

DOI: 10.7524/AJE.1673 - 5897.20131121002

王璐, 惠秀娟, 李双双, 等. 盐酸小檗碱对小鼠脾细胞的 DNA 损伤和氧化性损伤[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(3): 490-494

Wang L, Hui X J, Li S S, et al. DNA damage and oxidation damage of berberine hydrochloride on spleen of mice [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(3): 490-494 (in Chinese)

盐酸小檗碱对小鼠脾细胞的 DNA 损伤和氧化性损伤

王璐, 惠秀娟, 李双双, 徐成斌*, 陈忠林, 何蕾

辽宁大学环境学院, 沈阳 110036

收稿日期: 2013-11-21 录用日期: 2014-02-05

摘要: 为了探讨盐酸小檗碱对小鼠的 DNA 损伤和氧化性损伤。随机选取 30 只小鼠分成对照组以及 7.5, 15, 30, 60 与 120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 实验组, 处理后, 应用小鼠脾细胞进行彗星实验与抗氧化酶实验。测定 DNA 损伤情况以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性以及丙二醛(MDA)含量变化。对盐酸小檗碱的 DNA 损伤与氧化性损伤作用进行比较研究。研究结果表明: 彗星实验中, 随着盐酸小檗碱浓度的增加, 尾部 DNA 含量、尾长与尾矩均增加, 与阴性对照组相比差异有统计学意义($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 且呈剂量-效应关系; 超氧化物歧化酶(SOD)与过氧化氢酶(CAT)活性随盐酸小檗碱剂量增加逐渐降低, 丙二醛(MDA)含量明显上升, 过氧化物酶(POD)活性在 7.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时上升, 而后逐渐下降。在 60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时有极显著性差异($p < 0.01$)产生。由此可见, 盐酸小檗碱对小鼠脾细胞有一定的损伤作用, 能够引起小鼠脾细胞的 DNA 损伤和氧化性损伤。

关键词: 盐酸小檗碱; 彗星实验; 氧化性损伤; 脾细胞

文章编号: 1673-5897(2014)3-490-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

DNA Damage and Oxidation Damage of Berberine Hydrochloride on Spleen of Mice

Wang Lu, Hui Xiujuan, Li Shuangshuang, Xu Chengbin*, Chen Zhonglin, He Lei

School of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China

Received 21 October 2013 accepted 5 February 2014

Abstract: To study the DNA damage and oxidation damage of berberine hydrochloride. Thirty mice were divided into the controls, 7.5, 15, 30, 60 and 120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ berberine to determine the DNA damage in vitro by comet assay. Then the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and malondialdehyde (MDA) were measured. The results shown that compared with the controls, tail DNA content (%), tail length and tail moment went up respectively in dose-effect manner following the rising berberine hydrochloride, the change tendency showed significant differences ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). As the content of berberine hydrochloride increased, the activities of dismutase (SOD), catalase (CAT) were gradually decreased and the concentration of malondialdehyde (MDA) was gradually increased. Peroxidase (POD) activity with 7.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ berberine hydrochloride increased comparing to the controls and then gradually decreased over the course of the experiment. The statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed at the dose of 60 and 120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The berberine

基金项目: 2011 年辽宁省科学技术计划项目(No.2011230009); 辽宁大学环境学院重点学科资助项目

作者简介: 王璐(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境污染物遗传毒性研究, E-mail: 417624120@qq.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: xuchengbin80@163.com

hydrochloride could cause DNA damage and oxidation damage of mice spleen cells.

