食物黄酮异荭草素及其银纳米颗粒的保肝活性

王 晓，张 忠，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：为提高食物黄酮异荭草素(Iso)的生物活性和预防苯并(a)芘(BaP)诱发的肝损伤提供一定的依据，以Iso及其银纳米颗粒(Iso-AgNPs)为研究对象，建立食品高温有害产物BaP损伤HL-7702人肝细胞模型，基于细胞凋亡、自噬和焦亡3种程序性死亡方式，通过MTT、台盼蓝染色、荧光标记、流式细胞术、Western blotting等方法检测Iso-AgNPs的保肝作用。结果表明：相较于Iso，Iso-AgNPs能更好地钝化BaP对HL-7702人肝细胞活力的作用，促进细胞增殖，显著抑制BaP诱导的HL-7702人肝细胞凋亡性、自噬性和焦亡性损伤。因此，Iso-AgNPs可提高Iso的生物活性且预防肝细胞损伤。

关键词：银纳米颗粒负载异荭草素；异荭草素；细胞凋亡；细胞自噬；细胞焦亡

中图分类号：TQ 28　**文章编号：**1673-1689(2023)05-0102-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.05.014

Hepatoprotective Effect of Isoorientin and Its Silver Nanoparticle

WANG Xiao, *ZHANG Zhong*, *YUAN Li**

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

Abstract: To improve the biological activity of food flavone isoorientin (Iso) and provide a basis for preventing liver injury induced by benzo (a) pyrene (BaP), Iso and its silver nanoparticles (Iso-AgNPs) were used to investigate to the damage of HL-7702 human liver cells caused by BaP, a harmful product of food prepared under high temperature. The hepatoprotective effect of Iso-AgNPs was detected by MTT, trypan blue staining, fluorescence labeling, flow cytometry, and Western blotting based on the three programmed death modes including apoptosis, autophagy and pyroptosis. The results showed that compared with Iso, Iso-AgNPs could better inhibit the damage of HL-7702 huamn liver cells activity induced by BaP, promote cell proliferation, and significantly inhibit the apoptosis, autophagy and apoptosis of HL-7702 huamn liver cells. Therefore, Iso-AgNPs could improve the biological activity of Iso and prevent liver cell damage.

Keywords: silver nanoparticles-isoorientin, isoorientin, apoptosis, autophagy, pyroptosis

收稿日期：2021-05-28

基金项目：国家自然科学基金面上项目(31972183)；中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(GK202002006)；西安市青年人才托举计划项目(095920201311)；西部果品资源高值利用教育部工程研究中心开放课题项目(XGZX2021-G10)；陕西省重点研发计划项目(2021NY-145)；陕西省技术创新引导专项项目(2022QFY09-03)。

* **通信作者：**袁 莉(1986—)，女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事食品安全与毒理学研究。E-mail：yuanli112086@snnu.edu.cn

异荭草素 (Iso,3',4',5,7-四羟基黄酮-6-O-β-D-吡喃葡萄糖苷或木犀草素 6-C-葡萄糖苷)分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$,相对分子质量为 448.38,是一种天然黄酮类物质,多存在于食物中,具有抗氧化[1]、抗炎[2]、抑菌[3]和抗肿瘤[4]等生理功能。但是,黄酮类化合物易受外界环境影响,导致其功能活性降低,探索提高黄酮类化合物生物活性的方法很有必要。金属纳米颗粒被广泛用于构建纳米载体,其中银纳米颗粒(AgNPs)因具有较高膜穿透性、低毒性、高生物相容性等优点,被广泛应用于活性成分载体和治疗诊断等领域。据报道,金属纳米颗粒负载黄酮类化合物可有效提高黄酮类物质的功能活性[5-8]。作者所在团队前期研究发现,Iso 负载于 AgNPs 后形成异荭草素银纳米颗粒(Iso-AgNPs)在 pH 5~9 的 NaCl 溶液中稳定存在,且 Iso-AgNPs 在体外模拟胃肠道消化中表现出较高的稳定性;同时,相较于 Iso,Iso-AgNPs 稳定性提高,展现出较高的抑制 α-葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的活性[9]。

苯并(a)芘(BaP)是一种常见的食品加工有害产物,属于多环芳烃类物质。食品加工过程中,有机物质如油脂和蛋白质在高温条件下发生美拉德反应,然后经进一步裂解、环化及聚合可形成 BaP[10-11]。肝脏是人体内主要的解毒器官,也是 BaP 吸收代谢的主要部位,BaP 对于肝脏的毒性损伤远高于对其他器官的损伤[12]。大量研究表明,BaP 主要通过诱发细胞凋亡、导致氧化应激、阻滞细胞周期、降低细胞色素 P450 酶活性、形成 DNA 加合物等方式损伤机体健康[13-15]。食物活性成分如姜黄素[16]、杨梅素[17]、柚皮苷[18]可预防 BaP 诱发的组织细胞损伤。前期研究也发现,BaP 可诱发细胞自噬和损伤 HL-7702 人肝细胞[19]。天然食物黄酮 Iso 可有效预防由 BaP 导致的 HL-7702 人肝细胞和小鼠肝脏组织自噬性和焦亡性损伤[20]。

为进一步促进 Iso 保肝活性,利用食品加工有害产物 BaP 建立 HL-7702 人肝细胞损伤模型,基于程序性细胞死亡方式——细胞凋亡、细胞自噬、细胞焦亡,全面分析研究 AgNPs 负载 Iso 后得到的异荭草素银纳米颗粒(Iso-AgNPs)的保肝活性,为提高食物黄酮 Iso 生物活性和预防食品加工有害产物 BaP 危害机体健康提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

实验细胞株 HL-7702 人肝细胞:第四军医大学提供。

1.2 实验试剂和仪器

Iso-AgNPs 为作者所在课题组前期制备,Iso-AgNPs 呈光滑的球面形貌,其中 Iso 的负载效率为 76.60%,平均粒径为 (117.20±2.13) nm,PDI 值为 0.37±0.01,Zeta 电位为(-16.57±0.64) mV[9]。

