

基于 AFM 的人参水提物对 VERO 细胞氧化损伤作用研究

刘畅¹, 曲英敏², 李景梅^{1*}

(1. 长春理工大学生命科学技术学院, 吉林长春 130022; 2. 长春理工大学电子信息工程学院, 吉林长春 130022)

摘要 [目的] 研究人参水提物对 VERO 细胞在体外培养中的氧化损伤。[方法] 采用细胞体外培养技术、MTT 比色法、SOD 和 MDA 试剂盒法、原子力显微镜(AFM)观察法, 研究人参水提物对 VERO 细胞氧化损伤的机制。[结果] 人参水提物对 VERO 细胞能够起到明显的增殖抑制作用。人参水提物对 VERO 细胞具有一定的氧化损伤作用且有一定的剂量及时间依赖性。原子力显微扫描成像结果表明正常生长的 VERO 细胞表面光滑、细胞体积饱满, 而人参水提物处理组细胞膜损坏现象明显, 细胞表面的粗糙度较大。[结论] 人参水提物对 VERO 细胞具有一定的氧化损伤作用, 其作用机制可能与细胞膜的损伤有关。

关键词 人参水提物; VERO 细胞; 原子力显微成像; 氧化损伤

中图分类号 TQ028.0 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)01-00113-04

Study of Oxidative Damage Effect of WEG on VERO Cells Based on AFM

LIU Chang et al (School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun, Jilin 130022)

Abstract [Objective] To clarify the oxidative damage effect of water extracts of ginseng (WEG) on VERO cells. [Method] By using *in vitro* cell culture technology, MTT assays, SOD & MDA kits, atomic force microscope (AFM), the oxidative damage effects of WEG on VERO cells were studied. [Result] The results indicated that WEG could inhibit the proliferation of VERO cells significantly. WEG has a certain oxidative damage on VERO cells *in vitro*, and has dose-dependent and time-dependent. By AFM, those cells in the experimental groups were observed getting shrinkage and round, membrane broken and surface roughness, depending on the increasing concentration. While the cells in the control group were uniform and full, the surfaces of the cells were smooth. [Conclusion] WEG can do the oxidative damage on the VERO cells *in vitro*, and this phenomenon maybe related to the broken of the cell membrane by WEG.

Key words Water extracts of ginseng(WEG); VERO cells; Atomic force microscope (AFM); Oxidative damage

人参是我国的一种传统中药^[1], 但关于其毒性的报道较少。研究表明, 人参水溶性蛋白对 VERO 细胞的体外增殖具有一定的抑制作用^[2]。VERO 细胞来源于非洲绿猴肾, 具有无限增殖的特点, 常用于药物对肾脏毒性影响的试验^[3]。唐蕊华等^[4]通过原子力显微镜(AFM)对细胞表面扫描成像手段观察 Vero-E6 细胞在被汉坦病毒感染前后细胞表面形貌的变化, 结果表明使用 AFM 扫描经不同稀释度的汉坦病毒处理的细胞表面, 发现细胞表面粗糙程度、细胞表面的空洞数量均发生一定的改变, 采用 AFM 技术可以通过观察细胞表面超微结构的变化粗略判断出病毒感染细胞的动态过程。笔者采用传统的中药煎煮法制备人参水提物, 以非洲绿猴肾细胞作为人参水提物的受试细胞, 探讨人参水提物对肾细胞的毒性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 1640 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清(FBS, 杭州四季青公司)、胰酶(Trypsin, 长春天佳公司); 噻唑兰(MTT, Sigma 公司)、二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司)、鲜人参(购于吉林农业大学, 产地为吉林省抚松地区)、SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所)、MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所)、CO₂ 培养箱(日本三洋公司)、原子力显微镜(N9410S, Agilent)。

1.2 提取物的制备 取鲜人参根 50 g, 剪碎, 加入 700 ml 蒸馏水, 100 °C 条件下提取 4 h, 纱布过滤。滤渣重复提取 2 次, 每次 4 h。将 3 次所得滤液合并, 60 °C 水浴浓缩至 50 ml, 离心(4 500 r/min, 15 min), 弃去沉淀。得到的上清即为人参水

