

陶叶杏,余倩,刘瑞婷,等.广陈皮中黄酮类化合物提取物对 *t*-BHP 诱导 HepG2 细胞氧化损伤保护作用机制[J].华中农业大学学报,2022,41(5):161-168.DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.05.020

广陈皮中黄酮类化合物提取物对 *t*-BHP 诱导 HepG2 细胞氧化损伤保护作用机制

陶叶杏,余倩,刘瑞婷,张曦文,吴婷,潘思轶,徐晓云

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室/
果蔬加工与品质调控湖北省重点实验室,武汉 430070

摘要 为了研究陈化对于广陈皮抗氧化活性的影响,以新鲜干燥果皮、贮藏1 a和10 a广陈皮(*Pericarpium Citri Reticulatae* ‘Chachi’, PCR-C)为研究对象,提取纯化得到广陈皮黄酮类化合物提取物(PCR-CF),以叔丁基过氧化氢(*t*-BHP)诱导 HepG2 细胞作为氧化应激损伤模型,评价陈皮的抗氧化活性,同时利用 qRT-PCR 和 Western blot 技术进一步探究其抗氧化活性作用分子机制。结果显示,广陈皮陈化过程中,橙皮苷含量呈现波动,但总体上是下降趋势;而多甲氧基黄酮及其总含量呈增加趋势,其中 PCR-C10F 中含量最高,PMFs 总含量达到(98.66±0.56) mg/g。而且,不同贮藏年份 PCR-CF 可明显提高 SOD、GSH 水平和降低 MDA 含量,且不同年份间差异显著,PCR-C10F 抗氧化活性最强,SOD、GSH、MDA 水平分别达到(139.38±17.38) U/mg 和(117.81±3.22) μmol/g、(0.39±0.03) nmol/mg。相关性分析表明,川陈皮素的积累是 PCR-C10F 维持氧化还原平衡的主要活性成分。此外,PCR-C10F 显著上调 Nrf2 mRNA 以及其在胞核蛋白中的表达;从而激活抗氧化酶的 mRNA 和蛋白表达水平,HO-1 的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平显著降低。研究表明,陈皮在陈化过程中,多甲氧基黄酮含量呈现增加趋势,抗氧化活性不断增强,PCR-C10F 能够通过调控 Nrf2-ARE 抗氧化信号通路起到氧化应激抵御保护作用。

关键词 广陈皮;黄酮类化合物;抗氧化活性;Nrf2-ARE 通路

中图分类号 R285.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)05-0161-08

广陈皮(*Pericarpium Citri Reticulatae* ‘Chachi’, PCR-C)来源于茶枝柑(*Citri reticulata* ‘Chachi’)的干燥成熟果皮,主要产于广东省江门市新会区^[1]。研究表明,PCR-C 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗哮喘、神经保护作用等生物活性^[2-3]。黄酮类化合物是 PCR-C 中的主要活性成分,主要包括橙皮苷、川陈皮素、橘皮素等糖苷黄酮类化合物和多甲氧基黄酮类化合物^[4]。而且,黄酮类化合物的动态变化对 PCR-C 质量和活性的影响尚不清楚。

氧化应激与人类多种慢性疾病的发生和发展密切相关^[5]。黄酮类化合物表现出较强的抗氧化生物活性,可以作为一种间接抗氧化剂,通过调控细胞内相关抗氧化酶的表达来激活体内的抗氧化机制,从而维持机体氧化还原稳态^[6]。调控细胞内源性抗氧化系统的一系列抗氧化酶和解毒酶主要包括醌氧化

还原酶 1(NQO1)、超氧化物歧化酶 1(SOD1)、谷胱甘肽 S-转移酶- Ω 1(GSTO1)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)以及血红素加氧酶-1(HO-1),在氧化应激损伤下,能够清除体内多余的活性氧,从而在维持细胞内氧化还原稳态方面发挥着重要作用^[7]。而 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)是一种核因子 E2 相关因子 2,这些抗氧化酶的表达由 Nrf2 进行调控。当 Nrf2 被激活后,Nrf2 与 Keap1 蛋白发生解离,从细胞质转移至细胞核内,与细胞核内的抗氧化反应元件 ARE 进行结合,从而诱导下游抗氧化酶的表达,发挥维持机体内氧化还原稳态的作用^[8]。黄酮类化合物可通过 Nrf2-ARE 抗氧化信号通路发挥抗氧化活性,成为一种潜在的 Nrf2 激活剂^[9]。橘皮素能够有效抑制叔丁基过氧化氢(*t*-BHP)诱导的 HepG2 细胞中 ROS 水平的升高,减弱氧化应激损伤

收稿日期:2022-05-22

基金项目:国家自然科学基金项目(32172140);中央高校基本科研业务费专项(2662020SPPY008)

陶叶杏,E-mail: yexing.tao@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:徐晓云,E-mail: xuxiaoyun@mail.hzau.edu.cn

对 GSH 的消耗,通过促进 Nrf2 入核激活下游抗氧化酶 HO-1 和 NQO1 的表达,增强细胞内抗氧化系统,发挥抗氧化活性^[10]。

本研究以新鲜干燥果皮以及贮藏 1、10 a 的广陈皮为研究对象,分析广陈皮在陈化过程中黄酮类化合物的含量变化;以 *t*-BHP 诱导氧化应激损伤的人肝癌细胞 HepG2 细胞为模型,探究 PCR-CF 的抗氧化活性作用,并通过 qRT-PCR 和 Western blot 技术研究 PCR-C10F 的抗氧化作用分子机制,旨在探究广陈皮在陈化过程中黄酮类化合物含量变化与抗氧化活性的相关性,为陈皮的品质控制及合理使用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