Iso(纯度为 98%):江苏永健医药科技有限公司产品;BaP(纯度为 99%):Sigma 公司产品;AO/EB 试剂盒、活性氧检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、LDH 试剂盒:北京索莱宝科技有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞活力测定和台盼蓝染色观察细胞形态 采用 MTT 比色法,取对数生长期且生长状态良好的 HL-7702 人肝细胞,按 2×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中。置于 37 ℃、体积分数 5%的 CO_2 恒温培养箱培养24 h,使用后药物处理细胞 (空白对照组、BaP 处理组 (25 μmol/L BaP)、Iso 处理组 (5 μmol/L Iso)、Iso-AgNPs 处理组(5 μmol/L Iso-AgNPs)、Iso+BaP 处理组(5 μmol/L Iso+25 μmol/L BaP)、Iso-AgNPs+BaP 处理组 (5 μmol/L Iso-AgNPs+25 μmol/L BaP)),且作用细胞 24 h。然后,加入 20.0 μL 的 MTT(5 mg/mL)溶液,于 CO_2 恒温培养箱培养 4 h 后吸弃,加入 150.0 μL DMSO,避光低速振荡 10 min,用酶标仪在 570 nm 下检测吸光度,重复 3 次。

$$C_v=(A_1/A_0)\times100\%$$

式中:C_v 为细胞活力,A_0 为空白对照组吸光度,A_1 为实验组吸光度。

HL-7702 人肝细胞按 1×10^5 个/mL 接种于 12 孔板中,每孔 100 μL。细胞置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 恒温培养箱培养 24 h 后,药物作用细胞 24 h,弃上清液,PBS 清洗 1 次,每孔加入 100 μL 台盼蓝溶液 (质量分数 0.04%),染色 15 min。吸弃染液,PBS 清洗 2 次后,采用倒置显微镜观察细胞形态。

1.3.2 流式细胞术检测细胞周期分布变化 按照蒋炜等的方法[21]并略加修改,选取生长状态良好的 HL-7702 人肝细胞,接种于 12 孔板(2 mL/孔)中置于 CO_2 恒温培养箱培养 24 h 后,吸弃培养基并按照 1.3.1 中的药物处理方法作用细胞。处理24 h,吸弃

细胞培养基,加入消化液消化细胞,制得的细胞悬液转移到离心管中,离心(1 000 r/min、5 min),用 1 mL PBS 重悬细胞后,继续离心(1 000 r/min、5 min),收集细胞。沉淀细胞用 1 mL 预冷的体积分数 70%乙醇混匀,在 4 ℃冰箱中固定细胞 2 h。然后再次离心(1 000 r/min、5 min),收集细胞。将碘化丙啶染液(PI)加入每组细胞中,混匀后重悬细胞,继而过 300 目筛。37 ℃避光 30 min 后,检测细胞周期。

1.3.3 细胞内活性氧(ROS)测定 参照姜浩瀚等的方法[22]并略加修改,将 HL-7702 人肝细胞接种于 6 孔板中(2×10^5 个/孔),置于 CO_2 恒温培养箱培养 24 h 后,吸除培养基后用不同的处理组(空白对照组、BaP 处理组(25 μmol/L)、Iso+BaP 处理组(5 μmol/L Iso+25 μmol/L BaP)、Iso-AgNPs+BaP 处理组(5 μmol/L Iso-AgNPs+25 μmol/L BaP))作用细胞。24 h 后吸弃上清液,无血清培养基配置的 DCFH-DA 溶液(1.5 mL)加入至每个处理组,室温孵育 30 min,利用无血清培养基清洗 3 次。利用流式细胞仪检测荧光强度,并用倒置荧光显微镜观察细胞。

1.3.4 线粒体膜电势的测定 参照吴涛等的方法[23]并略加修改,利用细胞线粒体膜电势特性荧光染料 JC-1 来检测 HL-7702 人肝细胞的线粒体膜电势。HL-7702 人肝细胞以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,置于 37 ℃、CO_2 恒温培养箱培养 24 h。然后吸弃培养基,按照 1.3.3 药物处理作用细胞 24 h。吸弃上清液,用 PBS 洗涤 3 次,加入 JC-1 工作液(50 μL/孔),于 37 ℃、CO_2 恒温培养箱孵育 20 min,吸弃 JC-1 工作液,用 1×Incubation Buffer 洗涤 3 次,利用酶标仪检测荧光强度并利用倒置荧光显微镜观察细胞。

1.3.5 细胞凋亡形态观察 将 HL-7702 人肝细胞接种于 6 孔板中(5×10^4 个/孔),于 CO_2 恒温培养箱培养 24 h,吸弃培养液,按照 1.3.3 药物处理方法作用细胞 24 h 后吸弃上清液,用 PBS 清洗 3 次,以体积比 1:1 的比例在 6 孔板中加入 AO/EB 工作液,于 CO_2 恒温培养箱培养 15 min,PBS 清洗后,利用倒置荧光显微镜观察细胞。

1.3.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 参照 Yin 等的方法[24]并略加修改,选取生长状态良好的 HL-7702 人肝细胞,接种于 6 孔板中(2×10^5 个/孔),置于 CO_2 恒温培养箱培养 24 h,按照 1.3.3 药物处理作用细胞。待药物作用 24 h 后,收集细胞培养基中的漂浮细胞存至离心管内,用 PBS 清洗后,加消化液,将贴壁细胞消化制成细胞悬液,离心(1 000 r/min、5 min)后,弃上清液,将细胞置于离心管中。400 μL Buffer 缓冲液加入离心中管重悬细胞,并加入 5 μL Annexin V-FITC,避光孵育 20 min 后再向其中加入 10 μL PI 染色液,避光孵育 5 min 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.7 细胞自噬形态观察 HL-7702 人肝细胞按 1 mL/孔接种于 6 孔板,于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 恒温培养箱培养过夜。吸弃培养液后,并按照 1.3.3 药物处理方法作用细胞 24 h 后,吸弃上清液,经 PBS 洗涤 3 次,1 mL AO 工作液或 50 μmol/L MDC 染液加入其中,于恒温培养箱孵育 15 min。PBS 清洗 3 次后,利用倒置荧光显微镜观察细胞。

1.3.8 相对电导率和乳酸脱氢酶(LDH)的测定 HL-7702 人肝细胞接种于细胞皿(5 mL/孔),于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 恒温培养箱培养过夜。12 h 后吸弃培养液,并按照 1.3.3 药物处理方法作用细胞 24 h 后收集上清液,利用电导率仪测定细胞电导率情况。

HL-7702 人肝细胞接种于 96 孔板(5×10^4 个/孔)中,于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 恒温培养箱培养过夜。吸弃上清液,按照 1.3.3 药物处理方法作用细胞 24 h 后取药物上清液,使用 LDH 试剂盒并于 450 nm 波长处检测样品吸光度。

1.3.9 细胞焦亡膜孔观察 参照 Yuan 等的方法[25]并略加修改,HL-7702 人肝细胞接种于 6 孔板培养(1 mL/孔),置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 恒温培养箱培养过夜。吸弃上清液,按照 1.3.3 药物处理方法作用细胞 24 h 后,吸弃上清液。用 PBS 清洗后,加消化液,将贴壁细胞消化制成细胞悬液,离心 5 min(1 000 r/min),弃上清液,收集细胞于离心管中。利用体积分数 2.5%戊二醛固定过夜,然后在 0.1 mol/L PBS 中冲洗 3 次,每次 45 min。用 0.1 mol/L PBS 配置的质量分数 1% 锇酸(OsO_4)在室温下作用细胞 2 h,然后在不同体积分数的乙醇溶液中作用,每次 15 min,最后用醋酸异戊酯作用 15 min。样品在干燥器中干燥。最后将干燥标本溅射上一层金钯,并用扫描电子显微镜观察。

