DOI:10.12441/spyswjs.20221114006 [文章编号] 1673-1689(2025)01-0043-11

富硒黑豆蛋白预防苯并[a]芘诱导肝损伤的机制

何紫妍 王珠琳 骆 莹 李建科 袁 莉*

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院,陕西 西安 710119)

摘要:【目的】探究天然富硒黑豆蛋白(SeBSP,含硒质量分数 84.00 mg/kg)对食品热加工有害产物苯并[a]芘(BaP)诱导的 BALB/c 小鼠肝损伤的预防作用。**【方法】**以正常黑豆蛋白(BSP,含硒质量分数 0 mg/kg)为对照,分别对 SeBSP 和 BSP 进行了蛋白质表征检测,并灌胃处理小鼠。灌胃 30 d 后,对小鼠肝脏组织进行病理学观察,检测血清肝功能指标、肝脏氧化指标、BaP 代谢相关指标以及细胞焦亡炎症因子水平。**【结果】**SeBSP 和 BSP 均可预防 BaP 诱发的小鼠肝脏损伤,改善脂质代谢,降低丙二醛(MDA)和过氧化氢(H_2O_2)水平,提高谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和总超氧化物歧化酶(T-SOD)水平。与 BSP 相比,SeBSP 可通过高效降低 BaP 代谢相关酶 AhR 的酶活力,以及 CYP1A1、CYP1B1 和 GST-P1 的 mRNA 相对水平,更好地抑制最终致癌物 BPDE-DNA 的形成,从而减轻 BaP 的肝脏毒性。同时,SeBSP 可以更显著地降低 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 和炎症因子(TNF-α、IL-1β、IL-18、iNOS、COX-2)的 mRNA 相对水平,从而减弱 BaP 诱导的肝脏焦亡性损伤。**【结论】**该研究揭示了 SeBSP 可通过抑制 BaP 对肝脏造成的氧化损伤,调节 BaP 代谢相关酶和减弱细胞焦亡,有效预防 BaP 诱导的肝损伤,为控制 BaP 肝脏毒性和拓展硒资源的功能提供了依据。

关键词:苯并[a]芘;富硒黑豆蛋白;肝损伤;代谢相关酶;细胞焦亡

Mechanism of Selenium-enriched Black Soybean Protein in Preventing Benzo[a]pyrene-induced Liver Injury

*HE Ziyan WANG Zhulin LUO Ying LI Jianke YUAN Li**

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract: [**Objective**] To investigate the preventive effect of natural selenium-enriched black soybean protein (SeBSP, selenium mass fraction is 84.00 mg/kg) on the liver injury induced by benzo[a]pyrene (BaP), a harmful product of high-temperature processed food, in BALB/c mice. [**Method**] This study used normal black bean protein (BSP, selenium mass fraction is 0 mg/kg) as a control. Both SeBSP and BSP, were characterized and used to feed BaP exposed mice by gavage. After 30 d of gavage, the liver tissues of mice were observed histopathologically, and the levels of serum liver function indicators, liver oxidative indicators, BaP metabolism-related indicators and pyroptosis-related inflammatory factors were detected. [**Result**] Both SeBSP and BSP prevented the liver injury caused by BaP, improved lipid metabolism, reduced the levels of MDA and H_2O_2, and increased the levels of GSH-Px and T-SOD in mice. SeBSP outperformed BSP in inhibiting the formation of the final carcinogen BPDE-DNA by effectively reducing the activity of BaP metabolism-related enzyme AhR and the relative mRNA levels of CYP1A1, CYP1B1 and GSTP1, thus attenuating the hepatotoxicity of BaP. Moreover, SeBSP significantly down-regulated the relative mRNA levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD and inflammatory factors (TNF-α, IL-1β, IL-18, iNOS and COX-2), thereby ameliorating the BaP-induced pyroptotic

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31972183);陕西省技术创新引导专项项目(2022QFY09-03);西安市科技计划项目(21XJZZ0008)。

通信作者:袁莉(1986—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事食品营养与安全研究。 E-mail:yuanli112086@snnu.edu.cn

收稿日期:2022-11-14 **修回日期:**2022-12-27

injury in the liver. [**Conclusion**] The results revealed that SeBSP could effectively prevent BaP-induced liver injury by inhibiting BaP-induced oxidative damage to the liver, regulating BaP metabolism-related enzymes and reducing pyroptosis. The findings provide a basis for controlling the hepatotoxicity of BaP and expanding the functions of selenium resources.

Keywords: benzo[a]pyrene; selenium-enriched black soybean protein; liver injury; metabolism-related enzymes; pyroptosis

BaP是典型的多环芳烃类化合物，由5个苯环组成，分子式$C_{20}H_{12}$，相对分子质量252.32，熔点178 ℃[1]。它是世界卫生组织认定的I类致癌物，具有较强的致癌性、致畸性和致突变性[2]，广泛存在于烤肉和糕点等高温加工食品、食用油、厨房油烟中[3-5]。BaP本身没有毒性，但当被细胞色素P450（CYP450）代谢时，会转化为高度致癌物质BPDE，继而与DNA结合，导致包括癌症在内的多种疾病[6-7]。肝脏极易受到毒素、病原物等外界因素的影响，引发炎症、脂肪肝和其他疾病[8-9]。大量研究表明，BaP具有极强的肝脏毒性。作者所在课题组前期研究发现，BaP能通过诱导细胞自噬和细胞焦亡损伤肝细胞[10-11]。此外，BaP也可导致小鼠肝脏氧化损伤和炎症[12]。

硒（Se）是人体必需的微量元素，具有抗氧化、抗肿瘤、保肝、解毒等生物活性[13]。硒以无机或有机形式从饮食中被摄取，并影响机体生理功能[14]。硒在含硒酶，如GSH-Px和硫氧还蛋白还原酶（TrxR）的活性位点中起着至关重要的作用，是许多主要代谢途径的关键成分，包括甲状腺激素代谢、抗氧化防御系统和免疫功能[15]。研究表明，补充硒可能会减少抗甲状腺过氧化物酶（抗TPO）抗体[16]。植物通过肥料、水源和土壤获得无机硒，并利用其生物转化能力合成有机硒，含硒蛋白质是硒的主要存在形式[17-19]。富硒植物蛋白是一种具有多种生理功能的优质硒资源，如富硒糙米蛋白可以有效清除羟基自由基、超氧阴离子自由基和DPPH自由基[20]。Fang等[21]发现，富硒大米蛋白水解产生的富硒肽能够缓解Pb^{2+}诱导的PC12细胞和RAW264.7细胞焦亡及氧化损伤。一些含硒蛋白，如富硒螺旋藻蛋白[22]、硒生物强化玉米肽[23]和硒强化大豆肽[24]等，能够显著降低肝损伤程度。Guo等[23]发现，在刀豆蛋白A诱导的肝损伤模型中，硒强化玉米肽降低了肝脏组织中MDA水平，增加了SOD和GSH-Px的活性，表明适当和有效的硒补充可以预防肝损伤。富硒糙米蛋白肽[25]和含硒藻蓝蛋白[22]也显示出高抗氧化活性和有效的保肝作用。黑豆是一种传统食品原料，其蛋白质丰富，氨基酸种类均衡[26]，主要生长在中国北方。其中陕西省安康市是富硒地区之一，该地区植物可通过自然积累和生物转化获得硒[27]。因此，种植于陕西省安康市的黑豆天然富硒，其生产的SeBSP可被用作优质硒补充剂。然而，SeBSP对BaP诱导的肝损伤有何影响尚不清楚。

