

桑叶生物碱对 *D*-半乳糖诱导小鼠 DNA 氧化损伤的修复及作用机理

杨忠敏¹, 沈以红², 黄先智², 丁晓雯^{1*}

1(西南大学 食品科学学院, 重庆市农产品加工重点实验室, 食品科学与工程国家级实验教学示范中心, 重庆, 400716)

2(西南大学, 科技处, 重庆, 400716)

摘要 探讨桑叶生物碱是否能修复小鼠 DNA 氧化损伤, 旨在为桑叶生物碱的开发利用提供理论依据。采用 *D*-半乳糖诱导建立小鼠氧化损伤模型, 灌胃不同剂量的桑叶生物碱, 于第 8 周末测定小鼠血浆 8-OH-dG、5-OH-dC 含量及 MTH1、OGG1、MUTYH 的酶活水平, 检测肝脏 DNA ladder 结果, Real-time PCR 测定肝脏组织 MTH1、OGG1、MUTYH mRNA 表达。与模型对照组相比, 桑叶生物碱高剂量组 (200 mg/kg · BW) 能使小鼠血浆中 8-OH-dG、5-OH-dC 分别降低 65.35%、59.13% ($P < 0.01$); 血浆中的 MTH1、OGG1、MUTYH 活力水平分别增加 37.09%、134.44%、114.29% ($P < 0.01$), 且它们在肝脏中 mRNA 表达分别增加 192.35%、103.96%、109.36% ($P < 0.01$)。此外, 桑叶生物碱高剂量组中小鼠肝脏无 DNA ladder 结果出现 ($P > 0.05$)。桑叶生物碱对 *D*-Gal 诱导的 DNA 氧化损伤有良好的修复作用, 其机制可能是在转录水平上调控相关的酶活水平, 从 BER 途径对 DNA 氧化损伤进行修复。

关键词 桑叶生物碱; *D*-半乳糖; DNA; 氧化损伤; 碱基切除修复系统

DNA 氧化损伤会使细胞发生氧化应激反应, 引发基因突变、神经性病变以及癌变等诸多不利变化^[1-2]。研究表明, 活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 攻击 DNA 脱氧核糖骨架或碱基时会导致 DNA 氧化损伤^[3]。腺嘌呤 (A)、胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C)、鸟嘌呤 (G) 是 DNA 的 4 种基本碱基, 正常情况下, 这 4 种碱基严格按照 A-T、C-G 配对记载生命的遗传信息。目前已知 DNA 碱基受 ROS 攻击可形成 20 种修饰碱基, 如 8-羟基鸟嘌呤 (8-hydroxy-2'-desoxyguanosine, 8-OH-dG)、5-羟基胞嘧啶 (5-hydroxy-2'-deoxycytosine, 5-OH-dC) 等^[4]。DNA 被 ROS 攻击发生氧化损伤时, 机体可通过自身的修复机制修复损伤的 DNA 分子从而维持基因的稳定状态。研究表明, 碱基切除修复 (base excision repair, BER) 途径是 DNA 氧化损伤的重要修复途径之一, 8-羟基鸟嘌呤核苷酸酶 (8-oxoguanine nucleoside triphosphatase, MTH1), 8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶 (8-oxoguanine DNA glycosylase, OGG1)、mutY 同源酶 (mutY homolog, MUTYH) 是参与此途径中 DNA 损伤修复的重要酶类^[5]。

桑叶含有多种生物活性成分, 如黄酮、多糖、生物碱等, 具有较高的潜在药用价值, 是一种具有丰富来

源的营养保健食品资源^[6]。桑叶生物碱是以 1-脱氧野尻霉素 (1-deoxynojirimycin, 1-DNJ) 为主的多羟基哌啶类生物碱, 具有降糖^[7]、抗病毒^[8]、抑制肿瘤转移^[9]等作用。王兴婷等^[10]研究体外表明桑叶生物碱对 DPPH 自由基、羟基自由基具有较好的清除作用, 分别为 $IC_{50} = 0.589 \text{ g/L}$ 、 $IC_{50} = 1.788 \text{ g/L}$ 。彭晓蝶^[11]研究表明, 桑叶生物碱粗提液能上调机体抗氧化酶的 mRNA 表达, 提高机体抗氧化酶活力, 使小鼠 MDA 含量下降, 从而证实桑叶生物碱具有调控脂质过氧化的作用。TANG 等^[12]也证实, 1-DNJ 能提高罗非鱼体内的抗氧化酶活力来改善其脂质氧化。笔者前期研究已证明, 桑叶生物碱在体外模拟胃肠消化体系中具有较好 DPPH 自由基清除能力、铁离子还原能力^[13], 同时也进一步证实了其能通过增强小鼠机体抗氧化能力来改善小鼠脂质、DNA 及蛋白质氧化损伤^[14]。但目前针对桑叶生物碱修复 DNA 氧化损伤的研究特别是有关机理的研究尚未见报道。因此, 本文采用 *D*-半乳糖 (*D*-galactose, *D*-Gal) 诱导小鼠建立氧化损伤模型, 然后给实验小鼠灌胃不同剂量的桑叶生物碱, 通过测定 BER 途径相关酶活力的变化及其 mRNA 表达, 在前期研究的基础上深入探讨桑叶生物碱在体内对 DNA 氧化损伤的修复作用及机理, 为开发桑叶生物碱改善机体氧化应激状况的相关保健食品提供理论依据, 为防御机体 DNA 氧化损伤提供新的思路。

