

基于氧化应激的固态发酵白酒抑制肝癌 HepG2 细胞增殖

周琦¹, 管祺杰², 耿燕^{1*}

¹江南大学生命科学与健康工程学院 江苏无锡 214122

²江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心 江苏无锡 214122)

摘要 探究固态酿造浓香型白酒(NX)和酱香型白酒(JX)抑制肝癌细胞 HepG2 增殖的作用机制。采用细胞计数试剂盒 8 (CCK8)法评价细胞增殖,用试剂盒检测乙醇脱氢酶(ADH)、过氧化氢酶(CAT)、黄嘌呤氧化酶(XOD)的酶活以及活性氧(ROS)和一氧化氮(NO)的含量评价 HepG2 氧化应激酶的水平,采用实时定量 PCR 检测氧化应激关键基因核因子 E2 相关因子 2(NRF2)及其下游基因醌氧化还原酶(NQO1)的表达。结果:100 mmol/L 乙醇(ETOH)浓度时 NX 和 JX 均能显著抑制 HepG2 的增殖,抑制率达 15%;JX(6.25~100 mmol/L ETOH)显著上调 HepG2 细胞内 XOD 和 CAT 的活力。ROS 检测发现在 12.5 mmol/L ETOH 时其含量达到峰值,且受 JX 影响较大。NX(6.25~100 mmol/L ETOH)较 JX 显著促进 NO 的生成。NX 和 JX(100 mmol/L ETOH)均可显著抑制 HepG2 胞内 NRF2 及其下游基因 HGO-1 的表达。用抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)抑制氧化应激反应后,NX 和 JX 抑制 HepG2 增殖的作用均消失,同时也阻断其对 NRF2 和 HGO-1 表达的调控。结论:NX 和 JX 均通过促进氧化应激抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖。

关键词 中国白酒; 肝癌; 氧化应激; 细胞模型

文章编号 1009-7848(2023)08-0060-07 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.007

中国白酒作为世界六大蒸馏酒之一,具有以酯类为主体的复合香味,在我国乃至世界都有着众多消费群体^[1]。根据风味特征,中国白酒有多种分类,浓香(NX)和酱香(JX)是其中的典范。JX 高度酒的体积分数一般为 53%,总酸含量大于 1.5 g/L,乙酸乙酯含量高于 2.5 g/L。NX 型高度酒的体积分数一般在 52%,乙酸含量在 0.5 g/L 与 1.7 g/L 之间,乙酸乙酯的含量通常高于 2.5 g/L^[2-4]。

世界卫生组织(WHO)指出全球每年约有 5.3%的死亡来自于有害使用酒精,并且也是多种疾病以及一些损伤症的致病因素之一^[5]。乙醇及其代谢产物乙醛为明确的致癌物质,可导致消化道肿瘤、肥胖及心血管疾病等^[6-10]。中国白酒并不等同于乙醇溶液。酿造白酒是一种由多种粮食制成的蒸馏酒,其生产工艺复杂,包括固体糖化、发酵、曾蒸馏、瓷瓶陈酿等。此外,酒曲作为糖化发酵剂,含有多种微生物和酶。复杂的酿造工艺和菌群为白酒功能成分的形成提供了丰富的物质基础。

目前研究发现白酒中含有大量的小分子生物活性化合物^[11]。吴寿岭等^[12]研究不同饮酒量对糖尿

病男性心脑血管事件的影响,结果发现,低饮酒组人群较不饮酒组及高饮酒组人群而言,其急性心肌梗死、脑梗死和脑出血发生率显著降低。赵明德等^[13]研究发现饮酒并不会引起小鼠血压的上升,另外适量饮酒还能减轻小鼠主动脉粥样硬化,这是由于适量饮酒会降低血液中纤维蛋白原浓度,减少血小板的聚集,提升血液高密度脂蛋白的浓度,进而缓解动脉粥样硬化^[14]。

