

谭琳,郑晓燕,陈娇,等. 诺丽果汁对  $H_2O_2$  诱导 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):317-319.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.093

# 诺丽果汁对 $H_2O_2$ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

谭琳<sup>1</sup>, 郑晓燕<sup>1</sup>, 陈娇<sup>1</sup>, 郑学勤<sup>2</sup>, 马蔚红<sup>1</sup>, 艾斌凌<sup>1</sup>, 王朝政<sup>1</sup>

(1. 中国热带农业科学院海口实验站/海南省香蕉遗传改良重点实验室,海南海口 570102;

2. 中国热带农业科学院生物技术研究所,海南海口 571101)

**摘要:**为了探讨诺丽果汁对过氧化氢诱导的 PC12 细胞氧化损伤的保护作用,本试验采用  $H_2O_2$  造成 PC12 神经细胞氧化损伤模型,通过荧光显微镜观察细胞形态,MTT 测定细胞存活率、乳酸脱氢酶(LDH)活力检测法,Ho/PI 染色检测细胞凋亡和细胞坏死,研究的诺丽果汁对过氧化氢所致 PC12 细胞氧化损伤的影响。结果发现,体积分数在 1% ~ 5% 诺丽果汁均能不同程度地保护细胞形态,增加细胞的生存率,抑制过氧化氢诱导的 PC12 细胞坏死,减少损伤后 LDH 的生成。以上结果表明,1% ~ 5% 体积分数诺丽果汁对过氧化氢诱导的 PC12 细胞损伤有保护作用。

**关键词:**诺丽果汁; $H_2O_2$ ;PC12 细胞;细胞坏死;乳酸脱氢酶

**中图分类号:** TS275.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0317-03

氧化应激是由活性氧自由基和活性氮自由基产生和清除失衡引起的应激损伤状态<sup>[1]</sup>,在中枢神经系统退行性疾病中起着重要作用<sup>[2-3]</sup>。近年来,越来越多的研究显示植物多酚具有强抗氧化性,且在防治氧化损伤神经退行性疾病有着重要的作用<sup>[4-5]</sup>。诺丽(*Morinda citrifolia*),又称诺尼、海巴戟,属茜草科巴戟天属植物,主要分布在南太平洋诸岛屿以及中国的海南岛、西沙群岛和台湾岛等地<sup>[6]</sup>。早在 2 000 多年前,南太平洋岛屿的波利尼西亚人就发现诺丽果实具有天然的健康和医学功效,经常将诺丽果压成汁液,作为日常饮品和用于治疗癌症、糖尿病、高血压等多种疾病<sup>[7]</sup>。现代医学也表明诺丽具有抗氧化、抗癌、降糖等多种生物学活性<sup>[8-10]</sup>,但是关于其神经保护方面的功能鲜见报道。前期研究表明诺丽果汁

中多酚含量高达 1.934 mg/mL,且对 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟自由基、过氧化氢等均具有很好的清除活性<sup>[11]</sup>。本研究利用  $H_2O_2$  诱导类神经细胞系 PC12 细胞产生氧化损伤模型,检测诺丽果汁对 PC12 细胞的保护作用,旨在为新型诺丽果汁保健产品的开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 PC12 高分化细胞(大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株)购于中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。

1.1.2 诺丽果汁 诺丽果由郑学勤研究员采自海南陆侨集团三亚种植基地,将采来的新鲜诺丽果实去皮和去籽,果肉用医用纱布包裹,挤压,得到诺丽果汁,果汁再用一次性 0.22  $\mu$ m 滤膜(milipore)进行过滤除菌,备用。

1.1.3 药品和试剂 RMPH1640 培养液购自北京索莱宝公司;无支原体胎牛血清为杭州四季清生物工程材料有限公司产品;Trypsin 为 Amersco 公司产品;DMSO、LDH 脱氢酶试剂盒购自 Promega 公司;MTT、Hoechst33342/PI 细胞凋亡测定试剂盒上海美吉生物医药科技有限公司。

