

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250218006

引用格式: 林思敏, 施丽丹, 占洪斌. 川芎茶对 2,2'-盐酸脘基丙烷诱发 LLC-PK1 细胞氧化应激的保护作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(15): 232–238.

LIN SM, SHI LD, ZHAN HB. Protective effects of Chuanxiong tea on oxidative stress induced by 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride in LLC-PK1 cells [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(15): 232–238. (in Chinese with English abstract).

川芎茶对 2,2'-盐酸脘基丙烷诱发 LLC-PK1 细胞氧化应激的保护作用

林思敏, 施丽丹, 占洪斌*

[宁德师范学院附属宁德市医院, 宁德 355001]

摘要: **目的** 探讨川芎茶的乙醇提取物对由 2,2'-盐酸脘基丙烷[2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH, 1 mmol/L]诱导产生的 LLC-PK1 猪肾近端小管上皮细胞氧化应激损伤的保护效果。**方法** 将 LLC-PK1 细胞与不同质量浓度范围(10~100 $\mu\text{g/mL}$)的川芎茶乙醇提取物(记作 CXTEE)共培养 24 h 后, 再将其置于含有 AAPH 的杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)中继续培养 4 h 以建立细胞受损模型。通过四甲基偶氮唑蓝(tetramethyl azazole blue, MTT)法检测细胞存活率; 利用硫代巴比妥酸比色分析法和 2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(2',7'-dihydrodichlorofluorescein yellow diacetate, DCFH-DA)探针技术分别测定细胞内丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及总活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 此外, 还采用特定试剂盒评估了包括过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS)在内的多种抗氧化酶活性以及谷胱甘肽(glutathione, GSH)的浓度。**结果** 经过 CXTEE 预处理后的细胞表现出更高的存活率, 并且细胞内的总 ROS 水平与 MDA 生成量显著降低。同时, 该提取物还能增强受损细胞中的抗氧化酶活性(如 CAT、SOD、GSH-Px 和 GST), 并促进 γ -GCS 活性及提高 GSH 含量。进一步的实验显示 CXTEE 还可以上调氧化损伤 LLC-PK1 细胞中 SOD、GSH-Px 和 CAT 的 mRNA 表达水平。**结论** 川芎茶乙醇提取物可能通过强化细胞自身的抗氧化防御系统来减少 MDA 和 ROS 水平, 从而减轻 AAPH 对 LLC-PK1 细胞造成的氧化应激损伤。本研究可为川芎茶的进一步应用开发提供依据。

关键词: 川芎茶; 氧化损伤; 抗氧化; LLC-PK1 细胞; mRNA 表达

Protective effects of Chuanxiong tea on oxidative stress induced by 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride in LLC-PK1 cells

LIN Si-Min, SHI Li-Dan, ZHAN Hong-Bin*

[Ningde Hospital Affiliated to Ningde Normal University, Ningde 355001, China]

收稿日期: 2025-02-18

第一作者: 林思敏(1995—), 女, 医师, 主要研究方向为肾脏医学。E-mail: lin_sim@163.com

*通信作者: 占洪斌(1989—), 男, 硕士, 主治医师, 主要研究方向为肾脏医学。E-mail: 595521616@qq.com

ABSTRACT: Objective To investigate the protective effects of ethanol extract of Chuangxiong tea on the 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) (1 mmol/L) on oxidative stress injury of proximal renal tubule epithelial cells of pigs. **Methods** LLC-PK1 cells were co-cultured with ethanol extract of Chuangxiong tea (labeled CXTEE) with different mass concentrations ranging from 10 to 100 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h, and then placed in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing AAPH for 4 h to establish the cell damage model. The cell survival rate was measured by tetramethyl azazole blue (MTT) method. The content of malondialdehyde (MDA) and the level of total reactive oxygen species (ROS) were determined by thiobarbituric acid colorimetry and 2',7'-dihydrodichlorofluorescein yellow diacetate (DCFH-DA) probe technique, respectively. In addition, the activity of several antioxidant enzymes, including catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST), γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), and the concentration of glutathione (GSH), were also evaluated using specific kits. **Results** The results showed that the cells pretreated with CXTEE showed a higher survival rate, and the total ROS level and MDA production in the cells were significantly reduced. At the same time, the extract also enhanced the activity of antioxidant enzymes (such as CAT, SOD, GSH-Px and GST) in the damaged cells, promoted the activity of γ -GCS and increased the content of GSH. Further experiments showed that CXTEE could also up-regulate the mRNA expression levels of SOD, GSH-Px and CAT in oxidative damage LLC-PK1 cells. **Conclusion** The ethanol extract of Chuangxiong tea may reduce the levels of MDA and ROS by strengthening the antioxidant defense system of cells, thus alleviating the oxidative stress damage caused by AAPH to LLC-PK1 cells. This study can provide a basis for further application and development of Chuangxiong tea.

