文章编号: 1001-0580(2009)09-1122-02 中图分类号: R 992 文献标志码: A 【实验研究】

海兔素对 D-半乳糖诱导衰老小鼠抗氧化作用*

贺娟[1], 梁惠[2], 李元[1], 史大永[3], 马爱国[2]

摘 要: 目的 通过对 D-半乳糖导的衰老小鼠补充不同剂量海兔素, 观察其对 DNA损伤和机体抗氧化能力影响。方法 以 D-半乳糖连续颈背皮下注射制作亚急性衰老小鼠模型, 并测定血淋巴细胞 DNA损伤状况、血浆中 O^6-甲基鸟嘌呤 (O^6-MeG)含量以及血清中抗氧化酶活力。结果 海兔素各剂量组的血淋巴细胞自发性损伤程度差异无统计意义。经 H_2O_2 处理后, 海兔素中、高剂量组及维生素 E对照组血淋巴细胞 DNA损伤程度及血浆中 O^6-MeG含量均低于模型组 ($P < 0.05$)。海兔素低、中、高剂量组及维生素 E对照组血清中丙二醛 (MDA)含量分别为 (6.54±0.17), (4.36±0.22), (5.51±0.19), (4.86±0.12) nmol/mL, 明显低于模型组的 (14.15±0.29) nmol/mL ($P < 0.05$)。海兔素中剂量组及维生素 E对照组小鼠血清中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)活性比模型组升高 ($P < 0.05$)。结论 海兔素可有效降低 H_2O_2 诱导的 DNA氧化损伤和减少 DNA烷化损伤产物 O^6-MeG的生成, 提高血清中 SOD, GSH-Px活性, 降低血清中 MDA含量, 具有一定的抗氧化作用。

关键词: D-半乳糖; 海兔素; DNA损伤; 衰老; 抗氧化作用

Antioxidant effect of aplysin on aged mice exposed to D-galatose

HE Juan, LIANG Hui, LI Yuan, et al. Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao Univercity (Qingdao 266003, China)

Abstract Objective To investigte antioxidant effect of various dosages of aplusin on aged mice. **Methods** The subacute ageing model of mice were made by back neck subcutaneous injection of D-galactose continuously. The oxidative DNA damage of peripheral lymphocytes induced by H_2O_2 was analyzed by SCGE. O^6-methy-guanine (O^6-MeG) was measured by high performance capillary zone electrophoresis. The content of malondialdehyde (MDA), activities of superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the serum were tested. **Results** There was no significant difference in DNA spontaneous damage of peripheral lymphocytes between treatment and control groups. There was a significant decreasing tendency of oxidatice DNA damage of peripheral lymphocytes in 40, 80 mg/kg• bw aphysin and Vit E supplement groups exposed to 10μmol/L H_2O_2 compared with blank control group ($P < 0.05$). The conents of O^6-MeG in plasma of 40, 80 mg/kg aplysin and Vit E supplement group were significantly lower than that of the blank control ($P < 0.05$). The SOD and GSH-Px acticities in 40, 80 mg/kg aplysin and Vit E supplement groups were higher than that of the blank coutrol ($P < 0.05$). The contents of MDA in all supplement groups were significantly lower than that of the blank control ($P < 0.05$). **Conclusion** The study indicated that aplysin could engange in antioxidantive acticities, strengthen the activities of antioxidative enzyme SOD and GSH-Px, and lower the level of MDA. Aplysin can also decrease DNA damage effectively in the aged mice.

