



葡萄原花青素和花青素对丙烯酰胺致细胞损伤的保护作用

郝瑞芳, 于 蓉, 张先平, 侯艳霞, 张兴亮

(山西林业职业技术学院 园艺系, 山西 太原 030009)

摘要:用丙烯酰胺诱导人结肠癌细胞 HT-29 和人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 损伤建立细胞损伤模型, 研究葡萄籽原花青素和花青素提取物对两种细胞的保护作用。结果表明:用 $100\sim 700\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丙烯酰胺分别对 HT-29 和 SH-SY5Y 细胞孵育 6 和 8 h, 两种细胞存活率分别下降至 $44.6\%\sim 80.5\%$ 和 $52.0\%\sim 81.0\%$, 表明丙烯酰胺对细胞均有损伤作用。经葡萄籽提取物或葡萄皮提取物 ($5, 10, 20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 预先对 HT-29 细胞孵育 1 h 后, 再用 $300\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丙烯酰胺处理 6 h, HT-29 细胞的存活率均显著高于丙烯酰胺损伤组 (69.8%), 其中 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄籽提取物和葡萄皮提取物对 HT-29 细胞的保护作用最强, 细胞存活率分别达到 92.4% 和 93.8% 。用葡萄皮提取物 ($5, 10, 20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和葡萄籽提取物 ($5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对 SH-SY5Y 细胞预先孵育 1 h, 同样能够显著增加 SH-SY5Y 细胞的存活率。其中, 葡萄皮提取物的保护作用较强, 低、中、高浓度组的细胞存活率分别为 $80.7\%, 89.3\%, 91.5\%$ 。葡萄原花青素和花青素具有抑制细胞损伤的作用。

关键词:葡萄籽原花青素提取物; 葡萄皮花青素提取物; 丙烯酰胺; 细胞损伤

丙烯酰胺是一种具有细胞毒性的物质。丙烯酰胺能够显著抑制 PC12 细胞的活性, 损伤细胞 DNA, 并诱导细胞氧化损伤^[1]。丙烯酰胺可诱导肝细胞 Hep G2 导致 DNA 断裂, 微核形成, 细胞内活性氧的水平提高, 造成细胞发生氧化应激损伤^[2]。丙烯酰胺对肠细胞 Caco-2 也有一定的毒性作用, 它能够抑制 Caco-2 细胞内谷胱甘肽-S-转移酶的活性, 降低细胞内还原型谷胱甘肽的水平, 从而对细胞产生毒性作用^[3]。有研究表明天然抗氧化剂姜黄素、茶多酚、白藜芦醇等可抑制丙烯酰胺在体内产生的毒性作用^[2, 4]。姜黄素能够显著抑制丙烯酰胺诱导的 Hep G2 细胞氧化损伤^[2]。具有抗氧化活性的美拉德反应产物也能够显著抑制 AAPH、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 致 Caco-2 细胞的毒性作用^[5]。

葡萄中原花青素和花青素都是抗氧化活性较强的物质, 能有效清除人体内多余的自由基, 具有延缓衰老和增强免疫力的作用。因此, 本试验选用人结肠癌细胞 HT-29 和人神经母细胞瘤 SH-SY5Y, 用丙烯酰胺诱导细胞损伤, 建立细胞损伤模型, 探讨葡萄籽原花青素和葡萄皮花青素

对丙烯酰胺致这两种细胞的损伤是否具有保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞 HT-29 和人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 购自中国协和医科大学; 高糖型 DMEM 细胞培养液购自美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清购自北京鼎国生物技术有限责任公司; 丙烯酰胺标准品, 纯度 99.5% 购自美国 Sigma 公司。葡萄籽原花青素提取物 (GSPE) 和葡萄皮花青素提取物 (GHAE) 购自天津市尖峰天然产物研究开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 试液配制 ①磷酸盐缓冲液:称取磷酸二氢钾 $0.20\ \text{g}$, 磷酸氢二钠 $2.90\ \text{g}$, 氯化钾 $0.20\ \text{g}$, 氯化钠 $8.00\ \text{g}$, 加 $900\ \text{mL}$ 超纯水溶解, 用 18% 的盐酸调 pH 至 7.4 , 最后定容至 $1\ \text{L}$ 。②葡萄籽原花青素提取液和葡萄皮花青素提取液:用磷酸盐缓冲液分别溶解葡萄籽提取物和葡萄皮提取物, 分别配制成 $1.0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的原液, 无菌条件下用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, 临用前用不含血清的 DMEM 培养液稀释到所需浓度。③丙烯酰胺溶液:用磷酸盐缓冲液溶解丙烯酰胺, 配制成 $1.0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液, 在无菌条件下用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, 临用前用不含血清的 DMEM 培养液稀释到所需浓度。