KEY WORDS: Chuangxiong tea; oxidative damage; antioxidation; LLC-PK1 cells; mRNA expression

0 引言

川芎茶是一种以川芎和茶叶为主要成分的药膳饮品,常被用作日常代茶饮品饮用,因其配方中还包括白芷、薄荷、防风、甘草、荆芥、羌活以及细辛等多种草本植物,适宜中老年人饮用^[1]。这种茶饮源于四川地区,其中所含有的川芎性质温和且味道辛辣,能够进入人体的肝经与胆经之中发挥作用。它具有调和血液、促进气流通及缓解因风热引起的头痛症状等功效,在调节相关病症时也被作为日常保健饮品配合药物治疗进行广泛应用^[2-3]。研究显示川芎茶中含有橙皮苷和蒙花苷等黄酮类物质,黄酮类物质具有很好的抗氧化效果,川芎茶也因此可能具有较好的抗氧化效果^[4]。

在生物体执行有氧呼吸过程中,会自然生成一系列生理代谢副产物,如超氧阴离子(O_2^-)、过氧根离子(O_2^{2-})、羟自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2)以及有机过氧自由基($\text{ROO}\cdot$)和脂过氧自由基($\text{LOO}\cdot$),这些物质统称为活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[5-6]。普遍认为,当体内或特定组织中 ROS 积累过多时,可能会引发细胞或组织的氧化应激反应,并进一步导致疾病的发生^[7]。对于某些慢性肾病来说,由于肾脏内抗氧化酶水平相对较低,过量的 ROS 不仅能够促进多不饱和脂肪酸的脂质过氧化,还会造成蛋白质与 DNA 等生物大分子结构的变化,从而对肾小管上

皮细胞产生氧化损伤,最终可能导致整个肾脏组织的坏死^[8-9]。因此,ROS 被认为是引起慢性肾病的重要因素之一。在中国悠久的饮食文化里,茶叶饮品因其独特的风味及营养价值而被认为具有一定的保健效果,这类食物通常富含抗氧化成分,具备良好的抗氧化性能。适量食用这类食品有助于增强机体的抗氧化防御系统,减轻氧化应激对身体各部位特别是关键器官带来的负面影响,进而预防相关疾病^[10-12]。为了探讨川芎茶干预抗氧化应激反应造成生理损伤的作用及分子机制,本研究利用 2,2'-盐酸脒基丙烷 [2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, AAPH] 建立 LLC-PK1 细胞氧化应激损伤,通过细胞模型进行体外验证,旨在为川芎茶应用于预防氧化应激所致肾脏疾病的理论基础提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

川芎茶(泽群中药饮片有限公司); LLC-PK1 猪肾近曲小管上皮细胞系(厦门逸漠生物科技有限公司)。

AAPH、四甲基偶氮唑蓝(tetramethyl azazole blue, MTT)、2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(2',7'-dihydrodichlorofluorescein yellow diacetate, DCFH-DA)、青链霉素双抗(美国默克生命科学公司); 杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清、Trizol、OligodT18、核

糖核酸酶(ribonuclease, RNase)、脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)、鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MLV)逆转录酶(美国赛默飞世尔科技有限公司);羧基-X-罗丹明(carboxy-X-rhodamine, ROX)参考染料、SYBR Premix Ex Taq II(日本 TAKARA 公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(北京索莱宝公司)。

1.2 仪器与设备

ELx808 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);3111 二氧化碳细胞培养箱、Quant StudioTM 6 Flex PCR 仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);AUW120D 天平(感量为 0.1 mg, 日本岛津公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 川芎茶的提取

将大约 100 mg 的冷冻干燥川芎茶样本与 80% (V:V) 乙醇溶液按照质量比 1:9 混合,在室温条件下搅拌过夜以完成提取过程,随后通过抽滤分离固体和液体部分,此步骤重复 3 次,并将所有收集到的滤液合并。对合并后的滤液进行 3600 r/min、持续 15 min 的离心处理,去除沉淀物后保留上清液。之后,在 50 °C 下利用减压旋转蒸发技术浓缩上清液,最终制得川芎茶的乙醇提取物(记作 CXTEE)。CXTEE 被溶解于 DMSO 中,配制成质量浓度为 20 mg/mL 的储备溶液,并在 -80 °C 条件下保存备用。

1.3.2 细胞培养及分组

在含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素双抗溶液的 DMEM 培养基中,LLC-PK1 细胞被置于 37 °C、5% CO₂ 湿度条件下进行培养,并且每隔 2 d 更换一次培养液。实验过程中,将这些细胞以每孔 1×10^4 个和 2×10^5 个的数量分别接种到 96 孔板与 6 孔板上。通过向培养基中添加 1 mmol/L AAPH 并继续培养 4 h 的方式,构建氧化应激损伤模型。之后,从该模型中取出的细胞再次以每孔 1×10^4 个细胞、每孔 100 μ L 的量接种至新的 96 孔板,并使用不同质量浓度(分别为 10、50 和 100 μ g/mL)的 CXTEE 处理 24 h 后进行后续研究。此外,未经过任何干预措施处理的正常 LLC-PK1 细胞则作为对照组^[13]。

1.3.3 MTT 法测定细胞存活率

首先,将 LLC-PK1 细胞按照先前确定的分组条件进行处理,并在接下来的 24 h 内持续培养。之后,去除原有的培养基,向每个孔中加入终质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液(体积为 100 μ L),再继续培养 4 h。完成此步骤后,