Key words D-galactose; aplysin; DNA damage; aging; antioxidtive activity

在对海洋生物中抗肿瘤天然成分的筛选过程中, Yamamura S和 Hirata Y首次观察到海兔的粗提物显示出强烈的生物活性, 对筛取物进一步的分离、纯化得到一种倍半萜, 命名为海兔素 (Aplysin)[1]。研究显示, 海兔素广泛存在于海兔和凹红藻顶藻属海洋植物中, 在自然界中表现出独特的拒食性和抗肿瘤活性[2]。本研究前期实验表明, 海兔素对小鼠 S180肉瘤有一定的抑制作用, 对荷瘤小鼠有较强的免疫增强作用[3]; 并可增强酒精暴露大鼠体内抗氧化酶的活性, 对酒精引起的氧化损伤具有一定的保护效应[4]。本实验应用 D-半乳糖诱导亚急性衰老小鼠模型, 研究海兔素抗氧化、抗自由基与遗传稳定性的关系, 为海兔素的应用提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)凹顶藻与海兔素: 三列凹顶藻 (中国科学院海洋研究所); 倍半萜海兔素。(2)实验动物: SPF级昆明种小鼠 (青岛市实验动物中心), 雌雄各半, 体重 18~23 g。(3)主要仪器与试剂: 3K30型低温离心机 (美国 Sigma公司); 低温冰箱、电泳仪, M-20K-25型制冰机 (日本 Hoshizaki Electric公司) BH-2型荧光显微镜 (日本 Olympus公司); P/ACE 5000型全自动毛细管电泳仪 (美国 Beckman公司)。正常熔点琼脂糖、RPMI-1640培养基、小牛血清 (美国 Gibco公司); 4, 6-联脒-2-苯基吲哚二盐酸盐 (DAPI, 德国 Boehringer Mannheim公司); 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 美国 Amresco公司); 1, 6-三苯基-1, 3, 5-已三烯 (DPH)、O^6-甲基鸟嘌呤 (O^6-MeG)标准品 (美国 Sigma公司); 淋巴细胞分离液 (青岛爱普生物技术公司); 硼砂缓冲液 (美国 Beckman公司); 乙二胺四乙酸、磷酸二氢钠 (深圳恒康化工贸易有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 60只昆明小鼠适应性喂养 1周, 按体重随机分为空白对照组, 海兔素低、中、高剂量组、维生素 E对照组和模型组, 每组 10只, 雌雄各半, 分笼喂养。以上各组分别以生理盐水、20, 40, 80 mg/kg海兔素, 40 mg/kg维生素 E及吐温-80灌胃, 每天 1次, 连续 30 d。同时除空白对照组外, 其他 5组小鼠每天均按 400 mg/(kg• bw)颈背皮下注射 D-半乳糖生理盐水, 建立氧化损伤动物模型。

1.2.2 慧星电泳法检测淋巴细胞 DNA损伤 取外周血淋巴细胞, 分别 0, 10μmol/L按 H_2O_2 处理 5 min, 采用单细胞琼脂

* 基金项目: 山东省卫生厅资助项目 (2001CAICBA5)
作者单位: 1. 青岛大学医学院附属医院营养科, 青岛 266003; 2. 青岛大学医学院; 3. 中国科学院海洋研究所生物工程中心
作者简介: 贺娟 (1970-), 女, 山东青岛人, 主治医师, 硕士, 研究方向: 临床营养。

中国公共卫生 CPH

糖胶电泳 (SCGE)技术, 操作按文献〔5〕。

1.2.3　O^6-MeG的测定　采用高效毛细管电泳法, 操作按文献〔6〕。

1.2.4　血清脂质过氧化指标测定　超氧化物歧化酶 (SOD)测定采用羟胺法; 丙二醛 (MDA)测定采用硫代巴比妥酸法; 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)测定采用 5, 5-二硫对硝基苯甲酸 (DTNB)直接法。

1.3　统计分析　采用 SPSS 11.0统计软件进行单因素方差分析。

2　结　果

2.1　各组小鼠淋巴细胞 DNA损伤及 O^6-MeG测定情况 (表 1)　海兔素各剂量组、模型组和各对照组 (均未加入 H_2O_2)的淋巴细胞 DNA自发性氧化损伤程度均较低, 各组间差异无统计学意义; 而诱发氧化损伤 (加入 10μmol/L H_2O_2)后, 各组 DNA损伤和度明显加重。海兔素中、高剂量组及维生素 E对照组淋巴细胞 DNA损伤程度及血浆中 O^6-MeG含量与模型组比较均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1　各组小鼠淋巴细胞 DNA损伤及 O^6-MeG测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组　别	DNA损伤程度 (AU)		O^6-MeG (μmol/L)
	H_2O_2 (0μmol/L)	H_2O_2 (10μmol/L)	
空白对照组	4.78±2.48	305.87±23.65	2.76±0.24
模型组	5.16±2.78	356.74±14.65	2.98±0.27
海兔素低剂量组	4.49±3.56	321.76±16.15	2.54±0.19
中剂量组	3.57±1.36	287.57±20.34[a]	1.36±0.22[a]
高剂量组	3.45±1.78	236.82±18.23[a]	1.51±0.17[a]
维生素 E对照组	3.86±1.75	265.01±18.03[a]	1.86±0.12[a]

