

# 罗汉果粗提物抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 MIN6 细胞的 ROS 生成及凋亡

李肖娟<sup>1</sup>, 李玉雪<sup>1</sup>, 周璐炜<sup>1</sup>, 王娟<sup>1,2\*</sup>

(1. 桂林医学院药学院生药学重点实验室, 广西桂林 541199) (2. 桂林医学院附属医院广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室, 广西神经鞘脂代谢相关疾病基础研究重点实验室, 广西桂林 541001)

**摘要:** 探讨罗汉果粗提物 (*Momordica grosvenorii* extract, MGE) 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 MIN6 细胞凋亡及氧化损伤的保护作用及机制。以不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 MIN6 细胞建立氧化损伤模型, 根据细胞活力选择最适的诱导浓度。采用 MTT 法检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞活性氧 ROS 水平和细胞凋亡率; Western blot 方法对凋亡相关因子进行检测。结果表明, 罗汉果粗提物 (0~200 μg/mL) 对 MIN6 细胞活性几乎无影响, 因此选取 200 μg/mL 罗汉果粗提物进行后续实验。200 μg/mL 罗汉果粗提物能显著逆转过氧化氢导致的细胞活力降低 ( $p < 0.05$ )。流式细胞术结果显示, 与单用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 相比, 罗汉果粗提物可以显著下调 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的 ROS 水平升高 ( $p < 0.05$ ), 且抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MIN6 细胞的凋亡。Western blot 结果也表明罗汉果粗提物能部分逆转 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 PCNA 表达降低, Bax 表达增高 ( $p < 0.05$ )。综上所述, 罗汉果粗提物可以抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 MIN6 细胞的 ROS 生成及细胞凋亡, 该研究结果可为将罗汉果开发为防治糖尿病功能食品提供实验依据。

**关键词:** 罗汉果粗提物; ROS; 凋亡; MIN6 细胞

文章编号: 1673-9078(2022)07-11-18

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1036

## Crude *Momordica Grosvenorii* Extract Inhibites H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS Production and Apoptosis in MIN6 Cells

LI Xiaojuan<sup>1</sup>, LI Yuxue<sup>1</sup>, ZHOU Luwei<sup>1</sup>, WANG Juan<sup>1,2\*</sup>

(1. Laboratory of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

(2. Guangxi Key Laboratory of Molecular Medicine in Liver Injury and Repair, Laboratory of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China)

**Abstract:** The study is to investigate the protective effect and mechanism of crude *Momordica grosvenorii* extract (MGE) against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced apoptosis and oxidative damage in MIN6 cells. An oxidative damage cell model was established by the induction by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at different concentrations, and the optimal induction concentration was selected according to cell viability. The cell viability was determined by the MTT assay. Flow cytometry was used to detect the level of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis rates of cells. The apoptosis-related factors were detected by Western blot. The results showed that the crude MGE (0~200 μg/mL) showed little effect on the viability of MIN6 cells, thus, 200 μg/mL of the crude *Momordica grosvenorii* extract was chosen for subsequent experiments. The crude MGE at

引文格式:

李肖娟,李玉雪,周璐炜,等.罗汉果粗提物抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 MIN6 细胞的 ROS 生成及凋亡[J].现代食品科技,2022,38(7):11-18

LI Xiaojuan, LI Yuxue, ZHOU Luwei, et al. Crude *Momordica Grosvenorii* extract inhibites H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS production and apoptosis in MIN6 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 11-18

收稿日期: 2021-09-15

基金项目: 广西省第四批创新驱动发展专项基金资助 (桂科 AA19254025); 国家自然科学基金资助项目 (81760663; 31460229; 82002822; 81760443); 中国博士后科学基金 (2020M683630XB); 广西科技计划项目基金资助 (桂科 ZD20302006); 第四批八桂学者 2017 年专项经费 ([2017] 143 号); 桂林市科技计划项目 (20190206-1); “广西特聘专家”专项经费 (2019B12); “广西医学高层次人才培养计划” (G202002005); 广西壮族自治区卫生健康委员会广西神经鞘脂代谢相关疾病基础研究重点实验室 (ZJC2020005) 建设经费

作者简介: 李肖娟 (1997-), 女, 在读硕士, 研究方向: 天然药物的作用机制, E-mail: 1519888529@qq.com

通讯作者: 王娟 (1983-), 女, 博士研究生, 副研究员, 研究方向: 天然药物的药理机制及靶标发现等, E-mail: 407271431@qq.com

200  $\mu\text{g/mL}$  significantly reversed the decrease ( $p<0.05$ ) in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced cell viability. The results of flow cytometry showed that compared with the treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  alone, the crude MGE decreased significantly ( $p<0.05$ ) the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced increase in ROS level, and inhibited  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced apoptosis of MIN6 cells. Moreover, the Western blot results revealed that the crude MGE could partially reversed  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced decrease in the expression of PCNA and increase in the expression of Bax ( $p<0.05$ ). In summary, the crude MGE could inhibit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced ROS generation and apoptosis in MIN6 cells. The results of this study can provide an experimental basis for the development of *Momordica grosvenorii* into functional foods for the prevention and treatment of diabetes.