人肝癌细胞 (human hepatoma cell, HepG2 cell) 购买于中科院上海细胞库干细胞库。新鲜果皮、贮藏 1 a 和 10 a 的 PCR-C 药材,购自广东省江门市新会区双水镇柑泽园,样品经湖北中医药大学药学院鉴定。MEM 培养基购于美国 Gibco 公司;胎牛血清购于南乌拉圭 Quacell 公司;色谱级的乙腈购于美国 Fisher 公司;色谱级的甲酸购于天津市科密欧化学试剂有限公司;BCA 法蛋白测定试剂盒 (BCA02) 购于北京鼎国昌盛科技有限公司;GSH (A006-2-1)、MDA (A003-4-1)、T-SOD (A001-1-2) 试剂盒购于南京建成生物科技有限公司;RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒购于北京艾德莱生物科技有限公司;荧光定量 PCR 所用引物合成,购于北京擎科生物科技有限公司;TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒和 TaKaRa Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒 (RR047A),均购于宝生物工程 (大连) 有限公司;细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒 (P0028);小鼠单抗 β -actin (BM0627)、HRP 标记羊抗小鼠二抗 (BA1051)、HRP 标记羊抗兔二抗 (BA1054) 均购于武汉博士德生物工程有限公司;兔多抗 Nrf2 (A0674) 购于武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔多抗 HO-1 (10701-1-AP) 购于武汉三鹰生物技术有限公司;兔多抗 NQO1 (DF6437) 购于美国 Affinity Biosciences 公司;兔多抗 SOD1 (PA5-27240) 购于美国 Invitrogen 公司;兔单抗 GSTO1 (ab138491) 和兔多抗 GSH-Px (ab22604) 购于 Abcam 公司;小鼠单抗 Histone H3 (bsm-33042M) 购于北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 主要仪器设备

超声破碎仪,VCX750,美国索尼克斯;全波长酶标仪,MULTISKAN GO,美国 Thermo 公司;高效液相色谱仪,e2695,美国 Waters 公司;微量核酸测定仪,NanoDrop2000,美国 NanoDrop Technologies 公司;电泳仪,DYY-8C,北京六一仪器厂;凝胶成像系统,Gel Doc XR+,美国 LI-COR 公司;荧光定量 PCR 仪,Qtower2.2,德国 Analytik JenaAG 公司;垂直电泳槽,DYCZ-24DN,北京六一仪器厂;电转仪,DYCZ-40,北京六一仪器厂。

1.3 试验方法

1) HepG2 细胞的培养。细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 双抗及 MEM 基础培养基中,置于 37 °C,5% CO₂ 细胞培养箱中,待其长至瓶壁的 80% 左右,用胰蛋白酶消化传代,每隔 3~4 d 传代 1 次。

2) 广陈皮中黄酮类化合物的提取纯化。参照笔者所在实验室前期研究方法^[11],用 80% 乙醇超声辅助提取,料液比 1:20 (g/mL),超声辅助提取 30 min,超声频率 40 kHz,功率 480 W,提取温度 25 °C。用 HPD300 树脂进行纯化富集,最后冷冻干燥得到 PCR-CF。

3) HPLC 分析。参照笔者所在实验室前期研究方法^[11],使用 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 0.1% 甲酸水 (A) 和乙腈 (B) 作为流动相,梯度洗脱条件为 15%~25% B (0~5 min), 25%~35% B (5~20 min), 35%~45% B (20~40 min), 45%~75% B (40~45 min), 75%~85% B (45~50 min), 85%~15% B (50~55 min), 保持 15% B 持续 5 min。色谱柱温度为 25 °C,流速为 1 mL/min,进样量为 20 μ L,设定 280、330 nm 波长进行检测。

4) SOD、GSH、MDA 水平的测定。参照笔者所在实验室前期研究方法^[11],将生长状态良好、处于对数生长期的 HepG2 细胞按照 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,过夜,待细胞贴壁生长。向样品组和样品对照组加入 50 μ g/mL PCR-CF 样品,设置空白对照组和模型组,加入基础培养基,药物作用 24 h 后,模型组及样品组均加入 300 μ mol/L *t*-BHP 刺激诱导细胞 3 h。待细胞处理结束后,收集细胞超声破碎取上清,按 SOD、GSH、MDA 试剂盒说明书进行操作测定各个指标,并按照 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白含量。

5) 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测基因表

达水平。将生长状态良好、处于对数生长期的 HepG2 细胞按照 6×10^5 个/mL 浓度接种于 12 孔板中, 过夜, 待细胞贴壁生长。向样品组和样品对照组加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCR-C10F 样品, 设置空白对照组和模型组, 加入基础培养基, 药物作用 24 h 后, 模型组及样品组均加入 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ *t*-BHP 刺激诱导细胞 3 h。待细胞处理结束后, 采用 RNA pure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒进行 RNA 的提取, 使用 TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒对 RNA 进行反转录, 使用 TaKaRa SYBR Premix Ex TaqTM II 荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR 分析。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因的相对表达量。所用引物如表 1 所示。