在动物水平上有研究发现,白酒中风味物质能调节小鼠肠道菌群,减轻乙醇引起的肠屏障损伤,并改善宿主代谢^[15]。与此相似,白酒也被报道通过调节肠道菌群改善大鼠高脂饮食引起的代谢疾病^[16]。另外,肿瘤研究发现 JX 能改善二乙基亚硝胺诱导的小鼠肝细胞癌,显著降低 GPC3(肝癌的一个早期形成指标)表达量,并通过抗氧化因子的激活起到保护肝脏的作用^[17]。

KEAP1/NRF2 信号通路被证实参与细胞的氧化应激,其中核因子 E2 相关因子 2(Nuclear factor erythroid-2 related factor 2,NRF2)被发现在细胞的氧化应激中起重要作用。当细胞未受到氧化应激信号时,Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1,Keap1)会与 NRF2 结合,诱使 NRF2 泛素化降解;然而,在接收到氧化

收稿日期: 2022-08-14

第一作者: 周琦,男,硕士生

通信作者: 耿燕 E-mail: gengyan@jiangnan.edu.cn

应激信号后, NRF2 与 KEAP1 解离开, 进入细胞核, 进而影响下游信号, 以此调控细胞内氧化应激反应^[18-19]。有研究发现 NX 中含有的 4-甲基愈创木酚和 4 乙基愈创木酚会通过此信号通路参与细胞的氧化应激^[20-21]。

另外, 有研究分别将 NX 和 JX 与相同浓度 ETOH 作用于人肿瘤细胞, 证实不论 NX 还是 JX 都表现出对肿瘤细胞 Pol III 基因转录、细胞增殖和集落形成的抑制作用^[22]。不同白酒抑制肿瘤细胞增殖的作用机制不一致。本研究以人肝癌细胞 HepG2 为对象, 比较同等浓度 ETOH、JX 与 NX 作用细胞后对其增殖及氧化应激水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝癌细胞系 HepG2, 中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心。

乙醇(色谱级), 国药集团, 酱香型白酒为贵州茅台酒样(53%); 浓香型白酒酒样为“国窖·1573”(52%)。

CCK8 试剂盒, 碧云天生物技术公司; 乙醇脱氢酶(ADH)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、过氧化氢酶(CAT)、活性氧(ROS)、一氧化氮(NO)试剂盒均订购于南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

CFX Connect 荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad; VE-180 垂直电泳槽、VE-186 转移电泳槽, 天能科技有限公司; 恒温 CO₂ 细胞培养箱, 美国赛默飞公司; Nanodrop2000, 美国赛默飞公司。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞培养与传代 细胞生长完全培养基: 90 mL RPMI 1640 培养基, 10 mL 特级胎牛血清 FBS, 1 mL 双抗。细胞培养在 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中。

当细胞密度达 80%~90% 时进行传代操作, 弃废弃的完全培养基, 并用 DPBS 洗 3 次, 加入胰酶消化 3 min, 后续使用完全培养基终止消化, 收集细胞于离心管中, 离心(800×g)3 min。将得到的沉淀重新用完全培养基重悬, 并以 1:3 比例转至大皿中培养。传至第 3 代以后进行后续试验。

试验组分为 3 组, 分别为 50% 乙醇组(ETOH), 酱香型酒样组(JX)和浓香型酒样组(NX)。

1.3.2 CCK8 法检测细胞增殖 当细胞生长至 90% 时, 进行细胞传代操作, 加入完全培养基, 对消化得到的细胞进行重悬, 以 2×10^4 个/mL 铺至 96 孔板, 每孔加入完全培养基 100 μ L, 边缘孔每孔加适量 DPBS 防止液体蒸发。在 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中孵育 12 h, 接着继续给药 72 h。结束给药后用含 10% CCK8 的完全培养基孵育 2 h, 用酶标仪在波长 450 nm 处检测吸光度。

1.3.3 乙醇脱氢酶、过氧化氢酶和黄嘌呤氧化还原酶酶活测定 预先以 3×10^4 个/mL HepG2 细胞均匀铺于 6 孔板中, 给药培养 72 h。之后将废液吸出, 每孔加 DPBS 洗涤细胞, 重复 3 次。使用胰酶消化细胞, 以 400 μ L DPBS 重悬。将细胞悬液装入 1.5 mL EP 管中, 在液氮-室温环境下反复冻融 3 次以破坏细胞膜释放胞内物质, 后续采用试剂盒标注方法测试。