该研究旨在通过测定肝功能相关指标、BaP代谢相关酶、BPDE-DNA加合物和经典细胞焦亡指标，研究SeBSP对BaP所致肝损伤的预防作用，为控制BaP毒性和丰富硒资源利用提供新的视角和策略。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

BaP：美国Sigma-Aldrich公司；富硒黑豆：安康汉阴华眸植物药业有限公司；普通黑豆：西安秦氏食品科技有限公司；SeBSP和BSP：以富硒黑豆和普通黑豆为原料，通过碱溶酸沉法制备；溴化钾、甲醇和多聚甲醛：西安晶博生物科技有限公司。清洁级BALB/c小鼠：西安交通大学实验动物中心。

总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸转氨酶（ALT）、GSH-Px、T-SOD、H_2O_2和MDA检测试剂盒：南京建成生物工程研究所；AhR和BPDE-DNA加合物试剂盒：上海酶联生物科技有限公司；BCA蛋白质定量试剂盒：美国赛默飞世尔科技公司；总RNA提取试剂Trizol：生工生物工程有限公司；TransScript all-in-one first strand cDNA synthesis supermix和Perfectstart™ green qPCR supermix：北京全食黄金生物科技有限公司；其他化学品均为分析级。

1.2 仪器与设备

自动均质器：F6/10-10G型，上海FLUKO有限

公司；全自动凯氏定氮仪：Kjeltec 2300型，瑞典福斯公司；微波消解装置：CEM-MARS6型，美国CEM公司；全自动氨基酸分析仪：L-8900型，日本日立公司；扫描电子显微镜（SEM）：SU8220型，日本日立公司；原子荧光分光光度计：AFS-7900型，北京海光仪器有限公司；傅里叶红外分光光度计（FT-IR）：Nicolet iS10型，美国赛默飞世尔科技公司；荧光实时定量PCR仪：FQD-96A型，杭州博日科技股份有限公司。

1.3 蛋白质样品表征

1.3.1 蛋白质质量分数和氨基酸组成分析

蛋白质质量分数通过全自动凯氏定氮仪测定。将100 mg蛋白质样品放入消化管中，加入5 mL 6 mol/L盐酸，超声处理2 min，氮气吹扫2 min后密封。用微波消解装置在180 ℃下消解30 min，冷却后取出。吸取2 mL该溶液至10 mL容量瓶中，加入2 mL 0.5 mol/L氢氧化钠溶液，并加入双蒸水定容。用孔径0.45 μm的无机膜过滤，取1.5 mL滤液至样品瓶，使用全自动氨基酸分析仪测定氨基酸组成。

1.3.2 硒质量分数分析

根据GB 5009.93—2017《食品安全国家标准 食品中硒的测定》中方法，进行适当修改。首先，精确称量0.5 g蛋白质样品，将其添加到含10 mL HNO_3和2 mL质量分数30%的H_2O_2的微波消化槽中，在微波消解装置中消解30 min，然后在200 ℃的电热板上去酸。根据情况添加硝酸，当溶液清澈透明并冒出白烟时，将其置于室温下冷却。然后加入2 mL 6 mol/L盐酸，将六价硒转化为四价硒，并继续加热。当溶液蒸发至约2 mL时，使用中等定量滤纸将其过滤到10 mL定容离心管中定容。同时制备空白样品和标准曲线溶液。然后用原子荧光分光光度计测定溶液。

1.3.3 微观形态观察

使用SEM观察蛋白质样品的微观形态。蛋白质样品经真空喷金后，在20 kV的加速电压下通过SEM观察蛋白质样品。

1.3.4 FT-IR检测

在蛋白质样品中加入一定量的溴化钾，将其研磨成均匀的粉末并压制成薄片。用FT-IR在全波数（4 000~400 cm^{-1}）下扫描样品。

1.4 动物试验

1.4.1 动物与分组

该研究获得陕西师范大学学术委员会科学伦理专业委员会（中国西安）的批准，遵循动物伦理委员会的指导原则。36只6~7周龄BALB/c雄性小鼠在空气经过微粒过滤、标准温度为（25±2）℃、光照/黑暗循环周期为12 h/12 h的环境内，自由摄入高压灭菌过的食物和水。适应1周后，将小鼠随机分为6组，每组6只（n=6）。对照组：每天依次灌胃10 mL/kg（以小鼠体质量计）的生理盐水和橄榄油，间隔2 h。BaP组：首先灌胃10 mL/kg（以小鼠体质量计）的生理盐水，2 h后再灌胃含50 mg/kg（以小鼠体质量计）BaP的橄榄油。SeBSP组：首先灌胃含25 μg/kg（以小鼠体质量计）SeBSP的生理盐水，2 h后灌胃10 mL/kg（以小鼠体质量计）的橄榄油。SeBSP+BaP组：小鼠先后灌胃含25 μg/kg（以小鼠体质量计）SeBSP的生理盐水和含50 mg/kg（以小鼠体质量计）BaP的橄榄油，二者间隔2 h。BSP组：小鼠灌胃含25 μg/kg（以小鼠体质量计）BSP的生理盐水，2 h后灌胃10 mL/kg（以小鼠体质量计）的橄榄油。BSP+BaP组：小鼠依次灌胃含25 μg/kg（以小鼠体质量计）BSP的生理盐水和含50 mg/kg（以小鼠体质量计）BaP的橄榄油，二者间隔2 h。每5 d测量一次小鼠的体质量、摄食量和摄水量。连续灌胃30 d后，禁食不禁水8 h，通过吸入异氟醚麻醉试验动物，称质量、采集血液和肝脏组织样品。

1.4.2 肝功能检测

将血样以2 700 r/min离心20 min，并将血清在4 ℃下保存。根据说明书，使用试剂盒测定血清中TC和TG的浓度、AST和ALT的酶活力。

1.4.3 肝脏组织氧化指标（GSH-Px、T-SOD、MDA、H_2O_2）测定

使用自动均质器均质肝脏样本。在4 ℃下以5 000 r/min离心10 min，收集上清液并使用BCA蛋白质定量试剂盒测定蛋白质质量浓度。根据说明书，使用试剂盒检测肝脏组织上清液中GSH-Px和T-SOD的酶活力、MDA和H_2O_2的质量摩尔浓度。

