

越橘花青素脂质体对 Caco-2 细胞的抗氧化作用

陈玉洁¹, 关荣发^{2*}, 黄海智¹, 钟浩², 孙玉敬², 张维²

(¹ 中国计量大学生命科学学院 杭州 310018

² 浙江工业大学食品科学与工程学院 杭州 310014)

摘要 目的:研究越橘花青素脂质体对氧化应激状态下 Caco-2 细胞抗氧化功能的影响。方法:以大豆卵磷脂和胆固醇混合物为壁材,采用薄膜分散法制备越橘花青素脂质体,并对其稳定性进行评估。通过建立过氧化氢诱导的 Caco-2 细胞氧化损伤模型,评估越橘花青素脂质体对氧化损伤细胞的保护效果。结果:越橘花青素脂质体呈表面光滑的球型结构,平均粒径(213.2±13.4)nm,多分散性指数(PDI)0.201±0.026。随着储存时间的延长,花青素脂质体的粒径和 pH 值逐渐增大。在质量浓度均为 200 μg/mL 时,花青素组与花青素脂质体组的氧化损伤细胞生存率分别为 74.33%和 84.17%;氧化损伤细胞内 ROS 含量分别下降了 36.58%,38.02%;MDA 含量分别下降了 43.44%,53.66%;T-AOC 含量分别提高了 3.42,8.89 倍;SOD 酶活性分别提高了 5.76%,8.79%;CAT 酶活性分别提高了 9.21%,12.26%。结论:脂质体作为载体可以提高越橘花青素的生物活性。越橘花青素脂质体可以降低受损细胞内 MDA 与 ROS 水平,提高氧化损伤细胞的生存率,增强细胞内源性抗氧化酶的活力,进而发挥抗氧化作用。

关键词 越橘花青素;脂质体;抗氧化;Caco-2 细胞

文章编号 1009-7848(2023)06-0056-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.007

正常生理条件下,体内的自由基维持在正常生理范围内,然而,外界因素的刺激会导致机体内氧化与抗氧化反应不均衡,当体内产生过量自由基时,会损害细胞和组织^[1-2],造成细胞内脂质、代谢酶类及功能蛋白等物质活性的丧失^[3],炎症细胞浸润,产生炎症^[4]。肠上皮细胞因氧化应激而产生的氧化损伤,会引起肠道屏障功能丧失^[5]。自由基使机体的性能下降,增加各种疾病的发病率,包括癌症、心血管疾病和神经系统疾病,被认为是导致机体衰老的一个重要因素^[6]。安全有效的天然抗氧化剂受到越来越多的关注。

花青素是一种天然的水溶性类黄酮化合物,在许多植物的根以及谷物中广泛存在^[7-8]。花青素具有清除自由基、抗氧化、抗炎症、抗肿瘤及预防心血管疾病等多种生物活性^[9-12]。然而,花青素存在稳定性较低,易降解的问题,容易受到如温度、酶光等外界因素的影响而发生降解^[13-16],其应用受限制。研究表明^[17-18],脂质体在改善包装材料的生

物稳定性、吸收和生物利用度方面比传统配方有优势。脂质体是一种人工磷脂双层膜,具有类似细胞膜的结构,携带疏水和亲水化合物,作为物理化学屏障,增加亲脂化合物在水中的溶解度^[19-22]。利用脂质体作为载体,可以提高包材的溶出率和靶向性,提高脂质体的缓释效果,有效延缓包材的释放。

本试验以脂质体作为载体制备越橘花青素脂质体,用过氧化氢处理人结肠癌上皮细胞 Caco-2 细胞,制备细胞氧化损伤模型,研究越橘花青素脂质体对细胞氧化损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

越橘花青素(≥25%),陕西清雅生物科技有限公司;人结直肠腺癌细胞 Caco-2、MEM 培养基、庆大霉素-两性霉素 B 混合溶液,上海启达生物科技有限公司;卵磷脂、胆固醇、DMSO、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲溶液 PBS、试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清,上海双洙生物科技有限公司;其它试剂为分析纯级。

1.2 仪器与设备

UV-1200 紫外分光光度计,上海美普达仪器

收稿日期:2022-06-29

基金项目:浙江省重点研发计划竞争性项目(2021C04032);
国家自然科学基金面上项目(32172202)

