

葡萄籽油对镉致大鼠肝脏细胞氧化损伤的保护作用

邹志辉, 杨翠婵, 李伯灵

摘要: [目的] 探讨葡萄籽油(grape seed oil, GSO)对氯化镉(CdCl₂)诱导大鼠肝脏细胞DNA损伤的保护作用。[方法] 将40只SPF级雌雄各半SD大鼠随机分为对照组(腹腔注射生理盐水和灌胃生理盐水)、染镉组(腹腔注射1.0 mg/kg的CdCl₂和灌胃生理盐水)、GSO低、中、高剂量干预组(均腹腔注射1.0 mg/kg CdCl₂, 同时分别灌胃0.66、1.32、2.64 mg/kg GSO), 硫代巴比妥酸法检测肝中丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量, 采用单细胞凝胶电泳技术(SCGE)检测各组肝脏细胞DNA损伤情况。[结果] 1.0 mg/kg CdCl₂可诱导大鼠肝脏细胞合成MDA, 使其含量明显增加并加速DNA的氧化损伤; GSO高剂量干预组中MDA含量较染镉组差异具有统计学意义($P<0.05$), 3个GSO干预组MDA的清除率分别为54.55%、54.55%和100.00%, 不同剂量的GSO对MDA清除呈较好的剂量-效应关系。各GSO干预组DNA氧化损伤较染镉组均明显下降($P<0.05$)。[结论] 一定剂量葡萄籽油可降低大鼠肝脏中MDA含量和镉致DNA氧化损伤, 具有明显的抗脂质过氧化损伤的作用。

关键词: 葡萄籽油; 镉; 肝脏; DNA损伤

Protective Effects of Grape Seed Oil on Oxidative Damage in Rat Liver Cells Exposed to Cadmium
ZOU Zhi-hui, YANG Cui-chan, LI Bo-ling (School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510310, China). Address correspondence to LI Bo-ling, E-mail: liblgz@163.com

Abstract: [Objective] To explore the protective effect of grape seed oil (GSO) on DNA oxidative damage of liver cells in rats exposed to CdCl₂. [Methods] A total of 40 SD rats of SPF grade were randomly divided into 5 groups, which were the control group (intraperitoneal injection and gastric perfusion of normal saline with same volume), the CdCl₂ exposure-positive group (intraperitoneal injection of 1.0 mg/kg CdCl₂ and gastric perfusion of normal saline with the same volume), and the GSO low-, medium- and high-dose intervention groups (intraperitoneal injection of 1.0 mg/kg CdCl₂ and gastric perfusion of 0.66 mg/kg, 1.32 mg/kg, 2.64 mg/kg GSO, respectively) with 8 of either gender in each group. Malondialdehyde (MDA) content in liver was measured by thiobarbituric acid (TBA) method. DNA oxidative damage was measured by single cell gel electrophoresis (SCGE). [Results] The 1.0 mg/kg CdCl₂ induced a significant increase in MDA content and DNA oxidative damage. The difference of MDA contents between the GSO high-dose intervention group and the CdCl₂ exposure-positive group was significant ($P<0.05$). The clearances in the GSO low-, medium- and high-dose intervention groups were 54.55%, 54.55% and 100.00%, respectively. The DNA damage significantly decreased in the GSO intervention groups in a dose-dependent manner, compared with the CdCl₂ exposure-positive group ($P<0.05$). [Conclusion] A certain dose of grape seed oil can induce a decrease in MDA content and DNA damage in rat liver after cadmium exposure.

Key Words: grape seed oil; cadmium; liver; DNA damage

镉(cadmium, Cd)是常见的职业和环境毒害物, 被美国毒物管理委员会(ATSDR)列为第6位危及人体健康的有毒物质。肝脏是镉机体中最主要的蓄积和毒害靶器官之一, 大量文献报道, 镉可诱导肝脏氧化应激产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS), ROS的释放和增加可攻击细胞膜上的不饱和脂肪酸及DNA等分子而导致进一步脂质过氧化损伤^[1-2]。葡萄籽

油(grape seed oil, GSO)富含亚油酸、维生素A、维生素E、多种矿物元素、白藜芦醇、多酚类化合物等, 具有强抗氧化、抑制与清除自由基、刺激细胞分裂与修复损伤等作用^[3]。本项目拟以葡萄籽油为研究对象, 观察GSO对镉致大鼠肝脏细胞DNA损伤的保护作用, 为镉中毒性肝损害的预防和治疗提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及处理