提物(WEG)。将 WEG 置于 60 °C 水浴继续浓缩, 冷冻干燥后用少量无菌培养液将其溶解, 原始浓度为 200 mg/ml, 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。用培养液稀释成所需要的浓度。

1.3 体外试验方法

1.3.1 细胞培养及传代。 将 VERO 细胞用含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液按照 1×10^5 个/ml 的浓度接种于无菌培养瓶内, 置于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱内。0.25% 胰酶消化液消化传代, 3~4 d 传代 1 次。试验所用 VERO 细胞均处于对数生长期。

1.3.2 MTT 法检测 WEG 对 VERO 细胞的影响。 将 VERO 细胞用含 8% 灭活胎牛血清、1% 双抗的 RPMI-1640 完全培养液按照 1×10^5 个/ml 的浓度接种于培养瓶内, 置于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ (95% 空气) 培养箱内。0.25% 胰酶消化传代, 3~4 d 传代 1 次。试验所用 VERO 细胞均处于对数生长期。

采用 MTT 比色法检测人参水提物(WEG)对 VERO 细胞的增殖抑制作用。收集对数期细胞, 调整细胞悬液浓度至 10^5 个/ml, 取若干块无菌 96 孔细胞培养板, 使每孔加入 100 μl 含有上述悬浮细胞的培养液, 静置, 移至培养箱内培养 24 h 后, 弃去原培养液。加入不同浓度的人参提取液, 用培养液补足至 200 μl, 使每孔中药物的终浓度为 20、40、60、80、100 mg/ml, 对照组加入空白培养液。每组设 6 个复孔。将培养板置于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ (95% 空气) 培养箱中培养 3 d 后, 每 12 h 取出一块培养板, 每孔加入 20 μl MTT 溶液, 继续培养 4 h。终止培养, 小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μl DMSO, 置于摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。每组试验重复 3 次。在酶标仪上以空白孔为对照调零, 在波长 490 nm 处测定各孔的吸光度值, 计算细胞增殖抑制率, 计

基金项目 吉林省科技厅项目(201215136)。

作者简介 刘畅(1987-), 女, 吉林长春人, 硕士研究生, 研究方向: 生物材料, E-mail: 165652403@qq.com。* 通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事生物材料研究, E-mail: ljm3023@126.com。

收稿日期 2013-12-10

算 IC_{50} 值,以时间、浓度为横轴,以光吸收值(A)、增殖抑制率为纵轴,绘制相应曲线。

抑制率 = $(1 - A_{490}$ 加提取液组细胞吸光值 / A_{490} 对照组细胞吸光值) $\times 100\%$

1.3.3 WEG 对 VERO 细胞氧化损伤的影响。按照 SOD 试剂盒、MDA 试剂盒说明书中的方法,对不同浓度 WEG 处理 24 h 的 VERO 进行 SOD 活性、MDA 含量的检测。每组试验重复 3 次。

1.3.4 VERO 细胞的 AFM 探测。将经 75% 乙醇溶液浸泡消毒的盖玻片置于无菌 6 孔板细胞培养板中,接种对数生长长期的 VERO 细胞,调节细胞密度 $10^5 \sim 10^6$ 个/ml,每孔 2 ml。培养 24 h,吸出培养基并加入 WEG,使每孔药物的终浓度为 20、40、60、80、100 mg/ml,对照组加入空白培养液。培养 48 h 后,弃掉培养基,加入无菌 PBS 轻轻冲洗每孔。弃掉 PBS,每孔加入 2.5% 戊二醛固定细胞 15 min。弃掉戊二醛,用超纯水洗涤盖玻片 3 次。将制备好的样品置于原子力显微镜的 XY 扫描台上,用监视器定位所要扫描的样品区域,轻敲模式成像。试验采用 100 μ m 扫描器,标准硅探针,微悬臂的弹性系数为 40 N/m,共振频率为 300 kHz,获得图像像素为 512 \times 512。AFM 图像以自带软件 Pico Image Basic 6.2 处理。每组试验重复 3 次。

