

## 蓝莓渣多酚对肝星状细胞的增殖与自噬作用

马 剑<sup>1,2</sup>, 赖光荣<sup>3</sup>, 胡一阳<sup>3</sup>, 贾飞鸿<sup>1</sup>, 马艳弘<sup>1\*</sup>, 刘海燕<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>江苏省农业科学院农产品加工研究所 南京 210014

<sup>2</sup>克孜勒苏柯尔克孜自治州林业工作管理站 新疆阿图什 845350

<sup>3</sup>南京市溧水区供销合作总社 南京 211200)

**摘要** 为了提高蓝莓全资源利用率,降低其加工副产物对环境的危害。通过高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)分析超高压提取、超声提取和溶剂提取技术对蓝莓渣多酚(BRP)组分及含量的影响。以活化的 HSC-T6 细胞为模型,通过噻唑蓝法和乳酸脱氢酶法检测 BRP 对 HSC-T6 细胞存活率和细胞毒性的影响,透射电镜和吡啶橙染色法观察 BRP 对 HSC-T6 细胞自噬的诱导作用,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 BRP 对 HSC-T6 细胞自噬相关蛋白的表达量,酶联免疫法(ELISA)分析 HSC-T6 细胞的纤维化程度。结果表明:BRP 中有 14 种组分,3 种提取方法中的矢车菊素-3-O-葡萄糖苷占比最高,分别为 57.530%,58.703%,54.830%。3 种提取方法所得 BRP 的组分种类相同,而含量存在较大差异。超高压提取法所得 BRP 含量显著高于常规溶剂法和超声辅助提取法( $P<0.05$ )。BRP 能显著抑制 HSC-T6 细胞增殖( $P<0.05$ ),且在一定浓度范围呈现时间-剂量效应关系;通过上调自噬相关蛋白 Beclin-1 和 LC3-II 表达,下调 p62 蛋白表达,诱导细胞发生自噬;同时 BRP 显著下调 HSC-T6 细胞中 COL-I、COL-III、TNF- $\beta$ 1 的分泌量( $P<0.05$ )。结论:超高压萃取的 BRP 组分总含量最高,生物活性功能最强,BRP 可通过抑制活化的 HSC-T6 细胞增殖,诱导细胞自噬从而发挥其抗纤维化效果。

**关键词** 蓝莓渣多酚;超高压;HSC-T6 细胞;增殖;自噬

**文章编号** 1009-7848(2024)09-0105-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.010

蓝莓(*Vaccinium* spp.)为杜鹃花科,越橘属的深蓝色水果,富含多酚、黄酮和多糖等多种功能活性成分,具有消炎、抑菌和抗癌等生物活性功能,有很高的食用和药用价值<sup>[1-3]</sup>。蓝莓渣是蓝莓加工的主要副产物,富含多酚类化合物,具有抗癌、降血压、抗癌等生物功能,具-有广阔的开发应用前景<sup>[4-5]</sup>。目前 80%的蓝莓渣直接排放或用于饲料生产,容易造成环境污染和资源浪费。利用蓝莓渣为主要原料,可制备高抗氧化活性的蓝莓保健食品<sup>[6-7]</sup>。然而,蓝莓渣中植物多酚等生物活性物质的提取以及相关功能研究还未见报道。

植物多酚是指分子结构中有若干个酚羟基的植物成分的总称,包括酚酸类、黄酮类、单宁类以及花色苷类等。目前多酚提取技术包括有机溶剂提取法、超声辅助提取法、超高压提取法等。其中超高压(Ultra-high pressure,UHP)技术与其它提取技术相比具有提取时间短,得率高,条件温和等

特点,被成功应用于花色苷、茶多酚、多糖等活性成分的提取<sup>[8]</sup>。

我国是肝病高发国家,慢性肝病持续发展会导致肝纤维化(Liver fibrosis,LF),最终发展为肝硬化甚至肝癌<sup>[9-10]</sup>。研究证实:肝星状细胞(Hepatic stellate cells,HSCs)受外界持续性刺激时会造成细胞外基质(Extracellular matrix,ECM)的过度积累,导致 HSCs 活化,加速肝病发展<sup>[9-11]</sup>。抑制 HSC 的激活与增殖,并促进其自噬被认为是保护肝脏功能的有效策略。细胞自噬是机体通过各种胁迫信号诱导产生的自我保护机制,参与细胞的发育、分化、免疫、肿瘤的发生发展等生理病理过程<sup>[12-14]</sup>。自噬关键蛋白 LC3-II 表达水平变化,是判断自噬发生的标志蛋白。据报道,化疗诱导的肿瘤细胞死亡中自噬发挥重要作用<sup>[15-16]</sup>,然而,自噬能否在肝脏疾病发生过程中诱导 HSC 发生程序性死亡,仍存在较大争议<sup>[11,17-18]</sup>。

鉴于此,本研究采用溶剂提取法、超高压提取法、超声波提取法制备 BRP,分析不同提取方法对 BRP 组分的影响,并以活化的 HSC-T6 细胞为模型,研究 BRP 对细胞生长、自噬、胶原产生的影

收稿日期:2023-09-23

基金项目:新疆自治区重点研发计划项目(2023B02028)

第一作者:马剑,男,博士生

通信作者:马艳弘 E-mail:ma\_yhhyy@126.com

响,分析其抗纤维化效应,为 BRP 抗肝纤维化功能食品的研发与应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蓝莓渣(蓝莓饮料生产副产物),由句容万山红遍生物科技有限公司提供;肝星状细胞 HSC-T6 为活化的 HSCs,具有纤维化特性,由江苏省农业科学院农产品加工研究所保存。

