

轮叶党参皂苷对二乙基亚硝胺致肝细胞DNA损伤的保护作用

郑春姬¹, 俞 星^{1,2}, 韩春姬^{1,2,*}

(1. 延边大学医学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学食品研究中心, 吉林 延吉 133002)

摘 要: 目的: 探讨轮叶党参皂苷(*Codonopsis lanceolata* saponin, CLS)对二乙基亚硝胺(DEN)致肝细胞DNA损伤的保护作用, 为开发肝癌化学预防剂提供参考依据。方法: 将50只小鼠随机分为5组: 阴性对照组(每日灌胃蒸馏水10mL/(kg·d)), DEN组(隔日腹腔注射DEN 20mg/kg), CLS高、中、低剂量组(每日分别灌胃CLS 200、100、50mg/(kg·d)), 同时隔日腹腔注射DEN 20mg/kg, 连续给药6周。采用单细胞凝胶电泳技术分别对肝细胞DNA损伤进行分析, 用比色法测定肝组织中丙二醛(MDA)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)活力。结果: CLS对DEN引起小鼠体重质量增长抑制作用没有明显的改善作用。CLS 3个剂量组的彗星尾长、彗星长、尾矩、Olive尾矩及尾DNA百分率均显著低于单纯DEN组($P < 0.05$), 各剂量组DNA损伤程度均低于DEN组($P < 0.05$)。CLS高剂量组肝组织SOD活性明显高于DEN组, CLS高、中剂量组肝组织GSH-Px活性明显高于DEN组($P < 0.01$), CLS 3个剂量组肝组织匀浆中MDA含量均显著低于DEN组($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性减少。结论: 轮叶党参皂苷对DEN致小鼠肝细胞DNA损伤有一定的保护作用。

关键词: 轮叶党参皂苷; 二乙基亚硝胺; 单细胞凝胶电泳; DNA损伤

Protective Effect of *Codonopsis lanceolata* Saponin on DNA Damage in Liver Cells Induced by Diethylnitrosamine

ZHENG Chun-ji¹, YU Xing^{1,2}, HAN Chun-ji^{1,2,*}

(1. Yanbian University Medical College, Yanji 133002, China;

2. Food Research Center, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: Objective: To explore the preventive effect of total saponin (CLS) from *Codonopsis lanceolata* on DNA damage in liver cells induced by diethylnitrosamine (DEN), and provide a reference for chemical prevention of liver cancer. Methods: Fifty mice were randomly divided into five groups including negative control group (intragastric administration of distilled water), DEN group (DEN 20 mg/kg by intraperitoneal injection every other day), and high, middle and low dose groups (CLS 200, 100 mg/(kg·d) and 50 mg/(kg·d) by intragastric administration every day, DEN 20 mg/kg by intraperitoneal injection every other day). The treatments were lasted for 6 weeks. DNA damage of liver cells were analyzed by a single cell gel electrophoresis technique, the content of malondialdehyde (MDA), the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxidodismutase (SOD) in liver tissues were determined by colorimetry. Results: CLS had no significant improvement for mice on the inhibition of body weight. Comet tail length, comet length, tail moment, Olive tail moment and tail DNA (%) of three CLS dose groups were significantly lower than those of DEN group ($P < 0.05$), DNA damage of each CLS dose group was significantly lower than that of DEN group ($P < 0.05$). SOD activity of CLS high dose group was significantly higher than that of DEN group ($P < 0.01$), GSH-Px activities of CLS high and middle groups were significantly higher than that of DEN group ($P < 0.01$), the contents of MDA in three CLS dose groups were significantly lower than that of DEN group in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Conclusion: *Codonopsis lanceolata* saponin has obvious protective effects against DNA damage in mouse liver cells induced by DEN.

Key words: *Codonopsis lanceolata* saponin; diethylnitrosamine; single cell gel electrophoresis (SCGE); DNA damage
中图分类号: R144 文献标志码: A 文章编号: 1002-6630(2013)11-0254-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201311055

收稿日期: 2012-03-15

基金项目: 科技部国际合作专项(2011DFA33470); 吉林省科技厅发展计划项目(200905208)

作者简介: 郑春姬(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子毒理学与保健食品研发。E-mail: zhengchunji85@163.com