表 1 引物序列信息
Table 1 Primers sequence

基因 Gene	序列(5'-3') Primers	参考文献 Reference
GAPDH	F: GGAGTCAACGGATTTGGT	[12]
	R: GTGATGGGATTTCATTG	
Nrf2	F: CTTGGCCTCAGTGATTCTGAAGTG	[12]
	R: CCTGAGATGGTGACAAGGGTTCTA	
HO-1	F: ATGGCCTCCCTGTACCACATC	[12]
	R: TGTTGCGCTCAATCTCCTCCT	
NQO1	F: GGATTGGACCGAGCTGGAA	[12]
	R: AATTGCAGTGAAGATGAAGGCAAC	
GSTO1	F: AGGACGCGTCTAGTCCTGAA	[12]
	R: TTCCCTGGGTATGCTTCATC	
SOD1	F: GGTGGCCAAAGGATGAAGAG	[13]
	R: CCACAAGCCAAACGACTTCC	
GSH-Px	F: CAGTCGGTGATGCCTTCTCG	[13]
	R: GAGGGACGCCACATTCTCG	

6) 蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测蛋白表达。细胞的处理与分组与 RNA 提取的细胞处理方式一致。用加入了蛋白酶抑制剂 (PMSF) 的 RIPA 细胞裂解液进行细胞总蛋白的提取。按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒的方法得到细胞核蛋白。4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min, 离心 5 min, 取上清并用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。根据目标蛋白分子质量大小选择分离胶的浓度, 先恒压 80 V 电泳至溴酚蓝指示剂在浓缩胶与分离胶交界处成线状, 再改为恒压 120 V 至溴酚蓝到凝胶底部, 约需 90 min。电泳结束后进行转膜, 5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 2 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h, ECL 显影并进行拍照。

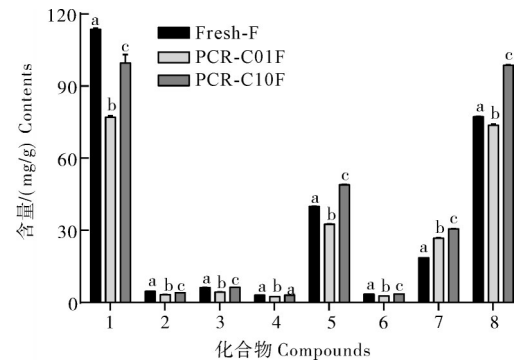
7) 数据统计与分析。试验至少有 3 个独立的平

行试验, 数据结果以平均值 \pm 标准偏差 (Mean \pm SD) 表示。采用 IBM SPSS Statistic Version 25.0 统计软件分析数据, 多组间比较采用单因素 ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 时认为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 PCR-CF 中主要黄酮类化合物的含量变化

PCR-CF 中主要黄酮类化合物含量如图 1 所示^[12], 新鲜陈皮中, 橙皮苷含量最高, 其他主要黄酮类化合物如: 异橙黄酮、甜橙黄酮、5, 7, 8, 4'-四甲氧基黄酮、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘皮素以及多甲氧基黄酮 (PMFs) 的总含量在贮藏 10 a 的陈皮中含量较高。



1. 橙皮苷 Hesperidin; 2. 异橙黄酮 Isosinensetin; 3. 甜橙黄酮 Sinensetin; 4. 5, 7, 8, 4'-四甲氧基黄酮 5, 7, 8, 4'-Tetramethoxyflavone; 5. 川陈皮素 Nobiletin; 6. 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-Heptamethoxyflavone; 7. 橘皮素 Tangeretin; 8. PMFs.

图 1 PCR-CF 中主要黄酮类化合物的含量

Fig.1 The contents of main flavonoids in PCR-CF

2.2 PCR-CF 对 *t*-BHP 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤的影响

细胞内 SOD、GSH 和 MDA 水平可以反映抗氧化活性水平。如表 2 所示, 与模型组相比, Fresh-F 和 PCR-C10F 均能显著提高 HepG2 细胞中 SOD 和 GSH 的活力 ($P < 0.05$), 特别地, PCR-C10F 水平显著高于 Fresh-F ($P < 0.05$); 此外, Fresh-F、PCR-C01F 和 PCR-C10F 均能显著降低 *t*-BHP 诱导的细胞内 MDA 水平 ($P < 0.05$), 其中, PCR-C10F 的 MDA 水平显著低于 Fresh-F 和 PCR-C01F ($P < 0.05$)。结果表明, 在 *t*-BHP 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤作用下, PCR-CF 能够有效改善细胞氧化应激损伤, 从而发挥抗氧化作用, 而且 PCR-C10F 抗氧化活性较强。

PCR-CF 中所含的黄酮类化合物可能是其发挥抗氧化活性的关键成分, 为了进一步探究黄酮类化

合物与抗氧化活性之间是否具有相关性,对PCR-CF中黄酮类化合物的含量与SOD、GSH和MDA水平进行Pearson相关性分析(表3),总PMFs含量与SOD、GSH水平呈现显著正相关($R^2=0.845$ 、 0.934 , $P<0.01$),与MDA水平呈现显著负相关($R^2=-0.903$, $P<0.01$)。在所分析的黄酮类化合物中,只有川陈皮素含量不仅与SOD、GSH水平呈现显著正相关($R^2=0.934$ 、 0.861 , $P<0.01$),而且与MDA水平呈现显著负相关($R^2=-0.918$, $P<0.01$)。结果表明,川陈皮素可能是PCR-CF减轻*t*-BHP诱导的HepG2细胞氧化损伤的关键活性成分。

表2 PCR-CF对*t*-BHP诱导的HepG2细胞中SOD、GSH、MDA水平的影响

Table 2 Effect of PCR-CF on *t*-BHP-induced the levels of SOD, GSH and MDA in HepG2 cells

组别 Group	SOD/(U/mg)	GSH/(μ mol/g)	MDA/(nmol/mg)
对照 Control	154.64 \pm 10.23a	116.39 \pm 2.85a	0.32 \pm 0.09a
Model	101.88 \pm 6.40d	56.26 \pm 3.40c	1.14 \pm 0.13c
Fresh-F	123.76 \pm 12.13c	95.32 \pm 8.55b	0.54 \pm 0.08b
PCR-C01F	106.98 \pm 6.84d	94.10 \pm 4.07b	0.65 \pm 0.04b
PCR-C10F	139.38 \pm 17.38b	117.81 \pm 3.22a	0.39 \pm 0.03a

注 Note:同列字母不同代表差异显著($P<0.05$)。Different letters in the same column represent significant differences ($P<0.05$).

