

西番莲果皮花色苷对 H₂O₂ 诱导 L02 细胞氧化损伤的抑制作用

张佳辰, 丁 蕾, 何传波, 魏好程, 熊何健*

(集美大学海洋食品与生物工程学院, 厦门 361021)

摘要: **目的** 探究西番莲果皮花色苷(peel of passion fruits anthocyanins, PPFA)对 H₂O₂ 诱导人正常肝细胞 L02 氧化损伤的抑制作用。**方法** 采用噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]法建立 H₂O₂ 诱导 L02 细胞氧化损伤的模型, 通过测定细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)指标, 观察 PPFA 对细胞氧化损伤的抑制作用, 结合非靶向代谢组学显著差异代谢物分析, 探讨其抗氧化机制。**结果** PPFA 体外清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值为 34.62 μg/mL, 有一定的羟自由基、超氧阴离子自由基清除能力。细胞实验表明, PPFA 能够显著提高 H₂O₂ 损伤的 L02 细胞总抗氧化力($P<0.05$), 并显著降低损伤细胞中 MDA 生成量和 LDH 的释放量($P<0.05$); 与损伤组相比, PPFA 各剂量组 SOD 活性均显著升高($P<0.05$), 中剂量组 CAT 与低剂量组 GSH-Px 的活性显著升高且达空白组水平($P<0.05$)。代谢组学分析表明, 与损伤组相比, PPFA 处理后细胞存在 23 种显著差异代谢物, 涉及到谷胱甘肽代谢、胆汁分泌、铁死亡和脂肪酸生物合成途径。**结论** PPFA 对 H₂O₂ 诱导 L02 细胞的氧化损伤有抑制作用, 表现出显著的细胞抗氧化活性。

关键词: 西番莲果皮; 花色苷; L02 细胞; 抗氧化活性; 非靶向代谢组学

Inhibition effect of peel of passion fruits anthocyanins on H₂O₂-induced oxidative damage in L02 cells

ZHANG Jia-Chen, DING Lei, HE Chuan-Bo, WEI Hao-Cheng, XIONG He-Jian*

(College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the inhibitory effect of peel of passion fruits anthocyanins (PPFA) on H₂O₂-induced oxidative damage in human normal liver cells L02. **Methods** A model of H₂O₂-induced oxidative damage in L02 cells was established by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method, and the inhibitory effect of PPFA on cellular oxidative damage was observed by measuring cellular malondialdehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and

基金项目: 福建省区域发展项目(2019N3012)、福建省科技计划项目(2019N0014)

Fund: Supported by the Fujian Province Regional Development Project (2019N3012), and the Science and Technology Plan Project of Fujian Province (2019N0014)

*通信作者: 熊何健, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品化学与营养。E-mail: hjxiong@jmu.edu.cn

*Corresponding author: XIONG He-Jian, Master, Professor, College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China. E-mail: hjxiong@jmu.edu.cn

glutathione peroxidase (GSH-Px) indexes, combined with non-targeted metabolomics significantly different metabolite analysis to explore its antioxidant mechanism. **Results** The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by PPFA *in vitro* was 34.62 μg/mL, and it had certain scavenging ability hydroxyl radicals and superoxide anion radicals. Cellular experiments showed that PPFA could significantly increase the total antioxidant power of H₂O₂-induced L02 cells ($P<0.05$), and significantly decrease the MDA production and LDH release in the damaged cells ($P<0.05$); compared with the damaged group, the SOD activity of PPFA was significantly increased in all dose groups ($P<0.05$), and the activity of CAT in the middle dose group and GSH-Px in the low dose group were significantly increased and reached the normal level ($P<0.05$). Metabolomic analysis showed that there were 23 kinds of significantly different metabolites in PPFA-treated cells compared with the damaged group, involving glutathione metabolism, bile secretion, ferroptosis and fatty acid biosynthesis pathways. **Conclusion** PPFA can inhibit the H₂O₂-induced oxidative damage in L02 cells, showing significant cellular antioxidant activity.

KEY WORDS: peel of passion fruits; anthocyanins; L02 cell; antioxidant activity; non-targeted metabolomics

0 引言

西番莲(*Passiflora edulis* Sims), 俗称百香果, 是西番莲科植物中被种植和食用最广泛的物种之一, 西番莲原产于南美洲, 在热带和亚热带地区有广泛种植^[1], 具有非常高的经济利用价值。西番莲果实呈椭圆形, 成熟时花青素色素所在的果皮呈紫色。西番莲大多用于生产果汁, 会产生大量的果皮副产物^[2], 其果皮占果实总重量的 50%左右, 且富含花色苷、多糖和膳食纤维等营养物质^[3], 因此果皮具有很高的利用和研究价值。花色苷是一类广泛分布在果蔬中的水溶性色素, 属于黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗肿瘤、抑菌、调节肠道菌群等多种营养活性^[4]。多项研究表明, 西番莲果皮是优良天然花色苷来源物^[5-6]。利用果皮提取花色苷不仅可以提高西番莲的综合利用率, 解决工业废弃物问题, 缓解环保压力, 还可以得到高附加值的花色苷产品, 提高经济效益。近年来, 西番莲果皮花色苷越来越受到人们的关注, 但对其大多停留在提取纯化和清除自由基能力的考查^[7-8], 对其细胞抗氧化活性涉及较少。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是在氧化应激环境下机体内具有氧化活性的细胞内含氧化合物, ROS 可以维持机体组织细胞的生理平衡, 但机体内如果存在过量的 ROS 会破坏其氧化还原稳态, 导致机体细胞的过氧化损伤^[9]。抗氧化剂可以抵消导致多种人类疾病的氧化应激, 消除 ROS^[10-12]。因此, 寻找有效的抗氧化剂对相关氧化应激疾病的防治有重要意义。花色苷作为抗氧化剂对细胞氧化损伤的抑制作用一直是花色苷类物质研究的热点。杨兆艳等^[13]研究了蓝莓花色苷对 H₂O₂ 诱导 A549 细胞氧化损伤的保护作用, 其作用机制可能与抑制细胞凋亡通路相关蛋白的表达, 提高胞内抗氧化酶活性, 清除胞内过量 ROS 有关。姚凤丽等^[14]研究了醇解黑莓花色苷对人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)细胞氧化损

伤的保护作用, 表明醇解黑莓花色苷可以抑制 ROS 积累, 保护细胞膜完整性, 抑制脂质过氧化, 并提高细胞内抗氧化酶活力。目前, 关于西番莲果皮花色苷对 H₂O₂ 诱导的 L02 细胞作用后, 细胞内各类氧化指标的评价还未见报道, 而且针对花色苷抑制细胞氧化损伤的功能活性研究很少结合代谢组学。代谢组学位于转录组学和蛋白质组学的下游^[15], 可实现对一个有机体或生物系统中所有代谢产物的全面(定性和定量)分析, 进而了解相关代谢途径的变化^[16]。通过代谢组学对细胞显著差异代谢物分析可以探讨抗氧化活性物质影响细胞生长的代谢途径, 研究其抗氧化机制。其中, 基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)的非靶向代谢组学方法已成为代谢产物分离和鉴定的重要技术^[17]。综上, 本研究通过建立 H₂O₂ 诱导 L02 细胞损伤模型, 以细胞存活率及抗氧化能力为指标, 结合非靶向代谢组学探究西番莲果皮花色苷(peel of passion fruits anthocyanins, PPFA)对 L02 细胞氧化损伤的抑制作用, 为西番莲果皮花色苷的有效利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