吸除上清液,每孔内添加 DMSO(同样为 100 μ L)并在避光条件下摇晃 30 min。最后,通过测量 490 nm 处的吸光度值,并依据公式(1)来计算细胞存活率^[13]。

$$\text{细胞存活率}/\% = \text{OD}_{\text{样品处理组}}/\text{OD}_{\text{对照组}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.4 细胞内丙二醛生成量的测定

完成上述处理步骤之后,采用硫代巴比妥酸比色法来评估细胞内丙二醛(malondialdehyde, MDA)的生成量^[8]。首先,所有细胞均需经过冷 PBS 的洗涤处理。随后,利用细胞刮刀收集这些细胞,并将其置入已预冷的细胞裂解液中完成裂解过程。在 5 mL 容量的玻璃试管内,依次加入 500 μ L 的细胞裂解上清液和 400 μ L 由 15% 三氯乙酸与 0.67% 硫代巴比妥酸组成的混合溶液,充分混匀后置于 95 °C 水浴中加热 20 min。待样品冷却至室温后,向其中添加 3 mL 异丙醇用于色素的提取,最后测量其在 532 nm 波长处的吸光度值。此外,通过 Bio-Rad 蛋白质试剂盒确定细胞总蛋白含量。最后,依据公式(2)计算出 MDA 的具体生成量。

$$\text{MDA 生成量}/(\text{ng}/\text{mg prot}) = \text{MDA 含量}/(\text{ng}/\text{mL}) \times 1.5 \text{ mL} / \text{总蛋白质含量}/\text{mg} \quad (2)$$

1.3.5 细胞内 ROS 生成量的测定

依据 1.3.2 节中介绍的方法处理 6 孔细胞培养板内的细胞后,加入含有 20 μ mol/L DCFH-DA 的 DMEM 培养基,并在 37 °C 下培养 20 min。之后,用冷 PBS 缓冲液清洗细胞两次。然后,在 485 nm 和 530 nm 的波长下测定荧光强度,并根据公式(3)计算相对 ROS 水平。

$$\text{相对 ROS 含量}/\% = \text{荧光强度}_{\text{样品处理组}}/\text{荧光强度}_{\text{对照组}} \times 100\% \quad (3)$$

1.3.6 细胞内部抗氧化酶活性、GSH 水平及 γ -GCS 活性的检测

首先,将细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,并按照 1.3.2 节所述的方法进行处理。完成处理后,依据 SOD、GSH、CAT、GSH-Px 和 γ -GCS 测定试剂盒相应说明书中的操作步骤完成检测。所有测量结果均需根据细胞总蛋白量进行校正。

1.3.7 实时荧光定量聚合酶链式反应技术探究 LLC-PK1 细胞中相关基因表达水平

按照 Trizol 试剂的操作指南,从待测细胞中提取总 RNA,并通过紫外光谱法对其纯度进行了测定。随后,将各组样品中的总 RNA 浓度统一调整至一致水平。对于每组样本,均选取等量的 2 μ g RNA 加入到含有 1 μ L OligodT18、1 μ L RNase、1 μ L dNTP 以及 1 μ L MLV 逆转录酶和 10 μ L 5 \times Buffer 的无菌聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)管内,在 37 °C 下反应 120 min,接着在 99 °C 处理 4 min 后,最后于 4 °C 维持 3 min 以完成 cDNA 的合成过程。采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术来检测抗氧化酶 CAT、GSH-Px 与 SOD

的表达水平。每个 qRT-PCR 反应体系(总体积 20 μL)包含 2 μL cDNA 模板、各 1 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物、10 μL SYBR Premix Ex Taq II (2 \times)、0.4 μL ROX reference Dye (50 \times), 并补充 5.6 μL 灭菌双蒸水至最终体积。充分混合后, 将上述溶液置于 QuantStudioTM 6 Flex PCR 仪中执行扩增程序。该程序设定如下: 首先 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 然后进入循环阶段, 其中包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s、55~59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 此循环共重复 40 次。对每个基因的 cDNA 样本进行 3 次平行扩增, 根据平均 Ct 值评估目标基因的相对表达量^[14]。

1.4 数据处理

每项实验均独立进行 3 次, 所得数据以平均值 \pm 标准偏差的形式呈现。本研究采用 SPSS 19.0 软件进行数据的统计处理, 并通过 Duncan's 检验执行了多重比较分析, 将 $P < 0.05$ 作为判断显著性差异的标准。

