

- 中医骨伤科杂志, 2004, 12(4): 16-20.
- [8] 章建华, 章 权, 朱 希, 等. 健膝壮骨方对大鼠骨性关节炎软骨细胞凋亡及其调控基因 P53、Bcl-2 表达作用的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(11): 2437-2439.
- [9] 邹 季. 骨折愈合实验研究中动物模型选择的有关问题[J]. 湖北中医学院学报, 2002, 4(2): 25-27.
- [10] 聂 林. 骨关节炎的动物模型[J]. 中华实验外科杂志, 1990, 7(2): 96-97.
- [11] 方 忠, 李 锋, 杨 琴, 等. 特异性 COX-2 抑制剂对骨性关节炎的软骨保护作用的临床对照研究[J]. 实用医学进修杂志, 2005, 33(4): 222-227.
- [12] 段 戡, 袁长深, 姚弘毅, 等. 化淤祛湿法对膝关节炎早期诱导型一氧化氮合酶炎症途径影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 3-4.
- [13] 张铁锋, 李景峰. 细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 在骨关节炎软骨中 mRNA 表达的变化及意义[J]. 中国现代医生, 2008, 46(15): 116-117.
- [14] 季卫锋, 施伟峰, 陈 林, 等. 补肾活血法防治大鼠膝骨性关节炎的实验研究[J]. 中国骨伤, 2012, 25(3): 246-250.

12 β -羟基藜芦酰棋盘花胺对小鼠小脑和大脑皮层组织 DNA 损伤的影响

郭敬功¹, 李 林², 刘迎滑³, 王江英², 李沙沙², 沈 姗², 魏晓利³, 丛 悦^{2*}, 王天晓^{3**}

(1. 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004; 2. 河南大学药学院药物研究所, 河南 开封 475004; 3. 河南大学药学院中药研究所, 河南 开封 475004)

摘要: 目的 探讨 12 β -羟基藜芦酰棋盘花胺 (12 β -hydroxylveratroylzygadenine, Vog) 引起小鼠小脑和大脑皮层组织 DNA 损伤的影响。方法 取 132 只雄性昆明种小鼠, 随机分为空白组, Vog 高 (2.50 μ mol/kg)、低剂量组 (0.25 μ mol/kg), 给药 7 d。采用彗星实验检测小脑和大脑皮层 DNA 损伤及修复情况; 酶联免疫法检测 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG)、醌氧化还原酶 (NQO1) 含量; 比色法测定小脑和大脑皮层活性氧自由基 (ROS)、丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 含量和总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力; RT-PCR 检测小脑和大脑皮层 8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶 (*Ogg1*) 和血红素加氧酶-1 (*Ho-1*) mRNA 表达。结果 Vog 明显提高小鼠小脑和大脑皮层 MDA、ROS、NO 以及尿液中 8-OHdG 含量, 降低 GSH-Px 和 T-SOD 活力, 以及 NQO1 含量, 上调 *Ogg1* 表达。停药后第 3 天 DNA 修复接近正常水平, 8-OHdG 含量接近正常水平。结论 Vog 可能引起氧化应激, 导致 DNA 损伤。Vog 同时上调 *Ogg1* 表达, 为抗氧化防御状态和 DNA 修复系统的代偿性调节。

关键词: 12 β -羟基藜芦酰棋盘花胺; DNA 损伤; 氧化应激; DNA 修复

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)08-1668-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.002

DNA damage of 12 β -hydroxylveratroylzygadenine to cerebellum and cerebral cortex of mice

GUO Jing-gong¹, LI Lin², LIU Ying-hua³, WANG Jiang-ying², LI Sha-sha², SHEN Shan², WEI Xiao-li³, CONG Yue^{2*}, WANG Tian-xiao^{3**}

(1. School of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Institute of Pharmacy, Pharmaceutical College, Henan University, Kaifeng 475004, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, Pharmaceutical College, Henan University, Kaifeng 475004, China)

ABSTRACT: AIM To investigate DNA damage of 12 β -hydroxylveratroylzygadenine (Vog) to mouse cerebellum

收稿日期: 2016-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21102035); 河南省科技厅基础研究项目 (142300410128); 河南省教育厅自然科学基金项目 (14A180030)