西番莲外果皮采集于福建省漳州市华安县; L02 细胞(中国科学院)。

二苯基苦味酰基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 超氧阴离子自由基试剂盒、羟自由基试剂盒、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒、细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)测定试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(南京建成生物工程研

究所); 总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)检测试剂盒{2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS]法}、T-AOC 检测试剂盒[总抗氧化值(total antioxidative capability, FRAP)法]、过氧化氢酶检测试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、RPMI-1640 液体培养基、胰蛋白酶消化液、青链霉素(美国 HyClone 公司); 噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、抗坏血酸(vitamin C, VC)(分析纯, 北京索莱宝科技有限公司); 蛋白裂解液(上海信裕生物科技有限公司); 乙腈、甲醇、氨水(色谱纯, 美国 Millipore 公司); 乙酸铵(色谱纯, 美国 Sigma 公司)。

1.2 仪器与设备

Forma 3111 型水套式 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 5810R 型高速冷冻离心机、Concentrator plus 真空离心浓缩仪(德国 Eppendorf 公司); XDS-2 倒置显微镜(广州粤显光学仪器公司); UV-5200 分光光度计(上海元析仪器有限公司); MDF-U3386S 医用超低温冰箱(日本 Panasonic 公司); YXQ-LS-50SII 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); Guava easy Cyte 流式细胞仪(法国 Millipore 公司); KJ-201A 孔板震荡器(上海 QiQian 公司); FS-600N 超声波细胞粉碎机(上海生析超声仪器有限公司); B01080010 Bioruptor 超声系统(比利时 Diagenode 公司); Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司); HILIC ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); Triple TOF 5600+质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)。

1.3 方法

1.3.1 PPFA 的制备

选取新鲜的西番莲果, 除杂后手工去皮, 只留外果皮, 清洗后冷冻干燥、粉碎过 80 目筛, 低温储存备用。使用本实验室的方法^[18]提取西番莲果皮花色苷, 得到西番莲果皮花色苷粗提物。参照何丹等^[19]的方法使用 AB-8 和 Sephadex LH-20 填料对西番莲果皮花色苷进行纯化, 得到 PPFA。

经鉴定, PPFA 中花色苷的含量为 12.21%, 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷为 PPFA 中的单一花色苷组分, 结构式如图 1 所示。

1.3.2 PPFA 抗氧化活性测定

(1) PPFA 清除 DPPH 自由基活性测定

根据 KÄHKÖNEN 等^[20]的方法并稍加修改, 配制 0.2 mmol/L DPPH 溶液, 待测液 PPFA 质量浓度分别为 20、40、60、80、100 μg/mL。样品组: 2 mL 样液+2 mL DPPH 溶液, 对照组: 2 mL 无水乙醇+2 mL DPPH 溶液, 空白组:

2 mL 样液+2 mL 无水乙醇, 混匀后室温避光静置 30 min, 测定在 517 nm 处的吸光度, 并根据公式(1)计算样品清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = 1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}} \times 100 \quad (1)$$

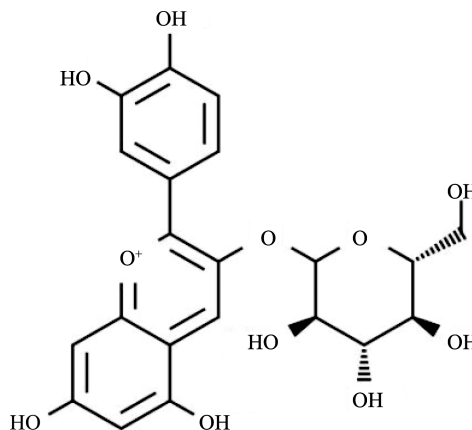


图 1 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷结构式

Fig.1 Structural formula of cyanidin-3-O-glucoside

其中, A_{sample} , A_{blank} 和 A_{control} 分别为样品、空白和对照组的吸光度。

以 PPFA 的质量浓度为横坐标, 清除率为纵坐标, VC 对应拟合曲线的回归方程为 $Y = -0.0001X^2 + 0.0238X - 0.1049$, $r^2 = 0.9921$, PPFA 对应拟合曲线的回归方程为 $Y = -0.0001X^2 + 0.0222X - 0.1497$, $r^2 = 0.9904$ 。然后根据拟合曲线计算半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值。

(2) PPFA 清除超氧阴离子与羟自由基活性测定

按照试剂盒进行操作, 待测液 PPFA 质量浓度分别为 50、100、150、200、300、400、500 μg/mL, 测定 550 nm 的吸光度。以 PPFA 的质量浓度为横坐标, 清除率为纵坐标, VC 清除超氧阴离子自由基对应拟合曲线的回归方程为 $Y = -0.0007X^2 + 0.5502X + 1.4688$, $r^2 = 0.9921$, PPFA 清除超氧阴离子自由基对应拟合曲线的回归方程为 $Y = 0.01035X + 31.36998$, $r^2 = 0.964$; VC 清除羟自由基对应拟合曲线的回归方程为 $Y = -0.0004X^2 + 0.4252X - 14.952$, $r^2 = 0.9877$, PPFA 清除羟自由基对应拟合曲线的回归方程为 $Y = -0.0002X^2 + 0.185X - 7.524$, $r^2 = 0.9762$ 。

1.3.3 PPFA 对 L02 细胞氧化损伤的抑制作用

(1) L02 细胞的培养及传代

按照 RPMI-1640 培养基:青霉素-链霉素混合溶液:胎牛血清=79:1:20 的体积比配制完全培养基, 培养 L02 细胞, 在 37°C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。待 L02 细胞长满平板的 80%~90%时, 用 0.25%胰蛋白酶消化进行传代培养。取对数生长期 L02 细胞进行后续实验。

(2) L02 细胞的氧化损伤模型建立与 MTT 法测定细胞存活率

参考陈言言^[21]的方法并稍加修改, 96 孔板中每孔加

入100 μL细胞浓度为 1×10^5 cells/mL的细胞,在培养箱中培养36 h。细胞贴壁生长后弃掉上清液,H₂O₂损伤组分别加入100 μL用完全培养基配制的0、40、80、120、160、200、240、280 μmol/L H₂O₂,空白组加入100 μL完全培养基,各浓度设置6个复孔再培养4 h,弃掉培养基用PBS清洗两次。称取70 mg MTT溶于14 mL PBS,充分溶解后放入高压灭菌锅中灭菌,配制成5 mg/mL的MTT溶液,-20°C下避光保存,每孔加20 μL MTT,继续培养4 h。弃去上清后,每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min混匀,测定490 nm的吸光度值,H₂O₂损伤组测得的吸光度为 B_{sampler} ,空白组测得的吸光度为 B_{blank} 。按公式(2)计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}/\% = B_{\text{sampler}}/B_{\text{blank}} \times 100 \quad (2)$$

其中, B_{sampler} 为不同浓度H₂O₂损伤组吸光度、 B_{blank} 为空白组吸光度。

(3) PPFA对L02细胞存活率的影响

参考郑峰等^[22]的方法并稍加修改,96孔板中每孔加入100 μL细胞(1×10^5 cells/mL),在培养箱中培养12 h。样品处理组加入0、200、400、600、800、1000、2000和3000 μg/mL PPFA,各质量浓度设置6个复孔,继续恒温培养24 h,弃去培养基并用PBS清洗两次,用MTT法测定细胞存活率。

