

玉米糖肽对酒精诱导损伤 LO2 细胞的保护效应

王晓杰, 童 玲, 刘晓兰

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院 黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要 构建 LO2 细胞酒精性损伤模型,在细胞水平上研究玉米糖肽干预对酒精诱导损伤的 LO2 细胞的保护效应,并探讨玉米糖肽拮抗酒精性肝细胞损伤的可能机理。结果表明:与酒精模型组相比,50 $\mu\text{g/mL}$ 玉米糖肽的预处理能够增加损伤 LO2 细胞中酒精代谢酶(ADH 和 ALDH)和抗氧化酶(SOD、CAT 和 GSH-Px)活力以及 GSH 含量;降低 ROS 和 MDA 含量,说明玉米糖肽通过促进酒精代谢和增强抗氧化活力,维持 LO2 细胞结构的完整,防止肝内酶(AST、ALT 和 LDH)的泄露,并降低 LO2 细胞早期凋亡和死亡细胞的比例,达到保护酒精诱导损伤的 LO2 细胞的效果。

关键词 转谷氨酰胺酶;玉米糖肽;LO2 细胞;酒精代谢酶;细胞凋亡

文章编号 1009-7848(2023)01-0013-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.01.002

据世界卫生组织(WHO)报告,饮酒与 200 多种疾病和伤害有关^[1]。肝脏是酒精代谢的主要器官,90%的酒精摄入量由肝脏代谢,肝脏也是酒精毒性的主要靶器官^[2]。长期大量饮酒或酗酒容易引发肝脏损伤性疾病,且不容易受到控制。酒精性肝损伤的特征是脂肪变性、炎症、坏死,最终导致纤维化和肝硬化,约有 15%的酒精性肝硬化患者会发展成肝癌,其引发的健康和社会问题不容忽视^[3-4]。目前,酒精性肝病的临床治疗主要采取戒酒、营养支持和对症治疗等综合疗法,目的是减轻酒精性肝损伤的临床症状,降解清除已经形成或者正在形成的纤维组织,以防止肝硬化的发生。尽管现代医学取得了长足的进步,但仍没有特效药物能使肝病患者痊愈,而且一般的抗酒精药物会导致副作用或产生新的毒性^[5-8]。研发拮抗酒精性肝损伤的天然、低毒副作用、多途径的肝保护剂,是目前医学和食品科学领域共同关注的问题。

玉米糖肽是玉米蛋白经蛋白酶水解获得低分子质量的玉米肽,然后,在转谷氨酰胺酶催化下与氨基糖共价结合的产物。与玉米肽相比,玉米糖肽的溶解性显著增加,并具有更高的抗氧化活性及乙醇脱氢酶激活活性^[9-10],推测玉米糖肽具有在体

内发挥促进酒精代谢和拮抗酒精性肝损伤的潜力。然而,目前鲜有关注玉米糖肽在细胞水平上拮抗酒精性肝损伤的活性研究。

本试验以细胞存活率为指标,构建 LO2 细胞酒精性损伤模型,然后,用构建成功的 LO2 细胞损伤模型,以 GSH 为阳性对照,从 LO2 细胞存活率、酒精代谢酶活力、氧化应激水平及细胞凋亡情况等角度,评价玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞的保护效应,并分析可能的保护机制,为后续用动物模型研究玉米糖肽拮抗酒精性肝损伤的效应及作用机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

LO2 细胞株,南京凯基生物技术有限公司;噻唑兰(MTT),上海生工生物技术有限公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶,Gibco 公司;丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase, AST)、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)、活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)和 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH)、乙醛脱氢酶(Acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶

收稿日期:2022-01-11

基金项目:黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2020C111);
黑龙江省省属高等学校基本科研业务费青年创新人才科研项目(135509225)

第一作者:王晓杰,女,博士,教授

E-mail: wangxiaojie80@163.com

(Catalase, CAT)、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)检测试剂盒,上海江莱生物有限公司。

1.2 仪器与设备

NV 4750E 二氧化碳培养箱,美国纽埃尔公司;FC500 流式细胞仪,美国贝克曼库尔特公司;SX-500 高压蒸汽灭菌锅,日本 TOMY 公司;En-Spire 酶标仪,美国 PerkinElmer 股份有限公司;LX73 荧光倒置显微镜,日本 Olympus 公司;VELOCITY14R 高速离心机,澳大利亚 Dynamica 公司;NDA701 杜马斯定氮仪,意大利 VELP 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品的制备 参照文献[11]的方法制备玉米肽和玉米糖肽。按蛋白基称取配制 10 mL, 8 mg/mL 玉米糖肽和玉米肽溶液所需的样品量,放于干净小烧杯内,于无菌条件下加入 DMEM 培养基,用无菌移液器反复吸打使样品充分溶解。用 0.22 μm 的无菌过滤器对玉米糖肽和玉米肽溶液进行过滤除菌,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 LO2 细胞的培养 将解冻的 LO2 细胞悬液转移到装有 5 mL DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清、1%青-链霉素双抗)的 25 cm^2 细胞培养瓶中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的二氧化碳培养箱中培养。待 LO2 细胞生长融合度达到 80%~90%时进行传代培养。选用 20~30 代细胞进行试验。

1.3.3 玉米糖肽对 LO2 细胞的毒性试验 采用细胞存活率表征玉米糖肽是否对 LO2 细胞产生毒性效应,测定方法参照 Li 等^[12]描述的 MTT 法,略有修改。取 96 孔板,每孔加入 100 μL ,密度为 1×10^5 cells/mL(以下试验均采用该密度)、对数生长期的 LO2 细胞悬液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。样品组每孔加入 100 μL 待测样品溶液,使待测样品的终质量浓度分别为 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8 g/mL, 对照组每孔加入 100 μL DMEM 培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h。培养结束后,吸弃孔内液体,加入磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2~7.4, 下同)清洗细胞 2 次,每孔再加入 100 μL 磷酸盐缓冲液和 10 μL 终质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h。吸弃孔内液体,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,将 96 孔板放在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、500 r/min 的微孔板振荡仪上振荡 10 min。用酶标仪检测样品组和对照组每孔在