1.4.4 肝脏中AhR酶活力和BPDE-DNA加合物的测定

用生理盐水均质肝脏样品，使用试剂盒测定AhR酶活力。使用自动均质机以体积分数70%的

甲醇均质肝脏样品，并用 Whatman 1 号滤纸过滤，参照说明书，使用试剂盒测定滤液中的 BPDE-DNA 加合物。

1.4.5 肝脏组织病理学观察

将肝脏组织用质量浓度 4 g/L 的多聚甲醛缓冲液固定，并包埋在石蜡中，按厚度 5~6 μm 切片，分别用 HE 染料和油红 O 染色，低温恒温器处理染色样品后，于光学显微镜下观察并拍照。

1.4.6 反转录定量聚合酶链反应

使用 Trizol 从肝脏组织中提取总 RNA，并使用 TransScript all-in-one first strand cDNA synthesis supermix 合成相应的 cDNA。使用 Perfectstart™ green qPCR supermix 进行反转录定量聚合酶链反应（RT-qPCR）。通过 SYBR Green system 检测 GAPDH、AhR、CYP1A1、CYP1B1、GSTP1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、TNF-α、IL-1β、IL-18、iNOS、COX-2 等蛋白质的转录水平，引物信息见表 1。以 GAPDH 的转录水平为内参，PCR 反应程序为：94 ℃预变性 30 s；94 ℃变性 5 s，60 ℃延伸 30 s，共 40 个循环。数据收集后，分析不同处理组中每个基因的相对转录水平。

1.5 统计分析

所有结果均通过 SPSS 19.0 分析。数据以平均值±标准差（X±SD）表示，进行单因素方差分析（ANOVA），并采用 Duncan's 检验进行显著性分析，P<0.05 表示差异显著。

表 1 用于扩增的引物

Table 1 Primers used for amplification

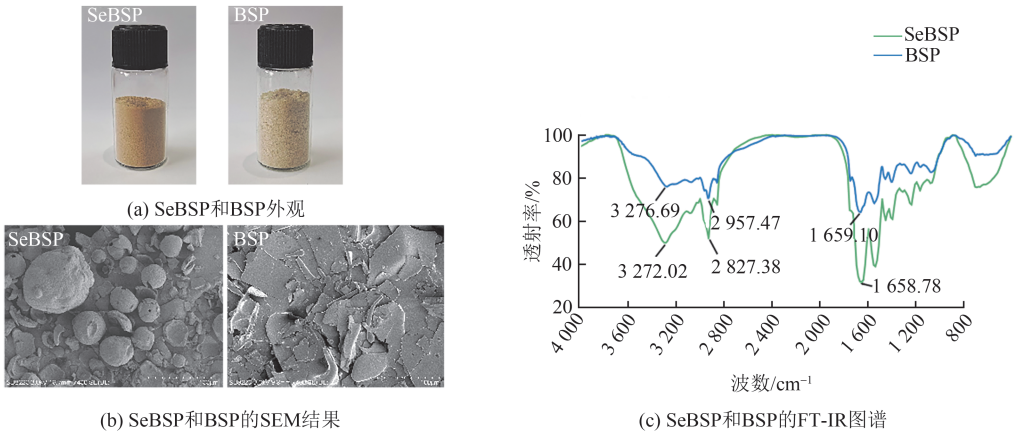
基因（对应蛋白质）	引物序列（5′—3′）	长度/ bp	引物信息
Gapdh（GAPDH）	F：CCTCGTCCCGTAGACAAAATG R：TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	133	NM_008084.2
Ahr（AhR）	F：CTTCATCTTCAGGACCAAACACA R：GAGTGGCGATGATGTAATCTGGT	296	NM_001314027.1
Cyp1a1（CYP1A1）	F：ACCATGACCGGGAACTGTG R：TGCTGAGGACCAGAAGACCG	307	NM_001136059.2
Cyp1b1（CYP1B1）	F：ATGTGCCTGCCACTATTACGG R：CAGGTTGGGCTGGTCACTCAT	179	NM_009994.2
Gstp1（GSTP1）	F：GATGGAGACCTCACCCTTTACC R：GGGCCTTCACGTAGTCATTCTT	196	NM_013541.1
Nlrp3（NLRP3）	F：TAAGAACTGTCATAGGGTCAAAACG R：GTCTGGAAGAACAGGCAACATG	146	NM_001359638.1
Pycard（ASC）	F：ACTATCTGGAGTCGTATGGCTTGG R：TTCTGTGACCCTGGCAATGAG	203	NM_023258.4
Casp1（Caspase-1）	F：CAGGCAAGCCAAATCTTTATCAC R：TCCAACCCTCGGAGAAAGATG	342	NM_009807.2
Gsdmd（GSDMD）	F：TAAGGCTCTGGAGACAACGGTG R：TGACAATAGGAACAGGGAGGC	262	NM_026960.4
Tnf（TNF-α）	F：CCCTCACACTCACAAACCACC R：CTTTGAGATCCATGCCGTTG	93	NM_001278601.1
Il1b（IL-1β）	F：GTAATGAAAGACGGCACACCC R：CAGGCTTGTGCTCTGCTTGTG	181	NM_008361.4
Il18（IL-18）	F：CCATGTCAGAAGACTCTTGCGT R：CAAAGTTGTCTGATTCCAGGTCTC	105	NM_001357221.1
Nos2（iNOS）	F：AGCTCGGGTTGAAGTGGTATG R：CACAGCCACATTGATCTCCG	245	NM_001313921.1
Ptgs2（COX-2）	F：ATAGACGAAATCAACAACCCCG R：GGATTGGAAGTTCTATTGGCAG	193	NC_010339

2　结果与讨论

2.1　蛋白质样品的表征

如图1所示，SeBSP和BSP样品分别呈浅棕色球形颗粒和乳白色片状颗粒。SeBSP和BSP的蛋白质质量分数分别为78.15%和80.96%。2种样品的氨基酸质量分数见表2。其中，谷氨酸和天冬氨酸质量分数较高，精氨酸次之。组成2种蛋白质的必需氨基酸中，SeBSP的亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和苏氨酸质量分数略高于BSP，而BSP中苯丙氨酸、赖氨酸和甲硫氨酸的质量分数高于SeBSP。SeBSP的总必需氨基酸质量分数为252.88 g/kg，略高于BSP的总必需氨基酸质量分数252.47 g/kg。此外，在BSP样品中未检测到硒，而SeBSP的硒质量分数为84.00 mg/kg，显著高于BSP。

