

桑葚和葡萄籽不同提取物对 PC12 细胞的影响

李 鑫, 李林竹, 付 正, 李景明*

中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

摘 要: 为研究桑葚和葡萄籽等食源性材料潜在的功能活性, 比较其不同提取物对 PC12 细胞的作用, 本实验采用不同极性的溶剂(水、乙醇、乙酸乙酯、正己烷)对桑葚和葡萄籽进行提取, 测定不同提取物对 PC12 细胞的影响。结果表明, 葡萄籽提取物对 PC12 细胞的影响强于桑葚, 其水提取物和乙醇提取物对 PC12 细胞有较大的促进生长作用, 作用浓度在 50 ~ 500 mg/L 作用时间为 4 h 时对 PC12 细胞的存活率有最为显著的提高。因此葡萄籽水提取物和乙醇提取物具有潜在的细胞保护作用, 可为进一步的开发提供理论依据。

关键词: PC12 细胞; 桑葚提取物; 葡萄籽提取物; 共培养

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.028

Effect on the Survival Rate of PC12 Cells from Extract of Mulberries and Grape Seeds

LI Xin, LI Lin-zhu, FU Zheng, LI Jing-ming*

China Agricultural University College of Food Science and Nutritional Engineering, Beijing 100083, China

Abstract: In order to study the foodborne material which have potential functions such as grape seeds and mulberries, comparing their different extracts on PC12 cells. The mulberries and grape seeds were extracted by different polar solvents (water, ethanol, ethyl acetate, n-hexane), measuring the effects of different extracts on PC12 cells. The results showed that the grape seeds extract influencing PC12 cells more than the mulberries. When the grape seeds water extract and ethanol extract tested in 50-500 mg/L, 4h, the survival rate of PC12 cells had the most significant improvement. In consequence, grape seeds water extract and ethanol extract have the potential of cell protection, which can provide a theoretical basis for further experiment.

Key words: PC12 cells; mulberry extract; grape seed extract; coculture

人的记忆和认知能力会随着年龄增长而逐渐退化, 医学研究表明很多疾病也与神经损伤密不可分, 如老年痴呆, 帕金森症等。随着社会的发展, 人们的生活水平逐步提高, 糖尿病、老年痴呆、帕金森症等疾病的发病率在逐年上升, 病人和家庭都承受着极大的痛苦和经济负担。研究者们寻找能够有效的预防或治疗这些疾病的药物, 很多研究者认为来源于食源性材料的成分预防、治疗疾病更加安全。

嗜铬细胞瘤细胞 (pheochromocytoma cell, PC12 Cell) 作为神经瘤细胞株, 现在已经广泛用作研究神经细胞分化、离子通道、受体、递质释放和药物疗效的实验材料, 也是用来研究药物影响细胞增殖的细胞株之一^[1]。

葡萄籽中的有效成分白藜芦醇对神经干细胞氧糖剥夺损伤有保护作用, 对认知损伤有一定的修复能力^[2], 对心脑血管疾病也有治疗作用。此外桑葚中花色苷, 葡萄中原花青素、单宁等也对人体健康大有益处^[3,4]。到目前为止, 葡萄和桑葚中不同极性组分对神经细胞的影响的差异仍然鲜有报道。

在本研究中, 我们选取了桑葚、葡萄籽作为实验对象, 采用不同方式提取, 分析各个提取物在不同时间和不同浓度下对 PC12 细胞存活率的影响, 探讨其中几种提取物潜在的功能活性, 为相关研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞系: PC12 细胞购买于通派(上海)生物科技有限公司。实验材料: 桑葚、葡萄籽真空冷冻干燥, 破碎过 40 目筛后, -40 °C 保存待用。试剂: RP-

收稿日期: 2015-07-21

接受日期: 2015-09-21

基金项目: 中国农业大学食品学院 2015 年本科生科研训练计划 (URP); 国家自然科学基金 (31171786; 31571840)

* 通讯作者 Tel: 86-10-62737039; E-mail: lyima@foxmail.com

MI1640 培养基、胰酶购于 Gibco;胎牛血清购于 Hyclone;青霉素、链霉素、MTT 试剂购于 Amresco;其他分析级试剂乙醇、乙酸乙酯、正己烷等购于国药集团有限公司。仪器:311 倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司)、水套式 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)、水纯化装置(英国 ELGA 公司)、电子天平(北京奥多利斯仪器系统公司)、96 孔细胞培养板购于康宁生命有限公司、低温离心机 RE 52-99 旋蒸仪(上海亚荣生化仪器厂)等。