1.1.4 主要仪器 超净工作台(苏净安泰 VS-840K-U,苏

料时,发现发酵的米酒酸甜协调、口感醇和。黑糯玉米米酒发酵的最佳工艺参数为酒曲浓度 1.2%、发酵温度 28  $^{\circ}$ C、发酵时间 72 h。

## 参考文献:

- [1] 张钟,李凤霞,杨蕤光. 黑糯玉米黄酒发酵工艺条件的优化[J]. 粮食与饲料工业,2007(3):24-25,28.
- [2] 马越,赵晓燕,徐亚民. 黑玉米的营养价值与保健作用[J]. 食品研究与开发,2006(9):115-117.
- [3] 李建林,朱永义. 黑米蒸煮品质改良方法的研究[J]. 粮食与饲料工业,2003(5):5-7.
- [4] 刘邻渭. 食品化学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2011.

收稿日期:2015-03-24

基金项目:中国热带农业科学院海口实验站科研启动项目(编号:HKZKY140204);农业部财政项目“热带野生果树种子资源收集、利用和评价”。

作者简介:谭琳(1974—),女,博士,副研究员,研究方向为食品分子营养。E-mail:tanlin7402@126.com。

通信作者:马蔚红,研究员,主要从事热带作物种质资源收集与评价研究,E-mail:zjwhma@163.com;郑学勤,研究员,主要从事热带作物遗传育种研究。E-mail:zhengxxxqin@126.com。

米所特有的香气和发酵酒特有的醇香味;滋味鲜美,酸甜适度。

## 3.2 理化指标

糖度:4.0%;乙醇体积分数:9.5%;总酸度(g/100 g):3.8。

## 3.3 卫生指标

每 100 mL 细菌菌落总数 < 50 个,大肠杆菌菌落数 < 3 个,未检出致病菌。

## 5 结论

通过试验可知,当黑糯玉米与糯米以 1:2 的比例作为原

州),二氧化碳培养箱(Thermo/Forma3111,美国),倒置荧光显微镜(Zeiss/Axiovert 40CFL,德国),全自动酶标仪(Thermo Multiskan FC,美国);细胞培养瓶,细胞培养板(康宁)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** PC12 细胞培养用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,每 2 d 传代 1 次。待细胞增长至 80% 融合时,用 0.25% 胰酶消化细胞,调整细胞密度至  $1 \times 10^5$  个/mL 后传代或接种于细胞培养板进行各项指标测定。

**1.2.2 细胞形态检测** 取对数生长期的 PC12 细胞接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL。培养 24 h 后吸弃培养液。试验分为对照组、损伤组、预防组,每组设 3 个复孔。对照组细胞按常规方法培养,预防组用终体积分数分别为 1%、2.5%、5% 的诺丽果汁培养 24 h 后,吸弃培养液,PBS 冲洗 1~2 次,加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度为 0.3 mmol/L 的培养液,培养 4 h,损伤组用不含诺丽果汁的培养液培养,其余处理方法与预防组细胞相同,荧光倒置显微镜检查细胞形态。

**1.2.3 MTT 检测诺丽果汁对氧化应激损伤 PC12 细胞活力的影响** 按照“1.2.2”节进行试验分组、给药处理及培养,然后用 MTT 法测定细胞活力,向各孔加入 5 g/L 的 MTT 后继续培养 4 h,小心吸弃所有培养液,每孔加入 150 μL 二甲亚砜(DMSO)振荡 10 min。在酶标仪上以 560 nm 波长测定各孔吸光度  $D$ 。按相对活力  $= (\bar{D}_{\text{处理}} - \bar{D}_{\text{空白}}) / (\bar{D}_{\text{正常平均}} - \bar{D}_{\text{空白}}) \times 100\%$  公式计算细胞相对活力。