2种蛋白质的红外光谱基本相似，见图1(c)。在3 272.02 cm^{-1}附近出现了一个强吸收峰，这是由酰胺基中N—H与分子间及分子内—OH的拉伸振动引起的。波数为2 957.47 cm^{-1}和2 827.38 cm^{-1}的吸收峰是由饱和烃中C—H的拉伸振动引起的。在1 659.10 cm^{-1}和1 658.78 cm^{-1}处窄而尖锐的吸收峰是由醛基中C═O的拉伸振动和蛋白质中酰胺I的拉伸振动引起的。SeBSP和BSP之间的化学键没有明显差异。



(a) SeBSP和BSP外观

(b) SeBSP和BSP的SEM结果

(c) SeBSP和BSP的FT-IR图谱

图1　SeBSP和BSP蛋白质样品的表征

Fig. 1　Characterization of protein samples of SeBSP and BSP

表2　SeBSP和BSP的氨基酸质量分数

Table 2　Mass fraction of amino acid of SeBSP and BSP

样品	氨基酸质量分数/(g/kg)								
	谷氨酸	天冬氨酸	精氨酸	亮氨酸	赖氨酸	丙氨酸	脯氨酸	苯丙氨酸	异亮氨酸
SeBSP	154.22	91.57	65.40	57.90	48.73	44.82	43.32	40.70	34.88
BSP	154.24	89.38	75.40	54.92	49.55	41.07	41.35	81.80	16.27
样品	氨基酸质量分数/(g/kg)								
	缬氨酸	丝氨酸	酪氨酸	甘氨酸	苏氨酸	组氨酸	甲硫氨酸	半胱氨酸	其他游离氨基酸
SeBSP	33.81	30.77	30.18	29.75	25.53	20.43	11.33	0	6.13
BSP	19.99	41.12	34.99	32.33	18.47	26.42	11.47	0	5.47

2.2　SeBSP对小鼠体质量、摄食量和摄水量的影响

短期高剂量和长期低剂量暴露于BaP可降低小鼠体质量[11,28-29]。与之相符，该研究也发现，BaP可明显降低小鼠的体质量、摄食量和摄水量。如图2所示，喂食30 d后，与其他组相比，BaP组小鼠明显变瘦，毛发稀疏且失去光泽。SeBSP组小鼠体型较大。如图3(a)所示，从第10天起，BaP组小鼠体质量明显下降，其他组均无明显变化。由于每日灌胃，各组小鼠的摄食量和摄水量都急剧下降，见图3(b)~(c)，其中BaP组小鼠的摄食量和摄水量减少最为明显。综上，SeBSP和BSP可以改善BaP诱导的摄食量、摄水量下降以及小鼠瘦小和毛发稀疏情况。

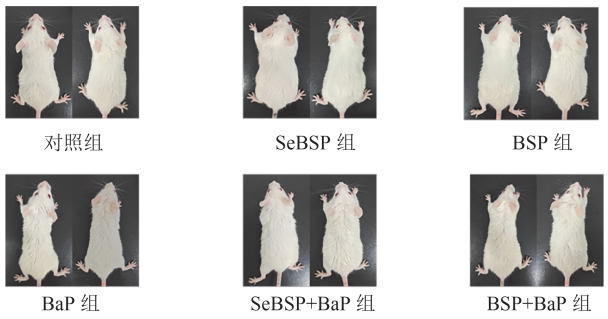
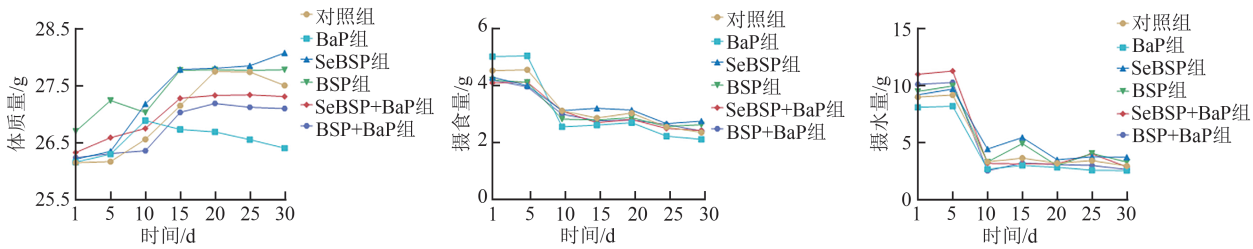


图 2　SeBSP 和 BSP 对小鼠外观的影响

Fig. 2　Effects of SeBSP and BSP on the appearance of mice

2.3　SeBSP 对肝功能的影响

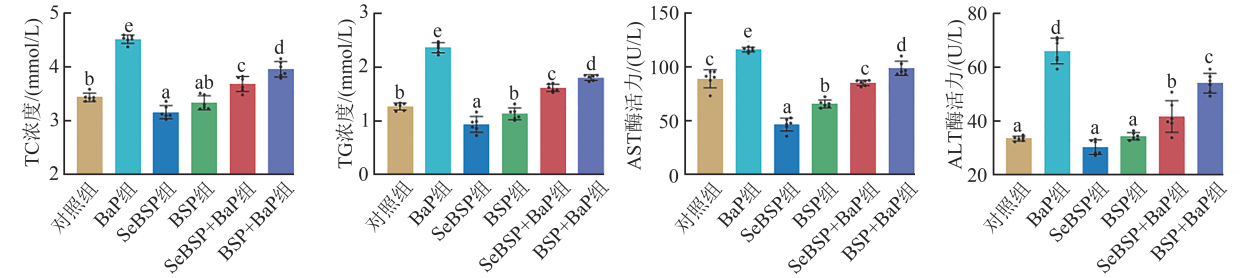
血清中 TC、TG、AST 和 ALT 水平反映了肝损伤的程度。TC 和 TG 作为肝脏脂质代谢指标，血清中 TC 和 TG 浓度的增加可引起脂质代谢紊乱[11]。AST 和 ALT 通常存在于肝细胞中，如果肝细胞受损，二者将进入血液[12]。大量研究证实，暴露于 BaP 可明显升高小鼠血清中 TC、TG、AST 和 ALT 水平[30-31]。如图 4 所示，与对照组相比，BaP 组的 TC、TG、AST 和 ALT 水平分别显著升高 31.24%、85.21%、30.30% 和 96.71%（P<0.05），SeBSP 和 BSP 预处理可明显降低 BaP 引起的这些指标的升高，且 SeBSP 效果更佳。例如，与 BaP 组相比，SeBSP+BaP 组的 TG 和 ALT 水平分别显著降低 31.48% 和 36.68%（P<0.05）；BSP+BaP 组的 TG 和 ALT 水平分别显著降低 23.42% 和 17.99%（P<0.05）。SeBSP 和 BSP 预处理可有效预防 BaP 对肝功能的损伤作用。