1.4 数据统计与分析 所有数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,组间数据采用独立样本 t 检验法进行两两比较分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。MTT 中的抑制率曲线采用 Origin 8.0 软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 不同浓度人参水提取物对 VERO 细胞体外增殖的影响 不同浓度的人参水提取物(WEG)均对 VERO 细胞起到不同程度的增殖抑制作用。从图 1 可以看出,随着 WEG 浓度的增加,试验组 VERO 细胞存活数量明显降低。

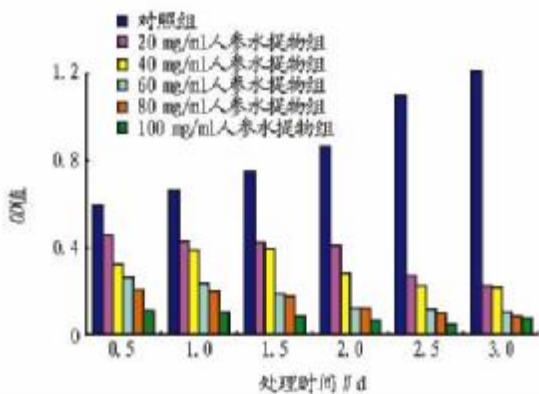


图 1 MTT 法检测各组细胞的吸光度值

2.2 人参水提取物不同作用时间对 VERO 细胞体外增殖的影响 从图 1 可以看出,随着细胞培养时间的延长,对照组的吸光度 OD 值增加。这说明细胞的数量在不断增加,细胞的增殖现象显著。随着 WEG 作用时间的延长,OD 值逐渐下降,说明存活细胞数量在减少。

从图 2 可以看出,所有曲线上的 Y 值均伴随着横坐标 X

值的增加而增大。这说明伴随着 WEG 作用时间的增加,WEG 对 VERO 细胞的增殖抑制率增加,WEG 对 VERO 细胞的增殖抑制率呈时间依赖性。

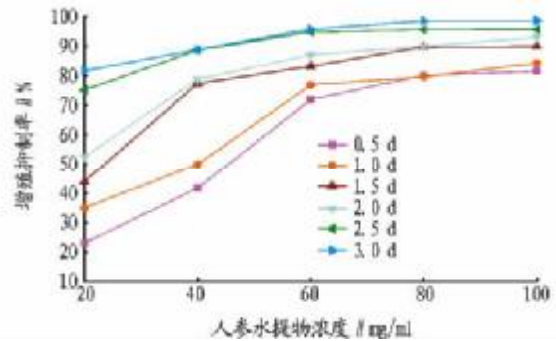


图 2 WEG 不同作用时间对 VERO 细胞增殖抑制的影响

2.3 倒置显微镜下观察 WEG 对 VERO 细胞形态的影响

当人参水提取物作用于 VERO 细胞 2 d 时,通过倒置显微镜观察不同组别细胞形态的差异。从图 3 可以看出,对照组细胞生长旺盛、细胞的折光性良好、细胞呈不规则的梭形或长条形、细胞轮廓清晰、细胞形态均一(图 3A)。20 mg/ml 人参水提取物和 40 mg/ml 人参水提取物组细胞出现轻微的皱缩,形态也略有改变(图 3B)。60 mg/ml 人参水提取物和 80 mg/ml 人参水提取物组细胞数量略有减少、细胞出现脱水现象、逐渐失去贴壁形态(图 3D、E)。100 mg/ml 人参水提取物组中细胞脱壁现象严重,培养液中出现大量细胞碎片,细胞完全失去原本贴壁形态(图 3F)。因此,通过倒置显微镜的观察,发现当 WEG 浓度增加,对 VERO 细胞形态改变的影响越大。这说明 WEG 对 VERO 细胞能够产生增殖抑制作用,且 WEG 浓度增加对 VERO 细胞的增殖抑制作用越强。