570 nm 波长处的吸光度值,按照公式(1)计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{样品组细胞的平均吸光值}}{\text{对照组细胞的平均吸光值}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 玉米糖肽对酒精诱导损伤 LO2 细胞的保护作用 按 1.3.3 节的方法用 24 孔板培养 LO2 细胞。试验分为对照组、酒精组和样品组,样品组每孔中加入 1 mL 样品溶液,使样品终质量浓度为 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$, 对照组和酒精组每孔加入 1 mL DMEM 培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h。吸弃孔内液体,对照组每孔加入 2 mL DMEM 培养基,酒精组和样品组每孔加入 2 mL 500 mmol/L 酒精溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。收集 LO2 培养液,用于检测 AST、ALT 和 LDH 活力;用 500 μL 磷酸盐缓冲液清洗细胞 2 次,一部分平板按 1.3.3 节的 MTT 法测定酒精组和样品组的细胞存活率,一部分平板用胰酶消化细胞,将细胞悬液收集于无菌离心管中。向细胞沉淀中加入高效 RIPA 裂解液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 裂解 30 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。取适量裂解液放置于冰水浴中,按照试剂盒说明书测定 CAT、SOD、ADH、ALDH 和 GSH-Px 活力以及 MDA 和 GSH 含量。

1.3.5 LO2 细胞内 ROS 含量的测定 参考 Wang 和 Lee 等描述的方法^[13-14],略有修改。细胞培养、造模与 1.3.4 节相同。培养结束后,将孔内液体弃去,每孔用 100 μL 磷酸盐缓冲液清洗 2 次,每孔加入 100 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)探针溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。将孔内探针溶液弃去,用磷酸盐缓冲液清洗 2 次。取一部分 96 孔板在激发波长 485 nm, 发射波长 530 nm 的条件下,测定孔内荧光强度,并用公式(2)计算相对 ROS 水平(%);另取一部分孔板用荧光倒置显微镜观察和记录细胞内绿色荧光的强度。

$$\text{相对 ROS 水平}(\%) = \frac{\text{样品组细胞的平均荧光强度}}{\text{正常组细胞的平均荧光强度}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.6 玉米糖肽对酒精诱导的 LO2 细胞凋亡的拮抗作用 细胞培养、造模与 1.3.4 节相同。培养结束后,用不含 EDTA 的 0.25%胰酶消化细胞后,

将细胞收集于无菌离心管中,用磷酸盐缓冲液清洗细胞 2 次,加入 500 μL 结合液,轻轻重悬细胞,随后分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,轻轻混匀,室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)下用铝箔纸包上避光孵育 10 min,在 1 h 之内用流式细胞仪进行细胞凋亡情况的检测。

1.3.7 数据统计分析 所有数据均以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。试验数据采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 19.0 进行单因素方差分析,采用 LSD 法进行组间多重比较, $P<0.05$ 为差异显著性水平。

2 结果与分析

2.1 玉米糖肽对 LO2 细胞的毒性效应

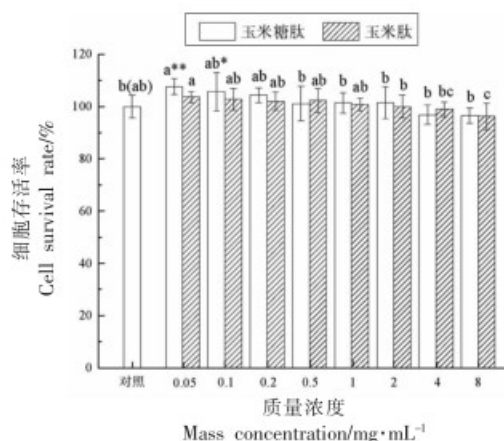
细胞毒性分析是评估功能性食品生物安全性最重要的检测方法之一。将不同质量浓度的玉米糖肽和玉米肽分别作用 LO2 细胞 6 h 后,采用 MTT 法测定细胞存活率,以表征玉米糖肽和玉米肽是否对 LO2 细胞产生毒性效应,结果如图 1 所示。

由图 1 可以看出,与对照组相比,随着玉米糖肽浓度的增加,LO2 细胞存活率呈逐渐降低的变化趋势。在 0.05 mg/mL 质量浓度下,玉米糖肽组的细胞存活率极显著高于对照组($P<0.01$),提示 0.05 mg/mL 的玉米糖肽具有较好的促进 LO2 细胞增殖的作用;在 0.1~8 mg/mL 质量浓度范围内,玉米糖肽处理后的 LO2 细胞存活率与对照组相比差异不显著($P>0.05$),说明高质量浓度的玉米糖肽没有对 LO2 细胞产生毒性效应。在 0.05~4 mg/mL 质量浓度范围内,玉米肽组的细胞存活率与对照组相比差异不显著($P>0.05$),说明在此质量浓度范围内,玉米肽对 LO2 细胞既无增殖作用,也无毒性效应;在 8 mg/mL 时,玉米肽组的 LO2 细胞存活率为 96.19%,与对照组相比显著降低($P<0.05$),与同质量浓度玉米糖肽相比,经糖基化修饰后,玉米肽的安全性得以改善。一般情况下,当细胞存活率小于对照组 75% 的样品质量浓度被认为是有毒的^[15]。在本试验质量浓度范围内,经玉米糖肽和玉米肽处理 6 h 后,LO2 细胞存活率均大于 96%,说明玉米糖肽和玉米肽未对 LO2 细胞产生毒副作用,是安全的生物功能因子。为了考察玉米糖肽在低质量浓度条件下对酒精诱导损伤的

LO2 细胞的保护效应,在后续研究中玉米糖肽的质量浓度选择 5~50 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞存活率的影响