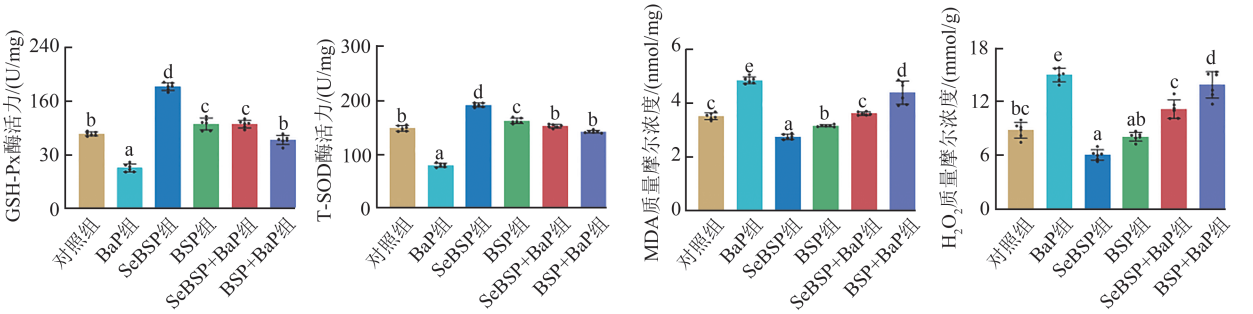
(a) 体质量　(b) 摄食量　(c) 摄水量

图 3　SeBSP 和 BSP 对小鼠体质量、摄食量和摄水量的影响

Fig. 3　Effects of SeBSP and BSP on body weight, food intake and water intake of mice



不同字母表示差异显著(P<0.05)。(a) 血清TC浓度　(b) 血清TG浓度　(c) 血清AST酶活力　(d) 血清ALT酶活力



不同字母表示差异显著(P<0.05)。(e) GSH-Px酶活力　(f) T-SOD酶活力　(g) MDA质量摩尔浓度　(h) H_2O_2质量摩尔浓度

图 4　SeBSP 和 BSP 对肝功能的影响

Fig. 4　Effects of SeBSP and BSP on liver function

抗氧化酶，如GSH-Px、T-SOD等，能够保护组织免受自由基造成的损伤[32]。MDA是脂质过氧化的标志，是氧化损伤的特征性指标；H_2O_2是活性氧种类之一，是普遍存在的自由基[29,33]。氧化损伤会导致肝功能异常。为了确定补充SeBSP是否减轻了BaP诱导的肝脏氧化损伤，作者对肝脏抗氧化酶GSH-Px和T-SOD的酶活力进行了检测，结果见图4(e)~(f)。与对照组相比，BaP组的GSH-Px和T-SOD酶活力分别显著降低45.32%和45.67%(P<0.05)。同时，与对照组相比，BaP组的肝脏MDA和H_2O_2质量摩尔浓度分别显著增加43.76%和69.37%(P<0.05)，见图4(g)~(h)。而SeBSP和BSP能够有效延缓BaP诱导的GSH-Px和T-SOD酶活力的降低以及MDA和H_2O_2水平的增加，并且SeBSP比BSP更有效，例如，与BaP组相比，SeBSP+BaP组和BSP+BaP组的GSH-Px酶活力分别显著升高106.54%和76.41%(P<0.05)，SeBSP+BaP组和BSP+BaP组的肝脏MDA分别显著降低25.64%和7.45%(P<0.05)。SeBSP和BSP有效抑制了BaP诱导的肝脏氧化损伤，且SeBSP抑制效果更佳。

图5的HE染色结果显示，对照组以及SeBSP和BSP组的肝细胞形状和大小均匀，组织致密，细胞间质较少。与BaP组相比，SeBSP和BSP预处理可减轻BaP引起的肝细胞损伤，且SeBSP的作用更为明显。图5的油红O染色结果显示，用BaP处理的小鼠肝脏中脂质分布不均匀，脂质堆积严重，而SeBSP和BSP可以改善BaP诱导的肝脏脂质积累，尤其是SeBSP预处理的作用更有效。