收稿日期:2018-01-07

基金项目:山西省科技厅青年基金资助项目 (20150211154); 山西林业职业技术学院科研教改基金资助项目 (20170207)。

第一作者简介:郝瑞芳 (1978-), 女, 博士, 副教授, 从事食品安全与质量控制研究。E-mail: 471518969@qq.com。

1.2.2 细胞培养 将 HT-29 细胞和 SH-SY5Y 细胞分别培养于含 20% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的高糖 DMEM 培养液,置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱内培养。当细胞生长至 80%~90% 融合时,进行传代。

1.2.3 葡萄籽提取物和葡萄皮提取物对细胞生长的影响 取 96 孔细胞培养板,每孔加 100 μL 对数生长期的细胞制成的细胞悬液,HT-29 细胞密度为 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,SH-SY5Y 细胞密度为 5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。HT-29 细胞和 SH-SY5Y 细胞分别培养 24 和 48 h 后弃培养液,每孔内先加入 70 μL 磷酸盐缓冲液润洗细胞表层,弃去缓冲液,然后分别加入 100 μL 不同浓度的葡萄籽提取物或葡萄皮提取物(均为 5、10、20、40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),HT-29 细胞于 37 °C 孵育 6 h,SH-SY5Y 细胞于 37 °C 孵育 8 h;弃去孵育溶液,每孔加入 100 μL 培养液继续培养 24~48 h,用 MTT 法检测细胞存活率。

1.2.4 细胞损伤模型的建立 HT-29 细胞和 SH-SY5Y 细胞分别接种于 96 孔板培养 24 和 48 h 后弃培养液,每孔加入 100 μL 含不同浓度的丙烯酰胺溶液(100~700 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),37 °C 孵育 2~8 h;弃去丙烯酰胺溶液,每孔加入 100 μL 培养液继续培养 24~48 h,用 MTT 法测定细胞存活率,确定细胞损伤模型的丙烯酰胺浓度^[6]。

1.2.5 GSPE 和 GHAE 对丙烯酰胺致 HT-29 和 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用 试验设对照组(用磷酸盐缓冲液对 HT-29 细胞孵育 6 h)、提取液-20 组(GSPE-20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或 GHAE-20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 孵育 6 h)、丙烯酰胺损伤组(单独用 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丙烯酰胺孵育 6 h)、试验组(5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 GSPE 或 GHAE 孵育 1 h,再加丙烯酰胺 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 孵育 6 h)。HT-29 和 SH-SY5Y 细胞分别接种于 96 孔板培养 24 和 48 h 后弃培养液,用磷酸盐缓冲液润洗细胞表层,弃去缓冲液,然后给予不同浓度的提取液和丙烯酰胺处理。操作步骤为:对照组和丙烯酰胺损伤组中每孔均加入 50 μL 不含血清的细胞培养液,试验组每孔先加入 50 μL 葡萄籽提取物或葡萄皮提取物(终浓度为 5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),37 °C 预孵育 1 h 后,对照组再加入 50 μL 不含血清的细胞培养液,提取液-20 组再加入 50 μL 葡萄籽提取物或葡萄皮提取物(20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),其余组均加入 50 μL 丙烯酰胺(300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),进行损伤处

理(HT-29 细胞于 37 °C 继续孵育 6 h,SH-SY5Y 细胞继续孵育 8 h)。损伤处理结束后,所有组均弃去各孔中的样品溶液,加 100 μL 细胞培养液继续培养 24~48 h,然后用 MTT 法检测细胞存活率。

1.2.6 数据分析 每个试验重复 3 次,每个重复测定 3 次,结果表示为 Means \pm SD。采用 MINITAB 13.20 软件进行 One-way ANOVA 分析。邓肯氏多重检验用来确定数据间的差异,显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 GSPE 和 GHAE 对 HT-29 细胞和 SH-SY5Y 细胞生长的影响