*通信作者: 韩春姬(1960—), 女, 教授, 博士, 研究方向为分子毒理学与保健食品研发。E-mail: cjhan@ybu.edu.cn

原发性肝癌成为世界第5个最常见的恶性肿瘤,在人类癌症中占5.6%^[1],也是我国最常见的恶性肿瘤之一。尽管目前对肝癌的主要治疗方法采取手术措施,肝癌死亡率仍很高。因此,研究肝癌发生早期阶段的预防剂是非常必要的,尤其是选用天然无毒的化学预防剂是国内外学者重视的课题。轮叶党参(*Codonopsis lanceolata*)又名山海藻,属于桔梗科党参属植物,广泛分布于中国、韩国、朝鲜、日本等地。轮叶党参主要是作为山野菜食用,未见任何毒副作用。现代药理学研究表明,轮叶党参提取物具有抗氧化、抗衰老、抗突变、抗肿瘤、抗疲劳以及提高机体免疫力等作用^[2-5]。本实验室前期的研究结果表明,轮叶党参提取物具有显著的预防化学性肝损伤的作用^[6-7]。最近的研究结果表明,轮叶党参经活性酵母发酵后,其抗氧化活性明显增强^[8],但有关轮叶党参对化学致癌物二乙基亚硝胺(DEN)的早期肝脏损伤的保护作用尚未见报道。本实验旨在探讨发酵轮叶党参皂苷(*Codonopsis lanceolata* saponin, CLS)对DEN致小鼠肝脏氧化损伤的保护作用,以期能为肝癌化学预防剂的开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

轮叶党参采集自长白山。轮叶党参采用活性酵母发酵,CLS的制备方法同俞星等^[9]的报道。

雄性SPF级KM小鼠50只,体质量20~22g,由延边大学实验动物科提供,在本研究室IVC系统中饲养并进行实验。

DEN 日本半井化学药品株式会社;正常熔点琼脂糖(normal melting point agarose, NMPA)、低熔点琼脂糖(low melting agarose, LMPA) 美国Promega公司;溴化乙啶(ethidium bromide, EB)、二甲亚砜(DMSO)、Triton X-100 美国Sigma公司;超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)试剂盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

DYY-6B型电泳仪 北京市六一仪器厂;CK-43荧光倒置显微镜 日本Olympus公司;DY89-II电动玻璃匀浆机 宁波新芝生物科技股份有限公司;彗星图像分析软件(CASP version 1.2.3b1, 从<http://casplab.com>获取)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及处理

雄性SPF级KM小鼠50只,适应性喂养3d,然后随机分为阴性对照组、单纯DEN组(隔日腹腔注射DEN 20mg/kg)及CLS高、中、低3个剂量组(灌胃剂量200、100、50mg/(kg·d),同时隔日腹腔注射DEN 20mg/kg)。连续6周,每天记录各组体质量变化情况。

1.3.2 制备肝细胞悬液

处死动物后取小鼠肝组织,用冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,剪碎,加少量PBS液,在匀浆器中将组织研碎。200目铜网过滤,1000r/min离心10min,弃上清液。用冰冷PBS液洗涤细胞2次,用冰冷PBS液调整细胞数目为 $10^5 \sim 10^7$ 个/mL。

1.3.3 单细胞凝胶电泳实验

按传统方法^[10]略加修改,用24孔培养板盖取代载玻片,采用两层铺胶法。第1层胶:0.5%正常熔点琼脂糖100μL,待凝固;第2层胶:制备好的细胞混悬液5μL和0.6%低熔点琼脂糖45μL迅速混匀后铺于第1层胶上面,待凝固。铺胶后迅速移入4℃冰箱,使其凝固。在4℃条件下裂解、解旋、电泳、中和,溴化乙啶染色后尽快在荧光显微镜下观察。以上步骤均避光、低温操作,避免额外的DNA损伤。每个样品观察100个细胞,显微摄像拍照,用CASP软件分析彗星图像^[11]。

1.3.4 肝组织中丙二醛(MDA)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)活力含量测定

每只小鼠取200mg左右的肝组织,用冷生理盐水冲洗、拭干、称质量、剪碎,置玻璃匀浆器中,加冷生理盐水,匀浆,制成10%的组织匀浆液,4000r/min离心10min,取上清液待测。SOD、GSH-Px活性及MDA含量测定严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.5 统计学分析

用SPSS17.0软件进行数据分析,体质量变化的比较采用单因素方差分析,组间比较采用LSD-*t*检验,损伤分级的比较采用K-W秩和检验,损伤程度与药物剂量间的相关性采用Kendall等级相关分析方法。