1.3.4 活性氧含量测定 将细胞均匀铺在 96 孔板中, 培养 72 h, 待细胞密度达 80%~90%, 将废液吸出, 每孔加 100 μ L DPBS 洗涤细胞 3 次, 给药后继续培养 24 h。将废液吸出, DPBS 洗涤细胞后加入 100 μ L 10 μ mol/L DCFH-DA 培养基孵育 1 h, 收集细胞后离心, 取沉淀, 用于荧光检测。

1.3.5 一氧化氮含量测定 使用 96 孔板培养 HepG2 细胞, 在恒温箱中培养 72 h, 待细胞长满后, 吸出 100 μ L 细胞培养液, 后使用试剂盒标注方法测定 NO 含量。

1.3.6 荧光实时定量 PCR 将 HepG2 细胞以 3×10^4 个/mL 密度均匀铺在 6 孔板中, 共分为 4 组, 即 CTL(对照组)、ETOH、NX 和 JX。均按 ETOH 浓度 100 mmol/L 给药细胞 72 h, 采用 Trizol 法提取 HepG2 细胞的总 RNA, 并用 DEPC 水完全溶解。采用微量分光光度计(Nanodrop)测定 RNA 浓度, 进行 cDNA 扩增, 最后通过 SYBR green 扩增测定 Ct 值。基因引物序列参见表 1。

1.3.7 统计学分析 本试验中数据以平均值 \pm 标准偏差表示, 采用单因素方差法分析(ANOVA)及图基(Tukey)事后检验法分析各组间差异, *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$ 表示统计学上存在显著性差异。

表1 引物序列

Table 1 The sequence of the primer pairs	
基因名称	引物序列(5'-3')
NRF2	5'-TCAGCGACGGAAAGAGTATGA-3'
	5'-CCACTGGTTTCTGACTGGATGT-3'
NQO1	5'-GAAGAGCACTGATCGTACTGGC-3'
	5'-GGATACTGAAAGTTCGCAGGG-3'
GAPDH	5'-TGTGGGCATCAATGGATTGG-3'
	5'-ACACCATGTATTCCGGGTCAAT-3'

2 结果和分析

2.1 不同乙醇含量的白酒对 HepG2 细胞增殖的影响

不同 ETOH 浓度的 NX 和 JX 对 HepG2 细胞增殖的影响见图 1。在 100 mmol/L ETOH 浓度下, ETOH 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用并不显著, 而 NX 和 JX 均显著抑制 HepG2 的增殖, 抑制率达 15%, 推测除白酒中存在具有抑制 HepG2 细胞增殖的物质。

2.2 白酒对 HepG2 细胞内乙醇脱氢酶的影响

ADH 大量存在于哺乳动物的肝脏细胞中, 能协助肝脏细胞代谢乙醇, 代谢产物经过一系列反应参与三羧酸循环并以二氧化碳和水的形式排出体外。由图 2 可知, 随着 ETOH 浓度的增加, ETOH、JX 和 NX 都可显著提高细胞内 ADH 的活力, 三者在同一浓度下对 ADH 活力的调控差异并不显著, 这表明 ADH 的酶活可能与白酒中 ETOH 浓度有关, 而受白酒中其它物质的影响较小。

2.3 白酒对 HepG2 细胞内氧化应激酶的影响

为探究不同风味白酒抑制 HepG2 细胞增殖与氧化应激的关系, 分别检测 HepG2 内 CAT、XOD 酶活以及 ROS 和 NO 含量。

CAT 是几乎暴露于氧气的生物体(如细菌, 植物和动物)中发现的一种最常见的酶, 其催化过氧化氢分解成水和氧, 是保护细胞免受 ROS 氧化损伤的非常重要的酶。如图 3 所示, JX 对 HepG2 中 CAT 的影响显著性高于 NX 和 ETOH, 在 50 mmol/L ETOH 浓度下, 各组 CAT 相对酶活达到峰值, JX 处理组的 CAT 活力较 ETOH 组与 NX 组上调近 3.5 倍。在 100 mmol/L ETOH 浓度时, 各组 CAT 活力较 50 mmol/L ETOH 浓度时略微下降, 而 JX 处理组较 NX 组 CAT 活力上调 7.7 倍, 较