作者简介: 郭敬功 (1982—), 男, 博士生, 从事生物学研究。Tel: (0371) 22857224, E-mail: jgguo@henu.edu.cn

* 通信作者: 丛 悦 (1978—), 女, 副教授, 从事中药药效物质基础研究。Tel: (0371) 23880680, E-mail: congyue1027@163.com

王天晓 (1975—), 女, 教授, 从事中药药理研究。Tel: (0371) 23880680, E-mail: wtx1975@126.com

and cerebral cortex. **METHODS** One hundred and thirty-two male mice were randomly divided into the control group, Vog high- (2.50 $\mu\text{mol/kg}$) and Vog low-dose groups (0.25 $\mu\text{mol/kg}$). Comet assay was used to detect DNA damage and repair of mouse cerebellum and cerebral cortex. Their levels of 8-hydroxy- deoxyguanosine (8-OHdG) and quinone oxidoreductase (NQO1) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The colorimetry was applied to measuring reactive oxygen species (ROS), methane dicarboxylic aldehyde (MDA), nitric oxide (NO), total superoxide dismutase (T-SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px). RT-PCR was performed to examine the levels of 8-hydroxyl-guanine DNA glycosylase (*Ogg1*) and hemeoxygenase-1 (*Ho-1*) mRNA. **RESULTS** Vog could significantly increase the levels of MDA, ROS, NO and 8-OHdG; reduce NQO1 level and the vitality of GSH-Px and T-SOD; and increase *Ogg1* mRNA expressions in mouse cerebellum and cerebral cortex. Meanwhile, DNA damage was repaired and the content of 8-OHdG was restored close to the normal level on the third day after Vog withdrawn. **CONCLUSION** Vog may cause oxidative stress and consequently lead to DNA damage; at the same time it also raises the expression of *Ogg1* mRNA as a compensatory adjustment to the antioxidant defense status and DNA repair systems.

KEY WORDS: 12 β -hydroxylveratroylzygadenine; DNA damage; oxidative stress; DNA repair

神经细胞 DNA 损伤是神经毒性研究领域的一个重要方向。神经细胞 DNA 损伤因素有自身因素、物理因素和化学因素,均导致体内 DNA 结构改变。氧化应激是组织细胞 DNA 损伤的重要因素之一^[1]。当 DNA 损伤发生时,细胞通过一系列应答反应,如细胞周期停滞、DNA 修复、细胞凋亡等,以维持基因组的稳定性。然而脑组织 DNA 修复能力低,所以 DNA 修复系统缺陷导致 DNA 损伤的积累,最终导致神经变性即神经毒性^[2-5]。藜芦为百合科藜芦 (*Veratrum nigrum* L.) 植物,其根和根茎入药,味苦,辛,性寒,大毒,具有催吐、祛风痰、杀虫疗疮的功效,治疗中风、癫痫、疥癣秃疮、喉痹症、痰涎涌盛、高血压等疾病^[6]。前期研究证实藜芦生物碱是藜芦引起神经 DNA 损伤的主要毒性成分^[7]。12 β -羟基藜芦酰棋盘花胺 (12 β -hydroxyl-veratroylzygadenine, Vog) 是从藜芦中提取分离的一种甾体生物碱类成分^[8]。研究表明 Vog 能显著引起小鼠小脑和大脑皮层的 DNA 损伤,并呈剂量依赖性^[9]。但目前关于 Vog 对小鼠小脑和大脑皮层的 DNA 损伤与修复效应的文献报道较少。本研究以雄性昆明种小鼠为研究对象,从氧化应激角度,观察 Vog 对小鼠小脑和大脑皮层 DNA 损伤的影响,以 *Ogg1* 和 *Ho-1* 的 mRNA 表达水平来评价 DNA 修复活性和氧化应激防御状态。将有助于揭示其神经毒性的作用机理,对藜芦的减毒和毒效关系研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性昆明种小鼠及普通饲料均购于郑州大学实验动物中心,小鼠体质量 22 ~

25 g, SPF 级,许可证号: SCXK (豫) 2010-0002。

1.2 药物与试剂 Vog 的纯度 $\geq 98\%$, 由本实验室制备^[8], 分子式为 $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{NO}_{11}$, 相对分子质量为 673.346 2。8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 检测试剂盒购于上海西唐生物科技有限公司。丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、活性氧族 (ROS)、一氧化氮 (NO) 及醌氧化还原酶 (NQO1) 检测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶 (*Ogg1*) 和血红素加氧酶-1 (*Ho-1*) RT-PCR 试剂盒购于北京全式金生物公司。