(4) PPFA对L02细胞氧化损伤的抑制作用

96孔板中每孔加入100 μL细胞浓度为 1×10^5 cells/mL的细胞,设置空白组、H₂O₂损伤组和样品处理组均在培养箱中培养12 h。样品处理组加入完全培养基配制的为100、200、300、400、500、600 μg/mL PPFA溶液,各质量浓度设置6个复孔,继续在培养箱中培养24 h。弃去培养基后,H₂O₂损伤模型组及样品处理组每孔各加入100 μL的120 μmol/L H₂O₂,空白组加入100 μL完全培养基,损伤4 h后,弃去上清液并用PBS清洗两次,MTT法测定细胞存活率。

1.3.4 细胞T-AOC的测定

设置空白组、损伤组、低剂量组、中剂量组、高剂量组及VC阳性对照组,6孔板每孔加入100 μL不同质量浓度PPFA样品溶液(低剂量:200 μg/mL、中剂量:400 μg/mL、高剂量:600 μg/mL)和VC溶液(400 μg/mL)处理24 h后,损伤组、低、中、高剂量样品组和VC阳性对照组加入H₂O₂(120 μmol/L),空白组加入100 μL完全培养基,损伤4 h,弃去上层培养基并用PBS清洗两次后收集所有细胞提取总蛋白,然后根据ABTS和FRAP法测定T-AOC。

1.3.5 细胞抗氧化指标的测定

实验组细胞处理方法同1.3.4,弃去培养基并用PBS清洗后,10000 r/min离心5 min收集细胞,将细胞在380 W功率下超声破碎5 s,间隔20 s,10次循环,收集破碎细胞上清液,按照试剂盒说明操作测定各项抗氧化指标(MDA、LDH、SOD、CAT和GSH-Px)。

1.3.6 代谢物分析

取中剂量组(400 μg/mL)细胞和损伤组细胞,每组5个样本。不同组细胞培养完成后去除培养基,用预冷的PBS

收集清洗干净的细胞,液氮速冻后-80°C干冰保存,进行后续UPLC-Q-TOF-MS检测。

(1) 样品预处理

取样品真空浓缩至干,加入200 μL预冷水和800 μL预冷的甲醇/乙腈(1:1, V:V),混匀,冰浴超声60 min,-20°C孵育1 h沉淀蛋白,16000×g 4°C离心20 min,取上清。在沉淀中加入200 μL蛋白裂解液复溶,通过BCA定量测得蛋白质浓度。根据蛋白质浓度取相应量上清进样分析,检测时加入100 μL乙腈-水溶液(1:1, V:V)复溶,14000×g 4°C离心15 min,分离上清。

(2) 色谱分离

样品采用HILICACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)分离。其中柱温25°C,进样体积5 μL,流速0.3 mL/min;流动相A相为水+25 mmol/L乙酸铵+25 mmol/L氨水,B相为乙腈;梯度洗脱程序如下:0~0.5 min 5% A; 0.5~7.0 min 5%~35% A; 7.0~9.0 min 35%~60% A; 9.0~10.0 min, A保持在60%; 10.0~11.1 min 60%~5% A; 11.1~16.0 min, A保持在5%。

1.4 数据处理

所有数据均以至少3个独立实验数据的平均值±标准偏差表示。数据采用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析比较组间差异,Duncan多重极差检验进行统计学分析。原始MS数据使用MS-DIAL进行峰对齐、保留时间校正和峰面积提取。代谢物通过精确质量(质量耐受性<0.01 Da)和MS/MS数据(质量耐受性<0.02 Da)进行鉴定,这些数据与HMDB、massbank和其他公共数据库相匹配。利用KEGG数据库(<http://www.kegg.jp>)对差异代谢物数据进行代谢途径分析。使用Origin 2018作图,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 PPFA体外清除自由基活性

DPPH自由基是一种稳定的有机氮自由基,常用于天然抗氧化成分的筛选^[23]。如图2A所示,随质量浓度的增加,PPFA的DPPH自由基清除活性迅速提高,具有明显的量效关系。当质量浓度为100 μg/mL时,VC对DPPH自由基的清除率达到(91.40±1.01)%,PPFA为(86.27±1.63)%,VC和PPFA清除DPPH自由基的IC₅₀值分别为28.90和34.62 μg/mL,PPFA表现出良好的DPPH自由基清除活性。图2B和图2C分别比较了VC、不同质量浓度PPFA对超氧阴离子自由基和羟自由基清除活性。质量浓度为500 μg/mL时,VC和PPFA对超氧阴离子清除率分别为(98.44±1.19)%和(36.98±1.08)%,IC₅₀值分别为101.25和1798.26 μg/mL;VC和PPFA对羟自由基清除率分别(93.95±2.39)%和(36.39±2.30)%。

VC对羟基自由基清除率的 IC_{50} 值为 $184.93 \mu\text{g/mL}$,根据回归方程可知,在本研究质量浓度范围内,PPFA对羟基自由基清除率无法达到50%,这表明PPFA有一定的清除超氧阴离子自由基和羟自由基能力,但均低于VC。

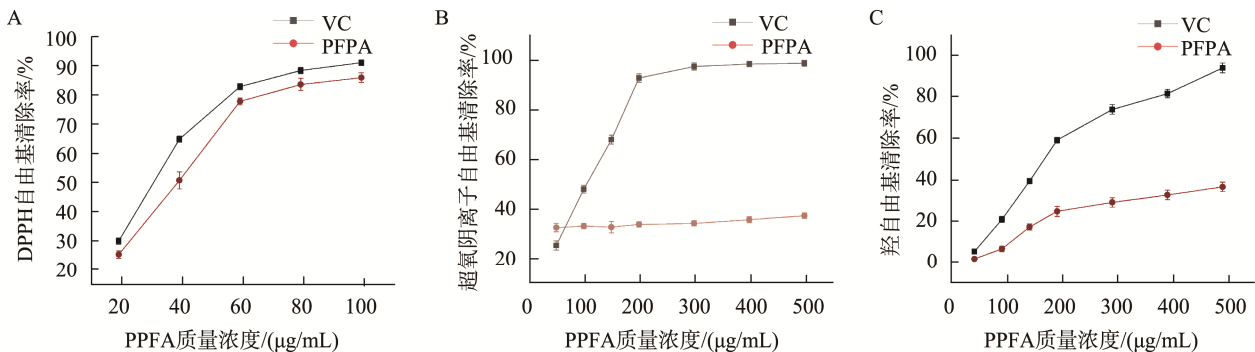
结果表明,PPFA有着与VC相似的DPPH自由清除能力,一定的超氧阴离子自由基和羟基自由基清除能力。DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ等^[7]提取了西番莲果皮中的酚类物质(富含花青素),测得DPPH的 IC_{50} 值为 $32.93 \mu\text{g/mL}$,与本研究所得的PPFA IC_{50} 值为 $34.62 \mu\text{g/mL}$ 较为接近。杨果等^[24]提取纯化了西番莲果皮的黄酮类物质,测得提取物和纯化物对DPPH的 IC_{50} 值分别为 0.92 、 0.82 mg/mL ,对羟基自由基的 IC_{50} 值分别为 0.95 、 0.78 mg/mL 。其DPPH的 IC_{50} 值低于本研究所得的PPFA的 IC_{50} 值,而清除羟基自由基能力比PPFA强。