2 结果与分析

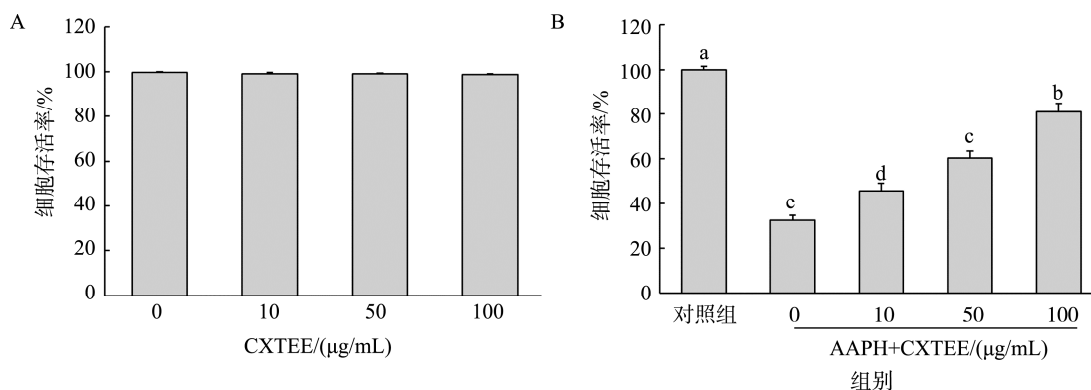
2.1 CXTEE 对 LLC-PK1 细胞增殖的影响

如图 1 所示, 质量浓度分别为 10、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 CXTEE 作用在 LLC-PK1 细胞后, 细胞的存活率均超过

90%。实验结果表明 CXTEE 对体外培养的 LLC-PK1 细胞没有表现出显著的毒性作用。基于此, 在后续实验中选取了 10、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 作为安全浓度进行研究, 以确保不会影响细胞活性。此外, 与未经处理的正常培养 LLC-PK1 细胞组(对照组)相比, 当细胞被 AAPH 直接作用 4 h 后, LLC-PK1 细胞的生存率显著下降($P < 0.05$)。然而, 如果先用不同浓度的 CXTEE 预处理 24 h, 则可以观察到受损细胞的存活率有所提高, 并且这种保护效应随着 CXTEE 浓度的增加而增强, 显示出明显的剂量依赖性差异($P < 0.05$)。

2.2 CXTEE 对受损 LLC-PK1 细胞中 MDA 生成量及 ROS 水平的影响

相比未受处理的对照组, 在被 AAPH 作用诱导氧化应激后, LLC-PK1 细胞中的 MDA 水平显著提升($P < 0.05$)。但是在 10、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的 CXTEE 干预下, 诱导氧化应激损伤 LLC-PK1 细胞内的 MDA 水平则显著下降($P < 0.05$); 尤其当使用最高质量浓度即 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, MDA 生成量达到最低点(图 2A)。此外, AAPH 还导致了 LLC-PK1 细胞内的 ROS 水平大幅上升。但经过 24 h 的不同质量浓度 (10、50、100 $\mu\text{g/mL}$) CXTEE 预处理后, 发现受损细胞中 ROS



注: 不同小写字母标记代表各组之间存在显著性差异($P < 0.05$), 下同。

图 1 CXTEE 对 LLC-PK1 细胞存活率的作用(A)以及在 AAPH 处理条件下对细胞的保护效果(B)

Fig.1 Effects of CXTEE on the survival rate of LLC-PK1 cells (A) and the protective effects of CXTEE on cells under AAPH treatment (B)

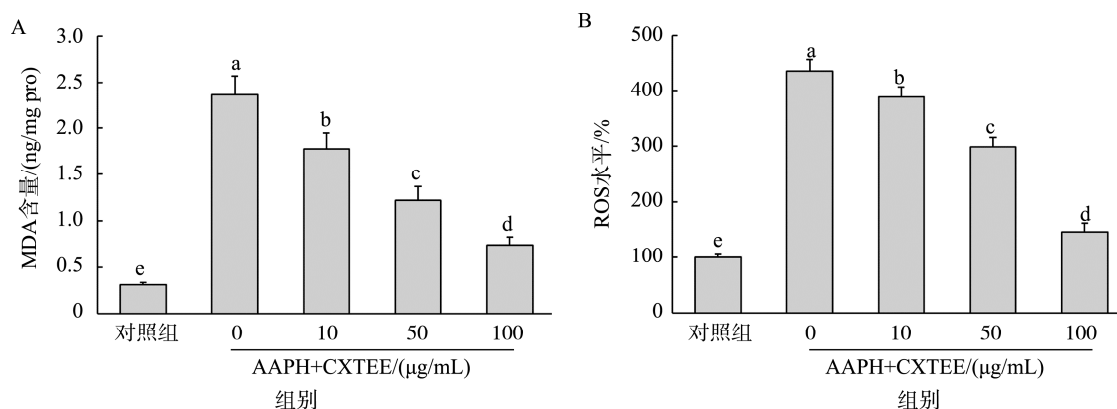


图 2 CXTEE 对由 1 mmol/L AAPH 引起的 LLC-PK1 细胞内 MDA 含量(A)及 ROS 水平(B)变化的影响

Fig.2 Effects of CXTEE on MDA content (A) and ROS level (B) in LLC-PK1 cells induced by 1 mmol/L AAPH

水平呈现逐渐减少的趋势,并且与仅接受 AAPH 处理的模型组(0 $\mu\text{g/mL}$ CXTEE 组)相比存在显著差异($P<0.05$)。值得注意的是,在 100 $\mu\text{g/mL}$ 这一最高测试浓度下, CXTEE 表现出最强的抑制 ROS 产生的效果(图 2B)。由此可以看出, CXTEE 在体外细胞层面,展示出对氧化应激损伤的抑制作用,对氧化应激损伤的标志性物质 MDA 和 ROS 有显著影响。

