

美洲大蠊醇提物对大鼠抗氧化应激的影响

隋世燕, 葛亚男, 徐取尉, 苏晶晶

(大理大学农学与生物科学学院, 云南大理 671003)

摘要:目的 研究美洲大蠊 *Periplaneta americana* 醇提物对大鼠血清和卵巢抗氧化指标的影响。方法 17 只成年雌性 SD 大鼠适应饲养 7 d 后, 随机分为 3 组: 对照组 (9 mL · kg⁻¹, 生理盐水) 5 只、低剂量组 (9 mL · kg⁻¹, 0.03 g · mL⁻¹ 美洲大蠊醇提物) 6 只、高剂量组 (9 mL · kg⁻¹, 0.09 g · mL⁻¹ 美洲大蠊醇提物) 6 只。每 2 天灌胃 1 次, 共饲养 30 d。实验结束后, 采集大鼠血清和卵巢, 检测血清中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、一氧化氮 (NO)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 指标和卵巢中 SOD、GSH-PX、CAT 基因表达的变化。结果 与对照组相比, 高剂量组 ($P=0.085$)、低剂量组 ($P=0.091$) 血清中的 NO 含量均有降低的趋势; 高剂量和低剂量的美洲大蠊醇提物均显著提高了大鼠血清中的 SOD 含量 ($P<0.05$), 同时, 高剂量组血清中的 MDA 含量显著降低 ($P<0.05$); 此外, 高剂量组和低剂量组卵巢 SOD 基因的表达显著升高 ($P<0.05$)。结论 美洲大蠊醇提物升高了大鼠血清 SOD 的含量, 降低了 NO 和 MDA 的含量, 同时, 还提高了卵巢 SOD 基因的表达, 说明美洲大蠊醇提物对大鼠卵巢具有一定的抗氧化应激功能。

关键词: 美洲大蠊醇提物; 氧化应激; 基因表达; 血清; 卵巢; 大鼠

中图分类号: Q95-33 文献标志码: A 文章编号: 1000-7083(2017)02-0198-05

Influence of *Periplaneta americana* Extract on Antioxidant Stress in Rats

SUI Shiyan, GE Yanan, XU Quwei, SU Jingjing

(College of Agronomy and Bioscience, Dali University, Dali, Yunnan Province 671003, China)

Abstract: Objective To study the effect of *Periplaneta americana* alcohol extract on antioxidant index of serum and ovary in rats. **Methods** A total of 17 adult female SD rats were randomly assigned to 3 groups after a week of adaption in the laboratorial environment. The rats of control group ($n=5$) were fed with physiological saline (9 mL · kg⁻¹) through stomach perfusion. The rats of experimental groups (6 per group) were treated with low-dose (9 mL · kg⁻¹, 0.03 g · mL⁻¹) and high-dose (9 mL · kg⁻¹, 0.09 g · mL⁻¹) *P. americana* alcohol extract as described above. Rats were treated every other day for 30 days. Subsequently, the serum and ovaries of rats were collected, and the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), nitric oxide (NO), glutathione (GSH-PX) in the serum, the expression of gene SOD, GSH-PX and CAT in the ovary were detected. **Results** Compared with control group, the NO content in rats serums of high-dose group ($P=0.085$) and low-dose group ($P=0.091$) showed a decreasing trend but not significant; the content of SOD in rats serums were significantly increased ($P<0.05$). Moreover, the content of MDA in rats serums were significantly decreased in the high-dose group ($P<0.05$). In addition, *P. americana* alcohol extract treatment significantly increased the expression of SOD gene in ovary ($P<0.05$). **Conclusion** *P. americana* alcohol extract can significantly increase the content of antioxidant index SOD and reduce levels of the oxidative stress indicators NO and MDA, and can also significantly increase the expression of SOD gene in ovary. Therefore, *P. americana* alcohol extract has a certain antioxidant stress function to the ovary of rats.

