

沙棘叶水溶性多糖的抗突变作用

李芳亮¹, 高杨², 刘莹¹, 杨新源¹, 王锐¹

(1. 辽宁工程技术大学理学院, 辽宁 阜新 123000; 2. 辽宁省阜新市科技局, 辽宁 阜新 123000)

摘要: 为了研究沙棘叶水溶性多糖(WPHL)的抗突变作用, 本实验通过微核实验、精子畸变实验和彗星实验观察 WPHL 对环磷酰胺(CP)诱发的小鼠骨髓嗜多染红细胞微核、肝细胞 DNA 损伤和精子畸变的抑制作用。结果表明: WPHL 在 50mg/(kg·d)剂量时, 对 CP 诱发的微核($P < 0.05$)和精子畸变($P < 0.05$)有明显的抑制作用, 并可以显著减小肝脏彗星细胞的数量和缩短彗星细胞尾巴的长度($P < 0.05$)。说明有显著的抗突变能力。

关键词: 沙棘叶; 多糖; 抗突变; 微核实验; 彗星实验

Anti-mutagenic Effect of Water-soluble Polysaccharide from *Hippophae rhamnoides* Leaves

LI Fang-liang¹, GAO Yang², LIU Ying¹, YANG Xin-yuan¹, WANG Rui¹

(1. College of Science, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, China;

2. Fuxin Science and Technology Bureau, Fuxin 123000, China)

Abstract: In order to explore the anti-mutagenic effect of water-soluble polysaccharides from *Hippophae rhamnoides* leaves (WPHL), the inhibitory effect of WPHL on bone mouse marrow cell micronuclei, abnormal sperm and hepatic DNA damage induced by cyclophosphamide (CP) was studied. The results show that WPHL at the dose of 50 mg/kg·d significantly inhibited the frequency of micronucleus ($P < 0.05$) and sperm abnormality ($P < 0.05$). In addition, WPHL could also significantly decrease the number and tail length of hepatic comet cells ($P < 0.05$). Therefore, WPHL has anti-mutagenic potential.

Key words: *Hippophae rhamnoides* leaf; polysaccharide; anti-mutation; micronuclei test; comet assay

中图分类号: Q946.91; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)19-0217-03

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)为胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属的灌木或小乔木。沙棘的地理分布很广, 主要分布在欧亚大陆温带地区^[1]。从 20 世纪 50 年代起至今, 国内外学者对沙棘的化学成分及其功效研究表明, 沙棘的根、茎、叶、花、果含有丰富的生物活性成分^[2]。目前对沙棘茶和沙棘叶多糖的研究多集中于水溶性多糖体外抗氧化性能^[3-5], 而对沙棘叶水溶性多糖(water-soluble polysaccharides from *Hippophae rhamnoides* leaves, WPHL)抗突变作用的研究未见报道, 本实验通过微核实验、精子畸变实验和彗星实验(comet assay)对沙棘叶水溶性多糖的抗突变作用进行了研究, 为开发新的功能性食品和天然抗突变剂, 更合理利用沙棘资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沙棘叶于 2009 年 10 月份采于辽宁省阜新市阜新蒙古族自治县阜新镇同乃北沟。

昆明种小鼠, 体质量为(25 ± 2)g, 购于中国医科大实验动物中心; 环磷酰胺(CP) 德国 Fluka 公司; 其他化学试剂均为国产化学纯。

1.2 仪器与设备

Scientz-12N 型冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司; XSZ-4G 型显微镜 北京联合科仪科技有限公司; XSZ-HY1 型荧光显微镜 重庆麦克光电有限公司。

1.3 方法

1.3.1 沙棘叶水溶性多糖(WPHL)的制备

取 100g 沙棘叶, 粉碎, 加入 2000mL 蒸馏水, 于 80℃ 水浴中浸提 2h, 提取 3 次, 过滤后合并滤液, 用旋转蒸发仪浓缩至 200mL, 采用木瓜蛋白酶-Sevag 法联合去蛋白^[6], 浓缩至 100mL, 加入无水乙醇使其终体积分数为 80%, 离心, 所得沉淀依次用无水乙醇离心洗涤 3 次, 重新溶解于 100mL 蒸馏水, 透析后, 冷冻干燥得 WPHL。取 1g WPHL 重新溶解于 100mL 蒸馏水中, 稀释 10 倍后备用, 采用硫酸蒽酮法^[7], 以葡萄糖为标准品测得 WPHL 糖含量为 84%。

收稿日期: 2011-01-16

基金项目: 辽宁工程技术大学优秀青年科学研究基金项目(07-127)

作者简介: 李芳亮(1974—), 男, 讲师, 硕士, 主要从事生物活性多糖研究。E-mail: asdzxxx@126.com

1.3.2 小鼠骨髓细胞微核实验^[8-9]