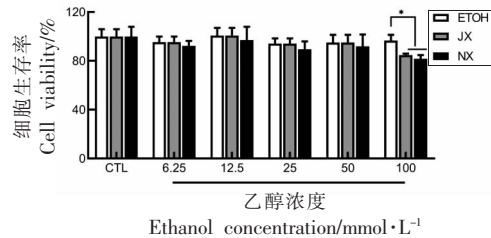


图1 白酒对 HepG2 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of Baijiu on cell proliferation of HepG2 cells

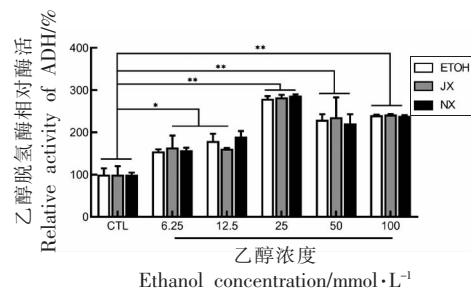


图2 白酒对 HepG2 胞内乙醇脱氢酶活力的影响

Fig.2 Effect of Baijiu on intracellular ADH activity of HepG2

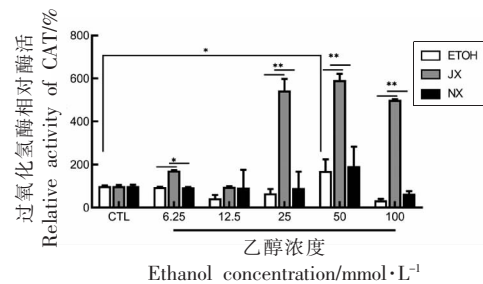


图3 白酒对 HepG2 胞内过氧化氢酶活力的影响

Fig.3 Effect of Baijiu on intracellular CAT activity of HepG2 cells

ETOH 组上调 15 倍。

XOD 是黄嘌呤氧化还原酶的一种形式, 它是一种产生活性氧的酶。如图 4 所示, 除 25 mmol/L ETOH 浓度外, JX 组在各浓度下对 HepG2 细胞中 XOD 活力的影响均显著高于 NX。

ROS 作为线粒体电子传递链的副产物, 在氧化应激反应时不断产生。过量的 ROS 水平会通过产生单一或双重损伤 DNA 嘌呤, 嘧啶或脱氧核糖修饰。DNA 交联和 DNA 甲基化模式的修饰, 以此

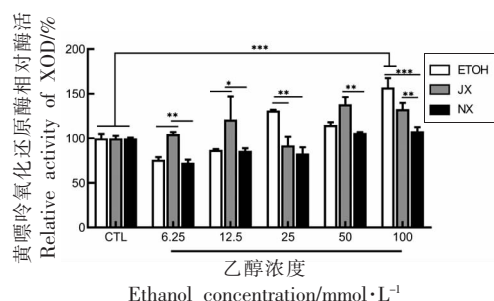


图 4 白酒对 HepG2 胞内黄嘌呤氧化还原酶活力的影响

Fig.4 Effect of Baijiu on intracellular XOD activity of HepG2

对细胞产生影响。检测结果如图 5 所示, ETOH、JX 和 NX 对胞内 ROS 含量的促进作用在 12.5 mmol/L ETOH 浓度下达到峰值, 且 JX 显著高于 NX, 然而, 在更高的 ETOH 浓度下 JX 和 NX 对 ROS 的影响无显著性差异。