**Key words:** *Momordica grosvenorii* extract; ROS; apoptosis; MIN6 cell

罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*) 是我国特有的珍贵葫芦科植物, 是一种多年生草本藤蔓植物, 主要产地为广西, 此外, 广东、江西、贵州、湖南等地区也有分布<sup>[1]</sup>。罗汉果素有“神仙果”之称, 作为广西道地药材, 一种常用的药食两用的植物, 其有效活性成分的研究也已被广泛关注。在我国传统中药中, 罗汉果被用作肺部缓和剂, 用于治疗肺结核、哮喘、及急性支气管炎等<sup>[2]</sup>, 具有镇咳祛痰、增强免疫、抗氧化损伤、润肠通便和抑癌等多种作用<sup>[3]</sup>, 临床上用于治疗多种疾病, 如前列腺癌、鼻咽癌、高血压、糖尿病等<sup>[4]</sup>。其果实中含有以三萜苷类为主的非糖甜味的成分, 包括罗汉果皂苷 V、罗汉果皂苷 IV 及罗汉果 11-O-V 和罗汉果皂苷 III 等。

胰岛  $\beta$  细胞发生凋亡的主要原因与氧化应激密切相关<sup>[5,6]</sup>。内分泌胰岛  $\beta$  细胞对活性氧 (ROS) 比其他组织细胞更加敏感, 肥胖时机体会产生过量 ROS 诱导  $\beta$  细胞功能障碍和凋亡, 进而导致代谢失衡和高血糖<sup>[7]</sup>。因此抗氧化治疗对于保护机体胰岛  $\beta$  细胞, 减少其氧化损伤, 降低血糖具有重要的作用, 谈建成等<sup>[8]</sup>的研究发现, 罗汉果中的皂苷和黄酮成分均具有抗氧化作用, 一方面可以通过减少脂质过氧化物而增加肝脏的抗氧化能力, 一方面通过清除人体胰岛  $\beta$  细胞的活性氧自由基, 减轻胰岛细胞的损伤, 改善细胞状态, 回复胰岛  $\beta$  细胞的降血糖能力。罗汉果中另含罗汉果多糖<sup>[9]</sup>, 具有多种生物活性, 如降血脂、降血压、降血糖<sup>[10]</sup>、调节免疫等。黄飞<sup>[11]</sup>对罗汉果多糖降低血脂的实验结果表明, 罗汉果多糖可一定程度上降低胆固醇和甘油三酯的含量, 从而降低血糖, 辅助治疗糖尿病, 广泛应用于糖尿病人的代用糖。目前针对罗汉果提取物的研究多集中在罗汉果皂苷, 国内外关于使用罗汉果粗提物对防治糖尿病的干预研究还鲜有报道。本研究以小鼠 MIN6 细胞为对象, 通过过氧化氢诱导 MIN6 细胞的凋亡, 给予不同浓度的罗汉果粗提物<sup>[12]</sup> (*Momordica grosvenorii* extract, MGE), 观察其对细胞的氧化损伤及细胞凋亡的影响, 为罗汉果粗提物在防治糖尿病中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 材料与药物

细胞小鼠胰岛  $\beta$  细胞 (MIN6 细胞系) 为本课题组传代保存。

罗汉果粗提物由桂林莱茵公司馈赠, 样品编号 LHG200618-02 2, 其中提取方法参考刘辉等<sup>[13]</sup>研究方法。由高效液相色谱仪检测发现里面主要含有罗汉果皂苷 V (53.27%), 罗汉果皂苷 VI (1.21%), 11-氧-罗汉果皂苷 V (12.26%), 罗汉果皂苷 IV-E (2.45%)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清, 美国 CLARK 公司; DMEM 培养基, 美国 Gibco 公司; 噻唑蓝 (MTT), 北京索莱宝科技有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、 $\text{H}_2\text{O}_2$ , 广东西陇化工有限公司; DCFH-DA, 美国 Sigma 公司; RIPA 强裂解液, 上海碧云天生物科技有限公司;  $\beta$ -actin、PCNA、Bax 单克隆抗体, 美国 Abcam 公司; 鼠二抗、兔二抗, 北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 超敏化学发光试剂, 合肥 Bio sharp 公司; CellXpert C170 二氧化碳细胞培养箱, 德国 Eppendorf 公司; AC2-4S1 生物安全柜, 新加坡 ESCO 公司; Infinite M200 PRO 多功能酶标仪, 瑞士 TECAN 公司; 蛋白电泳系统、PowerPac Basic 蛋白转印系统, 新加坡 Bio-Rad 公司; TDZ4-WS 台式低速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Centrifuge 5425 小型高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; Sorvall Biofuge Stratos Centrifuge 高速冷冻离心机, 德国 Thermo Fisher Scientific 公司; Annexin V-FITC 凋亡试剂盒、BD Accuri C6 Plus 流式细胞仪, 美国 BD 公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 细胞培养

MIN6 细胞采用高糖 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100  $\mu\text{g/mL}$ ) 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 饱和湿度 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。使用含 EDTA 胰蛋白酶消化, 按照 1:3 传代培养, 取对数生长期细胞进行实验。

#### 1.2.2 药物配制

配制 1×PBS 缓冲液, 其中取 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 3.58 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g 用双蒸水定容至 1 L。罗汉果粗提物用 1×PBS 缓冲液配制浓度为 200 mg/mL 母液, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用 1×PBS 缓冲液配制浓度为 60 mmol/L 母液, 实验时根据实验所需浓度用培养基稀释, 现配现用。

### 1.2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激损伤模型建立

当细胞长满整个培养皿面积 80% 以上时, 消化并离心, 每孔以 2000 个细胞的密度种植于 96 孔板中, 每个浓度设立 5 个复孔, 37 °C 培养过夜, 每孔加入 100 μL 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200、400、800、1200 μmol/L), 24、48 和 72 h 后每孔加入 20 μL MTT, 继续培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液混合均匀。采用酶标仪于 490 nm 波长处测定光密度值 (OD), 计算 IC<sub>50</sub> 值。