选用体重为(190±10)g的SPF级雄性SD大鼠40只[由广东省实验动物监测所提供, 批号为SCXK(粤)2008-0002], 适应观察一周后, 按体重均衡原则随机分为5组, 每组8只, 具体分组为: 对照组(腹腔注射和灌胃相应量的生理盐水)、染

[基金项目] 广东省中医药局项目“MAPKs信号在葡萄籽原花青素影响DNA损伤中的作用研究”(编号: 2010417)

[作者简介] 邹志辉(1980—), 男, 硕士生, 实验师; 研究方向: 分子流行病学, E-mail: zhzhou1980@163.com

[通信作者] 李伯灵副教授, E-mail: liblgz@163.com

[作者单位] 广东药学院公共卫生学院, 广东 广州 510310

镉组(腹腔注射 1.0 mg/kg 的 CdCl₂ 和灌胃相应剂量生理盐水)、GSO 低、中、高剂量干预组(均腹腔注射 1.0 mg/kg CdCl₂, 同时分别灌胃 0.66、1.32、2.64 mg/kg 的 GSO)。连续染毒 14 d 后断头处死。

1.2 试剂和仪器

分析纯氯化镉(天津福晨化学试剂厂)、葡萄籽油(广州市熊氏化妆品有限公司)、胰蛋白酶(美国 Amresco 公司)、碘化吡啶(美国 Sigma 公司)、正常熔点和低熔点琼脂糖(西班牙 BIOWEST 公司)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

U-3010 型紫外可见分光光度计(日本日立公司)、22R 型台式冷冻离心机(德国 Hettich Mikro 公司)、DU730 型核酸蛋白分析仪(美国 Beckman Culter 公司)、BX51 型荧光生物显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 肝脏脏器系数的测定

解剖取出大鼠肝脏后, 置于预冷生理盐水中轻轻除去表面的凝血及结蒂组织等附属物, 再经预冷生理盐水漂洗几次, 用滤纸吸干脏器表面水份后称重, 称得的肝脏重量除以体重即得其脏器系数。脏器系数计算公式为: 脏器系数(%)=脏器湿重/动物体重×100。

1.4 肝脏细胞中 MDA 含量的测定

断头处死大鼠后取约 0.1 g 肝脏组织, 加入 9 倍体积冷生理盐水在冰浴上充分研磨, 制成 10% 的组织匀浆, 离心(4℃, 4000 r/min, 离心半径 4 cm)10 min, 取上清液备用。应用硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 含量, 测定步骤和计算公式均按照 MDA 测定试剂盒说明书操作。MDA 清除率(%)=(MDA_{染镉组}-MDA_{干预组})/(MDA_{染镉组}-MDA_{干预组})×100。

1.5 单细胞凝胶电泳检测 DNA 氧化损伤

取 0.05 g 肝脏组织剪碎, 加入 100 μL 0.25% 胰酶室温消化 1 min 后, 用含 10% 小牛血清 DMEM 培养液中止消化, 制成单细胞悬液。在磨砂载玻片上铺上 1% 正常熔点琼脂糖 80 μL 作为第 1 层, 常温凝固后去掉盖玻片; 滴加混有 10 μL 细胞悬液的 75 μL 0.8% 低熔点琼脂糖作为第 2 层; 置 4℃ 冰箱 5 min 后, 去掉盖玻片铺 75 μL 1% 正常熔点琼脂糖作为第 3 层。4℃ 冰箱 5 min 后, 去盖玻片, 置预冷的细胞裂解液中[2.5 mol/L NaCl、100 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、10 mmol/L Tris、5% Triton X-100、10% 二甲基亚砜(DMSO)]1 h。取出玻片置于盛有 300 mmol/L NaOH(pH=12) 的水平电泳槽中, 先浸泡 20 min, 使 DNA 双链解螺旋。然后在 25 V、100 mA 条件下电泳 20 min, 电泳后取出玻片, 用 0.4 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=7.5) 中和 3 次, 去掉多余液体, 30 μL 碘化吡啶(30 μg/mL) 染色, 盖上盖玻片, 在配备有 100 W 荧光灯, 激发波长 515~560 nm、抑制波长 590 nm 的荧光显微镜下随机抓取图像, 每个标本观察 100 个细胞。用 IMI 1.0 彗星分析软件逐个分析细胞的尾长、尾分布矩和 Olive 尾矩(olive tail moments, OTM)。

1.6 统计与分析

使用 SAS 9.0 软件进行统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用方差分析, 两组间的比较用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 脏器系数的测量

脏器系数测量结果见表 1, 对照组及 GSO 低、中、高剂量干预组的肝脏重量、脏器系数与染镉组比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠肝脏重量及脏器系数($n=8, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Weight of liver and organ coefficient of rats in each group