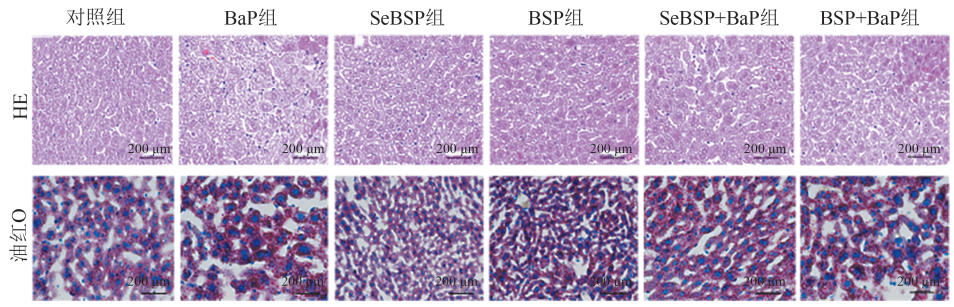


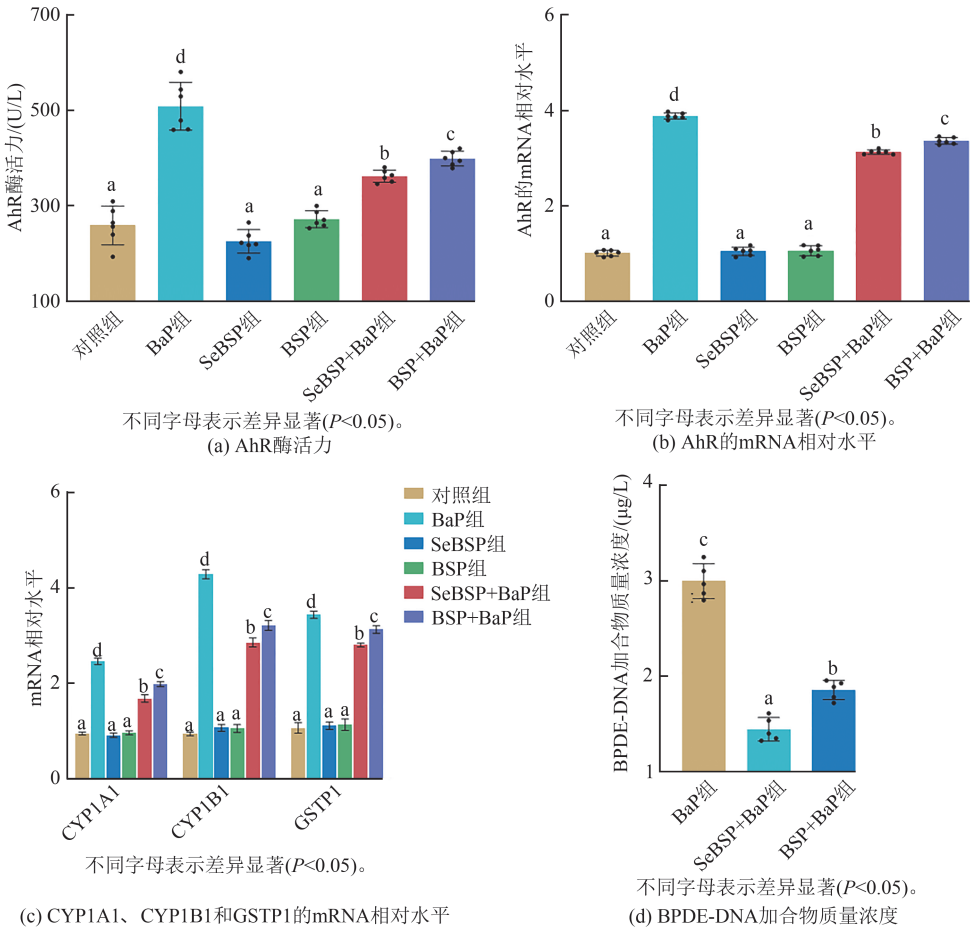
图5　肝脏组织病理学观察

Fig. 5　Histopathological observation of livers

2.4　SeBSP对BaP代谢相关酶和BPDE-DNA加合物的影响

致癌代谢物的生物效应不仅取决于CYP酶(I相酶)的激活，还取决于II相酶的解毒[34]。BaP进入机体后，必然与其受体AhR结合，并激活AhR发生核易位，上调下游CYP1A1和CYP1B1的表达[35]，CYP酶进一步作用于BaP，形成最终致癌物BPDE[36-37]。II相酶，如GSTP1，可使BPDE等环氧化物形成更易被排泄的水溶性产物，从而起到解毒作用[38]。为了分析SeBSP对BaP代谢的影响，测定了肝脏组织中BaP代谢相关酶的mRNA相对水平。结果显示，与对照组相比，BaP组小鼠的肝脏中AhR酶活力显著提高了96.25%(P<0.05)；与BaP组相比，SeBSP和BSP预处理后，小鼠肝脏组织中AhR酶活力分别显著降低了37.83%和22.91%(P<0.05)，见图6(a)。与对照组相比，BaP组AhR的mRNA相对水平增加了近3倍。而与BaP组相比，SeBSP+BaP组和BSP+BaP组中AhR的mRNA相对水平分别显著减少了19.29%和13.35%(P<0.05)，SeBSP和BSP预处理有效钝化了BaP对AhR的促进作用，见图6(b)。此外，与对照组相比，BaP组中CYP1A1、CYP1B1和GSTP1的mRNA相对水平分别增加了1.65倍、3.70倍和2.30倍(P<0.05)，而SeBSP和BSP的预处理显著降低了BaP代谢相关基因的转录，并且SeBSP抑制效果突出，例如，与BaP组相比，SeBSP+BaP组和BSP+BaP组中CYP1B1的mRNA相对水平分别显著减少了33.73%和25.35%(P<0.05)，见图6(c)。

此外，BaP能够被CYP450代谢为致癌化合物BPDE[39]，BPDE与DNA结合形成BPDE-DNA加合物，导致严重的DNA损伤。如图6(d)所示，与BaP组相比，SeBSP和BSP预处理组的BPDE-DNA



不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(a) AhR酶活力

不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(b) AhR的mRNA相对水平

不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(c) CYP1A1、CYP1B1和GSTP1的mRNA相对水平

不同字母表示差异显著(P<0.05)。
(d) BPDE-DNA加合物质量浓度

图 6　SeBSP 和 BSP 对 BaP 代谢相关酶和 BPDE-DNA 加合物的影响

Fig. 6　Effects of SeBSP and BSP on BaP metabolism-related enzymes and BPDE-DNA adduct

加合物质量浓度显著降低了 51.51% 和 37.89%（P<0.05）。

结果表明，相较于 BSP，SeBSP 可更显著地抑制 BaP 造成的 AhR 酶活力的提高，抑制 AhR、CYP1A1、CYP1B1、GSTP1 的基因转录以及 BPDE-DNA 加合物的形成，从而有效降低 BaP 的肝脏毒性。

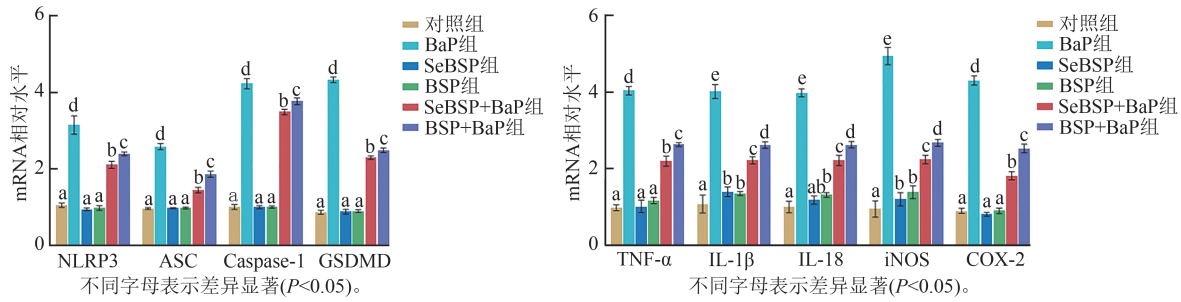
2.5　SeBSP 对 BaP 诱导的肝脏焦亡性损伤的影响

细胞焦亡是一种伴随着膜孔隙形成和内容物释放，进而引发炎症反应的促炎性程序性细胞死亡[40]。与凋亡和坏死不同，细胞焦亡依赖于炎症性 Caspase 发生[41]，并伴有炎症因子释放[42-43]。已有研究证实，细胞焦亡在肝脏疾病的进展中发挥着重要作用[44-46]。作者所在课题组前期研究表明，BaP 可以通过 NF-κB/NLRP3/Caspase-1 信号通路诱发 HL-7702 肝细胞焦亡性损伤[47]。为确定 SeBSP 能否通过抑制 BaP 诱导的细胞焦亡减轻肝损伤，检测了细胞焦亡相关经典蛋白的 mRNA 水平。如图 7（a）所示，与对照组相比，BaP 组 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSDMD 的 mRNA 相对水平分别显著增加 2.00 倍、1.68 倍、3.21 倍、4.00 倍（P<0.05）。SeBSP 和 BSP 预处理可明显降低这些 mRNA 的相对水平，并且 SeBSP 的作用比 BSP 更明显，例如，与 BaP 组相比，SeBSP+BaP 组和 BSP+BaP 组中 GSDMD 的 mRNA 相对水平分别显著降低 47.03% 和 42.60%（P<0.05）。