### 1.2.4 罗汉果粗提物对 MIN6 细胞活性的影响

当细胞长满整个培养皿面积 80% 以上时, 消化并离心, 每孔以 2000 个细胞的密度种植于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 将罗汉果粗提物母液用完全培养基稀释成不同浓度 (25、100、200、400、800、1000、1600 μg/mL), 每孔 100 μL 药物, 每个浓度设立 5 个复孔。24 h 后每孔加入 20 μL MTT, 继续培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液混合均匀。采用酶标仪于 490 nm 波长处测定光密度值 (OD), 计算 IC<sub>50</sub> 值。

### 1.2.5 MTT 检测罗汉果粗提物和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 MIN6 细胞活性的影响

取对数生长期的 MIN6 细胞, 用 PBS 洗一次, 用 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶于室温消化 2 min, 加入培养基终止消化, 将细胞悬液移至 15 mL 离心管中离心 (1000 r/min, 5 min), 弃上清, 加入适当培养基, 细胞计数调整细胞密度为 2000 cells/孔, 接种于 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 细胞贴壁后, 联用罗汉果粗提物及过氧化氢组, 先加入 100 μL 罗汉果粗提物 (200 μg/mL), 待药物作用 1 h 后, 给予 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200、400、800、1200 μmol/L), 空白对照组加入 100 μL 完全培养基, 单用罗汉果粗提物组加入 100 μL 浓度为 200 μg/mL 的罗汉果粗提物。每组设立 5 个复孔, 培养 24 h、48 h、72 h 后, 每孔加入 20 μL MTT, 继续培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液混合均匀后。采用酶标仪于 490 nm 波长处测定光密度值 (OD)。

### 1.2.6 实验分组及 MIN6 细胞形态观察

将实验分为空白对照组 (Ctrl)、过氧化氢组 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、联用罗汉果粗提物及过氧化氢组 (MGE+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、罗汉果粗提物组 (MGE)。其中空白对

照组仅加入完全培养基; MGE 组加入罗汉果粗提物, 浓度为 200 μg/mL; 过氧化氢组加入过氧化氢, 浓度为 500 μmol/L; MGE+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组加入罗汉果粗提物 (200 μg/mL) 及过氧化氢 (500 μmol/L)。

在 6 孔板中均匀接种 MIN6 细胞, 加入 2 mL 完全培养基继续培养 24 h, 在显微镜下观察细胞形态。

### 1.2.7 细胞凋亡检测

取对数生长期 MIN6 细胞种于 6 孔板中, 按 1.2.6 分组给药作用 24 h 后, 0.25% 胰酶消化后收集细胞及上清于 15 mL 离心管中, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 2 mL PBS 缓冲液混悬细胞沉淀再次离心, 取沉淀结束后按照 Annexin FITC/PI 双染检测细胞凋亡的步骤进行操作并上机检测凋亡率。

### 1.2.8 细胞中 ROS 水平的检测

取对数生长期 MIN6 细胞种于 6 孔板中, 待其贴壁后, 按 1.2.6 分组给药处理, 24 h 后收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 每组中加入 2 μmol/L 的 ROS 探针 DCFH-DA, 避光室温染色 30 min, PBS 洗涤之后流式细胞仪检测 ROS 水平。

### 1.2.9 Western Blot 检测凋亡相关蛋白的表达

取对数生长期 MIN6 细胞种于 7 cm 培养皿中, 按 1.2.6 分组给药 24 h 后, 收集沉淀, 加入适量裂解液冰上放置 30 min 后, 于 4 °C, 12000 r/min 离心 20 min, 取上清液, BCA 法定量, 用 12% SDS-PAGE 电泳分离 120 min, 转膜 70 min, 5% 脱脂牛奶室温封闭 3 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, PBST 洗 3 次, 每次 10 min, 与二抗室温孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 发光液, 免疫印迹成像系统检测目的蛋白。

### 1.2.10 统计学分析

采用 IBM SPSS Statistics 22 (IBM; USA) 统计进行统计学分析, 两组样本之间用独立样本 *t* 检验, 多组样本之间采用单因素检验分析, 以 *p*<0.05 具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 罗汉果粗提物预保护对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的

#### MIN6 存活率的影响

#### 2.1.1 不同浓度罗汉果粗提物对 MIN6 细胞活性的影响

向小鼠胰岛 MIN6 细胞中加入不同浓度罗汉果粗提物 24 h 后, 检测细胞活性。结果表明, 当罗汉果粗提物为 25、100、200、400 μg/mL 时, 细胞活力分别为 99.67%、98.82%、97.27%、89.32%。200 μg/mL 时

细胞活力达 90% 以上且相对 400  $\mu\text{g/mL}$  的浓度来说对细胞活力几乎无抑制作用, 因此我们选用 200  $\mu\text{g/mL}$  罗汉果粗提物用于后续实验。(图 1a)

### 2.1.2 罗汉果粗提物减少 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对 MIN6 细胞的影响

从石瑶瑶等<sup>[14]</sup>的研究可知,  $\text{H}_2\text{O}_2$  作为一种常见的活性氧, 易透过细胞膜从而导致氧化损伤和凋亡, 是构建细胞氧化损伤模型的常用试剂, 因此本实验选择  $\text{H}_2\text{O}_2$  进行体外建模。MIN6 细胞经  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导后, 细胞存活率明显下降, 呈浓度依赖性,  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度越大, 细胞存活率越低(如图 1b); 计算  $\text{IC}_{50}$  值为 540  $\mu\text{mol/L}$ , 故后续实验选择 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  建立  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导氧化应激模型; 200  $\mu\text{g/mL}$  的罗汉果粗提物预处理 1 h 后分别加入不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200、400、800 和 1200  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用于 MIN6 细胞, 培养 24、48 和 72 h, 检测细胞活力。与单用  $\text{H}_2\text{O}_2$  组相比, 罗汉果粗提物预处理后用  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理各实验组细胞活力明显升高(如图 1c)。以上结果发现罗汉果粗提物能将细胞活力由 13.23% 提高到 61.48%, 极显著增加 800  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  导致的细胞增殖减少 ( $p < 0.01$ )。