1.3.10 各程序性死亡方式特征蛋白质表达测定 Western blotting 法检测蛋白质表达[26]。具体步骤如下:

1)细胞培养 进行 HL-7702 人肝细胞培养。

2)细胞蛋白质提取 按照 1.3.3 药物处理细

胞,然后置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 恒温培养箱孵育 24 h。经 PBS 清洗 3 次后,加入 200 μL RIPA 细胞裂解液,在冰浴条件下将细胞裂解(20 min),然后离心 10 min (4 ℃、15 000 r/min),取上清液,用 BCA 试剂盒测定细胞总蛋白质浓度并调平。

3)细胞蛋白质变性 SDS 上样缓冲液与样品体积比为 4:1,振荡混匀,然后水浴 10 min(95 ℃),冷却后分装,冷冻备用。

4)Western blotting 装板:确保凝胶玻璃板间密封,无漏液。制胶:按照蛋白质相对分子质量确定浓缩胶与分离胶体积比。上样:于上样孔中加入 10 μL 样品。电泳:于 120 V 恒压条件下电泳 120 min,直至样品迁移至凝胶底部。转印:根据蛋白质相对分子质量的不同,于 10~30 V 恒压条件下半干转印适当时间。清洗:在 TBST 溶液中清洗 3 次,每次 20 min。封闭:室温下,于质量分数 5%脱脂奶粉溶液中封闭 2 h。清洗:在 TBST 溶液中清洗 3 次,每次 20 min。一抗孵育:PVDF 膜放入特定一抗蛋白质中,于 4 ℃孵育过夜。清洗:在 TBST 溶液中清洗 3 次,每次 20 min。二抗孵育:PVDF 膜放入特定二抗蛋白质中,常温下摇床孵育 2 h。清洗:在 TBST 溶液中清洗 3 次,每次 20 min。化学发光检测:采用 ChemiDox 凝胶成像系统检测。

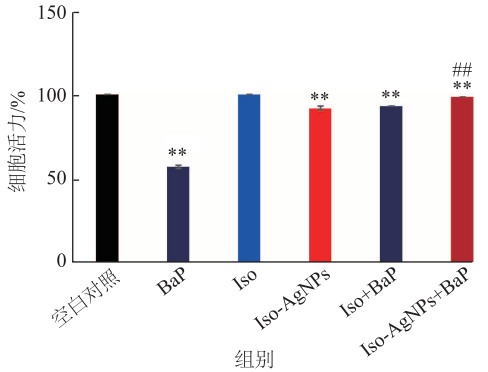
1.3.11 统计学分析 所有实验进行 3 次重复,结果以平均数±标准差(SD)表示。采用单因素方差分析(ANOVA)、Duncan's post hoc 检验(SPSzS v19.0)和 Excel 2010 进行统计学意义分析。

2 结果与分析

2.1 Iso-AgNPs 对 BaP 作用的肝细胞活力和形态的影响

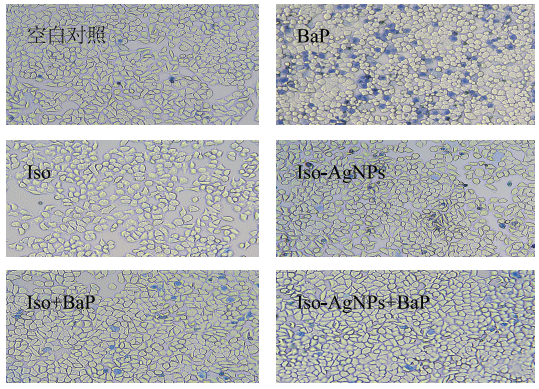
如图 1(a)所示,BaP 可显著降低 HL-7702 人肝细胞活力,Iso 和 Iso-AgNPs 可延缓 BaP 减低 HL-7702 人肝细胞活力。与空白对照组相比,25 μmol/L BaP(BaP 处理组)可显著(P<0.01)降低细胞活力(42.87%),单独 Iso(Iso 处理组)处理不影响 HL-7702 人肝细胞生长;同时,Iso+BaP 处理可显著降低 BaP 对 HL-7702 人肝细胞活力的抑制作用,其细胞活力较 BaP 处理组高 35.98 个百分点。尽管 Iso-AgNPs 可轻微降低细胞活力,但相较于 BaP 处理组,Iso-AgNPs+BaP 处理组细胞活力高 41.62 个百分点,且其对 BaP 减低 HL-7702 人肝细胞活力的抑制作用强于 Iso 处理组。

台盼蓝是一种细胞活性染料,被用来检测细胞的完整性。正常细胞的细胞膜完整,台盼蓝无法进入细胞,当细胞损伤或死亡时,台盼蓝可进入细胞,与解体的 DNA 结合,使其染成蓝色。如图 1(b)所示,与细胞活力结果一致,与空白对照组相比,BaP 处理后,蓝色细胞明显增多。Iso-AgNPs+BaP 处理组中蓝色细胞较 BaP 单独处理明显下降。



** 表示与空白对照组在P<0.01水平显著,## 表示与BaP在P<0.01水平显著。

(a) 细胞活力



蓝色为死亡细胞或细胞膜破损细胞

(b) 细胞形态

图 1 Iso-AgNPs 对 BaP 损伤作用下 HL-7702 人肝细胞活力和形态的影响

Fig. 1 Effect of Iso-AgNPs on the cell viability and morphology of HL-7702 human liver cells damaged by BaP

2.2 Iso-AgNPs 对 BaP 作用的肝细胞周期的影响

细胞周期是从一次分裂完成开始到下一次分裂完成结束时所经历的全过程,分为两个阶段,分别为分裂间期(G_1 期、S 期、G_2 期)和分裂期。G_1 期、S 期、G_2 期分别被称为 DNA 制备前期、DNA 制备期和 DNA 制备后期。细胞周期中各个时期的DNA 含量不同,正常细胞中,G_1/G_0 期具有二倍体细胞的 DNA 含量(2N),G_2/M 期则具有四倍体细胞的 DNA 含量