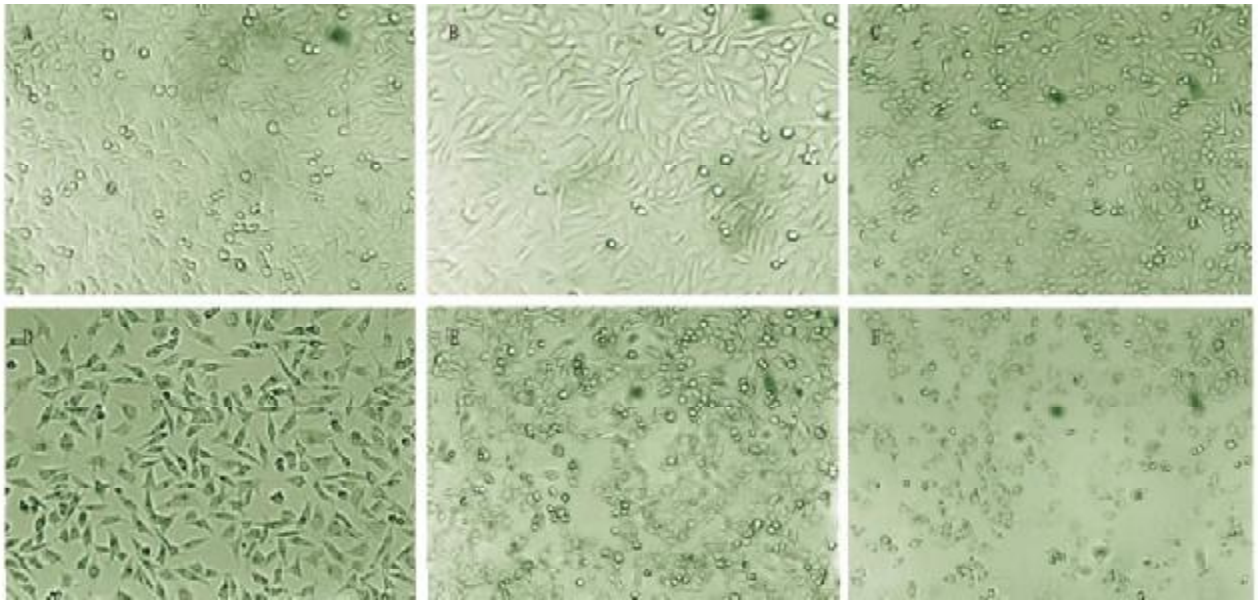
2.4 WEG 对 VERO 细胞氧化损伤的影响 由表 1 可知,与对照组相比,各浓度 WEG 组的 SOD 活性呈明显低于对照组,各组 MDA 含量明显高于对照组 ($P < 0.05$)。随着 WEG 浓度的升高,各组 SOD 活性相应降低,各组 MDA 含量对应性升高。这说明人参水提取物对 VERO 细胞的正常生长起到了破坏作用,使细胞受到损伤。

表 1 WEG 对 VERO 细胞氧化损伤的影响

处理	SOD 活性//U/ml	MDA 含量//nmol/ml
对照组	9.69 \pm 0.15	1.53 \pm 0.32
20 mg/ml 人参水提取物组	6.81 \pm 1.87*	1.66 \pm 0.38*
40 mg/ml 人参水提取物组	4.53 \pm 4.32*	1.78 \pm 0.03*
60 mg/ml 人参水提取物组	3.82 \pm 0.78*	1.85 \pm 0.41*
80 mg/ml 人参水提取物组	3.05 \pm 3.42*	1.97 \pm 0.82*
100 mg/ml 人参水提取物组	2.43 \pm 3.95*	2.04 \pm 0.43*