**1.2.4 细胞凋亡和细胞坏死检测** 根据 Hoechst33342/PI 试剂盒说明书进行细胞凋亡和细胞坏死检测。先配制好染色缓冲液,然后对各处理组进行离心收集悬浮细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次。取适量离心收集好的细胞用 0.5~1 mL 染色缓冲液将细胞重悬,使其浓度大约为  $1 \times 10^6$  个/mL。加入 5 μL Hoechst 33342 染色液。轻轻混匀后室温避光孵育 10~15 min。用 PBS 洗涤细胞 1 次,用 0.5~1 mL 染色缓冲液将细胞重悬,加入 5 μL PI 染色液,轻轻混匀后室温避光孵育 10~15 min,再用 PBS 洗涤细胞 1 次,加 PBS 稀释至适当浓度后荧光显微镜检测结果。Hoechst33342-DNA 的最大激发波长为 350 nm,最大发射波长为 460 nm,PI 的最大激发和最大发射波长分别为 488,615 nm。

**1.2.5 LDH 检测诺丽果汁对 PC12 细胞的保护作用** 细胞凋亡或坏死而造成的细胞膜结构的破坏时,细胞内的 LDH 会释放到培养基中,而活细胞则不会,所以培养上清中 LDH 的活性可以反映细胞的死亡或损伤程度。各组细胞经相应处理后,吸取细胞培养上清,按照试剂盒说明书操作检测 LDH 含量。

**1.2.6 数据处理与统计分析** 采用 SAS 9.0 统计分析软件分析试验数据,处理组之间差异显著性分析采用邓肯氏(Duncan's)多重比较法,以  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 诺丽果汁对 PC12 细胞形态的影响

本研究发现,对照组细胞呈长梭形或多角形镶嵌状排列,细胞边界清晰,大小均匀,细胞丰满,无重叠生长现象(图 1-A)。而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞出现收缩、变圆、体积变小,细胞间隙增宽,大部分细胞破碎、脱落,但细胞轮廓尚较清晰(图 1-

B)。用不同剂量诺丽果汁预处理后均有不同程度的保护作用,细胞形态好于损伤组(图 1),其中 10% 诺丽果汁预处理组细胞形态与对照组接近(图 1-E)。

### 2.2 诺丽果汁对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 PC12 细胞存活率的影响

不同质量浓度诺丽果汁均可减小 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞的增殖抑制作用,细胞存活率从 120% 增加到 166%,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比,差异极显著( $P < 0.01$ )(图 2)。此结果表明,在一定浓度范围内,诺丽果汁不仅有保护细胞免受损伤的作用,而且还有促进细胞增殖的作用。

### 2.3 诺丽果汁对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 PC12 细胞坏死的影响

Hoechst33342 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,与 DNA 结合,凋亡细胞有膜通透性改变,主要摄取 Hoechst 染料,凋亡细胞中的凝聚染色质会比正常细胞中的染色质染色更深、更加明亮,表现为强蓝色荧光。坏死细胞由于有很强 PI 嗜染性并可覆盖 Hoechst 染色,故呈强红色荧光。本研究发现,对照组有少数 PI 染色阳性细胞(橘黄色),300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组 PI 染色阳性细胞显著增加,而经诺丽果汁预处理后 PI 阳性细胞完全没有,但有少量凋亡细胞(亮蓝色)(图 3)。以上结果表明,诺丽果汁可显著地减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞坏死。