(4N)，而 S 期的 DNA 含量介于二倍体和四倍体之间。PI 染料可选择性嵌入 DNA 和RNA 的碱基之间并与之结合,DNA 和结合量呈正相关。因此,其荧光强度可反映细胞内 DNA 含量，从而确定细胞周期变化。如图 2 所示,与空白对照组相比,BaP 处理后 HL-7702 人肝细胞 S 期细胞相对含量明显增加到 20.26%,G_2/M 期细胞逐渐减少,且 G_0/G_1 期细胞则基本保持不变。Iso 处理可有效促进细胞生长,S 期细胞相对含量明显减少至 10.54%,G_2/M 期细胞相对含量则增加到 27.00%。尽管相较于空白对照组,Iso-AgNPs 单独处理组 S 期细胞增加，但 Iso-AgNPs+BaP 处理可明显减少 S 期细胞，增加 G_2/M 期细胞，有效抑制 BaP 导致的细胞停滞于 S 期,且 Iso-AgNPs+BaP 处理效果优于 Iso+BaP 处理。

以上结果表明,Iso-AgNPs 较 Iso 具有更强地预防 BaP 损伤肝细胞的作用。

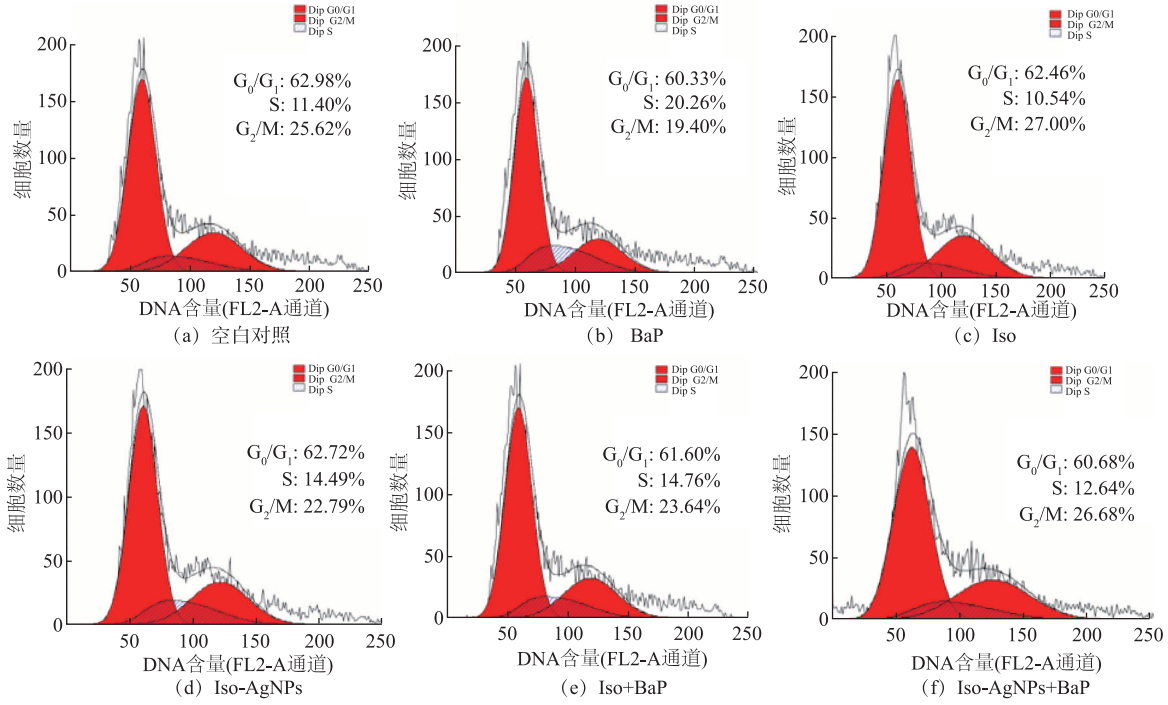


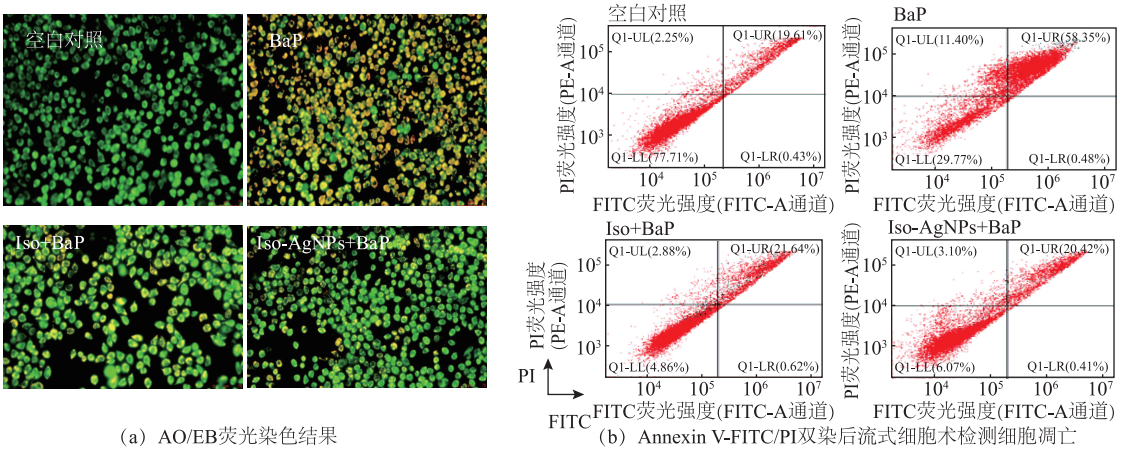
图 2　Iso-AgNPs 对 BaP 损伤作用下的 HL-7702 人肝细胞周期的影响

Fig. 2　Effects of Iso-AgNPs on cell cycle of BaP-damaged HL-7702 human liver cells

2.3　Iso-AgNPs 对 BaP 诱导的肝细胞凋亡性损伤的影响

2.3.1　AO/EB 荧光染色和 Annexin V-FITC/PI 双染结果　吖啶橙(AO)可透过正常细胞,与核 DNA 结合,使其呈现绿色荧光;溴乙锭(EB)不能透过完整的细胞膜,而凋亡中期细胞膜通透性增加,EB 与核内 DNA 结合,呈现鲜红色,细胞经 EB 和 AO 同时染色后呈现橘色荧光;凋亡末期,进入细胞内的 EB 的量增加,致使红色荧光强于绿色荧光,最终细胞呈现红色荧光。如图 3(a)所示,BaP 处理组细胞呈现橘红色荧光,部分显示出橘黄色荧光,即细胞呈现明显凋亡状态。Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理组橘色荧光细胞明显减少,且 Iso-AgNPs+BaP 处理组表现出更少的橘色荧光，说明 Iso-AgNPs 较 Iso 可更有效地抑制 BaP 诱导 HL-7702 人肝细胞凋亡性损伤。