第一作者: 硕士研究生 (丁晓雯教授为通讯作者, E-mail: 837731486@qq.com)。

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (No. CARS-18)

收稿日期: 2019-06-27, 改回日期: 2019-07-22

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

昆明种小鼠 60 只(SPF 级),4 周龄,平均质量为 20 g 左右,由重庆医科大学实验动物中心(许可证号 SCXK(渝)2018-0003)提供;基础饲料,购于重庆医科大学实验动物中心。桑叶粉末,购于重庆市蚕业科学技术研究院。桑叶生物碱,实验室自制^[13],总生物碱含量为 93.57%(质量分数)。

D-Gal(纯度≥99%)、GSH(纯度≥98%):阿拉丁有限公司;8-OH-dG、5-OH-dC、MTH1、OGG1、MUTYH 酶联吸附免疫(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)测定试剂盒:厦门慧嘉生物科技有限公司;DNA ladder 抽提试剂盒:碧云天生物科技有限公司;高纯总 RNA 快速提取试剂盒:北京百泰克生物技术有限公司;反转录试剂盒、SYBR® Premix Ex TaqTM II(Til RNaseH Plus)试剂盒:宝生物工程(大连)有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Synergy H1 酶标仪,基因有限公司;811DK 高速冷冻离心机,Eppendorf AG;KQ5200DB 超声波清洗仪,昆山市超声仪器有限公司;T100T 型 PCR、CFX96 Real-time PCR、NanoDropND-2000C 微量紫外分光光度计、GelDoc2000 凝胶成像系统,美国 Thermo 公司;DW-HL438 型超低温冰箱合肥美菱股份有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及模型建立

60 只雄性 SPF 级昆明种小鼠,实验前适应性饲养 7 d 后,随机分出 10 只小鼠为正常对照组,其余小鼠连续腹腔注射 D-Gal(1 000 mg/(kg·BW))20 d,构造氧化应激模型。以造模组、正常对照组小鼠血清中 MDA、SOD 水平是否存在显著性差异为判定指标。正常对照组注射等量的生理盐水。

造模成功后,正常对照组小鼠灌胃生理盐水,将造模成功小鼠随机分为模型对照组(灌胃生理盐水)、阳性药物组(灌胃 200 mg/(kg·BW) GSH)、桑叶生物碱低、中、高剂量组(分别灌胃 50、100、200 mg/(kg·BW) 桑叶生物碱),每组各 10 只。实验期间,小鼠每天称体质量 1 次,并根据体质量变化按照 0.1 mL/10 g 每天灌胃 1 次,连续灌胃 8 周。

小鼠按照西南大学实验动物保护和使用规则饲养,实验期间室内通风条件良好,控制动物房温度为(23±2)℃、相对湿度 40%~60%,12 h 明暗交替

(9:00 am~21:00 pm),所有小鼠均喂饲普通饲料,自由觅食、饮水。

1.3.2 样本采集

8 周实验结束后,各实验组小鼠禁食不禁水 12 h,摘取小鼠眼球取血于肝素钠采血管中,4℃、3 000 r/min 离心 15 min,上清液即为血浆,于-80℃保存备用。采血完毕后,颈椎脱臼处死小鼠,快速取出肝脏,用冷生理盐水漂洗除去表面血液,于-80℃保存备用。