从表 1 可以看出,当葡萄籽提取物和葡萄皮提取物为 5~20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,分别对 HT-29 细胞孵育 2~6 h,对细胞的生长均无明显地抑制作用,细胞存活率都在 99% 以上。葡萄籽提取物和葡萄皮提取物为 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,孵育 2 h,和对照相比,细胞存活率无差异,但孵育超过 4 h,存活率显著下降。当葡萄籽提取物和葡萄皮提取物为 5~20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,分别对 SH-SY5Y 细胞孵育 4~6 h,细胞生长旺盛,细胞存活率均高于对照组,最高达到 127.2%,表明两种提取物对细胞生长有明显的促进作用;孵育达到 8 h,提取物对细胞的生长虽无促进作用但也无明显的抑制作用,细胞存活率和对照组相比均无显著差异;然而,用 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的两种提取物分别对 SH-SY5Y 细胞孵育 6~8 h,细胞存活率最低达 83.5%,表明两种提取物对细胞产生损伤,导致细胞存活率均显著下降。因此,最终确定葡萄籽提取物和葡萄皮提取物的浓度均为 5、10 和 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别对 HT-29 细胞孵育 6 h,对 SH-SY5Y 细胞孵育 8 h,以此为基础探讨两种提取物分别对丙烯酰胺致 HT-29 细胞和 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用。

2.2 丙烯酰胺对 HT-29 和 SH-SY5Y 细胞生长的影响

丙烯酰胺对两种细胞的生长均有一定的抑制作用,其抑制效果与丙烯酰胺的浓度、孵育时间呈正相关。如图 1 所示,当丙烯酰胺浓度为 100~500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,HT-29 细胞孵育 2~4 h,生长良好,细胞存活率和对照组相比无显著差异;丙烯酰胺为 600~700 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率显著低于对照组,但仍然在 80% 以上。当孵育时间达到 6 h 时,丙烯酰胺对 HT-29 细胞的生长具有显著

的抑制作用,丙烯酰胺为 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率为 80.5% ,随着丙烯酰胺浓度逐渐增加,细胞的存活率显著下降,当浓度为 $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞的存活率为 71.8% ;当丙烯酰胺达到 $700\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞的存活率仅为 44.6% ,超过一半以上的细胞回缩变圆,胞体皱缩、死亡,其余

的细胞也不像正常对照组的细胞长得饱满。有研究报道用丙烯酰胺($1\sim3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 HT-29 细胞孵育 20 h,细胞存活率会随着丙烯酰胺浓度的增加而逐渐下降,最低可降至 30% ^[7]。因此,选用浓度为 $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丙烯酰胺对 HT-29 细胞孵育 6 h 建立损伤模型。

表 1 葡萄籽提取物和葡萄皮提取物对 HT-29 和 SH-SY5Y 细胞生长的影响
Table 1 Effects of GSPE and GHAE on cell growth of HT-29 and SH-SY5Y

添加物 Additives	浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Concentration	细胞存活率/% Cell viability					
		HT-29			SH-SY5Y		
		2 h	4 h	6 h	4 h	6 h	8 h
葡萄籽提取物 GSPE	0	100.7±5.7 a	100.5±3.7 a	100.0±3.2 a	100.0±8.7 a	100.0±1.4 a	100.0±7.3 a
	5	121.2±1.8 b	118.7±0.8 b	119.4±3.3 b	127.2±5.9 b	101.7±0.6 a	105.4±4.3 a
	10	118.7±2.5 b	115.1±4.2 b	109.8±1.9 ab	125.7±2.8 b	105.3±3.2 a	101.8±3.3 a
	20	108.5±2.9 b	99.2±2.8 a	107.6±4.4 a	110.5±2.1 b	104.2±2.8 a	99.9±8.5 a
	40	101.4±3.2 a	86.7±3.4 b	80.5±4.4 b	88.5±3.2 c	90.6±5.4 b	83.5±3.1 b
葡萄皮提取物 GHAE	5	111.4±1.5 b	110.5±2.8 a	109.7±5.3 a	121.2±2.5 b	108.2±5.7 a	99.4±3.3 a
	10	108.1±2.2 b	104.2±3.2 a	109.6±4.1 a	119.3±4.2 b	102.7±8.2 a	98.4±5.4 a
	20	108.5±2.9 b	99.5±3.3 a	105.3±1.1 a	115.6±8.8 b	100.5±2.3 a	100.9±7.5 a
	40	97.4±2.9 a	84.2±4.2 b	88.6±2.7 b	100.4±2.2 a	90.2±1.2 b	84.3±5.9 b

同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。
Different letters in the same column mean significant differences at 0.05 level. The same below.

