



# 红毛多糖对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Caco-2细胞氧化损伤的保护作用研究

郑雅君<sup>1</sup>, 何萍萍<sup>1</sup>, 郑明静<sup>1,2,3,4</sup>, 姜泽东<sup>1,2,3,4\*</sup>, 朱艳冰<sup>1,2,3,4</sup>, 倪辉<sup>1,2,3,4</sup>, 李清彪<sup>1,2,3,4</sup>

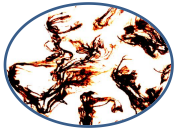
1.集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2.福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3.厦门南方海洋研究中心经济海藻资源化利用与深加工重点实验室, 福建 厦门 361021; 4.厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021

## 摘要

目的: 研究红毛藻多糖 (Bangia fusco-purpurea polysaccharide, BFP) 对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的人结肠癌细胞 (Caco-2) 氧化应激损伤的保护作用。方法: 利用过氧化氢 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 诱导Caco-2细胞建立氧化应激损伤细胞模型, 采用四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 比色法检测细胞活力, 分光光度法检测细胞内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活力、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活力、还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 水平和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平。采用二氯荧光乙酰乙酸盐 (dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 法检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 采用Hoechst染色法观察细胞凋亡情况, 采用试剂盒检测细胞内Caspase-3和Caspase-9的酶活性。结果: 多糖BFP显著提高H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤的Caco-2细胞活力, 降低细胞内ROS生成水平, 提高细胞内SOD、CAT活性和GSH水平, 减少MDA生成, 并通过抑制Caspase-3和Caspase-9的酶活性来改善氧化应激损伤引起的细胞凋亡。结论: 红毛藻多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化应激损伤Caco-2细胞具有保护作用, 可通过增强细胞内源性抗氧化酶的活力、提高非酶类抗氧化物的水平和抑制细胞凋亡显著改善H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Caco-2细胞氧化应激损伤。

## 引言

红毛藻 (Bangia fusco-purpurea) 又称为红毛菜, 是我国东南沿海特色的食用海藻资源。红毛藻在福建、广东沿海分布较广, “莆田红毛菜”是国家地理标志的名优海藻。红毛藻富含蛋白质、多糖、氨基酸、游离脂肪酸和维生素, 具有较高的营养价值<sup>[1-3]</sup>。多糖是红毛藻中主要的膳食营养活性成分之一。



- 生物活性:
- 抗氧化<sup>[4,7]</sup>
  - 抑制血管紧张素转换酶活性<sup>[5]</sup>
  - 免疫诱导<sup>[1]</sup>
  - 抑菌活性<sup>[4]</sup>

## 目的

研究红毛藻多糖 (Bangia fusco-purpurea polysaccharide, BFP) 对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的人结肠癌细胞 (Caco-2) 氧化应激损伤的保护作用。

## 材料和方法

### 1. 材料与试剂

➢ 人结肠癌细胞 (Caco-2) 购于美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC); DMEM培养基 美国Hyclone公司; 胎牛血清 美国Gibco公司; 四甲基偶氮唑盐 (methylthiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 过氧化氢 西格玛奥德里奇 (上海) 有限公司; RIPA裂解液 北京索莱宝科技有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 检测试剂盒、还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 检测试剂盒和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 南京建成科技有限公司; Hoechst 33258 荧光染色试剂盒、活性氧 (ROS) 检测试剂盒、Caspase 3 活性检测试剂盒和Caspase 9活性检测试剂盒 碧云天生物技术有限公司。

➢ 红毛藻多糖BFP, 采用课题组报道的方法<sup>[4,6]</sup>对红毛藻多糖提取和纯化。

### 2. 方法

- Caco-2毒性分析
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Caco-2细胞氧化损伤模型建立
- 多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Caco-2细胞氧化损伤的保护作用分析
- Caco-2细胞形态的分析
- Caco-2细胞内ROS的产生测定
- Caco-2细胞中SOD活力、CAT活力、GSH水平和MDA含量的测定
- Caco-2细胞凋亡分析
- Caco-2细胞内Caspase-3和Caspase-9的活性分析
- 数据统计与分析

## 结论

- 多糖BFP在测定浓度 (0~1000 μg/mL) 范围内对Caco-2细胞的细胞活力无显著影响。
- 多糖BFP能够显著抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化应激损伤Caco-2细胞模型内ROS的生成, 显著提高抗氧化酶 (SOD和CAT) 的酶活力和非酶类抗氧化物GSH的水平, 并能够显著降低细胞内MDA的产生量。
- 多糖BFP能够显著下调H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化应激损伤Caco-2细胞模型内Caspase-3和Caspase-9蛋白酶的活性, 缓解氧化应激损伤引起细胞凋亡, 使细胞维持正常形态。
- 红毛藻多糖BFP可有效干预H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Caco-2细胞氧化应激损伤, 具有潜在预防和辅助治疗由氧化应激引起的肠道炎症的应用价值。

## 参考文献

- 1) JIANG Z, et al. : Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 83, 2065-2074 (2019).
- 2) WANG W J, et al. : Biologia, 73, 333-337 (2018).
- 3) 吴纹茵, 等. 海洋科学, 06 30-32 (1982).
- 4) 孙惠洁. 集美大学, 2008.
- 5) 宋田源, 等. 集美大学学报 (自然科学版), 22, 24-30 (2017).
- 6) 蔡薇. 集美大学, 2017.
- 7) 张一非, 等. 水产科学, 38, 749-758 (2019).
- 8) WANG S, et al. : Food and Chemical Toxicology, 88: 65-74 (2016).
- 9) IRRAZABAL T, et al. : Nature Communications, 11: 1802 (2020).
- 10) YU G, et al. : Journal of Functional Foods, 67: 103839 (2020).