注: $n = 10$; 与模型组比较, a$P < 0.05$。

2.2　各组小鼠机体氧化活性测定情况 (表 2)　与空白对照组比较, 模型组动物血红细胞 SOD、GSH-Px活力明显降低, MDA的含量明显升高 ($P < 0.05$), 表明造模成功。与模型组比较, 海兔素各剂量组及维生素 E对照组小鼠血中 MDA的含量均明显降低, 海兔素中剂量组及维生素 E对照组小鼠血中 SOD、GSH-Px活性均明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2　各组小鼠机体抗氧化活性测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组　别	SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)	MDA (nmol/mL)
空白对照组	261.44±19.60	372.58±13.62	10.72±0.44
模型组	223.94±12.78[b]	326.7±14.67[b]	14.15±0.29[b]
海兔组低剂量组	236.75±13.56	334.7±15.14	6.54±0.17[a]
中剂量组	298.56±11.36[a]	403.15±20.03[a]	4.36±0.22[a]
高剂量组	241.73±10.78	336.8±18.72	5.51±0.19[a]
维生素 E对照组	285.62±13.75[a]	387.0±18.10[a]	4.86±0.12[a]

注: $n = 10$; 与模型组比较, a$P < 0.05$; 与空白对照组比较, b$P < 0.05$。

3　讨　论

以往研究证实, D-半乳糖制造的衰老模型在多种器官、组织的形态及心理、生化等多项指标上, 呈现出与自然衰老相似的改变〔7-8〕。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 H_2O_2诱导的 DNA氧化损伤, 发现海兔素中、高剂量组 DNA损伤程度较模型组明显降低, 且与维生素 E对照组无明显差异, 提示海兔素可明显提高衰老模型大鼠 DNA抗氧化损伤的能力。O^6-MeG是 DNA受环境致癌物及各种细胞毒素性物质的甲基化作用而形成的代谢产物〔9〕。O^6-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分子中鸟嘌呤-O^6-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 O^6位的烷化碱基。本实验结果显示, 中、高剂量海兔素能够明显减少 DNA烷化损伤产物 O^6-MeG的生成。海兔素具有一定的抗氧化活性, 与其含有丰富的烯键, 能保护细胞膜和线粒体膜中的不饱和脂肪酸不被氧化, 维持膜的完整性和功能有关。因此, 作为一种新型的海洋活性物质, 海兔素有进一步研究开发价值。

参考文献

〔1〕 Yamamura S, Hirata Y. Structures of aplysin and aplysinol, naturally occurring bromo-compounds [J]. Tetrahedron, 1963, 19: 1485-1496.

〔2〕 Ojika M, Kigoshi H, Yoshida Y, et al. Aplyronine A, a potent antitumor macrolide of marine origin, and the congeners aplyronines B and C: isolation, structures, and bioactivities [J]. Tetrahedron, 2007, 63: 3138-3167.

〔3〕 刘颖, 梁惠, 徐宏伟, 等. 海兔素 S180荷瘤小鼠的抑瘤活性及其免疫作用的实验观察 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(11): 1403-1405.

〔4〕 逄丹, 梁惠, 贺娟, 等. 海藻萜类化合物对酒精暴露大鼠抗氧化作用 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24(4): 464-466.

〔5〕 马爱国, Collins AR, Susan JD, et al. 不同细胞 DNA氧化损伤及自身修复能力的分析 [J]. 癌变·畸变·突变, 1997, 9(3): 138.

〔6〕 杜卫, 梁惠, 张秀诊. 高效毛细管电泳法测定 O^6-甲基鸟嘌呤 [J]. 色谱, 2000, 18(2): 187-188.

〔7〕 张熙, 张葆樽, 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.

〔8〕 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.

〔9〕 章扬培, 季守平, 陈建敏, 等. O^6-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶与肿瘤预见性化疗 [J]. 生理科学进展, 2004, 30(3): 279-282.

收稿日期: 2008-12-15　　(王弈编辑　李贵福校对)

中国公共卫生 CPH