第一作者:陈玉洁,女,硕士生

通信作者:关荣发 E-mail:rongfaguan@163.com

有限公司;RV10 旋转蒸发仪,德国 IKA 公司;GE-NIOS-BASIC 型 CO₂ 培养箱,美国赛默飞世尔科技公司;Nano-ZS90 马尔文粒径仪,英国 Malvern 公司;JEM-2100 透射电子显微镜,日本株式会社;TC20 全自动细胞计数仪,美国 Bio-Rad 公司;i-Mark 酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;TS100 倒置生物显微镜,日本 Nikon 尼康公司;930N 荧光分光光度计,上海仪电有限公司;Allegra X-30R 冷冻离心机,美国贝克曼库尔特有限公司;YXQ-SG46-280S 蒸汽压力灭菌锅,上海博讯实业有限公司;SW-CJ-1C 型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 越橘花青素脂质体的制备 越橘花青素脂质体的制备采用薄膜分散法,称取药脂比 1:11,胆脂比 1:5 的花青素、大豆卵磷脂和胆固醇溶于 10 mL 无水乙醇中,并置超声仪中超声 20 min,使其完全溶解形成混合物。将混合物旋转蒸发除去有机溶剂,当梨形瓶的瓶底形成均匀的脂质薄膜后,加入预热的 PBS 洗脱脂质薄膜,冰水浴超声 20 min,获得脂质体悬浊液。分别用 0.45 μm 和 0.22 μm 的滤膜过滤脂质体悬浊液,置于冰箱 4 °C 保存。

1.3.2 脂质体的微观表征 采用透射电子显微镜观察越橘花青素脂质体的形态,激光马尔文粒径仪测定其粒径分布。取 1 mL 脂质体并加 PBS 稀释 10 倍后,用移液枪吸取 1 滴于透射电镜样品专用铜网(直径 3 mm,200 目)上,加入 1 滴 2% 乙酰双氧铈溶液进行负染色,在室温放置 5 min,干燥后用透射电子显微镜观察。

1.3.3 脂质体储藏稳定性评价 将制备的越橘花青素脂质体于 4 °C 条件下保存,在一定的时间内(21 d)内测量其粒径和 pH 值的变化,分别用马尔文粒径仪和 pH 计测定。

1.3.4 细胞培养 人结肠癌细胞 Caco-2 细胞常规培养于含有 20% 胎牛血清、1% 双抗的 MEM 培养基中,置 37 °C、5% CO₂(相对湿度 90%)的培养箱中培养,1~2 d 更换 1 次培养液,待细胞密度 80% 时,用含有 0.25% 胰蛋白酶消化细胞。取对数生长期的细胞做试验。

1.3.5 细胞的毒性试验 研究越橘花青素及其脂

质体对细胞的抗氧化作用,需了解其作用于 Caco-2 细胞的安全浓度范围,在此范围进行后续试验^[23]。将对数生长期的 Caco-2 细胞按照 1.0×10⁵ cells/mL 的密度接种到 96 孔板中培养,每孔加入 100 μL 细胞悬液,在 37 °C、5% 二氧化碳恒温培养箱中培养 24 h,试验组中加入 10 μL 不同浓度的样品,将样品稀释,最终质量浓度分别为 20,50,100,150,200 μg/mL,每组设 6 个平行孔,同时设置空白组和对照组。共培养 12 h 后,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,继续培养 1~4 h,用酶标仪测光吸收值 A_{490 nm}。

1.3.6 越橘花青素脂质体对氧化损伤 Caco-2 细胞的保护作用 将对数生长期的 Caco-2 细胞按照 1.0×10⁵ cells/mL 的密度接种到 96 孔板中培养,每孔加入 100 μL 细胞悬液,于 37 °C、5% 二氧化碳恒温培养箱中培养 24 h。设置空白组、正常组、损伤组和保护组。以 200 μmol/L H₂O₂ 刺激诱导 12 h,保护组加入不同质量浓度(20,50,100,150,200 μg/mL)的越橘花青素脂质体,继续培养 6 h 并进行后续试验^[24]。