Keywords: *Periplaneta americana* alcohol extract; oxidative stress; gene expression; serum; ovary; rats

氧化应激是在机体内环境稳态时, 体内生成的活性氧超过机体的抗氧化防御能力时对细胞组织造成损害的病理性生物化学反应。氧化应激的本

质在于反应性的氧化物与生物抗氧化剂间平衡的破坏, 从而造成活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 浓度升高。生理水平的 ROS 有助于卵子发

收稿日期: 2016-10-14 接受日期: 2016-12-15

基金项目: 云南省教育厅项目 (2014C110Y); 大理大学博士科研启动基金项目 (KYBS201406)

作者简介: 隋世燕 (1981—), 男, 博士, 讲师, 主要从事动物营养与繁殖方面的研究, E-mail: sysui569@163.com

生和卵泡形成,但是过量 ROS 对女性生殖健康则有许多不利的影响(Aitken & Koppers, 2011),可以破坏细胞的 DNA、脂类和蛋白质,引起细胞基因、结构及功能受损,甚至导致细胞死亡(Bausenwein *et al.*, 2010)。很多研究已经证实,卵泡内含有内源性抗氧化物酶,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)等,与非酶类抗氧化物共同对抗氧化损伤以降低卵泡中的 ROS 水平(Agarwal *et al.*, 2005; Goud *et al.*, 2008);但当卵母细胞中的氧化应激产物超过机体抗氧化能力时,就会引起多种卵巢相关疾病,如内分泌紊乱、卵泡闭锁、卵巢早衰等,严重危害人类和动物的生殖健康(Agarwal *et al.*, 2003, 2005; Rizzo *et al.*, 2012)。在人类辅助的生殖领域,氧化应激可引起体外胚胎老化、发育受阻、凋亡和碎片等(Sikka, 2001; Agarwal *et al.*, 2005; Riva *et al.*, 2007)。因此,减少卵巢氧化应激的发生,对提高卵母细胞质量、促进胚胎的发育有积极作用。

机体中常见的氧化应激标志物有以一氧化氮(NO)和丙二醛(MDA)为代表的脂质氧化产物(Wathes *et al.*, 2007),它们能反映生物体内脂质过氧化反应的程度。利用机体内源的抗氧化体系在细胞内部协同对抗自由基,最终有效消除细胞内过量的自由基。若想有效降低自由基对人体的危害,不仅要依靠内源性防御体系,还要利用外源性自由基清除剂,使自由基在侵入机体之前就被阻断,避免机体遭受氧化损伤(Bagchi *et al.*, 1997)。

美洲大蠊 *Periplaneta americana* 属于蜚蠊科 Blattidae 大蠊属 *Periplaneta*, 原产于南美洲,食性广泛,喜食糖和淀粉,污染食物、传播病菌和寄生虫,是世界性卫生害虫,其分泌物和粪便还含有致癌物质,但其药理作用却日益造福人类,其具有抗肝炎、抗肿瘤、抗菌、抗人类免疫缺陷病毒、增强机体免疫力、消炎镇痛、促进血管增生和组织修复等作用(戴云等, 2005; 何正春等, 2009)。研究发现,美洲大蠊提取物在体外具有一定的抗氧化能力(焦春香等, 2011),但是,其在体内的抗氧化效果却未见报道。

因此,本研究以成年 SD 大鼠为研究对象,观察以美洲大蠊醇提物干预后其血清 NO、GSH-PX、CAT、SOD 和 MDA 等氧化或抗氧化应激指标的变化,并且测定了大鼠卵巢中抗氧化相关基因 *GSH-PX*、*CAT* 和 *SOD* 的表达,以探讨美洲大蠊醇提物对

大鼠机体和卵巢的抗氧化能力,从而为研究美洲大蠊醇提物对动物繁殖功能的影响奠定基础。

1 材料

1.1 实验对象

1.1.1 实验动物 17 只成年 SD 雌性大鼠,体质量 230 ~ 250 g,购自第三军医大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2007-017,实验动物使用许可证号:SCXX(滇)2005-0010。

1.1.2 美洲大蠊醇提物的制取 成年美洲大蠊(由大理大学昆虫生物医药研究院赠送)处死后,晾干,将虫体粉碎,用 15 倍量的 95% 乙醇进行冷浸提取 3 次,然后去除脂肪,沉淀物放入 -40 °C 保存备用。

1.1.3 实验处理 大鼠先进行 7 d 的自由采食饲养,以调节生理周期,使其适应环境。按体质量随机分为 3 组,对照组 5 只灌胃生理盐水;低剂量组 6 只灌胃低剂量的美洲大蠊醇提物($0.03 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$);高剂量组 6 只灌胃高剂量的美洲大蠊醇提物($0.09 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$);根据甘平等(2011)的方法,3 组大鼠灌胃的剂量均为每千克体质量 9 mL。所有大鼠均自由饮水和采食。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 NO 试剂盒、CAT 试剂盒、MDA 试剂盒、GSH-PX 试剂盒、SOD 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;Trizol 试剂盒购自上海 Life Technologies 生物技术有限公司;DNA 酶购自 TaKaRa 公司;反转录酶购自 Promega 公司;dNTP 和 RNA 酶抑制剂购自南京生兴生物工程有限公司;含 SYBR GREEN 的 DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。10% 水合氯醛。反转录引物、内参引物和基因表达引物由上海捷瑞生物技术有限公司合成。