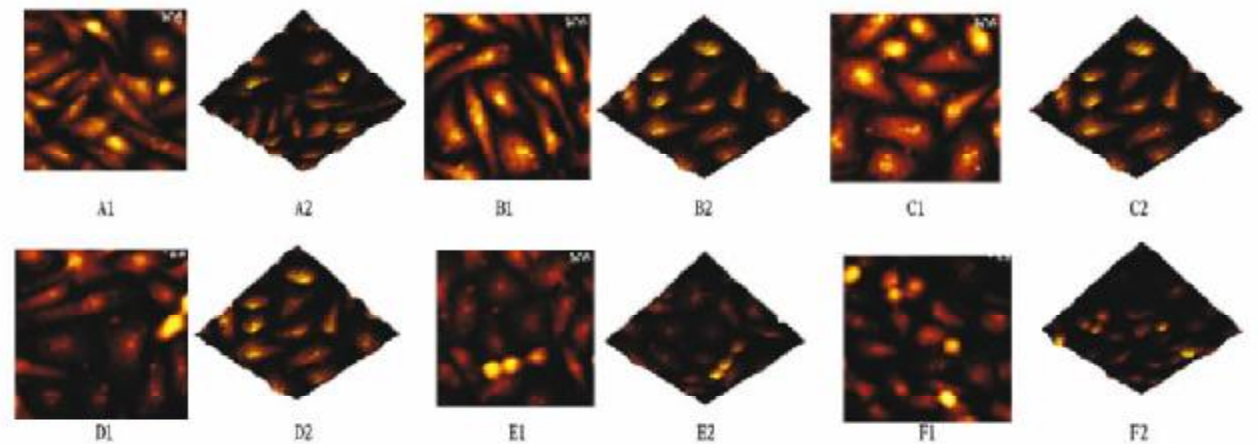
注: * 表示与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

2.5 原子力显微镜对 VERO 细胞的观测结果 基于原子力显微镜在纳米尺度上的观测技术对 VERO 细胞进行细胞结构上的探测,希望能够从 WEG 对 VERO 细胞结构上的影响来探讨 WEG 对 VERO 细胞体外增殖的抑制作用。取经 20、40、60、80 和 100 mg/ml WEG 培养 2 d 的 VERO 细胞,每组至少用 AFM 扫描成像 10 个细胞,获得扫描范围为 80 μ m \times 80 μ m 的 VERO 细胞及表面超微结构图(图 4)。



注:A. 对照组;B. 20 mg/ml 人参水提取物组;C. 40 mg/ml 人参水提取物组;D. 60 mg/ml 人参水提取物组;E. 80 mg/ml 人参水提取物组;F. 100 mg/ml 人参水提取物组。

图3 倒置显微镜下观察 VERO 细胞的形态变化 (40 ×)



注:A1. 对照组 Vero 细胞的形貌图;A2. 对照组 Vero 细胞的 3D 图;B1. 20 mg/ml 人参水提取物组 Vero 细胞的形貌图;B2. 20 mg/ml 人参水提取物组 Vero 细胞的 3D 图;C1. 40 mg/ml 人参水提取物组 Vero 细胞的形貌图;C2. 40 mg/ml 人参水提取物组 Vero 细胞的 3D 图;D1. 60 mg/ml 人参水提取物组 Vero 细胞的形貌图;D2. 60 mg/ml 人参水提取物组 Vero 细胞的 3D 图;E1. 80 mg/ml 人参水提取物组 Vero 细胞的形貌图;E2. 80 mg/ml 人参水提取物组 Vero 细胞的 3D 图;F1. 100 mg/ml 人参水提取物组 Vero 细胞的形貌图;F2. 100 mg/ml 人参水提取物组 Vero 细胞的 3D 图。

图4 不同浓度 WEG 处理组 VERO 细胞的 AFM 扫描结果

从图4可以看出,对照组中 VERO 细胞体积饱满、折光性良好、细胞边界清晰、细胞形态均一,细胞贴壁状态良好,细胞的平均高度约为 $2.9 \mu\text{m}$ 。随着 WEG 浓度的增加,细胞出现严重的脱水现象。当 WEG 浓度为 100 mg/ml 时,细胞基本失去原本良好的贴壁状态,细胞脱水现象严重,已变成球型,细胞表面较对照组粗糙得多。这可能是由于细胞膜遭到破坏、细胞内容物溢出细胞的平均高度仅为 $1.5 \mu\text{m}$ 。

VERO 细胞受到人参水提取物的作用,细胞的正常生长受到一定的影响,经过对细胞的形态、细胞膜表面超微结构的改变进行观测,发现细胞膜表面粗糙度随着 WEG 的浓度增加而增大。产生这个现象的原因,可能是由于人参水提取物对 VERO 细胞的细胞膜进行了破坏,使细胞膜受到损伤、细胞内的物质溢