1.3.7 细胞内 ROS 水平的测定 细胞内 ROS 含量测定方法参照 DCFH-DA 荧光探针法^[23]。将对数期 Caco-2 细胞以 6×10⁵ cells/孔的密度接种于 6 孔板,置于 37 °C、5% 二氧化碳恒温培养箱中培养 48 h。设置正常组、损伤组、保护组。以 200 μmol/L H₂O₂ 刺激诱导 12 h,保护组加入不同浓度(20,50,100,150,200 μg/mL)的花青素脂质体溶液,继续培养 6 h。具体操作步骤根据试剂盒说明书,用荧光分光光度计检测各组细胞在激发波长 485 nm,发射波长 528 nm 处的荧光强度。

1.3.8 细胞内 MDA 含量的测定 MDA 是脂质过氧化的产物,其含量可以反映体内脂质过氧化程度^[25]。本试验采用丙二醛(MDA)检测试剂盒对 Caco-2 细胞中 MDA 含量进行测定。细胞按前述分组处理并培养,加入细胞裂解液,在冰上裂解细胞,获得样品。根据试剂盒方法操作,根据样品蛋白浓度计算 MDA 含量。

1.3.9 细胞内总抗氧化能力(T-AOC)的测定 T-AOC 可以反映机体抗氧化能力。采用总抗氧化能力检测试剂盒对 Caco-2 细胞中 T-AOC 的含量进行测定。细胞按前述分组处理并培养,收集细胞,

加入预冷的提取液,匀浆或超声以充分破碎细胞并释放其中的抗氧化物。获得的样品在4℃,10 000 r/min 条件下离心5 min,取上清液,待测。据样品蛋白浓度计算 T-AOC 含量。

1.3.10 细胞内抗氧化酶活性的测定 细胞按前述分组处理并进行培养后。收集细胞,离心后弃上清。加入提取液,超声破碎细胞,4℃,8 000×g 条件下离心10 min,取上清,置冰上,待测。根据 SOD 和 CAT 试剂盒方法操作,据样品蛋白浓度计算各抗氧化酶含量。

1.4 数据处理与与分析

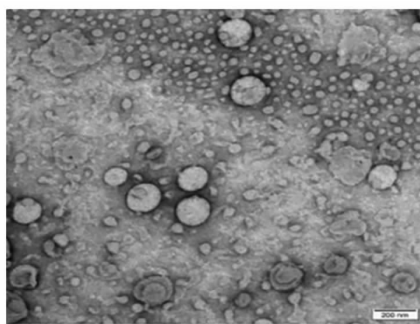
实验重复3次,结果用均值(means)±标准偏

差(SD)表示,采用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 26.0 软件进行绘图和结果数据统计分析, $P<0.05$ 为具有统计差异。

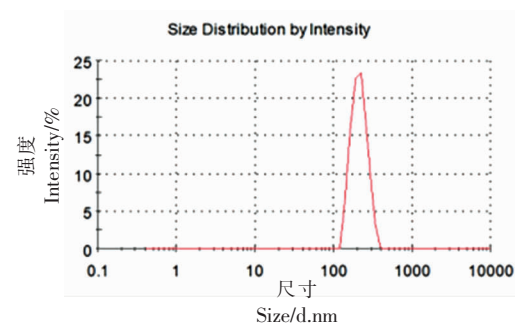
2 结果与分析

2.1 脂质体的表征

脂质体的形态和粒径分析采用透射电镜和马尔文粒径分析仪。如图1a所示,透射电镜结果显示脂质体呈球形分布,具有囊泡状结构。图1b为脂质体的分布。所得脂质体的平均粒径为 (213.2 ± 13.4) nm,多分散性指数(PDI)为 0.201 ± 0.026 。



(a)脂质体透射电镜观察图



(b)脂质体粒径分布图

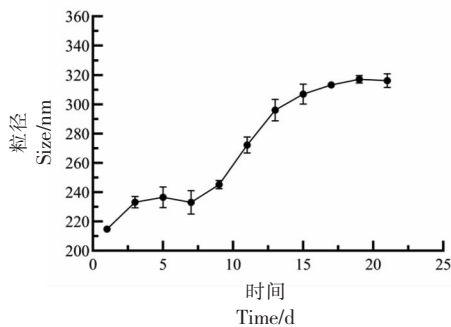
图1 花青素脂质体扫描电镜和粒径分布图

Fig.1 The image and size distribution of anthocyanins liposomes

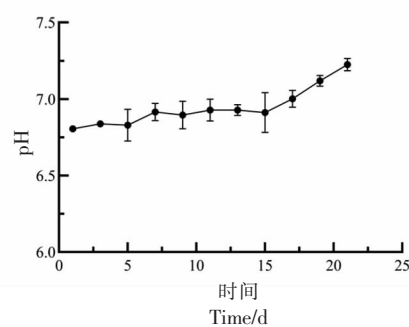
2.2 脂质体的稳定性

21 d 储存时间内花青素脂质体粒径和 pH 值变化见图2。随着储存时间的延长,越橘花青素脂质体的粒径呈上升趋势。0~7 d 内粒径缓慢增加,基本在230 nm左右,之后持续增加,稳定在320 nm左右。随着储存时间的增加,脂质体会因氧化

