

## 基于 HeLa 细胞模型探究植物乳杆菌 CY1-2 的抗氧化机理

武文玉<sup>1</sup>, 张艳芳<sup>1</sup>, 白凤翎<sup>1</sup>, 吕欣然<sup>1\*</sup>, 崔方超<sup>1</sup>, 檀茜倩<sup>1</sup>, 励建荣<sup>1,3</sup>, 李英美<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心

辽宁省高等学校生鲜食品产业技术研究院 辽宁锦州 121013

<sup>2</sup>达莲食品(锦州)有限公司 辽宁锦州 121019

<sup>3</sup>大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034)

**摘要** 建立植物乳杆菌 CY1-2 保护偶氮二异丁脒盐酸盐(ABAP)损伤 HeLa 细胞模型,利用细胞增殖试验、细胞形态学观察及免疫印迹试验探究植物乳杆菌 CY1-2 的细胞保护机制。结果表明,当菌液浓度为 10<sup>8</sup> CFU/mL 的植物乳杆菌 CY1-2 保护细胞 3 h 后,再用浓度为 110 mmol/L 的 ABAP 损伤细胞 3 h。在此模型条件下,植物乳杆菌 CY1-2 菌体及无细胞提取物均能有效提高 HeLa 细胞的存活能力,细胞存活率分别提高 9.41% 和 25.71%。通过显微镜观察发现,与损伤组相比,经植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物保护的 HeLa 细胞大而饱满,边缘清晰且伸展性好。免疫印迹试验表明,与损伤组相比,植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物能够正向调控 HeLa 细胞的 kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Keap1)、核因子 E2-相关因子(Nrf2)和血红素加氧酶-1(HO-1)蛋白表达量,分别提高了 18%,47%和 58%。植物乳杆菌 CY1-2 保护 ABAP 氧化损伤 HeLa 细胞的机制是激活细胞 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路,提高其抗氧化能力。本研究结果为开发乳酸菌抗氧化剂提供一定的理论依据。

**关键词** 植物乳杆菌; 氧化损伤; HeLa 细胞模型; 抗氧化

**文章编号** 1009-7848(2024)08-0092-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.009

乳酸菌具有完整的抗氧化评价体系,包括体内和体外抗氧化试验两方面,体外试验包括化学方法测定抗氧化指标及建立细胞模型评价抗氧化能力,体内试验包括动物实验和人体试验<sup>[1-2]</sup>。近年来,学者们常用细胞模型评估乳酸菌的抗氧化活性,细胞培养相较于体内试验,具有选择范围广,节约时间和成本低等优点,并且细胞模型可以有效模拟机体的生理条件,将研究提高至生物层面,更全面地反映乳酸菌的抗氧化能力<sup>[3]</sup>。因此,细胞模型成为评估乳酸菌抗氧化活性的一个有效方法<sup>[4]</sup>。HeLa 细胞是一种宫颈癌细胞,增殖异常迅速,并且可以无限分裂。有研究表明,人体内自由基形成和抗氧化剂之间一旦失衡,会损伤细胞导致疾病,甚至引发宫颈癌等恶性肿瘤<sup>[5]</sup>,因此,可选择人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞评价乳酸菌的抗氧化功能。

植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)是一种同型发酵乳酸菌,菌株多为杆状,主要分布于肉制品、乳制品、发酵蔬菜以及动物肠道等环境<sup>[6]</sup>。其具有免疫调节作用,抑菌作用,维持肠道菌群平衡等优点,在医药领域及食品工业中被广泛应用<sup>[7-8]</sup>。此外,将一些具有抗氧化活性的植物乳杆菌应用在发酵产品中,不仅能延缓其氧化,保证食品安全,还能改善其风味。Hariri 等<sup>[9]</sup>研究表明,二型糖尿病患者通过每日补充含有植物乳杆菌的乳酸菌豆奶,一段时间后其体内的抗氧化酶水平显著提高,证明植物乳杆菌具有一定的抗氧化作用。本课题组前期从草鱼肠道筛选出一株抗氧化活性较好的植物乳杆菌 CY1-2,其无细胞提取物对羟自由基、超氧阴离子和抗脂质过氧化率分别为 64.27%,21.97%和 51.03%<sup>[10]</sup>。然而,对其抗氧化活性研究仅停留在基础指标阶段,缺乏对其作用机制及具体抗氧化物质的深入探讨。

本文以偶氮二异丁脒盐酸盐(ABAP)为氧化诱发剂,诱导人宫颈癌 HeLa 细胞氧化损伤,通过分析植物乳杆菌 CY1-2 保护 HeLa 细胞的菌液浓度和处理时间,构建植物乳杆菌 CY1-2 保护氧化损伤 HeLa 细胞模型,并利用该模型分析植物乳杆

**收稿日期:** 2023-08-23

**基金项目:** 辽宁省海洋经济发展规划“重点专项”(2021-84);辽宁省“兴辽英才计划”青年拔尖人才项目(XLYC1807133)

**第一作者:** 武文玉,女,硕士生

**通信作者:** 吕欣然 E-mail: lvxinran1990@163.com

菌 CY1-2 对 HeLa 细胞形态的影响,以及借助免疫印迹(Western blot)试验从分子水平探究植物乳杆菌 CY1-2 的抗氧化机制,为开发具有抗氧化作用的乳酸菌生物制剂提供一定的理论参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) CY1-2 由本实验室分离自草鱼肠道;鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG)、人宫颈癌细胞(HeLa)由学院微生物学与分子生物学实验室保藏。

