

绞股蓝提取物对衰老大鼠 DNA 损伤的影响

The Effect of Gynostemma Pentaphyllum Extract on DNA Damage of Aging Rats

孙永叶/马爱国*/贾依娜/张秀珍

(青岛大学医学院营养研究所, 山东 青岛 266021)

SUN Yong-ye, MA Ai-guo*, JIA Yi-na, ZHANG Xiu-zhen
(Institute of Nutrition, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China)

【摘要】背景与目的: 探讨绞股蓝提取物对衰老大鼠 DNA 氧化及烷化损伤的影响。材料与方法: 成年大鼠颈背部皮下注射 D-半乳糖 100 mg/kg 构建衰老动物模型, 同时设注射等量生理盐水的正常对照组。已建模的大鼠分为人工合成饲料中添加不同剂量的绞股蓝提取物(200、800、4 000 mg/kg 饲料)及维生素 E、C(V_{E+C})各组, 8 周后采血获取淋巴细胞, 用单细胞凝胶电泳法检测淋巴细胞 DNA 自发损伤及 H_2O_2 诱导的氧化损伤; 实验结束前 1 周留取大鼠 24 h 尿液, 通过毛细管电泳法检测大鼠尿中 O^6 -甲基鸟嘌呤(O^6 -MeG)的含量。结果: 各组大鼠淋巴细胞 DNA 自发损伤无明显差异($P > 0.05$)。分别采用 5、10 和 25 μ mol/L H_2O_2 氧化时, 绞股蓝各组及维生素 E、C(V_{E+C})组 DNA 氧化损伤均明显低于衰老对照组($P < 0.05$), 且绞股蓝 800、4 000 mg/kg 组 DNA 氧化损伤与正常对照组及 V_{E+C} 组无显著性差别。衰老对照组尿中 DNA 烷化损伤代谢产物 O^6 -MeG 含量较其他各组偏高, 但差别无统计学意义。结论: D-半乳糖诱导衰老的大鼠模型 DNA 抗氧化损伤的能力降低, 而 DNA 烷化损伤无明显改变; 在本实验条件下, 绞股蓝提取物可有效降低 H_2O_2 诱导的 DNA 氧化损伤, 对 DNA 烷化损伤没有明显作用。

【关键词】绞股蓝; DNA 损伤; 彗星电泳; O^6 -甲基鸟嘌呤

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)05-0378-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To investigate the effects of Gynostemma pentaphyllum (GP) extract on DNA oxidative and alkylating damages. MATERIAL AND METHODS: Adult Wistar rats received 100 mg/kg D-galactose subcutaneous injection each day to build the aging model. There was also a control group. These groups of rats were fed with fully compounded diet which was supplemented with different doses of Gynostemma pentaphyllum extract or vitamin E, C(V_{E+C}) for 8 weeks. Whole blood was collected at the end of the trial. Spontaneous and induced oxidative DNA damages were analyzed by SCGE. Urine was collected before the end of the trial. Urinary O^6 -MeG was analyzed by high performance capillary zone electrophoresis. RESULTS: There was no statistical difference in spontaneous DNA damage among 6 groups ($P > 0.05$). But less oxidative DNA damage induced by 5, 10, 25 μ mol/L H_2O_2 were found in the groups supplemented with Gynostemma pentaphyllum extract and the V_{E+C} group than in the aging group ($P < 0.05$). When supplemented with higher dose of Gynostemma pentaphyllum extract, DNA damage showed no significant differences compared with the control group and V_{E+C} group. The level of urinary O^6 -MeG in the aging group was not higher than that in the other groups ($P > 0.05$). CONCLUSION: D-galactose could induce DNA oxidative damage while it had no effect on DNA alkylating damage. When Gynostemma pentaphyllum extract was given to aging rats, the oxidative DNA damage induced by H_2O_2 could be effectively decreased and the alkylating DNA damage showed no change.