Keywords: berberine hydrochloride; comet assay; oxidative damage; spleen cell

黄连素(berberine) 又名小檗碱,是存在于小檗科、罂粟科、毛茛科、芸香科和防己科等植物中的一种黄色的异喹啉类生物碱^[1-3],具有广泛的生物学作用。小檗碱因所含取代基的不同常表现为盐酸小檗碱与硫酸小檗碱两种形式,我们临床中常使用的清热解毒和抗菌类治疗药物其主要成分多为盐酸小檗碱。国内外对于盐酸小檗碱药用价值的研究已证实,盐酸小檗碱具有抗肿瘤、降血糖、抗心律失常、免疫调节等多种药理活性^[4-5]。同时作为广谱抗生素的一种,它能抑制多种革兰氏阴性菌 G^- 、革兰氏阳性菌 G^+ 以及真菌的生长繁殖^[6]。

但是研究发现,盐酸小檗碱也表现出一定的毒副作用。由于盐酸小檗碱快速的杀菌、消炎作用^[7-8],盐酸小檗碱作为抗菌性药物,被大剂量的添加在饲料中,以促进牛、猪等抗病而快速生长;调查结果显示全球每年生产的抗菌类药物(盐酸小檗碱、土霉素、水杨酸等)中,约有60%被用来作为生长剂及治疗药物饲喂动物。此类药物进入生物体后,并不能完全被吸收,其中80%以上以原药形式排出体外,有些抗菌性药物在生物体内经生物转化,生成毒性更大的代谢物随粪便和尿液排出体外。这些抗菌药及其代谢物随雨水地表径流污染地表水,或通过渗滤作用污染地下水。尽管浓度很低,但由于其在养殖业和畜牧业中被长期、大量、频繁的施用,因此,对整个生态系统和人体健康构成极大的潜在威胁。在排放入环境水体的合成盐酸小檗碱的冲洗废水中,调查结果显示盐酸小檗碱的浓度高达 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。

盐酸小檗碱也能呈浓度依赖性地诱导原代培养的大鼠大脑皮质和小脑颗粒神经元坏死^[9]。在一定浓度范围内,盐酸小檗碱会对小鼠脾细胞的增殖具有抑制作用^[10]。脾是血液循环中重要的滤过器,它能清除血液中的异物、病菌以及衰老死亡的细胞,同时也是人和动物的重要外周免疫器官,在机体内发挥免疫作用。药理以及毒理等多种实验中,都把脾作为靶器官进行研究。因而,为了深入研究盐酸小檗碱对小鼠脾细胞的损伤作用以及其潜在的环境影响,本研究从细胞及分子水平上,以小鼠脾细胞为实验对象,通过彗星实验及抗氧化酶实验研究盐酸小檗碱对小鼠脾细胞的 DNA 损伤和氧化性损伤,为

进一步研究盐酸小檗碱的遗传毒性、毒性机理以及具体氧化性应激反应等提供科学依据。

1 材料和方法(Materials and methods)

1.1 主要实验试剂

盐酸小檗碱为分析纯(国药集团化学试剂沈阳有限公司);溴化乙锭(EB),正常熔点琼脂糖(NMA)、低熔点琼脂糖(LMA),二甲亚砜(DMSO),过氧化氢(H_2O_2),硫代巴比妥酸等(美国 Sigma 公司)。

1.2 动物分组及处理

实验选择 ICR 雄性小鼠(沈阳医学院实验动物中心),体重 $25\sim 30\ \text{g}$ 左右,常规喂养两周后选取健康的小鼠进行实验。按 SAS 随机分组程序将小鼠随机分为 7 组,即对照组和 7.5、15、30、60 和 $120\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 盐酸小檗碱剂量组。采用灌胃方式染毒,末次染毒 6 h 后处死小鼠。按文献方法^[11]进行取材、处理。

1.3 指标测定方法

1.3.1 彗星实验

参照 Singn 等人的彗星实验方法^[12],并适当加以改动^[13-14]。荧光显微镜下用 $515\sim 560\ \text{nm}$ 的激发光观察,每张玻片用图像采集系统在 $\times 200$ 下随机采集 50 个彗星图像,用 CASP(Comet Assay Software Project)图像分析软件测定尾部 DNA 含量、尾长和尾矩。

