

潘俊坤, 焦中高, 张强. EGCG 和异鼠李素的细胞抗氧化协同作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 12-18. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040160

PAN Junkun, JIAO Zhonggao, ZHANG Qiang. Synergistic Effect of EGCG and Isorhamnetin on Cellular Antioxidant Activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 12-18. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040160

· 特邀主编专栏—食源性功能物质挖掘与评价 (客座主编: 王颖、郭慧媛) ·

EGCG 和异鼠李素的细胞抗氧化协同作用

潘俊坤, 焦中高, 张强*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 河南郑州 450009)

摘要:目的: 探究不同比例的食源性类黄酮表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 和异鼠李素 (isorhamnetin) 细胞抗氧化协同效应, 为食源性类黄酮功能性食品的开发提供理论依据。方法: 采用 Chou-Talalay 联合指数法 (Combination Index, CI) 评价不同比例 EGCG 和异鼠李素组合对细胞抗氧化活性的影响。结果: EGCG 和异鼠李素 (6:4, c/c) 联合作用时, EC_{50} 值为 $5.01 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$, 联合作用指数 CI_{avg} 值为 0.76, 表现出较强的协同作用。进一步细胞抗氧化酶实验发现, 在 EGCG+异鼠李素 (1.5+1, 3+2 和 6+4 $\mu\text{g/mL}$) 浓度梯度下, 超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性相较于 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 [2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride solution, AAPH] 处理组分别提高了 5.2%、21.1% 和 49.1%; 谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性分别提高了 7.6%、27.8% 和 57.6%; 过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性分别提高了 5.6%、24.6% 和 42.1%。结论: EGCG 和异鼠李素组合细胞抗氧化的机制可能是通过上调内源性抗氧化酶的活性来提高细胞自身抗氧化能力, 从而达到平衡机体氧化应激反应的效果。

关键词: EGCG, 异鼠李素, 细胞抗氧化, 协同作用, 抗氧化酶

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)22-0012-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040160



本文网刊:

Synergistic Effect of EGCG and Isorhamnetin on Cellular Antioxidant Activity

PAN Junkun, JIAO Zhonggao, ZHANG Qiang*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China)

Abstract: Objective: To investigate the synergistic antioxidant effects of different ratios of EGCG (epigallocatechin gallate) and isorhamnetin combinations, and provide a theoretical basis for the development of food borne flavonoid functional foods. Methods: The cellular antioxidant activities (CAA) of EGCG and isorhamnetin combinations were estimated by Chou-Talalay combination Index (CI) method. Results: The median effective dose (EC_{50}) of EGCG and isorhamnetin combination (6:4, c/c) was $5.01 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ with the CI_{avg} value of 0.76, which represented significantly synergistic effects. Further experiments proved that the superoxide dismutase (SOD) activities of EGCG+isorhamnetin (1.5+1, 3+2, and 6+4 $\mu\text{g/mL}$) were increased by 5.2%, 21.1% and 49.1%. Glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were increased by 7.6%, 27.8% and 57.6%, and catalase (CAT) activities were increased by 5.6%, 24.6% and 42.1% of AAPH group value, respectively. Conclusion: The mechanism of the combination of EGCG and isorhamnetin in cell antioxidant activity might be through up-regulating the activity of endogenous antioxidant enzymes to enhance the cell's own antioxidant capacity, thereby achieving a balance in the body's oxidative stress response.

Key words: EGCG; isorhamnetin; cellular antioxidant activity; synergistic effect; antioxidant enzymes

收稿日期: 2023-04-18

基金项目: 河南省自然科学基金项目 (222300420383); 中国农业科学院科技创新工程专项项目 (CAAS-ASTIP-2023-ZFRI); 重庆市人民政府与中国农业科学院战略合作项目 (CQ-CAAS-08)。

作者简介: 潘俊坤 (1995-), 男, 硕士, 研究方向: 功能食品与生物活性物质, E-mail: pjkshihanhan@163.com。

* 通信作者: 张强 (1988-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: zhangqiang02@caas.cn。

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)广泛存在于茶叶中,是一种儿茶素类物质,占茶多酚含量的 30%~50%^[1]。EGCG 结构富含多个羟基基团,具有良好的抗氧化、抗癌、抗炎、降血糖等功能活性^[2-4]。异鼠李素(isorhamnetin)广泛存在于银杏、沙棘等植物中,是一种黄酮醇类化合物^[5-6]。异鼠李素结构也富含多个羟基基团,具有抗炎、抗氧化、抗癌、降血脂等生物活性^[7-10]。

在探寻天然高效抗氧化活性资源的过程中,单一活性成分的抗氧化活性研究备受关注,而复配组分研究尚有不足。有研究发现,单一天然活性成分的抗氧化效果有弱于复配组分的现象发生^[11-13]。王娜等^[14]利用中效定理分析发现,白藜芦醇与维生素 E 在体积比为 1:1~7:1 之间具有良好的协同效果(联合作用指数(Combination Index, CI)<0.95),且当体积比为 3:1 时,CI 值最小,其清除 DPPH· 的半抑制浓度 IC₅₀ 值为 0.011 mg/mL,因此当体积比为 3:1 时该复配组分具有最佳的协同抗氧化作用。

