</sup>。内源性抗氧化物酶SOD、CAT是防止氧化应激产生的第一道防线。由图4可知,  $H_2O_2$ 对HepG2细胞内的抗氧化物酶系具有灭活的作用, 当HepG2细胞受到ROS刺激时会造成整个抗氧化防御系统遭到重创, 细胞内的抗氧化物酶系SOD、CAT和GSH-Px活力显著降低, 并且MDA水平显著升高, 导致细胞发生不可逆的损伤。而PVPs预培养能显著上调抗氧化酶活力并降低MDA水平, 恢复 $H_2O_2$ 引起的氧化应激损伤, 保护细胞内源性抗氧化防御系统, 这也可能是PVPs发挥抗氧化活性的作用机制。

$H_2O_2$ 能对HepG2细胞造成严重的氧化应激损伤。当HepG2细胞遭受ROS刺激后, 细胞膜脂质发生氧化反应并生成代谢产物MDA, 膜通透性增强, 并且对胞内遗传物质造成破坏, 引起p53和Caspase-3凋亡蛋白的表达量升高, 进而导致细胞损伤并诱导其凋亡; 为了抵抗外界ROS的刺激和恢复胞内氧化还原平衡, 内源性的抗氧化物酶系(SOD、CAT和GSH-Px)被大量消耗, 最终导致氧化防御系统紊乱。因此, 当HepG2细胞受到 $H_2O_2$ 刺激后, 细胞存活率显著下降、凋亡通路被激活、MDA和抗氧化物酶系水平显著改变。而本研究结果显示, PVPs能显著提高HepG2细胞的存活率, 降低MDA和胞内ROS水平, 提高抗氧化物酶活力, 降低凋亡蛋白的表达。这表明PVPs能通过降低胞内ROS水平、提高过氧化物酶系和抑制凋亡通路的激活缓解氧化应激损伤。

### 4 结论

本实验研究了PVPs对 $H_2O_2$ 所诱导的氧化应激损伤模型的细胞存活率、ROS水平、MDA水平、抗氧化物酶系活力和p53、Caspase-3蛋白表达量的影响。结果表明: PVPs能缓解 $H_2O_2$ 所引起的HepG2细胞存活率降低, 并降低胞内ROS、MDA水平, 提高抗氧化物酶系中SOD、



CAT、GSH-Px活力,并且下调p53、Caspase-3的蛋白表达量。PVPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的HepG2细胞氧化损伤具有一定的保护作用,能通过提高细胞存活率、降低胞内的ROS水平、减轻细胞膜脂质的氧化程度、抑制凋亡蛋白的表达和提高胞内抗氧化物酶系的活力,提高机体的抗氧化能力,从而增强对外界氧化应激的调控。