1.3.2 生化测定

参照杨晓霞等人的实验方法。SOD 活性采用氮蓝四唑法测定;POD 采用愈创木酚法测定;CAT 活性采用羟胺氧化法测定;MDA 使用硫代巴比妥酸比色法测定^[15-18]。SOD、POD 和 CAT 比活用每 mg 蛋白酶活单位(U)表示,MDA 结果以单位质量蛋白质中能与 TBA 反应的物质(TBARS)的纳摩尔数($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$)表示。

1.4 数据处理

实验数据使用 Excel 2010 软件进行整理,采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析和显著性检验,并进行 Tukey 多重比较检验。实验结果以 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ 表示。

2 结果(Results)

2.1 体外彗星实验结果

盐酸小檗碱对小鼠脾细胞的体外彗星实验结果如表1。从表1可见,体外给予 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸小檗碱后,小鼠脾细胞尾部 DNA 含量、尾长和尾矩即明显增加($p < 0.01$)。表明盐酸小檗碱造成了小鼠脾细胞 DNA 损伤。且随盐酸小檗碱浓度的增高,呈明显的剂量-效应关系。

2.2 体内彗星实验

盐酸小檗碱对小鼠脾细胞的体内彗星实验结果如表2。从表中可见,5个剂量组与阴性对照组相比,尾部 DNA 含量、尾长及尾矩均呈现增加趋势,当浓度增加至 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后,差异有统计学意义($p < 0.01$)。说明一定剂量的盐酸小檗碱对小鼠脾细胞 DNA 有损伤作用。随着盐酸小檗碱浓度的升

高,小鼠脾细胞尾部 DNA 含量、尾长、尾矩都呈现增加趋势,且与浓度呈剂量-效应关系。使用台盼兰进行细胞存活率测定时,实验前细胞存活率均在95%以上,染毒后的细胞存活率也在90%以上,说明 DNA 损伤为受试物作用所致,而非细胞毒性。

2.3 盐酸小檗碱对小鼠组织内 SOD、CAT、POD 活力以及 MDA 含量的影响

不同剂量盐酸小檗碱对小鼠脾细胞 SOD、CAT、POD 活性以及 MDA 浓度的影响如图1-4。数据表明,高剂量的盐酸小檗碱能够抑制抗氧化酶的活性。随着盐酸小檗碱浓度的升高, SOD 与 CAT 活性逐渐降低,与对照组相比差异显著($p < 0.05$)。POD 活性在 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,活性被激活,活性增加极显著($p < 0.01$)。MDA 含量随盐酸小檗碱浓度的增加呈上升趋势,且与浓度呈剂量-效应关系。

表1 盐酸小檗碱体外彗星实验结果($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The results of comet assay($\bar{x} \pm s$)

受试物 Test substance	剂量组 Dose group	尾部 DNA 含量/% DNA content in tail/%	尾长/ μm Tail Length/ μm	尾矩 Tail moment
水 Water	阴性 Negative control	24.094 ± 1.018	33.758 ± 1.160	9.546 ± 0.769
盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride	$10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	41.979 ± 1.372^b	75.661 ± 1.941^b	37.596 ± 1.032^b
	$20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	49.275 ± 1.312^b	77.740 ± 2.845^b	42.798 ± 0.936^b
	$40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	53.054 ± 1.585^b	94.538 ± 2.035^b	55.348 ± 1.437^b
重铬酸钾 Potassium dichromate	阳性 Positive control	41.676 ± 1.869^b	84.939 ± 1.083^b	41.987 ± 1.319^b

注:与阴性对照组相比,^a $p < 0.05$,^b $p < 0.01$ 。

Note: Significant differences from the control are indicated as ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$.