2.3 CXTEE 对受损 LLC-PK1 细胞中 CAT、SOD、GSH-Px 及 GST 活性的影响

如表 1 所示, AAPH 诱导氧化应激后, LLC-PK1 细胞的 CAT、GSH-Px、SOD 和 GST 抗氧化酶的活性出现下降的趋势。然而,当这些细胞预先接受了不同质量浓度(10、50、100 $\mu\text{g/mL}$)的川芎茶乙醇提取物处理 24 h 后,观察到抗氧化酶活性有所恢复,与未接受该提取物处理的损伤模型组(0 $\mu\text{g/mL}$ CXTEE 组)相比,差异具有统计学意义($P<0.05$)。实验结果显示 CXTEE 对 LLC-PK1 细胞的抗氧化酶有显著的提升作用,由此提示 CXTEE 具有通过调控细胞中抗氧化酶活力起到抗氧化效果的作用。

2.4 CXTEE 对 LLC-PK1 细胞中 γ -GCS 活性及 GSH 水平的影响

AAPH 处理不仅显著抑制了细胞内 γ -GCS 的活性,还导致 GSH 合成量下降(图 3)。然而,在使用 CXTEE(质

量浓度范围为 10~100 $\mu\text{g/mL}$)作用在 LLC-PK1 细胞中后,氧化应激损伤细胞的 γ -GCS 酶活性出现提升的现象。同时,氧化应激损伤细胞的 GSH 含量也出现相同趋势并呈现出上升的现象。与未经 CXTEE 处理组相比, CXTEE 对受损 LLC-PK1 细胞中 γ -GCS 酶活性及 GSH 水平的影响具有统计学意义($P<0.05$)。实验结果显示 CXTEE 可能特异性地对细胞中 GSH 水平及其合成酶具有调控作用,从而起到抗氧化效果。

2.5 CXTEE 对 LLC-PK1 细胞内氧化相关基因表达水平的影响

采用 qRT-PCR 技术进行分析的结果表明, 1 mmol/L AAPH 能够导致 LLC-PK1 细胞中 SOD、GSH-Px 及 CAT 这 3 种关键内源性抗氧化酶的 mRNA 表达量下降(图 4)。然而,经过 CXTEE 预处理之后,这些受损细胞内相关基因的表达水平逐渐恢复。与未经 CXTEE 处理组(0 $\mu\text{g/mL}$ CXTEE 组)相比, 10~100 $\mu\text{g/mL}$ CXTEE 显著提升了 SOD、GSH-Px 和 CAT 在受损 LLC-PK1 细胞中的表达量($P<0.05$),显示出其对改善细胞抗氧化状态的有效干预作用。进一步的 mRNA 表达也验证出 CXTEE 对抗氧化酶具有调控作用,结合试剂盒检测结果可以认为 CXTEE 通过提升抗氧化酶活力抑制 LLC-PK1 细胞氧化损伤是 CXTEE 作用的重要机制。

表 1 CXTEE 对 AAPH 诱导的 LLC-PK1 细胞中 CAT、SOD、GSH-Px 及 GST 活性的影响
Table 1 Effects of CXTEE on the activities of CAT, SOD, GSH-Px and GST in LLC-PK1 cells induced by AAPH

组别	质量浓度($\mu\text{g/mL}$)	CAT 活力/(U/mg prot)	SOD 活力/(U/mg prot)	GSH-Px 活力/(U/mg prot)	GST 活力/(U/mg prot)
正常组	/	2.02 \pm 0.21 ^a	5.52 \pm 0.37 ^a	3.66 \pm 0.26 ^a	1.02 \pm 0.12 ^a
CXTEE	0	0.65 \pm 0.07 ^c	1.51 \pm 0.20 ^c	1.31 \pm 0.14 ^c	0.33 \pm 0.04 ^c
	10	0.89 \pm 0.08 ^d	2.66 \pm 0.26 ^d	1.93 \pm 0.16 ^d	0.49 \pm 0.04 ^d
	50	1.26 \pm 0.16 ^c	3.12 \pm 0.23 ^c	2.32 \pm 0.18 ^c	0.65 \pm 0.07 ^c
	100	1.63 \pm 0.15 ^b	4.33 \pm 0.32 ^b	2.89 \pm 0.21 ^b	0.83 \pm 0.05 ^b