2.2 细胞氧化损伤模型的建立

H_2O_2 可以穿透细胞膜生成高活性的 $\cdot\text{OH}$,产生过量的ROS,从而对L02细胞造成氧化毒性损伤^[25]。因此利用 H_2O_2 构建细胞氧化应激模型稳定可靠且在L02细胞氧化应激模型中使用广泛^[10,26-27]。ROS含量过高会对细胞造成氧化损伤,从而导致细胞凋亡,存活率下降。因此细胞损伤程度可由细

胞存活率来反映,细胞存活率下降表明细胞受损,也表明氧化损伤模型的成功建立。由图3A可知,随 H_2O_2 浓度的升高,L02细胞存活率出现显著降低。 H_2O_2 浓度为 $120 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率为 $(81.92\pm 3.52)\%$,与空白组相比有显著下降($P<0.05$),当 H_2O_2 浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率为 $(49.80\pm 9.57)\%$,达到半数致死率。由于半数致死浓度导致的细胞损伤很难恢复,故本研究选择浓度为 $120 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 建立L02细胞的氧化损伤模型。

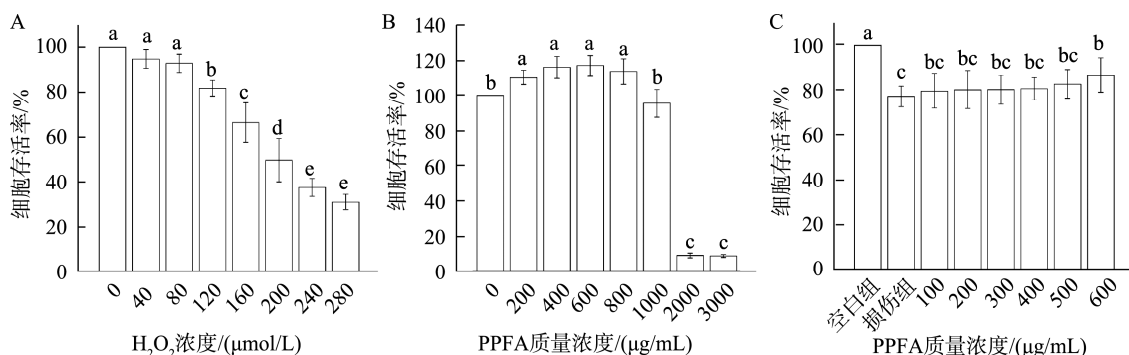
不同质量浓度PPFA对L02细胞存活率的影响如图3B。相比于 $0 \mu\text{g/mL}$,PPFA在 $200\sim 800 \mu\text{g/mL}$ 范围内时,细胞存活率均显著提高,其中 $600 \mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率达到最大值 $(116.77\pm 5.68)\%$ 。PPFA在 $1000 \mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率降至与 $0 \mu\text{g/mL}$ 无显著性差异水平,而PPFA质量浓度大于 $1000 \mu\text{g/mL}$ 对细胞存活产生了抑制作用。所以本研究选择PPFA质量浓度在 $600 \mu\text{g/mL}$ 内进行细胞抗氧化实验。如图3C所示,在 $100\sim 600 \mu\text{g/mL}$ 范围内,细胞的存活率逐渐增长,与损伤组相比, $600 \mu\text{g/mL}$ PPFA处理的 H_2O_2 细胞存活率显著提高($P<0.05$),可达 $(86.89\pm 7.60)\%$ 。这表明高剂量的西番莲果皮花色苷对 H_2O_2 损伤L02细胞有一定的抑制作用。选择3个梯度质量浓度 200 、 400 、 $600 \mu\text{g/mL}$ 进行后续抗氧化实验。



注: A~C 分别为 PPFA 对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基和羟基自由基的清除作用,均以 VC 为阳性对照。

图 2 PPFA 体外清除自由基的活性($n=3$)

Fig.2 Radical scavenging activities of PPFA *in vitro* ($n=3$)



注: A 为不同浓度的 H_2O_2 对细胞存活率的影响; B 为不同质量浓度的 PPFA 对 L02 细胞存活率的影响; C 为不同质量浓度 PPFA 抑制 H_2O_2 对 L02 细胞氧化损伤的效果; 不同小写字母表示组间差异有统计学意义, $P<0.05$ 。

图 3 L02 细胞氧化损伤模型的建立($n=3$)

Fig.3 Modeling of oxidative injury in L02 cells ($n=3$)

2.3 细胞 T-AOC 的测定

ABTS 能被氧化成色泽明显的 ABTS⁺自由基,适用于亲脂性和亲水性化合物,是一种广泛的测定 T-AOC 的方法^[28-29]。由表 1 可知, H₂O₂ 导致 L02 细胞 T-AOC 显著降低, PPFA 实验组细胞清除 ABTS⁺表现出了明显的剂量依赖性,相较于空白组和损伤组,低、中、高剂量 PPFA 处理组的 T-AOC 均有显著提高,但仍显著低于 VC 对照组($P<0.05$)。FRAP 主要测定待测样品还原三价铁离子的能力,可以反映总抗氧化能力^[30]。由表 1 可知,随着 FRAP 质量浓度的增加,细胞还原三价铁离子的能力逐渐提高,PPFA 质量浓度和铁离子还原能力呈剂量依赖关系。相较于损伤组,PPFA 中、高剂量组的 T-AOC 有显著提高($P<0.05$),达到空白组水平,但显著低于 VC 对照组($P<0.05$)。综上,ABTS 法与 FRAP 法的检测结果基本吻合,表明 PPFA 可以显著提高 H₂O₂ 诱导损伤细胞的 T-AOC,但未达到 VC 的 T-AOC 水平。何丹等^[19]研究表明,紫皮西番莲果皮花色苷有与 VC 相同的 ABTS 阳离子自由基清除活性和一定的 FRAP 总抗氧化能力,这与本研究相似,表明花色苷可以有效地抗机体氧化,抑制氧化损伤。

表 1 PPFA 对 H₂O₂ 诱导 L02 细胞 T-AOC 的影响
($n=3$, mmol/mg prot)

组别	ABTS 法	FRAP 法
空白组	0.635±0.008 ^e	0.287±0.010 ^b
损伤组	0.577±0.006 ^f	0.238±0.013 ^c
低剂量组	0.711±0.015 ^d	0.254±0.006 ^c
中剂量组	0.754±0.013 ^e	0.293±0.009 ^b
高剂量组	0.819±0.009 ^b	0.309±0.010 ^b
VC	0.865±0.008 ^a	0.410±0.015 ^a

注: 同列不同字母表示在 $P<0.05$ 水平存在显著差异,下同。

2.4 PPFA 对 H₂O₂ 诱导 L02 细胞内各类抗氧化指标的影响

ROS 可损害细胞功能,导致脂质过氧化,脂质过氧化会诱变产生 MDA^[31],因此,MDA 生成量为氧化应激程度

的常见指标。由表 2 可知,与空白组相比, H₂O₂ 损伤组细胞 MDA 生成量提高了 1.75 倍($P<0.05$); PPFA 各剂量组细胞 MDA 生成量逐次降低,且均显著低于损伤组水平($P<0.05$)。这表明 PPFA 能显著降低 MDA 的含量,缓解 ROS 对细胞脂质氧化损伤的影响。LDH 是一种氧化还原酶,存在于正常细胞的细胞质中^[32]。主要作用是催化乳酸氧化为丙酮酸,在三羧酸循环过程中具有重要作用,一旦细胞膜受损,LDH 会从细胞中释放出来^[33],在一定程度上能抵抗外界氧化应激导致的机体损伤^[34]。因此,LDH 是机体病理损伤、炎症反应和氧化应激的标志,LDH 的释放量也常常用于反应细胞自身的抗氧化调控系统的功能状态。由表 2 可知,与空白组相比, H₂O₂ 损伤组细胞 LDH 释放量显著升高($P<0.05$)。PPFA 各剂量组细胞 LDH 释放量逐次降低,且显著低于损伤组水平($P<0.05$)和空白组水平($P<0.05$)。表明 PPFA 可通过降低 LDH 含量进而减轻 L02 细胞的 H₂O₂ 损伤。