1.2.2 主要仪器 可见分光光度计,上海棱光技术有限公司;NanoDrop 分光光度计(ND-1000),美国 Thermo 公司;普通 PCR 仪(Gene Amp PCR system 9600),美国 Perkins Elmer 公司;实时荧光定量 PCR 仪(Mx3000P),美国 Stratagene 公司。

2 方法

2.1 动物模型建立

大鼠自由取食喂养 7 d 后灌胃,每 2 天 1 次。

2.2 样本采集

大鼠喂养 30 d 后开始采样,用 10% 水合氯醛

(每千克体质量 2 mL)对大鼠进行腹腔注射,待麻醉后剖开腹腔,腹主动脉采血,将血注入含有 EDTA-Na 的抗凝管里,将卵巢放入 EP 管中,置于 -70 °C 保存。血液 4000 r · min⁻¹离心 10 min,取上清。

2.3 血清中各氧化和抗氧化应激指标测定

根据说明书进行 NO、GSH-PX、CAT、SOD、MDA 指标的测定。

2.4 基因表达测定方法

2.4.1 RNA 提取及质量控制 根据说明书,使用 Trizol 试剂盒提取卵巢总 RNA, DNA 酶处理后用 NanoDrop 分光光度计测定总 RNA 的浓度,测得的值应在 2 000 ng · μL⁻¹内,若超过则稀释后重测,OD_{260/280} = 1.8 ~ 2.2。最后取 5 μg RNA 稀释到 500 ng · μL⁻¹,每管 4 μL,共分装 2 套,用于 RNA 反转录。

2.4.2 反转录 反应总体积 25 μL。第一步,2 μg 总 RNA,10 mmol · L⁻¹ dNTP,2.5 μmol · L⁻¹随机引物,加 DEPC 水至 10 μL,在普通 PCR 仪上 70 °C 变性 5 min 后,立即置于冰上冷却;第二步,加 5 μL 5 × RT buffer,0.2 μL 1 000 U RNA 酶抑制剂,0.1 μL 10 000 U 反转录酶(M-MLV),DEPC 水补齐至 25 μL,在普通 PCR 仪上 37 °C 反应 1 h,95 °C 活化 5 min。反转录产物短期内使用可置于 4 °C,长期保存需置于 -20 °C。

2.4.3 引物设计 内参基因 GAPDH 和目的基因的引物根据 GenBank 上猪的相关 cDNA 序列,采用 Primer premier 5.0 进行设计,由上海捷瑞生物工程有限公司合成(表 1)。

2.4.4 PCR 扩增反应 将 cDNA 原液稀释至 10%,使用实时荧光定量 PCR 仪检测目的基因的 mRNA 表达,其体系为:cDNA 2 μL,1 μmol · L⁻¹目的或内参基因引物 2 μL,高压 ddH₂O 6 μL,含 SYBR Green 的 DNA 聚合酶 10 μL,共 20 μL。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,64 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,40 个循环。

统计方法使用 2^{-ΔΔCt} 法(Livak & Schmittgen, 2001)。计算公式如下:ΔΔCt = (Ct_{Target} - Ct_{GAPDH})_x - (Ct_{Target} - Ct_{GAPDH})_{control}

其中,以对照组的的目的基因 Ct_{Target} 和内参基因 Ct_{GAPDH} 差值的平均值为对照进行计算,x 表示任意一个样本,通过上述公式计算出每一个样本目的基因的表达,即通过 GAPDH 校正后相对于对照组的目的基因表达的倍数。

表 1 基因表达引物序列
Table 1 The primer sequences of gene expression

目的基因 Target gene	PCR 产物 PCR product/bp	引物序列 Primer sequences (5'-3')	基因序列号 GenBank ID
CAT	213	F:ACCTGTGAACTGTCCTACCG R:CGCACCTGAGTGACGTTGTCT	NM_012520
SOD	163	F:GTGGTGGAGAACCCAAAGGA R:GCGGCAATCTGTAAGCGAC	NM_017051
GSH-PX	221	F:GTGCGAGGTGAATGGTGAGA R:TGTCGATGCTGCCAAGC	NM_030826
GAPDH	142	F:GGCAAGTTCACGGCAG R:CGCCAGTAGACTCCACGACAT	NM_017008