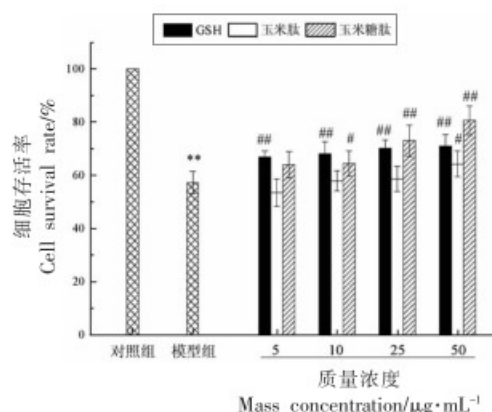
以 GSH 为对照,研究玉米糖肽和玉米肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞存活率的影响,结果如图 2 所示。



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);*,与对照组相比差异显著($P<0.05$);**,与对照组相比差异极显著($P<0.01$);(ab),玉米肽组与对照组相比。

图 1 不同质量浓度的玉米糖肽和玉米肽对 LO2 细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of corn glycopeptide and zein peptide at different mass concentrations on viability of LO2 cells



注:**,与对照组相比差异极显著($P<0.01$),#,与模型组相比差异显著($P<0.05$),##,与模型组相比差异极显著($P<0.01$),下同。

图 2 玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞存活率的影响

Fig.2 The effect of corn glycopeptide on the viability of LO2 cells induced by alcohol

由图2可以看出,与对照组相比,模型组的细胞存活率极显著降低,降低了42.71%,说明LO2细胞损伤模型构建成功。与模型组相比,玉米糖肽以剂量依赖的方式显著抑制了酒精的细胞毒性,使LO2细胞存活率显著提高,在质量浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 时,玉米糖肽使LO2细胞存活率提高23.3%,极显著高于同质量浓度的玉米肽($P<0.01$),显著高于同质量浓度的GSH($P<0.05$),说明玉米糖肽、玉米肽和GSH均显示出针对酒精诱导损伤的LO2细胞的保护作用,且玉米糖肽的保护效果更显著。

2.3 玉米糖肽对酒精诱导损伤的LO2细胞的保护效果

2.3.1 培养液中ALT和AST活力 细胞未受到刺激时,肝转氨酶(AST和ALT)只存在于细胞内,当细胞受到刺激时,细胞膜损伤,将AST和ALT释放到胞外,使培养液中转氨酶活力升高^[16]。因此,AST和ALT的释放是LO2细胞损伤的主要指标,酒精诱导的细胞毒性也可以直接通过检测培养液中的ALT和AST泄漏量进行评估,结果如图3和图4所示。

如图3和4所示,经酒精处理后,LO2细胞培养液中的ALT和AST活力分别增加了5.09和8.35倍,表明LO2细胞膜和线粒体受到了严重破坏,这一结果也进一步证实了500 mmol/L酒精对LO2细胞的毒性效应。

与模型组相比,玉米糖肽、玉米肽和GSH均以剂量依赖方式抑制了培养液中ALT和AST活力的升高,尤其是在25 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,玉米糖肽的干预使ALT和AST活力降低至正常水平,且ALT的降低效果显著高于同浓度的GSH,说明玉米糖肽对LO2细胞的酒精性损伤具有保护效果,使ALT和AST泄漏量降低。

2.3.2 培养液中LDH活力 LDH存在于所有细胞中,一旦细胞质膜受损,就会迅速释放到细胞培养液中,因此,LDH泄漏是细胞毒性的另一个经典指标^[17]。玉米糖肽对酒精诱导损伤的LO2细胞培养液中LDH活力的影响如图5所示。

如图5所示,与对照组相比,模型组LDH的活力极显著增加($P<0.01$),说明500 mmol/L酒精的干预使LO2细胞膜受损而促进了LDH的释放。

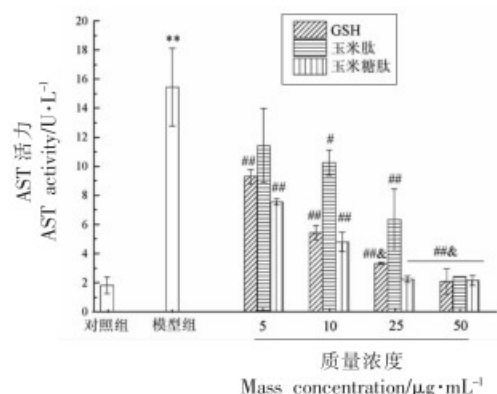
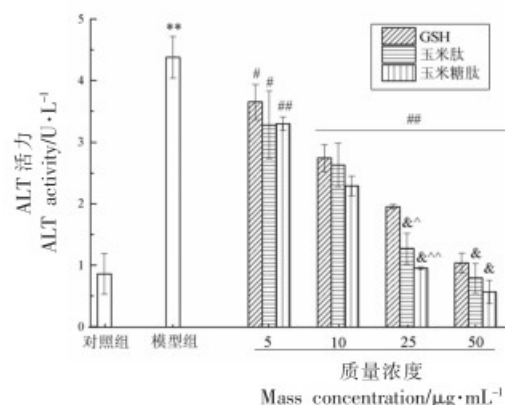


图3 玉米糖肽对酒精诱导损伤的LO2细胞培养液中AST活力的影响

Fig.3 The effect of corn glycopeptide on the AST activity in culture medium of the LO2 cells induced by alcohol



注:△, 玉米肽和玉米糖肽与GSH相比差异显著($P<0.05$),
△△, 与GSH相比差异极显著($P<0.01$)。

图4 玉米糖肽对酒精诱导损伤的LO2细胞培养液中ALT活力的影响

Fig.4 The effect of corn glycopeptide on the ALT activity in culture medium of the LO2 cells induced by alcohol

在试验浓度范围内,玉米糖肽、玉米肽和GSH的干预均可以抑制LDH水平的升高,尤其是在50 $\mu\text{g/mL}$ 时,三者均使LDH活力恢复到正常水平,这可能与三者的自由基清除能力有关,维持了LO2细胞膜的完整性,减少了LDH的释放。