DMEM(高糖)培养基, Hyclone(美国)公司;胎牛血清,杭州(四季青)生物工程材料有限公司;PBS(细胞用)缓冲液,索莱宝生物科技有限公司;胰蛋白酶-EDTA 消化液、青链霉素混合液, Gibco(美国)公司;偶氮二异丁脒盐酸盐(ABAP)、蛋白酶抑制剂(PMSF), Sigma(美国)公司;PVDF膜,索莱宝生物科技有限公司;抗体 Keap1、Nrf2 和 HO-1,艾博抗(上海)贸易有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔/鼠 IgG(HRP),南京建成生物工程研究所;BeyoECL 试剂盒、Cell Counting Kit-8 (CCK8)试剂盒,碧云天生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

CO<sub>2</sub> 培养箱,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;MoticAE2000 倒置光学显微镜,北京荣兴光恒科技有限公司;DL-CJ-2N 超级洁净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;SPX-25 生化培养箱,宁波海曙赛福实验仪器厂;超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;Imark 酶标仪, Bio-Rad(美国)公司。

### 1.3 方法

1.3.1 乳酸菌的培养基及无细胞提取物的制备 乳酸菌( $10^6$  CFU/mL)以 2%接种于 MRS 液体培养基,置于 37 °C 静置培养 24 h,传代培养 3 次后,将菌株培养液于 4 °C 下 6 000 r/min 离心 15 min,菌体经无血清的 DMEM 培养基洗涤 2 次后,重悬于 DMEM 培养基,即乳酸菌菌体。将乳酸菌菌体于冰浴下超声破碎 15 min 后(变幅杆:φ6;超声开 1 s,关 2 s;功率 33%),离心收集上清液,即乳酸菌无细胞提取物。

1.3.2 HeLa 细胞的培养 参考杜星星<sup>[1]</sup>的方法培养 HeLa 细胞,将 HeLa 细胞培养于含 1%双抗(青链霉素混合液)和 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、湿度 90%、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,隔天换一次培养液,培养细胞至对数生长周期备用。

1.3.3 植物乳杆菌 CY1-2 保护 HeLa 细胞的菌液浓度和处理时间的确定 将 100 μL HeLa 细胞(细胞浓度  $10^5$  个/mL)接种到 96 孔板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 24 h 直至完全贴壁,弃去上清培养液后,分别加入 100 μL 不同菌液浓度( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  CFU/mL)的乳酸菌培养液,然后于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中分别培养 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 h, 共培养结束后,用无菌 PBS 洗涤,直至乳酸菌被清洗干净。以添加 100 μL 细胞培养液为对照组。按照 CCK8 试剂盒说明书测定细胞存活率。

1.3.4 ABAP 诱导 HeLa 细胞损伤剂量和处理时间的确定 将 100 μL HeLa 细胞(细胞浓度  $10^5$  个/mL)接种到 96 孔板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 24 h 直至完全贴壁,弃去上清培养液后,分别加入 100 μL 不同浓度(70, 90, 110, 130, 150 mmol/L)的 ABAP,然后于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中分别培养 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 h, 共培养结束后,用无菌 PBS 洗涤,直至 ABAP 被清洗干净。以添加 100 μL 细胞培养液为对照组。按照 CCK8 试剂盒说明书测定细胞存活率。

1.3.5 建立植物乳杆菌 CY1-2 保护 ABAP 氧化损伤 HeLa 细胞模型 参照李颜利<sup>[2]</sup>的方法并稍加改动建立细胞氧化损伤模型。将 100 μL HeLa 细胞(细胞浓度  $10^5$  个/mL)接种到 96 孔板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 24 h 直至完全贴壁,弃去上清培养液后,加入 100 μL 细胞培养液,即对照组;加入浓度为 110 mmol/L 的 ABAP,即损伤组;加入植物乳杆菌 CY1-2 菌体保护细胞 3 h 后,经 PBS 洗涤后,加入浓度为 110 mmol/L 的 ABAP 对细胞进行损伤,即植物乳杆菌 CY1-2 菌体组;加入植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物保护细胞 3 h 后,经 PBS 洗涤后,加入浓度为 110 mmol/L 的 ABAP 对细胞进行损伤,即植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物组。同理,制备 LGG 菌体组和 LGG 无细胞提取物组。

1.3.6 植物乳杆菌 CY1-2 保护对 ABAP 氧化损伤 HeLa 细胞形态学的影响 按照 1.3.5 节的方法构建乳酸菌保护 ABAP 氧化损伤 HeLa 细胞模型,在倒置显微镜( $\times 400$ )下观察不同组的细胞生长状态并拍照记录。