1.3.3 血浆 8-OH-dG、5-OH-dC 的含量及 MTH1、OGG1、MUTYH 的酶活力测定

均按照试剂盒提供的方法进行操作。

1.3.4 肝组织 DNA 损伤水平检测

按照 DNA ladder 试剂盒进行检测。

1.3.5 肝组织 MTH1、OGG1、MUTYH mRNA 表达的测定

按照 RNA 提取试剂盒的方法提取肝脏组织总 RNA。再根据反转录试剂盒说明书将 RNA 反转为 cDNA,再进行 PCR 扩增。取上述反转录产物 1 μL 作为反应模板,进行 Real-time PCR 反应,反应体系 10 μL。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,如表 1 所示。Real-time PCR 反应条件:95℃,4 min 预变性;95℃,15 s 变性,60℃,30 s 退火,共 39 个循环。以 β-actin 作内参基因,分别测定肝组织 MTH1、OGG1、MUTYH 的相对表达量,结果以 2^{-ΔΔCq} 表示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	实时荧光定量 PCR 引物
β-actin F	CGTGCGTGACATCAAAGAGAAG
β-actin R	CAAGAAGGAAGGCTGGAAGA
MTH1 F	CTTGCTGCTAGTGTACAGCCTCAG
MTH1 R	GTGCAGTGTATCCACGCTCAGAC
OGG1 F	TGACTACGGCTGGCATCCTAAGAC
OGG1 R	GAGACAGGCTTGCTTGCGGAAG
MUTYH F	CTGTCCTGGAAGTGTCTCCGAAG
MUTYH R	TCTCTTGCTTGCTGCTGTTGC

1.4 数据统计分析

实验结果均以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,采用 SPSS 20.0 统计软件对结果进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。采用 Origin 9.0 作图。

2 结果与分析

2.1 桑叶生物碱对小鼠血浆 8-OH-dG、5-OH-dC 水

平的影响

研究表明,8-OH-dG 是 ROS 攻击 DNA 分子中鸟嘌呤碱基中第 8 位 C 原子而形成的一种氧化性加合物,可作为内源性或外源性因素造成 DNA 氧化损伤的标志物^[15]。DNA 氧化损伤产物种类较多,仅测定一种不能完全评估 DNA 氧化损伤程度,而 5-OH-dG 被证实是另一类重要的 DNA 氧化损伤产物^[4]。本研究测定各组小鼠血浆中 8-OH-dG、5-OH-dC 水平,以考察桑叶生物碱对 DNA 氧化损伤的影响,结果如表 2 所示。

表 2 桑叶生物碱对小鼠血浆中 8-OH-dG、5-OH-dC 的影响
Table 2 Effects of mulberry leaf alkaloids on 8-OH-dG and 5-OH-dC in plasma

实验组别	n	8-OH-dG / (ng · L ⁻¹)	5-OH-dC / (pg · mL ⁻¹)
正常对照组	10	14.88 ± 2.04 ^{##}	6.14 ± 1.18 ^{##}
模型对照组	10	45.25 ± 2.65 ^{**}	17.03 ± 1.55 ^{**}
阳性药物组	10	15.37 ± 1.19 ^{##}	6.12 ± 1.44 ^{##}
低剂量组	10	31.61 ± 2.98 ^{**}	14.72 ± 1.05 ^{**}
中剂量组	10	20.74 ± 3.04 ^{*#}	11.13 ± 1.17 ^{*#}
高剂量组	10	15.68 ± 2.42 ^{##}	6.96 ± 1.17 ^{##}

注: * 表示与正常组对照比较存在显著性差异 ($P < 0.05$), * * 表示极显著性差异 ($P < 0.01$); # 表示与模型组比较存在显著性差异 ($P < 0.05$), ## 表示极显著性差异 ($P < 0.01$)。下同。

由表 2 可知,与正常对照组相比,模型对照组小鼠 8-OH-dG、5-OH-dC 含量分别增加了 204.10%、177.36% ($P < 0.01$),表明模型组小鼠发生了 DNA 氧化损伤。与模型组对照组相比,阳性药物使小鼠 8-OH-dG、5-OH-dC 水平分别减少了 66.03%、64.06% ($P < 0.01$);桑叶生物碱中、高剂量组均下调了小鼠 8-OH-dG、5-OH-dC 水平,其中高剂量组下调最多,分别下调 65.35%、59.13% ($P < 0.01$)。上述结果表明,桑叶生物碱能明显修复小鼠的 DNA 氧化损伤,且有明显的量-效关系,高剂量能使 8-OH-dG、5-OH-dC 恢复至与正常组无显著性差异的水平 ($P > 0.05$)。

2.2 桑叶生物碱对小鼠血浆中 BER 途径相关酶活力的影响

BER 途径是生物体针对氧化损伤、烷基化等因素导致碱基变异的主要修复机制^[16]。BER 起识别和切除修饰碱基(如 8-OH-dG)的作用,主要从 DNA 特异性糖基化酶起始,包括 MTH1、OGG1 和 MUTYH^[17]。本研究测定各组小鼠血浆中 MTH1、OGG1、MUTYH 活力的变化,以考察桑叶生物碱对 DNA 损伤 BER 途径的影响,结果如表 3 所示。