表3 PCR-CF中黄酮类化合物的含量与SOD、GSH和MDA水平相关性分析

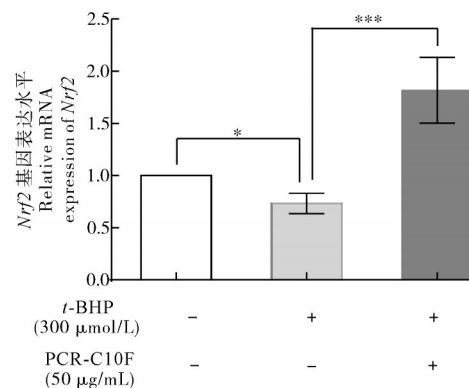
Table 3 Pearson correlation analysis between the content of flavonoids and the levels of SOD, GSH and MDA in PCR-CF

因素 Variable	SOD	GSH	MDA
橙皮苷 Hesperidin	0.647	0.205	-0.425
异橙黄酮 Isosinensetin	0.558	0.117	-0.35
甜橙黄酮 Sinensetin	0.887**	0.576	-0.736*
5,7,8,4'-四甲氧基黄酮 5,7,8,4'-Tetramethoxyflavone	0.828**	0.495	-0.681*
川陈皮素 Nobiletin	0.934**	0.861**	-0.918**
3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone	0.867**	0.598	-0.765*
橘皮素 Tangeretin	0.226	0.656	-0.439
PMFs	0.845**	0.934**	-0.903**

注 Note: *相关性在0.05水平上显著(双尾)。**相关性在0.01水平上显著(双尾)。*Correlation is significant at the 0.05 level (two-tailed). ** Correlation is significant at the 0.01 level (two-tailed).

2.3 PCR-C10F对*Nrf2*基因mRNA表达的影响

PCR-C10F抗氧化活性较强,为了进一步探究PCR-C10F对*t*-BHP诱导的HepG2细胞氧化损伤的保护作用机制,使用qRT-PCR考察了PCR-C10F对氧化应激状态下*Nrf2*基因水平的影响。如图2所示,与模型组相比,在PCR-C10F药物干预作用下,细胞内*Nrf2*基因mRNA的表达水平极显著上调($P<0.001$)。结果表明,PCR-C10F能够通过上调*Nrf2*基因mRNA的表达,从而有效减轻*t*-BHP诱导的HepG2细胞氧化损伤。



GADPH作为内参基因。结果以平均值 \pm 标准差表示, $n=3$ 。*, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$, 下同。GADPH was used as the reference gene. Results were presented as mean \pm SD, $n=3$. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$. The same as below.

图2 PCR-C10F对*t*-BHP诱导HepG2细胞*Nrf2* mRNA表达的影响

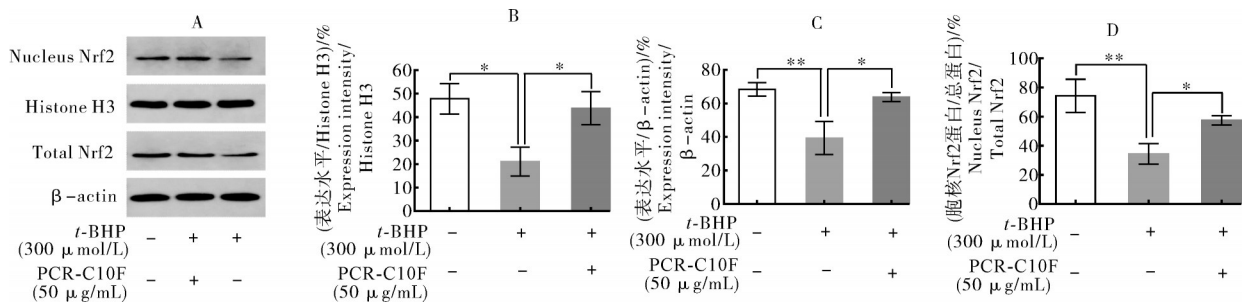
Fig.2 Effect of PCR-C10F on mRNA expression of *Nrf2* in HepG2 cells induced by *t*-BHP

2.4 PCR-C10F对Nrf2蛋白转移入核的影响

为了进一步确定PCR-C10F能否促进细胞内Nrf2转移入核,测定Nrf2蛋白的表达情况。如图3A,B所示,与模型组相比,在PCR-C10F药物干预作用下,Nrf2在胞核蛋白中的表达水平显著增加($P<0.05$)。图3A,C表明,在PCR-C10F药物干预作用下,Nrf2在总蛋白中的表达水平显著增加($P<0.05$)。如图3D所示,与模型组相比,在PCR-C10F药物干预作用下,Nrf2入核率显著增加($P<0.05$)。因此,以上结果表明,在*t*-BHP诱导HepG2细胞氧化损伤作用下,PCR-C10F能够促进HepG2细胞中Nrf2从细胞质转移至细胞核,从而促使Nrf2发挥其转录因子的作用。