细胞焦亡伴有炎症因子的释放。因此，作者也检测了炎症因子的 mRNA 水平。如图 7（b）所示，与对照组相比，BaP 组小鼠肝脏组织中炎症因子（即 TNF-α、IL-1β、IL-18、iNOS、COX-2）的 mRNA 相对水平显著提高。经过 SeBSP 与 BSP 预处理后，炎症因子的 mRNA 相对水平显著降低（P<0.05），例如，与 BaP 组相比，SeBSP+BaP 组和 BSP+BaP 组中 iNOS 的 mRNA 相对水平显著降低了 54.69% 和 45.89%（P<0.05）。

结果表明，SeBSP和BSP可以通过降低NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD和炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-18、iNOS、COX-2）的mRNA水平抑制BaP诱导的肝脏焦亡性损伤。与BSP的作用相比，SeBSP对BaP诱导的细胞凋亡和炎症因子释放有更明显的缓解作用。

综上，SeBSP和BSP能够从多方面抑制BaP引起的肝损伤，相关机制见图8。



不同字母表示差异显著(P<0.05)。

(a) NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD的mRNA相对水平　(b) TNF-α、IL-1β、IL-18、iNOS、COX-2的mRNA相对水平

图7　SeBSP和BSP对肝脏焦亡性损伤的影响

Fig. 7　Effects of SeBSP and BSP on pyroptotic damage in liver

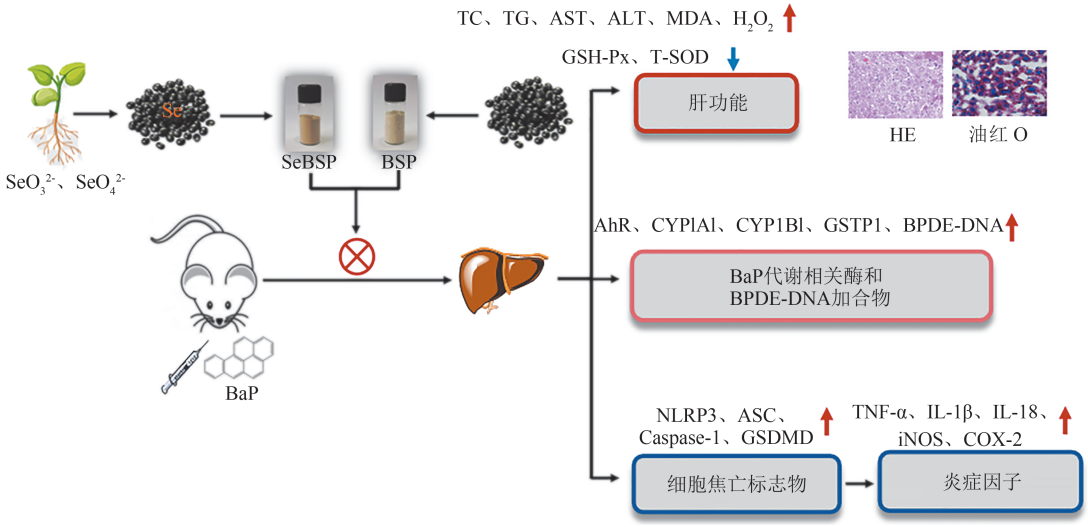


图8　SeBSP和BSP对BaP引起的肝损伤的预防作用

Fig. 8　Preventive effect of SeBSP and BSP on liver injury induced by BaP

3　结论

该研究证明了SeBSP和BSP能够调节BaP代谢相关酶并减弱细胞焦亡，对BaP诱导的肝损伤具有潜在预防作用，并且SeBSP的作用更强。富硒植物蛋白的膳食补充可有效预防BaP诱导的肝脏毒性，这为BaP毒性效应的预防和控制提供了新思路。但是，SeBSP对BaP代谢相关酶的具体调控机制仍有待进一步研究。

参考文献

[1] GUEVARA-LUNA J, ALVAREZ-FITZ P, RÍOS-LEAL E, et al. Biotransformation of benzo[a]pyrene by the thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* M2-7[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(7): 88.

[2] MINKINA T, SUSHKOVA S, YADAV B K, et al. Accumulation and transformation of benzo[a]pyrene in Haplic Chernozem under artificial contamination[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2020, 42: 2485-2494.

[3] EICHINGER A, NEUMAIER I, PSCHENITZA M, et al. Tight molecular recognition of benzo[a]pyrene by a high-affinity antibody[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2017, 56(35): 10592-10597.

[4] TZENG H P, LAN K C, YANG T H, et al.

Benzo[a]pyrene activates interleukin-6 induction and suppresses nitric oxide-induced apoptosis in rat vascular smooth muscle cells[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0178063.

[5] WOO H, LEE J, PARK D, et al. Protective effect of mulberry (*Morus alba* L.) extract against benzo[a]pyrene induced skin damage through inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(50): 10925-10932.

[6] JEE S C, KIM M, KIM K S, et al. Protective effects of myricetin on benzo[a]pyrene-induced 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and BPDE-DNA adduct[J]. Antioxidants, 2020, 9(5): 446.

[7] PIBERGER A L, KRÜGER C T, STRAUCH B M, et al. BPDE-induced genotoxicity: relationship between DNA adducts, mutagenicity in the *in vitro* PIG-A assay, and the transcriptional response to DNA damage in TK6 cells[J]. Archives of Toxicology, 2018, 92: 541-551.

[8] OWUMI S E, ADENIYI G, OYELERE A K. The modulatory effect of taurine on benzo[a]pyrene-induced hepatorenal toxicity[J]. Toxicology Research, 2021, 10(3): 389-398.

[9] BAJAJ J S. Alcohol, liver disease and the gut microbiota[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2019, 16(4): 235-246.

[10] YUAN L, LIU J Y, DENG H, et al. Benzo[a]pyrene induces autophagic and pyroptotic death simultaneously in HL-7702 human normal liver cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(44): 9763-9773.

[11] HE S Y, LI X Y, LI C Q, et al. Isoorientin attenuates benzo[a]pyrene-induced colonic injury and gut microbiota disorders in mice[J]. Food Research International, 2019, 126: 108599.

[12] MA J Q, LIU C M, QIN Z H, et al. *Ganoderma applanatum* terpenes protect mouse liver against benzo[a]pyren-induced oxidative stress and inflammation[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2011, 31(3): 460-468.

[13] MANGIAPANE E, PESSIONE A, PESSIONE E. Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems[J]. Current Protein & Peptide Science, 2014, 15(6): 598-607.

[14] ALLAN C B, LACOURCIERE G M, STADTMAN T C. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium[J]. Annual Review of Nutrition, 1999, 19: 1-16.

[15] SINHA R, EL-BAYOUMY K. Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds[J]. Current Cancer Drug Targets, 2004, 4(1): 13-28.