1.2 方法

1.2.1 桑葚葡萄籽天然提取物的获得

准确称取桑葚和葡萄干粉 10 g,放入 1 L 三角瓶中,分别加入 250 mL 蒸馏水、乙醇、乙酸乙酯和正己烷,超声提取 10 min (80 kHz),高速离心 (5400 rpm, 20 min),取上清液过 0.22 μm 水滤膜,旋转蒸发将溶液蒸干至粉末,称重,然后用蒸馏水复溶配置成 1 g/mL 溶液待用。

1.2.2 细胞株的培养

用含 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养液,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中传代培养,每 2~3 d 传代一次,取对数生长期细胞用于实验。培养瓶中当细胞约长满 80% 时用胰酶消化细胞,离心 (1500 rpm, 3 min) 后,弃培养基,加入新的培养基重悬混匀后将细胞接种于 96 孔板中,过夜,用于后续实验。

1.2.3 提取物对细胞的作用效果及存活率的测定

用含 100 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养液将桑葚水相、桑葚乙醇相、桑葚乙酸乙酯相、桑葚正己烷相、葡萄籽水相、葡萄籽乙醇相、葡萄籽乙酸乙酯相、葡萄籽正己烷相八种提取物稀释至不同浓度 (0、50、100、500、1000、2000 mg/L) 作用于接种好的细胞,提取物和细胞共孵育的时间分别为 4、8、12、24 h。用 MTT 法检测,用全自动酶标仪在 492 nm 下检测,记录各组 OD 值(测量值 = 每孔实际值 - 空白组值)。各实验组 PC12 细胞活力以各 OD 值与正常对照组的 OD 值的比值表示,检测细胞的存活率,分析不同提取方式,不同浓度提取物对 PC12 细胞的影响。细胞存活率 = 各组 OD 值 / CK 组 OD 值。

2 结果与分析

2.1 桑葚各提取物对 PC12 细胞存活率的影响

经过时间梯度的实验(见图 1、2),我们发现,固

定提取物浓度为 100 mg/L 时,桑葚提取物作用 24 h,葡萄籽提取物作用 4 h 时,提高细胞存活率的较多,故实验选取了 24 h 和 4 h 分别作为桑葚、葡萄籽提取物的作用时间。

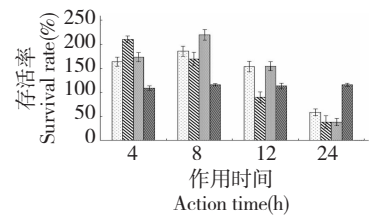


图 1 桑葚提取物不同作用时间对 PC12 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect on the survival rate of PC12 cells from mulberries extract that coculture in different time

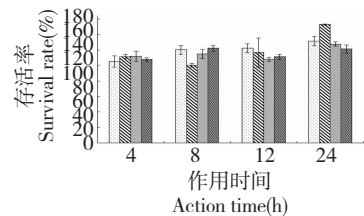


图 2 桑葚提取物不同作用时间对 PC12 细胞存活率的影响

Fig. 2 Effect on the survival rate of PC12 cells from grape seeds extract that coculture in different time

在桑葚四种提取物、五个作用浓度对 PC12 细胞存活率的比较(见图 3)中可以看出,桑葚不同提取物、不同浓度下对 PC12 细胞存活率具有显著性影响。

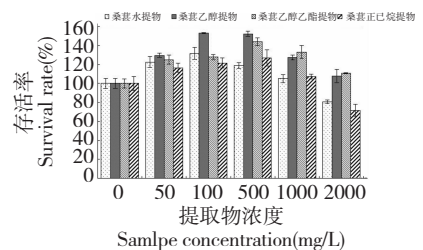


图 3 桑葚不同提取物作用 24 h 对 PC12 细胞存活率的影响

Fig. 3 Effect on the survival rate of PC12 cells from different extract of mulberries that coculture 24 h

相对于不同溶剂获得的提取物而言,作用浓度对 PC12 细胞存活率的影响更为显著。桑葚不同提取物作用 PC12 细胞 24 h, MTT 显示提取物对 PC12 细胞增殖呈双相作用:桑葚提取物浓度为 50~1000 mg/L 时促进细胞增殖 ($P < 0.05$); 而桑葚提取物浓度 > 2000 mg/L 时抑制细胞增殖或对细胞增殖效果