近年来,已有报道化合物组合对细胞模型相关性影响的研究。Liu 等^[15]研究槲皮素(5 μmol/L)和 EGCG(5 μmol/L)联合处理对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型糖代谢的影响,首次报道 miR-27a-3p 和 miR-96-5p 通过抑制 FOXO1 表达参与槲皮素和 EGCG 联合作用棕榈酸诱导的胰岛素抵抗的协同保护作用。Pan 等^[16]研究酚酸和胡萝卜素对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞的协同抗氧化作用发现,酚酸增加了细胞对胡萝卜素的摄取及其膜转运蛋白的表达。酚酸含量较高的组合具有协同作用,其中 β-胡萝卜素:咖啡酸=1:2 时,显著抑制了细胞内 ROS, Synergistic rate (SR)>1 表现出协同作用,并增加了细胞核 Nrf2 的表达。关惠^[17]的研究发现槲皮素和儿茶素(12.5+12.5 μmol/L)通过靶向 FOXO3 协同抑制 CHUK 基因转录增强细胞抗氧化应激的分子机制可能是:槲皮素和儿茶素通过共同作用于 CHUK 转录因子 FOXO3 的 DNA 结合域,干扰靶基因 DNA 的结合,并破坏蛋白-DNA 复合物的稳定性,进而协同抑制 FOXO3 与 CHUK 启动子序列的结合,抑制 CHUK 的转录表达,影响 CHUK 下游基因表达,从而协同增强细胞抗氧化应激作用。因此研究具有协同增效的细胞抗氧化活性植物天然成分,为食源性类黄酮功能性食品的开发提供理论依据。

本研究通过 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 [2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride solution, AAPH] 诱导构建了 HepG2 细胞抗氧化模型,设置 EGCG 和异鼠李素组合质量浓度比为 7:4、6:4 和 6:5,通过此模型验证了不同比例 EGCG 和异鼠李素组合对 HepG2 细胞抗氧化作用,采用 Chou-Talalay 中效分析法评价不同比例的 EGCG 和异鼠李素细胞抗氧化协同效应,并进一步探究联合指数(Combination Index, CI)最优组合对 HepG2 细胞内抗氧化

相关酶的影响。研究结果为揭示 EGCG 和异鼠李素抗氧化应激的协同增效机制提供了理论依据,同时为明确膳食中抗氧化成分的生物学功能提供了理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

EGCG 标准品(98%)、异鼠李素标准品(98%)、最小必需培养基(Minimum Essential Medium, MEM)、PBS 缓冲液(phosphate buffer solution)、胰蛋白酶、CCK-8 试剂盒 北京索莱宝科技有限公司; 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 [2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride solution, AAPH]、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS) Gibco 公司; Western、IP 裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 碧云天科技公司; 总超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒、总谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒 南京建成生物工程研究所; HepG2 细胞 中科院昆明动物所。

CO₂ 培养箱 Thermo Fisher 公司; SpectraMax i3X 酶标仪 Molecular Devices 公司; XDS-1 系列倒置生物显微镜 重庆重光实业有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台 苏州净化设备有限公司; Centrifuge 5427R 离心机 德国 Eppendorf 公司; -80 °C 冰箱 青岛海尔特特种电冰柜有限公司; LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; GL224i-1SCN 分析天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 联合指数法 采用 CompuSyn 分析软件计算 EGCG 和异鼠李素组合细胞抗氧化活性的联合指数 CI^[18]。联合指数公式为: $CI = (D)_1 / (DX)_1 + (D)_2 / (DX)_2$, 其中 (D)₁、(D)₂ 分别为复配处理时,活性达到 x%, 两种植物化学各自浓度, DX 为单一物质活性达到 x% 所需的物质浓度^[19]。当 CI<1 时,表示协同作用; CI=1 时,表示相加作用; CI>1 时,表示拮抗作用。

1.2.2 细胞培养 HepG2 细胞为贴壁细胞生长,该细胞培养在 10% 胎牛血清、1% 双抗(100×)的 MEM 培养基中,在 37 °C、5% CO₂、95% 湿度培养箱中孵育,每 1~2 d 更换培养基。当细胞在培养瓶中生长到 80%~90% 后,移除培养基,常温下 PBS 清洗 1~2 次,加入 1~2 mL 含 EDTA 的胰蛋白酶消化液于 25 cm² 培养瓶中,消化 2~3 min,待细胞消化完成后加入 2 mL 完全培养基,1000 r/min 下离心 5 min,弃去上清液后用完全培养基重悬细胞,按照后续实验需要的细胞数量进行传代。

1.2.3 细胞毒性实验 采用 CCK-8 法检测细胞毒性活性,参照 Liang 等^[18]方法,将密度为 5.0×10⁴ 个/孔

的 HepG2 细胞接种于 96 孔板各孔中, 每孔接种 100 μL , 每组设置 6 个重复, 培养 24 h。实验组每孔加入 100 μL MEM 培养基(包含不同浓度比的 EGCG+异鼠李素组合, EGCG 或异鼠李素), 并设置 6 个重复, 正常对照组加入相同体积的完全培养基, 继续培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液培养 1~2 h 后, 96 孔板放于酶标仪 450 nm 处测定 OD 值, 计算细胞存活率。

1.2.4 细胞抗氧化实验(CAA) 参照 Tu 等^[20]方法取对数生长期的 HepG2 细胞, 在 96 孔板中加入 100 μL 培养基其细胞密度达到 5×10^4 个/孔; 培养 24 h 后除去培养基, 并用 PBS 清洗 1~2 次; 分别加入包含 EGCG、异鼠李素, 不同质量浓度比的 EGCG+异鼠李素组合的 DCFH-DA 探针培养基, 其中 DCFH-DA 探针终浓度为 25 $\mu\text{mol/mL}$, 继续孵育 1 h; 1 h 后, 去除培养基, 每孔加入 100 μL 的 PBS 清洗 3 次; 然后加入 100 μL 的浓度为 600 $\mu\text{mol/mL}$ 的 AAPH(Hanks 溶液稀释), 将 96 孔板放入多功能酶标仪检测, 恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 。酶标仪测定条件为: 激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm, 振荡 5 s, 然后每 5 min 测定一次, 测定 60 min。计算公式如下: $\text{CAA}(\text{unit})=1-(\text{[SA]}/\text{[CA]})$, [SA]: 样品时间-荧光值曲线下的积分面积; [CA]: 对照时间-荧光值曲线下的积分面积; EC_{50} 根据 $\lg(\text{fa}/\text{fu})/\lg(\text{dose})$ 的中效原理计算; fa: CAA unit; fu: 1-CAA unit。实验中每个样品做四个重复, 实验空白组即加入探针 DCFH-DA 但不加 AAPH 及抗氧化剂的荧光衰减组; 实验阳性对照为加自由基激发剂 AAPH 和探针 DCFH-DA 的荧光衰减组, 样品实验剂量对细胞生长的抑制率在 10% 以下进行。