作用而聚集,从而导致其粒径变大^[26]。脂质体的 pH 值在0~15 d 处于相对稳定状态,15 d 后逐渐增大。所以,用于试验的脂质体每次均新鲜制备,以防止其特征及理化指标发生变化,减小试验误差。



(a)时间对脂质体粒径的影响



(b)时间对脂质体 pH 值的影响

图2 时间对脂质体粒径和 pH 的影响

Fig.2 Effect of time on the particle size and pH of liposomes

2.3 越橘花青素脂质体对 Caco-2 细胞的毒性情况

根据 CCK-8 法评估越橘花青素及其脂质体作用 Caco-2 细胞 12 h 后的细胞存活率, 见图 3。与对照组比, 20~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 越橘花青素及其脂质体对 Caco-2 细胞没有毒性作用, 可在此范围做后续试验研究。

2.4 越橘花青素脂质体对细胞氧化应激的保护作用

不同浓度的越橘花青素及其脂质体对处于氧化应激状态下的细胞存活率的影响见图 4。结果表明, 损伤组的 Caco-2 细胞经 H_2O_2 处理后生存率下降 ($P < 0.05$)。经不同浓度的越橘花青素脂质体处理的保护组, 细胞生存率呈上升趋势。同时, 越橘花青素脂质体对氧化损伤 Caco-2 细胞的保护作用存在剂量效应关系 ($P < 0.05$)。当越橘花青素脂质体质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞存活率 ($57.34 \pm 3.86\%$), 当其质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞存活率最高 ($84.17 \pm 2.49\%$), 高于花青素组的 ($74.33 \pm 4.42\%$)。在选取范围内, 越橘花青素脂质体浓度越高, 对细胞的保护效果越好。

2.5 越橘花青素脂质体对氧化损伤 Caco-2 细胞内 ROS 水平的影响

ROS 的积累会对细胞造成不同程度的损伤^[27]。采用 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内 ROS 水平的变化。DCFH-DA 进入细胞后, 被细胞内的酯酶水解生成 DCFH, 而细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光强度便可知道细胞内的活性氧水平。如图 5 所示, 与空白组相比, 氧化损伤组的荧光强度增强 ($P < 0.05$), 表明 ROS 含量增加。经不同质量浓度花青素脂质体 (20, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理的保护组, 荧光强度逐渐减弱, 在样品质量浓度达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后趋于平缓。结果显示, 花青素脂质体可以降低氧化损伤的细胞内 ROS 水平。

2.6 越橘花青素脂质体对氧化损伤 Caco-2 细胞内 MDA 含量的影响

MDA 是脂质过氧化的终产物, 其含量可间接反映细胞受活性氧自由基攻击的程度^[28]。经 H_2O_2 处理后, Caco-2 细胞中 MDA 含量升高 ($P < 0.05$)。经不同质量浓度花青素脂质体 (20, 50, 100, 150,

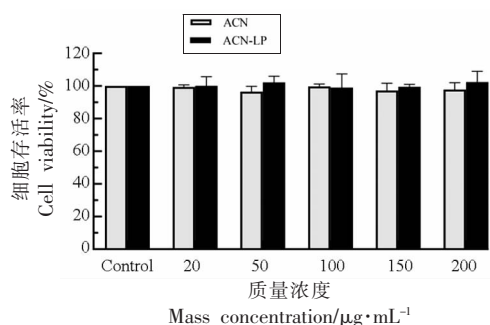
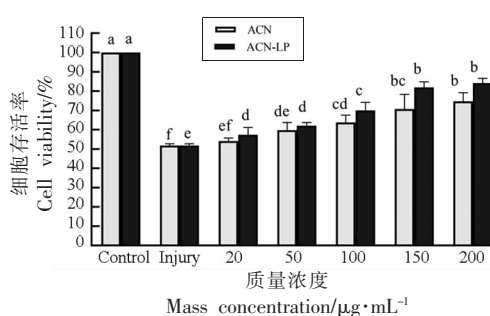