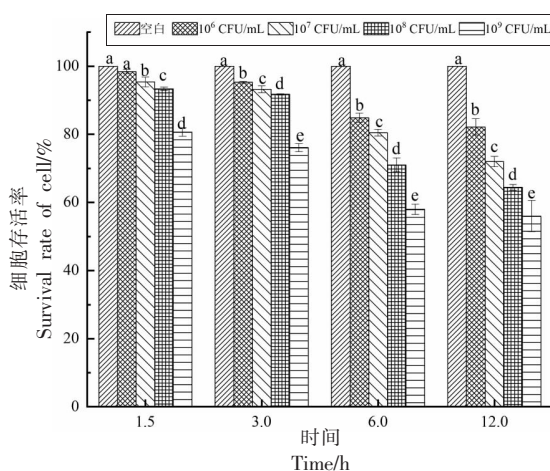
1.3.7 免疫印迹试验 (Western blot) 按照 1.3.5 节的方法设置分组。氧化损伤在持续 3 h 后停止,将不同试验组的细胞刮下转移到新的干净整洁无杂蛋白污染的新离心管中,获得上清液后用 PBS 洗涤细胞 2 次,并在冰浴条件下用含有 1% PMSF 的 RIPA 缓冲液超声裂解,以获得上清蛋白。从每组细胞裂解液中提取等量的蛋白质进行 15% 的 SDS-凝胶电泳处理,电泳完成后转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)。用含有 0.05% 吐温 20 和含有 5% 脱脂牛奶的 PBS 在室温下封闭 1 h。将膜分别与抗体 Keap1、Nrf2 和 HO-1 在 4 °C 下孵育过夜(在一抗稀释缓冲液中以 1:1 000 稀释),随后进行相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(在 1% BSA 中 1:2 000 稀释),在室温下孵育 1 h。使用 BeyoECL 试剂盒观察蛋白条带,通过 ImageJ 软件对条带进行扫描和定量<sup>[13]</sup>。以 Gapdh 的表达作为内标对照。

1.3.8 数据分析 试验结果均平行测定 3 次,结果用平均值 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 19.0(IBM)软件对数据进行统计分析,用 Origin 8.5(Origin Lab)软件对数据处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物乳杆菌 CY1-2 对正常培养 HeLa 细胞存活率的影响

如图 1 所示,在相同培养时间时,细胞存活率随菌液浓度的增加而减小;在同一乳酸菌菌液浓度作用下,随培养时间的延长,细胞存活率也呈下降趋势。王爱红<sup>[14]</sup>研究发现,乳酸杆菌与 HeLa 细胞的黏附具有时间依赖性,可能是因为乳酸菌产生的右旋糖苷带正电荷,中和了肿瘤细胞表面强的负电荷,这种静电作用有利于细胞间接收信号从而阻止了肿瘤细胞无限分裂,导致细胞存活率下降。当植物乳杆菌 CY1-2 菌液浓度在  $10^6\sim 10^8$  CFU/mL,培养时间 $\leq 3$  h,HeLa 细胞的存活率均 $> 90\%$ ,该条件对 HeLa 细胞均无明显毒性作用,细



注:图中不同小写字母表示同一时间不同处理之间的显著性差异( $P < 0.05$ ),下同。

图 1 不同菌液浓度植物乳杆菌 CY1-2 处理不同时间后 HeLa 细胞的存活率

Fig.1 Survival rate of HeLa cells treated with *Lactiplantibacillus plantarum* CY1-2 at different concentrations for different time

胞活性正常。培养时间 $\geq 6$  h,任何菌液浓度下的 HeLa 细胞的存活率均小于 85%,该条件会对 HeLa 细胞产生明显损伤作用,影响细胞活性。当菌液浓度在  $10^9$  CFU/mL 时,任何时间段下细胞的存活率均 $< 80\%$ ,此条件对细胞有显著毒害作用。当植物乳杆菌 CY1-2 菌液浓度为  $10^8$  CFU/mL,培养 3 h 后,对 HeLa 细胞无明显损伤且不影响其活性,可排除其对试验干扰的因素。因此,植物乳杆菌 CY1-2 与 HeLa 细胞共培养的最佳条件为菌液浓度  $10^8$  CFU/mL,时间 3 h。

### 2.2 不同浓度 ABAP 对 HeLa 细胞存活率的影响

不同浓度 ABAP 对 HeLa 细胞的损伤结果如图 2 所示。相同培养时间下,细胞存活率随 ABAP 浓度增大,呈下降趋势;相同 ABAP 处理浓度下,细胞存活率与作用时间呈负相关关系。当 ABAP 浓度 $\geq 130$  mmol/L,任意作用时间下细胞存活率均 $< 45\%$ ,说明该条件对细胞毒性较强,能够明显降低细胞活性。在 ABAP 浓度 $\leq 90$  mmol/L,作用时间 $\leq 3$  h,细胞存活率均 $> 55\%$ ,说明该条件对细胞具有一定损伤作用,而未达到半抑制浓度;在 ABAP 浓度为 110 mmol/L,损伤时间为 3 h 条件下,细胞存活率为 48.63%,细胞损伤明显,该浓度

达到半抑制浓度。因此,选择 ABAP 损伤 HeLa 细胞的最佳条件为浓度 110 mmol/L, 作用时间 3 h。Qian 等<sup>[15]</sup>研究发现,ABAP 损伤的 HepG2 细胞的存活率随着 ABAP 剂量的增加而降低,当 ABAP 浓度为 85 mmol/L 时,HepG2 细胞存活率接近 50%,说明不同细胞承受同一氧化剂损伤的能力存在差异。

