

# 龙葵碱对小鼠睾丸生殖细胞线粒体损伤的研究

季宇彬<sup>1,2,3</sup>, 吴盼<sup>1,2,3</sup>, 朗朗<sup>1,2,3</sup>

1 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2 哈尔滨商业大学 药物研究所博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076

3 教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

**摘要 目的:** 研究龙葵碱对小鼠睾丸的毒性作用。**方法:** 30只雄性小鼠, 体质量20~24g。随机分成5组, 每组6只。采用ip龙葵碱对小鼠进行染毒, 染毒剂量分别是1/8 LD<sub>50</sub> (5.25 mg/kg)、1/4 LD<sub>50</sub> (10.5 mg/kg)、1/2 LD<sub>50</sub> (21 mg/kg)。另设阴性对照组 (生理盐水组), 阳性对照组 (环磷酰胺, CP, 给药剂量40 mg/kg), 龙葵碱不同浓度组连续染毒14 d。应用紫外分光光度法测定睾丸中SDH、MDA、SOD、GSH的活力。**结果:** 龙葵碱染毒两周后, GSH的量仅1/2 LD<sub>50</sub>染毒剂量组与空白组相比较呈非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 随着染毒剂量的增加, MDA含量增加, 1/2 LD<sub>50</sub>、1/4 LD<sub>50</sub>、1/8 LD<sub>50</sub>染毒剂量组与空白组比较呈非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 随着染毒剂量的增加 SOD的活性降低明显, 1/2 LD<sub>50</sub>、1/4 LD<sub>50</sub>染毒剂量时, SOD活性的降低与空白组比较呈非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 随着染毒剂量的增加 SDH的活性降低明显, 1/2 LD<sub>50</sub>、1/4 LD<sub>50</sub>染毒剂量时, SDH活性的降低与空白组比较呈非常显著性差异 ( $P < 0.01$ )。**结论:** 龙葵碱能够使SDH、MDA、SOD、GSH活力降低, 从而导致自由基增多, 呼吸链和氧化磷酸化脱偶联, 三羧酸循环被阻断, 线粒体基质渗透压升高, 内膜肿胀, 使线粒体的功能发生障碍, 线粒体氧化损伤。

**关键词** 龙葵碱; 自由基; 线粒体; 琥珀酸脱氢酶 (SDH); 丙二醛 (MDA); 超氧化物歧化酶 (SOD); 谷胱甘肽 (GSH)

**中图分类号:** R965.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1674-6376 (2009) 02-0117-04

龙葵碱广泛存在于马铃薯、番茄及茄子等茄科植物中。如果误食了发芽或绿色的马铃薯可引起中毒, 表现为胃痛加剧, 恶心和呕吐, 呼吸困难、急促, 伴随全身虚弱和衰竭, 严重者可导致死亡。国外有报道龙葵碱有胚胎毒性、遗传毒性、致畸性等, 如Wang等<sup>[1]</sup>认为龙葵碱对胚胎小鼠有致畸作用, 其可引起神经管缺陷。龙葵碱有胚胎毒性, 有可能导致胚胎死亡。龙葵碱能明显影响胚胎的发育, 并导致宫内发育迟缓。如果对怀孕小鼠在妊娠期的第5或第6天给药会有阴道出血及流产发生。但同时龙葵碱具有增强红细胞的免疫功能, 抗癌等作用<sup>[2,3]</sup>, 因此, 研究其毒性作用, 明确作用机制将有助于新药的开发。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

昆明种健康级小鼠, 由哈尔滨汉方试验鼠类养殖所提供 (00101006)。紫外可见分光光度计 (尤尼柯 UV-210); 低速离心机 (北京医用离心机厂 LD4-2A); 电子天平 (德国 Bs 型); 超细匀浆器 (德国 Fluku F6/10); 涡旋震荡器 (江苏海门麒麟医用仪器厂)。龙葵碱 (天津市化学试剂分厂六厂,

质量分数为95%); 流式细胞仪; 200目不锈钢网; 蛋白定量 (考马斯亮兰法) 测试盒 (南京建成生物工程研究所); SDH试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