2 结果与分析

2.1 小鼠一般体征的变化

实验组分别腹腔注射DEN,同时灌胃不同浓度的CLS。连续观察6周后,所有受试小鼠活动正常,均未见毛色、饮食、大小便等异常,无死亡发生。

2.2 小鼠体质量增长的变化

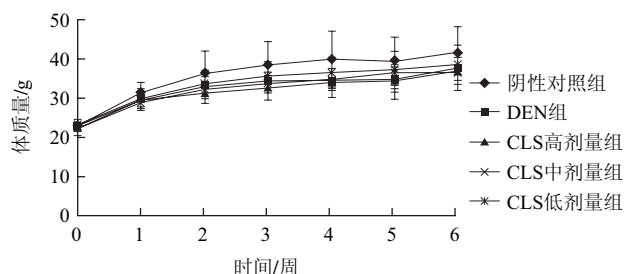


图1 各组小鼠体质量的变化

Fig.1 Change in body weight of mice from different groups

由图1可知,实验第3~5周,单纯DEN组小鼠体质量增长显著低于阴性对照($P<0.05$),CLS高、中、低3个剂量组小鼠体质量增长与DEN组比较,其差异无统计学意义,第6周,所有实验组小鼠体质量无明显差异,表明CLS在DEN引起小鼠体质量增长受抑制过程中,未起到明显的改善作用。

2.3 对DEN致肝细胞DNA损伤的影响

表1 轮叶党参皂苷对DEN诱导小鼠肝细胞DNA损伤的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 1 Effect of CLS on DNA damage induced by DNE in mouse liver ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	尾长/ μm	彗星长/ μm	尾矩	Olive尾矩	尾DNA/%
阴性对照组	12.98 \pm 9.60	98.60 \pm 27.06	1.82 \pm 3.51	3.23 \pm 4.58	7.81 \pm 12.61
DEN组	68.02 \pm 14.10*	148.54 \pm 19.70*	23.06 \pm 16.42*	20.61 \pm 8.82*	32.91 \pm 18.76*
CLS低剂量组	50.85 \pm 12.49 [#]	140.75 \pm 29.68 [#]	14.06 \pm 13.36 [#]	14.44 \pm 9.29 [#]	26.93 \pm 20.23 [#]
CLS中剂量组	48.59 \pm 17.63 [#]	123.89 \pm 24.93 [#]	11.49 \pm 10.19 [#]	12.27 \pm 7.21 [#]	26.95 \pm 20.85 [#]
CLS高剂量组	42.67 \pm 10.04 [#]	117.87 \pm 13.64 [#]	11.65 \pm 9.15 [#]	10.21 \pm 5.58 [#]	21.97 \pm 17.75 [#]

注:*.与阴性对照组比较,有显著性差异($P<0.05$);#.与DEN组比较,有显著性差异($P<0.05$);Δ.与CLS中剂量组比较,有显著性差异($P<0.05$).表2同。

由表1可知,DEN组的彗星实验5个指标(尾长、彗星长、尾矩、Olive尾矩及尾DNA百分率)均显著高于阴性对照组($P<0.05$)。高、中、低3个剂量组的彗星实验5个指标均显著低于单纯DEN组($P<0.05$)。给予CLS的3个剂量组彗星尾长、彗星长及Olive尾矩与CLS存在剂量依赖性,但尾矩和尾DNA含量与给药剂量不呈剂量依赖关系,提示彗星实验中用尾长、彗星长及Olive尾矩3个指标代表DNA损伤程度比尾矩和尾DNA含量指标更为敏感。

表2 各组DNA损伤等级比较
Table 2 Comparison of DNA damage grades in different groups

组别	正常($<20\mu\text{m}$)	I级损伤($20\sim40\mu\text{m}$)	II级损伤($40\sim60\mu\text{m}$)	III级损伤($60\sim80\mu\text{m}$)	IV级损伤($\geq 80\mu\text{m}$)
阴性对照组	70	30	0	0	0
DEN组*	0	0	30	58	12
CLS低剂量组 [#]	0	21	60	15	4
CLS中剂量组 [#]	0	36	32	28	4
CLS高剂量组 [#]	0	42	55	3	0

由表2可知,单纯DEN组DNA损伤等级与阴性对照组比较,有显著性差异($P<0.05$),即DEN组的DNA损伤程度高于阴性对照组。给予CLS的3个组DNA损伤程度均低于DEN组,有显著性差异($P<0.05$),且给予CLS的各剂量组DNA损伤分级以I级和II级为主,单纯DEN组的DNA损伤分级以III级为主,药物剂量与损伤程度间的相关系数 $r=-0.403(P<0.01)$ 。