机体中的酶类抗氧化剂是机体抗氧化系统的重要组成部分。酶类抗氧化剂主要包括 SOD、CAT 和 GSH-Px。SOD 和 CAT 是抵御外界氧化应激刺激的第一道防线。大部分 ROS 来源于超氧化物, SOD 可以催化超氧化物降解形成氧和 H₂O₂, 因此 SOD 对于机体抗氧化至关重要^[35]。CAT 通过进一步将过氧化氢分解为分子氧和水,显著降低氧化应激^[36]。损伤组的 SOD 活力较空白组有显著降低($P<0.05$); 与损伤组相比, PPFA 各剂量组细胞 SOD 活力均显著提高($P<0.05$),但未达到 VC 和空白组水平。损伤组 CAT 活力较空白组显著降低($P<0.05$); 与损伤组相比, PPFA 各剂量组细胞 CAT 活力均显著提高($P<0.05$),且达到甚至高于 VC 水平。GSH-Px 是慢性应激过程中的主要的过氧化氢清除酶,可以催化过氧化氢和氢过氧化物还原为水或醇^[37]。损伤组 GSH-Px 活力较空白组显著降低($P<0.05$),与损伤组相比, PPFA 各剂量组细胞 GSH-Px 活力均有所上升,但均未达显著差异($P>0.05$)。

结果表明, PPFA 可显著抑制 H₂O₂ 对 L02 细胞 MDA、LDH、SOD、CAT 和 GSH-Px 抗氧化指标的影响,与 T-AOC 结果一致。有研究发现紫色青稞麸皮花色苷可通过增加细胞内 CAT 和 SOD 水平降低 ROS 水平,从而有效抑制 CoCl₂

表 2 PPFA 对 H₂O₂ 诱导 L02 细胞 MDA、LDH、SOD、CAT 和 GSH-Px 水平的影响($n=3$)
Table 2 Effects of PPFA on MDA, LDH, SOD, CAT and GSH-Px levels in H₂O₂-induced L02 cells ($n=3$)

组别	MDA/(nmol/mg prot)	LDH/(U/g prot)	SOD/(mg/prot)	CAT/(mg/prot)	GSH-Px/(mg/prot)
空白组	1.81±0.11 ^c	220.63±3.87 ^b	85.60±0.33 ^a	57.42±1.43 ^a	115.86±5.62 ^b
损伤组	3.17±0.06 ^a	242.85±4.84 ^a	71.51±1.92 ^c	46.21±0.35 ^d	101.95±1.12 ^c
低剂量组	2.76±0.06 ^b	195.42±5.17 ^c	74.86±1.11 ^d	48.45±0.85 ^c	110.14±8.78 ^{bc}
中剂量组	1.87±0.13 ^c	176.07±2.27 ^d	75.51±0.81 ^c	55.58±0.36 ^a	101.82±1.54 ^c
高剂量组	1.62±0.03 ^d	170.49±0.31 ^d	77.68±0.57 ^{cd}	48.48±0.59 ^c	104.02±1.39 ^c
VC	1.03±0.02 ^e	221.14±8.77 ^b	81.89±2.07 ^b	47.06±1.28 ^{cd}	127.39±9.69 ^a

诱导的 PC12 细胞缺氧损伤细胞凋亡^[38], 富含花色苷的紫胡萝卜醇提取物也可以通过增加 CAT、SOD 和 GSH-Px 等各类抗氧化酶的活性有效提升 H₂O₂ 诱导损伤的 Caco-2 细胞的抗氧化能力^[39]。这与本研究结果相似, 表明花色苷可增加细胞各类抗氧化酶活性进而有效地抗机体氧化, 抑制氧化损伤。

2.5 多元统计分析

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 对 400 μg/mL PPFA 处理 H₂O₂ 诱导损伤的 L02 细胞和损伤组细胞的显著差异代谢物进行鉴定, 结果表明, 与损伤组细胞相比, PPFA 处理 H₂O₂ 诱导损伤的 L02 细胞的代谢物有明显的分离。为了降低数据维度, 提高数据的可解释性和有效性, 引入正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)模型进行进一步分析。图 4A 和 C 显示, 不同组别之间分离明显(正离子: $R^2_Y=1$, $Q^2=0.537$; 负离子: $R^2_Y=0.999$, $Q^2=0.549$)。此外, 交叉验证和响应排列检验(图 4B 和 D)表明, 正负离子 $R^2_{intercept}$ 分别为 0.9933 和 0.9913, $Q^2_{intercept}$ 均小于 0.05, 说明 OPLS-DA 模型没有出现拟合, 表明该模型可以用于探索西番莲果皮花色苷抑制 L02 细胞氧化应激代谢差异。

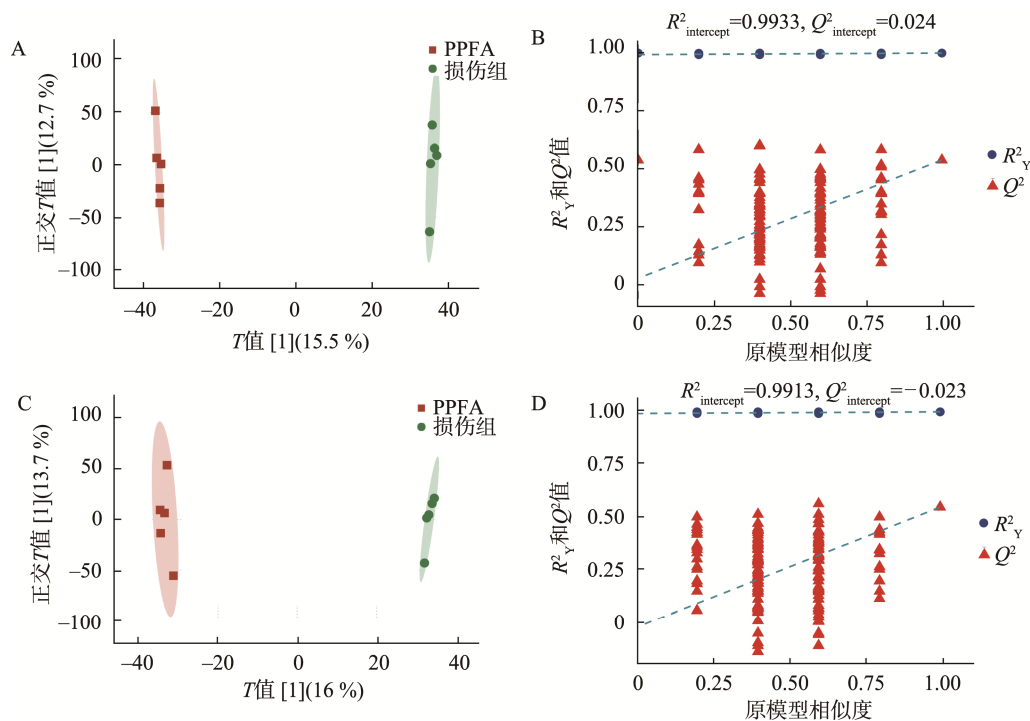
2.6 显著差异代谢物与代谢途径分析

OPLS-DA 分析可得到变量权重值(variable importance for the projection, VIP), VIP 值是评价组间表达模式影响程度和可解释性的有效参数。VIP 值越高, 表示变量对分组的