### 1.2 实验动物及分组

30只雄性小鼠, 体质量20~24g。随机分成5组, 每组6只。采用ip龙葵碱对小鼠进行染毒, 染毒剂量分别是1/8 LD<sub>50</sub> (5.25 mg/kg)、1/4 LD<sub>50</sub> (10.5 mg/kg)、1/2 LD<sub>50</sub> (21 mg/kg)。另设阴性对照组 (生理盐水组), 阳性对照组 (环磷酰胺, CP, 给药剂量40 mg/kg), 龙葵碱不同浓度组连续染毒14 d, 每天9:00 ip一次。环磷酰胺组采用30 h染毒法, 即2次染毒间隔24 h, 于第二次染毒后6 h将小鼠脱颈椎处死, 实验组于末次染毒后禁食、自由饮水, 24 h内进行实验。

### 1.3 单细胞悬液的制备和睾丸组织样品的处理

将各染毒组小鼠的睾丸取出以适量的生理盐水洗涤后, 在消毒碟皿中将组织剪切成碎块。移入2 mL含0.25%胰蛋白酶的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 中, 在37℃水浴中消化15 min, 每隔5 min摇荡1次。将消化

收稿日期: 2009-07-13

基金项目: 国家自然科学基金 (D200505)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 教授, 研究方向为天然药物化学。

的组织 1 000 r/min 离心 10 min, 吸去上清液。以 PBS 液漂洗 2~3 min, 再离心, 去上清, 重复 3 次以尽量洗去胰蛋白酶。用 200 目不锈钢网过滤, 去除未消化分离的组织碎块、纤维等。再以 PBS 液漂洗, 收集细胞悬液<sup>[4]</sup>。

取睾丸组织, 在冰冷的生理盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 准确称重, 放入预先加 1 mL 冷生理盐水的小烧杯中, 用眼科小剪尽快剪碎。将剪碎的组织块放入玻璃匀浆管中, 用余下的生理盐水(总体积为组织质量的 9 倍)冲洗小烧杯, 一并倒入, 研磨制成 10 % 睾丸组织匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行测定。同时用考马斯亮兰试剂测组织匀浆蛋白。

#### 1.4 SOD 活性的测定

通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基, 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现紫红色, 用可见分光光度计测其吸光度。SOD 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 操作过程按说明书进行。计算公式如下:

SOD 活力 = (对照管 A 值 - 测定管 A 值) / (对照管 A 值 × 50%) × 反应液总体积 / (取样量 × 组织中蛋白量)

#### 1.5 MDA 活性的测定

过氧化脂质降解产物中的丙二醛 (MDA) 可与硫代巴比妥酸 (TBA) 形成红色产物, 在 532 nm 处有最大吸收峰。MDA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 操作过程按说明书进行。计算公式如下:

组织中 MDA 的量 = (测定管 A 值 - 空白管 A 值) / (标准管 A 值 - 空白管 A 值) × 标准管浓度 / 组织中蛋白量

#### 1.6 GSH 活性的测定

二硫代二硝基苯甲酸与巯基化合物反应时能产生一种黄色化合物, 可进行比色定量测定。GSH 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 操作过程按说明书进行。计算公式如下:

组织中 GSH 的量 = (测定管 A 值 - 空白管 A 值) / (标准管 A 值 - 空白管 A 值) × 标准管浓度 × GSH 相对分子质量 / 组织中蛋白量

#### 1.7 SDH 活力的测定

琥珀酸脱氢酶 (SDH) 催化底物反应, 黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 是该反应的辅基, FAD 被还原成 FADH, 该反应与 2, 6-DPIP 的还原速度可以推算出 SDH 的活力。SDH 试剂盒购自南京建成生物工程

研究所, 操作过程按说明书进行: 比色在 600 nm 处, 蒸馏水调零后, 将待测 10 % 睾丸匀浆 0.1 mL 加入干净的比色皿底部, 快速将试管中已预温好的试剂倒入比色皿中, 同时按下秒表, 于反应 5 s 时读吸光度  $A_1$  值, 比色皿不要拿开, 1 min 后, 即 65 s 时读吸光度  $A_2$  值。记录  $\Delta A$  值 =  $A_1$  值 -  $A_2$  值以备计算。计算公式如下:

酶的比活性 =  $\Delta A / (0.01 \times \text{反应时间} \times \text{取样量中的蛋白量})$

## 2 结果

### 2.1 龙葵碱对小鼠睾丸组织 GSH 的影响

随着染毒剂量的增加, GSH 的量降低, 1/2LD<sub>50</sub> 染毒剂量组与空白组相比较呈非常显著性差异 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1。

表 1 龙葵碱各个染毒剂量组和对照组对小鼠睾丸组织 GSH 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effect of solanine on GSH in mice testis issue in groups of different doses and control group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	GSH/ (mg·g prot <sup>-1</sup> )
环磷酰胺组	25.15 ± 0.43**
龙葵碱 1/2LD <sub>50</sub> 组	30.84 ± 2.10**
龙葵碱 1/4LD <sub>50</sub> 组	34.68 ± 3.12
龙葵碱 1/8LD <sub>50</sub> 组	39.72 ± 3.29
对照组	40.08 ± 5.64

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group

### 2.2 龙葵碱对小鼠睾丸组织 MDA 的影响

随着染毒剂量的增加, 1/2 LD<sub>50</sub>、1/4 LD<sub>50</sub>、1/8 LD<sub>50</sub> 染毒剂量组 MDA 含量增加显著, 且与空白组比较呈非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 结果见表 2。

表 2 龙葵碱各个染毒剂量组和对照组对小鼠睾丸组织 MDA 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of solanine on MDA in mice testis issue in groups of different doses and control group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	MDA/ (mg·g prot <sup>-1</sup> )
环磷酰胺组	51.79 ± 3.59**
龙葵碱 1/2LD <sub>50</sub> 组	45.54 ± 1.21**
龙葵碱 1/4LD <sub>50</sub> 组	33.20 ± 3.35**
龙葵碱 1/8LD <sub>50</sub> 组	24.53 ± 2.45**
对照组	17.65 ± 4.36

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group

### 2.3 龙葵碱对小鼠睾丸组织 SOD 的影响

由表 3 可见, 龙葵碱染毒两周后, 随着染毒剂量的增加 SOD 的活性降低明显, 1/2 LD<sub>50</sub>、1/4LD<sub>50</sub> 染毒剂量时, SOD 活性的降低与空白组比较呈非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 而 1/8 LD<sub>50</sub> 染毒剂量, SOD 活性的降低与空白组比较呈显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 龙葵碱对小鼠睾丸组织 SDH 的影响

实验结果 (表 4) 表明, 龙葵碱染毒两周后, 随着染毒剂量的增加 SDH 的活性降低明显, 1/2、1/4 LD<sub>50</sub> 染毒剂量时, SDH 活性的降低与空白组比较呈非常显著性差异 ( $P < 0.01$ );

表 3 龙葵碱各个染毒剂组和对对照组对小鼠睾丸组织 SOD 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of solanine on SOD in mice testis issue in groups of different doses and control group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	SOD/ (mg·g prot <sup>-1</sup> )
环磷酸胺组	15.03 ± 1.56**
龙葵碱 1/2LD <sub>50</sub> 组	20.40 ± 1.21**
龙葵碱 1/4LD <sub>50</sub> 组	29.45 ± 1.20**
龙葵碱 1/8LD <sub>50</sub> 组	31.39 ± 1.74*
对照组	34.00 ± 1.74

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

表 4 龙葵碱各个染毒剂组和对对照组对小鼠睾丸组织 SDH 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of solanine on SDH in mice testis issue in groups of different doses and control group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	SDH/ (mg·g prot <sup>-1</sup> )
环磷酸胺组	35.12 ± 1.80**
龙葵碱 1/2LD <sub>50</sub> 组	50.64 ± 2.15**
龙葵碱 1/4LD <sub>50</sub> 组	55.79 ± 1.34**
龙葵碱 1/8LD <sub>50</sub> 组	61.25 ± 2.00
对照组	61.79 ± 3.34

