

蓝莓花色苷对鸡胚成纤维细胞系生长的影响

Effect of anthocyanins from blueberry on primary chicken embryonic fibroblast

王 丹^{1,2,3}

黄紫藤^{1,2,3,4}

马 越^{1,2,3}

赵晓燕^{1,2,3,4}

WANG Dan^{1,2,3}

HUANG Zi-teng^{1,2,3,4}

MA Yue^{1,2,3}

ZHAO Xiao-yan^{1,2,3,4}

(1.北京市农林科学院蔬菜研究中心,北京 100097;2.农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室,北京 100097;
3.农业部都市农业(北方)重点实验室,北京 100097;4.北京农学院食品科学与工程学院,北京 102206)

(1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China;

2. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, P.R.China, Beijing 100097, China; 3. Key Laboratory of Urban Agriculture (North), Ministry of Agriculture, Beijing

100097, China; 4. Food Science and Engineering College, Beijing University of Agriculture, Beijing, 102206, China)

摘要:以花色苷含量为 21.34% 的蓝莓花色苷粉末为原料,采用 MTT 法、显微镜观察法,同时利用细胞计数器测定细胞活率,3 种方法共同检测蓝莓花色苷作用于鸡胚成纤维细胞系的细胞毒性,以完成细胞试验模型的建立。结果表明:50~100 $\mu\text{g/mL}$ 的蓝莓花色苷可以促进鸡胚成纤维细胞生长,高于 100 $\mu\text{g/mL}$ 的蓝莓花色苷,对细胞生长产生抑制作用。该结果可为进一步拓展花色苷功能性研究,以及以鸡胚成纤维细胞为模型的生物功能性研究提供理论依据。

关键词:蓝莓花色苷;鸡胚成纤维细胞系;MTT 法

Abstract: The effect of blueberry anthocyanins on the growth of primary chicken embryonic was investigated fibroblast in this study. 21.34% of anthocyanins was used to The situation of cell growth was evaluate by optical microscope, cell counter, and MTT assays. We observed that 50—100 $\mu\text{g/mL}$ was the optimal concentration, which had no cytotoxicity to primary chicken embryonic fibroblast. It would inhibit cell growth when the concentration was more than 100 $\mu\text{g/mL}$. The results of this study may provide the basis for further development of anthocyanins functional studies and give helpful information for preventing the virus which used primary chicken embryonic fibroblast as cell model.

Keywords: blueberry anthocyanins; primary chicken embryonic fibroblast; MTT assay

鸡胚成纤维细胞来源于 East Lansing Line(ELL-0)鸡胚胎,具有永生性,是一种可传代的细胞系^[1]。此细胞系缺少

基金项目:北京市科技新星计划(编号:Z131105000413023);现代农业产业技术体系建设专项资金资助(编号:CARS-25)

作者简介:王丹,女,北京市农林科学院副研究员。

通讯作者:赵晓燕(1969—),女,北京市农林科学院研究员。

E-mail: zhaoxiaoyan@nrcv.org

收稿日期:2016-05-04

禽白血病毒的相关内源片段,并具有正常的成纤维形态,可以用于禽源病毒的增殖,用作生物制品研究与生产的重要材料,近些年,其安全性备受相关科研人员的关注^[2-3]。

花色苷是一类广泛存在于植物中的天然酚类化合物,主要分布在颜色鲜艳的蔬菜和水果中,如橙色、红色和蓝色等,尤其存在于浆果中。蓝莓是一种杜鹃花科的越橘属植物,浆果外观呈现蓝色或蓝黑色,以“世界水果之王”著称,蓝莓花色苷是蓝莓果实中提取出来的天然花色苷色素,呈紫黑色粉末状,无毒、无异味,花色苷对多种疾病有很好的疗效^[4],如具有抗氧化、清除自由基、降低患冠心病的风险、改善视力、降血脂以及抗肿瘤、抗糖尿病等诸多抗病作用^[5-6]。因蓝莓花色苷具有诸多生理功能,故近年来此类物质引起了科研人员的广泛关注,对于其抗氧化、抗癌细胞增殖等作用已有很多研究。蓝莓叶多酚提取物可以抑制细菌活性,表现出较强的抑菌性^[7]。关于蓝莓花色苷的抗氧化作用方面有一些报道,李颖畅等^[8]认为蓝莓花色苷可以降血脂并且具有抗氧化生物活性,可以降低发生动脉硬化的危险性。并且已有报道^[9]证明,蓝莓花色苷粉末可以显著抑制脂质体的过氧化。曾有人^[10]用蓝莓花色苷喂饲老年大鼠 60 d 后,老年大鼠中年大鼠的平衡能力一样好,可以在滚动的木棍上保持很好的平衡。在饲喂老鼠 120 d 后,老年老鼠的测试成绩同年轻老鼠的测试成绩一样好。