2.3.3 细胞中MDA含量 MDA作为脂质过氧化的主要终产物之一,可以与磷脂酰乙醇胺和蛋白质交联,产生脂褐素沉积而破坏细胞膜结构,导致细胞肿胀坏死^[18]。因此,MDA水平可以反映脂质过氧化和细胞损伤的程度。经玉米糖肽干预后LO2细胞中MDA的含量如图6所示。

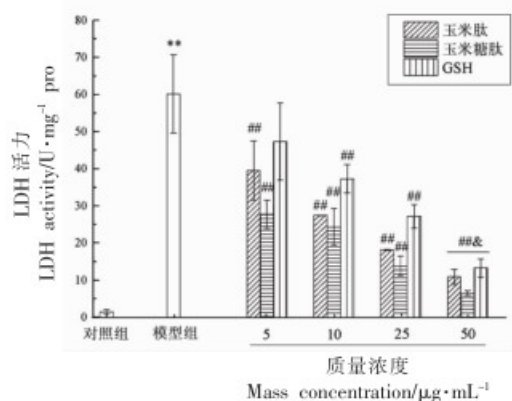


图 5 玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞培养液中 LDH 活力的影响

Fig.5 The effect of corn glycopeptide on the LDH activity in culture medium of the LO2 cells induced by alcohol

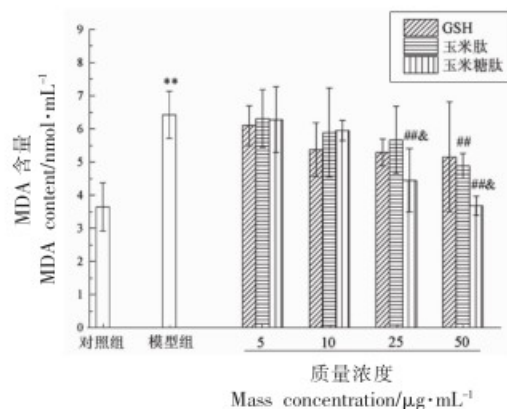


图 6 玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞中 MDA 含量的影响

Fig.6 Effect of corn glycopeptide on MDA content in alcohol-induced LO2 cells

由图 6 可以看出,与对照组相比,模型组细胞内的 MDA 含量由 3.64 nmol/mL 增加到 6.43 nmol/mL,说明酒精氧化代谢产生的过量 ROS 自由基使细胞膜上的不饱和脂肪酸氧化产生 MDA,进而产生细胞毒性。与模型组相比,经玉米糖肽干预后,MDA 含量呈剂量依赖式降低,在蛋白质量浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,MDA 含量降低 30.79%,比同质量浓度的玉米肽和 GSH 分别高 18.97%和 13.06%,说明在试验浓度范围内,玉米糖肽降低细胞内

MDA 含量的效果优于玉米肽和 GSH,可能与玉米糖肽具有多重生物学活性有关,可以从多角度清除 ROS 自由基而减少 MDA 的产生,使细胞内的毒性环境大大降低。

2.3.4 细胞中酒精代谢酶 ADH 和 ALDH 活力

经玉米糖肽干预后测定酒精诱导损伤的 LO2 细胞内的 ALDH 和 ADH 活力,表征玉米糖肽对 LO2 细胞内酒精氧化代谢能力的影响,结果如图 7 和 8 所示。

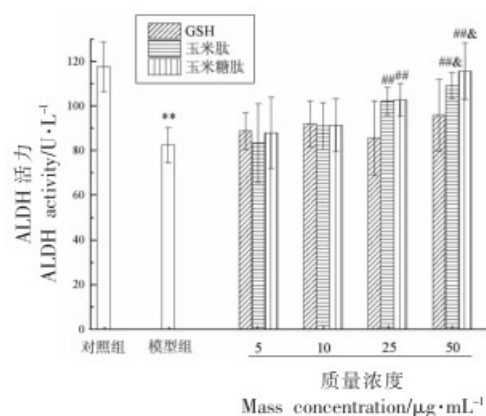


图 7 玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞中 ALDH 活力的影响

Fig.7 Effect of corn glycopeptide on ALDH activity in alcohol-induced LO2 cells

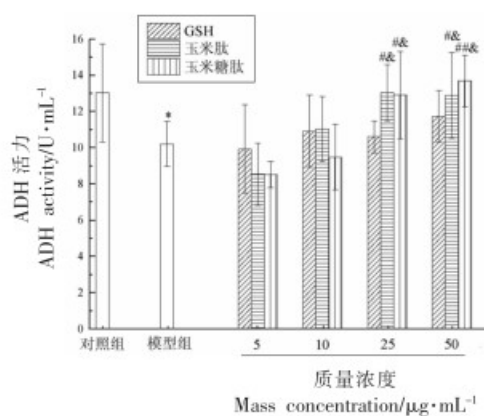


图 8 玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞中 ADH 活力的影响

Fig.8 Effects of corn glycopeptide on the ADH activity in alcohol-induced LO2 cells

由图7可以看出,与对照组相比,模型组ALDH活力极显著降低($P<0.01$),降低了29.94%,说明酒精氧化代谢产物乙醛会在LO2细胞内堆积,乙醛的增加会破坏线粒体功能而对LO2细胞的毒性效应增强,且乙醛加合物还会诱导免疫反应以促进肝细胞凋亡^[19]。与模型组相比,在质量浓度为25 $\mu\text{g/mL}$ 时,玉米糖肽和玉米肽的干预使ALDH活力极显著增加($P<0.01$),而在试验浓度范围内,GSH对ALDH活力没有产生显著性影响。因此,玉米糖肽可以通过提高ALDH的活力而减轻乙醛诱导的LO2细胞损伤。