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group

## 3 讨论

线粒体 (mitochondrion, MT) 是一个敏感而多变的细胞器, 普遍存在于除哺乳动物成熟红细胞以外的所有真核细胞中。细胞生命活动所需能量的 80% 是由线粒体提供的, 线粒体是细胞进行生物氧化和能量转换的主要场所, 而哺乳动物吸收氧气的 90% 在线粒体中利用, 所以线粒体既是自由基的来

源, 也是自由基损伤的主要目标。自由基有很多种, 其中最主要的是由氧诱发的自由基 (氧自由基)。自由基能够通过 mtDNA、线粒体膜、呼吸链等使线粒体发生损伤。本实验结果表明, 小鼠经 ip 龙葵碱后, 引起了睾丸组织内的自由基反应, 破坏了细胞的氧化代谢过程, 造成了线粒体的氧化损伤。

谷胱甘肽 (GSH) 是体内重要的非酶性抗氧化物质, GSH 的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要标志。谷胱甘肽有还原型 (G-SH) 和氧化型 (G-S-S-G) 两种形式, 在生理条件下以还原型谷胱甘肽占绝大多数。谷胱甘肽属于含有巯基的小分子肽类物质, 半胱氨酸上的巯基为其活性基团。所以还原型谷胱甘肽易受自由基氧化, 因此谷胱甘肽能够保护许多蛋白质和酶等分子中的巯基不被自由基氧化, 从而让蛋白质和酶等分子发挥其生理功能。本研究证明, 龙葵碱进入体内后可产生各种氧自由基消耗 GSH, 使得 GSH 水平下降, 从而导致睾丸组织对氧化损伤的敏感性增加。龙葵碱 1/2 LD<sub>50</sub> 剂量组的小鼠 GSH 下降明显, 可能由于龙葵碱进入后首先被 GSH 等抗氧化物质所吸收, 并与之发生反应, 生成活性氧自由基 (超氧离子、羟自由基) [5] 攻击细胞膜上不饱和脂肪酸 (PUFA), 引起脂质过氧化反应, 形成脂质过氧化产物。而其它剂量组 GSH 下降不明显, 可能与 GSH 在氧化物质作用下可代偿合成有关。

自由基作用于脂质发生过氧化反应, 氧化终产物为丙二醛 (MDA), 会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合, 且具有细胞毒性。MDA 不仅反映自由基产生的程度, 而且还反映脂质过氧化的程度, 间接反映细胞损伤的程度, 它是细胞发生脂质过氧化反应的产物中具有代表性的产物, 其含量的多少预示脂质过氧化程度的轻重。本实验结果表明, 小鼠睾丸组织的 MDA 含量在所有染毒剂量时都有明显增高。说明龙葵碱可以在睾丸组织产生 MDA 的堆积, 造成损伤, 从而证实龙葵碱注射后的过氧化反应造成小鼠睾丸组织的损伤, 是导致小鼠睾丸毒性的重要机制。

SOD 是自由基的有效清除剂, 能催化过氧自由基分解形成过氧化氢, 后者可被谷胱甘肽过氧化物酶转化为水 [6], 使细胞免受过氧自由基的氧化损伤。SOD 活性的降低, 说明体内需清除的自由基较多 [7]。本次实验观察到 SOD 活性随染毒剂量的增加而降低, 说明龙葵碱可引起睾丸组织脂质过氧化反应,

从而导致睾丸组织的损伤。

综上所述,睾丸中 SOD、GSH 水平的显著性降低,说明睾丸内含有大量的自由基;而睾丸中的 MDA 含量显著增高,则表明睾丸中的自由基作用于脂质发生过氧化反应,从而说明龙葵碱可引起睾丸组织脂质过氧化反应,从而导致睾丸组织的损伤。