1.2.5 细胞内抗氧化酶活性实验 参照 Zhang 等^[21]和 Shi 等^[22]取对数生长期的 HepG2 细胞浓度为 10^6 个/mL, 均匀铺于 6 孔板内, 培养 24 h 后待其贴壁生长后清除培养基; 加入含 EGCG+异鼠李素组合的基础培养基, 1 h 后, 用 PBS 清洗 1~2 次; 加入 1.5 mL 600 $\mu\text{mol/mL}$ AAPH 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱里孵育 1.5~2 h; 阳性对照组加入 AAPH 不加抗氧化剂(NC), 阴性对照组不加 AAPH 和抗氧化剂(PC); 然后用 PBS 清洗一次, 用细胞刮刀刮下细胞, 1000 r/min 离心 10 min 后收集细胞, 弃上清; 再加 1 mL PBS 离心 10 min, 弃上清; 加入 IP 裂解液(加 PMSF, 100:1, v/v) 30~40 min(冰上操作), 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 18495 r/min 离心 10 min, 取上清分装, -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。按试剂盒说明书进行操作, 取适量先进行蛋白含量测定, 然后检测总 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性。

1.3 数据处理

所有结果均以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。通过 SPSS 软件对实验数据进行统计分析, 采用 ANOVA 单因素进行统计学分析, 并采用 Duncan 模块结合事后多重比较进行显著性分析, 以 $P < 0.05$ 表示具有统计学显著差异, 采用 Sigmaplot 10.0 软件

进行绘图。

2 结果与分析

2.1 EGCG、异鼠李素以及 EGCG 和异鼠李素组合的细胞抗氧化活性

CAA 法是一种从细胞水平反映抗氧化剂的吸收和代谢的变化情况, 更真实地模拟机体的正常生理状态^[23]。CAA 法中荧光探针 DCFH-DA 本身没有荧光, 但可以自由穿过细胞膜, 进入细胞内后会被细胞内相应的蛋白酯酶水解生成 DCFH, 此时细胞内的活性氧通过氧化无荧光的 DCFH 从而能变成有荧光的 DCF, 因此检测荧光值就能反映细胞内活性氧的水平^[24-25]。

采用 HepG2 细胞抗氧化评价模型评价不同浓度梯度下样品的细胞抗氧化活性。如图 1 所示, EGCG 和异鼠李素的 EC_{50} 值分别为 6.2 ± 0.2 和 3.8 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 两者细胞抗氧化活性具有显著性差异 ($P < 0.05$)。在联合作用实验中, 为了每个单体化合物具有相似的活性, 确定每个单体化合物的 $(\text{EC}_{50})_1/(\text{EC}_{50})_2$ 为组合物的质量浓度比。并以 $(\text{EC}_{50})_1/(\text{EC}_{50})_2$ 比例为参照, 调整各个单体化合物质量浓度比例, 确定组合物的质量浓度比分别为 6:4、6:5、7:4。因此, 以 EGCG 组(7 $\mu\text{g/mL}$)、异鼠李素组(5 $\mu\text{g/mL}$)、组合 1(6+4 $\mu\text{g/mL}$)、组合 2(6+5 $\mu\text{g/mL}$) 和组合 3(7+4 $\mu\text{g/mL}$) 为各样品细胞抗氧化实验作用浓度。结果显示, EGCG 和异鼠李素组合的 EC_{50} 值分别为 5.0 ± 0.2 、 5.25 ± 0.2 和 5.50 ± 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 组合 1 的活性优于其他组合活性。EGCG+异鼠李素组合的 EC_{50} 值分别是 EGCG 组的 0.81 倍、0.85 倍和 0.89 倍, 表明 EGCG+异鼠李素组合抗氧化活性显著高于 EGCG 组 ($P < 0.05$)。然而, EGCG+异鼠李素组合的 EC_{50} 值均高于异鼠李素组, 表明组合物的抗氧化活性显著弱于异鼠李素组 ($P < 0.05$)。