图 3 花青素及其脂质体对 Caco-2 细胞活性的影响

Fig.3 Effects of anthocyanins and anthocyanins liposomes on the activity of Caco-2 cells



注: 小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

图 4 花青素及其脂质体对 H_2O_2 损伤下 Caco-2 细胞的保护作用

Fig.4 Protective effect of anthocyanins and anthocyanins liposomes on Caco-2 cells under H_2O_2 injury

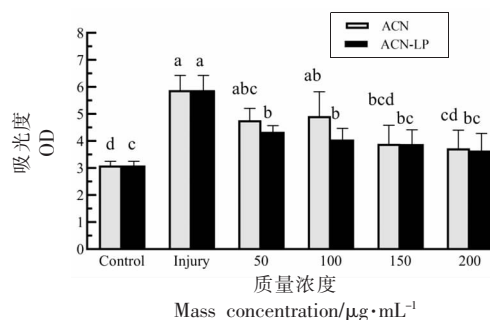


图 5 花青素及其脂质体处理 H_2O_2 损伤后各组 DCFH-DA 相对荧光强度

Fig.5 The relative fluorescence intensity of DCFH-DA in each group after the injury of H_2O_2 treated by anthocyanins and anthocyanins liposomes

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理后, 氧化损伤细胞内 MDA 含量呈递减趋势。相对于损伤组, 花青素和花青素脂质体在最大浓度组分别下降了 43.44%, 53.66%。结果显示, 花青素脂质体可以降低氧化损伤的细胞内

MDA 水平。

2.7 越橘花青素脂质体对氧化损伤 Caco-2 细胞内 T-AOC 含量的影响

总抗氧化能力测定结果见图 7。经不同质量浓度花青素脂质体 (20, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理后, 相对于损伤组, 处理组的抗氧化能力显著

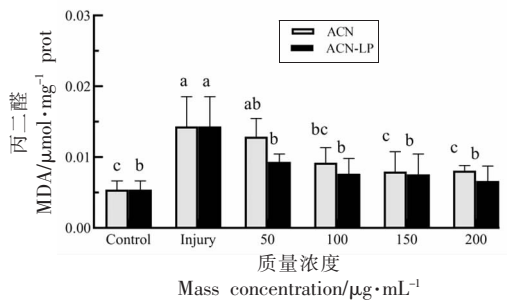
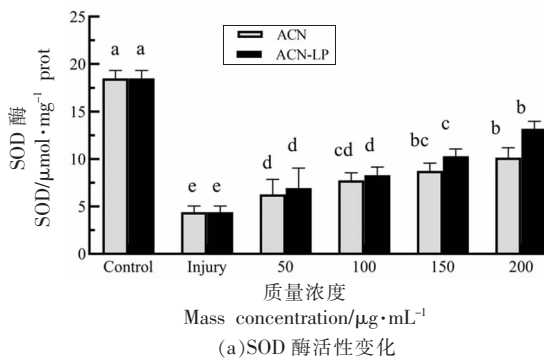


图 6 花青素及其脂质体处理 H_2O_2 损伤后各组 MDA 含量

Fig.6 The MDA content in each group after the injury of H_2O_2 treated by anthocyanins and anthocyanins liposomes

2.8 越橘花青素脂质体对氧化损伤 Caco-2 细胞内抗氧化酶的影响

细胞内源性抗氧化酶是氧化应激过程中的重要角色^[29-30]。经 H_2O_2 处理后, Caco-2 细胞中 SOD 和 CAT 的酶活性显著降低 ($P<0.05$)。经不同浓度紫菜薹乙醇提取物处理后, 氧化损伤细胞内 SOD