### 2.3 植物乳杆菌 CY1-2 对 ABAP 处理的 HeLa 细胞存活率的影响

ABAP 通过产生过氧自由基破坏细胞膜和生物分子,对正常细胞造成损伤<sup>[16]</sup>。如图 3 所示,与损伤组相比,植物乳杆菌 CY1-2 与 HeLa 细胞共同培养 3 h,再加入同浓度的 ABAP 作用后,其菌体及无细胞提取物均能有效提高 HeLa 细胞的存活能力,细胞存活率分别提高了 9.41%和 25.71%,其中无细胞提取物对 HeLa 细胞的保护效果明显。因此,表明植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物的抗氧化活性更强,可以保护 HeLa 细胞免受氧化损伤。然而,两组结果虽均低于阳性对照 LGG 组,但菌株 CY1-2 无细胞提取物组与 LGG 细胞提取物组无显著差异( $P>0.05$ ),这可能是由于菌株产生的可溶性蛋白能够通过单层细胞中紧密连接蛋白和屏障,从而防止过氧化物诱导损伤上皮屏障<sup>[17]</sup>。

### 2.4 HeLa 细胞形态学变化

采用倒置光学显微镜观察不同处理组 HeLa 细胞的形态变化结果如图 4 所示。空白组 HeLa 细胞形态多为梭形和不规则菱形,细胞分布均匀,贴壁牢固。损伤组 HeLa 细胞体积缩小,呈圆球状,细胞间隙增宽,贴壁性差,有凋亡小体产生,表明细胞结构被破坏。CY1-2 菌体组虽然出现少量圆缩状态细胞,但大部分仍为梭形和不规则菱形,且贴壁牢固,与阳性对照 LGG 组无明显差异。与损伤组相比,CY1-2 无细胞提取物组的 HeLa 细胞大而饱满,边缘清晰且伸展性好,与阳性对照 LGG 组无明显差异。因此,表明植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物的抗氧化活性更强。同时,该结果与乳酸菌对 ABAP 氧化损伤 HeLa 细胞的存活率的影响结果具有一致性。石韵佳<sup>[18]</sup>的研究结果与本研究的相似,受到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤的 IPEC-J2 细胞胞体增大,细胞间隙增宽,轮廓不清,而与乳酸菌共同培养后,细胞的损伤情况得到了缓解。

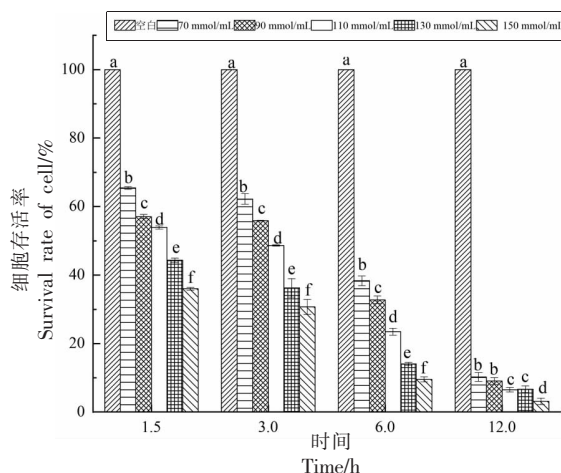
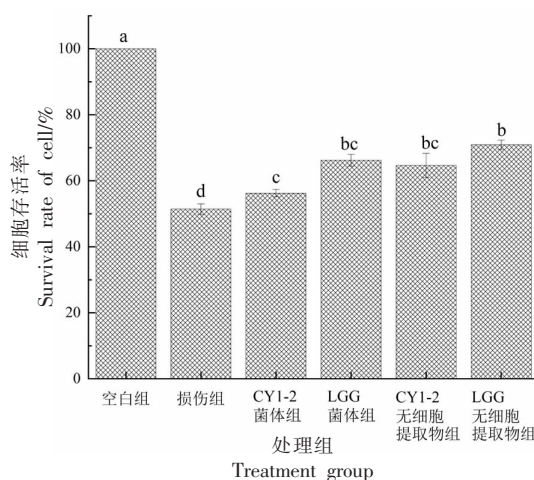


图 2 不同浓度 ABAP 处理不同时间后 HeLa 细胞的存活率

Fig.2 Survival rate of HeLa cells treated with ABAP at different concentrations for different time



注:图中不同小写字母表示不同处理之间的显著性差异( $P<0.05$ )。

图 3 乳酸菌保护 ABAP 氧化损伤的 HeLa 细胞的存活率  
Fig.3 The survival rate of HeLa cells protected by lactic acid bacteria against ABAP damage

### 2.5 植物乳杆菌 CY1-2 对 ABAP 氧化损伤 HeLa 细胞蛋白的影响

Keap1-Nrf2-ARE 信号通路在氧化应激防御系统中发挥重要作用,当机体处于氧化还原平衡状态时,Keap1-Nrf2-ARE 信号通路未被激活,核因子 E2-相关因子(Nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2)与 kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)处于稳定的结合状态,相关蛋白表达量不会发生