所有标准品,上海源叶生物公司;胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM),美国 Gibco 公司;噻唑蓝(MTT),吡啶橙,美国 Sigma 公司;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒,南京建成生物工程研究所;Hoechst 33258 染液,上海碧云天公司;I 型胶原蛋白(COL-I)、III 型胶原蛋白(COL-III)、层黏蛋白(LN)和转化生长因子(TGF- $\beta$ 1)酶联免疫检测试剂盒,北京金智研生物科技有限公司;Beclin-1 抗体,杭州华安公司;GAPDH 抗体,英国 Abcam 公司;LC3 II 抗体,武汉爱博泰克生物科技有限公司;p62 抗体,北京博奥森公司;HRP 标记羊抗兔二抗,美国 Jackson 公司。

### 1.2 设备与仪器

XMTD-8222 烘箱,上海精宏公司;超高压设备(HPP600MPa),包头科发高压科技公司;KQ-400DE 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;FDU-1200 冷冻干燥机,日本 EYELA 公司;Mini protean 3 cell 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;CO<sub>2</sub> 培养箱,美国 Thermo 公司;D-EPOCH 酶标仪,美国 BioTek 公司;Scios 2 DualBeam 透射电镜(TEM),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;1260 Infinity II 型高效液相色谱质谱联用仪(HPLC-MS),德国 Agilent 公司;IX53 倒置荧光显微镜,日本 Olympus 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 BRP 的制备 蓝莓渣在 50℃烘箱中进行烘干,将其烘干至恒重,超微粉碎,收集到的蓝莓渣粉末用不同提取方法(超高压辅助提取<sup>[8]</sup>、超声辅助提取<sup>[19]</sup>、溶剂提取)提取,使用 AB-8 大孔树脂对提取液进行纯化,旋转浓缩样品,使用冷冻干燥机冻干样品,收集,得到 BRP 冻干粉。

1.3.2 BRP 组分分析 取蓝莓渣多酚冻干粉 5 mg,用甲醇溶解,调节样品质量浓度为 1 mg/mL,用 0.22  $\mu$ m 有机滤膜过滤备用。

参考 Herrera-balandrano 等<sup>[20]</sup>方法,使用 HPLC-MS/MS 对 BRP 组分进行分析。色谱条件:安捷伦 120 EC-C18 柱(2.7  $\mu$ m, 3.0 mm $\times$ 100 mm),柱温 30℃,流速 0.6 mL/min,进样量 5.0  $\mu$ L,流动相包括 A(0.1%甲酸超纯水)和 B(100%乙腈),洗脱程序:0~2 min, 80% A; 2~9 min, 10% A; 9~9.1 min, 90% A。

质谱条件:离子源:电喷雾离子源(Electrospray ionization, ESI);检测方式:多反应检测(multiple reaction monitoring, MRM);电喷雾电压:3.5~4.0 kV;离子源温度:350℃;喷雾器压力:45 psi;气体流速:10 L/min。通过比较保留时间和质量离子模式,使用对应物质的标曲计算 BRP 各组分含量。

1.3.3 HSC-T6 细胞培养 将复苏后的 HSC-T6 细胞加入 DMEM 完全培养基(含 10%FBS, 1%青霉素/链霉素),置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内进行培养,当细胞密度为 80%~90%融合度时,分组传代培养。

1.3.4 BRP 对 HSC-T6 细胞增殖抑制率的影响 参照 Rugina 等<sup>[21]</sup>报道的 MTT 法,将 HSC-T6 细胞( $5\times 10^4$  个/mL)接种于 96 孔板中,分别加入终质量浓度 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300  $\mu$ g/mL 的 BRP 进行培养,分别培养 24, 48, 72 h 后,每孔中加入 10  $\mu$ L MTT(5 mg/mL)继续培养 4 h,培养结束后,弃掉培养液,再加入 150  $\mu$ L DMSO 溶液溶解结晶物后,用酶标仪测定各孔吸光度值(OD<sub>490nm</sub>)。按照公式计算细胞增殖抑制率:

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品组}}}{A_{\text{对照组}}}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中: $A_{\text{样品组}}$ 为样品组的吸光度; $A_{\text{对照组}}$ 为对照组的吸光度。

1.3.5 HSC-T6 细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放量测定 通过测定 HSC-T6 细胞的 LDH 释放量,评估 BRP 的细胞毒性。各组细胞加入终浓度 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300  $\mu$ g/mL 的 BRP 分别培养 24, 48, 72 h,按照 LDH 酶活性试剂盒说明书,测定 LDH 释放量。

### 1.3.6 透射电子显微镜观察 HSC-T6 细胞自噬泡

取对数期 HSC-T6 细胞分为对照组和 BRP 处理组(终浓度为 50, 100, 150  $\mu\text{g/mL}$ ), 在  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h。收集细胞于离心管中, 并用 PBS 洗涤 3 次, 离心后 EP 管中细胞呈绿豆大小, 用 1% 戊二醛溶液固定。后续操作步骤参照 Zhan 等<sup>[22]</sup>的研究方法, 使用透射电镜观察 HSC-T6 自噬泡。