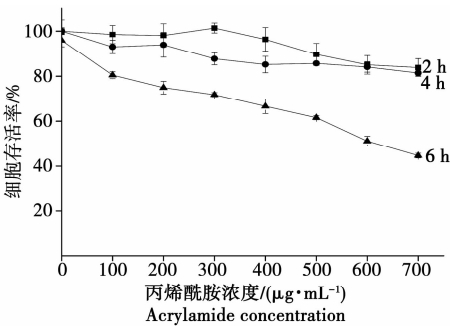


图 1 丙烯酰胺对 HT-29 细胞生长的抑制作用
Fig. 1 Inhibitory effect of acrylamide on cell growth of HT-29

图 2 显示了不同浓度的丙烯酰胺对 SH-SY5Y 细胞生长的影响。用 $100\sim400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丙烯酰胺对细胞孵育 4~6 h,细胞存活率和对照组相比无显著差异,均为 90% 以上,说明该浓度范围的丙烯酰胺对 SH-SY5Y 细胞的生长影响较小;然而用 $500\sim700\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丙烯酰胺孵育细胞,细胞存活率最低降为 70% ,表明细胞生长受到明显地抑制。若将孵育时间延长至 8 h, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丙烯酰胺就会显著抑制细胞的生长,细胞存活率降至 81.0% , $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丙烯

酰胺可使细胞存活率降至 70% ; $700\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丙烯酰胺可使细胞存活率降至 52.0% ,细胞生长和对照组相比具有显著的差异,该研究结果与 Okuno 等^[8]的结果基本一致。Okuno 等研究表明丙烯酰胺对 SH-SY5Y 细胞的毒性作用与丙烯酰胺的浓度和孵育时间呈正相关性。用丙烯酰胺($5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞孵育 0~24 h,细胞存活率也随孵育时间的延长逐渐下降,最低可降至 70% ^[8]。

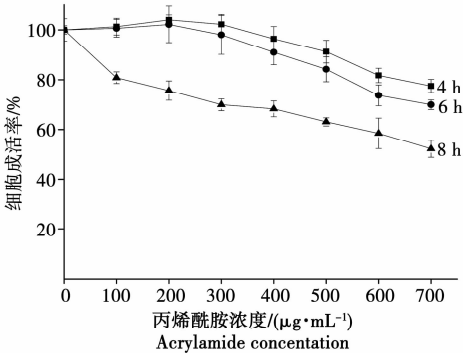


图 2 丙烯酰胺对 SH-SY5Y 细胞生长的抑制作用
Fig. 2 Inhibitory effect of acrylamide on cell growth of SH-SY5Y

因此选用浓度为 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丙烯酰胺对 SH-SY5Y 细胞孵育 8 h 建立细胞损伤模型。

2.3 GSPE 和 GHAE 对丙烯酰胺致 HT-29 和 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用

2.3.1 GSPE 和 GHAE 对丙烯酰胺致 HT-29 细胞损伤的保护作用 由表 2 可知,对照组细胞生长良好,用 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄籽提取物或葡萄皮提取物对 HT-29 细胞孵育 6 h,细胞同样能够正常生长,与对照组相比无差别;然而用 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丙烯酰胺对细胞孵育 6 h,细胞存活率下降为 69.8%,表明细胞生长受到显著抑制。若预先添加不同浓度的葡萄籽提取物或葡萄皮提取物对 HT-29 细胞孵育 1 h 后再用丙烯酰胺进行损伤处理,细胞存活率则显著增强,说明两种提取物对丙烯酰胺造成的 HT-29 细胞损伤均