通过检测细胞凋亡率进一步验证 Iso-AgNPs 对 BaP 诱导肝细胞凋亡性损伤的抑制作用。当 Annexin V 与 PI 染液共同使用时,PI 染液不进入活细胞 (Annexin V-/PI-) 和早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-)中,而 FITC 和 PI 结合染色可使晚期凋亡细胞和坏死细胞呈现双阳性(Annexin V+/PI+)。如图 3(b)所示,与空白对照组相比,BaP 处理后细胞凋亡中晚期和坏死细胞数量占比较空白对照组明显高 38.74 个百分点。Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理后,凋亡中晚期和坏死细胞数量占比分别较 BaP 处理组明显下降 36.71 个百分点和 37.93 个百分点,且相较于 Iso+BaP 处理组,Iso-AgNPs+BaP 处理后细胞分布与空白对照组更相似,即 Iso-AgNPs 较 Iso 可更有效地抑制BaP 诱导 HL-7702 人肝细胞凋亡。



（a）AO/EB荧光染色结果　（b）Annexin V-FITC/PI双染后流式细胞术检测细胞凋亡

图 3　HL-7702 人肝细胞的 AO/EB 荧光染色结果和 Annexin V-FITC/PI 双染结果

Fig. 3　Results of AO/EB fluorescence stained and Annexin V-FITC/PI stained on HL-7702 human liver cells

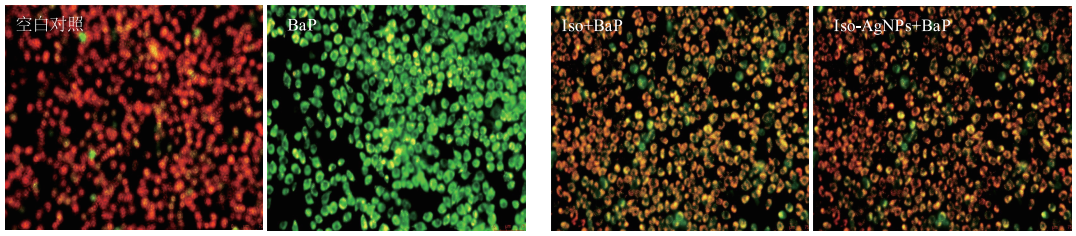
2.3.2　线粒体膜电势和活性氧水平　为探讨Iso-AgNPs 是否通过抑制线粒体调节的内源性途径预防 BaP 诱发肝细胞损伤，检测了线粒体膜电势和活性氧(ROS)水平。JC-1 是线粒体膜电势特异性的荧光染料，存在形式分为单体和多聚体两种。其以单体形式存在时呈绿色荧光，为多聚体形式时呈现红色荧光。细胞处于正常状态时，线粒体膜电势较高，JC-1 聚集在线粒体的基质中，呈现红色荧光；当发生细胞凋亡时线粒体受损，膜电势降低，JC-1 以单体形式存在，呈现绿色荧光。如图 4(a)所示，空白对照组细胞线粒体膜电势较高，呈红色荧光；BaP 作用后线粒体受损，膜电势降低，呈绿色荧光；Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理组较 BaP 处理组细胞膜电势升高，分别呈现橘红色和红色荧光，且 Iso-AgNPs 较 Iso 能更有效地抑制 BaP 诱导的肝细胞线粒体膜电势降低。

细胞内活性氧(ROS)主要由线粒体呼吸链复合物的电子漏产生，当线粒体功能受损时，ROS 水平急剧上升。DCFH-DA 荧光探针可与细胞内的 ROS 结合，由无荧光的状态（DCFH）转变为荧光物质 DCF。Iso-AgNPs 对肝细胞内 ROS 的影响如图 4(b)所示。与空白对照组相比，BaP 作用 HL-7702 人肝细胞后，ROS 的水平显著升高近 3 倍。Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理均可明显降低 BaP 诱导的肝细胞内 ROS 水平，荧光强度分别为 7 553.67、6 434.29。荧光显微镜观察结果也显示(见图 4(c))，相较于空白对照组，BaP 处理组呈现强烈的绿色荧光，ROS 水平激增；Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理后，荧光强度减弱，ROS 水平降低，且 Iso-AgNPs+BaP 处理组减幅更大。以上结果说明，相较于 Iso，Iso-AgNPs 可更有效地通过增加细胞线粒体膜电势，降低 ROS 水平，抑制 BaP 诱发的肝细胞凋亡性损伤。

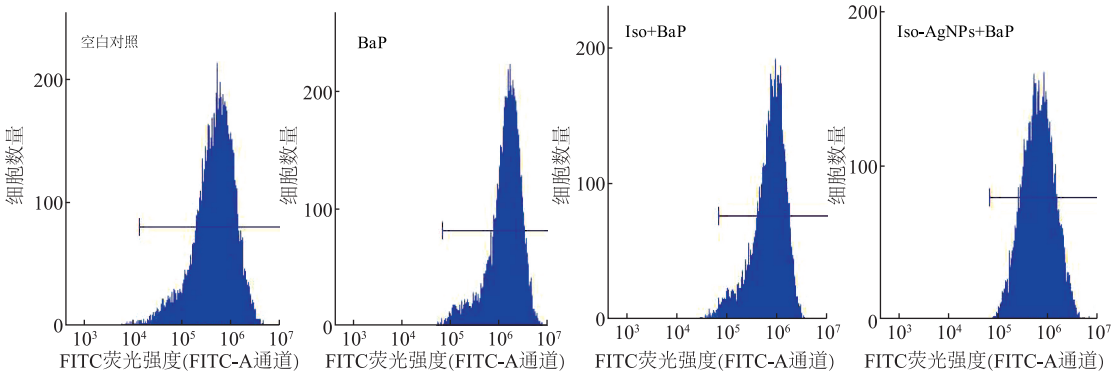
2.4　Iso-AgNPs 对 BaP 诱导的肝细胞自噬性损伤的影响

2.4.1　AO 和 MDC 荧光染色结果　为分析 Iso-AgNPs 是否通过抑制细胞自噬预防 BaP 诱发肝细胞损伤，首先利用自噬泡特异性荧光探针标记细胞内自噬泡。AO 可进入细胞与 DNA 结合呈现绿色荧光，也可与细胞内酸性细胞器自噬溶酶体结合，显红色荧光，且荧光强度和自噬泡呈正相关[27]。与空白对照组相比，BaP 处理组细胞内呈现红色荧光，即产生大量自噬泡；Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理后，细胞内红色荧光减弱，呈现黄色荧光，说明细胞内自噬泡减少，且 Iso-AgNPs+BaP 处理组自噬泡减少数量更多(见图 5(a))。MDC 是一种嗜酸性染料，可特异性标记自噬体。自噬泡数量与 MDC 绿色荧光强度呈正相关。如图 5(b)所示，与空白对照组相比，BaP 处理后，细胞内 MDC 绿色荧光增强，自噬泡明显增加；Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理均可明显降低 MDC 绿色荧光，且 Iso-AgNPs+BaP 处理组绿色荧光强度更弱。以上结果表明，Iso-AgNPs 能更好地降低 BaP 诱发的肝细胞内自噬泡增加。