2.5 PCR-C10F对抗氧化酶mRNA的影响

测定细胞内NQO1、GSTO1、SOD1、GSH-Px、



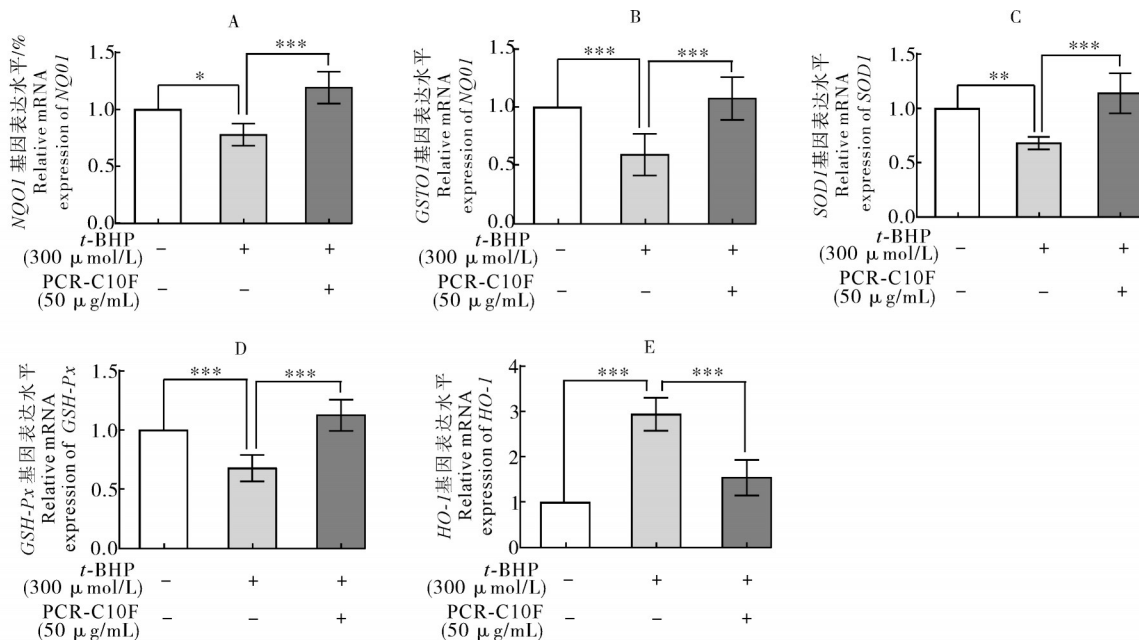
A: 分别提取总蛋白和胞核蛋白,通过 Western blot 技术测定 HepG2 细胞中 Nrf2 蛋白表达情况, Histone H3 作为胞核蛋白内参, β-actin 作为总蛋白内参 The total protein and nuclear protein were extracted to measure the expression level of Nrf2 protein in HepG2 cells via Western blot. Histone H3 was used as the reference protein for nuclear protein and β-actin was used as the reference protein for total protein. B~D 分别为 Nrf2 蛋白在胞核蛋白、总蛋白以及两者之比中表达水平的统计分析结果。结果以平均值±标准差表示, $n=3$ 。The statistical analysis results of the expression levels of Nrf2 protein in nucleus protein, total protein and the ratio of nucleus Nrf2 to total Nrf2. Results were presented as mean ± SD, $n=3$.

图3 PCR-C10F 对 *t*-BHP 诱导 HepG2 细胞 Nrf2 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of PCR-C10F on protein levels of Nrf2 in HepG2 cells induced by *t*-BHP

HO-1 基因的 mRNA 表达水平, 探究 PCR-C10F 能否通过促进 Nrf2 入核上调细胞内抗氧化相关基因的表达。如图 4A~E 所示, 与模型组相比, 在 PCR-C10F 药物干预作用下, *NQO1*、*GSTO1*、*SOD1*、*GSH-Px* 基因的 mRNA 表达水平极显著上调 ($P < 0.001$), *HO-1* 基因的 mRNA 表达水平极显著降低 ($P <$

0.001)。以上结果表明, 在 *t*-BHP 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的作用下, PCR-C10F 能够通过上调 Nrf2-ARE 抗氧化信号通路下游多种抗氧化酶基因 (*NQO1*、*GSTO1*、*SOD1*、*GSH-Px*) 的表达, 下调应激反应蛋白 (*HO-1*) 的基因表达, 维持细胞氧化/抗氧化动态平衡状态。



提取分离细胞总 RNA 后, 通过 qRT-PCR 技术测定 HepG2 细胞中 *NQO1*(A)、*SOD1*(B)、*GSTO1*(C)、*GSH-Px*(D)、*HO-1*(E) 基因 mRNA 表达水平。GADPH 作为内参基因, 结果以平均值±标准差表示, $n=3$ 。The total RNA were extracted to measure mRNA expression of *NQO1* (A), *SOD1* (B), *GSTO1* (C), *GSH-Px* (D) and *HO-1* (E) in HepG2 cells via qRT-PCR. GADPH was used as the reference gene. Results were presented as mean ± SD, $n=3$.