由图8可以看出,与对照组相比,模型组ADH活力降低21.66%,说明500 mmol/L酒精作用LO2细胞后,导致LO2细胞氧化代谢酒精的能力下降,增加了酒精对LO2细胞的毒性效应。与模型组相比,质量浓度为25 $\mu\text{g/mL}$ 的玉米糖肽和玉米肽使ADH活力恢复至正常水平,而在试验浓度范围内,GSH对ADH活力没有产生显著性影

响。

综合以上分析,玉米糖肽和玉米肽通过增强LO2细胞内的ADH和ALDH活力,加速了酒精氧化代谢,降低了酒精及其代谢产物对LO2细胞的毒性效应,而同浓度GSH没有此效果。分析可能与玉米糖肽和玉米肽富含Glu、Leu、Ala和Pro有关(见参考文献[10]),这4种氨基酸的代谢产物可以使TCA循环和线粒体呼吸链反应增强,从NADH到NAD⁺的再生速度加快,ADH活力被上调^[20-22]。而GSH作为天然抗氧化剂,只能从抗氧化的角度降低酒精代谢对细胞的氧化损伤,无加速酒精代谢的效果,进一步说明增加ADH和ALDH活力是玉米糖肽保护酒精诱导损伤的LO2细胞的主要机制之一。

2.3.5 细胞中GSH含量和抗氧化酶活力 玉米糖肽对酒精诱导损伤的LO2细胞内的GSH含量以及CAT、SOD和GSH-Px活力的影响如表1所示。

表1 玉米糖肽对损伤LO2细胞中CAT、SOD、GSH-Px活力和GSH含量的影响

Table 1 Effects of com glycopeptide on CAT, SOD, GSH-Px activities and GSH content in alcohol-induced LO2 cells

组别	GSH 含量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CAT 活力/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	SOD 活力/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	GSH-Px 活力/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{蛋白}$
对照组	15.72 $\pm$ 2.25	60.99 $\pm$ 11.41	188.28 $\pm$ 20.32	490.11 $\pm$ 37.5
模型组	10.24 $\pm$ 1.00**	36.07 $\pm$ 7.93**	114.73 $\pm$ 20.42**	190.54 $\pm$ 17.49**
GSH 5 $\mu\text{g/mL}$	11.42 $\pm$ 1.4	38.96 $\pm$ 11.88	141.58 $\pm$ 32.23	389.06 $\pm$ 51.04**
GSH 10 $\mu\text{g/mL}$	10.44 $\pm$ 2.87	44.16 $\pm$ 5.71	142.31 $\pm$ 26.1	399.45 $\pm$ 48.97**
GSH 25 $\mu\text{g/mL}$	11.83 $\pm$ 3.25	46.6 $\pm$ 12.91	162.13 $\pm$ 28.44**	405.57 $\pm$ 66.15**
GSH 50 $\mu\text{g/mL}$	14.28 $\pm$ 3.2**	52.47 $\pm$ 10.93**	177.32 $\pm$ 20.52**	478.09 $\pm$ 29.81**
玉米肽 5 $\mu\text{g/mL}$	10.53 $\pm$ 2.86	38.86 $\pm$ 9.02	140.15 $\pm$ 16.91*	309.29 $\pm$ 30.82**
玉米肽 10 $\mu\text{g/mL}$	11.4 $\pm$ 3.76	40.17 $\pm$ 5.89	150.2 $\pm$ 12.29**	339.43 $\pm$ 14.2**
玉米肽 25 $\mu\text{g/mL}$	14.42 $\pm$ 2.08**	46.18 $\pm$ 8.28	163.98 $\pm$ 29.7**	388.51 $\pm$ 40.37**
玉米肽 50 $\mu\text{g/mL}$	14.35 $\pm$ 2.86**	52.72 $\pm$ 10.85**	165.83 $\pm$ 17.37**	396.75 $\pm$ 24.28**
玉米糖肽 5 $\mu\text{g/mL}$	10.62 $\pm$ 3.24	43.59 $\pm$ 9.69	143.2 $\pm$ 21.9*	361.73 $\pm$ 23.63**
玉米糖肽 10 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\pm$ 2.19	43.67 $\pm$ 8.37	148.77 $\pm$ 20.76*	374.84 $\pm$ 12.31**
玉米糖肽 25 $\mu\text{g/mL}$	12.67 $\pm$ 1.57	48.7 $\pm$ 7.56*	167.12 $\pm$ 28.27**	401.08 $\pm$ 24.81**
玉米糖肽 50 $\mu\text{g/mL}$	15.33 $\pm$ 1.46**	60.9 $\pm$ 5.3**	182.68 $\pm$ 20.57**	488.42 $\pm$ 14.42**

注:**. 与对照组相比差异极显著($P<0.01$),*. 与模型组相比差异极显著($P<0.01$),^{*}. 与对照组相比差异不显著($P>0.05$),^{ns}. 与玉米肽组相比差异极显著($P<0.01$),^{*}. 与玉米肽组相比差异显著($P<0.05$),^{ns}. 与玉米肽组相比差异极显著($P<0.01$)。

由表1可知,与对照组相比,经500 mmol/L酒精诱导后,LO2细胞内GSH含量以及CAT、SOD和GSH-Px活力均极显著降低($P<0.01$),分

别降低了34.86%,40.86%,39.06%,61.12%,说明500 mmol/L酒精诱导LO2细胞产生大量ROS,ROS抑制了抗氧化酶的活力,消耗了GSH,使细

细胞处于氧化应激状态。于亚莉等^[23]利用 HepG2 细胞构建酒精性损伤模型时也得到了相同的结果。

由表 1 可以看出,与模型组相比,仅 50 $\mu\text{g/mL}$ 的玉米糖肽使 GSH 含量极显著增加至正常水平;在质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,玉米糖肽使 CAT 活力提高至正常水平,分别比同质量浓度的玉米肽和 GSH 高 22.68% 和 23.37%;在质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时,玉米糖肽组的 SOD 活力比酒精组高 45.66%,分别比同质量浓度玉米肽和 GSH 高 2.73% 和 4.35%。