同时在光学显微镜下观察细胞形态也发现, 对照

组 (Control, Ctrl) 细胞状况生长良好, 细胞密度较  $\text{H}_2\text{O}_2$  组高, 细胞膜边缘清晰可见,  $\text{H}_2\text{O}_2$  组细胞增殖受到抑制, 细胞形态发生变化, 皱缩变圆, 变亮, 而单用罗汉果粗提物组与对照组差异不大, 这说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  很可能诱导 MIN6 细胞发生了死亡。罗汉果粗提物组预处理组与单用  $\text{H}_2\text{O}_2$  相比, 预处理组细胞密度有所增加, 细胞碎片减少, 死细胞也相应减少, 说明罗汉果粗提物对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 MIN6 细胞死亡具有一定的逆转作用(如图 1d)。细胞存活是反映细胞活力及其增殖能力最直观指标。各种因素导致的氧化应激能使细胞内活性氧水平升高, 能损伤胰岛细胞甚至诱导其发生细胞凋亡<sup>[5]</sup>。细胞存活越高, 说明氧化应激对胰岛细胞的损伤就越小。因此, 细胞存活率是表明天然活性成分具有抗氧化活性的指标之一<sup>[15]</sup>。蔡小华等人<sup>[15]</sup>发现辣木叶水提物能恢复  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤细胞的存活率到 100%, 说明该提取物具有较强的抗氧化活性。本研究也发现 200  $\mu\text{g/mL}$  罗汉果粗提物能将细胞活力由 13.23% 提高到 61.48%, 说明罗汉果提取物对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导损伤的胰岛 MIN6 细胞有良好的保护作用, 能缓解  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 MIN6 细胞的氧化损伤。

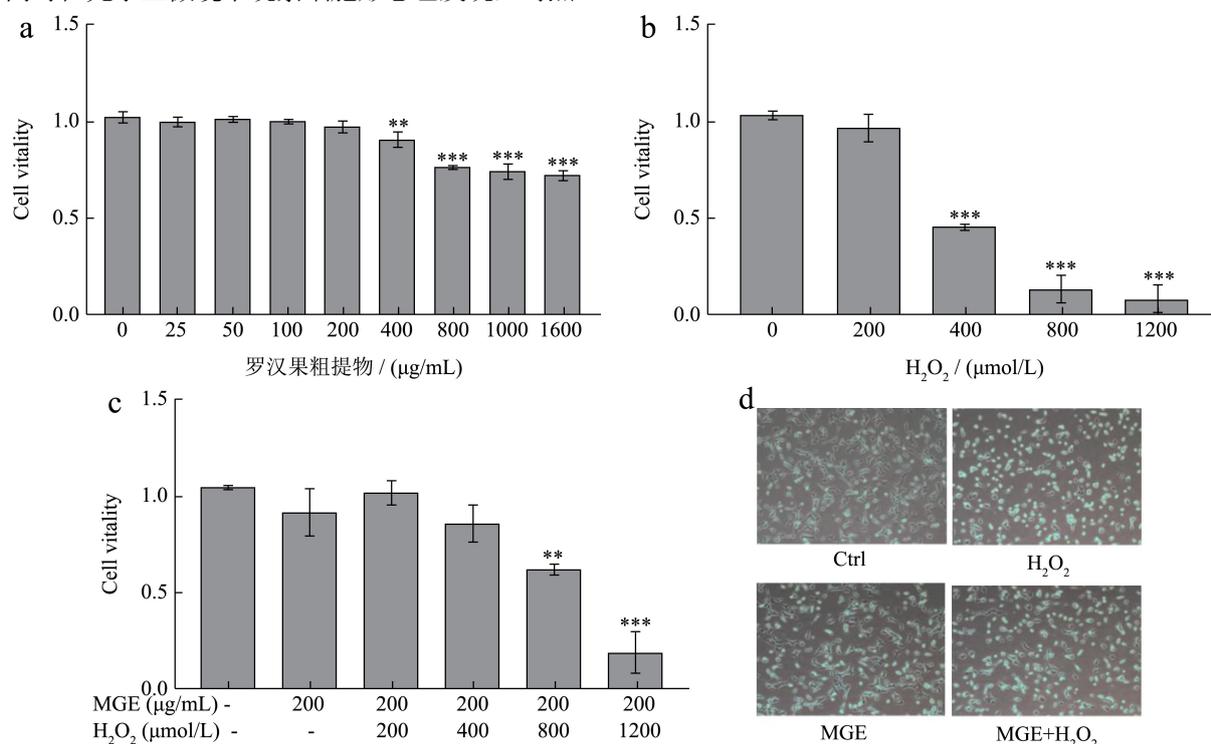


图 1 (a) 不同浓度罗汉果粗提物对 MIN6 细胞活力的影响; (b) 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 MIN6 细胞活力的影响; (c) 罗汉果粗提物和  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 MIN6 细胞活力的影响; (d) 罗汉果粗提物和  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后 MIN6 细胞形态

Fig.1 (a) Effects of different concentrations of *Momordica grosvenorii* extract on MIN6 cell viability; (b) Effect of different concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on MIN6 cell viability; (c) Effects of rough extract and  $\text{H}_2\text{O}_2$  on MIN6 cell viability; (d) Cell morphology of MIN6 treated with *Momordica grosvenorii* extract and  $\text{H}_2\text{O}_2$