鸡胚成纤维细胞是常用于评估药物活性或病毒侵染的模式细胞,紫玉米、紫甘薯等花色苷对其生长的影响已有报道^[6],花色苷组分不同,功能性不同,而蓝莓花色苷对此细胞的生长是否有影响,目前未有研究。本试验拟研究不同浓度的蓝莓花色苷作用于鸡胚成纤维细胞,观察细胞的形态学变化及不同浓度蓝莓花色苷对细胞存活情况的影响,旨在为后期以鸡胚成纤维细胞为细胞模型的试验提供相关的浓度

参数。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

蓝莓花色苷粉末:北京市农林科学院蔬菜研究中心;
鸡胚成纤维细胞、0.25%胰蛋白酶溶液(1x):武汉菲恩生物科技有限公司;
DMEM培养基、胎牛血清(FBS):美国Gibco公司;
二甲基亚砜(DMSO):北京索莱宝公司;
3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、青链霉素双抗溶液(100X):美国Sigma公司;
DMEM细胞培养液:美国Hyclone公司。

1.1.2 主要仪器设备

超净工作台:DL-CJ-1NDII型,北京东联哈尔仪器制造有限公司;
二氧化碳细胞培养箱:Series 8000 DH 3543型,美国Thermo公司;
倒置荧光显微镜:BDS200型,重庆OPTEC奥特光学公司;
酶标仪:SpectraMax i3型,美国Molecular Devices公司;
Countstar自动细胞计数分析仪:IC 1000型,北京五洲东方科技发展有限公司;
高速离心机:3K15型,德国Sigma公司。

1.2 试验方法

1.2.1 鸡胚成纤维细胞的复苏 预先配好含有15% FBS的DMEM培养液,加入1%青链霉素双抗溶液,于37℃水浴中预热30 min。从液氮中取出细胞冻存管,迅速置于37℃温水中摇晃,使冻存管中的冰迅速融化,待冻存管中仅剩少量冰时拿出,1 000 r/min离心5 min,以70%酒精喷洒冻存管表面,置于超净台内吹干。弃去上层冻存液,以一次性移液管加入预热好的培养基,有序地吹吸细胞,将细胞吹打分散至均匀,移至T25细胞培养瓶中,并补足至6 mL培养液。将细胞培养瓶置于含5% CO₂的37℃恒温培养箱中培养,细胞贴壁后,即可换入新的细胞培养液,继续培养,至长成单层后传代。

1.2.2 鸡胚成纤维细胞的传代培养 待鸡胚成纤维细胞铺满培养瓶壁的80%,弃去上清液,加入预热的PBS进行清洗,立即倒出,再加入0.25%胰蛋白酶溶液,置于37℃培养箱进行消化,见细胞脱落后将细胞悬液移入到装有FBS的离心管中,以1 300 r/min离心5 min后加入DMEM培养液,用吸管有序地吹打细胞至细胞分散,以1:3传代,加入到含5% FBS的DMEM培养液中培养细胞,将细胞培养瓶置于5% CO₂条件下37℃培养箱中培养,隔天传代。

1.2.3 蓝莓花色苷对鸡胚成纤维细胞生长的影响 参考盖丽丽等^[6]的试验方法,用浓度为10 mmol/L的PBS缓冲液将蓝莓花色苷粉稀释成母液,母液浓度为12.5 mg/mL,用0.22 μm滤膜过滤除菌,作为储备液可冻存于-20℃冰箱中,方便日后使用。将一瓶长满的鸡胚成纤维细胞消化,加入含5% FBS的DMEM细胞生长液,接种于96孔板,每孔