表2 盐酸小檗碱体内彗星实验结果($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The results of comet assay($\bar{x} \pm s$)

受试物 Test substance	剂量组 Dose group	尾部 DNA 含量/% DNA content in tail/%	尾长/ μm Tail length/ μm	尾矩 TM Tail moment
水 Water	阴性 Negative control	24.094 ± 1.018	33.758 ± 1.160	9.546 ± 0.769
盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride	$7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	25.542 ± 0.512	52.860 ± 0.566^b	16.953 ± 0.349^b
	$15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	33.773 ± 0.354^a	59.889 ± 0.378^b	23.351 ± 0.169^b
	$30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	34.192 ± 0.457^b	62.900 ± 0.498^b	26.079 ± 0.358^b
	$60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	35.438 ± 0.481^b	65.561 ± 0.603^b	28.037 ± 0.375^b
	$120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	39.344 ± 0.222^b	73.611 ± 0.649^b	32.359 ± 0.587^b
重铬酸钾 Potassium dichromate	阳性 Positive control	41.676 ± 1.869^b	84.939 ± 1.083^b	41.987 ± 1.319^b

注:与阴性对照组相比,^a $p < 0.05$,^b $p < 0.01$ 。

Note: Significant differences from the control are indicated as ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$.

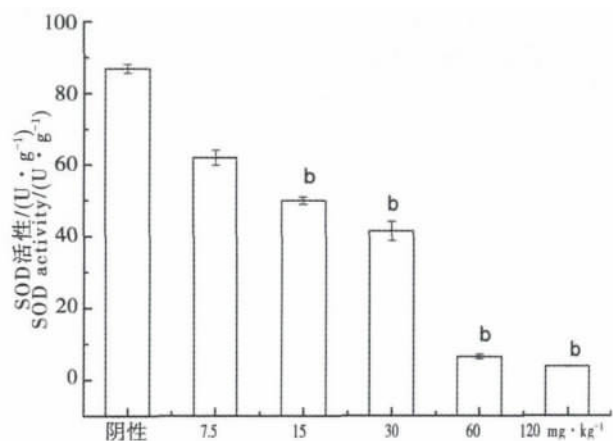


图1 不同剂量下染毒后小鼠细胞 SOD 变化情况

Fig. 1 The change of SOD activity after exposure to different concentrations of berberine

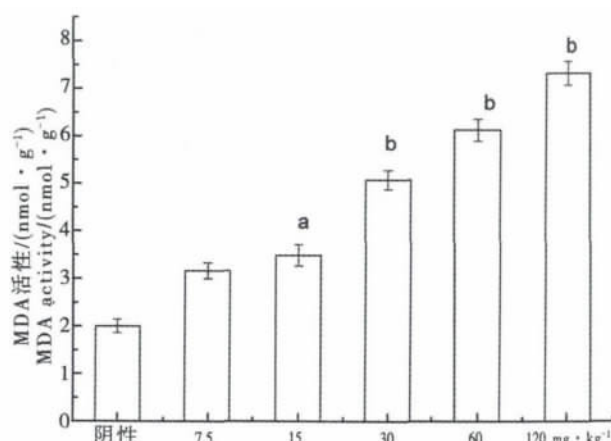


图4 不同剂量下染毒后小鼠细胞 MDA 变化情况

Fig. 4 The change of MDA activity after exposure to different concentrations of berberine

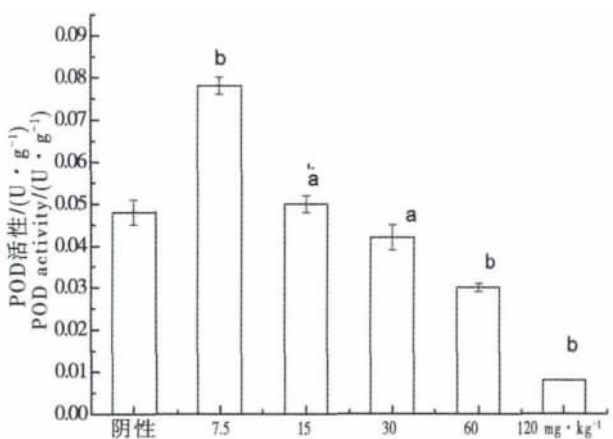


图2 不同剂量下染毒后小鼠细胞 POD 变化情况

Fig. 2 The change of POD activity after exposure to different concentrations of berberine