注: /表示无此项, 同列中不同小写字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

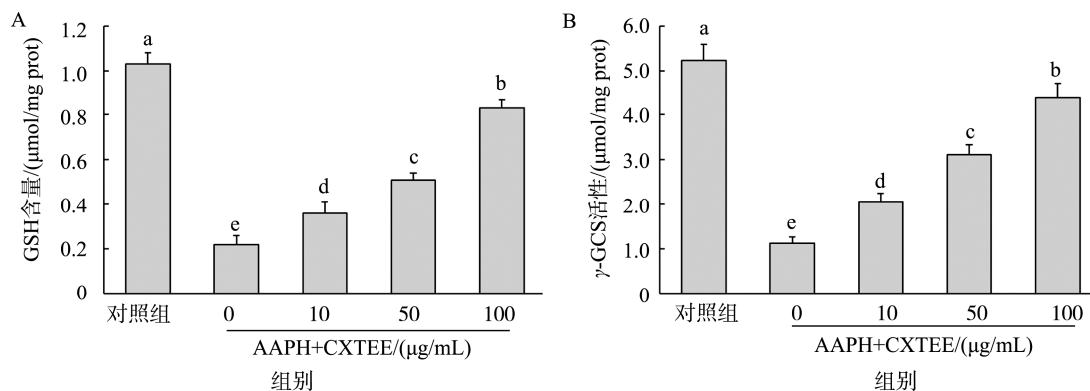


图 3 CXTEE 对由 1 mmol/L AAPH 诱导损伤的 LLC-PK1 细胞内 GSH 含量(A)及 γ -GCS 活性(B)的影响
Fig.3 Effects of CXTEE on GSH content (A) and γ -GCS activity (B) in LLC-PK1 cells damaged by 1 mmol/L AAPH

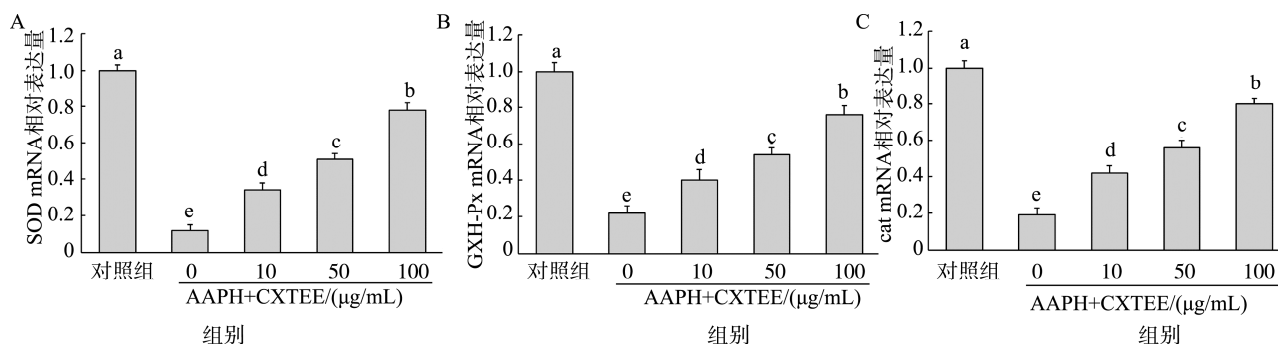


图 4 CXTEE 对 LLC-PK1 细胞中 SOD (A)、GSH-Px (B) 和 CAT (C) 基因表达水平的影响
Fig.4 Effects of CXTEE on SOD (A), GSH-Px (B) and CAT (C) gene expression in LLC-PK1 cells

3 讨论与结论

在生物体内, ROS 的过量积累被认为是多种慢性疾病发病机制中的关键因素之一。作为一类重要的自由基来源, 偶氮化合物 AAPH 能够自发产生过氧化自由基^[15]。这些过氧化自由基能够损伤细胞内的关键生物大分子, 如 DNA、蛋白质及脂质, 从而引发细胞凋亡^[16]。研究显示, 在 1 mmol/L AAPH 条件下暴露后, LLC-PK1 细胞的存活率显著下降; 但若先用不同浓度的川芎茶乙醇提取物处理 24 h, 则与未经该提取物预处理的受损细胞相比, 其生存能力有明显增强 ($P < 0.05$)。此外, 体内过度生成或累积的 ROS 还能促使细胞膜发生生理变化, 细胞膜内的不饱和脂肪酸发生变性, 产生脂质过氧化反应的有害产物, 从而影响细胞的正常生理活动^[17-18]。所以 MDA 作为脂质过氧化反应的常见产物, 在生理检测中被用于评价氧化应激损伤的重要指标^[19]。对于受到损伤的 LLC-PK1 细胞而言, 预先使用川芎茶乙醇提取物进行干预可以减少细胞内总 ROS 水平及 MDA 含量。这可能归因于川芎茶中富含具有强大抗氧化性能的苯酚类化合物, 比如藜本内酯^[20]。现有研究表明, 给予适量的抗氧化剂可以帮助减轻由 ROS 引起的肾细胞脂质过氧化情况, 并有助于预防肾细胞遭受氧化应激伤害^[21]。