出,进而对 VERO 细胞的正常增殖产生了抑制作用。

3 讨论

中草药被认为毒副作用小、使用安全,但仍有许多因用药不当而引发不良反应的报道^[5]。人参的主要活性成分是人参皂苷和人参多糖,其中关于人参皂苷的研究主要集中于改善机体免疫力、对心脑血管的保护作用、抗肿瘤作用等^[6],且研究大多局限于动物试验,其应用于临床实践的药理作用仍需大量研究。据报道,当将一定浓度的人参提取物添加到新生大鼠心肌培养基中时,新生大鼠心肌细胞出现跳动异常的现象,其浓度经连续稀释以后,心肌细胞跳动异常情况随之消失,但当将相同浓度的人参提取物添加到成年大鼠的心肌细胞的培养基中时,心肌细胞未见异常^[7]。这说明人参提

取物对新生大鼠的心肌细胞具有一定的毒性。

细胞的形貌、结构与细胞的生理状态和功能有着重要的联系,AFM对细胞表面形貌学研究与临床研究的关系越来越密切,并具有着广阔的应用前景^[8]。笔者通过AFM对WEG作用的VERO细胞前后形貌、超微结构的对比,从纳米尺度上直观观察WEG对VERO细胞形貌、结构的变化,通过对结构的观察探索WEG对VERO细胞增殖抑制的机理。WEG能明显抑制VERO细胞的体外增殖,并对VERO细胞具有一定的氧化损伤作用,通过原子力显微镜探测技术的引入,经扫描成像发现WEG对VERO细胞的细胞膜具有一定的破坏作用。据此推断,WEG对可能对人体的肾脏具有一定的损伤作用,随着WEG浓度的降低,对肾脏的损伤作用有所减轻,其可能的作用机制有待进一步研究。

(上接第112页)

1.6 防天敌措施 宽体金线蛭产卵后,体质很弱,容易受到各种天敌的危害,鸟类(白鹭、野鸭)龙虾、蛇、黄鳝等肉食性动物以及蜻蜓幼虫是水蛭天敌,此时要加强对水蛭的管理和保护。在产卵池上面覆盖4 cm×4 cm网眼的防鸟网,并采取相应的措施防止敌害。

1.7 水生植物准备 在幼苗孵化前,可在网箱中种植水葫芦可作为水蛭幼苗栖息场所,以提高成活率。每个网箱放养水生植物数量,可根据幼苗的数量而定,以满足大部分幼蛭栖息为宜。

2 种蛭的选择与饲养

用于产卵繁殖的宽体金线蛭种蛭应选择体重应在25 g/条以上,体质健壮,无病无伤,无畸形和其他缺陷。在3月下旬清塘后,将健康的宽体金线蛭放入产卵池中,放养密度约为10 500~12 000 kg/hm²。此时需要不间断地注入新水和排出池水,进出水量要相当,以维持池内水位的相对稳定。池内要有充足的螺蛭或河蚌,以保证种蛭的食料。

种蛭的主要饲料是螺蛭、田螺、河蚌等,在惊蛰后食量大增,但在产卵前食量较小;饵料要求新鲜适口,无腐败变质,无污染,其安全限量要求符合NY 5072的规定。在种蛭放养前集中投放螺蛭、河蚌15 t/hm²,产卵前无需再投料。

2.1 交配与产卵 宽体金线蛭交配时,2条种蛭的头尾方向相反,各将各自的雄生殖孔对准对方的雌生殖孔完成受精交配。交配后约4周产卵茧。产卵茧时先从生殖孔分泌一些白色粘液,将卵茧包在中间。卵茧大小约2.00~3.0 cm,重1.0~2.0 g。宽体金线蛭一年产卵茧2次,分别在4~5月和8~9月,产卵茧时间不一致。

2.2 种苗繁育 5月上旬,人工将宽体金线蛭成熟卵逐一挖出,放在木箱或塑料泡沫箱内进行孵化,孵化箱的大小和形状可自由选择,但是高度控制在10~15 cm即可。孵化基质应选用地表30 cm以下的黄土为佳。