注: \*\*表示与对照组相比差异极显著 ( $p < 0.01$ ), \*\*\*表示与对照组相比差异极显著 ( $p < 0.001$ ); MGE: 罗汉果粗提物。

## 2.2 罗汉果粗提物和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 MIN6 细胞中活性氧 (ROS) 的影响

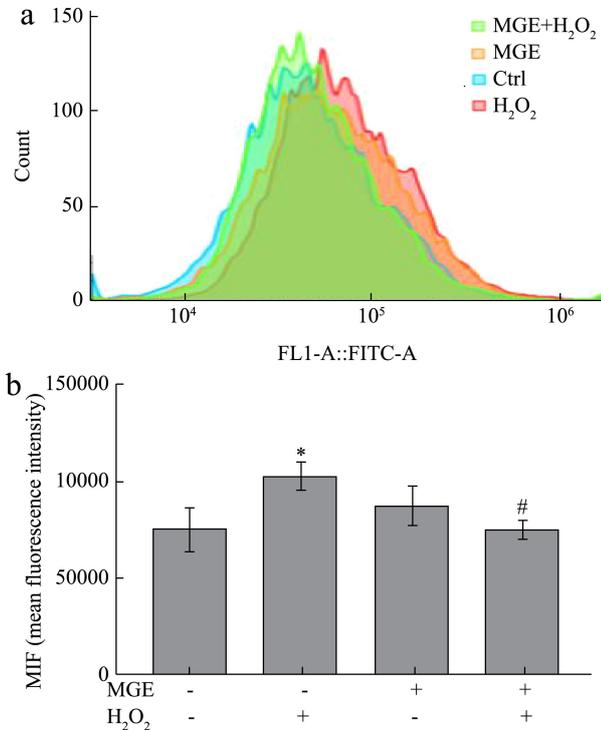


图2 罗汉果粗提物和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 MIN6 细胞中 ROS 水平的影响  
Fig.2 Effects of *Momordica grosvenorii* extract and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on ROS levels in MIN6 cells

注: \*表示与对照组相比差异显著 ( $p < 0.05$ ), #表示 MGE+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组间差异显著 ( $p < 0.05$ ); MGE: 罗汉果粗提物。

胰岛  $\beta$  细胞表达抗氧化酶很弱, 尤其对活性氧簇 (ROS) 比其他组织更加敏感。而体内产生过量 ROS<sup>[5,6,16]</sup> 会诱导胰岛  $\beta$  细胞功能障碍和凋亡, 进而导致血糖失衡, 引起代谢失调及高血糖等疾病。流式细胞术检测 ROS 发现, 与对照组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 单独处理组绿色荧光显著增强 (荧光强度比对照组增加了 1.35 倍), 而单用罗汉果粗提物预处理组的 ROS 含量则无明显变化, 以上结果表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能增加 ROS 含量, 并有可能诱导 MIN6 细胞的氧化损伤。用罗汉果粗提物预处理后, 能降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的 ROS 含量上升, 甚至将细胞内 ROS 水平降至正常, 与正常组相比无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 而与单用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组相比, ROS 水平下降了 26.86%, 具有明显差异 ( $p < 0.05$ ), 说明罗汉果粗提物可以抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MIN6 细胞内 ROS 水平升高。(如图 2)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的氧化应激导致细胞受损, 细胞存活减少甚至凋亡, 罗汉果粗提物能明显降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激导致的 ROS 水平增高, 从而能减轻 ROS

对小鼠胰岛  $\beta$  细胞的损伤和增殖抑制。

## 2.3 罗汉果粗提物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MIN6 细胞凋亡作用的影响

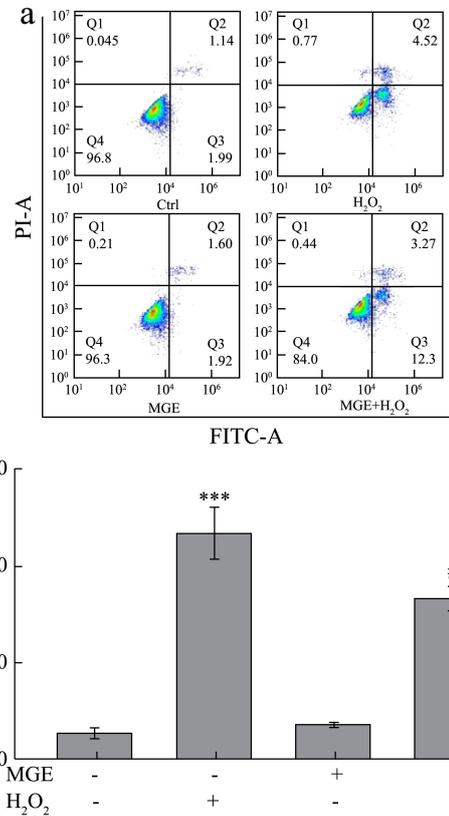


图3 罗汉果粗提物和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 MIN6 细胞凋亡的影响  
Fig.3 Effects of *Momordica grosvenorii* extract and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on apoptosis of MIN6 cells

注: \*\*\*表示与对照组相比差异极显著 ( $p < 0.001$ ), #表示 MGE+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组间差异显著 ( $p < 0.05$ ); MGE: 罗汉果粗提物。