**1.3.7 吖啶橙染色法检测 HSC-T6 细胞溶酶体** 在 6 孔板中放置细胞爬片, 用培养液将 HSC-T6 细胞稀释后( $1 \times 10^5$  个/孔)接种于 6 孔板中。用不同终浓度 BRP (50, 100, 150  $\mu\text{g/mL}$ ) 刺激 HSC-T6 细胞, 24 h 后, 弃除培养液, 用 PBS 清洗 2~3 次, 加入 2  $\mu\text{g/mL}$  吖啶橙试剂 1 mL, 于暗处反应 15 min, 将 HSC-T6 细胞置于在荧光显微镜下观察其细胞形态。

**1.3.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)分析自噬相关蛋白** 用含有 BRP (终浓度为 50, 100, 150  $\mu\text{g/mL}$ ) 的培养基培养 HSC-T6 细胞 24 h 后, 冰浴环境裂解细胞, 收集裂解液, 用 BCA 蛋白定量试剂盒对细胞蛋白质进行定量。在电泳槽中加入配置好的分离胶和浓缩胶, 每孔上样 15  $\mu\text{g}$ , 在浓缩胶恒压 80 V, 电泳 20 min, 分离胶恒压 120 V, 电泳 60 min 条件下进行电泳, 当蛋白到达分离胶底部时, 停止电泳。将胶上的蛋白质切割转移到 PVDF 膜上, 恒压 25 V 转膜 30 min, 然后将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。用 TBST 缓冲液低速摇床漂洗 PVDF 膜 3 次, 将膜放在抗体孵育的盒子, 加入稀释好的一抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日, 将膜取出用 TBST 缓冲液摇床漂洗 3 次(每次 5 min), 之后, 37  $^{\circ}\text{C}$  二抗孵育 1 h, 用 TBST 缓冲液摇床漂洗 3 次, 每次 5 min。将 ECL 发光液(A 液:B 液=1:1)加在孵育二抗后的膜上, 避光 5 min。去掉显色液, 在成像系统中进行扫描, 得到的数据进行保存, 最后使用 Image J 软件计算条带的灰度值。

**1.3.9 HSC-T6 细胞 COL-I、COL-III、LN 和 TGF- $\beta$ 1 含量检测** 取对数期 HSC-T6 细胞, 分为对照组, BRP 处理组(终浓度为 50, 100, 150  $\mu\text{g/mL}$ ), 细胞培养 24 h, 取上清液, 按照酶联免疫法试剂盒说明书测定 COL-I、COL-III、LN 和 TGF- $\beta$ 1 含量的变化。

## 1.4 数据处理与分析

所有试验重复 3 次, 并用平均值 $\pm$ 标准误差表示。使用 Origin 2019 绘图, SPSS22.0 进行单因素方差分析(ANOVA), Image J 分析蛋白条带,  $P < 0.05$  被视为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 BRP 组分分析

本研究采用 HPLC-MS/MS 对超高压提取法、超声波提取法和常规溶剂提取法所得 BRP 组分进行定量分析, 结果如图 1 和表 1 所示。

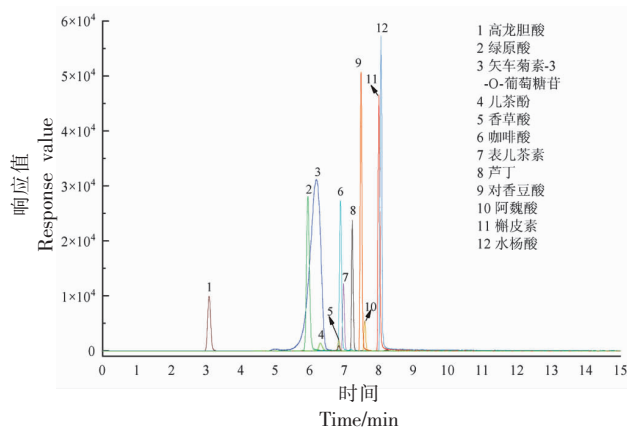


图 1 总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram

由如图 1 和表 1 可知, 3 种提取方法所得 BRP 的组分种类相同, 但含量却存在较大差异, 超高压提取法所得样品中, 绿原酸、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、芦丁等含量显著高于其它提取方法所得样品( $P < 0.05$ ), 其中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷是含量最高的生物活性物质( $P < 0.05$ ), 是 BRP 中的主要成分(含量为 57.53%)<sup>[23-24]</sup>。综上, 超高压辅助提取所得 BRP 含量最高, 比超声波提取法和溶剂提取法分别提高了 15.83%, 40.84%。因此选择超高压提取法制备 BRP, 用于后续相关试验。

### 2.2 BRP 对 HSC-T6 细胞增殖的影响

MTT 法检测 BRP 对 HSC-T6 细胞增殖率的影响, 如图 2 所示, HSC-T6 的增殖抑制率随着培养时间的延长和 BRP 浓度的提高而升高。细胞培养 24, 48, 72 h 时, 300  $\mu\text{g/mL}$  BRP 干预 HSC-T6 细胞的增殖抑制率由 3.98%, 4.05%, 6.91% 分别升