【KEY WORDS】 Gynostemma pentaphyllum; DNA damage; SCGE; O^6 -MeG

收稿日期: 2006-01-03; 修订日期: 2006-04-11

基金项目: 国家中医药局中医药科学技术研究专项基金 (No: 02-03ZP37); 青岛大学科研基金

作者简介: 孙永叶(1977-), 女, 山东烟台人, 硕士, 研究方向: 医学营养学。

* Correspondence to: MA Ai-guo, Tel: 86-532-82991503, E-mail: maiguo@public.qd.sd.cn

绞股蓝为葫芦科植物,是目前所知除五加科植物以外唯一含有人参皂甙类成分的植物,现已知绞股蓝中含80多种皂甙成分,还分离得到人参皂甙 Rb1, Rb3, Rd 和 F 等^[1]。近年来,有研究资料表明,绞股蓝具有抗癌、抗溃疡、抑制癌细胞增殖、增强机体免疫力等多种生物学功能。章荣华^[2]等也通过测定绞股蓝皂甙给药组动物肝脏组织或红细胞 LPO、SOD 含量及皮肤羟脯氨酸含量等指标后认为,绞股蓝皂甙具有延缓衰老的作用。但是,目前关于绞股蓝对 DNA 损伤影响的研究较少,因此,本实验通过建立大鼠衰老模型,观察不同剂量的绞股蓝提取物对衰老大鼠 DNA 氧化及烷化损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 衰老大鼠模型的建立与分组

采用 52 只成年 Wistar 大鼠(3~4 月龄),雌雄各半,体重 180~260 g,由青岛市实验动物中心提供(动物合格证号:20030010)。基础饲料适应性喂养 1 周后,随机分为 6 组,每组 8~10 只,分别为正常对照组、衰老对照组、维生素 E、C 组和绞股蓝 200、800、4 000 mg/kg 3 个剂量组。除正常对照组外,其余各组大鼠每日颈背部皮下注射 D-半乳糖 100 mg/kg,正常对照组皮下注射等量的生理盐水。正常对照组和衰老对照组大鼠喂饲基础饲料,其余 4 组分别在基础饲料中添加维生素 E、C (V_{E+C})及不同剂量的绞股蓝提取物,实验期为 8 周。

在基础饲料中添加维生素 E、C 或绞股蓝提取物,充分混匀,低温压制并经循环风自然干燥,后将制成的饲料放入 -20 °C 冰箱保存。各组动物自由摄食饮水。基础饲料成分^[3](%)为:玉米面 20,麸皮 21,豆饼粉 25,高粱粉 10,大麦 15,鱼粉 3,酵母粉 2,骨粉 3,食盐 1。

1.2 主要试剂

绞股蓝提取物(绞股蓝皂甙含量为 95%左右),购于陕西安康市禾焱生物工程有限公司,D-半乳糖为 Sigma 公司产品,荧光剂 DAPI(4'-6-Diamidino-2'-Phenylindole dihydrochloride)为 Boehringer Mannheim 公司产品,淋巴细胞分离液由爱普生物技术公司提供。

1.3 样品采集与处理

实验结束前 1 周内留取各组大鼠 24 h 尿液,置于 -80 °C 低温冰箱保存待测。干预结束后,以 20% 的乌拉坦麻醉动物,腹主动脉取血,抗凝,分离获取淋巴细胞。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 DNA 氧化损伤分析

采用单细胞凝胶电泳法(SCGE)或称彗星电泳技术^[4]。用微量移液器取抗凝血 30 μl,经分离获取淋巴细胞,分为加入 H₂O₂ 浓度为 5、10、25 μmol/L 的 3 个剂量组,作用 5 min 后立即分析 H₂O₂ 诱导淋巴细胞氧化损伤的程度。

1.4.2 尿 O⁶-MeG 和肌酐的测定

O⁶-MeG 采用毛细管电泳法^[5],其电泳条件:电压为 30 kV,检测波长 214 nm,进样压力为 20 kPa。尿肌酐采用苦味酸法测定。O⁶-甲基鸟嘌呤含量以 24 h 尿中相当于 1 g 肌酐的 O⁶-甲基鸟嘌呤 mg 数表示。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 11.0 统计软件,应用单因素方差分析比较组间差异,用 Q 检验进行两两比较,α = 0.05,为检验水准。