贡献越大。由 T 检验进一步验证组间代谢物的显著性, 得出 P 值通常用于评估不同组间差异的可能性。倍数变化(fold change analysis, FC)为样本之间代谢物浓度的差异比值。根据 HMDB 人类代谢组数据库、KEGG 数据库并结合先前的研究分析显著差异代谢物及代谢途径。本研究共鉴定出 460 种物质, 以 $VIP>1$ 、 $P<0.05$ 和 $\text{Log}_2\text{FC}>1$ (或 $\text{log}_2\text{FC}<-1$)的 3 个条件为原则^[40]筛选出 66 种显著差异物质。在去除掉部分大分子物质和仅在个别样品中检出的物质后, 最终确定了表 3 中 23 项代谢物作为具有显著性差异的代谢物。这 23 种显著差异代谢物, 包含氨基酸 3 种、脂肪酸 3 种、类脂物质 3 种、有机酸及其衍生物 4 种、吡啶和吡喃类 3 种和生物碱 1 种等。其中, 有 15 种物质显著上升, 8 种物质显著下调, 根据 KEGG 通路分析, 这些代谢物可能涉及胆汁分泌、谷胱甘肽代谢、铁死亡和脂肪酸生物合成代谢途径。

3 讨论与结论

花色苷抗氧化应激研究中, 目前认可度最高的学说之一为自由基理论, 花色苷结构中含有的多个可以与自由基反应生成稳定的醌自由基, 因此可以大大降低自动氧化链的传递, 从而抑制酯类过氧化的链式反应^[41]。另外已有研究表明, 花色苷(矢车菊素-3-葡萄糖苷)的抗氧化活性机制涉及激活 AMPK/Nrf-2 信号通路, 恢复氧化损伤细胞的 Nrf2 蛋白水平^[42]。花色苷另一可能的抗氧化机制为通过氢或



注: A 为正离子 OPLS-DA 得分图; B 为正离子置换检验图; C 为负离子 OPLS-DA 得分图; D 为负离子置换检验图。

图 4 OPLS-DA 得分图及置换检验图($n=5$)

Fig.4 OPLS-DA score plots and permutation charts ($n=5$)

表 3 主要差异性代谢物
Table 3 Major differential metabolites

序号	代谢物名称	保留时间/min	质荷比(<i>m/z</i>)	<i>P</i>	VIP	log ₂ FC
1	2-甲基乳酸	12.513	104.99226	0.0002	2.3123	5.3616
2	乳酸	6.602	89.02645	0.0005	2.2183	-3.4924
3	促胃泌素	13.907	433.33334	0.0042	2.0600	1.6141
4	吐根酚碱	0.944	489.31351	0.0068	1.9841	-2.9741
5	油酸	1.208	279.23309	0.0075	1.9569	3.3198
6	多西紫杉醇	5.936	808.43414	0.0114	1.9311	1.8122
7	辅酶 Q	6.352	880.58832	0.0146	1.8984	-6.8946
8	烟酰胺	1.324	123.05464	0.0149	1.8810	2.8214
9	麦芽酚	7.761	164.90045	0.0163	1.8656	-2.3659
10	胆甾烷	1.236	39.035648	0.0230	1.8039	2.6634
11	谷胱甘肽	13.745	308.08536	0.0218	1.7868	3.2933
12	5-氧代-脯氨酸	13.651	130.04854	0.0292	1.7368	1.3974
13	赖氨酸	13.641	147.07498	0.0313	1.7251	-1.5868
14	茴香霉素	3.04	288.19113	0.0325	1.7237	0.9891
15	麦角克碱	7.544	534.29102	0.0348	1.7062	1.9628
16	1-甲基烟酰胺	11.664	137.07047	0.0338	1.7050	1.1533
17	粪甾酮	0.969	369.42233	0.0348	1.6998	1.8868
18	月桂酸	1.21	199.17159	0.0351	1.6856	-1.0689
19	奎宁	7.235	325.17542	0.0385	1.6794	2.0110
20	油酸酰胺	1.076	282.19214	0.0374	1.6640	3.1065
21	异阿魏酸	1.185	195.05989	0.0402	1.6483	-1.3229
22	乳清酸	6.675	155.04921	0.0336	1.6449	-2.9741
23	L-谷氨酸	13.656	146.04741	0.0323	1.6056	3.3198

注: log₂FC>0 代表该代谢物在 PPFA 处理后含量升高, log₂FC<0 代表该代谢物在 PPFA 处理后含量下降。

电子的贡献直接中和 ROS, 尽量减少 ROS 与其他化合物(如金属离子或脂质)之间的相互作用^[43]。花色苷的抗氧化特性与其分子结构和氧化还原特性密切相关, 花色苷中含有大量酚羟基, 羟基的数目影响抗氧化活性的强弱^[44]。PPFA 中的矢车菊素-3-葡萄糖苷含有多个酚羟基基团可能是其发挥体外抗氧化和细胞抗氧化作用的重要原因。

人体具有优良的内在酶抗氧化系统, SOD、CAT 和 GSH-Px 为机体主要的抗氧化酶, 抗氧化酶活力的高低直接反映出机体对外界氧化应激损伤的调控能力^[45]。本研究结果表明, H₂O₂ 破坏了 L02 细胞的氧化调节系统, 降低细胞内抗氧化酶的活力, 使得 L02 细胞内氧化动态被打破。而不同质量浓度 PPFA 干预后能较有效抑制 H₂O₂ 造成的细胞内抗氧化酶活性的降低, 如各剂量均可显著提高 SOD 活性, 中剂量可增加 CAT 活性至空白组水平, 低浓度可增加 GSH-Px 活性至空白组水平, 由此可见, PPFA 对氧化损伤具有较好的抑制作用, 能提高机体对外界氧化应激的调控能力。除 CAT 外, PPFA 的各项抗氧化能力和指标均低于 VC, 可能是因为 PPFA 中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷含量较低, 提高纯度后可能会有更好的抗氧化活性。

代谢组学结果表明, PPFA 对抑制 H₂O₂ 诱导损伤 L02 细胞涉及多个代谢产物和多条代谢途径。5-氧代-脯氨酸可以在氧代脯氨酸酶的催化下水解产生 L-谷氨酸^[46], L-谷氨酸是天然存在的活性非必需氨基酸, 也是谷胱甘肽合成的 3 种前体之一^[47], 它还参与蛋白质和碳水化合物等代谢, 表