2.4 SOD、GSH-Px活性和MDA含量变化

由表3可知,DEN组肝组织匀浆中SOD、GSH-Px活性显著低于阴性对照组($P<0.01$);CLS高剂量组肝组织SOD活性明显高于DEN组,CLS高、中剂量组肝组织GSH-Px活性极显著高于DEN组($P<0.01$);并随着药物

浓度的增高,小鼠肝组织匀浆中GSH-Px活性也随之增高。DEN组肝组织匀浆中MDA含量极显著高于阴性对照组($P<0.01$);轮叶党参总皂苷高、中、低3个剂量组肝组织匀浆中MDA含量极显著低于DEN组($P<0.01$),并呈剂量依赖性减少。

表3 各组小鼠肝组织中SOD、GSH-Px活性及MDA含量比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 3 Comparison of SOD, GSH-Px activity and MDA content in liver tissues of mice from different groups ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	SOD活力/(U/mg pro)	MDA含量/(nmol/mg pro)	GSH-Px活力/(U/mg pro)
阴性对照组	80.59 \pm 9.41	1.51 \pm 0.36	9.89 \pm 0.52
DEN组	72.45 \pm 3.19**	2.44 \pm 0.35**	6.72 \pm 0.52**
CLS低剂量组	77.12 \pm 6.47	1.96 \pm 0.21 ^{##}	7.24 \pm 0.54
CLS中剂量组	76.54 \pm 3.93	1.86 \pm 0.37 ^{##}	7.58 \pm 0.64 ^{##}
CLS高剂量组	79.89 \pm 5.71 ^{##}	1.48 \pm 0.27 ^{##}	8.85 \pm 0.82 ^{##}

注:**.与阴性对照组比较,有极显著性差异($P<0.01$);#.与DEN组比较,有极显著性差异($P<0.01$)。

3 讨论

本实验应用改良的单细胞凝胶电泳技术,采用24孔细胞培养板的板盖铺胶,不易脱片,操作简便,速度快,耗材用量少;荧光染色均匀,背景清晰无杂质,彗星图片质量很高。非常适合于大量样本的分析。

本研究结果表明在给予DEN第3~5周,小鼠体质量增长明显低于正常对照组,给予CLS未能改善体质量增长,这可能是本实验中所采用的DEN剂量在诱发肝硬变早期对小鼠毒性比较大,以至于CLS对其体质量的影响不能起到明显的改善作用。但从实验结果中看到,DEN模型组和3个CLS组小鼠体质量在实验第6周时继续呈上升趋势,因此对CLS对DEN染毒小鼠体质量增长的影响有待于今后进一步延长给药时间,观察期长期的效果。

DEN被公认为自然界的强致癌物,且DEN诱发小鼠肝癌模型,其特点为诱癌成功率高,肝细胞所占比例大^[12],且其诱发的肿瘤多为肝细胞癌,与人肝细胞癌相似^[13-14]。DEN诱发大鼠肝癌的过程要经过3个阶段,即肝硬变前期(1~8周)、肝硬变期(8~14周)、癌变期(14~20周)^[15]。本实验结果表明,小鼠给予DEN 20mg/kg连续6周,肝组织抗氧化酶活性显著下降,过氧化物堆积,肝细胞DNA出现明显的损伤,表明以小鼠作为实验模型,6周时出现肝脏损伤的变化。

DEN在肝细胞内通过细胞色素CYP2E1亚型代谢而形成活性氧(ROS),后者对机体产生氧化应激^[16],ROS与有些细胞成分(包括脂质、蛋白、DNA、碳水化合物、硫醇及其他低分子质量抗氧化剂)结合,引起大分子氧化,最终导致病理改变^[17],进入肝癌的启动阶段。在DEN诱发肝癌的早期,如果降低体内过多的自由基水平,可以

抑制或消除肝癌的启动及发展。体内氧自由基的增加可以引起细胞膜脂质过氧化,进而引起细胞核中的DNA受损。MDA作为脂质过氧化终产物,能反映机体内脂质过氧化程度。本研究结果表明,单纯给予DEN的小鼠肝细胞DNA严重受损,而同时给予CLS的各个剂量组DNA损伤程度明显减轻,且呈剂量依赖性,表明在化学致癌物作用于机体的早期使用CLS,可以有效控制致癌物的肝癌启动阶段,进而达到预防肝癌的目的。本研究结果表明,DEN诱发小鼠肝癌的早期肝组织MDA水平显著提高,给予CLS的各个剂量组MDA水平明显低于单纯DEN组,表明CLS在体内通过清除DEN代谢过程中产生的过多的自由基,保护肝细胞DNA受损。