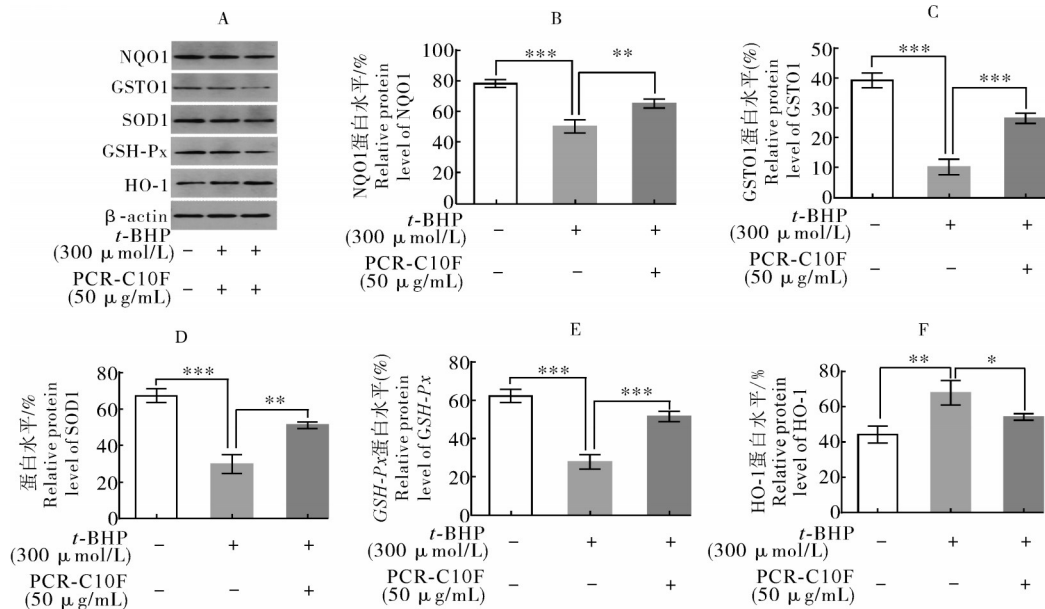
图4 PCR-C10F 对 *t*-BHP 诱导 HepG2 细胞中 *NQO1*、*GSTO1*、*SOD1*、*GSH-Px* 和 *HO-1* mRNA 表达水平的影响

Fig.4 Effect of PCR-C10F on mRNA expression of *NQO1*, *GSTO1*, *SOD1*, *GSH-Px* and *HO-1* in HepG2 cells induced by *t*-BHP

2.6 PCR-C10F 对抗氧化酶和应激反应蛋白的影响

进一步分析 *t*-BHP 刺激诱导下 HepG2 细胞中 NQO1、GSTO1、SOD1、GSH-Px 抗氧化酶蛋白和 HO-1 应激反应蛋白的表达情况,结果如图 5 所示,与模型组相比,在 PCR-C10F 药物干预作用下,NQO1 和 SOD1 蛋白表达水平极显著升高 ($P<0.01$),GSTO1 和 GSH-Px 蛋白表达水平极显

著升高 ($P<0.001$),HO-1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。因此,以上结果表明,在 *t*-BHP 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的作用下,PCR-C10F 能够在基因和蛋白水平通过上调 Nrf2-ARE 抗氧化信号通路下游多种抗氧化酶(NQO1、GSTO1、SOD1 和 GSH-Px)的表达,下调应激反应蛋白(HO-1)的表达,从而维持细胞氧化/抗氧化动态平衡状态,增强细胞在氧化应激损伤下的抗氧化防御能力。



A: 提取细胞中总蛋白,通过 Western blot 技术测定 HepG2 细胞中 NQO1、GSTO1、SOD1、GSH-Px、HO-1 蛋白的表达水平,β-actin 作为内参 The total protein were extracted to measure the expression levels of NQO1, GSTO1, SOD1, GSH-Px and HO-1 protein in HepG2 cells via western blot. β-actin was used as the reference protein for total protein; B~F 分别为 NQO1、GSTO1、SOD1、GSH-Px、HO-1 蛋白表达水平的统计分析结果,结果以平均值±标准差表示, $n=3$ 。The statistical analysis results of the expression levels of NQO1, GSTO1, SOD1, GSH-Px and HO-1 protein. Results were presented as mean ± SD, $n=3$.

图 5 PCR-C10F 对 *t*-BHP 诱导 HepG2 细胞中 NQO1、GSTO1、SOD1、GSH-Px 和 HO-1 蛋白表达水平的影响

Fig.5 Effect of PCR-C10F on protein levels of NQO1, GSTO1, SOD1, GSH-Px and HO-1 in HepG2 cells induced by *t*-BHP

3 讨论

黄酮类化合物是陈皮发挥生物活性的重要物质基础,中国药典以橙皮苷含量作为陈皮质量评价指标,“陈久者良”在陈皮使用和市场定价中被广泛认同,然而橙皮苷含量变化与陈皮的陈化年限并不一致^[14-15]。本研究结果也表明,不同贮藏年份的陈皮中橙皮苷的含量呈现波动状态,其中贮藏 10 a 的陈皮中橙皮苷的含量较新鲜果皮显著降低,提示需要引入更多的黄酮类化合物作为评价指标。本研究显示异橙黄酮、甜橙黄酮、5,7,8,4'-四甲氧基黄酮、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素以及总 PMFs,在陈化过程中虽然呈现波动状态,但 PCR-C10F 中的含量最高,整体上表现出增加的趋势。这