部分免疫反应发生时, 能产生大量的诱导型 NOS 和超氧化物阴离子自由基, 进而合成大量的 NO 和 H_2O_2 , 因此检测 NO 可反映细胞氧化应激水平。如图 6 所示, NX 与 JX 相比, 在各浓度下都有着更强的促进 HepG2 细胞生成 NO 的能力。另外, 当 ETOH 浓度达 100 mmol/L, JX 较 ETOH 也有显著性的差异。

2.4 白酒通过调节 *NRF2* 及其下游 *NQO1* 表达参与氧化应激

NRF2 是调节细胞氧化应激的重要调控基因, *NQO1* 为其下游关键基因。ETOH 下调部分 *NRF2* 和 *NQO1* 的表达, 而 NX 及 JX 引起的抑制作用更加明显, *NRF2* 的表达被显著抑制, 约为对照组的 40%。同样的, NX 和 JX 也抑制了 *NQO1* 的表达, 并且两者的抑制率达到 50% (图 7)。

2.5 *N*-乙酰半胱氨酸阻断白酒引起的 HepG2 细胞凋亡

N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 作为谷胱甘肽的前体, 因内部带有的巯基能与氧自由基结合, 故其能显著降低氧化应激相关酶的酶活^[23]。给予 NAC 后, 不论 NX 还是 JX 对 HepG2 细胞增殖的抑制效果都受到阻断, 如图 8。同样的, NAC 也阻断 JX 和 NX 引起的 *NRF2* 和 *NQO1* 表达水平的降低。这一结果说明白酒通过抑制 *NRF2* 及其下游

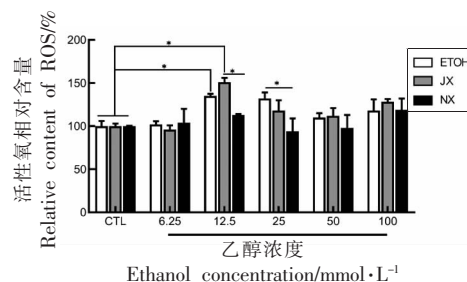


图 5 白酒对 HepG2 胞内活性氧产生的影响

Fig.5 Effect of Baijiu on intracellular ROS of HepG2

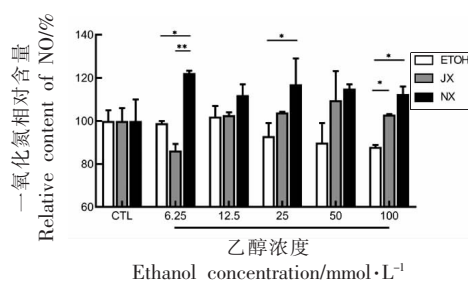


图 6 白酒对 HepG2 细胞一氧化氮产生的影响

Fig.6 Effect of Baijiu on NO production of HepG2 cells

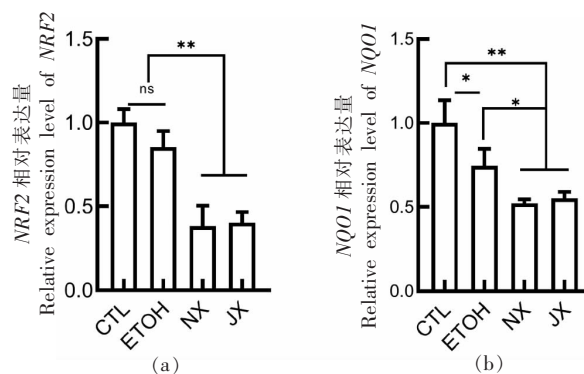


图 7 白酒对 HepG2 细胞 *NRF2* 和 *NQO1* 表达影响

Fig.7 Effect of Baijiu on the gene expression of *NRF2* and *NQO1* in HepG2 cells

NQO1 基因的表达参与 HepG2 细胞的氧化应激反应, 进而发挥抑制增殖的作用。

3 结论

白酒按香型分大致分为 12 种, 其中 NX 和 JX

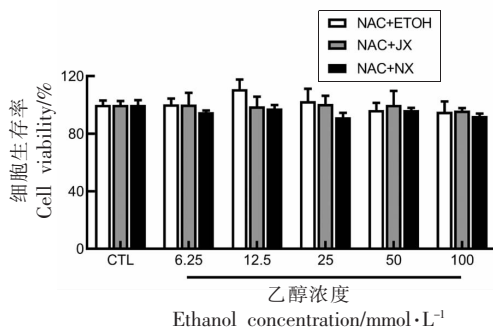


图8 *N*-乙酰半胱氨酸协同白酒对 HepG2 增殖的影响
Fig.8 Effect of Baijiu on proliferation of HepG2 after treated with NAC