组别 Group	剂量(mg/kg) Dose	肝脏湿重(g) Weight of wet liver	脏器系数(%) Organ coefficient
对照组(Control)	0.00	10.84 ± 1.52	4.02 ± 0.29
染镉组(Cadmium)	0.00	11.36 ± 1.66	4.20 ± 0.24
GSO 干预组(GSO intervention)			
低剂量(Low-dose)	0.66	13.01 ± 2.42	4.72 ± 0.53
中剂量(Medium-dose)	1.32	11.98 ± 2.18	4.42 ± 0.39
高剂量(High-dose)	2.64	10.92 ± 1.61	4.23 ± 0.29

2.2 各组肝脏细胞中 MDA 含量

由表 2 可知, 染镉组中 MDA 含量明显高于对照组($P<0.05$); 与染镉组相比, GSO 高剂量干预组中 MDA 含量降低明显($P<0.05$); 不同剂量的 GSO 对 MDA 清除呈一定的剂量-效应关系($r=0.893$)。

表 2 各组肝脏细胞中 MDA 含量($n=8, \bar{x} \pm s$)

Table 2 MDA content in liver cells in each group

组别 Group	剂量(mg/kg) Dose	MDA 含量(nmol/mgProt) MDA content	MDA 清除率(%) MDA clearance
对照组(Control)	0.00	0.06 ± 0.03*	0.00
染镉组(Cadmium)	0.00	0.17 ± 0.36*	0.00
GSO 干预组(GSO intervention)			
低剂量(Low-dose)	0.66	0.11 ± 0.06	54.55
中剂量(Medium-dose)	1.32	0.11 ± 0.06	54.55
高剂量(High-dose)	2.64	0.06 ± 0.04#	100.00

[注]*: 与对照组比较(Compared with the control group), $P<0.05$; #: 与染镉组比较(Compared with the cadmium group), $P<0.05$ 。

2.3 各组肝脏细胞 DNA 损伤情况

染镉组中细胞的尾长、Olive 尾矩、尾分布矩较对照组均明显升高; GSO 低、中、高剂量干预组中 DNA 氧化损伤的 3 个指标均比染镉组明显下降, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 GSO 对镉致大鼠肝脏细胞 DNA 损伤的影响情况($n=40, \bar{x} \pm s$)

Table 3 The effect of GSO on DNA damage in rat liver cells

组别 Group	剂量(mg/kg) Dose	尾长(μm) Tail length	Olive 尾矩 Olive tail moment	尾分布矩 Tail moment
对照组(Control)	0.00	17.9 ± 1.4*	8.4 ± 0.7*	42.4 ± 3.2*
染镉组(Cadmium)	0.00	29.2 ± 1.3	13.6 ± 0.5	46.0 ± 1.8
GSO 干预组(GSO intervention)				
低剂量(Low-dose)	0.66	22.8 ± 1.2#	10.9 ± 0.5#	43.8 ± 0.8#
中剂量(Medium-dose)	1.32	20.4 ± 2.8#	9.4 ± 1.9#	41.3 ± 2.9#
高剂量(High-dose)	2.64	18.1 ± 1.1#	8.4 ± 0.8#	41.3 ± 1.3#

[注]*: 与对照组比较(Compared with the control group), $P<0.05$; #: 与染镉组比较(Compared with the cadmium group), $P<0.05$ 。

3 讨论

脂质过氧化(lipid peroxidation, LPO)是指由环境中有害的物理、化学因素直接或间接诱导产生的, ROS与多不饱和脂肪酸的侧链及核酸等生物大分子发生一系列链式自由基反应, 越来越多的研究证明, 脂质过氧化损伤是镉毒性作用的重要机制之一^[4]。

MDA作为细胞内毒性最大的脂质过氧化产物, 其水平可以反映机体内脂质过氧化反应的程度, 也间接反映出细胞氧化损伤的程度。DNA是细胞中极易发生脂质过氧化损伤的靶标之一, MOURÓN等^[5]曾报道Cd²⁺可通过钙通道进入细胞, 直接与DNA共价结合, 诱导DNA单链或双链断裂、DNA-DNA交联、DNA-蛋白质交联以及碱基修饰等遗传损伤。本研究发现染镉组较对照组中MDA含量显著增加并且DNA出现明显损伤, 由此提示, 1mg/kg CdCl₂可诱导脂质过氧化反应进而造成肝脏细胞DNA损伤, 这与瞿金霞等报道的结果基本一致^[2]。