在机体和细胞正常生理状态下, 生物体内的包括 CAT、SOD、GSH-Px 和 GST 等抗氧化酶和 GSH 等非酶型抗氧化剂能够清除氧化应激产生的自由基有害产物, 保持机体和细胞的氧化平衡^[22]。这些不同的抗氧化剂作用机制有区别, SOD 将过量超氧阴离子转化为过氧化氢, CAT 和 GSH-Px 则能够将过氧化氢分解无害的水^[23]。GSH-Px 则可以利用 GSH 作为还原剂转化过氧化氢和烷基过氧化物, 还可以将有机氢过氧化物还原成较安全的羟基化合物。GST 可以参与辅助 GSH-Px 清除过多有机氢过氧化物^[24]。本研究的结果显示在不同浓度的川芎茶乙醇提取物预处理后, 受损细胞中主要包括 SOD 在内的抗氧化酶活性显著增强, 同时非酶抗氧化物质的相应增多。可见川芎茶乙醇提取物可以提升抗氧化酶的活性从而保护 LLC-PK1 细胞免受氧

化应激损害, 同时还可以抑制脂质过氧化反应对细胞膜造成的生理破坏, 并减轻由此引起的附加细胞损伤^[25-27]。GSH 作为一种重要的非酶抗氧化剂可以通过 GSH-Px 干预脂质过氧化物和过氧化氢等有毒产物, 同时 GSH 还能够间接阻止自由基的链式反应, 从而保护细胞不受自由基侵害^[28-29]。 γ -GCS 作为调控 GSH 合成的关键酶, 对于提高 GSH 水平至关重要。实验还表明, 川芎茶能够上调受损 LLC-PK1 细胞中关键抗氧化酶表达水平。加强 CAT 和 GSH-Px 基因转录有助于激活细胞内超氧化物歧化酶, 从而缓解氧化应激造成的细胞损伤^[30-31]。本研究为探讨川芎茶乙醇提取物作为潜在抗氧化保健饮品提供了理论依据。但是由于本研究还仅限于体外细胞实验层面, 关于川芎茶如何在分子层面上发挥机制作用保护细胞免受氧化应激损伤还有待深入研究。

参考文献

- 王国有, 王云, 张雪, 等. 川芎茶调散的现代研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13): 228-234.
WANG GY, WANG Y, ZHANG X, *et al.* General situation of modern research of Chuanxiong chatiaoan [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(13): 228-234.
- 李青, 苏晶, 丁慧宁. UPLC-MS/MS 测定 3 种川芎茶调类制剂中马兜铃酸 I 的含量[J]. 中国现代中药, 2024, 26(8): 1312-1318.
LI Q, SU J, DING HN. Content determination of aristolochic acid I in three Chuanxiong Chatiao products by UPLC-MS/MS [J]. Modern Chinese Medicine, 2024, 26(8): 1312-1318.
- 刘铭, 姚帅君, 贺文彬, 等. 川芎茶调散与六经头痛片源流关系探讨[J]. 山西中医药大学学报, 2023, 24(3): 237-241.
LIU M, YAO SJ, HE WB, *et al.* Study on the relationship between Chuanxiong Chatiao powder and Lijiang headache tablet [J]. Journal of Shanxi university of Chinese Medicine, 2023, 24(3): 237-241.
- 赖志坚, 张津津, 林焕钊, 等. 基于指纹图谱及抗血小板聚集活性的川芎茶调散及其颗粒质量差异性分析[J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(9): 1420-1427.
LAI ZI, ZHANG JJ, LIN HZ, *et al.* Analysis on quality difference of Chuanxiong Chatiao San and Chuanxiong Chatiao Granules based on anti-platelet aggregation activity and fingerprint [J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2024, 35(9): 1420-1427.