饲养温度 18~22℃, 自然光照, 动物自由采食和饮水。实验前将 50 只小鼠在实验环境下适应饲养 3d。按性别随机分成 5 组(每组 10 只, 雌雄各半): WPHL 低剂量组(50mg/(kg·d))、中剂量组(100mg/(kg·d))、高剂量组(200mg/(kg·d))和对照组、模型组。低、中、高剂量组, 经口灌胃给, 连续 10d; 对照组和模型组以等体积生理盐水代替 WPHL。第 9 天时模型组和低、中、高剂量组腹腔注射 CP40mg/kg, 24h 后重复一次, 6h 后处死动物。按常规法取股骨骨髓制片, 固定, 染色, 镜检。每只动物观察 1000 个嗜多染红细胞, 计数含微核的细胞数, 并计算微核率 P_M 和微核抑制率 P_I 。

$$P_M/\% = \frac{N_M}{N_{PCE}} \times 1000 \quad (1)$$

$$P_I/\% = \frac{N_{CM} - N_{WM}}{N_{CM} - N_{BM}} \times 100 \quad (2)$$

式中: N_{PCE} 为嗜多染红细胞数目; N_M 为微核细胞数目; N_{CM} 为模型组含有微核细胞数目; N_{WM} 为低、中、高剂量组含有微核细胞数目; N_{BM} 为对照组含有微核细胞数目。

1.3.3 CP 诱导小鼠肝脏 DNA 损伤的彗星实验^[10-11]

将微核实验中的小鼠处死后取出股骨的同时取出肝脏, 制备肝细胞单细胞悬液。0.4% 吖吩蓝染色 2~3min, 镜检活细胞比例 > 95%, 单细胞浓度为 4.0×10^5 个/mL。

在载玻片上浇注一层 0.1% 的常熔点琼脂糖, 迅速加盖玻片置 4℃ 环境中使琼脂糖固化, 这一层是为了使第二层平整和紧密地附着。移去盖玻片, 将 25 μ L 细胞悬液(约含 1000 个细胞)与 50 μ L 1% 的低熔点琼脂糖在 37℃ 混匀, 迅速滴加到第一层琼脂糖上, 加上盖玻片使其均匀铺开, 置 4℃ 中使固化, 移去盖玻片, 再加一层常熔点琼脂糖, 迅速加盖玻片置 4℃ 中使琼脂糖固化, 每个样制备 4 个载玻片。取下盖玻片后将载玻片放入预冷的细胞裂解液(2.5mol/L NaCl、0.1mol/L Na₂-EDTA、0.1mol/L Tris, 500 μ L 体积分数为 10% 二甲基亚砜(DMSO)、1% TritonX-100)中裂解 80min。取出载玻片, 经过 0.4mol/L Tris 缓冲液漂洗, 置于新鲜配制的 4℃ 电泳液中(0.3mol/L NaOH、0.01mol/L Na₂-EDTA、pH13), 于电泳槽内解旋 30min, 16V, 180mA 电泳 30min。取出载玻片用 4℃、0.4mol/L Tris-HCl pH7.5 浸泡 15min, 以中和电泳液的碱性。然后用甲醇固定 10min, 吸干固定液, 滴加 15 μ g/mL 溴化乙锭 15 μ L, 于暗室染色 15min。加盖玻片后, 采用荧光显微镜, 使用 260nm 波长的紫外光作为激发光, 放大倍数为 200 倍, 每张玻片随机选取 25 个细胞观察, 正常细胞核呈圆形, 发出荧光, 损伤细胞 DNA 的裂片向阳极迁移, 呈现拖尾现象, 计为

彗星细胞。数出彗星细胞数, 用目镜测微尺测量每个观察细胞的头长、全长, 得到彗星尾长(即 DNA 迁移长度, L_M)。统计彗星细胞率(P_C)。

$$P_C/\% = \frac{\text{彗星细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.3 小鼠睾丸染色体畸变实验^[12]

将 50 只健康雄性小鼠随机分为 5 组: WPHL 低剂量组 50mg/(kg·d) + CP40mg/(kg·d); WPHL 中剂量组 100mg/(kg·d) + CP40mg/(kg·d); WPHL 高剂量组 200mg/(kg·d) + CP40mg/(kg·d); 对照组(生理盐水); 模型组(生理盐水 + CP40mg/(kg·d)); 每组 10 只, CP 腹腔注射, 多糖经口灌胃, 连续 5d。低、中、高剂量组腹腔注射 CP 和经口给予多糖同时进行, 首次给药 35d 后处死动物, 后取双侧睾丸, 去被膜分离曲精细管, 取精子, 固定, 伊红染色, 镜检, 每只动物观察 1000 个精子, 计算精子畸形率(P_{sd})。

$$P_{sd}/\% = \frac{N_{as}}{N_s} \times 100 \quad (4)$$

式中: N_{as} 为畸变的精子数; N_s 为精子总数。

2 结果与分析

2.1 WPHL 对 CP 诱发小鼠骨髓细胞微核的影响

表 1 WPHL 对 CP 诱发的小鼠骨髓细胞微核率的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of WPHL on micronucleus rate of mouse bone marrow cells induced by CP