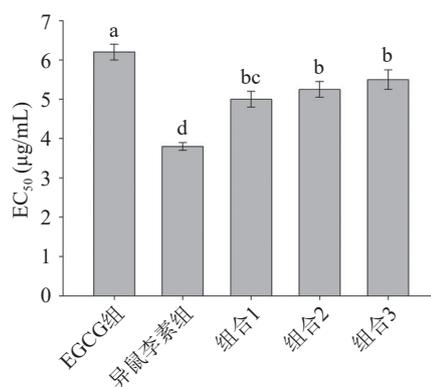


图1 EGCG组、异鼠李素组、EGCG+异鼠李素组合的 EC_{50} 值

Fig.1 EC_{50} of EGCG, isorhamnetin, and EGCG+isorhamnetin combinations

注: 图中不同小写字母表示差异显著 $P < 0.05$; 图 2 同。

综上所述, EGCG 和异鼠李素组合可保护 HepG2 细胞免受 AAPH 诱导的氧化损伤。其中, 组合 1 的

细胞抗氧化活性较强。目前,依据不同活性成分相互作用效果的不同将其相互作用关系分为:协同增效作用、拮抗作用和简单加和作用。从生物学角度来看,细胞摄取量对活性成分的生物可及性和生物利用度造成一定影响,并影响其最终在体内抗氧化作用的发挥。Chen 等^[26]研究表明,黄酮类化合物(槲皮素、木犀草素)和类胡萝卜素(番茄红素、叶黄素)在总浓度为 8 $\mu\text{mol/mL}$ 的不同比例下结合,番茄红素:槲皮素=1:5 复配组作用后,促进了番茄红素的细胞从而增强了其细胞抗氧化活性。Phan 等^[27]研究发现,花青素和 β -类胡萝卜素联合作用 Caco2 细胞时,增加了 β -类胡萝卜素的细胞吸收,但对其细胞抗氧化活性产生了拮抗作用,可能与 β -类胡萝卜素和花青素共同作用时, β -类胡萝卜素细胞浓度达到一定水平时表现出促氧化作用有关。因此,活性成分的摄取量可能是影响其细胞抗氧化活性的关键因素,也是未来研究方向中需要特别关注的内容。

2.2 EGCG 和异鼠李素组合对 HepG2 细胞存活率的影响

利用 CCK-8 法,对 EGCG、异鼠李素以及 EGCG 和异鼠李素组合在不同浓度梯度处理 HepG2 细胞 24 h,进行细胞毒性分析。由 2.1 中可知 EGCG 和异鼠李素的 EC_{50} 分别为 6.2 ± 0.2 和 $3.8 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$,在联合作用实验中,以单体化合物的 $(\text{EC}_{50})_1/(\text{EC}_{50})_2$ 为组合的质量浓度比参照,并上下调整质量浓度比例,确定组合物的质量浓度比分别为 6:4、6:4、7:4。因此,以 EGCG 组($7 \mu\text{g/mL}$)、异鼠李素组($5 \mu\text{g/mL}$)、组合 1($6+4 \mu\text{g/mL}$)、组合 2($6+5 \mu\text{g/mL}$)和组合 3($7+4 \mu\text{g/mL}$)为各样品 CCK-8 实验作用浓度。结果如图 2 所示,经不同质量浓度的 EGCG、异鼠李素以及不同质量浓度比的 EGCG 和异鼠李素组合处理 24 h 后,细胞存活率均在 90% 以上,该浓度下各样品符合后续细胞抗氧化实验细胞毒性要求。EGCG 和异鼠李素在不同浓度下,其细胞存活率存在显著性差异($P < 0.05$);而 EGCG 和异鼠李素组合(6:4, 6:5,

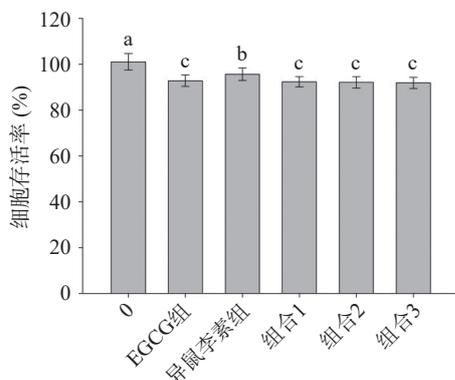


图 2 EGCG 组、异鼠李素组、EGCG+异鼠李素组合对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.2 Effects of EGCG group, isorhamnetin group, and EGCG+isorhamnetin groups on the survival rates of HepG2 cells

7:4, c/c)三者之间的细胞存活率无明显差异($P > 0.05$)。结果表明,本实验中各处理组所使用样品浓度,对 HepG2 细胞无明显毒副作用。

2.3 EGCG 和异鼠李素组合联合指数 CI

Chou 和 Talalay 引入了联合指数(CI)方法,将药物联合效应定量描述为协同效应($\text{CI} < 1$)、加和效应($\text{CI} = 1$)或拮抗效应($\text{CI} > 1$)。随着 Chou-Talalay 理论的发展,CompuSyn 软件被开发出来,用于剂量效应分析、CI 计算和 Fa-CI 图模拟^[28]。本研究采用 Chou-Talalay 联合指数法,考察 EGCG 与异鼠李素联合作用是否具有协同作用。在联合作用试验中,以 EGCG 和异鼠李素的 EC_{50} 值为指导选择单个浓度。CI 值由 CompuSyn 软件计算。EGCG 和异鼠李素在 50%、75% 和 90% 抗氧化效果下(GI_{50} 、 GI_{75} 和 GI_{90})的 CI 值见表 1。

表 1 EGCG 和异鼠李素组合的 CI 值
Table 1 CI value of EGCG+isorhamnetin

化合物	质量比	CI			CI_{avg}
		GI_{50}	GI_{75}	GI_{90}	
EGCG和异鼠李素	7:4	1.02 ± 0.01	1.00 ± 0.01	0.99 ± 0.01	1.00
	6:4	0.82 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.74 ± 0.01	0.76
	6:5	1.01 ± 0.01	0.96 ± 0.02	0.92 ± 0.01	0.95

注:数据源自三次独立实验的结果,表示为“平均值 \pm 标准差”。 GI_{50} 、 GI_{75} 和 GI_{90} 分别化合物抗氧化效应达到 50%、75% 和 90% 的 CI 值。 $\text{CI}_{\text{avg}} = (\text{CI}_{50} + 2\text{CI}_{75} + 3\text{CI}_{90})/6$ 。