- [5] NAGANNA CM, PRASAD KY, MAHENDRA VP, *et al.* Vanillic acid potentiates insulin secretion and prevents pancreatic β -cells cytotoxicity under H_2O_2 -induced oxidative stress [J]. *Molecular Biology Reports*, 2023, 50(2): 1311–1320.
- [6] OSERA C, AMADIO M, FALONE S, *et al.* Pre-exposure of neuroblastoma cell line to pulsed electromagnetic field prevents H_2O_2 -induced ROS production by increasing MnSOD activity [J]. *Bioelectromagnetics*, 2015, 36(3): 219–232.
- [7] TANG Z, CHEN Z, GUO M, *et al.* NRF2 deficiency promotes ferroptosis of astrocytes mediated by oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. *Molecular Neurobiology*, 2024, 61: 7517–7533.
- [8] YASUI H, SAKURAI H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269(1): 131–136.
- [9] HA H, LEE HB. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2005, S: 7–10.
- [10] ZHENG XQ, ZHANG XH, GAO HQ, *et al.* Green tea catechins and skin health [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(12): 1506.
- [11] CHIPOFYA E, DOCRAT TF, MARNEWICK JL, *et al.* The neuroprotective effect of rooibos herbal tea against Alzheimer's disease: A review [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2024, 69(1): e202400670.
- [12] SHAAALAN M, MAHBOUB HH, ABDELGAWAD AH, *et al.* Dietary tea tree (*Melaleuca aetheroleum*) oil fortifies growth, biochemical, immune-antioxidant trait, gene function, tissue reaction, and *Aeromonas sobria* resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *BMC Veterinary Research*, 2025, 21(1): 1–15.
- [13] 赵欣, 易若琨, 冯霞, 等. 韩国产芝麻酱油对 AAPH 诱发 LLC-PK1 细胞氧化应激的保护作用[J]. *食品科学*, 2017, 38(23): 213–218.
ZHAO X, YI RK, FENG X, *et al.* Protective effect of Korean sesame sauce on AAPH-induced oxidative stress in LLC-PK1 cells [J]. *Food Science*, 2017, 38(23): 213–218.
- [14] 张跃川, 王青龙, 李爽, 等. 实时荧光聚合酶链式反应法快速鉴定阪崎克罗诺杆菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2025, 16(1): 151–157.
ZHANG YC, WANG QL, LI S, *et al.* Rapid identification of *Cronobacter sakazaki* by real-time fluorescence polymerase chain reaction [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2025, 16(1): 151–157.
- [15] ANANTHAKRISHNA AB, HSIEH C, PALLAVI M, *et al.* Interactions of free radical initiators and antioxidants in erythrocytes: An *ex vivo* study [J]. *Cell and Tissue Biology*, 2023, 17: 256–264.
- [16] 刘文颖, 任杰, 吴晗硕, 等. 小麦抗氧化肽对人胚肾细胞氧化应激损伤的抑制作用及分子机制[J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 2024, 52(4): 33–41.
LIU WY, REN J, WU HS, *et al.* Inhibitory effects and molecular mechanism of wheat antioxidant peptides on oxidative stress injury in human embryonic kidney cells [J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2024, 52(4): 33–41.
- [17] ZHENG Y, SUN J, LUO Z, *et al.* Emerging mechanisms of lipid peroxidation in regulated cell death and its physiological implications [J]. *Cell Death & Disease*, 2024, 15(11): 859.
- [18] GUO Z, CHI R, PENG Y, *et al.* The role and interactive mechanism of endoplasmic reticulum stress and ferroptosis in musculoskeletal disorders [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(11): 1369.
- [19] GARGOURI B, AMOR IB, RAMMA Y, *et al.* Oxidative stress profile and auto-antibodies production in Tunisian patients with COVID-19 [J]. *Cytotechnology*, 2024, 77(1): 22.
- [20] TAKEUCHI K, OCHIAI K, KOBAYASHI M, *et al.* Light-chilling stress causes hyper-accumulation of iron in shoot, exacerbating leaf oxidative damage in cucumber [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2024, 65(11): 1873–1887.
- [21] WANG C, SALAHUDEEN AK. Cyclosporine nephrotoxicity: Attenuation by an antioxidant-inhibitor of lipid peroxidation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Transplantation*, 1994, 58(8): 940–946.
- [22] XUE H, CAO H, XING C, *et al.* Selenium triggers Nrf2-AMPK crosstalk to alleviate cadmium-induced autophagy in rabbit cerebrum [J]. *Toxicology*, 2021, 459: 152855.
- [23] QUASMI MN, KUMAR D, JANGRA A. Effects of dietary acrylamide on kidney and liver health: Molecular mechanisms and pharmacological implications [J]. *Toxicology Reports*, 2024, 14: 101859.
- [24] 耿慧武, 李清月, 龚治忠, 等. Pb^{2+} 对小鼠肝脏组织 GST 和 GSH-PX 酶活力及基因表达的影响[J]. *阜阳师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 37(4): 38–43.
GENG HW, LI QY, GONG ZZ, *et al.* Effects of Pb^{2+} on activity of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase and on expression of related genes in livers of mice [J]. *Journal of Fuyang Normal University (Natural Science)*, 2020, 37(4): 38–43.
- [25] BORKOVIĆ-MITIĆ S, MITIĆ B, VRANKOVIĆ JS, *et al.* Integrated biomarker response of oxidative stress parameters in the digestive glands and gills of autochthonous and invasive freshwater mussels from the Sava River, Serbia [J]. *Toxics*, 2024, 12(10): 756.
- [26] CIKMAN O, BULUT A, TAYSI S. Protective effect of propolis in protecting against radiation-induced oxidative stress in the liver as a distant organ [J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 21766.
- [27] NIU SQ, LI T, BAO XW, *et al.* Physiological and biochemical responses in a cadmium accumulator of traditional Chinese medicine *Ligusticum sinense* cv. Chuanxiong under cadmium condition [J]. *Stress Biology*, 2024, 4(1): 44.
- [28] SUPAWAT A, PALACHAI N, JITTIVAT J. Effect of galangin on oxidative stress, antioxidant defenses and mitochondrial dynamics in a rat model of focal cerebral ischemia [J]. *Biomedical Reports*, 2024, 22(1): 10.
- [29] KRISHNAMURTHY HK, PEREIRA M, RAJAVELU I, *et al.* Oxidative stress: Fundamentals and advances in quantification techniques [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2024, 12: 1470458.
- [30] CHEN X, ZHENG A, LI S, *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* regulates the Keap1/Nrf2 signaling pathway to improve the intestinal (Caco-2 cells and Chicken Jejunum) oxidative stress response induced by lipopolysaccharide (LPS) [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(12): 1550.
- [31] GONG X, TAN Z, XU H, *et al.* Paconiflorin attenuates oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease by activating the HSF1-NRF1 axis [J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2024, 52(7): 2131–2159.

(责任编辑: 于梦娇 安香玉)