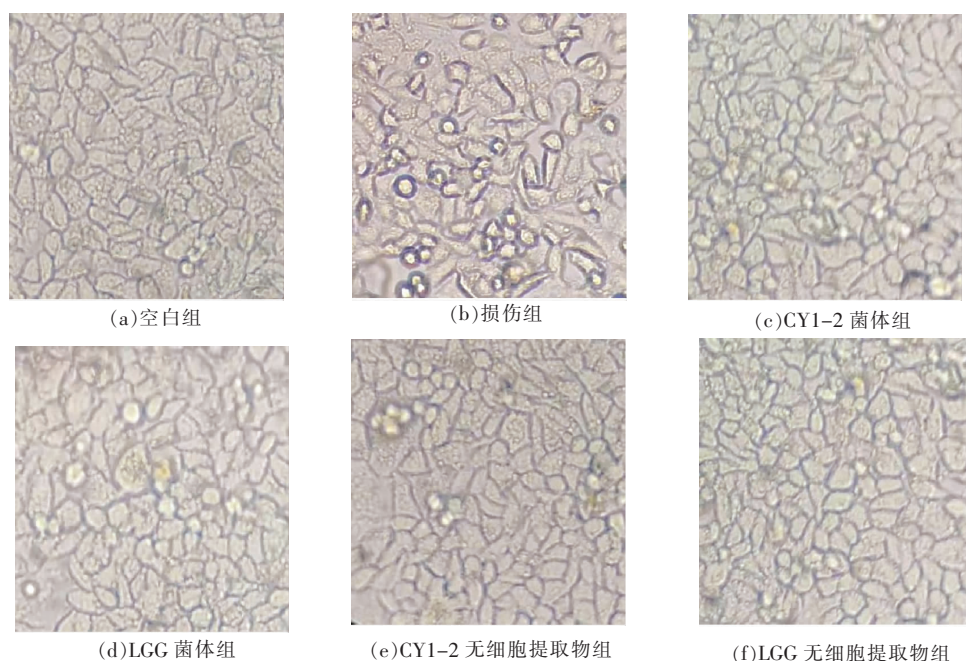


图4 不同处理组 HeLa 细胞的形态变化( $\times 400$ )

Fig.4 Morphological changes of HeLa cells in different treatment groups ( $\times 400$ )

变化<sup>[19]</sup>。反之,当该信号通路被激活,Nrf2 与 Keap1 发生分离,活化的 Nrf2 会激活其下游多种因子进行转录,如血红素加氧酶-1(Heme oxygenase-1, HO-1)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)、苯醌氧化还原酶 1[NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1, NQO1]等,这些靶蛋白在被激活后可以调节机体内氧化还原平衡,使机体从氧化应激状态恢复到正常的平衡状态<sup>[20-21]</sup>。因此,Nrf2 信号通路激活的关键是 Nrf2 和 Keap1 的解偶联<sup>[22]</sup>。在氧化应激条件下,Keap1 在氧化后失活,释放出被抑制的 Nrf2,然后 Nrf2 到达细胞核,与小的 Maf 蛋白相互作用,与抗氧化反应元件(ARE)结合释放 Nrf2,从而促进抗炎和抗氧化特性<sup>[23]</sup>。

Keap1 作为细胞内化学和氧化应激的亲电传感器,是 Nrf2 的负调节因子<sup>[24]</sup>,因此,可以根据 Keap1 的蛋白表达量变化观察 Nrf2 信号通路是否被激活。图 5 为乳酸菌保护 ABAP 氧化损伤的 HeLa 细胞的 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路相关蛋白表达的条带,可以看出与损伤组的条带相比乳酸菌保护组的条带更宽更加清晰。由图 6 可知,损伤组和乳酸菌处理组都会使 HeLa 细胞的 Keap1 的相对蛋白含量提升,经过植物乳杆菌 CY1-2 菌

体(1.33%)及无细胞提取物(1.45%)保护后的细胞的 Keap1 的相对蛋白含量显著高于损伤组(1.23%) ( $P<0.01$ )且高于阳性对照 LGG 组,且无细胞提取物组优于菌体组,可以认为植物乳杆菌 CY1-2 预处理提高了 HeLa 细胞中 Keap1 的蛋白表达,同时也能说明植物乳杆菌 CY1-2 处理可以激活 Nrf2 信号通路的活化状态。

Nrf2 可通过调控 HO-1 及其它抗氧化酶从而可激活各种酶或非酶化合物作为抗氧化剂,维持细胞氧化还原状态平衡<sup>[25]</sup>。单独使用 ABAP 损伤 HeLa 细胞,Nrf2 的相对蛋白含量与空白组相比有显著上升( $P<0.01$ ),表明 ABAP 在损伤 HeLa 细胞的过程中,细胞处于氧化应激状态并主动调节 Nrf2 信号通路相关蛋白表达以保护细胞免受损伤<sup>[4]</sup>。与损伤组(0.62%)相比,当细胞经植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物(0.91%)保护后,细胞的 Nrf2 蛋白表达量提高了 47%。且植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物组的 Nrf2 的相对蛋白含量高于阳性对照 LGG 无细胞提取物组(0.86%)。因此,表明植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物能正向调节 HeLa 细胞的 Nrf2,从而缓解因 ABAP 导致的细胞氧化损伤。