(a) SOD 酶活性变化

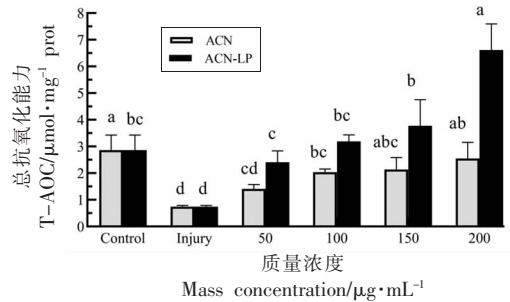
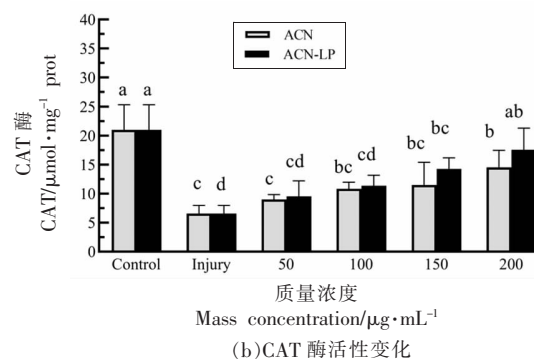


图 7 花青素脂质体处理 H_2O_2 损伤后各组 T-AOC 含量

The T-AOC content in each group after the injury of H_2O_2 treated by anthocyanins and anthocyanins liposomes

和 CAT 酶的活性增高。与损伤组比, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 花青素与花青素脂质体组的 SOD 酶活性分别提高了 5.76%, 8.79%; CAT 酶活性分别提高了 9.21%, 12.26%。花青素脂质体可以提高受损 Caco-2 细胞内抗氧化酶的活力。



(b) CAT 酶活性变化

图 8 花青素脂质体对 H_2O_2 损伤后各组抗氧化酶活性影响

Fig.8 The activity of antioxidant enzymes in each group after the injury of H_2O_2 treated by anthocyanins and anthocyanins liposomes

3 结论

花青素具有多种生物活性^[31-32], 然而, 容易受到外界作用而发生降解。以脂质体作为载体, 通过

囊泡状脂质体的封装和运载, 可以增加花青素的稳定性和生物利用率^[33-34]。本研究以脂质体为载体制备越橘花青素脂质体, 利用 H_2O_2 作用于 Caco-2

细胞,获得氧化损伤模型,研究越橘花青素脂质体对氧化应激损伤细胞的抗氧化作用。结果表明,越橘花青素经脂质体包裹后抗氧化活性有所提高,可显著提升受损细胞的生存率,抑制氧化损伤引发的细胞死亡。此外,越橘花青素经脂质体包裹后可进一步抑制氧化损伤细胞内 ROS 和 MDA 的生成,提高细胞中内源性抗氧化物酶系的活力和细胞总抗氧化能力,可以通过多种途径保护细胞^[24,35]。本结果为提高花青素利用率提供试验依据。