2 结果

2.1 绞股蓝提取物对大鼠淋巴细胞 DNA 氧化损伤的影响

结果见表 1。各组淋巴细胞 DNA 自发损伤差异无统计学意义(P > 0.05);分别采用 5、10 和 25 μmol/L H₂O₂ 氧化时,绞股蓝各组及维生素 V_{E+C} 组 DNA 氧化损伤均明显低于衰老对照组(P < 0.05),且绞股蓝 800 mg/kg 和 4 000 mg/kg 组 DNA 氧化损伤与正常对照组及 V_{E+C} 组差别无统计学意义。

2.2 绞股蓝对 DNA 烷化损伤的影响

O⁶-甲基鸟嘌呤为 DNA 烷化损伤的产物,衰老对照组尿中 O⁶-MeG 含量较其他各组偏高,但差别无统计学意义(P > 0.05),见表 2。

表 1 绞股蓝对大鼠淋巴细胞 DNA 氧化损伤的影响(arbitrary unit AU, s)

Table 1 Effect of Gynostemma pentaphyllum extract on oxidative DNA damage of lymphocytes in rats(s)

groups	n	H ₂ O ₂ (μmol/L)			
		0	5	10	25
Normal control group	8	0.50 ± 0.33	126.63 ± 20.85 ^b	169.13 ± 16.08 ^b	219.50 ± 15.83 ^b
Aging control group	8	1.00 ± 0.42	179.38 ± 21.11 ^a	219.88 ± 22.52 ^a	262.43 ± 18.29 ^a
V _{E+C} group	8	0.43 ± 0.30	139.29 ± 12.24 ^b	178.29 ± 18.45 ^b	225.00 ± 17.96 ^b
GP 200 mg/kg	9	0.56 ± 0.38	153.22 ± 15.72 ^{abc}	194.56 ± 17.87 ^{abc}	236.44 ± 13.20 ^b
800 mg/kg	9	0.67 ± 0.37	138.00 ± 19.51 ^b	177.89 ± 24.57 ^b	230.22 ± 26.15 ^b
4 000 mg/kg	10	0.60 ± 0.34	132.10 ± 15.37 ^b	175.30 ± 12.02 ^b	225.70 ± 17.83 ^b

a: compared with normal control P < 0.01; b: compared with aging control P < 0.01; c: compared with 4 000 mg/kg group P < 0.05.



表 2 绞股蓝提取物对DNA烷化损伤的影响

Table 2 Effect of *Gynostemma pentaphyllum* extract on O⁶-MeG concentration in rats' urine($\bar{x} \pm s$)

groups	n	O ⁶ -MeG(mg/g creatinine)
Normal control group	8	1.43 ± 0.42
Aging control group	8	2.17 ± 1.18
V _E +C group	8	1.91 ± 0.76
GP 200 mg/kg	9	1.84 ± 0.96
GP 800 mg/kg	9	1.92 ± 0.82
GP 4 000 mg/kg	10	1.58 ± 1.04

3 讨 论

D-半乳糖所致大鼠或小鼠亚急性衰老模型因衰老变化明显,模型稳定,在抗衰老研究中经常被采用,以往的研究证实了 D-半乳糖制造的衰老模型在多种器官、组织的形态及生理、生化的许多观测指标上,呈现出与自然衰老相似的改变^[6,7]。因此,本研究采用 D-半乳糖皮下注射诱导大鼠衰老,通过检测 H₂O₂ 诱导 DNA 氧化损伤,结果发现衰老模型组 DNA 氧化损伤较正常对照组明显加重,而通过饲料添加不同剂量的绞股蓝提取物的绞股蓝各组大鼠 DNA 氧化损伤较衰老对照组明显减轻,且补充剂量较高的绞股蓝组(800 mg、4 000 mg/kg) DNA 诱导损伤与正常对照组及维生素 E + C 组无显著差异,提示绞股蓝可显著提高衰老模型大鼠 DNA 抗氧化损伤的能力,且存在一定的剂量效应关系,与钱晓薇等的研究结果一致^[8]。绞股蓝含有丰富的人参皂甙及多种人体必需的氨基酸,刘晓瑞^[9]等研究发现,绞股蓝皂甙显著提高老龄大鼠抗氧化酶 SOD 及 GSH-Px 活性,提高肾上腺维生素 C 含量,从而提高机体的抗氧化能力。而且,绞股蓝还含有锌、硒、铁等微量元素,在生物体内锌参与 20 多种酶的合成,而硒能抑制过氧化反应、清除自由基和有害金属的毒性。上述因素可能在绞股蓝提高老龄大鼠 DNA 抗氧化损伤能力方面发挥作用。