如图 3 所示,随着浓度的增加各单体及 EGCG 和异鼠李素组合细胞抗氧化活性也随之增加,呈剂量-效应关系。图 3A~图 3C 中,浓度在 0~5 $\mu\text{g/mL}$ 时,异鼠李素组的 CAA 值最高,为 $53.5\% \pm 2.7\%$,与 EGCG 组和组合的 CAA 值具有显著性差异($P < 0.05$);浓度在 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,组合的 CAA 值此时最高,分别为 $65.6\% \pm 2.3\%$ 、 $70.1 \pm 2.5\%$ 和 $68.2 \pm 2.2\%$,且与浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时的 EGCG 组($51.6\% \pm 1.7\%$)和异鼠李素组($53.5\% \pm 2.7\%$)的活性存在显著性差异($P < 0.05$)。结果表明,EGCG+异鼠李素组合可能具有协同作用。

依据图 3 中各单体及组合在相应浓度下的 CAA 值,经过 CompuSyn 软件计算,得到 EGCG 和异鼠李素组合的 CI 值,结果如表 1 所示。表 1 是利用联合指数法计算出各不同浓度 EGCG 和异鼠李素组合联用时的平均 CI 值,从表 1 可以看出 EGCG 和异鼠李素联合作用时,在浓度比为 6:4 和 6:5 时,具有协同作用。EGCG 和异鼠李素的联合使用,在两者的浓度为 7:4 时,其联合用药系数 CI 约为 1,联合用药指数均值(CI_{avg})为 1.00,表现出了叠加作用。在两者的浓度比为 6:4 时,其中, GI_{75} 和 GI_{90} 均小于 0.80,说明两者在浓度为 6:4 时表现出了较强的协同作用,联合用药指数均值(CI_{avg})为 0.76。在两者的浓度比为 6:5 时, GI_{50} 约为 1, GI_{75} 和 GI_{90} 小于 1,说明两者在浓度为 6:5 时表现出了较弱的协同作用,

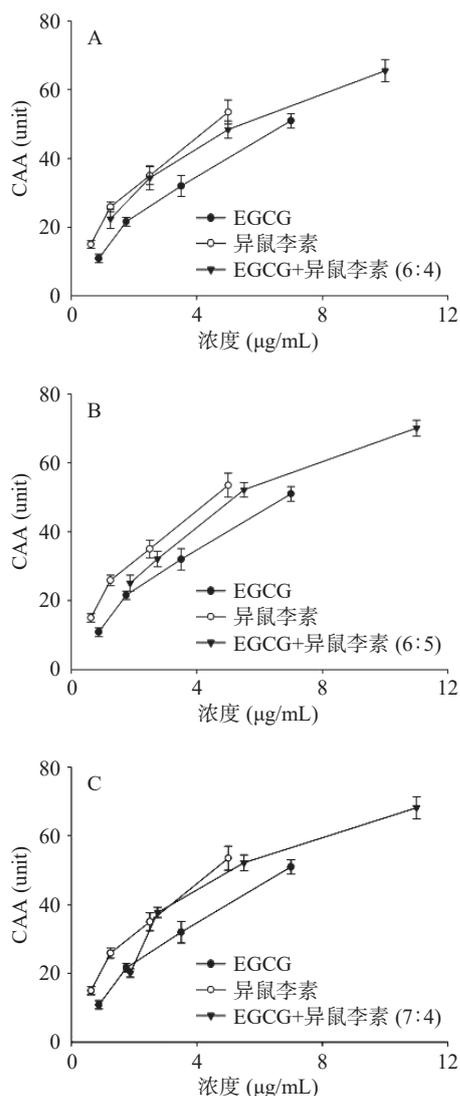


图3 EGCG(7 µg/mL)、异鼠李素(5 µg/mL)、EGCG+异鼠李素组合的 CAA 值

Fig.3 CAA of EGCG (7 µg/mL), isorhamnetin (5 µg/mL) and EGCG+isorhamnetin

联合用药指数均值(CI_{avg})为 0.95。图 4 为 EGCG 和异鼠李素组合(6:4)在 CI_{avg} 最小时的 Fa-CI 趋势图,随着 Fa 值的增加,CI 值呈降低趋势,即表明随着细胞抗氧化活性的增加,EGCG 和异鼠李素组合的协同增效作用更佳。结果表明,在一定的浓度范围内,EGCG 和异鼠李素组合对 HepG2 细胞具有协同

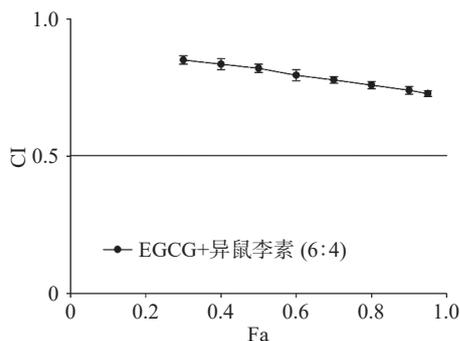


图4 EGCG 和异鼠李素组合(6:4)的 Fa-CI 趋势图

Fig.4 Fa-CI plot of EGCG+isorhamnetin (6:4)

抗氧化保护作用。EGCG+异鼠李素(6:4)的 CI 值为最佳组合,因此选用 EGCG+异鼠李素(6:4)进行后续实验。

于佳成^[29]发现,槲皮素与儿茶素(12.5 µmol/L+12.5 µmol/L)的浓度组合对 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤具有协同保护作用,其联合指数 CI 值为 0.374,表明组合协同效果较好;进一步细胞内抗氧化酶实验发现,二者联合处理后,SOD、CAT、GPx 活性和 MDA 含量比单药处理显著性降低,说明槲皮素和儿茶素组合在消除 ABAP 诱导的 HepG2 细胞氧化应激酶活方面具有一定的协同增效作用。Saw 等^[30]也研究发现,低浓度下的槲皮素和山奈酚,槲皮素和紫檀芪以及山奈酚和紫檀芪组合通过上调 Nrf2 通路上的 mRNA 和蛋白的表达,增加了其清除自由基(ROS)等能力,对 H₂O₂ 诱导 HepG2-C8 细胞氧化损伤达到协同抗氧化保护效果。研究结果与本文结果趋势一致,组合物对细胞都起到了协同保护作用。然而,这些结果表明,每个组合的协同作用水平与单个化合物的抗氧化作用无关,剂量效应关系并不能说明其机制,它只显示了质量作用律参数^[31]。基于以上结果,EGCG 与异鼠李素联用潜在的协同作用机制有待进一步探讨。