表 1 HPLC-MS/MS 分析 BRP 组分与含量

Table 1 HPLC-MS/MS analysis of BRP components and content								
序号	RT/min	母离子	子离子	分子量	化合物名称	超高压提取法/ (mg/L)	超声波提取法/ (mg/L)	溶剂提取法/ (mg/L)
1	3.124	167.0	122.0 <sup>a</sup> /123.0 <sup>b</sup>	168.14	高龙胆酸	0.034 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.032 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.024 ± 0.001 <sup>b</sup>
2	5.954	353.1	85.0 <sup>a</sup> /191.0 <sup>b</sup>	354.30	绿原酸	6.898 ± 0.023 <sup>a</sup>	4.733 ± 0.057 <sup>b</sup>	3.912 ± 0.019 <sup>c</sup>
3	5.848	449.1	137.0 <sup>a</sup> /287.0 <sup>b</sup>	449.20	矢车菊素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	25.850 ± 0.055 <sup>a</sup>	22.772 ± 0.110 <sup>b</sup>	17.493 ± 0.335 <sup>c</sup>
4	6.335	109.0	81.0 <sup>a</sup> /91.0 <sup>b</sup>	110.11	儿茶酚	1.296 ± 0.038 <sup>a</sup>	1.185 ± 0.006 <sup>b</sup>	1.249 ± 0.030 <sup>a</sup>
5	6.851	167.0	152.0 <sup>a</sup> /108.0 <sup>b</sup>	168.15	香草酸	0.514 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.522 ± 0.013 <sup>a</sup>	0.500 ± 0.010 <sup>a</sup>
6	6.901	179.0	134.0 <sup>a</sup> /135.0 <sup>b</sup>	180.16	咖啡酸	0.110 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.102 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.113 ± 0.002 <sup>a</sup>
7	6.987	289.1	109.0 <sup>a</sup> /245.0 <sup>b</sup>	290.27	表儿茶素	0.093 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.113 ± 0.008 <sup>b</sup>	0.155 ± 0.011 <sup>a</sup>
8	7.242	609.2	271.0 <sup>a</sup> /300.0 <sup>b</sup>	610.51	芦丁	4.788 ± 0.033 <sup>a</sup>	4.461 ± 0.019 <sup>c</sup>	4.579 ± 0.030 <sup>b</sup>
9	7.491	163.0	93.0 <sup>a</sup> /119.0 <sup>b</sup>	164.16	对香豆酸	0.011 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.013 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.011 ± 0.001 <sup>a</sup>
10	7.601	193.1	179.0 <sup>a</sup> /134.0 <sup>b</sup>	194.18	阿魏酸	2.072 ± 0.054 <sup>a</sup>	1.896 ± 0.003 <sup>b</sup>	1.605 ± 0.035 <sup>c</sup>
11	8.012	301.0	179.0 <sup>a</sup> /151.0 <sup>b</sup>	302.23	槲皮素	3.069 ± 0.087 <sup>a</sup>	2.834 ± 0.066 <sup>b</sup>	2.145 ± 0.037 <sup>c</sup>
12	8.06	137.0	65.1 <sup>a</sup> /93.0 <sup>b</sup>	138.12	水杨酸	0.198 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.129 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.118 ± 0.004 <sup>b</sup>
总含量						44.933 ± 0.155 <sup>a</sup>	38.792 ± 0.286 <sup>b</sup>	31.904 ± 0.474 <sup>c</sup>

注：a. 定性离子；b. 定量离子；不同字母代表样品间存在显著性差异(P<0.05)。

高到 71.26%,81.67%,89.79%( $P<0.05$ )。BRP 对细胞增殖的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 225.10,196.96,170.17  $\mu\text{g/mL}$ 。表明,BRP 显著抑制 HSC-T6 细胞的增殖,且在一定质量浓度范围内,呈现剂量-时间效应关系,该结果与 Lu 等<sup>[25]</sup>在 HepG2 细胞方面的研究结果相类似。

2.3 BRP 对 LDH 释放量的影响

乳酸脱氢酶 LDH 在细胞受损后会被释放到细胞外,常用作细胞毒性的评价指标<sup>[26]</sup>。BRP 对 HSC-T6 细胞 LDH 释放量的影响结果如图 3 所示。

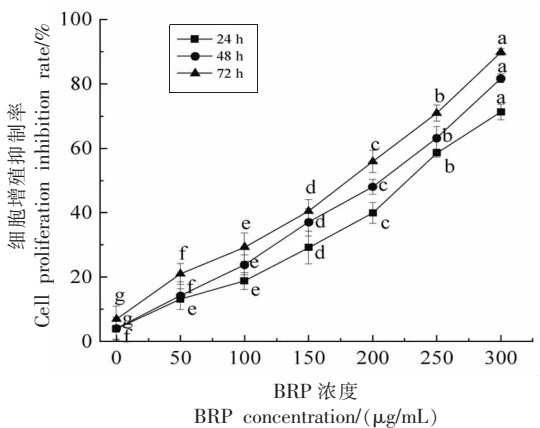
由图 3 可知,BRP 作用于 HSC-T6 细胞后,LDH 释放量随 BRP 浓度的提高和时间的延长而依赖性增加。当 BRP 质量浓度为 300  $\mu\text{g/mL}$  时,细胞在 24,48,72 h 的 LDH 释放量分别为 (675.22±18.12), (777.78±

33.16), (1 029.44±42.37) U/L。由此可知,高浓度 BRP 对 HSC-T6 细胞具有一定的细胞毒性,长时间处理后,将导致 HSC-T6 细胞死亡率上升,与 MTT 试验结果相同。结合 LDH 和 MTT 试验结果发现,高浓度 BRP 长时间作用细胞后,对细胞具有显著的毒性,因此选取 50~150  $\mu\text{g/mL}$  的 BRP 作用细胞 24 h,进行后续试验。