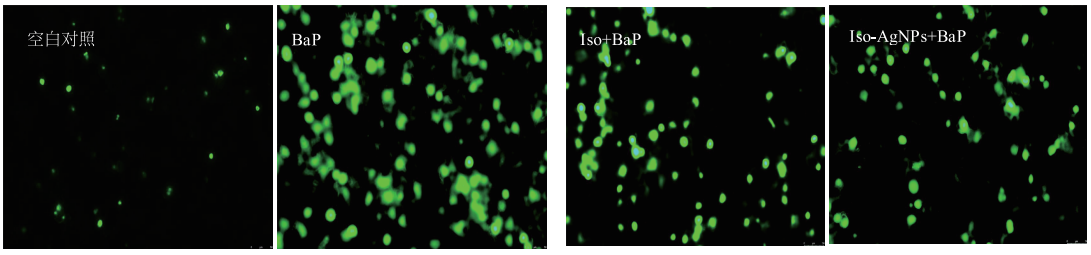
2.4.2　自噬特征蛋白质表达结果　LC3 和 Beclin-1 是细胞自噬形成过程中必不可少的蛋白质。其中 LC3 分为 LC3-I 和 LC3-II 两种形式。LC3-I 存在于细胞质中，通过 Atg7 和 Atg3 泛素化修饰后，与磷脂酰乙醇胺(PtdEth，PE)偶联生成脂质化 LC3-II，即 LC3-II 存在于细胞自噬体膜上[28-29]。Beclin-1 介导



(a) 萤光染色结果



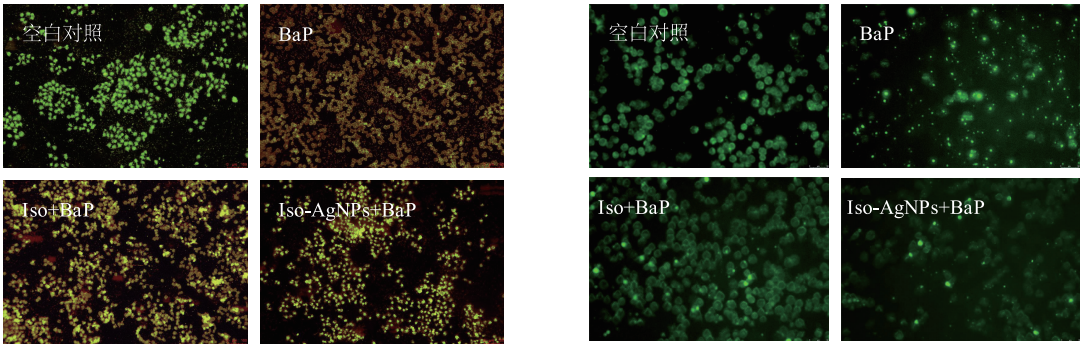
(b) ROS结果



(c) 荧光显微镜观测结果

图 4 Iso-AgNPs 对 HL-7702 人肝细胞线粒体膜电势和 ROS 的影响

Fig. 4 Effect of Iso-AgNPs on the mitochondrial potential and ROS levels of HL-7702 human liver cells



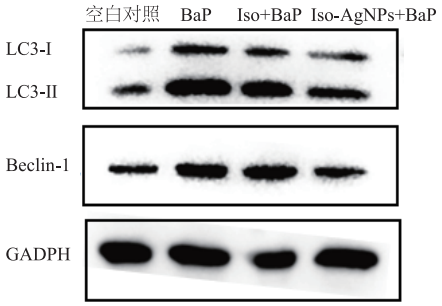
(a) AO荧光染色结果　　(b) MDC荧光染色结果

图 5 HL-7702 人肝细胞的 AO 荧光染色结果和 MDC 荧光染色结果

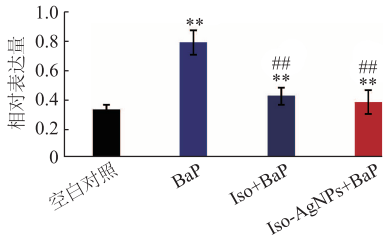
Fig. 5 Results of AO fluorescence stained and MDC fluorescence stained on HL-7702 human liver cells

其他自噬相关蛋白质定位于自噬泡中,参与形成自噬泡[30-31]。如图 6 所示,与空白对照组比较,BaP 作用后肝细胞内 LC3-II 和 Beclin-1 蛋白质表达量显著提高 ($^{**}P<0.01$);Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理后,可显著降低 ($^{\#\#}P<0.01$)BaP 诱导的 LC3-II 和 Beclin-1 蛋白质表达,且 Iso-AgNPs 抑制效果更强。

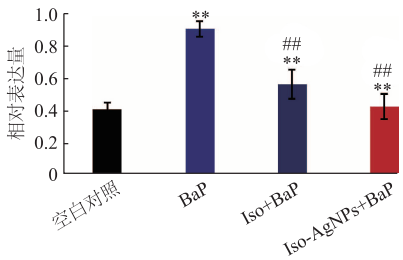
以上结果说明相较于 Iso,Iso-AgNPs 能更有效地抑制自噬泡形成和自噬特征蛋白质表达,预防 BaP 诱发的肝细胞损伤。



(a) 自噬特征蛋白质表达



(b) 蛋白质表达定量分析



(c) 蛋白质表达定量分析

相对表达量为 LC3-Ⅱ与 GADPH 灰度比值。

图 6 Iso-AgNPs 对 BaP 诱导的 HL-7702 人肝细胞自噬特征蛋白质表达的影响

Fig. 6 Effect of Iso-AgNPs on the BaP-induced autophagy characteristic proteins expression in HL-7702 human liver cells

2.5 Iso-AgNPso 对 BaP 诱导的肝细胞焦亡性损伤的影响

2.5.1 膜孔观察 细胞焦亡发生时,细胞膜表面会形成大量孔洞。通过扫描电子显微镜观察发现(见图 7),空白对照组细胞表面光滑,几乎没有膜孔;BaP 作用后的细胞膜表面出现大量密集且空隙较大的孔洞;Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理明显减少细胞膜孔洞,且膜孔洞空隙变小。

2.5.2 相对电导率和 LDH 释放水平 细胞焦亡时,大量细胞内容物和 LDH 通过膜孔洞溢出,导致细胞培养基电导率和 LDH 水平升高。如图 8 所示,与空白对照组相比较,BaP 处理组相对电导率(见图 8(a))和 LDH 释放率(见图 8(b))均显著($^{**}P$<0.01)