2.4 细胞内抗氧化相关酶活性

ROS 的过量产生导致细胞内氧化应激失衡,从而可能导致细胞损伤,是导致慢性疾病的主要因素,包括衰老、心血管病、高血压和神经退行性疾病^[32]。AAPH 诱导 ROS 生成可引起细胞内抗氧化防御系统失衡,SOD、CAT 和 GSH-Px 是清除自由基的主要酶。抗氧化酶系统对氧化应激损伤起着重要的防御作用。为了评估抗氧化酶系统是否在 HepG2 细胞中发挥作用,检测了抗氧化酶(SOD、CAT 和 GSH-Px)的活性,这些酶在人体氧化应激平衡中起着重要作用^[33]。因此,细胞内抗氧化酶活性的变化可以反映 HepG2 细胞抑制活性氧(ROS)的能力。

为了进一步阐明 EGCG 与异鼠李素(6:4)联合抗氧化的作用机制,对 SOD、GSH-Px 和 CAT 的活性进行了测定。结果如表 2 所示,与 PC 细胞相比,NC 细胞在 600 µmol/mL AAPH 作用 1 h 后,SOD、CAT 和 GSH-Px 活性分别显著降低 51.2%、53.5% 和 57.1%,表明 AAPH 对 HepG2 细胞产生了氧化损伤。而当 EGCG 和异鼠李素组合提前孵育 1 h 后,结果发现 HepG2 细胞内 SOD、CAT 和 GSH-Px 相比于 NC 均有上升且随剂量增加而增强。如表 2 结果,与 NC 细胞相比,EGCG 和异鼠李素组合在浓度 1.5+1 µg/mL 作用细胞时,SOD 无显著性差异($P>0.05$),然而在 3+2 µg/mL 和 6+4 µg/mL 时,具有显著性差异($P<0.05$),且 CAT 和 GSH-Px 的活性与 SOD 相似。相比于 NC 细胞,EGCG 和异鼠李素组合作用与 HepG2 细胞,其 SOD 活性分别增加了 5.2%、21.1% 和 49.1%;GSH-Px 的活性分别增加了 7.6%、

27.8% 和 57.6%; CAT 活性分别增加了 5.6%、24.6% 和 42.1%。结果与 CAA 测定结果一致。组合具有较好的细胞抗氧化活性, 抗氧化酶活性也较高。

表 2 EGCG 和异鼠李素组合(6:4)对 HepG2 细胞抗氧化相关酶的活性的影响

Table 2 Effects of EGCG+isorhamnetin (6:4) on activities of antioxidant enzymes in HepG2 cells

化合物 ($\mu\text{g/mL}$)	SOD (U/mg protein)	GSH-Px (mU/mg protein)	CAT (U/mg protein)
PC	29.3 \pm 2.2 ^a	310.5 \pm 5.4 ^a	61.3 \pm 3.1 ^a
NC	14.3 \pm 1.1 ^d	133.3 \pm 2.3 ^d	28.5 \pm 2.2 ^d
1.5+1	14.9 \pm 0.1 ^d	143.4 \pm 4.1 ^d	30.1 \pm 1.2 ^d
3+2	17.2 \pm 0.08 ^c	170.3 \pm 3.7 ^c	35.5 \pm 2.4 ^c
6+4	21.2 \pm 0.1 ^b	210.1 \pm 4.8 ^b	40.4 \pm 2.5 ^b

注: 数据源自三次独立实验的结果, 表示为平均值 \pm 标准差; 不同字母代表显著性差异 $P<0.05$ 。

综上所述, EGCG 与异鼠李素(6:4)组合可通过调节抗氧化酶活性抑制 AAPH 诱导的 HepG2 细胞氧化应激。同时, 高浓度组合在样品组中 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性最好。结果表明, 适当浓度的组合表现出更好的抗氧化酶活性, 说明较高的酶活性是细胞抗氧化协同作用的机制。Wen 等^[34]发现荔枝肉桂素 B1 通过上调 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性, 可抑制较强的细胞内抗氧化活性。Jiang 等^[35]报道 Jiupei 肽具有良好的细胞抗氧化活性, SOD、CAT 和 GSH-Px 活性呈剂量依赖性增加。Zhou 等^[36]研究发现, 马氏螯虾肉中的抗氧化肽可显著提高 HepG2 细胞谷胱甘肽(GSH)和过氧化氢酶(CAT)的产生, 以及 Nrf2 信号通路相关基因的表达。同样, Huo 等^[37]也报道了白酒中的抗氧化肽通过清除活性氧(ROS)和上调细胞抗氧化酶(SOD、CAT 和 GSH-Px)活性发挥保护作用。如图 5 所示, EGCG 和异鼠李素组合可以穿过细胞膜, 增加 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性, 共同清除活性氧(reactive oxidative species, ROS)。结果表明, EGCG 和异鼠李素联合作用主要提高了 HepG2 细胞的抗氧化酶活性。因此, EGCG 与异鼠李素联用的协同机制为: 上调较高的 SOD、