组别	WPHL 剂量 / (mg/(kg·d))	N_{PCE} / 个	N_M / 个	$P_M/\%$	$P_I/\%$
对照组	0	10^4	20	$2.0 \pm 1.6^{**}$	
模型组	0	10^4	249	24.9 ± 1.7	
WPHL 组	低剂量	10^4	207	$20.7 \pm 2.0^*$	16.9
	中剂量	10^4	156	$15.6 \pm 1.8^{**}$	39.6
	高剂量	10^4	102	$10.2 \pm 0.8^{**}$	63.6

注: N_{PCE} 嗜多染红细胞数; N_M 含微核的细胞数; P_M 微核率; P_I 微核抑制率。* 与模型组相比, 有显著性差异($P < 0.05$); ** 与模型组相比有极显著性差异($P < 0.01$)。下同。

从表 1 可知, 对照组的微核率与模型组比较存在极显著差异($P < 0.01$), 说明 CP 能够诱发小鼠骨髓嗜多染红细胞出现微核; 与模型组的微核率比较, 低剂量组差异显著($P < 0.05$), 而中、高剂量组差异非常显著($P < 0.01$); WPHL 低、中、高 3 个剂量组对 CP 诱发的微核抑制率分别为 16.9%、39.6% 和 63.6%。结果表明, WPHL 经口服可抑制 CP 对小鼠骨髓细胞的致突变作用, 并且存在着一定的量效关系。

2.2 WPHL 对 CP 诱发小鼠肝脏 DNA 损伤的影响

表 2 WPHL 对 CP 诱发小鼠肝脏细胞 DNA 损伤的影响($n = 10$)
Table 2 Effect of WPHL on DNA damage of mouse hepatic cells induced by CP($n = 10$)

组别	WPHL 剂量 / (mg/(kg · d))	N_L / 个	P_c %	L_M / μ m
对照组	0	10^4	2	$1 \pm 0.8^{**}$
模型组	0	10^4	43.4	30.5 ± 1.8
WPHL 组	低剂量 50	10^4	35.6	$26.1 \pm 2.3^*$
	中剂量 100	10^4	26.2	$20.7 \pm 1.9^{**}$
	高剂量 200	10^4	10.5	$7.4 \pm 1.3^{**}$

注: N_L , 肝细胞数; L_M , 彗星尾长度; P_c , 彗星细胞率。

由表 2 可知, 对照组与模型组相比彗星尾长存在极显著差异($P < 0.01$), 说明 CP 对肝细胞的 DNA 造成严重损伤。与模型组的彗星尾长相比, WPHL 低剂量组差异显著($P < 0.05$), 而 WPHL 中、高剂量组差异非常显著($P < 0.01$)。说明 WPHL 对环磷酰胺造成肝细胞 DNA 的损伤具有抑制作用, 能够明显降低彗星细胞率和彗星尾长。而且彗星细胞率、DNA 迁移长度与 WPHL 浓度有关。

2.3 WPHL 对 CP 诱发的小鼠精子畸形率的影响

表 3 WPHL 对 CP 诱发小鼠精子畸形率的影响($n = 10$)
Table 3 Effect of on mouse sperm abnormality induced by CP($n = 10$)

组别	WPHL 剂量 / (mg/(kg · d))	N_s / 个	N_{sd} / 个	P_{sd} %
对照组	0	10^4	253	$2.53 \pm 0.82^{**}$
模型组	0	10^4	565	5.65 ± 0.61
WPHL 组	低剂量 50	10^4	376	$3.76 \pm 0.55^*$
	中剂量 100	10^4	285	$2.85 \pm 0.42^{**}$
	高剂量 200	10^4	198	$1.98 \pm 0.48^{**}$

注: N_s , 精子细胞数目; N_{sd} , 精子细胞的畸形数; P_{sd} , 精子细胞畸形率。

由表 3 可知, 模型组与对照组相比差异极显著($P < 0.01$), 说明 CP 可以使小鼠精子细胞的畸形率明显上升。与模型组的精子细胞畸形率相比, WPHL 低剂量组差异显著($P < 0.05$), 而 WPHL 中、高剂量组差异极显著($P < 0.01$); 说明灌胃可以明显抑制由 CP 诱发的精子畸形, 且剂量与精子畸形率之间存在着剂量效应关系。