加入200 μL的细胞悬液,铺板时用自动细胞计数分析仪测定细胞浓度,为5.97×10⁵ mL⁻¹。放置于5% CO₂培养箱中37℃培养至细胞长成单层,弃液,每孔换成含2% FBS的DMEM细胞维持液,同时加入50,75,100,150 μg/mL的4种浓度的蓝莓花色苷溶液,每一种蓝莓花色苷浓度均设置3组重复,试验同时设置细胞对照组和重复组。在不同的时间点(12,24,48,72 h),利用自动细胞计数仪对各孔内的细胞进行计数,同时用倒置显微镜观察细胞生长情况,根据康雪燕^[11]提供判断标准来记录结果。

1.2.4 MTT法检测蓝莓花色苷对鸡胚成纤维细胞生长的作用 用0.25%胰蛋白酶溶液消化处理鸡胚成纤维细胞,加入含5% FBS的DMEM细胞生长液,用一次性移液枪吹散细胞制备细胞悬液,然后用八通道一体移液器将细胞悬液接种于96孔板,铺板时的细胞浓度为1.14×10⁵ mL⁻¹。铺板时每孔200 μL,将96孔板置于含5% CO₂培养箱中于37℃培养至细胞单层长满80%,弃去每孔内的细胞上清液,加入蓝莓花色苷,用含2% FBS的DMEM培养液调节花色苷的终浓度分别为50,75,100,150 μg/mL,每一种蓝莓花色苷浓度设3组重复,试验同时设置空白对照组和阴性对照组。同时接种4块96孔板,注意无菌操作。然后将其置于5% CO₂培养箱中于37℃过夜培养,分别于第12、24、48、72小时取出一块96孔细胞培养板,弃去每孔中的上清液,向每孔中加入10 μL的MTT溶液,置于37℃培养孵育4 h后,弃去孔内液体,向每孔中加入170 μL二甲基亚砜(DMSO)溶液,为使形成的甲磺完全溶解,酶标仪设置读数前震荡600 s,于490 nm处测定吸光值。

1.2.5 数据分析 使用Origin 8.0软件作图,并分析本试验的结果数据,试验数据均以 $\bar{x} \pm S$ 表示, $n=6$ 。

2 结果与分析

2.1 蓝莓花色苷对鸡胚成纤维细胞生长的影响检测结果

在对鸡胚成纤维细胞生长影响的试验中,随着蓝莓花色苷浓度增加和时间的延长,细胞的生长存活情况也会随之改变,结果见表1。结合倒置显微镜观察细胞形态(结果见图1),记录细胞生长状态,可以找到相应的最适合鸡胚成纤维细胞生长的蓝莓花色苷的终浓度。与对照组相比,细胞生长至72 h时,浓度为50,75,100 μg/mL的蓝莓花色苷没有影响鸡胚成纤维细胞的生长,用倒置显微镜观察细胞的生长形态,观察到细胞生长状态良好,生长形成单层,且基本未出现空隙,细胞形态饱满、透亮且完整,浓度为150 μg/mL的蓝莓花色苷处理组表现出对细胞生长的轻微抑制,未形成紧密的单层,出现空隙。随着时间的增加,120 h后,对照组的细胞还可以正常生长,而浓度为150 μg/mL的蓝莓花色苷处理对鸡胚成纤维细胞生长产生抑制作用,影响细胞生长,表现为出现凋亡小体。根据观察细胞生长形势以及数据,可得出蓝莓花色苷的最适终浓度为100 μg/mL。

由图1可知,72 h时细胞仍能够正常生长,且从形态上观察具有比较明显的差异。图1(a)是未加蓝莓花色苷的鸡胚成纤维细胞对照组,细胞生长良好,形成单层,基本无空隙。图1(b)和(c)是蓝莓花色苷浓度为50 μg/mL和100 μg/mL

表 1 蓝莓花色苷对鸡胚成纤维细胞生长的影响[†]

Table 1 Effect of different concentrations of blueberry anthocyanins on primary chicken embryonic fibroblast growth