琥珀酸脱氢酶(SDH)是三羧酸循环中唯一与内膜结合的酶,是含铁-硫中心的黄素蛋白,含有巯基,SDH 直接连在电子传递链上,是连接氧化磷酸化与电子传递的枢纽之一,可为真核细胞线粒体和多种原核细胞需氧和产能的呼吸链提供电子,其活性一般可作为评价三羧酸循环运行程度的指标,为线粒体的标志酶之一。因此,SDH 的活性反映了机体内物质氧化和供能代谢状态及线粒体的功能。实验结果表明,龙葵碱染毒两周后,随着染毒剂量的增加,SDH 的活性逐渐降低,均低于空白对照组。说明龙葵碱能够使琥珀酸脱氢酶活力降低甚至丧失,以至三羧酸循环被阻断,导致细胞代谢降低,对线粒体功能具有抑制作用,造成线粒体功能损伤。一方面,龙葵碱造成 SDH 的活性逐渐降低,致使线粒体的三羧酸循环、氧化磷酸化与电子传递受损。Piantadosi 等<sup>[8]</sup>认为,在病理条件下,线粒体电子传递的损伤是氧自由基生成的主要来源。说明龙葵碱导致琥珀酸脱氢酶活力降低,电子传递受损,氧自由基增多。另一方面,氧自由基增多和 GSH 含量下降,以至 GSH 无法保护琥珀酸脱氢酶中的巯基不被自由基氧化,从而导致琥珀酸脱氢酶活力下降,以至三羧酸循环被阻断。

由于酶 SOD、SDH 活性和 GSH 含量下降,MDA 含量显著增高,说明线粒体内自由基明显增多。研究结果<sup>[9]</sup>表明自由基的集聚可以导致线粒体内外膜通透性(PT)增大,线粒体肿大,激活线粒体通透性转换孔(PTP)的开放,进而导致 $\Delta\Psi_m$ 的下降。PT 的增大是呼吸链和氧化磷酸化脱偶联,ATP 合成停止,促进凋亡诱导因子的释放。自由基造成线粒

体内膜脂质的过氧化反应、膜流动性降低、膜脂质降解,线粒体内外膜蛋白过氧化,蛋白质交链,其结构和功能障碍,酶(如 SDH)活性丧失等,从而

影响跨越线粒体膜的质子梯度,使线粒体的功能发生障碍。同时,线粒体的功能障碍又可导致自由基产生增多,过多的氧自由基在内膜处集聚,又导致生物膜结构蛋白质和脂质过氧化,进一步损害线粒体膜的通透性,引起呼吸链活性以及 $\Delta\Psi_m$ 的进一步下降,形成恶性循环,使氧自由基生成进一步增加,加快凋亡的发生,最终造成细胞及组织的坏死<sup>[10]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 王学工,李守柔. 土豆类生物碱的提取及其对小鼠胚胎致畸作用的研究[J]. 中华妇产科杂志, 1993, 28(2): 73-75.
- [2] 高世勇,季宇彬. 龙葵碱对人肝癌 HepG2 细胞 N-乙酰基转移酶活性的影响[J]. 中草药, 2009, 39(11): 1812-1814.
- [3] 季宇彬,万梅绪,高世勇,等. 龙葵碱对荷瘤小鼠红细胞免疫功能的影响[J]. 中草药, 2009, 38(3): 412-414.
- [4] 沈静,谢苗荣,徐雍,等. 乳鼠心肌细胞培养及纯化方法的改良[J]. 中国医药导刊, 2001, 3(3): 225-226.
- [5] Postlethwait E M, Langford S D, Jacobson L M. NO<sub>2</sub> reactive absorption substrates in rat pulmonary surfacelining fluids[J]. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19(9): 5.
- [6] Motoori S, Majima H J, Ebara M, et al. Over expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 5382-5388.
- [7] 江泉观,常元勋. 近年中毒机制研究进展中若干问题[J]. 卫生毒理学杂志, 1997, 11(4): 243.
- [8] Piantadosi C A, Zhang I. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat[J]. *Stroke*, 1996, 27(5): 327-331.
- [9] Haerberlein S L. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell-death[J]. *Neurochem Res*, 2004, 29(3): 521-530.
- [10] Beal M F. Aging energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Ann Neurol*, 1995, 38(8): 357-366.