2.4 透射电镜观察 HSC-T6 自噬泡

自噬发生时,各种受损细胞器会被双层膜空泡包裹着形成自噬体<sup>[23,27]</sup>。采用透射电镜观察不同浓度 BRP 处理 24 h 后的 HSC-T6 细胞,如图 4 所示,50  $\mu\text{g/mL}$  的 BRP 处理的 HSC-T6 细胞中自噬泡数量与对照组相比无明显差异,当 BRP 质量浓度为 150  $\mu\text{g/mL}$  时,HSC-T6 细胞出现的包裹线粒体等细胞器的自噬泡明显增多,表明 150  $\mu\text{g/mL}$

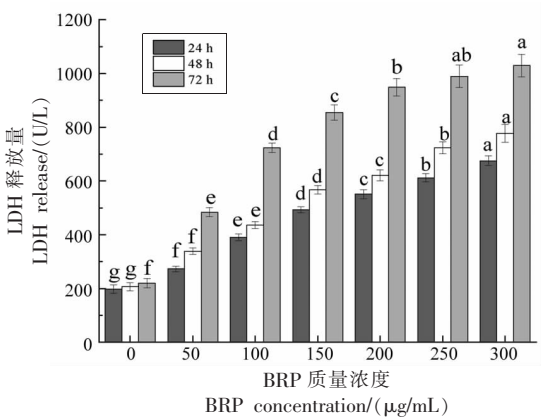




注:不同字母代表样品间存在显著性差异( $P<0.05$ )。

图 2 BRP 对 HSC-T6 增殖的影响

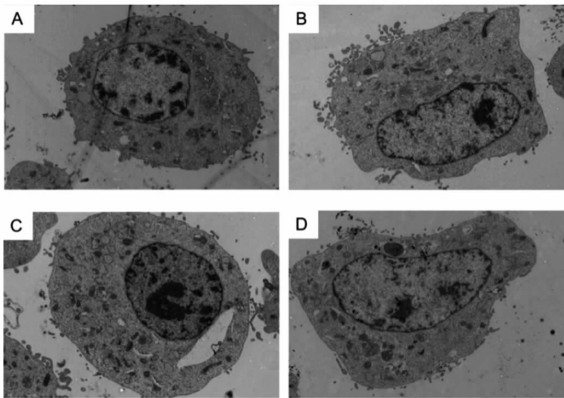
Fig.2 Effect of BRP on proliferation of HSC-T6



注:不同字母代表样品间存在显著性差异( $P<0.05$ )。

图 3 BRP 对 LDH 释放量的影响

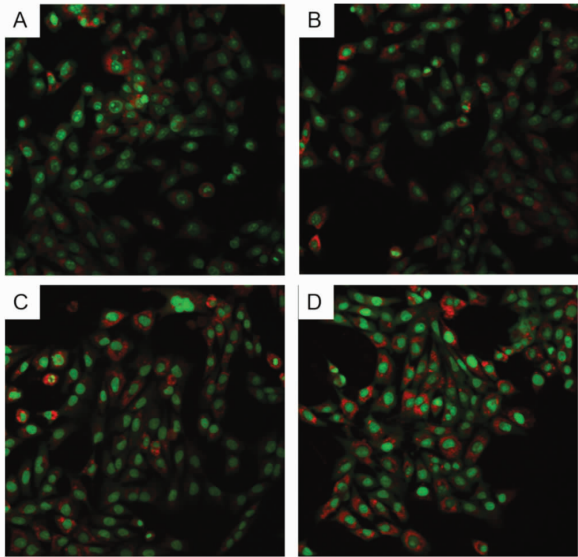
Fig.3 Effect of BRP on LDH release



注:A 为对照组;B、C 和 D 表示处理 HSC-T6 细胞的蓝莓渣多酚质量浓度分别为 50,100,150  $\mu\text{g/mL}$ 。

图 4 透射电镜观察 HSC-T6 自噬泡

Fig.4 Observation of HSC-T6 autophagic vesicles by transmission electron microscopy



注:A 对照组;B、C 和 D 表示 BRP 处理 HSC-T6 细胞,质量浓度分别为 50,100,150  $\mu\text{g/mL}$ 。

图 5 吖啶橙染色观察 HSC-T6 自噬泡

Fig.5 Acridine orange staining observed HSC-T6 autophagy vesicles

BRP 对 HSC-T6 细胞自噬具有明显的诱导效应。

### 2.5 吖啶橙染色检测溶酶体

吖啶橙渗透入细胞内,结合胞核中双链 DNA 和胞质呈现出绿色荧光。自噬过程中形成的酸性膜泡,使吖啶橙在低 pH 值环境下与自噬溶酶体结合呈现出红色荧光,通过红色荧光的数量,可判断细胞自噬发生的程度<sup>[13,27-28]</sup>。

如图 5 所示,吖啶橙染色细胞后,可见点状红色荧光颗粒散布于细胞核周围,与对照组相比,随着 BRP 浓度增加,点状红色荧光颗粒越多,尤其在 BRP 质量浓度为 150  $\mu\text{g/mL}$  时,红色荧光更明

显,且红色荧光颗粒几乎遍布在每个细胞的细胞核周围。表明高浓度的 BRP(150  $\mu\text{g/mL}$ )能明显促进 HSC-T6 细胞的自噬,与透射电镜试验结果一致,证实 BRP 能够诱导 HSC-T6 细胞发生自噬。