1.3 分组及给药 取雄性昆明种小鼠 132 只, 普通饲料适应性喂养 1 周后, 随机分为空白组 (52 只)、Vog 低剂量组 (0.25 $\mu\text{mol/kg}$, 28 只)、Vog 高剂量组 (2.50 $\mu\text{mol/kg}$, 52 只)。每组根据测试生化指标数, 空白组分为 13 组, 低剂量组分为 7 组, 高剂量组分为 13 组, 每组 4 只。Vog 用 0.05% 二甲基亚砜 (DMSO) 双蒸水溶解, 灌胃给药, 连续给药 7 d; 空白组灌胃给予等体积 0.05% DMSO 双蒸水。所有小鼠实验期间自由进食、饮水。

1.4 小鼠小脑和大脑皮层 DNA 损伤修复 分别在末次给药后 1 h、停药第 1 天、停药第 3 天、停药第 7 天, 断头取小鼠小脑和大脑皮层。采用彗星实验, 检测 DNA 损伤修复情况, 具体实验方法参考文献^[7, 10]。

1.5 小鼠尿液中 8-OHdG 含有量的检测 小鼠放入代谢笼, 分别在末次给药后 1 h、停药第 1 天、停药第 3 天、停药第 7 天, 收集 16 h 尿液 (空腹

状态), 3 000 r/min 离心 20 min。取上清液, 按照试剂盒说明进行处理, 以 450 nm 波长测其吸光度, 计算其 8-OHdG 的含有量。

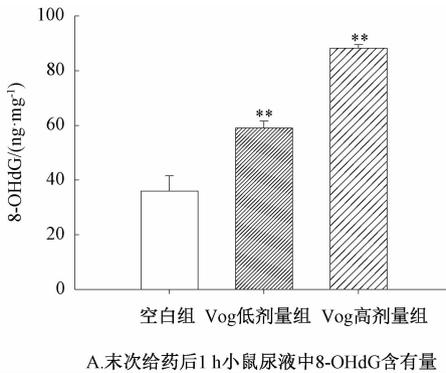
1.6 小鼠小脑及大脑皮层标本采集 于末次给药后 1 h, 断头取小脑和大脑皮层组织, 按质量 (g) : 体积 (mL) = 1 : 9 的比例加入生理盐水, 冰水浴条件下匀浆, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 严格按照试剂盒说明, 测定小脑和大脑皮层组织的 MDA、NO、ROS、NQO1、GSH-Px、T-SOD 活性等生化指标。

1.7 小鼠小脑及大脑皮层 *Ogg1* 和 *Ho-1* mRNA 水平检测 于末次给药后 1 h, 取小鼠大脑皮层和小脑组织 50 ~ 100 mg 剪碎, Trizol 法提取总 RNA, 然后采用 EasyScript Two-Step RT-PCR SuperMix 法进行逆转录和 PCR, 所得产物用含终质量浓度 1 μg/mL 溴乙啶的 1.0% 琼脂糖凝胶做电泳检测, 用凝胶成像分析系统检测结果, 并用 GelAnalyzer 2010 分析软件分析结果。

1.8 统计学处理 所有数据采用 SPSS 17.0 应用软件进行统计学分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 判断总体显著性差异, 组间比较采用 *t* 检验方法, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 Vog 引起小鼠小脑和大脑皮层 DNA 损伤及自身修复 如图 1 所示, Vog 高剂量组显著引起小鼠小脑和大脑皮层 DNA 损伤 ($P < 0.01$); 高剂量组



A. 末次给药后 1 h 小鼠尿液中 8-OHdG 含有量

在停药第 1 天仍可以显著引起小鼠小脑和大脑皮层 DNA 损伤 ($P < 0.01$), 而在停药后的第 3、7 天, Vog 引起的小脑和大脑皮层 DNA 损伤不显著, 即修复接近正常水平, 与空白对照组比较无差异 ($P > 0.05$)。