### 2.4 诺丽果汁对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 PC12 细胞 LDH 漏出率的影响

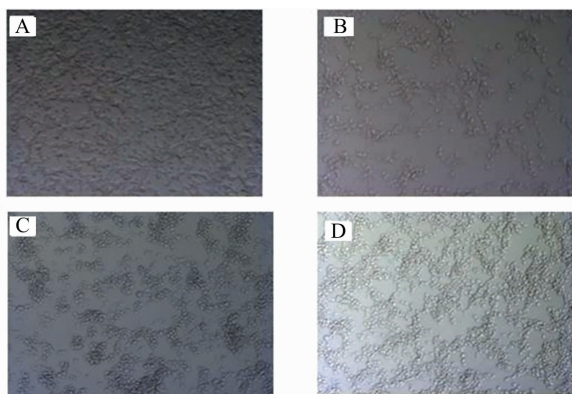
研究发现对照组中的 LDH 含量较低,而模型组中的 LDH 含量极显著高于对照组。经诺丽果汁保护后,LDH 含量下降,并随诺丽果汁浓度的增加而显著降低(图 4)。结果表明,诺丽果汁有效降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 PC12 细胞的氧化损伤,且在 1%~5% 的浓度范围内其保护效果与诺丽果汁浓度呈正相关。

## 3 结论与讨论

本研究用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成 PC12 神经细胞氧化损伤模型,通过荧光显微镜观察细胞形态,MTT 测定细胞存活率、乳酸脱氢酶(LDH)活力检测法,Ho/PI 染色检测细胞凋亡探讨诺丽果汁对过氧化氢所致 PC12 细胞氧化损伤的影响,发现 1%~5% 体积分数诺丽果汁均能不同程度地保护细胞形态,增加细胞的生存率,抑制过氧化氢诱导的 PC12 细胞坏死,减少损伤后 LDH 的生成,表明 1%~5% 体积分数诺丽果汁对过氧化氢诱导的 PC12 细胞损伤有保护作用,这将为诺丽果用于开发神经保护方面的保健品奠定了理论依据。

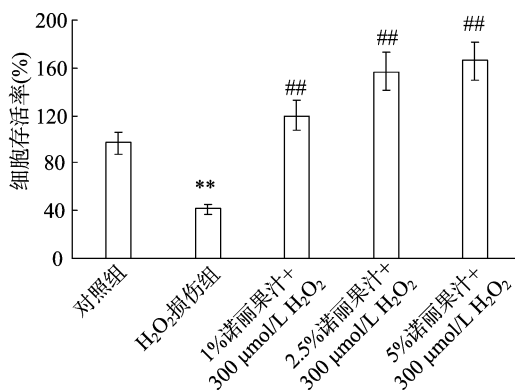
自 1983 年 Mosmann 创立了 MTT 比色法以来,由于其经济、灵敏、无放射性污染等特点,使之成为细胞生物学及相关研究领域一种常用的细胞活性检测方法<sup>[12]</sup>。本研究采用 MTT 比色法分析了 1%~5% 范围内诺丽果汁对过氧化氢诱导 PC12 损伤存活率的影响,发现其不仅有保护细胞免受损伤的作用,而且还有促进细胞增殖的作用,但有研究显示,10% 诺丽果汁能降低 Hela 细胞(宫颈癌细胞)22.3% 的生存率,具有抗癌作用<sup>[13]</sup>,这表明不同浓度范围的诺丽果汁对细胞的增殖作用不同。

虽然本研究首次报道了 1%~5% 体积分数诺丽果汁具有神经保护作用,但是在更大浓度的范围内,诺丽果汁对过氧化氢诱导的 PC12 细胞损伤是否还存在保护作用尚不得而



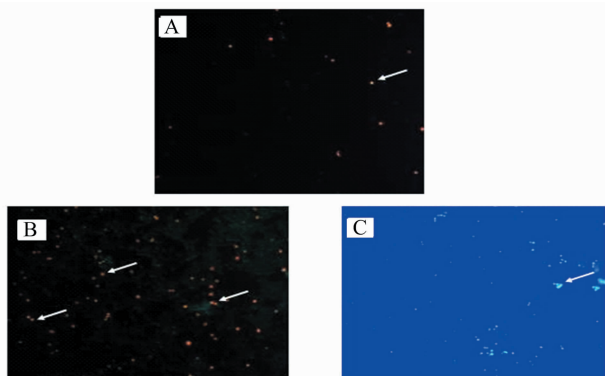
A—对照组; B—300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组; C—1% 诺丽果汁预处理;  
D—2.5% 诺丽果汁预处理; E—5% 诺丽果汁预处理