O⁶-甲基鸟嘌呤是生物体内 DNA 受到烷化剂及各种细胞毒性药物的甲基化作用后形成的一种代谢产

物。O⁶-MeG 的含量不仅反映了体内细胞 DNA 遭受烷化损伤的程度,还与机体高度专一性 DNA 修复酶—O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)的活性密切相关,后者能够有效地修复 DNA 分子中鸟嘌呤 O⁶ 位的烷化碱基。本研究发现,D-半乳糖诱导的老年模型组大鼠尿中 O⁶-MeG 的含量与其他各组无显著差别,提示 D-半乳糖对 DNA 不会造成明显的烷化损伤。另外,绞股蓝提取物及维生素 E、C 补充组与正常对照组 O⁶-MeG 的含量也没有显著差别,与本实验室前期研究结果一致^[10]。本实验结果产生的机制还不清楚,尚需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 郭绪林,王铁军,边宝林. 长梗绞股蓝的化学成分研究[J]. 药学报,1997,32(7):524-529.
- [2] 章荣华,张仲苗,耿宝琴,等. 绞股蓝总苷对老龄大鼠的抗氧化作用观察 [J]. 中国现代应用药学,2000,17(4):306-308.
- [3] 石雁川,杨富清,陈炳卿,等. 抗坏血酸硬脂酸酯的维生素 C 生物效应研究[J]. 营养学报,1996,18(3):364-366.
- [4] 马爱国,臧金林,宋风荣,等. SCGE, SCE 和染色体畸变分析法用于 DNA 损伤与修复检测的对比研究 [J]. 癌变·畸变·突变,2001,13(3):154-157.
- [5] 杜卫,张秀珍,梁惠. 尿中 O⁶-甲基鸟嘌呤与恶性肿瘤关系的研究[J]. 肿瘤防治杂志,2003,10:127-128.
- [6] 张熙,张葆葆,杨新平,等. D-半乳糖诱导拟衰老动物模型的记忆行为改变[J]. 中国老年学杂志,1996,16(4):230.
- [7] 王中林,顾一煌,焦瑞清,等. D-半乳糖致小鼠衰老模型海马突触蛋白的改变[J]. 南京中医药大学学报,1997,13(4):216-217.
- [8] 钱晓薇,杨明璋,韩安全. 绞股蓝对明矾诱发遗传物质损伤的抑制作用[J]. 浙江大学学报(理学版),1999,26(4):84-87.
- [9] 刘晓瑞,王雅贤,王树林. 绞股蓝抗氧化作用的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志,1998,4(12):22-23.
- [10] 孙永叶,马爱国,梁惠,等. 维生素 C 对豚鼠 DNA 氧化及烷化损伤影响的研究[J]. 营养学报,2005,27(3):193-195.

中国图书馆分类法(3)

R126.2 城市规划卫生
 R126.4 公共场所卫生
 旅馆、剧院、公园、游泳池、澡堂、商店的卫生等入此。参见TU993。
 R126.6 居民区卫生
 住宅及宿舍卫生标准入此。绿化入S731.5。
 R126.9 城市的噪音、振动的卫生标准与管理
 R127 农村卫生
 仿R126分。
 R128 交通卫生、旅行卫生
 旅游过程中饮食、住宿等卫生总论入此。
 专论入有关各类。例:营养要求入R151.4; 国境检疫入R185.3*5; 航空航天

卫生学入R851。
 R128+.1 铁道运行卫生
 R128+.2 公路运行卫生
 R128+.3 内河运行卫生
 R129 灾害医学、灾害卫生
R13 劳动卫生
 总论工厂卫生的著作入此。
 R131 劳动生理学
 劳动生理卫生入此。
 R132 劳动卫生组织与行政
 依世界地区表分。

摘自《中国图书馆分类法》(第四版)