### 2.6 Western Blot 分析自噬蛋白表达

采用 Western Blot 法检测不同浓度 BRP 对 HSC-T6 细胞自噬相关蛋白表达的影响,由如图 5 可知,与对照组相比,BRP 处理组的 Beclin-1 和

LC3-II 表达水平随着其浓度升高而显著提高( $P<0.05$ ),p62 显著降低( $P<0.05$ ),150  $\mu\text{g/mL}$  BRP 处理组的 Beclin-1 和 LC3-II 表达水平分别提高了 2.30,2.53 倍(自噬泡数量增加);p62 表达水平降低了 2.19 倍。LC3 蛋白是自噬发生的标志蛋白,LC3 包括 LC3-I 和 LC3-II 两种,当自噬发生时,

LC3-I 向 LC3-II 转化并特异性结合自噬体<sup>[29]</sup>;Beclin-1 是细胞自噬关键蛋白,有利于自噬小体的形成<sup>[15]</sup>;p62 在自噬发生过程中可直接与 LC3-II 结合,并在自噬溶酶体中被有效降解,与自噬活性呈负相关<sup>[30]</sup>。表明 BRP 可通过改变 Beclin-1,LC3-II 和 p62 表达量,诱导 HSC-T6 细胞自噬。

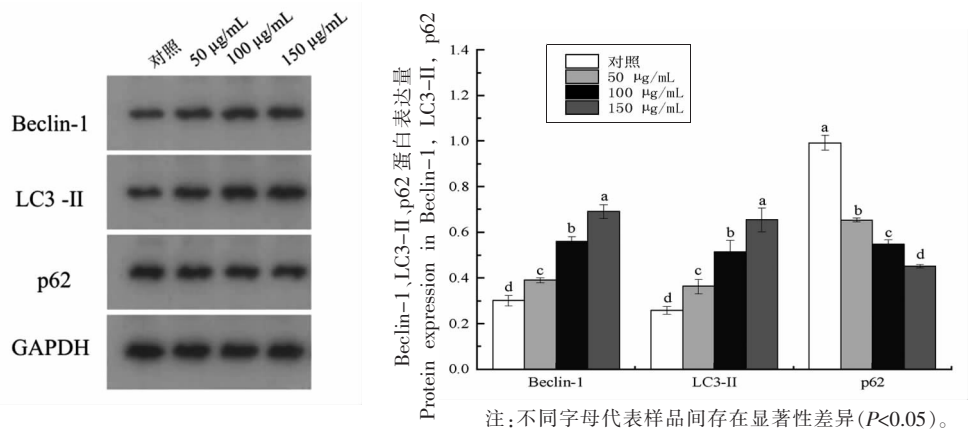


图 6 BRP 对 HSC-T6 细胞自噬相关蛋白表达的影响  
Fig.6 Effect of BRP on autophagy related protein expression in HSC-T6 cells

2.7 BRP 对 HSC-T6 胶原、蛋白和生长因子含量的影响

HSC 的活化导致肿瘤生长因子(主要为 TGF- $\beta$ 1)表达增高,分泌大量的 ECM,包括 COL-I, COL-III 和层粘连蛋白(LN)等纤维化标志物质<sup>[15,31]</sup>。LN 和 COL-I、COL-III 胶原含量的增加可逐渐取代正常肝脏细胞中的 IV 型、VI 型胶原,打破细胞外基质转换降解平衡,导致肝纤维化<sup>[11,16]</sup>。

由表 2 可知,HSC-T6 细胞经不同浓度 BRP 刺激 24 h 后,HSC-T6 细胞 COL-I、COL-III 含

量、LN 蛋白含量以及 TGF- $\beta$ 1 含量均发生显著变化( $P<0.05$ ),其中 100  $\mu\text{g/mL}$  BRP 处理组的 COL-I、COL-III、LN 含量分别为(84.34 $\pm$ 4.31),(24.56 $\pm$ 1.12),(11.84 $\pm$ 0.45) ng/mL,TGF- $\beta$ 1 含量为(46.62 $\pm$ 0.41)pg/mL,分别比对照组降低了 49.45%,74.76%,10.57%,21.38%。表明 BRP 能下调 HSC-T6 肝星状细胞 COL-I、COL-III、LN 和 TGF- $\beta$ 1 表达量,有效降低细胞的纤维化程度,其中 100  $\mu\text{g/mL}$  的 BRP 对 HSC-T6 的作用效果最好。有望成为抑制机体纤维化的潜在药物。

表 2 BRP 对 HSC-T6 细胞分泌胶原、LN、TNF- $\beta$ 1 的影响  
Table 2 Effects of BRP on collagen and protein content secreted by HSC-T6 cells

分组	COL-I/(ng/mL)	COL-III/(ng/mL)	LN/(ng/mL)	TNF- $\beta$ 1/(pg/mL)
对照组	166.86 $\pm$ 8.54 <sup>a</sup>	97.32 $\pm$ 2.24 <sup>a</sup>	13.24 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	59.30 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>
50 $\mu\text{g/mL}$ BRP	142.57 $\pm$ 1.21 <sup>b</sup>	62.67 $\pm$ 1.78 <sup>c</sup>	11.86 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	61.1 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>
100 $\mu\text{g/mL}$ BRP	84.34 $\pm$ 4.31 <sup>c</sup>	24.56 $\pm$ 1.12 <sup>d</sup>	11.84 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	46.62 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>
150 $\mu\text{g/mL}$ BRP	103.31 $\pm$ 7.23 <sup>b</sup>	44.31 $\pm$ 3.33 <sup>b</sup>	13.51 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	48.73 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>