与 Liang 等^[15]提出的陈皮在陈化过程中,橙皮苷含量降低,橘皮素、川陈皮素等多甲氧基黄酮类化合物含量呈现增加的趋势相一致,多甲氧基黄酮类化合物的含量增加可能是陈皮在陈化过程中活性变化的重要影响因素。

t-BHP 是一种氧化损伤诱导剂,可以与细胞膜上的脂质、蛋白质等生物大分子反应引起氧化损伤^[16]。因此,选择 *t*-BHP 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤模型探究 PCR-CF 的抗氧化活性,结果表明,PCR-CF 可通过提高 SOD 活性和 GSH 含量,减少 *t*-BHP 诱导产生的过量 MDA,发挥抗氧化活性作用;而且在陈化的过程中,呈现增强的趋势,其中以 PCR-C10F 的氧化应激保护作用最显著。

在正常生理状态下, Nrf2 与 Keap1 以二聚体的形式定位于细胞质中; 而一旦受到外界刺激, Nrf2 就会与 Keap1 发生解离, 从细胞质转移进至细胞核中, 并与 ARE 作用, 激活下游一系列抗氧化酶的表达^[17]。本研究表明, 在 PCR-C10F 干预下, Nrf2 转录因子的表达在基因和蛋白水平上均显著上调, 而且能够促进 Nrf2 转移入核, 增加其在细胞核中的累积, 从而提高细胞的抗氧化防御能力。研究表明, 陈皮的多甲氧基黄酮类成分提取物能够通过激活 Nrf2 信号通路来发挥抗氧化活性作用^[18], 这与本研究结果一致。此外, PCR-C10F 使细胞保护蛋白 NQO1、GSTO1、SOD1 以及 GSH-Px 在基因和蛋白水平均显著增加, 并下调 HO-1 的表达。与本研究结果一致的是, 甜橙皮水提取物以及其主要成分橙皮苷、橘皮素和川陈皮素^[19] 可通过上调 *t*-BHP 诱导的 HepG2 细胞中 GSH-Px 和 CAT 的表达来抵御氧化应激损伤。而且, 研究表明当 HepG2 细胞暴露于氧化剂的氧化应激损伤下, HO-1 的 mRNA 水平和蛋白表达水平均上调^[20], 黄酮类化合物可以减弱氧化剂诱导的 HO-1 的表达水平^[21]。由此可见, PCR-C10F 通过促进 Nrf2 转移入核, 激活 Nrf2-ARE 抗氧化信号通路下游 NQO1、SOD1、GSTO1 和 GSH-Px 4 种抗氧化酶 mRNA 和蛋白的表达, 下调应激反应蛋白 HO-1 的表达, 减轻细胞的氧化应激损伤, 发挥抗氧化活性。

综上所述, 陈皮在陈化过程中多甲氧基黄酮类化合物含量呈现增加的趋势, 而且其抗氧化活性也随之增强, 而且川陈皮素的积累可能是主要的因素。PCR-C10F 表现出较强的抗氧化活性, 能够通过调控 Nrf2-ARE 抗氧化通路下游抗氧化酶 mRNA 和蛋白的表达减轻 *t*-BHP 对 HepG2 细胞的氧化应激损伤, 从而发挥抗氧化活性, 为陈皮发挥间接抗氧化活性作用机制的研究提供了理论基础, 进而为陈皮的合理贮藏及使用提供一定的理论依据。本研究由于只选取了同一产地同一果园的样本, 而且不同年份的样本量有限, 还需进一步扩充样品的品种来源及年份深入开展研究。

参考文献 References

- [1] 周欣. 陈皮的红外光谱三级宏观指纹谱图分析研究[D]. 广州: 广东药学院, 2007. ZHOU X. Study on analysis of pericarpium citri reticulatae by the multi-steps infrared macro-fingerprint method[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2007(in Chinese with English abstract).
- [2] DUAN L, DOU L L, YU K Y, et al. Polymethoxyflavones in peel of *Citrus reticulata* 'Chachi' and their biological activities[J]. Food chemistry, 2017, 234: 254-261.
- [3] FU M Q, ZOU B, AN K J, et al. Anti-asthmatic activity of alkaloid compounds from *Pericarpium Citri Reticulatae* (*Citrus reticulata* 'Chachi')[J]. Food & function, 2019, 10(2): 903-911.
- [4] YE X L, CAO D, SONG F Y, et al. Preparative separation of nine flavonoids from *Pericarpium Citri Reticulatae* by preparative-HPLC and HSCCC[J]. Separation science and technology, 2016, 51(5): 807-815.
- [5] WILLCOX J K, ASH S L, CATIGNANI G L. Antioxidants and prevention of chronic disease[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2004, 44(4): 275-295.
- [6] WANG Y, LIU X J, CHEN J B, et al. Citrus flavonoids and their antioxidant evaluation[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2022, 62(14): 3833-3854.
- [7] SUZUKI T, YAMAMOTO M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress[J]. Journal of biological chemistry, 2017, 292(41): 16817-16824.
- [8] NITURE S K, KHATRI R, JAISWAL A K. Regulation of Nrf2: an update[J]. Free radical biology and medicine, 2014, 66: 36-44.
- [9] LI Y R, LI G H, ZHOU M X, et al. Discovery of natural flavonoids as activators of Nrf2-mediated defense system: structure-activity relationship and inhibition of intracellular oxidative insults[J]. Bioorganic & medicinal chemistry, 2018, 26(18): 5140-5150.
- [10] LIANG F Q, FANG Y J, CAO W W, et al. Attenuation of tert-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) induced oxidative damage in HepG2 cells by tangeretin: relevance of the Nrf2-ARE and MAPK signaling pathways[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2018, 66(25): 6317-6325.
- [11] YU Q, TAO Y X, HUANG Y T, et al. Aged Pericarpium Citri Reticulatae 'Chachi' attenuates oxidative damage induced by tert-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) in HepG2 cells[J/OL]. Foods (Basel, Switzerland), 2022, 11(3): 273 [2022-02-28]. <https://doi.org/10.3390/foods11030273>.
- [12] WU Y, CHEN Z, DARWISH W S, et al. Choline and ethanolamine plasmalogens prevent lead-induced cytotoxicity and lipid oxidation in HepG2 cells[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2019, 67(27): 7716-7725.
- [13] LIU J, TAN F, LIU X H, et al. Exploring the antioxidant effects and periodic regulation of cancer cells by polyphenols produced by the fermentation of grape skin by *Lactobacillus plantarum* KFV02[J/OL]. Biomolecules, 2019, 9(10): 575 [2022-05-22]. <https://doi.org/10.3390/biom9100575>.
- [14] YANG M, JIANG Z D, WEN M C, et al. Chemical variation of Chenpi (*Citrus* peels) and corresponding correlated bioactive compounds by LC-MS metabolomics and multibioassay analysis[J/OL]. Frontiers in nutrition, 2022, 9: 825381 [2022-05-22]. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.825381>.
- [15] LIANG S J, WENZ J, TANG T X, et al. Study on flavonoid and bioactivity features of the pericarp of *Citri Reticulatae* 'Chachi' during storage[J/OL]. Arabian journal of chemistry, 2022, 15(3): 103653 [2022-05-22]. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103653>.
- [16] OH J M, JUNG Y S, JEON B S, et al. Evaluation of hepatotoxicity and oxidative stress in rats treated with tert-butyl hydroperoxide[J]. Food and chemical toxicology, 2012, 50(5): 1215-1221.
- [17] GUO S S, ZHANG Q. Paeonol protects melanocytes against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through activation of Nrf2 signaling pathway[J]. Drug development research, 2021, 82