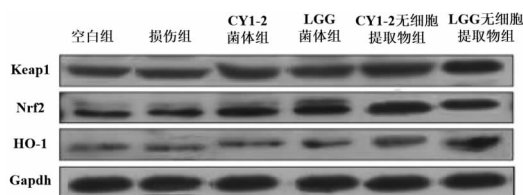
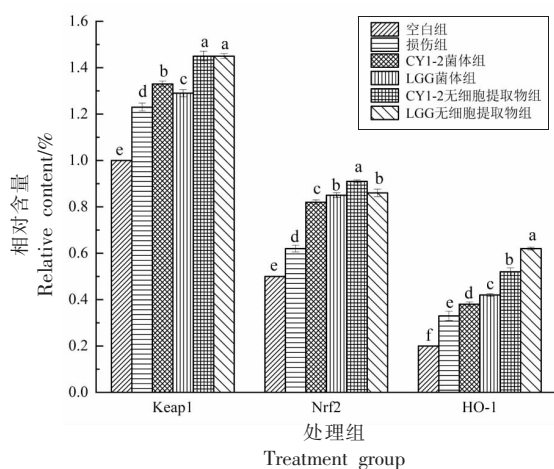


图 5 不同处理组的 Keap1、Nrf2 和 HO-1 的目的条带

Fig.5 Target bands of Keap1, Nrf2 and HO-1 in different treatment groups



注：图中不同小写字母表示同一蛋白的不同处理之间的显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 6 乳酸菌不同处理组对 Keap1、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of different treatment groups of lactic acid bacteria on protein expression of Keap1, Nrf2 and HO-1

HO-1 已被用作 NRF2 靶基因的标志,也是保护细胞免受氧化应激和炎症影响的主要抗氧化酶<sup>[26]</sup>。从图 6 中可以看出,损伤组和乳酸菌处理组均能增加 HeLa 细胞中 HO-1 的蛋白表达量。植物乳杆菌 CY1-2 处理后的 HO-1 的相对蛋白表达量(0.38%)虽低于阳性对照 LGG 组(0.42%),但显著高于损伤组(0.33%)和空白组 ( $P < 0.01$ ),可能是因为阳性菌株 LGG 主要通过细胞的 Nrf2 调控 HO-1 抗氧化酶发挥抗氧化作用,而植物乳杆菌通过 Nrf2 调控 HO-1 及其它抗氧化酶 SOD、GSH-Px 发挥抗氧化作用<sup>[26]</sup>。因此,说明植物乳杆菌 CY1-2 预处理可以提高 Nrf2 信号通路的活化状态,进而促进 HO-1 及其它抗氧化酶的转录表达。

Hidehiro 等<sup>[27]</sup>的研究结果中也报道了相似结果,肠道中的植物乳杆菌产生的亚油酸的新脂肪酸代谢物可以保护 HepG2 细胞免受过氧化氢诱导的细胞毒性,并且显著提高了 HepG2 细胞中 Nrf2 蛋白水平、HO-1、GCLM 和 NQO1 基因的表达。

综上,植物乳杆菌 CY1-2 菌体及无细胞提取物均能不同程度地提高 ABAP 氧化损伤的 HeLa 细胞的存活率及 Keap1、Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达量,其中植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物的抗氧化效果更显著。结合前期植物乳杆菌 CY1-2 抗氧化作用研究,其无细胞提取物对 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子和抗脂质过氧化均具有很强的清除作用<sup>[10]</sup>。因此,推测植物乳杆菌 CY1-2 的抗氧化机制可能为其无细胞提取物中的活性成分激活 HeLa 细胞的 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路,使下游靶蛋白 HO-1 发挥抗氧化作用,从而保护细胞免受氧化损伤。然而,不同菌株会表现出不同的抗氧化机制,如刘煜珺等<sup>[28]</sup>的研究发现植物乳杆菌 Y42 胞外多糖对 ABAP 氧化损伤 HT-29 细胞的保护作用,可能是通过清除活性氧以及促进 HT-29 细胞抗氧化酶系的表达完成的。Mu 等<sup>[29]</sup>确定了植物乳杆菌 Y44 通过淬灭氧自由基和激活 Caco-2 细胞中的 Nrf2 信号通路发挥抗氧化作用。

### 3 结论

植物乳杆菌 CY1-2 保护 ABAP 氧化损伤 HeLa 细胞模型为:植物乳杆菌 CY1-2 保护 HeLa 细胞的菌液浓度为  $10^8$  CFU/mL,处理时间 3 h;ABAP 损伤 HeLa 细胞的浓度 110 mmol/L,处理时间 3 h。在该细胞模型条件下,与损伤组相比,植物乳杆菌 CY1-2 菌体及无细胞提取物组的细胞存活率分别提高了 9.41%和 25.71%。通过倒置显微镜观察发现,植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物组的 HeLa 细胞大而饱满,边缘清晰且伸展性好。免疫印迹法分析表明植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物能显著提高 Keap1、Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达量。因此,说明植物乳杆菌 CY1-2 无细胞提取物可以促进 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路的激活,使下游靶蛋白 HO-1 发挥作用,从而保护 HeLa 细胞免受氧化损伤。