注:不同字母代表样品间存在显著性差异( $P<0.05$ )。

3 结论

蓝莓渣作为蓝莓加工副产物,仍然保留部分生物活性物质,对蓝莓渣生物活性物质的重复提

取利用是加强资源利用率,以及保护环境的重要举措。通过 HPLC-MS/MS 分析得知超高压辅助萃取、超声辅助萃取和溶剂萃取等萃取方法制备所

得的样品组分无显著性差异,但超高压萃取所得BRP中部分生物活性成分含量显著高于其它萃取方法( $P<0.05$ ),其中矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷为主要成分。细胞试验结果表明,BRP可以抑制HSC-T6细胞增殖,高浓度有很强的细胞毒性;透射电镜和荧光染色结果表明,BRP可诱导HSC-T6细胞发生自噬;Western Blot结果表明,BRP处理后自噬相关蛋白Beclin-1和LC3-II表达水平提高,p62蛋白含量降低;COL-I、COL-III、LN和TGF- $\beta$ 1表达量下调,有效降低细胞的纤维化程度。因此,蓝莓渣多酚可通过对肝星状细胞的增殖抑制与诱导自噬抑制肝星状细胞的纤维化,可作为抑制肝纤维化的潜在药物。

### 参 考 文 献

- [1] 罗晓玲,徐嘉红,杨武斌,等. 蓝莓花色苷抗氧化功能及稳定性研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(4): 312-317.  
LUO X L, XU J H, YANG W B, et al. Research progress in antioxidant function and stability of blueberry anthocyanins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(4): 312-317.
- [2] JIAO X Y, WANG Y H, LIN Y, et al. Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6 J mice by modulating the gut microbiota[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2019, 64: 88-100.
- [3] YANG S, WANG C, LI X Y, et al. Investigation on the biological activity of anthocyanins and polyphenols in blueberry[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(2): 614-627.
- [4] BERES C, FREITAS S P, OLIVEIRA-GODOY R L, et al. Antioxidant dietary fibre from grape pomace flour or extract: Does it make any difference on the nutritional and functional value[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 56: 276-285.
- [5] ZHU M, HUANG Y S, WANG Y L, et al. Comparison of (poly) phenolic compounds and antioxidant properties of pomace extracts from kiwi and grape juice[J]. Food Chemistry, 2019, 271: 425-432.
- [6] CURUTCHET A, COZZANO S, TARREGA A, et al. Blueberry pomace as a source of antioxidant fibre in cookies: Consumer's expectations and critical attributes for developing a new product[J]. Food Science and Technology International, 2019, 25(8): 642-648.
- [7] YAN Y, ZHANG F, CHAI Z Y, et al. Mixed fermentation of blueberry pomace with *L. rhamnosus* GG and *L. plantarum*-1: Enhance the active ingredient, antioxidant activity and health-promoting benefits[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 131: 110541.
- [8] 陈智玲,马剑,文博,等. 超高压提取蓝莓渣花色苷的工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 185-194.  
CHEN Z L, MA J, WEN B, et al. Optimization of ultra-high pressure extraction and the antioxidant activity of anthocyanins from blueberry pomace[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 185-194.
- [9] 黄奕璇,蒋莉夏,何云,等. 棒柄花苷A对活化的HSC-T6细胞增殖和凋亡的影响[J]. 广西医科大学学报, 2022, 39(6): 886-891.  
HUANG Y X, JIANG L X, HE Y, et al. Effect of PPGA on proliferation and apoptosis of activated HSC-T6 cells[J]. Journal of Guangxi Medical University, 2022, 39(6): 886-891.
- [10] MA Y, LI Y, ZHANG H Z, et al. Malvidin induces hepatic stellate cell apoptosis via the endoplasmic reticulum stress pathway and mitochondrial pathway[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(9): 5095-5106.
- [11] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2017, 14(7): 397-411.
- [12] SCHAAF M B E, KEULERS T G, VOOLJS M A, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un) related functions[J]. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2016, 30(12): 3961-3978.
- [13] YANGX C, SRIVASTAVA R, HOWELL S H, et al. Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2016, 85(1): 83-95.
- [14] 叶莹莹,康虎,刘国权,等. 自噬调控巨噬细胞极化的研究进展[J]. 生命的化学, 2022, 42(6): 1131-1137.  
YE Y Y, KANG H, LIU G Q, et al. Research