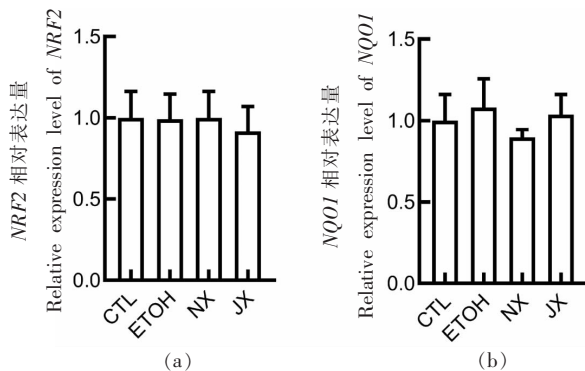


图9 *N*-乙酰半胱氨酸联合白酒对 *NRF2* 和 *NQO1* 表达的影响

Fig.9 Effect of Baijiu on the gene expression of *NRF2* and *NQO1* in HepG2 cells after treatment with NAC

占市场份额最大。近几年,越来越多的研究发现这两种香型白酒的价值。有研究发现 JX 经氯仿提纯得到的有机化合物能有效提高细胞抗氧化损伤能力^[24]。有研究以小鼠肝实质细胞为对象,发现 NX 和 ETOH 对细胞脂质代谢存在显著性差异,提示 NX 中的某些物质对肝脏脂质代谢存有一定益处^[25]。也有研究发现 NX 中存有微量活性物质 4-甲基愈创木酚和 4-乙基愈创木酚,影响 HepG2 细胞的氧化应激反应^[20-21]。

本研究发现,当 ETOH 浓度为 100 mmol/L 时 JX 和 NX 都显著抑制 HepG2 细胞的增殖,抑制率达 15%。为探究 JX 和 NX 抑制 HepG2 增殖的机制,分别检测 ADH、CAT、XOD、ROS 和 NO,结果发现 JX 较 NX 和 ETOH 显著性提高 CAT 与 XOD 的酶活,而 NX 处理 HepG2 后显著促进 NO 的生

成。另外,发现 JX 和 NX 在 100 mmol/L ETOH 浓度下能显著抑制 HepG2 内 *NRF2* 和 *NQO1* 的表达。同时氧化应激抑制剂 NAC 能阻断 JX 和 NX 引起的细胞增殖抑制以及 *NRF2* 和 *NQO1* 表达的下调,说明 JX 和 NX 通过调节 *NRF2* 和 *NQO1* 参与氧化应激反应。

总之,一定浓度的 NX 和 JX 能抑制 HepG2 增殖,并伴随着 *NRF2* 和 *NQO1* 表达下调。NX 主要通过促进 NO 的生成,而 JX 通过加强 CAT 和 XOD 活力调控氧化应激反应。推测这一差异主要在于 NX 和 JX 的酿造工艺及原材料不同,NX 和 JX 存在不同的物质基础,包括多元醇、不饱和脂肪酸以及一些芳香族化合物等^[26]。尽管本研究发现白酒对人肿瘤细胞 HepG2 有一定抑制增殖作用,而过度饮酒会引起消化系统疾病,诱导酒精性肝病。在未来研究中应关注白酒内的活性物质,挖掘白酒抗肝癌细胞增殖的物质基础及作用机制。