2.2.1 孵化。在孵化箱内铺5~8 cm的细黄土(湿度45%,(23±2)℃),将成熟的卵茧放在细黄土上面后,然后再加一层细土,盖上盖子,每天观察1~2次,待卵的顶部出现黑头

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010版)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:8.
- [2] 李红艳,赵雨,张巍,等. 人参水溶性蛋白对几种细胞增殖的影响[J]. 吉林农业大学学报,2008,30(5):705-707.
- [3] SHIMIZU B,SENO K,KOYAMA H,et al. Manual of selected cultured cell lines for bioscience and biotechnology (in Japanese)[J]. Tokyo:Kyoritsu Shuppan,1996,18(2):299-300.
- [4] 唐蕊华,薛小平,尹焕才,等. 用原子力显微镜观察汉坦病毒感染前后Vero-E6细胞的形貌变化[J]. 中国实验诊断学,2008,12(5):598-601.
- [5] 李庆虹,山丽梅,任永申. 中药毒性研究进展[J]. 中华中医药杂志,2007,22(5):300-302.
- [6] JONG D P,DONG K R,YOU H L. Biological activities and chemistry of saponins from Panax ginseng C. A. Meyer [J]. Phytochemistry Reviews, 2005,4:159-175.
- [7] 赵文莉,张立实,李宁. 人参皂甙的药理及毒性作用研究进展[J]. 国外医学卫生学分册,2008,35(3):165-169.
- [8] IYER S R.GAIKWAD M.SUBBA-RAO V,et al. Atomic force microscopy detects differences in the surface brush of normal and cancerous cells[J]. Nat Nanotechnol,2009,4(6):389-393.

时将卵茧取出放入幼苗繁殖网箱内(由60目左右的尼龙网制成,大小可根据繁殖数量而定)的泡沫板上,用纯棉的湿毛巾盖上,待幼苗孵化后自己爬到水中。繁殖水温应控制在15~25℃,最适繁殖水温为(23±2)℃。

2.2.2 水生植物准备。在前一年冬天要储备一些水葫芦种苗,春季进行繁殖后供幼小水蛭栖息。

3 幼苗饲养

幼苗的饲料主要有幼螺、大螺蛭(砸碎)、鸡蛋黄和黄豆浆;在幼苗孵化前需要饲养幼螺。

3.1 投料量 上述3种饲料每天各喂1次,开始的投料量占幼苗体重的1%~2%,随着幼苗不断长大,投料量可逐步增加到5%~8%,由于春季温度变化较大,具体的投料量还需要根据幼苗是否已经吃完进行适当调整。当幼苗活动量加大时,适当增加投料量,反之应适当减少。

3.2 喂养时间 每天上午喂幼螺和鸡蛋黄(将蛋黄压成粉状),晚上喂豆浆。

4 日常管理 日常管理是幼苗繁殖成功的重要环节之一,管理人员每天早中晚各巡池1次,注意观察水蛭的摄食、白天和夜间活动以及水质的清洁度变化等情况。同时,要做好每天的气温、水温变化、水蛭摄食、水质和水位、溶解氧以及水蛭活动的记录。

4.1 防幼苗天敌 在投喂幼螺时,切忌将龙虾幼苗投入网箱中。另外,因为蜻蜓幼虫会吃水蛭幼苗,要防止蜻蜓在网箱内产卵,蝌蚪和小青蛙也不能进入网箱内。

4.2 水质净化 不定期施放光合细菌或EM复合菌剂,吸收养殖水体中氨氮、硝酸盐等有害物质,分解有机物,净化水质,以达到缓解养殖箱内水体富营养化的程度。每隔2周使用1次,浓度为0.2 mg/L。幼水蛭饲养期间,网箱内的水要流动。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:77-78.
- [2] 丁辰龙,王宣朋,王信海,等. 宽体金线蛭4个繁殖性状指标的相关性分析[J]. 福建水产,2012,34(6):488-492.
- [3] 高明,侯建华,李双安. 温度对宽体金线蛭繁殖的影响研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(22):11305-11306.