

透性改变,而肝细胞线粒体保持相对完整,故胞浆酶释放较多,导致血液中 ALT 浓度明显升高。SOD 是一种广泛存在于生物体内与细胞氧化代谢密切相关的蛋白质,是活性氧自由基的天然消除剂,是抗氧化酶系中最先与活性氧自由基结合的酶,因此 SOD 是抗氧化系统性能状态的一个重要指标。MDA 作为脂质过氧化代谢的产物,其水平高低间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度,而 T-AOC 活力是衡量机体抗氧化能力的综合指标,可用其反映机体总抗氧化能力。研究显示,染毒组 AST 和 ALT 的含量升高,提示肝细胞可能遭到破坏,细胞膜通透性发生改变,胞浆酶释放增多,致使血液中 AST 和 ALT 浓度升高。随着染毒剂量增加 SOD 的活力降低,提示机体清除氧自由基的能力减弱;染毒组 MDA 升高,提示纳米硫化铅可能引起机体脂质过氧化水平增高,诱发细胞自由基产生,脂质过氧化程度加重;染毒组 T-AOC 活力降低,可能由于纳米硫化铅进入机体造成氧化抗氧化系统失衡。

此外,结果提示高剂量染毒组较低剂量组的损伤更为严重。氧化损伤发病机制复杂,多种因素交错作用,因此,纳米硫化铅氧化损伤的机制有待于我们进一步探讨。

参考文献:

- [1] Ermie Hood. Nanotechnology: Looking as we leap [J]. Environ Health Perspect, 2004, 112: A740.
- [2] Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning [J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29 (10): 927-945.
- [3] 汪冰,丰伟悦,赵宇亮,等. 纳米材料生物效应及其毒理学研究进展 [J]. 中国科学 B 辑: 化学, 2005, 35 (1): 1.
- [4] 余强,李坤刚,文兴,等. 纳米硫化镉量子点细胞毒性作用机制 [J]. 生态毒理学报, 2009, 4 (4): 488-493.
- [5] 张学峰,庄云龙. 纳米硫化铅离子敏感材料的研究 [J]. 化学传感器, 2004, 24 (1): 50-54.

葡萄籽油对镉致睾丸生殖细胞氧化损伤的保护作用

Protective effect of grape seed oil on oxidative damage by cadmium in testicular germ cell of rat

许瑞卿

XV Rui-qing

(海洋石油疾病预防控制中心, 天津 300450)

摘要: 取 32 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为对照组、染镉组、葡萄籽油 (GSO) 低、高剂量干预组,采用硫代巴比妥酸法和单细胞凝胶电泳技术 (SCGE) 分别检测生殖细胞丙二醛的含量和 DNA 损伤情况。结果染镉组 MDA 含量和生殖细胞的彗尾长、Olive 尾矩、尾分布矩均明显高于对照组,表明 1.0 mg/kg CdCl₂ 可引发大鼠雄性生殖系统出现明显的脂质过氧化损伤。GSO 低、高剂量干预组 MDA 含量均低于染镉组,并且 GSO 干预剂量与自由基清除率呈正相关,表明 GSO 具有一定的抗脂质过氧化活性;与染镉组比较, GSO 低、高剂量干预组中生殖细胞的尾分布矩明显降低,表明 GSO 具有一定抑制 DNA 损伤和促进 DNA 修复的生物学作用。

关键词: 葡萄籽油; 镉; 雄性生殖; DNA 损伤

中图分类号: R994 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2013)02-0106-02

研究表明,镉可降低雄性哺乳动物的生育能力,其生殖遗传毒性与氧化损伤密切相关^[1]。本文以葡萄籽油 (GSO) 为研究对象,探讨 GSO 对镉致大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤的保护作用,为镉中毒的预防和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器

分析纯氯化镉(天津福晨化学试剂厂)、葡萄籽油(纯度 95%,广州熊氏化妆品有限公司)、吡啶橙(美国 Sigma 公司)、正常熔点和低熔点琼脂糖(西班牙 BIOWEST 公司)、蛋白浓度和丙二醛含量测定试剂盒(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 Coulter 公司)、BX51 型荧光生物显微镜(日本 Olympus 公司)。