SOD是一种广泛存在于生物体内、具有清除氧自由基的功效,能够平衡机体的氧自由基,避免体内超氧阴离子自由基的过度积累。GSH-Px是一种广泛存在于体内的过氧化物分解酶,能清除体内过多的脂质过氧化物,因此,SOD和GSH-Px在体内协同作用,防止脂质过氧化及其代谢产物对机体的损害。本研究结果表明,给予小鼠腹腔注射DEN的同时给予CLS,高剂量组的SOD和中、高剂量组的GSH-Px活性显著提高,表明CLS保护SOD和GSH-Px两大抗氧化酶,清除由DEN代谢过程中产生的过多的自由基和过氧化物,从而保护了细胞膜的完整性,阻止DNA的损伤。

刘婷婷等^[8]证明发酵轮叶党参乙醇提取物在体外具有很强的清除DPPH自由基能力,其作用强于未发酵轮叶党参, Kim等^[3]证明轮叶党参乙醇提取物和正丁醇提取物在体外实验中具有很强的还原能力、清除DPPH自由基能力,并认为轮叶党参提取物是直接抗氧化剂。因此,推测CLS对DEN诱发小鼠肝细胞DNA损伤的保护作用除了通过保护SOD、GSH-Px酶活性而清除自由基和过氧化物的途径外,还可能通过CLS自身的直接抗氧化和清除自由基作用来实现的。

参考文献:

- [1] BUGIANESI E. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer[J]. Clin Liver Dis, 2007, 11(1): 191-207.
- [2] 韩春姬, 朴永泉. 轮叶党参多糖对小鼠S180肉瘤的抑制作用[J]. 延边大学医学学报, 2000, 23(4): 249-250.
- [3] KIM S H, CHOI H J, CHUNG M J, et al. Antimutagenic and antitumor effects of codonopsis lanceolata extracts[J]. J Korean Soc Food Sci Nutr, 2009, 38(10): 1295-1301.
- [4] 韩春姬, 李莲姬. 轮叶党参水提取液抗突变作用及其机理研究[J]. 预防医学文献信息, 1998, 4(3): 204-205.
- [5] 韩春姬, 李莲姬, 朴惠善, 等. 轮叶党参对老年小鼠益智及抗氧化的作用[J]. 中药材, 1999, 22(3): 136-138.
- [6] 白雪松, 韩春姬, 鲍捷. 复方轮叶党参预防乙醇性肝损伤作用机制研究[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(1): 42-43.
- [7] 张亮, 韩春姬, 李莲姬, 等. 复方轮叶党参对小鼠乙醇性肝损伤的预防作用[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 265-267.
- [8] 刘婷婷, 韩春姬, 俞星. 发酵轮叶党参提取物清除DPPH自由基的作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2011, 37(6): 1087-1089.
- [9] 俞星, 李林, 韩春姬, 等. 轮叶党参总皂苷对HepG-2细胞凋亡的作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2011, 37(6): 1090-1093.
- [10] KAUR R, KAUR S, LATA M. Evaluation of DNA damage in agricultural workers exposed to pesticides using single cell gel electrophoresis (comet) assay[J]. Indian J Hum Genet, 2011, 17(3): 179-187.
- [11] 邢彩虹, 李桂兰, 纪之莹, 等. 单细胞凝胶电泳图像分析软件的比较[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(2): 141-143.
- [12] GHOSH A, GHOSH D, SARKAR S, et al. Anticarcinogenic activity of nanoencapsulated quercetin in combating diethylnitrosamine-induced hepatocarcinoma in rats[J]. Eur J Cancer Prev, 2012, 21(1): 32-41.
- [13] OKUBO H, MORIYAMA M, TANAKA N, et al. Detection of serum and intrahepatic hepatocyte growth factor during DEN-induced carcinogenesis in the rat[J]. Hepatol Res, 2002, 24(4): 385-394.
- [14] 罗明, 贺平, 吴孟超, 等. 苦参碱和氧化苦参碱对二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌的预防阻断作用[J]. 肿瘤防治杂志, 2000, 7(6): 561-563.
- [15] 丁仕义, 蔡金华. 大鼠肝细胞癌模型的建立及MR成像研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(6): 643-645.
- [16] MANDAL A K, DAS S, MITRA M, et al. Vesicular flavonoid in combating diethylnitrosamine induced hepatocarcinoma in rat model[J]. J Exp Ther Oncol, 2008, 7(2): 123-133.
- [17] GHOSH D, CHOUDHURY S T, GHOSH S, et al. Nanocapsulated curcumin: oral chemopreventive formulation against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rat[J]. Chem Biol Interact, 2012, 195(3): 206-214.