2.5 数据统计与分析

所有数据用平均值 ± 标准误 (Mean ± SE) 表示,统计分析采用 SPSS 17.0 中的单因素方差分析 (One-Way ANOVA), P < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 美洲大蠊提取物对血清中各氧化和抗氧化应激指标的影响

3.1.1 对 NO、GSH-PX 和 CAT 含量的影响 与对照组相比,低剂量组 (P = 0.085) 和高剂量组 (P = 0.091) 均使大鼠血清中 NO 含量有减少的趋势。与对照组相比,高剂量和低剂量的美洲大蠊提取物均没有显著影响大鼠血清中的 GSH-PX 和 CAT 含量 (P > 0.05)。

3.1.2 对 SOD 含量的影响 与对照组相比,高剂量和低剂量的美洲大蠊提取物均显著增加了大鼠血清中的 SOD 含量 (P < 0.05) (图 1)。

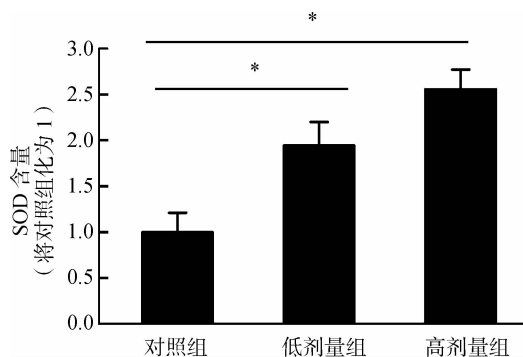


图 1 雌性 SD 大鼠血清中 SOD 含量的测定
Fig. 1 Levels of serum SOD in female SD rats
* P < 0.05; 下同 the same below.

3.1.3 对 MDA 含量的影响 与对照组相比,低剂量的美洲大蠊提取物没有显著影响大鼠血清中的 MDA 含量,但高剂量能够显著降低大鼠血清中的 MDA 含量 (P < 0.05) (图 2)。

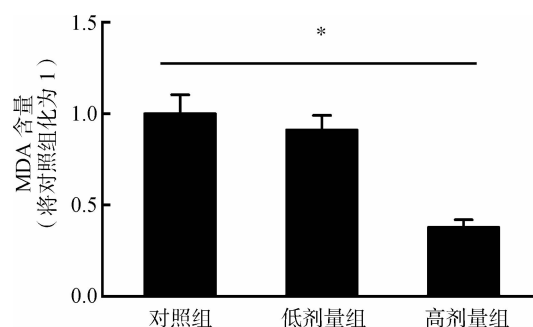


图2 雌性SD大鼠血清中MDA含量的测定
Fig. 2 Levels of serum MDA in female SD rats

3.2 美洲大蠊醇提物对卵巢中抗氧化应激相关基因表达的影响

3.2.1 对GSH-PX和CAT基因表达的影响 与对照组相比,高剂量与低剂量的美洲大蠊醇提物均没有显著影响大鼠卵巢GSH-PX和CAT基因的表达($P > 0.05$)。

3.2.2 对SOD基因表达的影响 由图3可知,与对照组相比,高剂量和低剂量的美洲大蠊醇提物均显著增加了雌性大鼠卵巢中SOD基因的表达($P < 0.05$)。

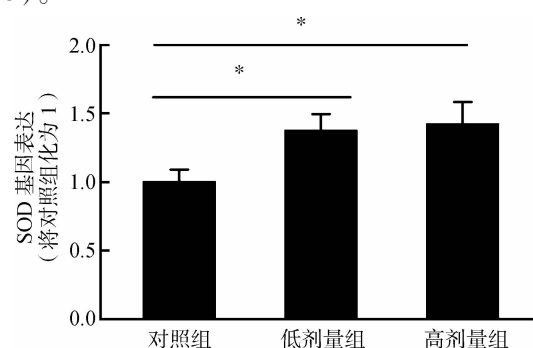


图3 雌性SD大鼠卵巢组织中SOD基因的表达
Fig. 3 The expression of SOD gene in the ovary tissue of female SD rats

4 讨论

本实验结果显示,不同剂量的美洲大蠊醇提物能够降低大鼠血清中氧化应激指标NO及MDA的含量,并且能够增加大鼠血清中SOD的含量及其基因表达,说明美洲大蠊醇提物对大鼠机体和卵巢具有一定的抗氧化应激功能。