CdCl₂ 染毒溶液的配制:准确称取适量的 CdCl₂ 溶于无菌生理盐水中,配制成 3.3 mg/ml 的 CdCl₂ 储备溶液,临用前稀释成 0.33 mg/ml 的 CdCl₂ 应用液。GSO 染毒溶液的配制:准确称取适量的 GSO 溶于无菌生理盐水,配制成 5.28 mg/ml 的 GSO 储备溶液,临用前稀释成 0.132 mg/ml 和 0.528 mg/ml 的 GSO 应用液。

1.2 动物分组及处理

选用广东省实验动物监测所提供的 SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只 批号: SCXK(粤) 2008-0002, 体重 (190 ± 10) g, 适应观察 1 周后,按体重均衡原则随机分为 4 组,每组 8 只。对照组腹腔注射和灌胃相应量的生理盐水;染镉组腹腔注射 1.0 mg/kg 的 CdCl₂ 和灌胃相应剂量生理盐水;GSO 低、高剂量干预组均腹腔注射 1.0 mg/kg CdCl₂, 同时分别灌胃 0.66 mg/kg、2.64 mg/kg 的 GSO。腹腔注射和灌胃染毒容量分别为 3 ml/kg 和 5 ml/kg,连续染毒 14 d 称重后断头处死。

1.3 睾丸脏器系数的测定

解剖取出大鼠双侧睾丸后,置于预冷生理盐水中轻轻除

收稿日期: 2012-08-15; 修回日期: 2012-10-20

作者简介: 许瑞卿 (1980—), 男, 硕士研究生, 工程师, 主要从事环境卫生学研究。

去表面结缔组织,经预冷生理盐水漂洗几次,用滤纸吸干表面水分后称重。辜丸脏器系数(%) = 双侧辜丸湿重/动物体重 $\times 100\%$ 。

1.4 生殖细胞中丙二醛含量的测定

剥除辜丸表面的鞘膜和白膜等被膜,取约 0.1 g 辜丸精细小管,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℃,4 000 r/min, $r = 4$ cm) 10 min,轻轻去除上层脂肪层,取上清液备用。应用 Bradford 蛋白染料结合法和硫代巴比妥酸(TBA)法分别测定蛋白浓度和丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量,测定步骤和计算公式均按南京建成生物工程研究所提供说明书操作。MDA 清除率(%) = $(\text{MDA}_{\text{染镉组}} - \text{MDA}_{\text{干预组}}) / (\text{MDA}_{\text{染镉组}} - \text{MDA}_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.5 DNA 氧化损伤的检测

轻轻剥离辜丸被膜,取约 0.05 g 精曲小管剪碎,0.25% 胰酶室温消化 2 min,中止消化后经 150 目不锈钢筛网过滤后,1 500 r/min 离心 10 min ($r = 4$ cm),用 PBS 重悬制成单细胞悬液。按 Singh 方法^[4]进行单细胞凝胶电泳。在磨砂载玻片上依次铺上 80 μl 1% 正常熔点琼脂糖、75 μl 混有 10 μl 细胞悬液的 0.8% 低熔点琼脂糖、75 μl 1% 正常熔点琼脂糖。凝固后去盖玻片,置预冷的细胞裂解液中(2.5 mol/L NaCl、100 nmol/L EDTA、10 mmol/L Tris、5% TritonX-100、10% DMSO)裂解 1 h。取出玻片置于盛有 300 mmol/L NaOH (pH = 12) 的水平电泳槽中,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,再用 0.4 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 7.5)中和 3 次,滴加 75 μl 0.02% 吖啶橙染色,盖上盖玻片,在配有 100 W 汞灯,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 200 个细胞。用 IMI 1.0 彗星分析软件逐个分析细胞,最后用 SAS9.0 进行统计分析。

1.6 统计与分析

使用 SAS 9.0 统计软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠辜丸脏器系数

通过实验发现,与染镉组比较,对照组及 GSO 低、高剂量干预组的辜丸脏器系数及双侧辜丸重量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 生殖细胞中 MDA 含量

由表 1 可知,染镉组中 MDA 含量明显高于对照组($P < 0.05$); GSO 低、高剂量干预组 MDA 含量均低于染镉组,但差异无统计学意义($P > 0.05$); GSO 的干预剂量与 MDA 清除率呈正相关。