#### 参考文献:

- [1] 柴岩,冯佰利,孙世贤.中国小杂粮品种[M].北京:中国农业科学技术出版社,2007:1-22.
- [2] 王强,张亚芝,魏淑红,等.黑龙江省芸豆生产现状与产业化发展[J].中国种业,2008(4):11-12. DOI:10.19462/j.cnki.1671-895x.2008.04.004.
- [3] HAYAT I, AHMAD A, AHMED A, et al. Exploring the potential of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to develop protein based product for food applications[J]. Journal of Animal and Plant Sciences, 2014, 24(3): 860-868. DOI:10.1155/2014/208751.
- [4] YIN Shouwei, TANG Chuanhe, WEN Qibiao, et al. Functional properties and in vitro trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate: effect of high-pressure treatment[J]. Food Chemistry, 2008, 110(4): 938-945. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.02.090.
- [5] 马文鹏,任海伟.芸豆蛋白的提取及其营养价值评价[J].食品科技,2013,38(1):75-79. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2013.01.005.
- [6] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview[J]. Methods in Enzymology, 1990, 186: 1-85. DOI:10.1016/0076-6879(90)86093-B.
- [7] 周逸蒋,张力.活性氧对干细胞向血管平滑肌细胞定向分化的影响及研究进展[J].中国医学前沿杂志(电子版),2013,5(4):38-41. DOI:10.3969/j.issn.1674-7372.2013.04.012.
- [8] FENG Ruo, ZHAI Wenlong, YANG Haiyan, et al. Induction of ER stress protects gastric cancer cells against apoptosis induced by cisplatin and doxorubicin through activation of p38 MAPK[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 406(2): 299-304. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.02.036.
- [9] CROMPTON M. On the involvement of mitochondrial intermembrane junctional complexes in apoptosis[J]. Current Medicinal Chemistry, 2003, 10(16): 1473-1484. DOI:10.2174/0929867033457197.
- [10] THOMAS H, TITUS S, KAROLINE K, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease[J]. Circulation, 2001, 104(22): 2673-2678. DOI:10.1161/hc4601.099485.
- [11] RIKI D, AKINORI T, HISAYOSHI N, et al. Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease[J]. Acta Neuropathologica, 2002, 104(2): 113-122. DOI:10.1007/s00401-002-0523-y.
- [12] WATANABE C, SHU G L, GILTIAY N V, et al. Regulation of B-lineage cells by caspase 6[J]. Immunology & Cell Biology, 2018, 96(10): 1072-1082. DOI:10.1111/imcb.12172.
- [13] 唐宁,庄红.玉米抗氧化肽Leu-Pro-Phe抗氧化稳定性研究[J].中国食品学报,2015,15(2):49-55. DOI:10.16429/j.1009-7848.2015.02.008.
- [14] 张晖,唐文婷,王立,等.抗氧化肽的构效关系研究进展[J].食品与生物技术学报,2013,32(7):673-679. DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2013.07.001.
- [15] 刘卫东,程璞,王章存,等.大米蛋白肽对冷应激时鹌鹑健康状况和血液生化指标的影响[J].中国粮油学报,2016,31(11):81-84. DOI:10.3969/j.issn.1003-0174.2016.11.014.
- [16] ZHANG Junhui, ZHANG Hui, WANG Li, et al. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide[J]. European Food Research & Technology, 2009, 229(4): 709-719. DOI:10.1007/s00217-009-1103-3.
- [17] 陈英.脱脂麦胚酶解粉功能活性研究[D].无锡:江南大学,2010:20-28.
- [18] LI H P, ZHANG J B, SHI R P, et al. Engineering *Fusarium* head blight resistance in wheat by expression of a fusion protein containing a *Fusarium*-specific antibody and an antifungal peptide[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(9): 1242-1248. DOI:10.1094/mpmi-21-9-1242.
- [19] WILKINSON M D, TOSI P, LOVEGROVE A, et al. The *Gsp-1* genes encode the wheat arabinogalactan peptide[J]. Journal of Cereal Science, 2017, 74: 155-164. DOI:10.1016/j.jcs.2017.02.006.
- [20] 杨贤,王炎炎,王锋,等.水解小麦蛋白肽对大鼠急性酒精性胃黏膜损伤的保护作用[J].食品科学,2016,37(13):178-182. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201613032.
- [21] 马萍,郭增旺,迟志平,等.双酶分段水解制备紫花芸豆肽工艺优化及抗氧化测定[J].中国食品添加剂,2018(2):166-176. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2018.02.020.
- [22] 徐清莹,马萍,陆涛,等.响应面优化紫花芸豆蛋白水解及多肽抗氧化研究[J].中国食品添加剂,2017(7):73-79. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2017.07.006.
- [23] BAK M J, JEONG W S, KIM K B. Detoxifying effect of fermented black ginseng on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in HepG2 cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2014, 34(6): 1516-1522. DOI:10.3892/ijmm.2014.1972.
- [24] 臧琳,郭景茹,郭爽,等. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导BRL-3A细胞模拟大鼠肝脏氧化应激损伤的研究[J].中国兽医学报,2013,33(3):445-449. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2013.03.026.
- [25] WANG Wei, MAO Shanhu, YU Hongli, et al. *Pinellia pedatisecta* lectin exerts a proinflammatory activity correlated with ROS-MAPKs/NF- $\kappa$ B pathways and the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 cells accompanied by cell pyroptosis[J]. International Immunopharmacology, 2019, 66: 1-12. DOI:10.1016/j.intimp.2018.11.002.
- [26] 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,2015,34(6):599-604. DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2015.06.008.
- [27] HAN J M, LEE E K, GONG S Y, et al. *Sparassis crispa* exerts anti-inflammatory activity via suppression of TLR-mediated NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 231: 10-18. DOI:10.1016/j.jep.2018.11.003.
- [28] 赵立理,张振昶,苏刚,等.过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)对PC12细胞的氧化应激损伤的研究[J].临床医药文献,2017,96:18826-18827;18989. DOI:10.16281/j.cnki.jocml.2017.96.010.
- [29] TIAN B, WU Y, SHENG D, et al. Chemiluminescence assay for reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on oxidative damage of DNA in *Deinococcus radiodurans*[J]. Luminescence, 2004, 19(2): 78-84. DOI:10.1002/bio.761.
- [30] HSIEH H M, WU W M, HU M L. Genistein attenuates *D*-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B binding activity in neuronal PC12 cells[J]. Life Sciences, 2011, 88(1/2): 82-88. DOI:10.1016/j.lfs.2010.10.021.
- [31] BECKMAN J A, GOLDFINE A B, LEOPOLD J A, et al. Ebselen does not improve oxidative stress and vascular function in patients with diabetes: a randomized, cross-over trial[J]. American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology, 2016, 311(6): 1431-1436. DOI:10.1152/ajpheart.00504.2016.