- progress on autophagy regulation of macrophage polarization[J]. *Chemistry of Life*, 2022, 42(6): 1131–1137.
- [15] CHEN Y F, LIU H, LUO X J, et al. The roles of reactive oxygen species (ROS) and autophagy in the survival and death of leukemia cells[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2017, 112: 21–30.
- [16] YUAN X, WANG B, YANG L, et al. The role of ROS-induced autophagy in hepatocellular carcinoma[J]. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 2018, 42(4): 306–312.
- [17] JIANG J Y, CHEN S H, LI K, et al. Targeting autophagy enhances heat stress-induced apoptosis via the ATP-AMPK-mTOR axis for hepatocellular carcinoma[J]. *International Journal of Hyperthermia*, 2019, 36(1): 499–510.
- [18] XIONG H, NI Z, HE J, et al. LncRNA HULC triggers autophagy via stabilizing Sirt1 and attenuates the chemosensitivity of HCC cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(25): 3528–3540.
- [19] LIU Y Y, SUN Y, LIH L H, et al. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from *Flammulina velutipes* residue and its protective effect against heavy metal toxicity[J]. *Industrial Crops & Products*, 2022, 187(PA): 115422.
- [20] HERRERA-BALANDRANO D D, BETA T, CAI Z, et al. Effect of *in vitro* gastro-intestinal digestion on the phenolic composition and antioxidant capacity of Burdock roots at different harvest time[J]. *Food Chemistry*, 2021, 358: 129897.
- [21] RUGINA D, HANGANU D, DIACONEASA Z, et al. Antiproliferative and apoptotic potential of cyanidin-based anthocyanins on melanoma cells[J]. *Molecular Sciences*, 2017, 18(5): 949.
- [22] ZHAN J J, PENG L, CUI R B, et al. Dimethyl  $\alpha$ -ketoglutarate reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis through inhibition of autophagy in hepatic stellate cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 481(1/2): 90–96.
- [23] CHEN X J, ZHANG W X, XU X Z. Cyanidin-3-glucoside suppresses the progression of lung adenocarcinoma by downregulating TP53I3 and inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *World Journal of Surgical Oncology*, 2021, 19(1): 232.
- [24] CAI Z, QU Z, LAN Y, et al. Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes [J]. *Food Chemistry*, 2016, 197: 266–272.
- [25] LU C R, LI C, CHEN B, et al. Composition and antioxidant, antibacterial, and anti-HepG2 cell activities of polyphenols from seed coat of *Amygdalus pedunculata* Pall [J]. *Food Chemistry*, 2018, 265: 111–119.
- [26] PASTI A, ROSSI V, DI S G, et al. Human lactate dehydrogenase A undergoes allosteric transitions under pH conditions inducing the dissociation of the tetrameric enzyme[J]. *Bioscience Reports*, 2022, 42(1): 2654.
- [27] 张海元. 藤黄酸引发结直肠癌细胞脂代谢紊乱所产生的 ROS 诱导细胞内保护性自噬发生的机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
- ZHANG H Y. ROS-mediated autophagy induced by dysregulation of lipid metabolism plays a protective role in colorectal cancer cells treated with gambogic acid[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2014.
- [28] WANG D F, LIU M, WU Y, et al. Idarubicin/mithramycin-acridine orange combination drugs co-loaded by DNA nanostructures: Different effects of intercalation and groove binding on drug release and cytotoxicity[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 355: 118947.
- [29] FU M, HE Y, LIU Z H, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 reduces apoptosis via autophagy activation in hepatic stellate cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10(3): 1282–1288.
- [30] WU Y T, TAN H, HUANG Q, et al. Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death[J]. *Autophagy*, 2008, 4(4): 457–466.
- [31] KIHARA A, KABEYA Y, OHSUMI Y, et al. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network[J]. *EMBO Reports*, 2001, 2(4): 330–335.



## Effects of Blueberry Pomace Polyphenols on Proliferation and Autophagy of Hepatic Stellate Cells

Ma Jian<sup>1,2</sup>, Lai Guangrong<sup>3</sup>, Hu Yiyang<sup>3</sup>, Jia Feihong<sup>1</sup>, Ma Yanhong<sup>1\*</sup>, Liu Haiyan<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup>*Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014*

<sup>(2)</sup>*Forestry Management Station, Kizilsu Kirgiz Autonomous Prefecture, Atushi 845350, Xinjiang*

<sup>(3)</sup>*Nanjing Lishui District Supply and Marketing Cooperative, Nanjing 211200*

**Abstract** In order to improve the utilization rate of blueberry resources and reduce the environmental harm of its processing by-products. The effects of ultra-high pressure extraction, ultrasonic extraction, and solvent extraction on the composition and content of polyphenol (BRP) in blueberry residue were investigated by high performance liquid chromatography (HPLC-MS/MS). Activated HSC-T6 cells were used as models to detect the effects of BRP on the survival rate and cytotoxicity of HSC-T6 cells by thiazole blue and lactate dehydrogenase methods. The autophagy induction effect of BRP on HSC-T6 cells was observed by transmission electron microscopy and acridine orange staining. The expression level of autophagy related proteins in HSC-T6 cells was detected by Western blot. The degree of fibrosis in HSC-T6 cells was analyzed by enzyme-linked immunoassay (ELISA). The results showed that there were 14 components in BRP, and cyanidin-3-O-glucoside accounts for the highest proportion among the three extraction methods, which are 57.530%, 58.703% and 54.830% respectively. The BRP components obtained by the three extraction methods were the same, but the content was different. The BRP content of ultra-high pressure extraction method was significantly higher than that of conventional solvent method and ultrasound-assisted extraction method ( $P < 0.05$ ). BRP significantly inhibited the proliferation of HSC-T6 cells ( $P < 0.05$ ), and showed a time-dose effect relationship within a certain concentration range. Autophagy was induced by up-regulating the expression of Beclin-1 and LC3-II, and down-regulating the expression of p62. And, BRP significantly decreased the secretion levels of COL-I, COL-III and TNF- $\beta$ 1 in HSC-T6 cells ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the total content of BRP components extracted by ultrahigh pressure extraction is the highest and the biological activity is the strongest, and BRP could induce autophagy by inhibiting the proliferation of activated HSC-T6 cells, thus exerting its anti-fibrosis effect.

**Keywords** blueberry residue phenolics; ultra-high pressure; HSC-T6 cells; proliferation; autophagy