不明显,其作用效果存在着浓度依赖性($P < 0.05$)。其中桑葚提取物浓度在 100 ~ 500 mg/L,作用时间在 24 h 时,对于 PC12 细胞的存活率有最大提高($P < 0.05$)。

在桑葚的四种提取物中,我们发现,乙醇提取物和乙酸乙酯提取物表现不俗,对细胞存活率的提高较为明显,明显优于另外两组($P < 0.05$),并且这种影响在高浓度下(> 500 mg/L)更为明显。杜秀菊证明了金耳子实体的乙酸乙酯相、乙醇相均具有抗氧化活性^[5]。文金龙等人也证实,天麻乙酸乙酯提取物能明显改善 H₂O₂ 氧化损伤 PC12 模型细胞的形态,提高细胞存活率^[6]。与本实验结果相符。

2.2 葡萄籽各提取物对 PC12 细胞存活率的影响

葡萄籽四种提取物、五个作用浓度对 PC12 细胞存活率的比较(见图 2)中可以看出,葡萄籽不同提取物、不同浓度下对 PC12 细胞存活率也具有显著性影响,但与桑葚提取物的影响有一定差异。

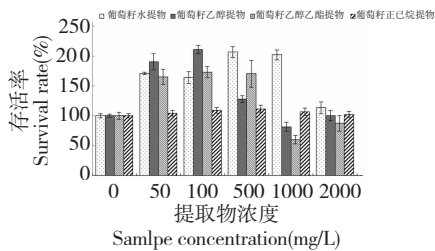


图4 葡萄籽不同提取物作用 4 h 对 PC12 细胞存活率的影响

Fig. 4 Effect on the survival rate of PC12 cells from different extract of grape seeds that coculture 4 h

葡萄籽不同提取物作用 PC12 细胞 4 h, MTT 显示提取物对 PC12 细胞增殖作用与桑葚提取物类似,呈双相作用:葡萄籽提取物浓度为 50 ~ 500 mg/L 时促进细胞增殖($P < 0.05$);而葡萄籽提取物除了水提取物浓度为 1000 mg/L 时仍然显著提高细胞存活率以外,各个提取物浓度 > 1000 mg/L 时抑制细胞增殖或对细胞增殖效果不明显。与桑葚提取物不同的是,葡萄籽提取物的浓度依赖性规律性不是很强,但仍然有剂量-效应关系。当葡萄籽提取物浓度在 50 ~ 100 mg/L 作用细胞 4 h 时,PC12 细胞的存活率有最大提高($P < 0.05$)。葡萄籽中含有白藜芦醇等活性物质,白藜芦醇引起的生物学变化包括生长抑制,细胞周期阻滞及细胞凋亡,且其影响与作用浓度有关^[7]。多数学者认为这类活性物质低于某一浓度时,会刺激细胞生长,高于这一浓度会引起细胞生长抑制和细胞周期阻滞^[8,9]。桑葚和葡萄

籽的提取物对 PC12 细胞存活率的影响皆体现出了这样的浓度效应。

对于葡萄籽不同提取方式,正己烷提取物对 PC12 细胞的存活率未有显著的提高,而另外三种提取方式在 100 mg/L ~ 500 mg/L,作用时间 4 h 时对于 PC12 细胞的存活率有较大的提高($P < 0.05$),其中又以水提取物和乙醇提取物为最优。葡萄籽中多酚可达 50% ~ 70%^[10],以乙酸乙酯——水作提取剂从葡萄籽中可提取到较多低聚黄烷醇等功能成分^[11],它们是以 C6—C3—C6 为骨架的黄烷醇类化合物,低聚黄烷醇(Oligomeric flavanols, OF)具有重要的生物活性和生理作用,能够提高细胞存活率。

我们由实验结果可以看到,桑葚和葡萄籽不同方式的提取物在较低浓度时,随着浓度的增加,PC12 细胞存活率也随之增加;而当提取物浓度高于一定值时,随着浓度增加,PC12 细胞存活率随之降低。而当我们把这两种植物的各类提取物进行比较时,又有葡萄籽提取物对于 PC12 细胞存活率的提高优于桑葚提取物。但其达到一定浓度时,或用不同极性的溶剂进行提取时,其对 PC12 细胞存活率的降低也大于桑葚。因此葡萄籽的各类提取物对 PC12 细胞的作用活性优于桑葚。

3 结论

PC12 细胞株来源于大鼠的肾上腺嗜铬细胞瘤细胞,具有较典型的神经内分泌细胞的特征,经常被用作体外条件下研究神经元损伤作用机制及药物对神经元的保护作用的理想细胞^[10,11]。同时它又具有肿瘤细胞的特征,因此也被用来研究药物对细胞增殖的影响^[12]。