由表 1 还可以看出,在试验浓度范围内,玉米糖肽、玉米肽和 GSH 均可以极显著提高酒精诱导损伤的 LO2 细胞内的 GSH-Px 活力,且在质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,玉米糖肽的提高效果与同质量浓度 GSH 相当,极显著高于同质量浓度的玉米肽。GSH-Px 清除 H_2O_2 时需要 GSH 巯基的参与, GSH 组的外源 GSH 供应充足,故 GSH-Px 活力较高,而经糖基化修饰后,玉米肽提供氢和电子的能力增强,故玉米糖肽清除 H_2O_2 的能力高于玉米肽,减少了抗氧化酶系的损耗,使 GSH-Px 活力提高。

综合以上分析,玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞内的抗氧化酶系和 GSH 有积极调节作用,说明玉米糖肽可能会直接或间接参与调节细胞内与 ROS 代谢及氧化应激相关信号通路的表达,如 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路等,进而有效改

善酒精引起的 LO2 细胞损伤。因此,玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞的保护作用也与其清除由酒精代谢产生的自由基的能力有关。

2.3.6 细胞内的 ROS 含量 采用 DCFH-DA 探针法测定 LO2 细胞内 ROS 的水平,玉米糖肽预处理对酒精诱导损伤的 LO2 细胞内绿色荧光强度的影响如图 9 所示,通过相对荧光强度计算的 ROS 相对含量如图 10 所示。

由图 9 可以看到,与对照组相比,500 mmol/L 酒精处理组细胞内荧光强度明显增强,说明在酒精作用下,细胞内抗氧化酶活力降低和 GSH 含量减少,脂质过氧化产生的 MDA 造成线粒体膜通透性增大,线粒体内的 ROS 进入细胞,LO2 细胞发生氧化应激。结合 2.3.5 节的结果,经玉米糖肽、玉米肽和 GSH 预处理后,LO2 细胞内抗氧化酶如 SOD、CAT、GSH-Px 活力增加,ROS 含量降低,细胞内荧光强度也呈剂量依赖式减弱。

如图 10 所示,与对照组相比,模型组 ROS 含量显著增加 ($P < 0.05$),增加了 25.95%,而与模型组相比,玉米糖肽、玉米肽和 GSH 的干预使 ROS 含量显著降低,尤其是在质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,玉米糖肽处理使 ROS 含量降低 15.9%,效果高于同质量浓度的 GSH 和玉米肽,说明玉米糖肽通过增强细胞内抗氧化酶活力和 GSH 含量而加速 ROS 的清除,减轻细胞的氧化性损伤,达到保护 LO2 细胞的效果。

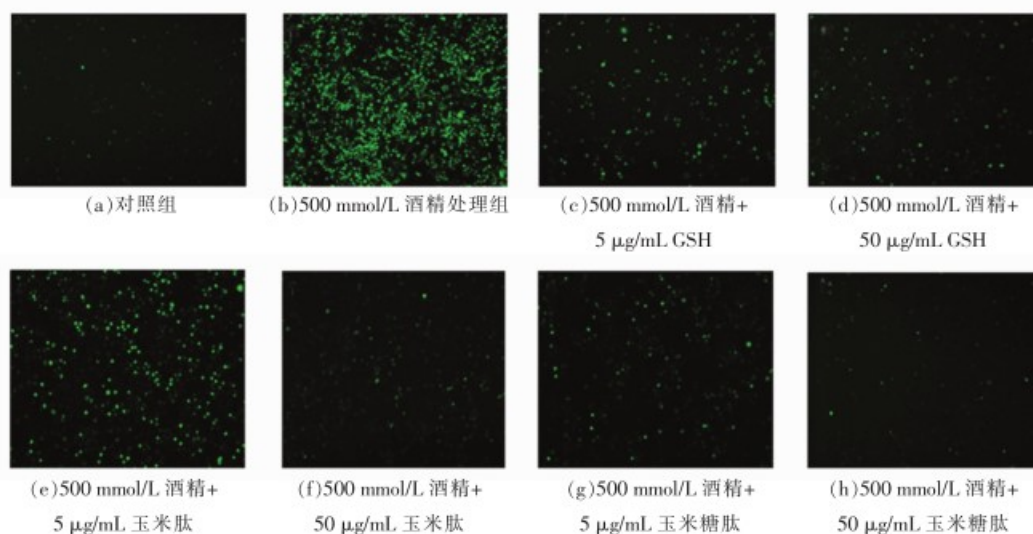


图 9 荧光显微镜下观察 LO2 细胞内荧光强度的变化 (400 $\times$)

Fig.9 The changes of fluorescence intensity in LO2 cells using a fluorescence microscope (400 $\times$)

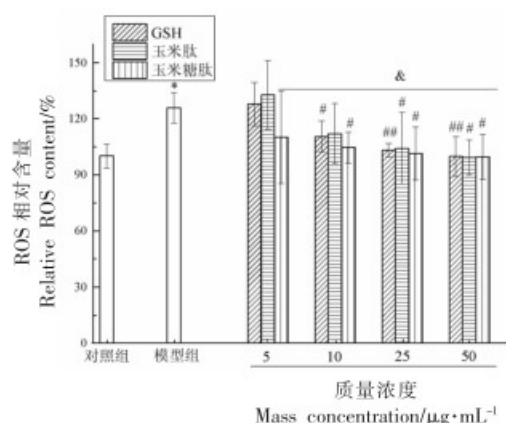


图 10 玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞内 ROS 含量的影响

Fig.10 Effects of corn glycopeptide on the ROS content in alcohol-induced LO2 cells

2.3.7 玉米糖肽对酒精诱导的 LO2 细胞凋亡的影响 目前,肝损伤伴随着细胞凋亡的观点已被广泛接受,细胞凋亡在酒精性肝病进展中起关键作用^[24-25]。因此,抑制细胞凋亡可以减慢甚至逆转酒精性肝病的发展。选择 50 $\mu\text{g/mL}$ 玉米糖肽预处理 LO2 细胞,用 500 mmol/L 酒精诱导 LO2 细胞损伤,通过 Annexin V-FITC/PI 双重染色后用流式细胞仪测定细胞凋亡情况,结果如图 11 所示。