参 考 文 献

- [1] 杨婕琳, 赵东强. 消化系统恶性肿瘤与氧化应激关系的研究进展[J]. 胃肠病学, 2015, 20(2): 113-115.
YANG J L, ZHAO D Q. Advances in study on relationship between digestive system neoplasms and oxidative stress[J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2015, 20(2): 113-115.
- [2] 郭玉文, 曹婧然, 何立杰. 细胞水平的抗氧化机制研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(1): 13-16.
GUO Y W, CAO J R, HE L J. Research progress in antioxidation mechanism on cellular level[J]. Medical Recapitulate, 2016, 22(1): 13-16.
- [3] LI B, ZANI A, MARTIN Z, et al. Intestinal epithelial cell injury is rescued by hydrogen sulfide[J]. Journal of Pediatric Surgery, 2016, 51(5): 775-778.
- [4] WAN H, LIU D, YU X, et al. A Caco-2 cell-based quantitative antioxidant activity assay for antioxidants[J]. Food Chemistry, 2015, 175: 601-608.
- [5] MIN L, RUI G, MENG Q, et al. Toxic effects of maternal zearalenone exposure on intestinal oxidative stress, barrier function, immunological and morphological changes in rats[J]. Plos One, 2014, 9(9): e106412.
- [6] SRIDHAR K, CHARLES A L. *In vitro* antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 41-49.
- [7] REN C, XIONG W F, LI J, et al. Comparison of binding interactions of cyanidin-3-O-glucoside to β -conglycinin and glycinin using multi-spectroscopic and thermodynamic methods[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 92: 155-162.
- [8] SWER T L, CHAUHAN K. Stability studies of enzyme aided anthocyanin extracts from *Prunus nepalensis* L[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 102: 181-189.
- [9] YONG W, LIANG Z, FENG L, et al. Retinoprotective effects of bilberry anthocyanins via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms in a visible light-induced retinal degeneration model in pigmented rabbits[J]. Molecules, 2015, 20(12): 22395-22410.
- [10] 赵巧玲, 陈晓梅, 赵晋忠, 等. 黑豆种皮花色苷含量及抗氧化活性的测定[J]. 山西农业科学, 2017, 45(8): 1240-1243, 1267.
ZHAO Q L, CHEN X M, ZHAO J Z, et al. Determination of the anthocyanin content and antioxidant activity of black beans seed coat[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2017, 45(8): 1240-1243, 1267.
- [11] SVANBERG L, MALMBERG K, GUSTINELLI G, et al. Effect of anthocyanins on lipid oxidation and microbial spoilage in value-added emulsions with bilberry seed oil, anthocyanins and cold set whey protein hydrogels[J]. Food Chemistry, 2019, 272: 273-278.
- [12] SUN X Y, YAN Z C, ZHU T, et al. Effects on the color, taste, and anthocyanins stability of blueberry wine by different contents of mannoprotein[J]. Food Chemistry, 2019, 279: 63-69.
- [13] FERNANDES A, ROCHA M A A, SANTOS L, et al. Blackberry anthocyanins: beta-Cyclodextrin fortification for thermal and gastrointestinal stabilization [J]. Food Chemistry, 2018, 245: 426-431.
- [14] YANG W, KORTESNIEMI M, MA X Y, et al. Enzymatic acylation of blackcurrant (*Ribes nigrum*) anthocyanins and evaluation of lipophilic properties and antioxidant capacity of derivatives[J]. Food Chemistry, 2019, 281: 189-196.
- [15] STANYS V, BENDOKAS V, RUGIENIUS R, et al. Management of anthocyanin amount and composition in genus *Ribes* using interspecific hybridisation [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 247: 123-129.
- [16] RIGHI DA ROSA J, NUNES G L, MOTTA M H, et al. Microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium* spp.) by spray

- drying: Characterization, stability and simulated gastrointestinal conditions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89: 742–748.
- [17] 李洋, 王秀丽. 新乌头碱脂质体制备工艺的研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2018, 41(3): 216–221.
LI Y, WANG X L. Preparation technology for liposome of new aconitine[J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 41(3): 216–221.
- [18] NAEEM S, KIEW L V, CHUNG L Y, et al. Optimization of phospholipid nanoparticle formulations using response surface methodology[J]. *J Surfact Deterg*, 2016, 19: 67–74.
- [19] MONTEIRO N, MARTINS A, REIS R L, et al. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine[J]. *J R Soc Interface*, 2014, 11(101): 20140459.
- [20] RAVAR F, SAADAT E, KELISHADI P D, et al. Liposomal formulation for co-delivery of paclitaxel and lapatinib, preparation, characterization and optimization[J]. *J Liposome Res*, 2015, 26(3): 175–187.
- [21] LIU Y, AN X. Preparation, microstructure and function of liposome with light responsive switch[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 178: 238–244.
- [22] ZAHEDNEZHAD F, SAADAT M, VALIZADEH H, et al. Liposome and immune system interplay: Challenges and potentials[J]. *J Control Release*, 2019, 305: 194–209.
- [23] 马瑞, 刘晓兰, 刘祥. 玉米蛋白水解物对 Caco-2 细胞的抗氧化作用研究[J]. *食品工业*, 2019, 40(4): 180–183.
MA R, LIU X L, LIU X. Study of caco-2 cells on the antioxidant of corn protein hydrolysate[J]. *The Food Industry*, 2019, 40(4): 180–183.
- [24] QUAN Z, GUAN R, HUANG H, et al. Antioxidant activity and absorption of cyanidin-3-O-glucoside liposomes in GES-1 cells *in vitro*[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(6): 1239–1249.
- [25] CUSTODIO -MENDOZA J A, VALENTE M I, RAMOS M R, et al. Analysis of free malondialdehyde in edible oils using gas-diffusion microextraction[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2019, 82: 103254.
- [26] TANG L, ZHANG Y, QIAN Z, et al. The mechanism of Fe²⁺-initiated lipid peroxidation in liposomes; the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical[J]. *Biochemical Journal*, 2000, 352Pt 1(Pt 1): 27–36.
- [27] 张捷, 李发弟, 李爱军, 等. 赭曲霉毒素 A 诱导 Caco-2 细胞的细胞毒性及 DNA 损伤[J]. *甘肃农业大学学报*, 2016, 51(1): 18–23.
ZHANG J, LI F D, LI A J. The cytotoxic effects and DNA damage induced by ochratoxin A on Caco-2 cells[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2016, 51(1): 18–23.
- [28] WU F, LIU R, SHEN X, et al. Study on the interaction and antioxidant activity of theophylline and theobromine with SOD by spectra and calculation[J]. *Spectrochimica Acta Part A -Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 215: 354–362.
- [29] CASIMIRRI E, STENDARDO M, BONCI M, et al. Biomarkers of oxidative-stress and inflammation in exhaled breath condensate from hospital cleaners[J]. *Biomarkers*, 2016, 21(2): 115–122.
- [30] ZHAO P, ZHOU R, ZHU X Y, et al. Matrine attenuates focal cerebral ischemic injury by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in mice [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015, 36(3): 633–644.
- [31] SHI M, MATHAI M L, XU G Q, et al. The effects of supplementation with blueberry, cyanidin-3-O-β-glucoside, yoghurt and its peptides on obesity and related comorbidities in a diet-induced obese mouse mode[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 56: 92–101.
- [32] PHAN M A T, BUCKNALL M P, ARCOT J. Interferences of anthocyanins with the uptake of lycopene in Caco-2 cells, and their interactive effects on anti-oxidation and anti-inflammation *in vitro* and *ex vivo*[J]. *Food Chemistry*, 2019, 276: 402–409.
- [33] GUADA M, LASA -SARACIBAR B, LANA H. Lipid nanoparticles enhance the absorption of cyclosporine A through the gastrointestinal barrier: *In vitro* and *in vivo* studies[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 500(1/2): 154–161.
- [34] 张婵, 李小东, 王成涛. 豆豉纤溶酶纳米脂质体的肠吸收效率研究[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(6): 28–35.
ZHANG C, LI X D, WANG C T. Intestinal absorption efficiency of fibrinolytic nanoliposomes from fer-