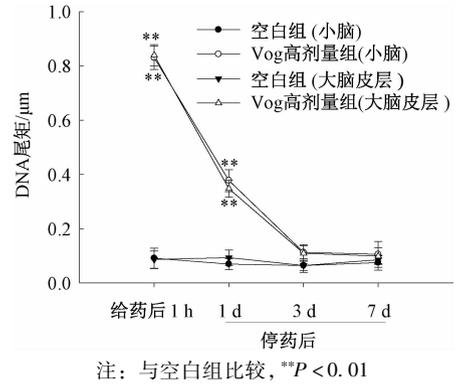
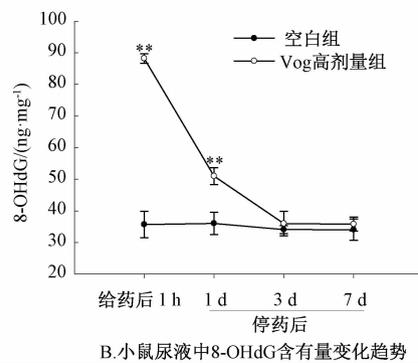


图 1 Vog 对小鼠小脑和大脑皮层 DNA 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effects of Vog on brain cells DNA in cerebellum and cerebral cortex of mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.2 Vog 对小鼠尿液中 8-OHdG 含有量的影响 如图 2A 所示, 与空白组比较, Vog 低、高剂量组小鼠尿液中 8-OHdG 含有量显著升高 ($P < 0.01$)。如图 2B 所示, Vog 高剂量组在停药第 1 天, 8-OHdG 含有量仍较高, 与空白组比较, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 而在停药第 3 天, 8-OHdG 含有量接近正常水平, 与空白对照组比较无差异 ($P > 0.05$)。



B. 小鼠尿液中 8-OHdG 含有量变化趋势

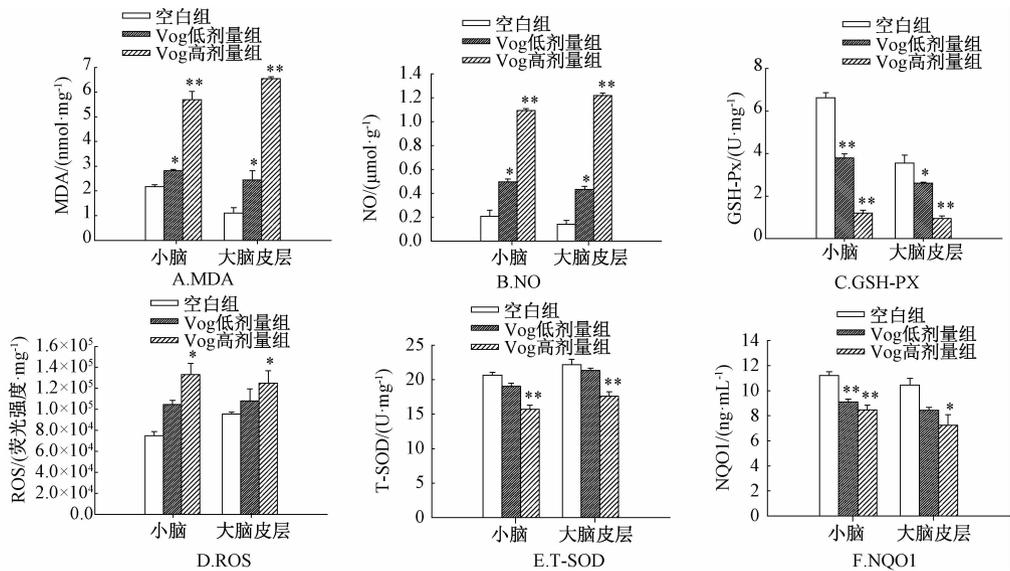
注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$

图 2 Vog 对小鼠尿液中 8-OHdG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Effects of Vog on 8-OHdG concentrations in urine of mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.3 Vog 对小鼠小脑和大脑皮层 MDA、NO、ROS、GSH-Px、T-SOD、NQO1 生化指标的影响 与空白组比较, Vog 低、高剂量组小鼠小脑和大脑皮层的 MDA 和 NO 含有量显著升高, GSH-Px 活力显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。Vog 高剂量组小

鼠小脑和大脑皮层 ROS 含有量显著升高而 T-SOD 活力显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。Vog 低、高剂量组小鼠小脑和高剂量组大脑皮层的 NQO1 含有量显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3。