现出肝保护作用^[48]。谷胱甘肽是一种有效的抗氧化剂, 在显著差异代谢物中, 5-氧代-脯氨酸、L-谷氨酸和谷胱甘肽均显著提高, 说明 PPFA 对 H₂O₂ 诱导损伤 L02 的抑制作用可能的机制之一为调节谷胱甘肽合成途径。高胆固醇可以促进肝脏的脂质氧化, 胆固醇在体内的动态平衡受胆固醇的吸收、合成、代谢或转化为胆汁酸的相互作用所控制^[49], 胆固醇代谢能够产生粪甾酮^[50], 而胆汁酸是通过肝脏中的胆固醇氧化合成并分泌到肠道中的, 其主要作用为通过脂类物质溶解吸收后进入机体进行脂质代谢循环。胆甾烷是胆汁酸合成途径的关键信号之一^[51], 由表 3 可知, 胆甾烷和粪甾酮在 PPFA 处理组均有显著的上升, 说明 PPFA 可以促进胆固醇降解, 提高胆汁酸分泌代谢来抑制氧化损伤。铁死亡一种非凋亡形式的细胞死亡模式, 是由铁依赖的脂质过氧化引起的细胞死亡形式, 铁死亡的核心机制是细胞脂质过氧化和铁积累引起^[52]。辅酶 Q 是铁死亡途径中的关键酶之一, 与损伤组相比, PPFA 处理组的辅酶 Q 显著下降, 表明 PPFA 可能通过抑制铁死亡途径来抑制 L02 细胞的凋亡。另外, 本研究还观察到有部分脂肪酸及其衍生物也有显著差异, 如油酸和油酸酰胺, 油酸酰胺是由油酸和氨酶酰胺生成的, ABDALLAH 等^[53]的研究表明, 油酸酰胺是一种能提高抗炎活性的新型代谢物, 代谢物中油酸和油酸酰胺均有显著上升, 表明 PPFA 可能促进了脂肪酸合成来提高 H₂O₂ 诱导损伤 L02 细胞的抗炎活性。

本研究发现 PPFA 有较强的 DPPH 自由基清除能力,

可通过降低细胞 MDA 和 LDH 浓度, 提高抗氧化酶系酶活力, 显著抑制 H_2O_2 诱导的 L02 细胞损伤。通过代谢组学分析发现, PPFA 处理 H_2O_2 诱导损伤的 L02 细胞和损伤组细胞之间存在 23 种显著差异代谢物, 涉及到谷胱甘肽代谢、胆汁分泌、铁死亡和脂肪酸生物合成途径。本研究为西番莲果皮花色苷在食品领域的应用提供了新依据。

参考文献

- [1] ARAUJO MH, SILVA ICVD, OLIVEIRA PF, *et al.* Biological activities and phytochemical profile of *Passiflora mucronata* from the Brazilian resting [J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2017, 27(6): 702–710.
- [2] CORRÊA RCG, PERALTA RM, HAMINIUK CWI, *et al.* The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit) [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2016, 58: 79–95.
- [3] HU M, DU J, DU L, *et al.* Anti-fatigue activity of purified anthocyanins prepared from purple passion fruit (*P. edulis* Sim) epicarp in mice [J]. *J Funct Foods*, 2020, 65: 103725.
- [4] 李煦, 白雪晴, 刘长霞, 等. 天然花青素的抗氧化机制及功能活性研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(20): 8163–8171.
LI X, BAI XQ, LIU CX, *et al.* Research progress on antioxidant mechanism and functional activity of natural anthocyanin [J]. *J Food Qual Saf*, 2021, 12(20): 8163–8171.
- [5] HARUNA K, MISATO W, SHOKEN H, *et al.* Analysis of natural colourant extracted from the pericarp of passion fruit [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 136(p2): 110412.
- [6] HERRERA-RAMIREZ J, MENESES-MARENTES N, DÍAZ MPT. Optimizing the extraction of anthocyanins from purple passion fruit peel using response surface methodology [J]. *J Food Meas Charact*, 2020, 14(1): 185–193.
- [7] DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ G, GARCÍA MC, PLAZA M, *et al.* Revalorization of *Passiflora* species peels as a sustainable source of antioxidant phenolic compounds [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 696(C): 134030.
- [8] 杨宗玲, 马馨, 张蕊, 等. 超声波提取西番莲果皮色素工艺优化及稳定性[J]. *食品科技*, 2020, 45(2): 251–257.
YANG ZL, MA X, ZHANG R, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction process and stability for pigment from *Passiflora edulis* peel [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(2): 251–257.
- [9] VO QV, HOA NT, THONG NM, *et al.* The hydroperoxyl and superoxide anion radical scavenging activity of anthocyanidins in physiological environments: Theoretical insights into mechanisms and kinetics [J]. *Phytochemistry*, 2021, 192: 112968.
- [10] GAO X, WANG C, CHEN Z, *et al.* Effects of *N-trans*-feruloyltyramine isolated from laba garlic on antioxidant, cytotoxic activities and H_2O_2 -induced oxidative damage in HepG2 and L02 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 130: 130–141.
- [11] WANG M, ZHAO F, PENG H, *et al.* Investigation on the morphological protective effect of 5-hydroxymethylfurfural extracted from wine-processed *Fructus corni* on human L02 hepatocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(2): 424–428.
- [12] LU Q, JIANG M, JIANG J, *et al.* Isolation and identification of compounds from *Penthorum chinense* Pursh with antioxidant and antihepatocarcinoma properties [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(44): 11097–11103.
- [13] 杨兆艳, 胡红娟, 李新, 等. 蓝莓花色苷对 H_2O_2 诱导 A549 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(12): 33–45.
YANG ZY, HU HJ, LI X, *et al.* Protective effects of blueberry anthocyanins on H_2O_2 -induced oxidative damage in A549 cells [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2021, 21(12): 33–45.
- [14] 姚凤丽, 孟少珂, 延海莹, 等. 醇解黑莓提取物对 HUVEC 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(7): 56–63.
YAO FL, MENG SK, YAN HY, *et al.* Protective effect of fermented blackberry extracts on oxidative damage in HUVEC cells [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2022, 22(7): 56–63.
- [15] WU L, WINDEN WA, GULIK WM, *et al.* Application of metabolome data in functional genomics: A conceptual strategy [J]. *Metab Eng*, 2005, 7(4): 302–310.
- [16] XU Y, WANG C, HO WE, *et al.* Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations [J]. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2014, 56: 37–48.
- [17] DONG Y, QIU P, ZHAO L, *et al.* Metabolomics study of the hepatoprotective effect of *Phellinus igniarius* in chronic ethanol-induced liver injury mice using UPLC-Q/TOF-MS combined with ingenuity pathway analysis [J]. *Phytomedicine*, 2020, 74: 152697.
- [18] 丁蕾, 何传波, 魏好程, 等. 响应面法优化西番莲果皮花色苷的提取工艺[J]. *食品工业*, 2021, 42(4): 1–4.
DING L, HE CB, WEI HC, *et al.* The optimization of the extraction process of anthocyanin from passion fruit peel by response surface method [J]. *Food Ind*, 2021, 42(4): 1–4.
- [19] 何丹, 孔钰婷, 宋洪波, 等. 紫果西番莲果皮花色苷鉴定及其生物活性[J]. *食品科学*, 2020, 41(11): 57–63.
HE D, KONG YT, SONG HB, *et al.* Identification and bioactivity evaluation of anthocyanins from *Passiflora edulis* Sims peel [J]. *Food Sci*, 2020, 41(11): 57–63.
- [20] KÄHKÖNEN MP, HEINONEN M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(3): 628–633.
- [21] 陈言言. 苜蓿皂苷对 H_2O_2 诱导 IEC-6 和 IPEC-J2 细胞氧化损伤的保护作用及其机制[D]. 郑州: 河南农业大学, 2017.
CHEN YY. Protective effect of alfalfa saponins against H_2O_2 induced oxidative stress injury in IEC-6 and IPEC-J2 cells and its mechanism [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2017.
- [22] 郑峰, 金芳多, 金梅花, 等. 大豆异黄酮对 H_2O_2 致 L02 细胞损伤的保护作用[J]. *大豆科学*, 2020, 39(3): 458–463.
ZHENG F, JIN FD, JIN MH, *et al.* Protective effect of soy isoflavones on injury of L02 cells induced by H_2O_2 [J]. *Soybean Sci*, 2020, 39(3): 458–463.
- [23] ALAM MN, BRISTI NJ, RAFIQUZZAMAN M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity [J]. *Saud Pharm J*, 2013, 21(2): 143–152.
- [24] 杨果, 李臣. 西番莲果皮黄酮纯化及其抗氧化与抗运动疲劳活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(4): 72–80.
YANG G, LI C. Purification and activity of antioxidation and resisting exercise fatigue of flavonoids from peel of passion fruit [J]. *China Food Addit*, 2022, 33(4): 72–80.
- [25] GAO L, MANN GE. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: A double-edged sword in redox signaling [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(1): 9–20.
- [26] MA J, ZENG X, ZHOU M, *et al.* Inhibitory effect of low-molecular-weight peptides (0–3 kDa) from *Spirulina platensis* on H_2O_2 -induced oxidative damage in L02 human liver cells [J]. *Bioresour Bioprocess*, 2021, 8(1): 36.
- [27] LI G, KANG J, YAO X, *et al.* The component of green tea, *L*-theanine protects human hepatic L02 cells from hydrogen peroxide-induced