培养时间/h	对照	50 $\mu\text{g/mL}$	75 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$
12	*****	*****	*****	*****	*****
24	*****	*****	*****	*****	*****
36	*****	*****	*****	*****	*****
48	*****	*****	*****	*****	*****
60	*****	*****	*****	*****	*****
72	*****	*****	*****	*****	*****
96	***	**	**	**	**
120	**	*	*	**	*
144	*	—	—	*	—

[†] ***** 表示细胞具有良好的折光性,生长成完整的单层,细胞之间未形成空隙;***** 表示细胞状态良好,生长形成单层,并且基本未形成空隙;*** 表示细胞生长状态一般,未生长形成单层,细胞极少,且细胞之间产生较多的空隙;** 表示细胞生长状态较差,细胞极少且细胞间产生大量空隙;* 表示细胞生长状态很差,贴壁细胞数量很少,并且无基本的细胞形态;— 表示细胞生长状态极差,全部细胞均破碎、细胞不完整或细胞基本轮廓不清晰。

的试验组,生长状态与对照组相同。图 1(d)是蓝莓花色苷浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 的试验组,细胞形态不如对照组的完整,细胞单层出现空隙。所以最适合于鸡胚成纤维细胞生长的浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,当浓度高于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,蓝莓花色苷会对鸡胚成纤维细胞生长产生抑制作用。

同时,使用自动细胞计数仪在不同时间点测定各浓度花色苷对鸡胚成纤维细胞的细胞活率,相应的结果见表 2。观察数据可知,在 24 h 时各个试验组的细胞活率均高于细胞对照组,说明在 24 h 时 4 种浓度的蓝莓花色苷均可以促进细胞生长。在 48 h 时,对照组的细胞活率 94.77%,浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的蓝莓花色苷处理组的细胞活率与对照组相当,浓度为 75,100 $\mu\text{g/mL}$ 的处理组的细胞活率高于对照组,只有浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 的花色苷处理组的细胞活率略低于对照组。72 h 后,浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的蓝莓花色苷最适合鸡

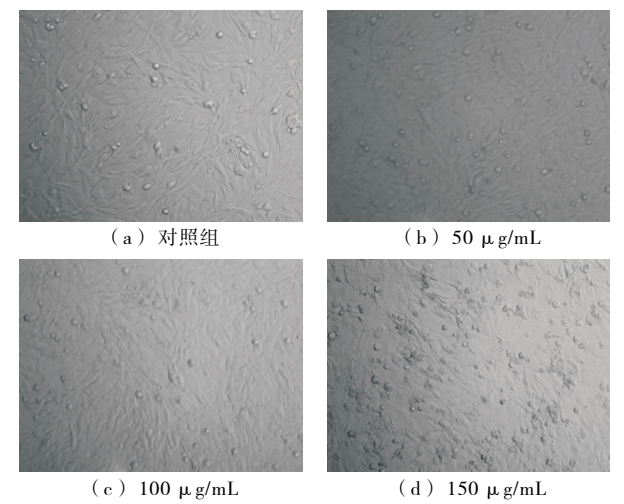


图 1 各试验组处理 72 h 的鸡胚成纤维细胞形态

Figure 1 Effect of anthocyanins on morphology of primary chicken embryonic fibroblast under microscope ($\times 200$)

胚成纤维细胞生长。其中在 120 h 时,对照组的细胞活率为 84.62%,100 $\mu\text{g/mL}$ 蓝莓花色苷组的细胞活率为 94.12%,差异显著($P<0.05$)。通过对比数据可以找出最适合鸡胚成纤维细胞生长的浓度,在不同时间点测得,蓝莓花色苷浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞活率均最大,当花色苷浓度高于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞活率明显下降,所以蓝莓花色苷对鸡胚成纤维单层细胞生长无影响的最大安全浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 MTT 法检测结果

由图 2 可知,蓝莓花色苷对于鸡胚成纤维细胞的生长有良好的促进作用,与对照组相比,浓度低于 100 $\mu\text{g/mL}$ 对细胞的单层生长无毒性作用,50,75,100 $\mu\text{g/mL}$ 的蓝莓花色苷均可以促进细胞生长,随着蓝莓花色苷浓度的增加,细胞的活性也在增加,当浓度高于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞活性便受到损伤,较对照组相比 490 nm 处的吸光值明显降低。所以,蓝莓花色苷促进细胞生长的最大安全浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 结论