## 参 考 文 献

- [1] 马芝丽, 陈文超, 祝香芝, 等. 油菜籽来源抗氧化物质研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(6): 998-1006.  
MA Z L, CHEN W C, ZHU X Z, et al. Review on antioxidant components from rapeseed[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2019, 41(6): 998-1006.
- [2] 曾文俊, 吕彩梦, 丁建宝, 等. 体外抗氧化活性评价方法的反应机理研究进展[J]. 化学与生物工程, 2022, 39(12): 13-19.  
ZENG W J, LÜ C M, DING J B, et al. Research progress in reaction mechanism of evaluation method for antioxidant activity *in vitro*[J]. Chemistry & Bioengineering, 2022, 39(12): 13-19.
- [3] XING J L, WANG G, GU Z N, et al. Cellular model to assess the antioxidant activity of *Lactobacilli*[J]. Rsc Advances, 2015, 5(47): 37626-37634.
- [4] 李唤宇. 植物乳杆菌 Y44 对人肠上皮细胞模型 Caco-2 抗氧化功能的影响[D]. 大连: 大连工业大学, 2019.  
LI H Y. Effect of *Lactobacillus plantarum* Y44 on the antioxidative function of human intestinal epithelial cell model Caco-2[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019.
- [5] 王凤杰, 王科坤, 陈显兵, 等. 宫颈癌组织中硒结合蛋白 1 表达与肿瘤微环境中抗氧化酶活性有关[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(5): 711-714.  
WANG F J, WANG K K, CHEN X B, et al. Selenium binding protein 1 expression in cervical cancer tissues associated to antioxidant enzyme activity in tumor microenvironment [J]. Chinese Journal of Immunology, 2016, 32(5): 711-714.
- [6] 王鸿蕉, 蔡昉洁, 岳明祥, 等. 植物乳杆菌的抑菌性能及其影响因素研究进展[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(14): 212-218.  
WANG H J, CAI Y J, YUE M X, et al. Antimicrobial properties of *Lactobacillus plantarum* and their influencing factors[J]. Food Research and Development, 2022, 43(14): 212-218.
- [7] 冯丽莉, 张栋, 荀一萍, 等. 植物乳杆菌的功能性及工业化应用研究进展[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(3): 35-37, 64.  
FENG L L, ZHANG D, XUN Y P, et al. Research progress on functionality and industrial application of *Lactobacillus plantarum*[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(3): 35-37, 64.
- [8] 江远智, 石阳阳, 严利文, 等. 植物乳杆菌发酵牛乳的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(4): 40-44, 50.  
JIANG Y Z, SHI Y Y, YAN L W, et al. Research progresses on fermentation of milk by *Lactobacillus plantarum*[J]. China Dairy Industry, 2020, 48(4): 40-44, 50.
- [9] HARIRI M, SALEHI R, FEIZI A, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial on probiotic soy milk and soy milk: Effects on epigenetics and oxidative stress in patients with type II diabetes[J]. Genes & Nutrition, 2015, 10(6): 52.
- [10] 丁丽丽, 吕欣然, 高永悦, 等. 鱼肠道中抗氧化活性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 127-132.  
DING L L, LÜ X R, GAO Y Y, et al. Screening for and identification of lactic acid bacteria with antioxidant activity from the intestinal tract of fish[J]. Food Science, 2021, 42(10): 127-132.
- [11] 杜星星. 乳酸杆菌抑制 HeLa 细胞增殖的可能机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.  
DU X X. Research on the mechanism that *Lactobacillus* inhibiting the proliferation of HeLa cells[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2017.
- [12] 李颜利. 多功能性阿拉伯木聚糖羟基肉桂酸酯的制备及性能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.  
LI Y L. Preparation and properties of multifunctional hydroxycinnamic acid arabinoxylan esters[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [13] MU G Q, GAO Y, TUO Y F, et al. Assessing and comparing antioxidant activities of *Lactobacilli* strains by using different chemical and cellular antioxidant methods[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(12): 10792-10806.
- [14] 王爱红. 乳酸杆菌对宫颈癌 HeLa 细胞抑制作用机制的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.  
WANG A H. Study on the inhibitory mechanism of *Lactobacillus* on HeLa cells of cervical cancer[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2010.
- [15] QIAN F, ZHANG J, HOU K R, et al. *In vitro* study of the antioxidative and antiproliferative capabilities of *Lactobacillus casei* 16-fermented soymilk [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(1): 48-57.