- apoptosis [J]. *Eur Food Res Technol*, 2011, 233(3): 427–435.
- [28] ARTS MJTJ, DALLINGA JS, VOSS H, *et al.* A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay [J]. *Food Chem*, 2004, 88(4): 567–570.
- [29] LI W, ZHANG Y, LIU Y, *et al.* *In vitro* kinetic evaluation of the free radical scavenging ability of propofol [J]. *Anesthesiology*, 2012, 116(6): 1258–1266.
- [30] BENZIE IF, STRAIN JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay [J]. *Anal Biochem*, 1996, 239(1): 70–76.
- [31] AYALA A, MUÑOZ MF, ARGÜELLES S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 360438.
- [32] NATALIYA S. Activity of the glutathione system of antioxidant defense in rats under the action of *L*-glutamic acid [J]. *Biochem J*, 2013, 85(4): 40–47.
- [33] HONG SM, LEE Y, PARK I, *et al.* Lactic acidosis caused by repressed lactate dehydrogenase subunit B expression down-regulates mitochondrial oxidative phosphorylation via the pyruvate dehydrogenase (PDH)-PDH kinase axis [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(19): 7810–7820.
- [34] AKILA P, ASAIKUMAR L, VENNILAL. Chlorogenic acid ameliorates isoproterenol-induced myocardial injury in rats by stabilizing mitochondrial and lysosomal enzymes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 582–591.
- [35] WANG Y, BRANICKY R, NOË A, *et al.* Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(6): 1915–1928.
- [36] LI S, YANG X, FENG Z, *et al.* Catalase enhances viability of human chondrocytes in culture by reducing reactive oxygen species and counteracting tumor necrosis factor- α -induced apoptosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(6): 2427–2442.
- [37] BELA K, HORVÁTH E, GALLÉ Á, *et al.* Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses [J]. *J Plant Physiol*, 2015, 176: 192–201.
- [38] ZHANG Y, YIN L, HUANG L, *et al.* Composition, antioxidant activity, and neuroprotective effects of anthocyanin-rich extract from purple highland barley bran and its promotion on autophagy [J]. *Food Chem*, 2021, 339: 127846.
- [39] ZHANG H, LIU R, TSAO R. Anthocyanin-rich phenolic extracts of purple root vegetables inhibit pro-inflammatory cytokines induced by H₂O₂ and enhance antioxidant enzyme activities in Caco-2 cells [J]. *J Funct Foods*, 2016, 22: 363–375.
- [40] 房艳, 于思雨, 高俊海, 等. 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法与代谢组学技术分析牛乳与羊乳差异性[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(7): 2075–2083.
- FANG Y, YU SY, GAO JH, *et al.* Analysis of differences in cow milk and goat milk by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry and metabolomics approach [J]. *J Food Qual Saf*, 2020, 11(7): 2075–2083.
- [41] SUN-WATERHOUSE D, ZHOU J, WADHWA SS. Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation [J]. *Food Control*, 2013, 32(2): 450–460.
- [42] YU L, ZHANG S, ZHAO X, *et al.* Cyanidin-3-glucoside protects liver from oxidative damage through AMPK/Nrf2 mediated signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Funct Foods*, 2020, 73: 104148.
- [43] GHISELLI A, SERAFINI M, NATELLA F, *et al.* Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29(11): 1106–1114.
- [44] WU Y, ZHOU Q, CHEN X, *et al.* Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: Evaluation of anti-oxidation and α -glucosidase inhibition effect [J]. *Food Res Int*, 2017, 100(Pt 1): 312–324.
- [45] DEMIRCI-ÇEKİÇ S, ÖZKAN G, AVAN AN, *et al.* Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2022, 209: 114477.
- [46] WERF P, ORLOWSKI M, MEISTER A. Enzymatic conversion of 5-oxo-*L*-proline (*L*-pyrrolidone carboxylate) to *L*-glutamate coupled with cleavage of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate, a reaction in the -glutamyl cycle [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1971, 68(12): 2982–2985.
- [47] SALYHA N, SALYHA Y. Protective role of *L*-glutamic acid and *L*-cysteine in mitigation the chlorpyrifos-induced oxidative stress in rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 64: 155–163.
- [48] ZHANG H, WANG Z, LI Z, *et al.* *L*-glycine and *L*-glutamic acid protect *Pediococcus pentosaceus* R1 against oxidative damage induced by hydrogen peroxide [J]. *Food Microbiol*, 2022, 101: 103897.
- [49] HU C, YE JW, ZHAO LC, *et al.* 5,7,3',4'-flavan-on-ol (taxifolin) protects against acetaminophen-induced liver injury by regulating the glutathione pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 236(236): 116939.
- [50] MARTÍN-PELÁEZ S, MOSELE JI, PIZARRO N, *et al.* Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: Implications of human gut microbiota [J]. *Eur J Nutr*, 2017, 56(1): 119–131.
- [51] WU D, GUAN L, JIANG Y, *et al.* Microbiome and metabolomics study of quercetin for the treatment of atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2019, 9(6): 545–560.
- [52] 高薇, 曾海荣, 乐佳敏. 鸦胆子苦醇通过 Nrf2/HO-1 通路诱导细胞铁死亡抑制胃癌细胞 HGC-27 增殖[J/OL]. *中国实验方剂学杂志*: 1-9. [2022-09-22]. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20221628
- GAO W, ZENG HR, LE JM, *et al.* Brusatol suppresses proliferation of human gastric cancer HGC-27 cells through inducing ferroptosis via Nrf2/HO-1 pathway [J/OL]. *Chin J Exp Tradit Med Form*: 1-9. [2022-09-22]. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20221628
- [53] ABDALLAH HMI, AMMAR NM, ABDELHAMEED MF, *et al.* Protective mechanism of acacia saligna butanol extract and its nano-formulations against ulcerative colitis in rats as revealed via biochemical and metabolomic assays [J]. *Biology*, 2020, 9(8): 195.

(责任编辑: 郑 丽 张晓寒)

作者简介



张佳辰, 硕士研究生, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: 775173431@qq.com



熊何健, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品化学与营养。

E-mail: hxjiong@jmu.edu.cn