由表 3 可知,与正常对照组相比,模型对照组小鼠 MTH1、OGG1、MUTYH 的活力分别下降了 28.29%、

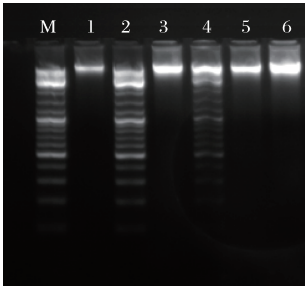
58.18%、56.66% ($P < 0.01$),表明模型小鼠修复 DNA 氧化损伤的能力大大下降。与模型组对照组相比,阳性药物使小鼠 MTH1、OGG1、MUTYH 活力分别增加了 38.70%、135.16%、117.74% ($P < 0.01$);桑叶生物碱中、高剂量组均能增加小鼠血浆中 MTH1、OGG1、MUTYH 活力,其中高剂量组分别使它们增加了 37.09%、134.44%、114.29% ($P < 0.01$)。结果表明,桑叶生物碱明显增加小鼠 DNA 氧化损伤相关修复酶的酶活水平,且有明显的量-效关系,高剂量能使小鼠 MTH1、OGG1、MUTYH 恢复至与正常组无显著性差异水平 ($P > 0.05$)。

表 3 桑叶生物碱对小鼠血浆 MTH1、OGG1、MUTYH 的影响 ($\bar{x} \pm SD$)
Table 3 Effects of mulberry leaf alkaloids on MTH1, OGG1 and MUTYH in plasma ($\bar{x} \pm SD$)

实验组别	n	MTH1 / (U · L ⁻¹)	OGG1 / (U · L ⁻¹)	MUTYH / (U · L ⁻¹)
正常对照组	10	131.13 ± 15.14 ^{##}	214.84 ± 16.68 ^{##}	187.68 ± 25.36 ^{##}
模型对照组	10	94.03 ± 11.56 ^{**}	89.84 ± 18.07 ^{**}	81.34 ± 7.83 ^{**}
阳性药物组	10	130.42 ± 11.13 ^{##}	211.27 ± 13.92 ^{##}	177.11 ± 14.06 ^{##}
低剂量组	10	100.69 ± 11.90 ^{**}	133.51 ± 20.31 ^{**}	91.55 ± 14.47 ^{**}
中剂量组	10	112.98 ± 15.53 ^{*#}	162.08 ± 20.47 ^{*#}	113.91 ± 26.34 ^{*#}
高剂量组	10	128.91 ± 12.29 ^{##}	210.62 ± 10.68 ^{##}	174.30 ± 29.29 ^{##}

2.3 DNA ladder 检测桑叶生物碱对小鼠肝脏 DNA 损伤的作用

细胞凋亡后,细胞染色体的 DNA 会发生降解,在琼脂糖凝胶电泳上会呈现特异性的梯状 ladder 图谱,而坏死的呈弥漫的联续图谱^[18]。采用 DNA ladder 方法检测桑叶生物碱对小鼠肝脏 DNA 损伤的作用,结果如图 1 所示。



M - DNA ladder marker; 1 - 正常对照组;
2 - 模型对照组; 3 - 阳性对照组; 4、5、6 -
桑叶生物碱低、中、高剂量组
图 1 桑叶生物碱对小鼠肝脏的 DNA ladder 结果
Fig. 1 Effects of mulberry leaf alkaloids on DNA ladder in mouse liver

由图 1 可知,模型组小鼠 DNA 经染色成像后呈现类似于梯子上的踩踏板,表明模型组小鼠出现了 DNA 的衰亡及损伤。桑叶生物碱低剂量组呈现与模型组类

似的情况,表明低剂量桑叶生物碱对 DNA 氧化损伤无改善作用;阳性对照组、桑叶生物碱中、高剂量组泳道上仅出现单一 DNA 条带,分子质量最大,且亮度与正常对照组无显著性差异($P > 0.05$),表明阳性药物组、桑叶生物碱中、高剂量组对小鼠肝脏细胞氧化损伤有明显修复作用,与血浆指标的测定结果一致。

2.4 桑叶生物碱对小鼠肝脏组织 BER 途径修复酶 mRNA 表达的影响

MTH1、OGG1 和 MUTYH 是 BER 途径的重要修复酶,且主要表达靶器官是肝脏组织^[19-20]。如果 DNA 发生氧化损伤,则 MTH1、OGG1 和 MUTYH 的 mRNA 表达将会减少。本研究考察桑叶生物碱是否是从转录水平调节 DNA 氧化损伤修复酶的活力水平。结果如图 2~图 4 所示。