## 结果

### 1.1 多糖BFP对Caco-2细胞活力的影响 1.2 氧化损伤模型的建立

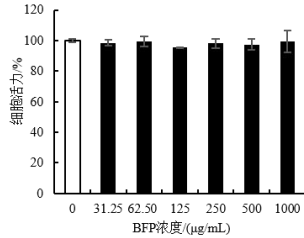


图1 红毛藻多糖BFP对Caco-2细胞活力的影响

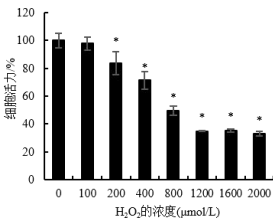


图2 不同浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对Caco-2细胞活力的影响  
注: 与对照组相比, \* p<0.05

### 1.3 多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导Caco-2细胞氧化损伤的影响

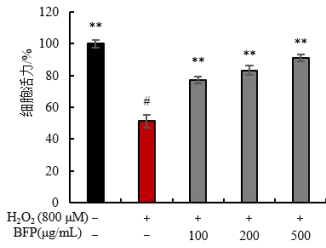
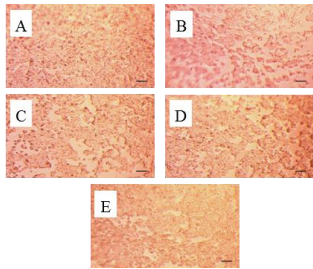


图3 红毛藻多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导Caco-2细胞氧化损伤的保护作用  
注: 与对照组相比, # p<0.05; 与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤组相比, \* p<0.05, \*\* p<0.01

### 1.4 多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤的Caco-2细胞形态的影响



A. 对照组; B. 氧化损伤组; C. 100 μg/mL BFP+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; D. 200 μg/mL BFP+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; E. 500 μg/mL BFP+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 比例尺20 μm  
图4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导Caco-2细胞氧化损伤的细胞形态学观察 (×400)

### 1.5 多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤的Caco-2细胞内ROS含量的影响

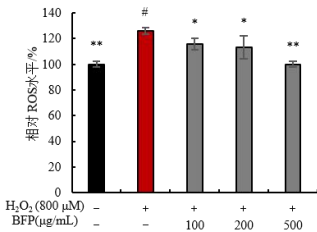


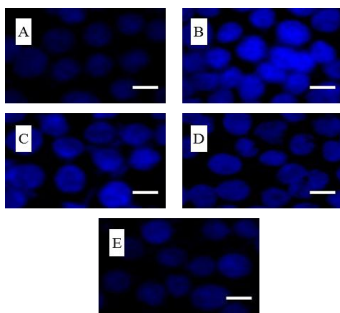
图5 红毛藻多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤的Caco-2细胞内ROS产生的影响  
注: 与对照组相比, # p<0.05; 与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤组相比, \* p<0.05, \*\* p<0.01

### 1.6 红毛藻多糖BFP对Caco-2细胞内SOD活力、CAT活力、GSH水平和MDA含量的影响 (n=6)

| 组别            | SOD活力/<br>(U/mg prot) | CAT活力/<br>(U/mg prot) | GSH含量/<br>(μmol/g prot) | MDA含量/<br>(nmol/mg prot) |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| 正常组           | 181.58 ± 18.58        | 7.50 ± 0.66           | 83.11 ± 4.40            | 43.22 ± 17.29            |
| 氧化损伤组         | 99.58 ± 28.90#        | 5.72 ± 0.31#          | 45.93 ± 5.79#           | 106.60 ± 5.96#           |
| BFP 100 μg/mL | 109.95 ± 10.40        | 6.95 ± 0.48**         | 65.04 ± 9.45**          | 88.02 ± 18.32**          |
| BFP 200 μg/mL | 149.25 ± 18.24*       | 7.10 ± 0.17**         | 71.83 ± 5.06**          | 77.11 ± 12.14**          |
| BFP 500 μg/mL | 172.60 ± 13.56**      | 7.36 ± 0.28**         | 78.53 ± 7.59**          | 69.23 ± 20.85**          |

注: 与对照组相比, # p<0.05; 与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤组相比, \* p<0.05, \*\* p<0.01

### 1.7 多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导Caco-2细胞凋亡的影响



A. 对照组; B. 氧化损伤组; C. 100 μg/mL BFP+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; D. 200 μg/mL BFP+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; E. 500 μg/mL BFP+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 比例尺20 μm  
图6 红毛藻多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤的Caco-2细胞凋亡的影响

### 1.8 多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导Caco-2细胞内Caspase-3和Caspase-9活性的影响

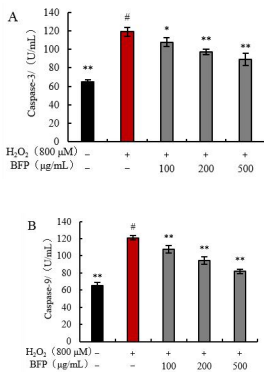


图7 红毛藻多糖BFP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤的Caco-2细胞Caspase-3和Caspase-9活性的影响  
注: 与对照组相比, # p<0.05; 与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤组相比, \* p<0.05, \*\* p<0.01