2.3 各组辜丸生殖细胞 DNA 损伤情况

表 2 显示,染镉组中细胞的彗尾长、Olive 尾矩、尾分布矩较对照组均显著升高;与染镉组比较,GSO 低、高剂量干预组中 DNA 氧化损伤的 3 个指标均呈下降趋势,且尾分布矩差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明 GSO 对镉致辜丸生殖

细胞 DNA 损伤具有一定的保护作用。

表 1 各组辜丸生殖细胞中 MDA 含量 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	MDA 含量 (nmol/mg prot)	MDA 清除率 (%)
对照组	0.62 $\pm$ 0.11	0
染镉组	0.82 $\pm$ 0.17*	0
GSO 低剂量干预组	0.72 $\pm$ 0.16	50
GSO 高剂量干预组	0.65 $\pm$ 0.38	85

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

表 2 GSO 对镉致大鼠辜丸生殖细胞 DNA 损伤的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	彗尾长 (μm)	Olive 尾矩	尾分布矩
对照组	23.05 $\pm$ 3.80	10.88 $\pm$ 2.28	33.99 $\pm$ 3.37
染镉组	34.50 $\pm$ 7.86*	16.58 $\pm$ 3.77*	37.85 $\pm$ 3.85*
GSO 低剂量干预组	25.39 $\pm$ 3.37	11.94 $\pm$ 1.67	34.16 $\pm$ 2.22#
GSO 高剂量干预组	23.88 $\pm$ 2.77	11.28 $\pm$ 1.34	32.79 $\pm$ 2.02#

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与染镉组比较,# $P < 0.05$ 。

3 讨论

MDA 作为细胞内脂质过氧化的终产物,其含量反映了脂质过氧化的作用强度。本文染镉组中 MDA 含量明显高于对照组,表明辜丸生殖细胞脂质过氧化损伤程度高于对照组,与杨凡等报道的镉对雄性小鼠生殖系统氧化损伤的结果一致^[3]。本研究中,染镉组的生殖细胞彗尾长、Olive 尾矩、尾分布矩较对照组明显升高,表明连续 14 d 腹腔注射 1.0 mg/kg 的 CdCl₂ 可诱导辜丸生殖细胞出现 DNA 氧化损伤。

葡萄籽油主要成分是亚油酸与原花青素,大量体外及动物实验研究证实,GSO 是一种天然、高效脂质过氧化抑制剂^[6,8]。龙正海等研究证实葡萄籽油对辐射损伤小鼠具有良好的防护作用^[9]。本研究发现 GSO 低、高剂量干预组 MDA 含量均低于染镉组,其 MDA 清除率分别为 50%、85%。与染镉组比较,GSO 低、高剂量干预组中 DNA 氧化损伤程度呈下降趋势,提示 GSO 对镉致大鼠辜丸生殖细胞 DNA 氧化损伤具有较好的防护作用,其机制可能与 GSO 保护细胞结构、促进 DNA 合成与修复等有关,需进一步证实。另外,本研究结果表明 GSO 高剂量干预组中 MDA 清除率达 85%,可为防治镉中毒时确定服用 GSO 安全和有效的剂量标准提供参考。

参考文献:

- [1] 卞建春. 镉的雄性动物生殖毒理学研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2000, 52-130.
- [2] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cells Res, 1988, 175: 184-191.
- [3] 杨凡, 庞亮, 杨世强. 镉对小鼠辜丸生殖细胞的遗传毒性 [J]. 职业与健康, 2010, 26 (2): 154-155.
- [4] 王媛, 王定颖, 岳田利. 超声波提取葡萄籽油的工艺优化及其抗氧化性研究 [J]. 食品科学, 2012, 33 (10): 136-140.
- [5] 吐尔逊江·买买提明, 孙娟娟, 丁红, 等. 葡萄籽油对超氧化物歧化酶活力的影响 [J]. 营养学报, 2004, 26 (4): 317-318.
- [6] 龙正海, 张煜炯, 罗方, 等. 葡萄籽油的化学成分及其抗辐射效应研究 [J]. 中国粮油学报, 2009, 24 (2): 116-119.