为保护机体免受过氧化损伤,细胞形成一套复杂的抗氧化酶防御系统,主要包括SOD、CAT、GSH-PX等,其中SOD将超氧阴离子(O_2^-)转换为过氧化氢(H_2O_2),GSH-PX和CAT再将 H_2O_2 转化为水,从而使有毒性的 O_2^- 和 H_2O_2 均被转化为无害的水分子(Husain *et al.*,2001)。CAT除了可调节体内 H_2O_2 水平,还可充当一些巯基蛋白质的保护剂;GSH在谷

胱甘肽过氧化物酶的催化下,实现还原型谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽的转变,还原氧化型物质,解除其毒性(吴军等,2007)。过多的自由基通过攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用(Oya-woye *et al.*,2003; Ashok *et al.*,2006),导致大鼠血清中脂质过氧化物MDA含量增加,造成组织细胞膜毒性反应,影响正常组织形态和功能的完整性(Oya-woye *et al.*,2003)。

美洲大蠊醇提物使大鼠血清中MDA及NO的含量减少,显示了体内抗氧化酶防御系统能力的增强,使机体清除自由基的能力加强,从而使过多的自由基攻击生物膜中多不饱和脂肪酸而产生的MDA的含量也得到了控制,细胞膜不再受到过多自由基的侵袭,保证了其正常的组织形态和完整的功能,说明美洲大蠊醇提物具有增强抗氧化能力的功能。增强对NO及MDA的抑制作用,提高SOD的含量和基因表达,可能是美洲大蠊醇提物对机体抗氧化功能的保护机理所在。这与邹俊波等(2016)的研究相似,美洲大蠊醇提物能够显著降低乙醇致急性胃溃疡小鼠胃黏膜组织内MDA和NO的水平,提高CAT、SOD和GSH-PX的活性,进而预防急性胃溃疡。

参考文献:

- 戴云,曾茗,项朋志. 2005. 蜚蠊的药用价值[J]. 中药材, 28(9): 848-850.
- 甘平,张旭强,何旭,等. 2011. 美洲大蠊醇提物对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 现代药物与临床, 26(2): 123-128.
- 何正春,胡明辉,王晓雨,等. 2009. 美洲大蠊提取物对3株人及小鼠白血病细胞的细胞毒性研究[J]. 云南中医中药杂志, 30(5): 56-57.
- 焦春香,张成桂,刘光明,等. 2011. 美洲大蠊提取物中抗衰老活性部位抗氧化活性的初步分析[J]. 时珍国医国药, 22(6): 1389-1391.
- 吴军,赵凤鸣,王明艳,等. 2007. 四君子汤对环磷酰胺造模小鼠血清中SOD、GSH、CAT和MDA水平的影响[J]. 辽宁中医杂志, 34(8): 1168-1169.
- 邹俊波,桑文涛,王芳,等. 2016. 美洲大蠊提取物对乙醇致小鼠急性胃溃疡的预防作用[J]. 中成药, 38(11): 2325-2331.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction [J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 3(28): 1-21.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction [J]. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 18(3): 325-332.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction [J]. Fertility and

- Sterility, 79(4): 829-843.
- Aitken RJ, Koppers AJ. 2011. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa [J]. *Asian Journal of Andrology*, 13(1): 36-42.
- Bagchi D, Garg A, Krohn RL, *et al.* 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro* [J]. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 95(2): 179-189.
- Bausenwein J, Serke H, Eberle K, *et al.* 2010. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and of catalase activity in follicular fluid of obese women [J]. *Molecular Human Reproduction*, 16(2): 117-124.
- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, *et al.* 2008. Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(7): 1295-1304.
- Husain K, Whitworth C, Somani SM, *et al.* 2001. Carboplatin-induced oxidative stress in rat cochlea [J]. *Hearing Research*, 159(1-2): 14-22.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, *et al.* 2003. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome [J]. *Human Reproduction*, 18(11): 2270-2274.
- Riva C, Binelli A, Cogni D, *et al.* 2007. Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether (BDE-209) in hemocytes of *dreisena polymorpha* using the comet and micronucleus assays [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48(9): 735-743.
- Rizzo A, Roscino MT, Binetti F, *et al.* 2012. Roles of reactive oxygen species in female reproduction [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2): 344-352.
- Sikka SC. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7): 851-862.
- Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction [J]. *Biology of Reproduction*, 77(2): 190-201.