如图 11 所示,与对照组相比,添加 500 mmol/L

酒精导致早期凋亡细胞和死亡细胞的百分比大大增加。研究表明,大多数形式的细胞凋亡是通过 ROS 诱导线粒体膜破坏触发的^[26],结合 2.3.5 节的试验结果,酒精诱导的 ROS 过量产生及线粒体损伤是 LO2 细胞凋亡的诱发因素。与酒精组相比,剂量为 50 $\mu\text{g/mL}$ 玉米糖肽、玉米肽和 GSH 的干预均能显著抑制早期细胞凋亡,且抑制效果的顺序为玉米糖肽>玉米肽>GSH,说明玉米糖肽表现出良好的抗酒精诱导细胞凋亡的效果,也说明其保护肝脏的活性与抑制肝细胞凋亡密切相关。

研究表明,玉米肽可以通过其抗氧化活性逆转与细胞凋亡相关的蛋白质表达(如 Bax、Caspase-3 等)而拮抗肝细胞的凋亡^[27-29]。D-氨基葡萄糖的共价结合改善了玉米肽的生物活性,因此,玉米糖肽也可能是通过逆转与细胞凋亡相关的蛋白质表达而拮抗 LO2 细胞的凋亡。另外,结合 2.3.3 节的试验结果,玉米糖肽还可以通过增加 ALDH 活力而减少乙醛的生成,进而抑制由乙醛介导的肝细胞凋亡途径。

综合以上分析,玉米糖肽对酒精诱导损伤的 LO2 细胞的保护作用,是其促进酒精代谢、增强抗氧化活力以及抑制肝细胞凋亡的综合效果,也正是这种多途径的综合效果,使玉米糖肽的保护效果优于阳性对照 GSH。

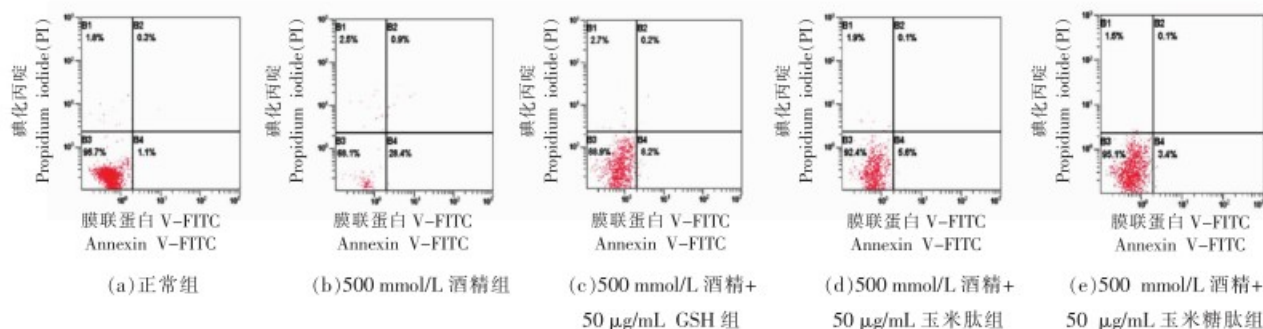


图 11 玉米糖肽对酒精诱导的 LO2 细胞凋亡情况的影响

Fig.11 The effect of corn glycopeptide on the LO2 cells apoptosis induced by alcohol

3 结论

为了研究开发拮抗酒精性肝损伤的天然、低毒副作用、多途径的肝保护剂,本试验通过构建 LO2 细胞酒精性损伤模型,在细胞水平上研究了玉米糖肽干预对损伤 LO2 细胞的保护效应。研究

结果发现 50 $\mu\text{g/mL}$ 玉米糖肽的干预对酒精诱导损伤的 LO2 细胞具有保护作用,是其促进酒精代谢、增强抗氧化活力以及抑制肝细胞凋亡的综合效果。在此基础上,可以采用分子生物学及蛋白质组学方法深入研究玉米糖肽拮抗酒精性肝细胞损