有显著的保护作用。其中,葡萄籽提取物组中,中剂量组对 HT-29 细胞的保护作用最大,细胞生长状态与对照组的接近,细胞存活率达到 92.4%,且显著高于低剂量组(82.1%)和高剂量组(84.5%),3 个剂量组均显著高于丙烯酰胺损伤组(69.8%)。葡萄皮提取物的 3 个剂量组中,HT-29 细胞的生长能够明显改善,细胞存活率在 86.0%~93.8%,均显著高于丙烯酰胺损伤组;同样是中剂量组对 HT-29 细胞的保护作用最大(93.8%),细胞存活率接近对照组,低剂量组(86.0%)和高剂量组(89.7%)之间无差别,3 个剂量组之间也无显著差异。

试验结果显示,葡萄籽提取物和葡萄皮提取物对丙烯酰胺诱导的 HT-29 细胞生长抑制均具有显著的保护作用。

表 2 葡萄籽提取物和葡萄皮提取物对丙烯酰胺致 HT-29 细胞损伤的保护作用

Table 2 Protective effect of GSPE and GHAE on acrylamide-induced cytotoxicity in HT-29 cell			
处理 Treatments	细胞存活率/% Cell viability	处理 Treatments	细胞存活率/% Cell viability
对照(CK)	100.0±3.2 a	对照(CK)	100.0±3.2 a
GSPE-20	107.6±4.4 a	GHAE-20	105.3±1.1 a
丙烯酰胺	69.8±1.3 c	丙烯酰胺	69.8±1.3 c
GSPE-5+丙烯酰胺	82.1±3.1 b	GHAE-5+丙烯酰胺	86.0±5.0 b
GSPE-10+丙烯酰胺	92.4±4.7 a	GHAE-10+丙烯酰胺	93.8±1.0 ab
GSPE-20+丙烯酰胺	84.5±1.1 b	GHAE-20+丙烯酰胺	89.7±3.8 b

2.3.2 GSPE 和 GHAE 对丙烯酰胺致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用 由表 3 可知,葡萄皮提取物的 3 个剂量组(5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和葡萄籽提取物(5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)能够显著抑制丙烯酰胺对 SH-SY5Y 细胞产生的损伤作用。其中,葡萄皮提取物的保护作用较强,高、中、低剂量组的细

胞存活率分别为 91.5%、89.3%、80.7%,高剂量组的细胞存活率与对照组接近,且差异不显著。葡萄籽提取物的保护作用较弱,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组的细胞存活率为 86.3%,对照组比较有显著差异,中、高剂量组的细胞存活率与丙烯酰胺相比差异不显著,说明对 SH-SY5Y 细胞无保护作用。

表 3 葡萄籽提取物和葡萄皮提取物对丙烯酰胺致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用

Table 3 Protective effect of GSPE and GHAE on acrylamide-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cell			
处理 Treatments	细胞存活率/% Cell viability	处理 Treatments	细胞存活率/% Cell viability
对照(CK)	100.0±3.4 a	对照(CK)	100.0±3.4 a
GSPE-20	97.1±0.8 a	GHAE-20	105.3±3.5 a
丙烯酰胺	67.6±2.3 c	丙烯酰胺	67.6±2.3 d
GSPE-5+丙烯酰胺	86.3±7.8 b	GHAE-5+丙烯酰胺	80.7±3.6 c
GSPE-10+丙烯酰胺	73.2±5.2 bc	GHAE-10+丙烯酰胺	89.3±6.1 bc
GSPE-20+丙烯酰胺	68.8±4.9 c	GHAE-20+丙烯酰胺	91.5±3.5 ab