- [16] WANG A R, HOU K R, MU G Q, et al. Antioxidative effect of soybean milk fermented by *Lactobacillus plantarum* Y16 on 2, 2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (abap)-damaged HepG2 cells[J]. Food Bioscience, 2021, 44 (PA): 101120.
- [17] 韩煦. 鼠李糖乳杆菌分泌可溶性蛋白 p40 预防性保护伽马干扰素诱导损伤 enteroids 肠上皮功能及紧密连接[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
- HAN X. Soluble protein P40 produced by *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances tight junction protein expression and prevents IFN gamma-induced epithelial barrier damage in enteroids[D]. Shanghai: Naval Medical University, 2019.
- [18] 石韵佳. 抗氧化益生乳酸菌筛选及其对 IPEC-J2 细胞氧化损伤的保护作用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
- SHI Y J. Screening of antioxidative and probiotic activities of lactic acid bacteria and its protecting effect to oxidative damage of pig intestinal epithelial cell [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018.
- [19] 侯凯荣. 干酪乳杆菌 Y16 发酵豆乳抗氧化功能分析 [D]. 大连: 大连工业大学, 2020.
- HOU K R. Analysis of antioxidant function of fermented soymilk by *Lactobacillus casei* Y16 [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2020.
- [20] LOBODA A, DAMULEWICZ M, PYZA E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism[J]. Cellular and molecular life sciences, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [21] 胡流芳, 王迎, 任汝静, 等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(1): 146-152, 166.
- HU L F, WANG Y, REN R J, et al. Anti-oxidative stress actions and regulation mechanisms of Keap1-Nrf2/ARE signal pathway[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2016, 43 (1): 146-152, 166.
- [22] WANG F Q, ZHAN Y, LI M M, et al. Cell-permeable PROTAC degraders against KEAP1 efficiently suppress hepatic stellate cell activation through the antioxidant and anti-inflammatory pathway [J]. ACS Pharmacology & Translational Science, 2023, 6(1): 76-87.
- [23] JI R, JIA F Y, CHEN X, et al. Carnosol inhibits KGN cells oxidative stress and apoptosis and attenuates polycystic ovary syndrome phenotypes in mice through Keap1-mediated Nrf2/HO-1 activation [J]. Phytotherapy Research: PTR, 2023, 37(4): 1405-1421.
- [24] LEE S, HU L Q. Nrf2 activation through the inhibition of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction [J]. Medicinal Chemistry Research, 2020, 29(5): 846-867.
- [25] TAIRA J, TSUDA R, MIYAGISHIOHIRA C, et al. Cytoprotective effect of pteryxin on insulinoma min6 cells due to antioxidant enzymes expression via Nrf2/ARE activation [J]. Antioxidants, 2023, 12(3): 693.
- [26] KIM J H, KANG D M, CHO Y J, et al. Medicago increases antioxidant genes by inducing NRF2 transcriptional level in HeLa cells [J]. Antioxidants, 2022, 11(2): 421.
- [27] HIDEHIRO F, THARNATH N, TOSHIKI K, et al. 10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid generated from linoleic acid by a gut lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* is cytoprotective against oxidative stress [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2016, 296: 1-9.
- [28] 刘煜珺, 张雨晴, 高原, 等. 乳杆菌胞外多糖抗氧化活性研究 [J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 21-35.
- LIU Y J, ZHANG Y Q, GAO Y, et al. Study of *Lactobacillus* extracellular polysaccharide antioxidant activity [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(6): 21-35.
- [29] MU G Q, LI H Y, TUO Y F, et al. Antioxidative effect of *Lactobacillus plantarum* Y44 on 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP)-damaged Caco-2 cells [J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(8): 6863-6875.



## The Antioxidant Mechanism of *Lactiplantibacillus plantarum* CY1-2 Based on HeLa Cell Model

Wu Wenyu<sup>1</sup>, Zhang Yanfang<sup>1</sup>, Bai Fengling<sup>1</sup>, Lü Xinran<sup>1\*</sup>, Cui Fangchao<sup>1</sup>,  
Tan Xiqian<sup>1</sup>, Li Jianrong<sup>1,3</sup>, Li Yingmei<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, the Fresh Food Storage and Processing Technology Research Institute of Liaoning Provincial Universities, Jinzhou 121013, Liaoning

<sup>2</sup>Dalian Food Jinzhou Co., Ltd., Jinzhou 121019, Liaoning

<sup>3</sup>Dalian Polytechnic University, Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian 116034, Liaoning)

**Abstract** In the study, a model of HeLa cells protected by *Lactiplantibacillus plantarum* CY1-2 against 2,2'-azobis [2-methylpropionamide] dihydrochloride (ABAP) damage was established. The antioxidant mechanism of *L. plantarum* CY1-2 was investigated using cell proliferation test, morphological observation and western blot analysis. The results showed that the cell protective model conditions were as follows: 10<sup>8</sup> CFU/mL of *L. plantarum* CY1-2 protected cells for 3 h, and then 110 mmol/L of ABAP damaged cells for 3 h. Under this model condition, both the cell and the cell-free extract of *L. plantarum* CY1-2 could effectively improve the viability of HeLa cells, and the cell survival rate increased by 9.41% and 25.71%, respectively. Meanwhile, microscopic observation showed that compared with the injured group, HeLa cells protected by the cell-free extract of *L. plantarum* CY1-2 were large and plump, with clear edges and good extensibility. Western blot analysis indicated that, compared with the injured group, the cell-free extract of *L. plantarum* CY1-2 could positively regulate the expression of kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) proteins in HeLa cells, resulting in increasing by 18%, 47% and 58% respectively. *L. plantarum* CY1-2 protects HeLa cells from oxidative damage by activating Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway to improve its antioxidant capacity. This study was expected to provide a theoretical basis for the development of lactic acid bacteria antioxidants.

**Keywords** *Lactiplantibacillus plantarum*; oxidative damage; HeLa cell model; antioxidation