注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图3 Vog对小鼠小脑和大脑皮层MDA、NO、ROS、GSH-Px、T-SOD、NQO1的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

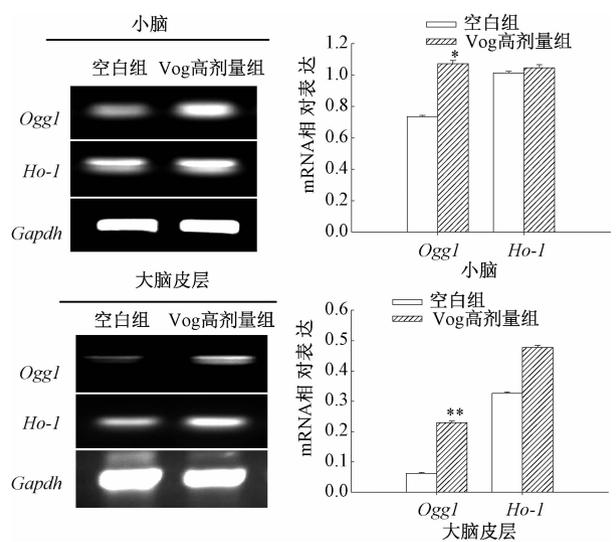
Fig. 3 Effects of Vog administration on MDA, NO, ROS, GSH-Px, T-SOD, NQO1 in cerebellum and cerebral cortex of mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.4 Vog对小鼠小脑和大脑皮层*Ho-1*和*Ogg1* mRNA表达的影响 RT-PCR结果显示，与空白组比较，Vog高剂量组小鼠小脑和大脑皮层中*Ogg1* mRNA表达增加，有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)，而Vog高剂量组小鼠小脑和大脑皮层中*Ho-1*的mRNA表达有增加趋势，但没有统计学差异 ($P > 0.05$)，见图4。

3 讨论

氧化应激是组织细胞DNA损伤的重要因素之一，中枢神经细胞是极为活跃的细胞，神经细胞膜过多的多不饱和脂肪酸和低氧防御系统使得脑组织易于受到氧化损伤。毒性药物主要通过引起氧化应激反应损伤神经细胞DNA，导致DNA碱基烷基化、碱基脱落、断裂、交联。细胞具有一整套抗氧化防御机制和DNA修复系统以抵制自由基的损伤作用和处理未被清除的自由基。ROS和NO是脑组织氧化应激的重要源头，并容易发生细胞膜脂质过氧化，产生小分子MDA，这些均可对DNA造成损伤，而机体的抗氧化酶体系包括GSH-Px、T-SOD、NQO1等可以清除这些自由基和过氧化物。

前期研究发现Vog高、低剂量均引起小鼠大脑皮层和小脑DNA的显著性损伤^[9]。所以本实验从氧化应激角度研究Vog引起小鼠大脑皮层和小脑组织DNA损伤效应。研究结果显示，Vog引起小鼠大脑皮层和小脑ROS、NO、MDA水平显著升高，



注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图4 Vog对小鼠小脑和大脑皮层*Ogg1*和*Ho-1* mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 4 *Ogg1* and *Ho-1* expressions in mice cerebral cortex and cerebellum after Vog administration ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

NQO1水平、GSH-Px、T-SOD活力显著降低；此外，小鼠尿液中DNA氧化损伤的分子标志物8-OHdG含有量也显著升高。由此推测，Vog可通过引起小鼠脑组织氧化应激而导致DNA损伤。