mented soybean[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(6): 28-35.
[35] 陈佩, 党辉. 干酪乳杆菌对 HepG2 细胞抗氧化功能的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(11): 220-224.

CHEN P, DANG H. Effect of *Lactobacillus casei* on antioxidant function of Hep G2 cells[J]. Food Science, 2017, 38(11): 220-224.

The Antioxidative Activity of Lingonberry Anthocyanin Liposomes on Caco-2 Cells

Chen Yujie¹, Guan Rongfa^{2*}, Huang Haizhi¹, Zhong Hao², Sun Yujing², Zhang Wei²

(¹College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018

²College of Food Science and Technology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

Abstract To investigate the effect of lingonberry anthocyanins liposomes on the antioxidant function of Caco-2 cells under oxidative stress. Methods: A mixture of soy lecithin and cholesterol was used to prepare lingonberry anthocyanins liposomes by the thin film dispersion method and to evaluate their stability. A model of hydrogen peroxide-induced oxidative damage in Caco-2 cells was established to evaluate the protective effect of lingonberry anthocyanins liposomes on oxidatively damaged cells. Results: The lingonberry anthocyanin liposomes showed a smooth surface spherical structure with an average particle size of (213.2 ± 13.4) nm and a polydispersity index (PDI) of 0.201 ± 0.026 . The particle size and pH of anthocyanins liposomes increased gradually after a period of time with the increase of storage time. At the concentration of 200 μ g/mL, the survival rate of oxidatively damaged cells was 74.33% and 84.17% in the anthocyanins group and anthocyanins liposomes group, respectively; the content of ROS in oxidatively damaged cells decreased by 36.58% and 38.02%, respectively; the content of MDA decreased by 43.44% and 53.66%, respectively; the content of T-AOC increased by 3.42 and 8.89 times, respectively. SOD enzyme activity increased by 5.76%, 8.79%; CAT enzyme activity increased by 9.21%, 12.26%, respectively. Conclusion: Liposomes as carriers improve the biological activity of lingonberry anthocyanins, and lingonberry anthocyanins liposomes can reduce the levels of MDA and ROS in damaged cells, improve the survival rate of oxidatively damaged cells and enhance the activity of endogenous antioxidant enzymes and thus play an antioxidant role.

Keywords Lingonberry anthocyanins; liposome; antioxidative activity; Caco-2 cells