- [32] 王立方. 脂质氧化应激水平与子痫前期的相关性研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012: 7-27.
- [33] 申迎宾. 四种谷物多酚抗氧化、降血脂作用评价研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 42-60.
- [34] NIKI E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 49(4): 503-515. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016.
- [35] GHELDOF N, WANG X H, ENGESETH N J. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(5): 1500-1505. DOI:10.1021/jf025897t.
- [36] AHMAD S, SINGH V, RAO G S. Antioxidant potential in serum and liver of albino rats exposed to benzene[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1994, 32(3): 203-206.
- [37] MELEGA S, CANISTRO D, DE NICOLA G R, et al. Protective effect of Tuscan black cabbage sprout extract against serum lipid increase and perturbations of liver antioxidant and detoxifying enzymes in rats fed a high-fat diet[J]. *British Journal of Nutrition*, 2013, 110(6): 988-997. DOI:10.1017/s0007114513000068.
- [38] MAXWELL S A, ROTH J A. Posttranslational regulation of p53 tumor suppressor protein function[J]. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 1994, 5(1): 23-57. DOI:10.1615/critrevoncog.v5.i1.20.
- [39] REISMAN D, LOGING W T. Transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 1998, 8(5): 317-324. DOI:10.1006/scbi.1998.0094.
- [40] OKOSHI R, ANDO K, SUENAGA Y, et al. Transcriptional regulation of tumor suppressor p53 by cAMP-responsive element-binding protein/AMP-activated protein kinase complex in response to glucose deprivation[J]. *Genes to Cells*, 2010, 14(12): 1429-1440. DOI:10.1111/j.1365-2443.2009.01359.x.
- [41] INOUE S, BROWNE G, MELINO G, et al. Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2009, 16(7): 1053-1061. DOI:10.1038/cdd.2009.29.
- [42] POURHASSANALI N, ROSHANMILANI S, KHERADMAND F, et al. Zinc attenuates ethanol-induced Sertoli cell toxicity and apoptosis through caspase-3 mediated pathways[J]. *Reproductive Toxicology*, 2016, 61: 97-103. DOI:10.1016/j.reprotox.2016.03.041.
- [43] SOSA V, MOLINÀ T, SOMOZA R, et al. Oxidative stress and cancer: an overview[J]. *Ageing Research Reviews*, 2013, 12(1): 376-390. DOI:10.1016/j.arr.2012.10.004.
- [44] SHI Y C, PAN T M. Red mold, diabetes, and oxidative stress: a review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(1): 47-55. DOI:10.1007/s00253-012-3957-8.
- [45] NGUYEN T T, SHAW P N, PARAT M O, et al. Anticancer activity of *Carica papaya*: a review[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2013, 57(1): 153-164. DOI:10.1002/mnfr.201200388.
- [46] KATTOOR A J, POTHINENI N V K, PALAGIRI D, et al. Oxidative stress in atherosclerosis[J]. *Current Atherosclerosis Reports*, 2017, 19(11): 42. DOI:10.1007/s11883-017-0678-6.
- [47] CHANG C Y, SHEN C Y, KANG C K, et al. Taurine protects HK-2 cells from oxidized LDL-induced cytotoxicity via the ROS-mediated mitochondrial and p53-related apoptotic pathways[J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2014, 279(3): 351-363. DOI:10.1016/j.taap.2014.06.029.
- [48] MOSHREFI M, SPOTIN A, KAFIL H S, et al. Tumor suppressor p53 induces apoptosis of host lymphocytes experimentally infected by *Leishmania major*, by activation of Bax and caspase-3: a possible survival mechanism for the parasite[J]. *Parasitology Research*, 2017, 116(8): 2159-2166. DOI:10.1007/s00436-017-5517-8.
- [49] 张婉嫻, 朱彤彤, 鲁育铭, 等. 郁金水煎剂对四氯化碳致急性肝损伤小鼠肝细胞p53和Caspase-3表达的影响及其对肝损伤的保护作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2014, 40(1): 82-86; 221. DOI:10.7694/jldxyxb20140119.