参 考 文 献

- [1] 宋书玉. 一组数据照出中国酒业“发展生态”[J]. 中国酒, 2021, 267(5): 40-45.
SONG S Y. A set of data reveals the ‘development ecology’ of China’s wine industry [J]. China Wine, 2021, 267(5): 40-45.
- [2] 孙宝国, 吴继红, 黄明泉, 等. 白酒风味化学研究进展[J]. 中国食品学报, 2015, 15(9): 1-8.
SUN B G, WU J H, HUANG M Q, et al. Advances of flavor chemistry in Chinese liquor spirits (Baijiu)[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(9): 1-8.
- [3] 汪地强, 严腊梅. 白酒分析检测发展[J]. 酿酒, 2007, 34(2): 28-32.
WANG D Q, YAN L M. The development in Chinese liquor analysis [J]. Liquor Making, 2007, 34(2): 28-32.
- [4] 孙宝国, 黄明泉, 王娟. 白酒风味化学与健康功效研究进展[J]. 中国食品学报, 2021, 21(5): 1-13.
SUN B G, HUANG M Q, WANG J. Research progress on flavor chemistry and healthy function of Baijiu [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(5): 1-13.
- [5] World Health Organization. Alcohol [EB/OL]. (2022-

- 05-09) [2022-02-14]. <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>.
- [6] BAAN R, STRAIF K, GROSSE Y, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages [J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8(4): 292-293.
- [7] LEVIT L A, PEREZ R P, SMITH D C, et al. Streamlining adverse events reporting in oncology: An American society of clinical oncology research statement[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(6): 617-623.
- [8] LOCONTE N K, BREWSTER A M, KAUR J S, et al. Alcohol and cancer: A statement of the American society of clinical oncology[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(1): 83-93.
- [9] PENG Q, CHEN H, HUO J R. Alcohol consumption and corresponding factors: A novel perspective on the risk factors of esophageal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(5): 3231-3239.
- [10] ZHAO J H, ZHU Y, WANG P P, et al. Interaction between alcohol drinking and obesity in relation to colorectal cancer risk: A case-control study in Newfoundland and Labrador, Canada[J]. *Bmc Public Health*, 2013, 122: 182-186.
- [11] HONG J X, ZHAO D R, SUN B G. Research progress on the profile of trace components in Baijiu [J]. *Food Reviews International*, 2021, 39(3): 1666-1693.
- [12] 吴寿岭, 张倩, 戚长春, 等. 饮酒对男性糖尿病患者人群心脑血管事件的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2011, 19(11): 1065-1069.
- WU S L, ZHANG Q, QI C C, et al. Effect of alcohol consumption on cardio-cerebrovascular events in male diabetic population [J]. *Chinese Journal of Hypertension*, 2011, 19(11): 1065-1069.
- [13] 赵明德, 肖顺汉, 陈美娟, 等. “国窖·1573”对动物心血管系统的影响[J]. *酿酒科技*, 2005, 26(8): 51-53.
- ZHAO M D, XIAO S H, CHEN M J, et al. Effects of ‘National Pits·1573’ liquor on animal cardiovascular system [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2005, 26(8): 51-53.
- [14] GIUSEPPE L, MASSIMO F, MASSIMO F, et al. Beyond the French paradox: The impact of moderate beverage alcohol and wine consumption in the prevention of cardiovascular disease [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2010, 36(1): 59-70.
- [15] FANG C, DU H, ZHENG X, et al. Solid-state fermented Chinese alcoholic beverage (Baijiu) and ethanol resulted in distinct metabolic and microbiome responses[J]. *FASEB J*, 2019, 33(6): 7274-7288.
- [16] ZHAO L, OUYANG H Y, ZHANG N H, et al. Effects of Huangjiu, Baijiu and Red Wine combined with high-fat diet on glucose and lipid metabolism: Aggravate or alleviate? [J]. *Alcohol and Alcoholism*, 2021, 56(3): 334-347.
- [17] YI X, LONG L, YANG C, et al. Maotai ameliorates diethylnitrosamine-initiated hepatocellular carcinoma formation in mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93599.
- [18] DIETZ B M, LIU D T, HAGOS G K, et al. *Angelica sinensis* and its alkylphthalides induce the detoxification enzyme NAD (P)H: Quinone oxidoreductase 1 by alkylating keap1[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, 21(10): 1939-1948.
- [19] ITOH K, TONG K I, YAMAMOTO M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 36(10): 1208-1213.
- [20] 张倩, 朱婷婷, 黄明泉, 等. 白酒中两种萜烯类化合物的细胞内抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2020, 41(9): 66-73.
- ZHANG Q, ZHU T T, HUANG M Q, et al. Intracellular antioxidant activity of two terpenoids in Baijiu[J]. *Food Science*, 2020, 41(9): 66-73.
- [21] ZHAO D R, SHI D M, SUN J Y, et al. Quantification and cytoprotection by vanillin, 4-methylguaiacol and 4-ethylguaiacol against AAPH-induced abnormal oxidative stress in HepG2 cells [J]. *Rsc Advances*, 2018, 8(62): 35474-35484.
- [22] YI Y, LEI J, SHI G, et al. The effects of liquor spirits on RNA Pol III genes and cell growth of human cancer lines [J]. *Food and Nutrition Sciences*, 2018, 9(3): 208-220.
- [23] 王红学, 朱清静, 张玉娟, 等. 异甘草酸镁联合乙酰半胱氨酸治疗药物性肝损伤患者血清氧化应激指标的改变 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2020, 23(2): 227-230.
- WANG X H, ZHU Q J, ZHANG Y J, et al. Efficacy of cetylcysteine combined with magnesium isoglycyrrhizinate in treatment of patients with drug-induced liver injuries [J]. *Journal of Practical Hepatolo-*