3 讨论与结论

3.1 讨论

丙烯酸胺具有一定的细胞毒性作用。Sum-izawa 等^[7]研究表明丙烯酸胺($1\sim 3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)能降低 HT-29 细胞的存活率,增加乳酸脱氢酶的释放量;丙烯酸胺还诱导 HT-29 细胞在 sub G1 周期中的数量显著增加,激活细胞内的 caspase-3 活性,从而导致细胞凋亡。丙烯酸胺($1\sim 5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)能降低 SH-SY5Y 细胞的活力,增加乳酸脱氢酶释放量,促进细胞的凋亡^[9]。天然抗氧化剂姜黄素、茶多酚、白藜芦醇、人参皂苷和二烯丙基三硫化物(大蒜成分)可抑制丙烯酸胺在体内产生的毒性^[2,4]。Cao 等^[2]用 $2.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的姜黄素对 Hep G2 细胞预先孵育 2 h,再换成丙烯酸胺($10\sim 20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞损伤处理一定时间,结果显示:和丙烯酸胺损伤组相比,姜黄素保护组的细胞存活率显著提高,说明姜黄素对丙烯酸胺的细胞损伤有显著的保护作用。而且姜黄素能够显著抑制丙烯酸胺诱导的 Hep G2 细胞内活性氧簇的释放、细胞内 DNA 双链的断裂和微核的发生率;姜黄素还能显著提高细胞内超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性,对活性氧造成的细胞氧化损伤有显著的保护作用。姜黄素对 Hep G2 细胞的保护作用可能是通过其较强的抗氧化性来实现的。

葡萄中原花青素具有较强的抗氧化性,能显著清除自由基及抑制脂质过氧化,其主要机理是原花青素能够提供质子氢,阻断自由基导致的链式反应^[10-11]。天然花青素也是抗氧化、清除自由基能力极强的物质,其能有效清除人体内多余的自由基,具有超强的延缓衰老和增强免疫力的作用^[12]。

本试验选用的葡萄籽提取物中原花青素含量 $\geq 95.0\%$,葡萄皮提取物中花青素含量为 25.0% 。结果表明,葡萄籽提取物和葡萄皮提取物对丙烯酸胺诱导的 HT-29 细胞生长抑制均具有显著地保护作用。用葡萄籽提取物或葡萄皮提取物预孵育细胞后,细胞的生长得到明显改善,细胞存活率均显著高于丙烯酸胺损伤组。葡萄皮提取物的 3 个剂量组(5 、 10 、 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和葡萄籽提取

物($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)能够显著抑制丙烯酸胺对 SH-SY5Y 细胞产生的损伤作用。推测其抑制机理可能与原花青素和花青素的抗氧化性有关,通过去除细胞内的自由基,从而保护细胞免受氧化损伤。该研究结果与文献报道的结果一致。Zhang 等^[13]从橄榄油中提取出的一种抗氧化性很强的物质——羟基酪醇,它对丙烯酸胺诱导的人肝癌细胞株 Hep G2 的遗传毒性具有显著的抑制作用。抑制机理为:羟基酪醇能显著减少细胞内活性氧簇的形成,显著减弱由丙烯酸胺引起的细胞内谷胱甘肽水平的降低;羟基酪醇还能增强 Hep G2 细胞中 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的表达,从而提高了胞内谷胱甘肽的水平。Song 等^[14]研究表明矢车菊素-3-葡萄糖苷能显著抑制丙烯酸胺诱导的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的毒性作用,减少细胞内活性氧簇的形成,抑制丙烯酸胺诱导的细胞氧化应激损伤。

3.2 结论

用浓度为 $5\sim 20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄籽原花青素提取物和葡萄皮花青素提取物分别对 HT-29 细胞孵育 6 h,对 SH-SY5Y 细胞孵育 8 h,两种提取物分别对这两种细胞的生长无任何抑制作用。用丙烯酸胺($300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对 HT-29 细胞孵育 6 h,对 SH-SY5Y 细胞孵育 8 h,两种细胞存活率均有显著下降。经葡萄籽原花青素提取物或葡萄皮花青素提取物(5 、 10 、 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)保护后,HT-29 细胞存活率显著提高,表明该浓度范围内的葡萄籽提取物或葡萄皮提取物对丙烯酸胺诱导的 HT-29 细胞损伤具有保护作用,保护作用强弱依次为:中剂量组 $>$ 高剂量组 $>$ 低剂量组。葡萄皮花青素提取物(5 、 10 、 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和葡萄籽原花青素提取物($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)同样能够显著抑制丙烯酸胺对 SH-SY5Y 细胞产生的损伤作用。葡萄皮花青素提取物的保护作用较强,高剂量组 $>$ 中剂量组 $>$ 低剂量组;葡萄籽原花青素提取物的保护作用较弱,只有低剂量组对 SH-SY5Y 细胞有保护作用。

参考文献:

- [1] 李程,王穆,吴剑阁,等.丙烯酸胺对 PC12 细胞损伤及机制研究[J].实用预防医学,2011,18(11):1826-1829.
- [2] Cao J, Liu Y, Jia L, et al. Curcumin attenuates acrylamide-

- induced cytotoxicity and genotoxicity in Hep G2 cells by ROS scavenging [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56: 12059-12063.
- [3] Pernice R, Hauder J, Koehler P, et al. Effect of sulforaphane on glutathione-adduct formation and on glutathione-S-transferase-dependent detoxification of acrylamide in Caco-2 cells [J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2009, 53: 1540-1550.
- [4] Xie Q Y, Liu Y, Sun H F, et al. Inhibition of acrylamide toxicity in mice by three dietary constituents [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56: 6054-6060.
- [5] Jing H, Kitts D D. Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 429: 154-163.
- [6] Jing H, Kitts D D. Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 429: 154-163.
- [7] Sumizawa T, Igisu H. Apoptosis induced by acrylamide in HT-29 cells [J]. Archives of Toxicology, 2007, 81: 279-282.
- [8] Okuno T, Matsuoka M, Sumizawa T, et al. Involvement of the extracellular signal-regulated protein kinase pathway in phosphorylation of p53 protein and exerting cytotoxicity in human neuroblastoma cells (HT-29) exposed to acrylamide [J]. Archives of Toxicology, 2006, 80: 146-153.
- [9] Sumizawa T, Igisu H. Suppression of acrylamide toxicity by carboxyfullerene in human neuroblastoma cells *in vitro* [J]. Archives of Toxicology, 2009, 83: 817-824.
- [10] Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts [J]. Bioresource technology, 2003, 87: 41-44.
- [11] 陈月英, 王彦平, 孙瑞琳, 等. 葡萄皮渣原花青素酶法提取工艺优化及抗氧化性研究 [J]. 北方园艺, 2016 (16): 129-132.
- [12] 戴妙妙. 紫娟茶中花青素提取物的抗氧化性研究 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37 (9): 42-46.
- [13] Zhang X M, Cao J, Jiang L P, et al. Protective effect of hydroxytyrosol against acrylamide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cell [J]. Mutation Research, 2009, 664: 64-68.
- [14] Song J, Zhao M Y, Liu X, et al. Protection of cyanidin-3-glucoside against oxidative stress induced by acrylamide in human MDA-MB-231 cells [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 58: 306-310.

Protective Effects of Grape Procyanidine and Anthocyanin on Cell Injuries Induced by Acrylamide

HAO Rui-fang, YU Rong, ZHANG Xian-ping, HOU Yan-xia, ZHANG Xing-liang

(Department of Horticulture, Shanxi Forestry Vocational Institute, Taiyuan 030009, China)

Abstract: The preventive effects of grape seed procyanidine extract (GSPE) and grape hull anthocyanin extract (GHAE) on acrylamide-induced cell injuries of human colon cancer cells (HT-29) and human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) were investigated by using cellular morphology in this paper. The results showed that the cell viabilities were decreased to 44.6%-80.5% when HT-29 cells were incubated 6 h with acrylamide of 100-700 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The cell viabilities were decreased to 52.0%-81.0% when SH-SY5Y cells were incubated 8 h with acrylamide of 100-700 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and it showed that acrylamide induced these two cells damage. However, when HT-29 cells were pre-protected 1 h with GSPE or GHAE of 5, 10 and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ before incubation 6 h with acrylamide of 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, GSPE and GHAE resulted in significant increases of cell viability respectively, as compared with that in acrylamide injury group (69.8%). GSPE and GHAE had the maximum protective effects on HT-29 cell from AA-induced cytotoxicity, with HT-29 cell viability of 92.4% and 93.8%. Moreover, compared with acrylamide group, pretreatment of GHAE (5, 10 and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and GSPE (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) resulted in significant increases of cell viabilities on SH-SY5Y cell. GHAE had better protective effects on SH-SY5Y cell than GSPE, with the cell viabilities of 80.7%, 89.3% and 91.5% at 5, 10 and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. GSPE and GHAE could effectively protect HT-29 cells and SH-SY5Y cells from acrylamide-induced injury.

Keywords: grape seed procyanidine extract (GSPE); grape hull anthocyanin extract (GHAE); acrylamide; cells injury