- (6):861-869.
- [18] KE Z L, ZHAO Y Y, TAN S, et al. *Citrus reticulata* Blanco peel extract ameliorates hepatic steatosis, oxidative stress and inflammation in HF and MCD diet-induced NASH C57BL/6 J mice[J/OL]. *The journal of nutritional biochemistry*, 2020, 83: 108426 [2020-09-25]. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108426>.
- [19] CHEN Z T, CHU H L, CHYAU C C, et al. Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress [J]. *Food chemistry*, 2012, 135 (4): 2119-2127.
- [20] GHATTAS M H, CHUANG L T, KAPPAS A, et al. Protective effect of HO-1 against oxidative stress in human hepatoma cell line (HepG2) is independent of telomerase enzyme activity [J]. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2002, 34(12): 1619-1628.
- [21] ABATE A, YANG G, WONG R J, et al. Apigenin decreases heme-mediated heme oxygenase-1 induction [J]. *Free radical biology and medicine*, 2005, 39(6): 711-718.

Protective mechanism of flavonoids extracts from *Pericarpium Citri Reticulatae* ‘Chachi’ on *t*-BHP-induced oxidative damage in HepG2 cells

TAO Yexing, YU Qian, LIU Ruiting, ZHANG Xiwen, WU Ting, PAN Siyi, XU Xiaoyun
College of Food Science and Technology/Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education/Hubei Key Laboratory of Fruit & Vegetable Processing & Quality Control, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The flavonoids extracts of *Pericarpium Citri Reticulatae* ‘Chachi’ (PCR-CF) were extracted and purified from fresh-dried tangerine peel and *Pericarpium Citri Reticulatae* ‘Chachi’ (PCR-C) stored for 1 year and 10 years to study the effects of aging process on the antioxidant activities of *Pericarpium Citri Reticulatae* ‘Chachi’. The changes of contents of flavonoids were analyzed with HPLC. The antioxidant activities of PCR-CF were evaluated by using *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)-induced oxidative damage in human hepatoma cells (HepG2 cells) as the model. The molecular mechanism of antioxidant activity was further explored via real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot. The results showed that the content of hesperidin fluctuated, but the overall trend was decreasing during the aging process of dried tangerine peel. The contents of polymethoxyflavonoids (PMFs) and total PMFs showed an increasing trend, among which the content of PCR-C10F was the highest, and the content of total PMFs reached (98.66 ± 0.56) mg/g. Moreover, PCR-CF from different storage years significantly increased the levels of SOD and GSH and reduced the contents of MDA. There was significant difference between different storage periods. The antioxidant activity of PCR-C10F was the strongest, in which the level of SOD, GSH and MDA reached (139.38 ± 17.38) U/mg, (117.81 ± 3.22) μ mol/g and (0.39 ± 0.03) nmol/mg, respectively. The results of correlation analyses showed that the accumulation of nobiletin was the main active component of PCR-C10F to maintain redox balance. PCR-C10F significantly up-regulated the mRNA expression levels of Nrf2 ($P < 0.001$) and increased the expression levels of Nrf2 ($P < 0.05$) in nuclear protein. The mRNA ($P < 0.001$) and protein ($P < 0.01$) expression levels of antioxidant enzymes were significantly activated, and the mRNA ($P < 0.001$) and protein ($P < 0.05$) expression levels of HO-1 was significantly decreased. It is indicated that the contents of PMFs in PCR-CF showed increasing trends and the antioxidant activities enhanced during aging process. PCR-C10F can protect against oxidative stress by regulating the Nrf2-ARE antioxidant signaling pathway. It will provide a theoretical basis for rational storage and quality control of PCR-C.

Keywords *Pericarpium Citri Reticulatae* ‘Chachi’; flavonoids; antioxidant activity; Nrf2-ARE pathway

(责任编辑:陆文昌)