3 讨 论

小鼠骨髓细胞微核是反映体细胞接触致突变物和致癌物的遗传毒性的敏感指标^[8-9]; 精子畸形实验可用于检测环境因子在体内对生殖细胞的致突变作用, 小鼠精子畸形是反映生殖细胞 DNA 损伤的敏感指标^[8-9]。本研究发现, WPHL 剂量为 50mg/(kg · d) 时对 CP 诱发的小鼠骨髓细胞微核发生率和小鼠精子畸形率有明显的抑制作用($P < 0.05$)。说明 WPHL 对体细胞和生殖细胞接触致突变物和致癌物的遗传毒性有抑制作用。

单细胞凝胶电泳(single cell gel-electrophoresis, SCGE) 技术, 又称为彗星实验。当各种内源性和外源

性 DNA 损伤因子诱发细胞 DNA 链断裂时, 在彗星实验中损伤的 DNA 断链及片段形成彗星尾巴, 而未损伤的 DNA 部分保持球形。在一定条件下, DNA 迁移距离(彗星尾长)与 DNA 损伤程度呈线性相关。因此, 通过测定 DNA 迁移长度可定量测定 DNA 损伤程度^[11-15]。实验结果显示, 在 WPHL 灌胃剂量为 50mg/kg 时可以明显缩短彗星细胞尾巴的长度, 对 CP 诱导的 DNA 损伤有明显的抑制作用。CP 诱变的实质是其代谢产物对 DNA 分子的氧化损伤, CP 这种作用与 $\cdot OH$ 对 DNA 的损伤作用类似; DNA 损伤可以引起精子畸变和微核形成^[16]; 说明 WPHL 抑制 CP 诱导的小鼠骨髓细胞微核的形成和小鼠精子的畸变可能是通过抑制 DNA 损伤实现的。刘春兰等^[5]研究表明沙棘叶多糖对 $\cdot OH$ 的清除能力也相当强, 且都存在一定的量效关系。由此推测 WPHL 抗 CP 诱变作用可能与其抗氧化作用有关, 这种关系是否存在尚待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 杨建华, 刘丹赤, 邵长明. 沙棘研究与开发的进展[J]. 沙棘, 2007, 20(3): 19-21.
- [2] SRIVASTAVA R, KULSHRESHTHA D K. Bioactive polysaccharides from plants[J]. Phytochemistry, 1989, 28(11): 2877-2833.
- [3] 李芳亮, 王锐, 张红梅. 沙棘茶水溶性多糖抗氧化活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(4): 671-673.
- [4] 刘海青, 刘春兰, 杨万政. 沙棘叶水溶性多糖的提取及分离纯化[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2005, 24(4): 327-329.
- [5] 刘春兰, 刘海青, 邓义红, 等. 沙棘叶水溶性多糖的分离纯化及体外清除自由基活性研究[J]. 中药材, 2006(2): 151-154.
- [6] 梁亦龙, 阎光凡, 舒坤贤, 等. 山药水溶性多糖的提取及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(11): 1-3.
- [7] 张惟杰. 糖复合物生化技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 12-14.
- [8] 郑克岩, 张洁, 林相友, 等. 松杉灵芝多糖的抗突变作用[J]. 吉林大学学报: 理学版, 2005, 43(2): 235-237.
- [9] 余杰, 许肇成, 颜璐璐, 等. 海萝多糖抗突变与抗肿瘤作用的研究[J]. 汕头大学学报: 自然科学版, 2007, 22(2): 59-63.
- [10] 孙亦阳, 杨兆芬, 谢继锋, 等. 采用 SCGE 和 SCE 分析法研究姬松茸菌体多糖(Ab-Mp)对 DNA 损伤的抑制作用[J]. 生物学杂志, 2006, 23(5): 34-36.
- [11] McKELVEY-MARTIN V J, GREEN M H L, SCHMEZER P, et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review[J]. Mutat Res, 1993, 288(1): 47-63.
- [12] TICEI R R, AGURELL E, ANDERSON D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2000, 35(3): 206-221.
- [13] ASHBY J, TINWELL H, LEFEVRE P A, et al. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment[J]. Mutagenesis, 1995, 10(2): 85-90.
- [14] MALYAPA R S, BI C, AHERN E W, et al. Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation[J]. Radiation Research, 1998, 149: 396-400.
- [15] 巴华杰, 林子清, 陈建旭, 等. SCGE 技术的发展及其在法医学中的应用[J]. 广东公安科技, 2006, 81(4): 31-33.
- [16] 陈美珍, 余杰, 龙梓洁, 等. 龙须菜多糖抗突变和清除自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 219-222.