蓝莓花色苷对鸡胚成纤维细胞的生长具有影响,蓝莓花色苷浓度为 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 时促进鸡胚成纤维细胞的生长,

表 2 鸡胚成纤维细胞在 4 种不同浓度蓝莓花色苷作用下的细胞活率

Table 2 Effect of different concentrations of blueberry anthocyanins on primary chicken embryonic fibroblast viability

培养时间/h	花色苷浓度				
	对照	50 $\mu\text{g/mL}$	75 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$
24	95.71 $\pm$ 1.332	95.75 $\pm$ 1.541	96.97 $\pm$ 1.359	97.04 $\pm$ 1.259	95.89 $\pm$ 1.241
48	94.77 $\pm$ 0.925	94.49 $\pm$ 0.878	95.34 $\pm$ 1.025	97.52 $\pm$ 1.112	93.52 $\pm$ 1.235
72	89.77 $\pm$ 1.138	82.66 $\pm$ 1.742	84.85 $\pm$ 1.035	90.14 $\pm$ 1.223	81.56 $\pm$ 1.025
96	83.15 $\pm$ 0.297	83.71 $\pm$ 1.941	84.09 $\pm$ 1.823	90.30 $\pm$ 0.161	78.17 $\pm$ 0.895
120	84.62 $\pm$ 1.325	90.00 $\pm$ 1.305	92.54 $\pm$ 1.351	94.12 $\pm$ 0.279	78.08 $\pm$ 1.071
144	78.04 $\pm$ 0.925	74.51 $\pm$ 1.211	78.26 $\pm$ 1.721	89.06 $\pm$ 0.259	71.45 $\pm$ 0.597

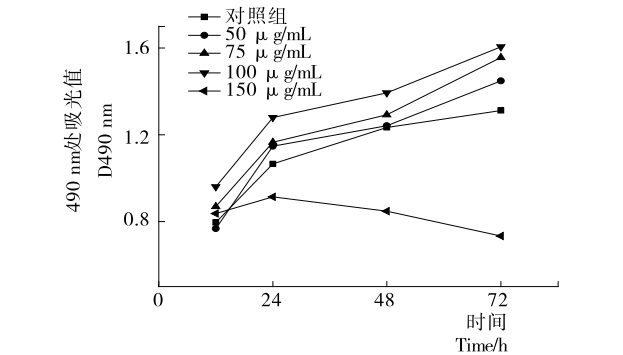


图 2 蓝莓花色苷对鸡胚成纤维细胞单层生长的影响
Figure 2 Effect of blueberry anthocyanins for primary chicken embryonic fibroblast growth by MTT assay

浓度高于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时对鸡胚成纤维细胞生长产生抑制作用。本试验结果可为蓝莓花色苷抗以鸡胚成纤维细胞为模型的病毒研究提供了理论依据,但有关蓝莓花色苷促进及破坏鸡胚成纤维细胞生长的机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 侯格妮,李俊,李然洪,等. 蓝莓白兰地特征香气成分的 GC—MS 分析[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 21-26.

(上接第 8 页)

[2] 梅亚敏,郭敏. 基于碰撞声信号的农产品品质检测技术综述[J]. 西北农林科技大学学报, 2013, 41(4): 213-219.

[3] PEARSON T C. Detection of pistachio nuts with closed shells using impact acoustics[J]. Applied Engineering in Agriculture, 2001, 17(2): 249-253.

[4] CETIN A E, PEARSON T C, TEWFIK A H. Classification of closed and open-shell pistachio nuts using voice-recognition technology[J]. Transaction of ASAE, 2004, 47(2): 659-664.

[5] MAHMOUD Omid, ASGHAR Mahmoudi, MOHAMMAD H Omid. An intelligent system for sorting pistachio nut varieties[J]. Expert Systems with Applications, 2009, 36: 11 528-11 535.

[6] MAHMOUD Omid. Design of an expert system for sorting pistachio nuts through decision tree and fuzzy logic classifier[J]. Expert Systems with Applications, 2011, 38: 4 339-4 347.