ROS 的过度产生会导致胰岛  $\beta$  细胞发生氧化应激凋亡, 从而导致胰岛素分泌不足和发生胰岛素抵抗等<sup>[5]</sup>。前面的细胞增殖实验提示罗汉果粗提物能明显增加 MIN6 细胞的增殖, 显微镜下观察也发现罗汉果提取物干预后能减少死细胞的数量, 推测其对 MIN6 细胞的保护作用可能与其抗细胞凋亡有关。流式细胞术结果表明, 单用罗汉果粗提物处理组细胞凋亡率为 (3.13%) 与对照组 (3.52%) 差异不明显。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组的凋亡率高达为 26.12%, 而罗汉果粗提物预处理后, 明显减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的 MIN6 凋亡, 下降到为 15.57%, 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 单独处理组相比差异显著 ( $p < 0.05$ ), 活细胞的数量 (Q3 象限) 增加了 10% (如图 3)。以上结果表明罗汉果粗提物促进氧化损伤胰岛  $\beta$  细胞的存活, 与其降低 ROS 产生进而减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞

凋亡有一定的关系。

## 2.4 Western blot 检测凋亡及氧化应激信号通路相关蛋白的表达

路相关蛋白的表达

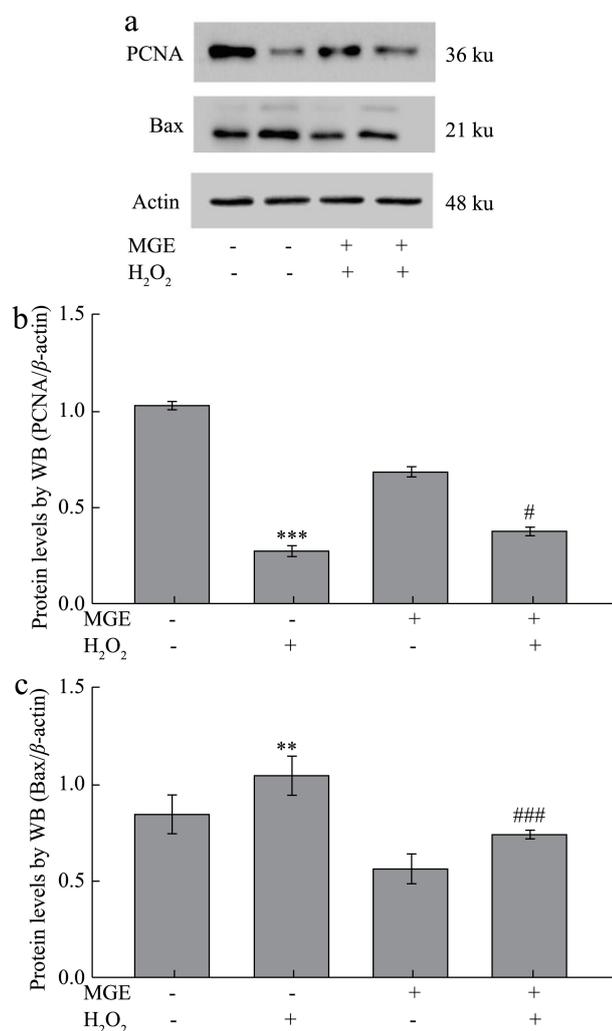


图4 罗汉果粗提物和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对 MIN6 细胞蛋白表达量的影响

Fig.4 Effects of *Momordica grosvenorii* extract and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on protein expression of MIN6 cells

注: \*\*表示与对照组相比差异极显著 ( $p < 0.01$ ), \*\*\*表示与对照组相比差异极显著 ( $p < 0.001$ ); #表示与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比差异显著 ( $p < 0.05$ ), ###表示与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比差异极显著 ( $p < 0.001$ ); MGE: 罗汉果粗提物。

对作为细胞增殖指标之一的 PCNA<sup>[17]</sup>表达进行检测, Western blot 结果显示单用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组的 PCNA 表达降低, 降低为 Ctrl 的 27.02%, 与对照组相比, 差异极显著 ( $p < 0.001$ ) 而罗汉果粗提物预处理后能增加 PCNA 的表达, 比单用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组升高 37.20%, 差异具有显著 ( $p < 0.05$ ), 说明罗汉果粗提物可以减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 MIN6 细胞 PCNA 表达的抑制, 进而促进了 MIN6 细胞的存活。

细胞凋亡<sup>[18-20]</sup>是维持细胞内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序性死亡, 作为一个主动的过程, 细胞凋亡涉及一系列基因的激活及蛋白表达发生改变, 凋亡是多基因严格控制的过程, 包括 Bcl-2 家族、caspase 家族、抑癌基因 P53 等, 其中 Bcl-2<sup>[21-24]</sup>家族中包括抗凋亡和促凋亡的基因, 如 Bcl-2、Mcl-1、Bcl-w、Bax 等, Bax 作为促凋亡蛋白, 对细胞凋亡具有重要意义。Western blot 结果显示, 促凋亡蛋白 Bax 在单用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组里表达增加, 用罗汉果粗提物预处理后用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 Bax 表达下降, 说明罗汉果粗提物可以减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的 Bax 增加, 这可能是其具有抗凋亡活性的分子机制之一。

综上所述, 说明罗汉果粗提物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的增殖抑制、ROS 生成以及细胞凋亡有明显的改善作用, 与其升高 PCNA 的水平以及降低促凋亡蛋白 Bax 的表达有关, 这可能也是罗汉果发挥促增殖及抗凋亡作用的机制之一。研究表明罗汉果粗提物可通过抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激和凋亡, 促进胰岛细胞的存活, 进而能改善葡萄糖刺激胰岛素分泌功能, 该研究为糖尿病的预防提供了新的思路, 但罗汉果粗提物对糖尿病的预防作用深层机制和临床应用仍需要进一步的探讨。