CAT 和 GSH-Px 活性, 来抑制 ROS 的产生, 从而达到平衡机体氧化应激反应的效果, 为食源性类黄酮功能性食品的开发提供理论依据。

3 结论

综上所述, EGCG 和异鼠李素组合联合应用对 HepG2 细胞的协同增效保护作用, 与单独使用 EGCG 或异鼠李素相比, 联合作用通过上调细胞内抗氧化相关酶活性更大程度地清除 HepG2 细胞内的 ROS。但本研究仍有许多不足之处: 本研究仅限于体外单一细胞系, 在后续的研究中可在多种细胞系中进行验证, 在条件允许下可进一步在动物实验或临床实践中进一步验证; EGCG 和异鼠李素联合应用在体内的毒性研究需要进一步验证; 后续研究中可在分子水平上进一步阐释 EGCG 和异鼠李素的细胞抗氧化协同作用的分子机制。本研究虽存在这些局限, 但初步结果表明, EGCG 和异鼠李素联合应用可能是一种潜在的抗氧化剂的候选组合, 并为其后续功能性产品的开发奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 王睿, 王琦, 周敏, 等. 茶多酚和 EGCG 对风干金鲳鱼品质相关理化指标的改善效果比较[J]. 食品科学, 2023, 44(2): 54–63. [WANG R, WANG Q, ZHOU M, et al. Comparison of the effect of tea polyphenols and epigallocatechin gallate on improving physicochemical indexes related to quality of air-dried golden pomfret[J]. Food Science, 2023, 44(2): 54–63.]
- [2] 毕樱馨, 刘成筠, 孟祥龙, 等. 茶多酚 EGCG 通过调控 miR-16-5p/含铜胺氧化酶 1 轴发挥对过氧化氢诱导的人心肌细胞凋亡的保护作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 376–383. [BI Y X, LIU X J, MENG X L, et al. Protective effect of EGCG on hydrogen peroxide-induced apoptosis of human cardiomyocyte via regulating miR-16-5p/AOC1 Axis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 376–383.]
- [3] ALMATROODI S A, ALMATROUDI A, KHAN A A, et al. Potential therapeutic targets of epigallocatechin gallate (EGCG), the most abundant catechin in green tea, and its role in the therapy of various types of cancer[J]. *Molecules*, 2020, 25(14): 3146.
- [4] GRZESIK M, NAPARLO K, BARTOSZ G, et al. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants[J]. *Food Chemistry*, 2018, 241: 480–492.
- [5] 倪璐卿, 陆慧, 高明, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS/MS 法的异鼠李素在小鼠体内代谢产物研究[J]. 军事医学, 2023, 47(5): 364–370. [NI L Q, LU H, GAO M, et al. *In vivo* metabolites of isorhamnetin in mice after oral administration based on UPLC-Q/TOF-MS/MS[J]. Military Medicine Science, 2023, 47(5): 364–370.]
- [6] 官红香, 南丽红, 陈亚萍, 等. 异鼠李素抑制单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的机制研究[J]. 福建中医药, 2023, 54(2): 43–47. [GUAN H X, NAN L P, CHEN Y P, et al. Mechanism of isorhamnetin inhibiting renal interstitial fibrosis in rat with unilateral ureteral obstruction[J]. Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine, 2023, 54(2): 43–47.]
- [7] 朱敏, 赵丽敏, 王培, 等. 异鼠李素抑制卵清蛋白诱导的哮喘小鼠肺部炎症[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(1): 106–111. [ZHU M, ZHAO L M, WANG P, et al. Isorhamnetin inhibits ovalbumin-induced pulmonary inflammation in asthmatic mice[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2021, 37(1): 106–111.]
- [8] 董曦, 孙桂波, 罗云, 等. 异鼠李素对 H₂O₂ 引起的 H9C2 细胞氧化应激损伤的保护作用研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(6): 853–860. [DONG X, SUN G B, LUO Y, et al. Protective ef-

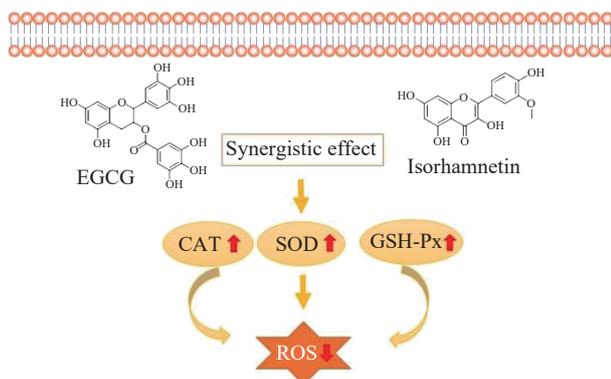


图 5 EGCG 和异鼠李素组合在 HepG2 细胞内协同抗氧化作用机制示意图

Fig.5 Possible mechanisms of EGCG+isorhamnetin combination antioxidant activities in HepG2 cells