- gy, 2020, 23(2): 227–230.
- [24] 罗强, 刘杰, 刘志刚. 酱香型白酒中活性成分的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(23): 84–89.
- LUO Q, LIU J, LIU Z G. Antioxidant activity of active components in Maotai-flavor liquor[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(23): 84–89.
- [25] 华进, 郑自强, 杨荣, 等. 浓香型白酒和酒精差异性影响肝脂质水平研究[J]. 西南师范大学学报, 2022, 47(2): 56–62.
- HUA J, ZHENG Z Q, YANG R, et al. Investigation in principle on differential impacts of strong-flavor liquor and pure ethanol on hepatic lipid level[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition), 2022, 47(2): 56–62.
- [26] 丁海龙, 敖灵, 邓波, 等. 中国白酒微量健康成分分析[J]. 中国酿造, 2018, 37(2): 11–14.
- DING H L, AO L, DENG B, et al. Analysis of trace healthy components of Chinese Baijiu[J]. China Brewing, 2018, 37(2): 11–14.

Solid-state Fermented Baijiu Based on Oxidative Stress Inhibits the Proliferation of HepG2 Cells in Liver Cancer

Zhou Qi¹, Guan Qijie², Geng Yan^{*}

¹School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

²National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu)

Abstract The aim of this study was to explore the inhibitory mechanism of solid-state fermented Chinese alcoholic beverage Luzhou-flavor baijiu (NX) and Maotai-flavor baijiu (JX) on the cell proliferation of hepatoma cell line HepG2. CCK-8 (Cell Counting Kit 8) method was used to evaluate the cell proliferation of HepG2. The activity of alcohol dehydrogenase (ADH), catalase (CAT), xanthine oxidase (XOD) and the contents of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) were detected by kit to evaluate the oxidative stress response. The gene expression level of Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*NRF2*) and NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*) was measured by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). Results: Compared with 100 mmol/L ethanol, NX and JX significantly inhibited HepG2 proliferation. JX (6.25–100 mmol/L) had a higher promoting effect than NX on regulation of the XOD and CAT. However, NX (6.25–100 mmol/L) significantly enhanced the production of NO than JX. Both NX and JX (100 mmol/L) decreased the gene expression of *NRF2* and *NQO1* in HepG2. Treatment with the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) abolished the inhibition of cell proliferation and the down-regulation of *NRF2* and *NQO1* induced by both JX and NX. Conclusion: Both Luzhou-flavor and Maotai-flavor baijiu may inhibit the proliferation of hepatoma cell line HepG2 through oxidative stress.

Keywords Chinese Baijiu; hepatocellular carcinoma; oxidative stress; cell model