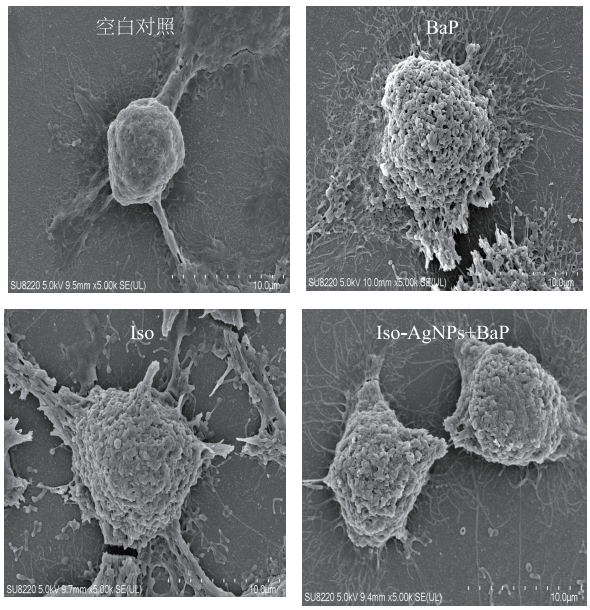
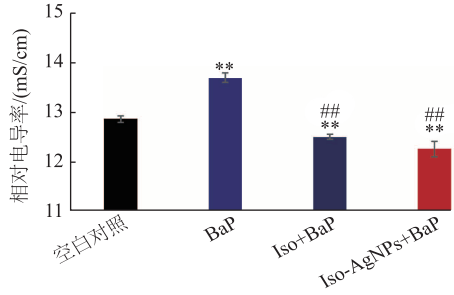


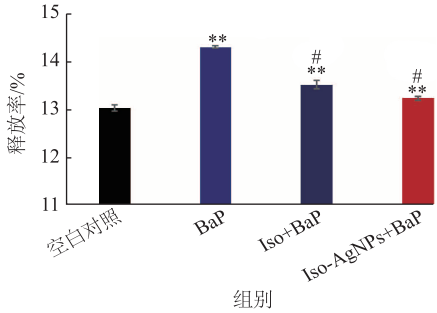
图 7 Iso-AgNPs 对 HL-7702 人肝细胞膜孔洞的影响

Fig. 7 Effect of Iso-AgNPs on the cell membrane pore of HL-7702 human liver cells

升高;相较于 BaP 单独处理,Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理均显著降低相对电导率($^{\#\#}P$<0.01)和 LDH 释放率($^{\#}P$<0.05),且 Iso-AgNPs 降低效果略强于Iso。



(a) 肝细胞相对电导率



(b) LDH释放水平

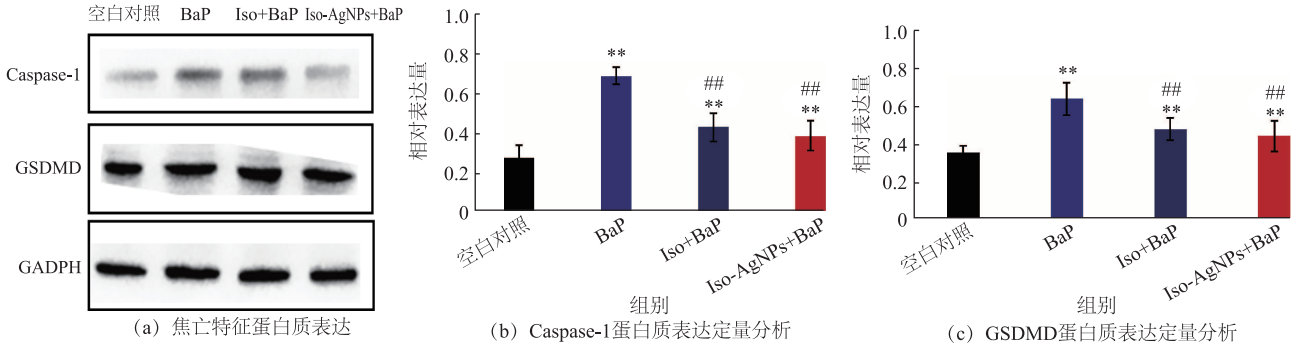
图 8 Iso-AgNPs 对 HL-7702 人肝细胞相对电导率和 LDH 释放水平的影响

Fig. 8 Effect of Iso-AgNPs on the cell relative electrical conductivity and LDH released level of HL-7702 human liver cells

2.5.3 *焦亡特征蛋白质表达结果* 细胞焦亡本质上由炎性 Caspase 蛋白质切割其共同底物 GSDMD 蛋白质形成的 N 端结构域(GSDMD-NT)介导发生,即 GSDMD 蛋白质才是细胞焦亡的执行者[32]。Caspase-1 介导的经典细胞焦亡途径为:当细胞受到外界刺激后,Caspase-1 激活并特异性地将 GSDMD 蛋白质切割活化形成 GSDMD-NT,GSDMD-NT 进一步通过寡聚化在细胞膜上形成膜孔洞,最终导致细胞破裂、死亡[33]。

如图 9 所示,与空白对照组比较,BaP 可显著($^{**}P$<0.01)增加细胞内 Caspase-1 和 GSDMD 蛋白质表达;Iso+BaP 和 Iso-AgNPs+BaP 处理能显著延缓 BaP 对 Caspase-1($^{\#\#}P$<0.01)和 GSDMD($^{\#\#}P$<0.01)蛋白质表达的增加作用,且 Iso-AgNPs 的抑制效果更强。

以上结果表明,相较于 Iso,Iso-AgNPs 可更加有效地抑制 BaP 诱发的肝细胞焦亡性损伤。



(a) 焦亡特征蛋白质表达　(b) Caspase-1蛋白质表达定量分析　(c) GSDMD蛋白质表达定量分析

图 9　Iso-AgNPs 对 BaP 诱导的 HL-7702 人肝细胞焦亡特征蛋白质表达的影响

Fig. 9　Effect of Iso-AgNPs on the BaP-induced pyroptosis characteristic proteins expression of HL-7702 human liver cells

3 结　语

基于程序性细胞死亡方式——细胞凋亡、细胞自噬、细胞焦亡分析比较了 Iso 和 Iso-AgNPs 对食品加工有害产物 BaP 诱发的肝细胞损伤的作用。结果发现,相较于 Iso,Iso-AgNPs 能更有效地预防 BaP 对 HL-7702 人肝细胞活力和增殖的影响,并钝化 BaP 诱发的肝细胞凋亡性、自噬性和焦亡性损伤。为通过纳米技术提高 Iso 生物活性及有效预防食品有害物 BaP 导致的肝损伤提供了一定科学依据,但是相关信号分子机制和体内模型验证还需进一步研究。

参考文献:

[1] ZHENG H N,ZHANG M F,LUO H,et al. Isoorientin alleviates UVB-induced skin injury by regulating mitochondrial ROS and cellular autophagy[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,2019,514(4):1133-1139.