图1 诺丽果汁对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤PC12细胞形态学的影响



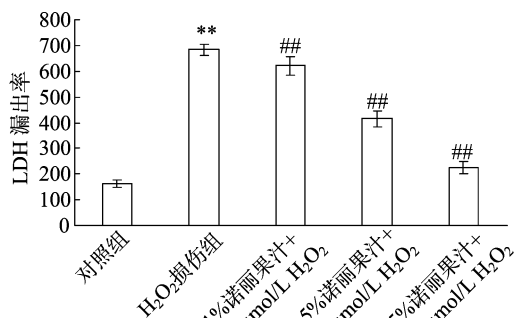
\*\*表示与对照组有极显著差异( $P<0.01$ ); ##表示与300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组相比有极显著差异( $P<0.01$ )

图2 诺丽果汁处理对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤PC12细胞存活率的影响



A—对照组; B—300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组; C—5% 诺丽果汁预处理

图3 诺丽果汁对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤PC12细胞坏死的影响



\*\*表示与对照组有极显著差异( $P<0.01$ ); ##表示与300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组相比有极显著差异( $P<0.01$ )

图4 诺丽果汁对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化损伤PC12细胞LDH漏出率的影响

#### 参考文献:

- [1] 付艳玲. 氧化应激与阿尔茨海默病以及抗氧化治疗研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2010, 37(4): 336-340.
- [2] Dubinina E E, Schedrina L V, Neznanov N G, et al. Oxidative stress and its effect on cells functional activity of Alzheimer's disease[J]. Biomeditsinskaia Khimiia, 2015, 61(1): 57-69.
- [3] Joshi Y B, Praticò D. The 5-lipoxygenase pathway: oxidative and inflammatory contributions to the Alzheimer's disease phenotype[J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2014, 8(8): 436.
- [4] Pasinetti G M, Wang J, Ho L, et al. Roles of resveratrol and other rape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2014(14): 00312-00313.
- [5] Malar D S, Devi K P. Dietary polyphenols for treatment of Alzheimer's disease - future research and development [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2014, 15(4): 330-342.
- [6] 李法营, 蓝增全, 刘昌芬, 等. 诺丽研究进展(一)——国内外研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(32): 15819-15821.
- [7] 许国平, 张春妮. 诺丽作用机制的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2007, 20(9): 974-977.
- [8] Lin Y L, Chou C H, Yang D J, et al. Hypolipidemic and antioxidative effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on high-fat/cholesterol-dietary hamsters [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2012, 67(3): 294-302.
- [9] Kma L. Roles of plant extracts and constituents in cervical cancer therapy[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2013, 14(6): 3429-3436.
- [10] Lee S Y, Park S L, Hwang J T, et al. Antidiabetic effect of *Morinda citrifolia* (Noni) fermented by cheonggukjang in KK-A(y) diabetic mice [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, 2012: 163280.
- [11] 李奕星, 袁德保, 郑晓燕, 等. 诺丽果汁的抗氧化性研究[J]. 热带作物学报, 2013, 34(8): 1531-1534.
- [12] 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT法和CCK-8法检测细胞活性之测试条件比较[J]. 激光生物学报, 2007, 16(5): 559-562.
- [13] Gupta R K, Banerjee A, Pathak S, et al. Induction of mitochondrial-mediated apoptosis by *Morinda citrifolia* (Noni) in human cervical cancer cells[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2013, 14(1): 237-242.

知。此外, 1%~5% 体积分数诺丽果汁产生的保护作用机制尚不清楚。因此, 今后将在更广的浓度范围内研究诺丽果汁对 PC12 细胞的保护作用, 并探究其作用机制。