## 3 结论

本实验以罗汉果粗提物为研究对象, 以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 MIN6 细胞构建氧化应激损伤模型, 分别从细胞增殖、细胞内 ROS 水平、细胞凋亡以及增殖凋亡因子 PCNA 和 Bax 的表达等方面探讨罗汉果粗提物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 MIN6 细胞氧化损伤的保护作用。结果表明, 罗汉果粗提物能显著缓解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 MIN6 细胞的增殖抑制和细胞内 ROS 的增多, 增加细胞促增殖因子 PCNA 的表达以及减少促凋亡因子 Bax 的水平, 从而提高 MIN6 细胞的存活。以上研究表明, 罗汉果粗提物具有较强的细胞抗氧化活性及抗凋亡作用, 这为后续罗汉果对胰岛细胞的保护作用机制提供了研究基础, 也为将罗汉果抗氧化降血糖的功能产品开发提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 彭瑾,张蓉,彭梅,等.紫外-可见分光光度法测定不同产地罗汉果中多糖含量[J].中国药业,2016,25(2):51-53
- [2] PENG Jin, ZHANG Rong, PENG Mei, et al. Determination of polysaccharide content in *Momordica grosvenorii* from different producing areas by UV-Vis spectrophotometry [J]. China Pharmaceutical Industry, 2016, 25(2): 51-53
- [2] 唐慧勤,龙颖,董威,等.产地、生长期、商品规格等不同因素对罗汉果止咳作用的影响[J].中草药,2015,46(20):3051-

- 3054  
TANG Huiqin, LONG Ying, DONG Wei, et al. Origin, growth term, commodity specifications and other different factors effect on cough effect of *Momordica grosvenorii* [J]. Chinese Herbal Medicine, 2015, 46(20): 3051-3054
- [3] 蒋彩云,李苗,冯鑫苇.罗汉果开发研究进展[J].江苏调味副食品,2021,1:4-8  
JIANG Caiyun, LI Miao, FENG Xinwei. Development and research progress of *Momordica grosvenorii* [J]. Jiangsu Seasoning Non-staple Food, 2021, 1:4-8
- [4] 杨洋,罗玉莲,刘眾.罗汉果抗氧化活性成分的提取工艺研究及其含量测定[J].食品工业科技,2004,3:70-72  
YANG Yang, LUO Yulian, LIU Gu. Study on extraction technology and content determination of antioxidant active components from *Momordica grosvenorii* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2004, 3: 70-72
- [5] 孙佳萍,王妍.阿卡波糖抑制过氧化氢诱导小鼠 MIN-6 胰岛  $\beta$  细胞氧化应激及细胞凋亡[J].中国药师,2020,23(7):1292-1296  
SUN Jiaping, WANG Yan. Acarbose inhibited oxidative stress and apoptosis of mouse min-6 islet  $\beta$  cells induced by hydrogen peroxide [J]. The Chinese Medicine, 2020, 23(7): 1292-1296
- [6] 胡聪,吴颀,李亚林,等.维生素 D 对过氧化氢诱导 MIN6 细胞凋亡的保护作用[J].中国药理学通报,2020,36(2):198-203  
HU Cong, WU Zhuan, LI Yalin, et al. Protective effect of vitamin D on apoptosis of MIN6 cells induced by hydrogen peroxide [J] Chinese Bulletin of Pharmacology, 2020, 36(2): 198-203
- [7] Wang T, Sun P, Chen L, et al. Cinnamtannin D-1 protects pancreatic  $\beta$ -cells from palmitic acid-induced apoptosis by attenuating oxidative stress [J]. Agric Food Chem, 2014, 62(22): 5038-5045
- [8] 谈建成,曾思恩.罗汉果药用功能研究与进展[J].中国继续医学教育,2019,11(13):147-149  
TAN Jiancheng, ZENG Sien. Research and progress on medicinal function of *Momordica grosvenorii* [J]. Continuing Medical Education in China, 2019, 11(13): 147-149
- [9] 万艳娟,吴军林,吴清平.罗汉果降血糖作用及机理研究进展[J].食品研究与开发,2016,37(11):188-191  
WAN Yanjuan, WU Junlin, WU Qingping. Research progress on hypoglycemic effect and mechanism of *Momordica grosvenorii* [J]. Food Research and Development, 2016, 37(11): 188-191
- [10] 周吉,陈章元,蔡芹,等.响应面法优化黄连-罗汉果药对中降糖成分的超声提取工艺研究[J].化学研究与应用,2019,31(6):1021-1027  
ZHOU Ji, CHEN Zhangyuan, CAI Qin, et al. Optimize ultrasonic-assisted extraction process of the hypoglycemic components from rhizoma coptidis-siraita grosvenorii compound by response surface method [J]. Chemical Research and Application, 2019, 31(6): 1021-1027
- [11] 黄飞.山楂叶和罗汉果多糖活性成分的研究[D].南宁:广西大学,2000  
HUANG Fei. Study on the active constituents of polysaccharide from hawthorn leaf and *Momordica grosvenorii* [D]. Nanning: Guangxi University, 2000
- [12] 周文俊,王睿洁.《桂林中药资源典》新书发布[N].桂林日报,2021-08-15(001)  
ZHOU Wenjun, WANG Ruijie. 《Guilin Traditional Chinese Medicine Resource Code》 A new book published [N]. Guilin daily, 2021-08-15(001)
- [13] 同福碗粥股份有限公司.一种从罗汉果中提取罗汉果甜苷的方法[P].中国, CN 105273033 A, 2016. 01. 27  
Tongfu Porridge Co. Ltd.. A method for extraction of grosvenin from momordica grosvena [P]. China: CN 105273033 A, 2016. 01. 27
- [14] 石瑶瑶,叶元土,蒋蓉,等.过氧化氢诱导的草鱼原代肝细胞氧化损伤模型的构建及其对天然植物抗氧化能力的评价[J].动物营养学报,2021,33(4):2290-2301  
SHI Yaoyao, YE Yuantu, JIANG Rong, et al. Construction of hydrogen peroxide-induced oxidative damage model and evaluation of antioxidant capacity of natural plants [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(4): 2290-2301
- [15] 蔡小华,李小伟,李国坤,等.辣木叶水提物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J].现代食品科技,2021,37(10):62-69,111  
CAI Xiaohua, LI Xiaowei, LI Guokun, et al. Protective effect of water extract from *Moringa oleifera* leaves on oxidative damage of HepG2 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 62-69, 111
- [16] 向思亭,易想炼,赵静,等. $\gamma$ -谷维素对过氧化氢诱导 L02 细胞凋亡的保护作用[J].营养学报,2018,40(3):279-284  
XIANG Siting, YI Xianglian, ZHAO Jing, et al. Protective effect of  $\gamma$ -glutamin on hydrogen peroxide induced apoptosis in L02 cells [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2018, 40(3): 279-284
- [17] 张旭东,张雷.PCNA 及 caspase-3 在 2 型糖尿病模型小鼠胰岛细胞中的表达及意义[J].长治医学院学报,2015,29(2):95-97