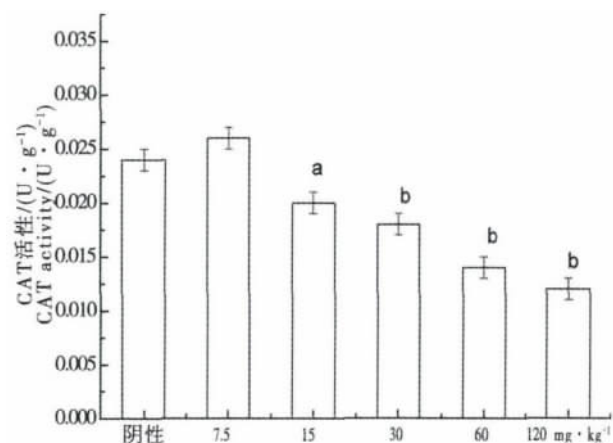


图3 不同剂量下染毒后小鼠细胞 CAT 变化情况

Fig. 3 The change of CAT activity after exposure to different concentrations of berberine

3 讨论 (Discussion)

实验结果表明,一定剂量的盐酸小檗碱对小鼠脾细胞有明显的 DNA 损伤与氧化性损伤作用。彗星实验中,随着盐酸小檗碱浓度的增加,小鼠脾细胞 DNA 单链断裂增多,电泳后,随电子迁移的距离也明显增大。脾细胞受损度增高,尾部 DNA 含量,尾长、尾矩均增加,与阴性对照组相比,差异有统计学意义 ($p < 0.01$)。可得出在一定剂量范围内盐酸小檗碱能够引起小鼠脾细胞的 DNA 损伤,对小鼠具有一定的遗传毒性。但其造成损伤的机理还有待于进一步研究。

且小鼠脾细胞中 MDA 含量明显上升, SOD 与 CAT 活性逐渐降低, POD 活性在 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时上升,而后逐渐下降。 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后,活性变化与对照组相比,差异显著 ($p < 0.05$)。说明在低剂量时,小鼠脾细胞自身有抵御损伤的作用,能够有效地清除自由基和活性氧,使细胞免受损伤。但当剂量升高后,机体内产生了大量的自由基在小鼠体内积累,未能被及时清除的自由基降低了抗氧化酶系的活性,同时加重了脂质过氧化反应,使机体内脂质过氧化产物增多,对细胞产生了毒性作用,也进一步说明了盐酸小檗碱可导致小鼠脾细胞 DNA 损伤。但对于长期条件下小鼠脾细胞的抗氧化酶系的活性以及 MDA 含量变化等情况还需要进一步的研究。

综上所述,彗星实验、抗氧化酶实验结果有较好的一致性,能够有效地证明盐酸小檗碱对小鼠脾细胞的 DNA 损伤与氧化性损伤作用。为盐酸小檗碱进一步遗传毒性的研究以及后续机理研究提供相关依据。

致谢:感谢辽宁大学环境学院各位老师、同学的帮助和支持。

通讯作者简介:徐成斌(1980—),男,环境工程博士,副教授,主要研究方向环境工程微生物等方向,发表学术论文30余篇。

参考文献:

- [1] 李芸兰,成志峰.小檗碱的研究进展[J].现代生物医学进展,2012,12(21):4173-4175
Li Y L, Cheng Z F. Advances in the study of berberine [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12 (21): 4173 - 4175
- [2] Ma B L, Ma Y M. Pharmacokinetic properties, potential herb-drug interactions and acute toxicity of oral rhizome coptidis alkaloids [J]. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology, 2013, 9(1): 51
- [3] Fan D J, Wu X R, Dong W N, et al. Enhancement by so-dium caprate and sodium deoxycholate of the gastrointesti-nal absorption of berberine chloride in rats [J]. Development and Industrial Pharmacy, 2013, 39(9): 1447
- [4] Pazhang Y, Ahmadian S, Mahmoudian M, et al. Berberine induced apoptosis via decreasing the survivin protein in K562 cell line [J]. Medical Oncology, 2011, 28(4): 1577 - 1583
- [5] 钟祥,李应东.小檗碱药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2012,8(3):185-186
Zhong X, Li Y D. Advances in pharmacological effects of berberine[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2012, 8(3): 185 - 186
- [6] 钟慈平, 骞宇, 舒畅等. 小檗碱及其衍生物抑菌作用研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 321 - 325
Zhong C P, Qian Y, Shu C, et al. Research progress in anti-microbial effects of berberine and its derivatives [J]. Food Science, 2013, 34(7): 321-325
- [7] Haller M Y, Müller S R, Mc Ardell C S, et al. Quantifica-tion of veterinary antibiotics (sulfonamides and trime-thoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 952 (1/2): 111 - 120
- [8] Pruden A, Pei R T, Storteboom H, et al. Antibiotic resist-ance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(23): 7445 - 7450
- [9] 林穗珍,黎明涛,李晓瑜,等.小檗碱诱导大鼠神经元毒性死亡的研究[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(4): 250 - 254
- [10] 马金柱,宋佰芬,阮宏生,等.盐酸小檗碱对小鼠脾细胞增殖和凋亡及分泌细胞因子的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(8): 802 - 808
Ma J Z, Song B F, Ruan H S, et al. Effect of berberine hydro-chloride on the proliferation, apoptosis and cytokine secretion of splenocytes in mice [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2013, 29(8): 802 - 808 (in Chinese)
- [11] 惠秀娟,孟玲玲,曹向宇,等.丙酯草醚对小鼠不同细胞DNA的损伤作用[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(8): 932 - 933
Hui X J, Meng L L, Cao X Y, et al. Effect of new pesticide on DNA damage in different mice cells [J]. China Journal of Public Health, 2005, 21(8): 932 - 933 (in Chinese)
- [12] Singh N P, Mccoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Experimental Cell Research, 1988, 175 (1): 184 - 191
- [13] 曹向宇,惠秀娟,马汐平等.激素类除草剂二氯喹啉酸遗传毒性比较[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(3): 333 - 334
Cao X Y, Hui X J, Ma X P, et al. Comparative research on genotoxicity of auxin herbicide quinclorac [J]. Experimental Cell Research, 2006, 22(3): 333 - 334 (in Chinese)
- [14] 孟雪莲,曹向宇,惠秀娟.乙草胺和胺苯磺隆对小鼠骨髓细胞DNA损伤作用[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(9): 1143 - 1144
Meng X L, Cao X Y, Hui X J. Effects of acetochlor and ethnesulfuron on DNA damage of mice bone marrow cells [J]. Experimental Cell Research, 2011, 27(9): 1143 - 1144 (in Chinese)
- [15] 杨晓霞,张薇,曹秀凤,等.亚致死剂量铜对蚯蚓P450酶和抗氧化酶活性的长期影响[J]. 环境科学学报, 2012, 32(3): 745 - 750
Yang X X, Zhang W, Cao X F, et al. Long-term effect of cop-per with sublethal dose on cytochrome P450 and antioxidant enzyme activities of earthworms [J]. Acta Scientiae Circum-stantiae, 2012, 32(3): 745 - 750 (in Chinese)
- [16] Luo Y, Zang Y, Zhong Y, et al. Toxicological study of two no-vel pesticides on earthworm Eisenia foetida [J]. Chemosphere, 1999, 39(13): 2347 - 2356
- [17] 徐镜波,袁晓凡,郎佩珍,等.过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度测定[J]. 环境化学, 1997, 16(1): 73 - 76
- [18] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lip id peroxides in ani-mal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. Analytical Bio-chemistry, 1979, 95 (2): 351 - 358

◆