[7] ONARAN I, PEARSON T C, YARDIMCI Y, et al. Detection of underdeveloped hazelnuts from fully developed nuts by impact acoustics [J]. Information & Electrical Technologies Division of ASABE, 2006, 49(6): 1 971-1 976.

(上接第 12 页)

[14] 彭娜,曾新安. 高糖胁迫对生长期酿酒酵母生理代谢的影响 [J]. 现代食品科技, 2011, 27(4): 397-399.

[15] 施巧琴,吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2009: 22.

[16] 郭科,周兵. 酵母 Ndi1p 突变表达文库的建立和温度敏感株的筛选[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(10): 966-970.

[17] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007.

[2] CHEN Jian, ZHAO Ying, TAO Xiao-yun. Protective effect of blueberry anthocyanins in a CCl_4 -induced liver cell model[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 60(2): 1 105-1 112.

[3] PETROFICIANI J. Cell substrates; where do we stand after 50 years of discussion[J]. Developmental Biology, 2006, 123: 11-21, discussion 55-73.

[4] 徐渊金,杜琪珍. 花色苷生物活性的研究进展[J]. 食品与机械, 2006, 22(6): 154-157.

[5] 王秀臻,张培培,程合刚,等. 鸡胚成纤维细胞替代鸡胚成纤维细胞上清快速检测外源性禽白血病毒病的探究[J]. 中国家禽, 2013, 35(10): 18-21.

[6] 盖丽丽,张莉,姜世金,等. 3 种花色苷对 DF-1 细胞的影响[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(4): 242-245.

[7] 王亚丽,李颖畅,马春颖,等. 蓝莓叶多酚提取物对 3 种细菌的抑菌活性[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(3): 163-167.

[8] 李颖畅,孟宪军,孙靖靖,等. 蓝莓花色苷的降血脂和抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(10): 44-48.

[9] 李颖畅,马春颖,孟宪军,等. 蓝莓花色苷提取物抗油脂氧化能力研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(2): 92-95.

[10] 凌美庭. 可供开发食品添加剂(IX): 兰莓提取物及其抗氧化作用[J]. 粮食与油脂, 2003(6): 45-48.

[11] 康雪燕. 猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白在毕赤酵母中的分泌表达及免疫原性分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010: 37.

[8] KHALIFA S, KOMARIZADEH M H, TOUSI B. An intelligent system for grading walnuts based on acoustic emission and neural [J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2011, 9(1): 132-135.

[9] KHALES S, MAHMOUDI A, HOSAINPOUR A, et al. Detection of walnut varieties using impact acoustics and artificial neural networks (ANNs) [J]. Modern Applied Science, 2012, 6 (1): 43-49.

[10] 杨红卫. 小麦品质分析的信号处理方法研究[D]. 郑州: 解放军信息工程大学, 2005: 44-46.

[11] 杨丽. 基于信号处理的小麦品质声学检测方法研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2007: 21-27.

[12] 张丽娜. 基于 BP 神经网络的小麦碰撞声信号分类[J]. 电子设计工程, 2013, 21(7): 163-168.

[13] 臧富瑶,冯涛,王晶,等. 基于撞击声的开心果分拣模型研究 [J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 157-160.

[14] 刘华平. 语音信号端点检测方法综述及展望[J]. 计算机应用研究, 2008, 25(8): 2 278-2 283.

[15] 宋知用. MATLAB 在语音信号分析与合成中的应用[M]. 北京: 北京航空航天大学出版社, 2013: 117-122, 159.

[18] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工出版社, 2006: 355.

[19] 张莉,王婧,杨婷,等. 产 β -葡萄糖苷酶酿酒酵母菌株紫外诱变选育及酶学性质分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 220-224.

[20] 李文莉,缪冶炼,陈介余,等. 木质素降解物对酿酒酵母的毒性 [J]. 生物加工过程, 2015, 13(1): 82-88.

[21] 苗兰兰,张东杰,王颖. 复合诱变高产金属硫蛋白酵母菌株的筛选[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 261-264.

[22] 姚咏婧. 插入式超声对酵母细胞膜通透性影响的研究[J]. 广东化工, 2006, 33(1): 42-44.