葡萄籽油由于富含多种维生素、不饱和脂肪酸和多酚类化合物, 大量体外及动物实验研究证实, 其具有较强的抗氧化和抗诱变活性, 是一种很好的氧自由基清除剂和脂质过氧化抑制剂^[6], 李伟等^[7]报道葡萄籽油对四氯化碳诱导肝损伤具有显著的保护作用。本研究采用腹腔镉注射染毒和葡萄籽油灌胃干预的方法, 研究葡萄籽油的抗氧化损伤效果, 结果发现各GSO干预组的MDA清除率分别为54.55%、54.55%和100.00%, 不同剂量GSO对MDA清除效果呈剂量-效应关系, 结合各GSO干预组DNA氧化损伤较染镉组明显降低这一现象, 提示GSO

可能通过清除MDA而阻断镉诱导的脂质过氧化反应, 表明了GSO对镉诱导肝脏细胞脂质过氧化具有明显的保护作用。另外, 实验结果中GSO高剂量干预组中MDA含量已降至对照组水平, MDA清除率达100%, 可为防治镉中毒时确定人服用GSO安全和有效的剂量标准提供参考。

参考文献:

- [1] 安红敏, 郑伟, 高扬. 镉的健康危害及干预治疗研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(9): 739-742.
- [2] 瞿金霞, 冯丫娟, 张照祥, 等. 亚慢性染镉小鼠肝脏抗氧化能力研究[J]. 中国工业医学杂志, 2009, 22(2): 98-100.
- [3] 董海胜, 陈斌. 葡萄籽提取物生理活性及其提取研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(12): 271-277.
- [4] 刘德坚, 马忠元, 梁敬棠. 镉对大鼠肾细胞毒性和脂质过氧化作用的影响[J]. 中国热带医学, 2007, 7(10): 1755-1756.
- [5] MOURÓN S A, GOLIJOW C D, DULOUT F N. DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay[J]. Mutat Res, 2001, 498(1-2): 47-55.
- [6] 郭英, 蔡秀成, 陈秋丽, 等. 葡萄籽提取物的体外抗脂质过氧化作用[J]. 卫生研究, 2002, 31(1): 28-30.
- [7] 李伟, 孙静, 郭英. 葡萄籽提取物对化学性肝损伤的肝功能保护作用[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(1): 42-45.

(收稿日期: 2011-07-20)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 徐新春)

【致谢】

《环境与职业医学》2011年审稿专家名单 (按姓氏拼音字母首字母音序排列)

白 云	陈景元	陈 良	陈卫红	陈 霏	崔留欣	戴俊明	丁钢强	丁锦春	范雪云
傅 华	高林峰	高燕宁	顾友直	郭红卫	郭新彪	韩春姬	胡家瑜	胡天锡	黄建权
黄金祥	黄雨舜	纪之莹	贾 光	贾晓东	江朝强	姜岳明	金泰廙	金锡鹏	金克峙
居丽雯	阚海东	康来仪	匡兴亚	兰 东	雷毅雄	李朝林	李德鸿	李 健	李 杰
李 洁	李来玉	李 敏	李 锐	李思惠	李新建	李燕婷	厉曙光	梁戈玉	梁友信
刘宝英	刘烈刚	刘 扬	卢 伟	鲁文清	陆荣柱	吕 斌	罗春燕	马国云	毛 翱
孟紫强	缪剑影	牛 侨	潘希和	彭娟娟	浦跃朴	单晓梅	单正军	沈 伟	沈孝兵
宋琦如	宋伟民	苏 敏	孙道远	唐春元	田 英	谈建国	童 建	汪国权	王海兰
王劲峰	王 林	王绵珍	王守林	王文静	王 莹	王友洁	王忠旭	王祖兵	吴寰宇
吴立明	吴 庆	吴南翔	吴世达	吴锡南	夏宝凤	夏昭林	肖国兵	肖 萍	谢吉民
徐德祥	徐望红	许慧慧	许正平	薛寿征	薛 迪	严 非	颜崇淮	杨 磊	杨 旭
姚耿东	叶舜华	叶细标	殷浩文	尹立红	尹文强	于云江	余善法	袁 东	袁 晶
翟成凯	詹绍康	张爱华	张春之	张胜年	张天宝	张玉彬	张蕴晖	张正东	张遵真
章敏华	赵根明	赵金垣	赵一鸣	郑钧正	郑频频	郑玉建	郑玉新	仲伟鉴	周 峰
周宜开	周志俊	朱宝立	朱国英	朱素蓉	卓维海	邹昌淇	邹淑蓉		