甘薯提取物可明显提高谷氨酸诱导的 PC12 损伤细胞存活率^[13],欧洲越桔和笃斯越桔可改善 H₂O₂ 氧化损伤 PC12 模型细胞的形态^[14],银杏叶标准提取物能显著抑制 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡并对细胞有保护作用^[15]。一系列的研究都表明了天然产物之中可能存在对神经细胞有保护作用的功能性成分,而实验结果表明,桑葚乙醇、乙酸乙酯提取物和葡萄籽水、乙醇提取物对于 PC12 细胞的存活率有较大的提高,将它们的提取物直接作用于 PC12 细胞并观察其对细胞存活率,可以推测其可能存在着对神经细胞的潜在保护作用。

综合比较,桑葚各类提取物在大部分对 PC12 细胞存活率有一定程度提升,但提升并不多。而葡

萄籽各类提取物在作用时间为 4 h 时对 PC12 细胞存活率有提升作用,提升的幅度大于桑葚提取物。因此葡萄籽提取物对 PC12 细胞的影响强于桑葚提取物。对于提高 PC12 存活率显著的葡萄籽水提物和乙醇提物,我们将继续对其进一步分离纯化,以期得到最有效的纯化的单体。同时,对其是否对氧化损伤的 PC12 细胞有保护作用以及作用途径和机理,我们亦将做进一步的探讨。

参考文献

- 1 Timothy JS, William DA. Transmitter, Ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells; A model for neurotoxicological studies. *Neuro Toxicol*, 1991, 12:473.
- 2 Han N(韩宁). The study of resveratrol in protecting neural stem cell from oxygen glucose deprivation. Xi'an; Fourth Military University, 2013; 1-48
- 3 Liu B(刘犇). The study of neuroprotective effects of resveratrol and peanut root extracts in astrocyte——preliminary study on the primary prevention of Alzheimer's disease. Guangzhou; Southern Medical University, 2013; 1-56
- 4 He YF(何于飞). The study of synthetic utilization of grape. *Food Eng(食品工程)*. 2008, 3:32-34.
- 5 Du XJ(杜秀菊), Zhang JS(张劲松), Liu YF(刘艳芳), et al. The antioxidant activity of various extracts from *Tremella aurantialba* fruiting bodies and their protective effects on PC12 cells injured by oxidation. *Acta Agric Shanghai(上海农业学报)*, 2010, 26(2):49-52.
- 6 Wen JL(文金隆), Han CN(韩春妮), Chen JF(陈建芬), et al. Protective effect of EtOAc extract from *Gastrodia elata* on oxidative damage in PC12 cells. *Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志)*, 2013, 19:171-175.
- 7 Schneider Y, Vincent F, Duranton B, et al. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett*, 2000, 158: 85-91.
- 8 Joe AK, Liu H, Masumi S, et al. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 2002, 8:893-903.
- 9 Nakagawa H, Kiyozuka Y, Uemura Y, et al. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *Cancer Res*, 2001, 127:258-264.
- 10 Lin ZQ(凌智群), Zhang XH(张晓辉). Review on the pharmacological research of procyanidins. *Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报)* 2002, 18:9-12.
- 11 Wei FX(魏福祥), Han J(韩菊), Yu BL(于宝莉). Study of technology for extracting active components from grape seeds. *Fine Chem(精细化工)*. 2001, 18(7):394-395.
- 12 Huang HW(黄慧伟), Qiu YH(邱一华). Effect of *Tripterygium wilfordii* Hook(TWH) on proliferation of PC12 cells. *Acta Acade Med Nantong(南通医学院学报)*, 2004, 24: 373-376.
- 13 Sun LH(孙丽华), Zheng XL(郑晓亮), Lu JZ(鲁健章), et al. Pilot study of protection of sweet potato extract to PC12 cells injure caused by glutamic acid. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2012, 24:321-324.
- 14 Tao XY(陶欣艺), Lu YH(卢艳花), Zhou WY(周文瑜), et al. Protective effects of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium uliginosum* L. on oxidative damage in neural cells. *Chin J Clin Rehab(中国临床康复)*, 2005, 9(33):50-52.
- 15 Song Y(宋勇), Zhou SK(周生奎), Cui GY(崔桂云), et al. Protective effect of EGB761 on H₂O₂-induced damage of PC12 cells. *Heilongjiang Med J(黑龙江医药)*, 2010, 23: 732-735.