此外，研究发现Vog引起小鼠大脑皮层和小脑

的 DNA 损伤在停药后第 3 天可以修复至接近正常水平。8-OHdG 是公认的内源性及外源因素对 DNA 氧化损伤的生物标志物, 8-OHdG 导致 DNA 链碱基配对颠换, 该突变与肿瘤发生发展及某些疾病有密切关系^[11-12], 在停药后第 3 天开始, 8-OHdG 含有量接近正常水平。这些结果表明脑细胞具有 DNA 损伤的自动修复能力。我们同时检测了 Vog 对具有碱基切除修复能力 OGG1 及具有抗氧化防御作用 HO-1 的影响。一般认为 OGG1 的表达主要受氧化应激的调节, OGG1 的碱基切除修复能力是化学致癌物质或环境中有害物质引起细胞内氧化应激的又一生物分子标志物^[13], 其在体内特异识别 8-OHdG 并将其切除修复。HO-1 可通过减少促氧化物质水平及增加抗氧化物质含有量来发挥抗氧化作用, 从而提高机体的抗氧化防御状态。HO-1 的诱导被认为能在各种氧化应激状态下参与组织细胞的抗氧化应激损伤, 对机体起到保护作用^[14]。研究结果显示, Vog 可增加小鼠大脑和小脑皮层组织的 *Ogg1* 和 *Ho-1* 的 mRNA 水平。*Ho-1* 上调表明脑组织增加了对抗 Vog 引起氧化应激的抗氧化能力, 同时 *Ogg1* 上调提示脑组织增强了 DNA 修复能力, 以上这些是脑细胞抗氧化防御状态和 DNA 修复系统的代偿性调节。

综上, Vog 可通过引起小鼠脑组织的氧化应激而导致 DNA 损伤, 这种 DNA 损伤可通过自身防御系统得到部分修复, 但是 Vog 对小鼠脑组织 DNA 损伤作用仍不可忽视, 因为化学物质引起的 DNA 损伤及修复频率的增加, 也会增加致突变和致癌的可能性^[15]。

参考文献:

[1] Deng X L, Vidaruben L, Englander E W. Accumulation of oxidative DNA damage in brain mitochondria in mouse model of hereditary ferritinopathy [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 479 (1): 44-48.

[2] Barzilai A, Biton S, Shiloh Y. The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance [J]. *DNA Repair*, 2008, 7 (7): 1010-1027.

[3] Morio T, Kim H. Ku, Artemis, and ataxia-telangiectasia-mutated; signalling networks in DNA damage [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40 (4): 598-603.

[4] Brasnjevic I, Hof P R, Steinbusch H W M, et al. Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss; Molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neuro degenerative diseases [J]. *DNA Repair*, 2008, 7 (7): 1087-1097.

[5] 王娅杰, 孙 华, 刘耕陶, 等. p53 在 DNA 损伤反应中的研究进展 [J]. *药学报*, 2011, 46 (12): 1413-1419.

[6] 毛晓峰, 史志诚, 王亚洲. 我国藜芦属植物研究进展 [J]. *动物毒物学*, 2003, 18 (1, 2): 17-21.

[7] 丛 悦, 张亚宏, 郭 磊, 等. 黑紫藜芦对小鼠小脑和大脑皮层细胞 DNA 损伤研究 [J]. *中成药*, 2011, 33 (7): 1234-1236.

[8] Cong Y, Wang J H, Wang R, et al. A study on the chemical constituents of *Veratrum nigrum* L. processed by rice vinegar [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10 (7): 619-624.

[9] Cong Y, Guo J G, Tang Z, et al. Identification of *in vitro* and *in vivo* metabolites of 12β-hydroxyveratroylzygadenine associated with neurotoxicity by using HPLC-MS/MS [J]. *Chin Chem Lett*, 2014, 25 (8): 1107-1111.

[10] Cong Y, Guo L, Yang J Y, et al. Steroidal alkaloids from *Veratrum japonicum* with genotoxicity on brain cells DNA of cerebellum and cerebral cortex in mice [J]. *Planta Med*, 2007, 73 (15): 1588-1591.

[11] Shigenaga M K, Ames B N. Assays for 8-dihydroxy-2'-deoxyguanosine; a biomarker of *in vivo* oxidative DNA damage [J]. *Free Radic Biol Med*, 1991, 10 (3, 4): 211-216.

[12] 陈志强, 舒 融, 骆传环. 木耳多糖的制备及辐射防护作用试验研究 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2001, 21 (1): 40-47.

[13] Riis B, Rism L, Loft S, et al. OGG1 mRNA expression and incision activity in rats are higher in foetal tissue than in adult liver tissue while 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels are unchanged [J]. *DNA Repair*, 2002, 1 (9): 709-717.

[14] Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1; redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signa*, 2002, 4 (5): 749-758.

[15] Kido R, Sato I, Tsuda S. Detection of *in vivo* DNA damage induced by ethanol in multiple organs of pregnant mice using the alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay) [J]. *J Vet Med Sci*, 2006, 68 (1): 41-47.