伤的分子机制。综上,玉米糖肽可能作为一种潜在的功能性食品或膳食补充剂来保护酒精性肝损伤。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global status report on alcohol and health [EB/OL]. Geneva (Switzerland): World Health Organization, (2018-09)[2021-08-05]. <https://www.drugsandalcohol.ie/15735/>.
- [2] ZHAO R J, HUO C Y, QIAN Y, et al. Ultra-high-pressure processing improves proteolysis and release of bioactive peptides with activation activities on alcohol metabolic enzymes *in vitro* from mushroom foot protein[J]. Food Chemistry, 2017, 231: 25-32.
- [3] LU C, XU W, ZHANG F, et al. Ligustrazine prevents alcohol-induced liver injury by attenuating hepatic steatosis and oxidative stress[J]. International Immunopharmacology, 2015, 29: 613-621.
- [4] DAI W O, CHEN C, FENG H T, et al. Protection of *Ficus pandurata* Hance against acute alcohol-induced liver damage in mice via suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 275: 114140.
- [5] THAWLEY V. Acute liver injury and failure[J]. Veterinary Clinics of North America -Small Animal Practice, 2017, 47: 617-630.
- [6] HWANG J M, TSENG T H, TSAI Y Y, et al. Protective effects of baicalein on tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rat hepatocytes[J]. Journal of Biomedical Science, 2005, 12: 389-397.
- [7] BHANDARKAR M R, KHAN A. Antihepatotoxic effect of *Nymphaea stellata* willd., against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 91: 61-64.
- [8] WU Y L, HUANG S H, HE C M, et al. Dendrobium officinale flower extraction mitigates alcohol-induced liver injury in mice; Role of antisteatosis, antioxidative, and anti-inflammatory [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2020, 6: 1-12.
- [9] 王晓杰, 刘晓兰, 丛万锁, 等. 玉米六肽的酶法糖基化修饰对产物生物活性的影响[J]. 中国酿造, 2018, 37(3): 78-83.
- [10] WANG X J, LIU X L, CONG W S, et al. Effect of transglutaminase catalyzed glycosylation reaction on the biological activity of corn hexapeptide [J]. China Brewing, 2018, 37(3): 78-83.
- [11] 王晓杰, 刘晓兰, 石彦国. 玉米肽的酶法糖基化修饰及产物溶解性的研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(11): 70-74.
- [12] WANG X J, LIU X L, SHI Y G. Enzymatic glycosylation of corn peptide and solubility of glycosylated product[J]. China Oils and Fats, 2019, 44(11): 70-74.
- [13] LI J T, ZHANG J L, HE H, et al. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 51: 297-305.
- [14] WANG L Y, DING L, YU Z P, et al. Intracellular ROS scavenging and antioxidant enzyme regulating capacities of corn gluten meal-derived antioxidant peptides in HepG2 cells[J]. Food Research International, 2016, 90: 33-41.
- [15] LEE J, YANG J, JEON J, et al. Hepatoprotective effect of esculetin on ethanol-induced liver injury in human HepG2 cells and C57BL/6J mice[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 536-543.
- [16] CERMEÑO M, FITZGERALD R J, O'BRIEN N M. *In vitro* antioxidant and immunomodulatory activity of transglutaminase-treated sodium caseinate hydrolysates[J]. International Dairy Journal, 2016, 63: 107-114.
- [17] PARI L, SURESH A. Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(5): 1627-1634.
- [18] BI Y S, JIA Y H, LIU T Q, et al. Effects of compound puerariae tablets on liver function and ultrastructure of aging model rats [J]. Pharm J Chin People's Lib Army, 2018, 34: 230-235.
- [19] REN X Y, WANG M Y, CAO Y, et al. Functional

- properties of corn germ meal protein[J]. Food Science and Technology, 2014, 39(6): 187–192.
- [19] LIANG H W, YANG T Y, TENG C S, et al. Mulberry leaves extract ameliorates alcohol-induced liver damages through reduction of acetaldehyde toxicity and inhibition of apoptosis caused by oxidative stress signals [J]. International Journal of Medical Sciences, 2021, 18(1): 53–64.
- [20] HERLUF I D, THIEDEN N G, DAMGAARD S E, et al. Effect of fructose and glyceraldehyde on ethanol metabolism in human liver and in rat liver [J]. European Journal of Biochemistry, 1972, 30: 250–261.
- [21] ZHAO R J, HUO C Y, QIAN Y, et al. Ultra-high-pressure processing improves proteolysis and release of bioactive peptides with activation activities on alcohol metabolic enzymes *in vitro* from mushroom foot protein[J]. Food Chemistry, 2017, 231: 25–32.
- [22] YAMAGUCHI M, TAKADA M, NOZAKI O, et al. Preparation of corn peptide from corn gluten meal and its administration effect on alcohol metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1996, 42: 219–231.
- [23] 于亚莉, 宋雪梅, 关玉, 等. 玉米肽 Tyr-Phe-Cys-Leu-Thr 对酒精性 HepG2 细胞的保护作用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 43–52.
- YU Y L, SONG X M, GUAN Y, et al. Protective effect of corn peptide Tyr-Phe-Cys-Leu-Thr on alcoholic HepG2 cells[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(5): 43–52.
- [24] WANG S G, PACHER P, DE LISLE R C, et al. A mechanistic review of cell death in alcohol-induced liver injury[J]. Alcoholism-Clinical and Experimental Research, 2016, 40(6): 1215–1223.
- [25] ZHANG Y F, BU F T, YIN N N, et al. NLRP12 negatively regulates EtOH-induced liver macrophage activation via NF- κ B pathway and mediates hepatocyte apoptosis in alcoholic liver injury[J]. International Immunopharmacology, 2020, 88: 106968.
- [26] PESSAYRE D, FROMENTY B, BERSON A, et al. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury[J]. Drug Metabolism Reviews, 2012, 44(1): 34–87.
- [27] 马芝丽. 玉米肽对酒精致肝细胞凋亡干预分子机制及 QLLPF 的代谢、醒酒构效关系研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- MA Z L. Mechanism of corn peptides on hepatocyte apoptosis induced by ethanol, metabolism and structure-activity relationship of QLLPF[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [28] MA Z L, HOU T, SHI W, et al. Inhibition of hepatocyte apoptosis: An important mechanism of corn peptides attenuating liver injury induced by ethanol [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(9): 22062–22080.
- [29] 刘雪娇. 玉米低聚肽保肝作用的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- LIU X J. Study of corn oligopeptide on hepatoprotective effect[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016.

Protective Effect of Corn Glycopeptide against Alcohol-induced LO2 Cells Injury

Wang Xiaojie, Tong Ling, Liu Xiaolan

(Heilongjiang Key Laboratory of Corn Deep Processing Theory and Technology, College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang)

Abstract In the present work, the protective effect of corn glycopeptide intervention on alcohol-induced injury of LO2 cells was studied, and the possible mechanism of corn glycopeptide antagonizing alcoholic liver cell injury was investigated. The results show that compared with the alcohol model group, corn glycopeptide at 50 μ g/mL remarkably increased the activities of alcohol metabolism enzymes (ADH and ALDH) and antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) as well as GSH content, decreased ROS and MDA levels in damaged LO2 cells. These results suggested that corn glycopeptide could enhance cytomembrane structural integrity by promoting alcohol metabolism and enhancing antioxidant activities, prevent the leakage of liver enzymes (AST, ALT and LDH) and reduce the percentage of early apoptosis and death of LO2 cells to achieve the effect of protecting the LO2 cells induced injury by alcohol.

Keywords transglutaminase; corn glycopeptide; LO2 cells; alcohol metabolism enzymes; apoptosis