- fect of isorhamnetin on H9C2 cell line against oxidative stress[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2015, 31(6): 853–860.]
- [9] MULAT A, ZHANG X, ZHAO T, et al. Isorhamnetin attenuates high-fat and high - fructose diet induced cognitive impairments and neuroinflammation by mediating MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. *Food and Function*, 2021, 12(19): 9261–9272.
- [10] 赵增光, 刘应才. 异鼠李素的心血管保护作用[J]. *医学综述*, 2008, 14(15): 2321–2323. [ZHAO Z G, LIU Y C. Cardiovascular protective effect of isorhamnetin[J]. *Medicine Recapitulate*, 2008, 14(15): 2321–2323.]
- [11] 曹汝鸽, 马建飞, 周中凯. 芸香柚皮苷与 EGCG 协同抗氧化作用及其机理研究[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(1): 43–48. [CAO R G, MA J F, ZHOU Z K. Studies on the mechanism of the synergistic antioxidant effect of narirutin complexed with EGCG[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(1): 43–48.]
- [12] 肖星凝, 徐雯慧, 左丹, 等. 6 种黄酮协同抗氧化作用及构效关系研究[J]. *食品与机械*, 2017, 33(2): 17–21. [XIAO X N, XU W H, ZUO D, et al. The synergistic antioxidant effect and structure-activity relationship of six flavonoids[J]. *Food Machinery*, 2017, 33(2): 17–21.]
- [13] WANG D, JIANG Y, SUN D X, et al. MicroRNA-based regulatory mechanisms underlying the synergistic antioxidant action of quercetin and catechin in H₂O₂-stimulated HepG2 cells: Roles of BACH1 in Nrf2-dependent pathways[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 153: 122–131.
- [14] 王娜, 高恩光, 李娜, 等. 白藜芦醇与维生素 E 协同抗氧化效应研究[J]. *河南农业大学学报*, 2022, 56(6): 1007–1014. [WANG N, GAO E G, LI N, et al. Study on the synergistic antioxidant effect of resveratrol and vitamin E[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2022, 56(6): 1007–1014.]
- [15] LIU H, GUAN H, TAN X T, et al. Enhanced alleviation of insulin resistance via the IRS-1/Akt/FOXO1 pathway by combining quercetin and EGCG and involving miR-27a-3p and miR-96-5p[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2022, 181: 105–117.
- [16] PAN Y, DENG Y Z, CHEN X, et al. Synergistic antioxidant effects of phenolic acids and carotenes on H₂O₂-induced H9c2 cells: Role of cell membrane transporters[J]. *Food Chemistry*, 2021, 341: 128000.
- [17] 关惠. 槲皮素与儿茶素通过靶向 FOXO3 协同抑制 CHUK 基因转录增强细胞抗氧化应激的分子机制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022. [GUAN H. Molecular mechanism of quercetin and catechin in protecting cell against oxidative stress by targeting FOXO3 to synergistically inhibit CHUK transcription [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2022.]
- [18] LIANG T S, ZHANG Z T, JING P. Black rice anthocyanins embedded in self-assembled chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles enhance apoptosis in HCT-116 cells[J]. *Food Chemistry*, 2019, 301: 125280.
- [19] LIU L L, LIU Q, LI P, et al. Discovery of synergistic anti-inflammatory compound combination from herbal formula GuGe FengTong Tablet[J]. *Chinese Journal Natural Medicines*, 2018, 16(9): 683–692.
- [20] TU J M, SHI D D, WEN L R, et al. Identification of moracin N in mulberry leaf and evaluation of antioxidant activity[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 132: 110730.
- [21] ZHANG Q, YANG W B, LIU J C, et al. Identification of six flavonoids as novel cellular antioxidants and their structure-activity relationship[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 4150897.
- [22] SHI D D, YANG J L, JIANG Y M, et al. The antioxidant activity and neuroprotective mechanism of isoliquiritigenin[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 152(20): 207–215.
- [23] DENG M, JIA X C, DONG L H, et al. Structural elucidation of flavonoids from Shatianyu (*Citrus grandis* L. Osbeck) pulp and screening of key antioxidant components[J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130605.
- [24] WOLFE K L, LIU R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(22): 8896–8907.
- [25] 张强. 稻壳的化学成分及生物活性研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2018. [ZHANG Q. Chemical constituents from rice hull and their bioactivities [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2018.]
- [26] CHEN X, DENG Z Y, ZHENG L F, et al. Interaction between flavonoids and carotenoids on ameliorating oxidative stress and cellular uptake in different cells[J]. *Foods*, 2021, 10(12): 3096.
- [27] PHAN M A, BUCKNALL M, ARCOT J. Interactive effects of β -carotene and anthocyanins on cellular uptake, antioxidant activity and anti-inflammatory activity *in vitro* and *ex vivo*[J]. *Journal Functional Foods*, 2018, 45: 129–137.
- [28] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(2): 440–446.
- [29] 于佳成. 黄芪白芍协同调控细胞抗氧化作用机制的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015. [YU J C. Synergistic mechanism of astragalus and peony in the regulation of cellular antioxidant[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2015.]
- [30] SAW C L, GUO Y, YANG A Y, et al. The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: Involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway[J]. *Food and Chemistry Toxicology*, 2014, 72: 303–311.
- [31] CHOU T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies[J]. *Pharmacological Reviews*, 2006, 58(3): 621–681.
- [32] VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. *International Journal Biochemistry Cell Biology*, 2007, 39(1): 44–84.
- [33] CHEN X, LI H Y, ZHANG B, et al. The synergistic and antagonistic antioxidant interactions of dietary phytochemical combinations[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(20): 5658–5677.
- [34] WEN L G, YOU L J, YANG X M, et al. Identification of phenolics in litchi and evaluation of anticancer cell proliferation activity and intracellular antioxidant activity[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 84: 171–184.
- [35] JIANG Y S, ZHAO D R, SUN J Y, et al. Analysis of antioxidant effect of two tripeptides isolated from fermented grains (Jiupi) and the antioxidative interaction with 4-methylguaiacol, 4-ethylguaiacol, and vanillin[J]. *Food Sciences and Nutrition*, 2019, 7(7): 2391–2403.
- [36] ZHOU J, WEI M F, YOU L J. Protective effect of peptides from *Pinctada martensii* meat on the H₂O₂-induced oxidative injured HepG2 cells[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(2): 12020535.
- [37] HUO J Y, MING Y Z, LI H F, et al. The protective effects of peptides from Chinese baijiu on AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells via Nrf2-mediated signaling pathway[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(6): 1527–1538.