- ZHANG Xudong, ZHANG Lei. Expression and significance of PCNA and caspase-3 in islet cells of type 2 diabetic mice [J]. Journal of Changzhi Medical College, 2015, 29(2): 95-97
- [18] 胡聪.1,25-(OH)2D3 改善内质网应激抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MIN6 细胞凋亡[D].衡阳:南华大学,2020
- HU Cong. 1,25-(OH)2D3 improves ER stress suppresses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in MIN6 cells [D]. Hengyang: University of South China, 2020
- [19] 冯丽帅,王倩倩,马旭,等.serp1 对过氧化氢诱导内皮细胞凋亡的保护作用[J].中国医药导报,2016,13(28):13-16
- FENG Lishuai, WANG Qianqian, MA Xu, et al. Protection of serp1 against hydrogen peroxide-induced endothelial apoptosis [J]. China Medical Herald, 2016, 13(28): 13-16
- [20] 王婧,杨雯,涂琦,等.灯盏花素通过调节 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体功能诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡[J].实用医学杂志,2020,36(24):3333-3337
- WANG Jing, YANG Wen, TU Qi, et al. Caligendin induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells by regulating mitochondrial function mediated by the PINK1/Parkin signaling pathway [J]. The Journal of Practical Medicine, 2020, 36(24): 3333-3337
- [21] 周晓红,卢晓丽,杨雪,等.熊果酸对喉癌 Hep-2 细胞 bcl-2、Bax 基因表达和凋亡影响[J].中国实验诊断学,2021,25(3): 434-437
- ZHOU Xiaohong, LU Xiaoli, YANG Xue, et al. Effect of bear fruit acid on bcl-2, Bax gene expression and apoptosis in Hep-2 laryngeal cancer cells [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2021, 25(3): 434-437
- [22] 李伟宏,田莉,刘俊保.莜术油对人子宫内膜癌 HEC-1-B 细胞增殖、凋亡及 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响[J].河南中医,2021,41(3):384-387
- LI Weihong, TIAN Li, LIU Junbao. Effect of angdotry oil on the proliferation, apoptosis of HEC-1-B cells and Caspase-3, Bax, Bcl-2 protein expression in human endometrial carcinoma [J]. Henan Traditional Chinese Medicine, 2021, 41(3): 384-387
- [23] Pan X, Tan J, Weng X, et al. ICT1 promotes osteosarcoma cell proliferation and inhibits apoptosis via STAT3/BCL-2 pathway [J]. Biomed Res Int, 2021, 6: 8971728
- [24] Li Y N, Ning N, Song L, et al. Derivatives of deoxypodophyllotoxin induce apoptosis through Bcl-2/Bax proteins expression [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2021, 21(5): 611-620

(上接第 231 页)

- [15] 李梁,邹兰,张永县,等.正交法优化青稞淀粉提取工艺及其性质研究[J].粮食与油脂,2021,34(4):32-26
- LI Liang, ZOU Lan, ZHANG Yongxian, et al. Optimization of extraction technology and properties of highland barley starch by orthogonal method [J]. Grain and Oil, 2021, 34(4): 32-36
- [16] Liu K, Chi C, Huang X, et al. Synergistic effect of hydrothermal treatment and lauric acid complexation under different pressure on starch assembly and digestion behaviors [J]. Food Chemistry, 2019, 278(45): 560-567
- [17] 韩伟,马婉婉,骆开荣.酶法提取技术及其应用进展[J].机电信息,2010,17:15-8
- HAN Wei, MA Wanwan, LUO Kairong. Enzymatic extraction technology and its application progress [J]. Electromechanical Information, 2010, 17: 15-18
- [18] Aguilera Y, Rebollo-hernanz M, Caas S, et al. Response surface methodology to optimise the heat-assisted aqueous extraction of phenolic compounds from coffee parchment and their comprehensive analysis [J]. Food Function, 2019, 10(8): 4739-4750
- [19] 谭宏渊,田明杰,谭富耀,等.微波辅助提取板栗淀粉的工艺优化[J].食品工业,2019,40(3):49-51
- TAN Hongyuan, TIAN Mingjie, TAN Fuyao, et al. Optimization of microwave assisted extraction of chestnut starch [J]. Food Industry, 2019, 40(3): 49-51
- [20] Mudgil D, Barak S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 61(21): 54-67
- [21] 唐煜括.控制糊化耦合热挤压 3D 打印调控淀粉消化性能的研究[D].广州:华南理工大学,2020
- TANG Yukuo. Study on regulating starch digestibility by controlling gelatinization coupled hot extrusion 3D printing [D]. Guangzhou: South China University of technology, 2020