[16] KIELISZEK M, BŁAŻEJAK S, BZDUCHA-WRÓBEL A, et al. Effect of selenium on growth and antioxidative system of yeast cells[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46: 1797-1808.

[17] HOSNEDLOVA B, KEPINSKA M, SKALICKOVA S, et al. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review[J]. International Journal of Nanomedicine, 2018, 13: 2107-2128.

[18] GIGOLASHVILI T, KOPRIVA S. Transporters in plant sulfur metabolism[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 442.

[19] ZHANG X, HE H, XIANG J Q, et al. Selenium-containing proteins/peptides from plants: a review on the structures and functions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(51): 15061-15073.

[20] LIU K L, ZHAO Y, CHEN F S, et al. Purification and identification of Se-containing antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of Se-enriched brown rice protein[J]. Food Chemistry, 2015, 187: 424-430.

[21] FANG Y, XU Z, SHI Y, et al. Protection mechanism of Se-containing protein hydrolysates from Se-enriched rice on Pb^{2+}-induced apoptosis in PC12 and RAW264.7 cells[J]. Food Chemistry, 2017, 219: 391-398.

[22] ZHANG H B, CHEN T F, JIANG J, et al. Selenium-containing allophycocyanin purified from selenium-enriched *Spirulina platensis* attenuates AAPH-induced oxidative stress in human erythrocytes through inhibition of ROS generation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(16): 8683-8690.

[23] GUO D J, ZHANG Y, ZHAO J J, et al. Selenium-biofortified corn peptides: attenuating concanavalin A-induced liver injury and structure characterization[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2019, 51: 57-64.

[24] LIU W W, HOU T, SHI W, et al. Hepatoprotective effects of selenium-biofortified soybean peptides on liver fibrosis induced by tetrachloromethane[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 50: 183-191.

[25] LIU K L, DU R F, CHEN F S. Antioxidant activities of Se-MPS: a selenopeptide identified from selenized brown rice protein hydrolysates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 111: 555-560.

[26] YAMASHITA Y, SAKAKIBARA H, TODA T, et al. Insights into the potential benefits of black soybean (*Glycine max* L.) polyphenols in lifestyle diseases[J]. Food & Function, 2020, 11(9): 7321-7339.

[27] LUO L P, ZHANG J P, ZHANG K Y, et al. Peanut

selenium distribution，concentration，speciation，and effects on proteins after exogenous selenium biofortification[J]. Food Chemistry，2021，354：129515.

[28] AJAYI B O，ADEDARA I A，FAROMBI E O. Benzo[a]pyrene induces oxidative stress，pro-inflammatory cytokines，expression of nuclear factor-kappa B and deregulation of wnt/beta-catenin signaling in colons of BALB/c mice [J]. Food and Chemical Toxicology，2016，95：42-51.

[29] JI X Y，LI Y F，HE J L，et al. Depletion of mitochondrial enzyme system in liver，lung，brain，stomach and kidney induced by benzo[a]pyrene[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology，2016，43：83-93.

[30] ALZOHAIRY M A，KHAN A A，ALSAHLI M A，et al. Protective effects of thymoquinone，an active compound of *Nigella sativa*，on rats with benzo[a]pyrene-induced lung injury through regulation of oxidative stress and inflammation[J]. Molecules，2021，26(11)：3218.

[31] KIM K S，KIM N Y，SON J Y，et al. Curcumin ameliorates benzo[a]pyrene-induced DNA damages in stomach tissues of Sprague-Dawley rats[J]. International Journal of Molecular Sciences，2019，20(22)：5533.

[32] DWORZAŃSKI J，STRYCHARZ-DUDZIAK M，KLISZCZEWSKA E，et al. Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activity in patients with diabetes mellitus type 2 infected with Epstein-Barr virus [J]. PLoS One，2020，15(3)：e0230374.

[33] LIU C M，MA J Q，SUN Y Z. Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology，2010，30(3)：264-271.

[34] BURCZYNSKI M E，PENNING T M. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon *ortho*-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 *via* nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor [J]. Cancer Research，2000，60(4)：908-915.

[35] SUN Y W，KOSINSKA W，GUTTENPLAN J B. E-cigarette aerosol condensate enhances metabolism of benzo[a]pyrene to genotoxic products，and induces CYP1A1 and CYP1B1，likely by activation of the aryl hydrocarbon receptor [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health，2019，16(14)：2468.

[36] TANAKA Y，ITO T，TSUJI G，et al. Baicalein inhibits benzo[a]pyrene-induced toxic response by downregulating src phosphorylation and by upregulating NRF2-HMOX1 system[J]. Antioxidants，2020，9(6)：507.

[37] MACDONALD C J，CHENG R Y S，ROBERTS D D，et al. Modulation of carcinogen metabolism by nitric oxide-aspirin 2 is associated with suppression of DNA damage and DNA adduct formation [J]. Journal of Biological Chemistry，2009，284(33)：22099-22107.

[38] WESTERINK W M A，SCHOONEN W G E J. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells[J]. Toxicology *in Vitro*，2007，21(8)：1592-1602.

[39] GUO L，JIANG X，TIAN H Y，et al. Detection of BPDE-DNA adducts in human umbilical cord blood by LC-MS/MS analysis [J]. Journal of Food and Drug Analysis，2019，27(2)：518-525.

[40] KOVACS S B，MIAO E A. Gasdermins：effectors of pyroptosis[J]. Trends in Cell Biology，2017，27(9)：673-684.

[41] FANG Y，TIAN S W，PAN Y T，et al. Pyroptosis：a new frontier in cancer[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy，2020，121：109595.

[42] DAI W Y，WANG X G，TENG H L，et al. Celastrol inhibits microglial pyroptosis and attenuates inflammatory reaction in acute spinal cord injury rats[J]. International Immunopharmacology，2019，66：215-223.

[43] LI X F，YU Z Y，ZONG W F，et al. Deficiency of the microglial Hv1 proton channel attenuates neuronal pyroptosis and inhibits inflammatory reaction after spinal cord injury[J]. Journal of Neuroinflammation，2020，17(1)：263.

[44] MAMUN A A，WU Y Q，JIA C，et al. Role of pyroptosis in liver diseases [J]. International Immunopharmacology，2020，84：106489.

[45] EGUCHI A，WREE A，FELDSTEIN A E. Biomarkers of liver cell death[J]. Journal of Hepatology，2014，60(5)：1063-1074.

[46] DONG X T，LIU J Q，XU Y P，et al. Role of macrophages in experimental liver injury and repair in mice[J]. Experimental and Therapeutic Medicine，2019，17(5)：3835-3847.

[47] LI H，YUAN L，LI X Y，et al. Isoorientin attenuated the pyroptotic hepatocyte damage induced by benzo[a]pyrene *via* ROS/NF-κB/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway[J]. Antioxidants，2021，10(8)：1275.

（责任编辑：周玥）