[2] YANG J H,CHOI M H,YANG S H,et al. Potent anti-inflammatory and antiadipogenic properties of bamboo (*Sasa coreana* Nakai) leaves extract and its major constituent flavonoids[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2017,65(31):6665-6673.

[3] AMBIKA S,SUNDRARAJAN M.Antibacterial behaviour of *Vitex negundo* extract assisted ZnO nanoparticles against pathogenic bacteria[J]. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**,2015,146:52-57.

[4] HUANG D H,JIN L,LI Z,et al. Isoorientin triggers apoptosis of hepatoblastoma by inducing DNA double-strand breaks and suppressing homologous recombination repair[J]. **Biomedicine and Pharmacotherapie**,2018,101:719-728.

[5] ANWAR A,MASRI A,RAO K,et al. Antimicrobial activities of green synthesized gums-stabilized nanoparticles loaded with flavonoids[J]. **Scientific Reports**,2019,9(1):1-12.

[6] RAO K,IMRAN M,JABRI T,et al. Gum tragacanth stabilized green gold nanoparticles as cargos for naringin loading:a morphological investigation through AFM[J]. **Carbohydrate Polymers**,2017,174:243-252.

[7] OWOSENI-FAGBENRO K A,SAIFULLAH S,IMRAN M,et al. Egg proteins stabilized green silver nanoparticles as delivery system for hesperidin enhanced bactericidal potential against resistant *S. aureus*[J]. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**,2019,50:347-354.

[8] RAO K,AZIZ S,ROOME T,et al. Gum acacia stabilized silver nanoparticles based nano-cargo for enhanced anti-arthritic

potentials of hesperidin in adjuvant induced arthritic rats[J]. **Artificial Cells**,2018,46:597-607.
[9] WANG X,YUAN L,DENG H,et al. Structural characterization and stability study of green synthesized starch stabilized silver nanoparticles loaded with isoorientin[J]. **Food Chemistry**, 2021,338:1-10.
[10] 袁海艳,涂白杰. 苯并[a]芘神经毒性及其在脑组织中分别的研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2009
[11] 史巧巧,席俊,陆启玉. 食品中苯并芘的研究进展[J]. 食品工业科技,2014,35(5):379-381.
[12] MANTEY J,REKHADEVI P,DIGGS D, et al. Metabolism of benzo (a)pyrene by subcellular fractions of gastrointestinal(GI) tract and liver in Apc(min) mouse model of colon cancer[J]. **Tumor Biology**,2014,35(5):4929-4935.
[13] ZHA J,HONG X,RAO H,et al. Benzo(a)pyrene-induced a mitochondria-independent apoptosis of liver in juvenile Chinese rare minnows(*Gobiocypris rarus*)[J]. **Environmental Pollution**,2017,231:191-199.
[14] DAS D N,BHUTIA S K. Inevitable dietary exposure of benzo[a] pyrene:carcinogenic risk assessment an emerging issues and concerns[J]. **Current Opinion in Food Science**,2018,24:16-25.
[15] 袁莉,高春霞,邓红,等. 食品有害物苯并(α)芘及其诱导细胞死亡的研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(6):561-568.
[16] ALMATROODI S A,ALRUMAIHI F,ALSAHLI M A,et al. Curcumin,an active constituent of turmeric spice:implication in the prevention of lung injury induced by benzo(a) pyrene(BaP) in rats[J]. **Molecules**, 2020,25(3):1-19
[17] 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(Basel)**, 2020,9(5):1-13.
[18] ALI R,SHAHID A,ALI N,et al. Amelioration of benzo [a]pyrene-induced oxidative stress and pulmonary toxicity by naringenin in wistar rats:a plausible role of Cox-2 and NF-κB[J]. **Human and Experimental Toxicology**,2016,36:349-364.
[19] 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 Agriculture and Food Chemistry**,2017 8,65(44):9763-9773.
[20] LI X Y,HE S Y,GAO C X,et al. Isoorientin attenuates benzo [a]pyrene-induced liver injury by inhibiting autophagy and pyroptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. **Food and Agricultural Immunology**,2019,30:841-861.
[21] 蒋炜,邓治林,李福昌. 槲皮素对人肝星状细胞Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白表达的影响与其细胞周期研究[J]. 重庆医学,2018,47(9):1179-1182.
[22] 姜浩瀚,吕留庄,景志行,等. 野生笃斯越桔总花青素对 SPCA-1 细胞活力抑制及机理[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(6):102-108.
[23] 吴涛,周厚杰,高玉红,等. 姜黄素抑制环氧化酶 -2 表达和激活半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶诱导胶质瘤细胞凋亡及影响线粒体膜电位[J]. 中华实验外科杂志,2018,35(5):815-816.
[24] YIN M C,LIN C C,WU H C,et al. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast,lung,liver,cervix,and prostate cancer cells:potential mechanisms of action[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2009,57(14):6468-6473.
[25] YUAN B,ZHOU X M,YOU Z Q,et al. Inhibition of AIM2 inflammasome activation alleviates GSDMD-induced pyroptosis in early brain injury after subarachnoid haemorrhage[J]. **Cell Death and Disease**,2020,11(1):76-92.
[26] 方妮. TRIB3 参与内质网应激诱导的β胰岛细胞凋亡机制的研究[D]. 北京:中日友好临床医学研究院,2014.
[27] 郁艳丽. 没食子酸诱导肺癌细胞凋亡机制及其应用的研究[D]. 长春:吉林大学,2012.
[28] SCHILLE S,CRAUWELS P,BOHN R,et al. LC3-associated phagocytosis in microbial pathogenesis[J]. **International Journal of Medical Microbiology**,2018,308(1):228-236.
[29] LEE S,JUN J K,SUH M. Gastric cancer screening uptake trends in Korea[J]. **Medicine**,2015,94(8):533-539.
[30] 郭鑫,杨俊. Beclin1 调控自噬、凋亡与炎症反应的分子机制[J]. 中国老年学杂志,2014,34(18):5289-5291.
[31] HUANG Z J,FANG W L,LIU W H,et al. Aspirin induces beclin-1-dependent autophagy of human hepatocellular carcinoma cell [J]. **European Journal of Pharmacology**,2018,823:58-64.
[32] SHI J J,GAO W Q,SHAO F. Pyroptosis:gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. **Trends in Biochemical Sciences**,2017,42(4):245-254.
[33] 刘瑞卿,李胜玉. GSDMD 介导的细胞焦亡在感染性疾病中的研究进展[J]. 微生物学报,2019,59(11):2083-2093.