2.4.1 桑叶生物碱对小鼠肝脏组织 MTH1 的 mRNA 表达的影响

由图 2 可知,与正常对照组相比,模型组小鼠 MTH1 mRNA 表达水平降低了 68.11% ($P < 0.01$)。与模型对照组相比,阳性药物组、桑叶生物碱高剂量组使小鼠 MTH1 mRNA 表达水平分别增加了 198.02%、192.35% ($P < 0.01$),与正常对照组无显著性差异($P > 0.05$)。结果表明,一定剂量的桑叶生物碱能增加 DNA 中 BER 途径中 MTH1 修复酶 mRNA 水平,且高剂量组使 MTH1 的 mRNA 表达恢复到正常水平。说明桑叶生物碱是通过调控 MTH1 的 mRNA 表达水平进而使 MTH1 酶活水平升高而进行 DNA 氧化损伤修复的。

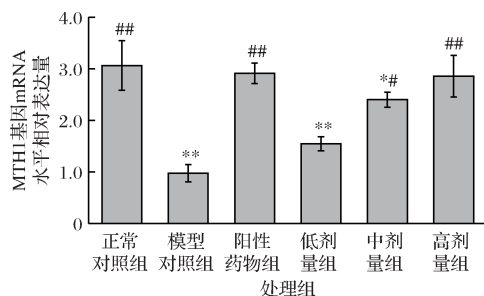


图 2 桑叶生物碱对小鼠肝脏 MTH1 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of mulberry leaf alkaloids on MTH1 mRNA expression in mouse liver

2.4.2 桑叶生物碱对小鼠肝脏组织 OGG1 mRNA 表达的影响

由图 3 可知,与正常对照组相比,模型组小鼠 OGG1 mRNA 表达水平降低了 58.07% ($P < 0.01$)。与模型对照组相比,阳性药物组、桑叶生物碱高剂量组使小鼠

OGG1 mRNA 表达水平分别增加了 115.86%、103.96% ($P < 0.01$),与正常对照组无显著性差异($P > 0.05$)。结果表明,桑叶生物碱能增加 DNA BER 途径中 OGG1 修复酶 mRNA 水平,且高剂量组 OGG1 mRNA 表达恢复至与正常对照组无显著性差异的水平($P > 0.05$),说明桑叶生物碱是通过调控 OGG1 的 mRNA 表达水平进而使 OGG1 酶活水平升高而进行 DNA 氧化损伤修复的。

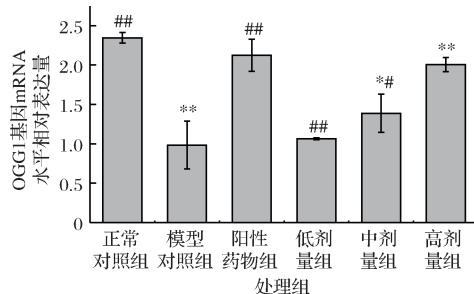


图 3 桑叶生物碱对小鼠肝脏 OGG1 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effect of mulberry leaf alkaloids on OGG1 mRNA expression in mouse liver

2.4.3 桑叶生物碱对小鼠肝脏组织 MUTYH mRNA 表达的影响

由图 4 可知,与正常对照组相比,模型组小鼠 MUTYH mRNA 表达水平降低了 60.21% ($P < 0.01$)。与模型对照组相比,阳性药物组、桑叶生物碱高剂量组使小鼠 MUTYH mRNA 表达水平分别增加了 112.57%、109.36% ($P < 0.01$),与正常对照组无显著性差异($P > 0.05$)。

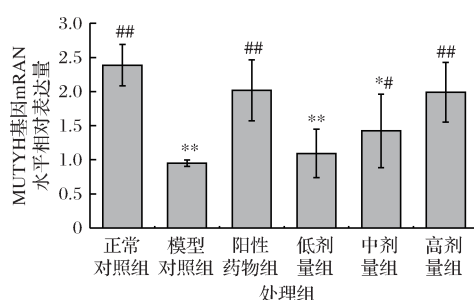


图 4 桑叶生物碱对小鼠肝脏 MUTYH mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effect of mulberry leaf alkaloids on MUTYH mRNA expression in mouse liver

结果表明,桑叶生物碱能增加 DNA BER 途径中 MUTYH 修复酶 mRNA 水平,且高剂量组 MUTYH mRNA 表达恢复与正常对照组无显著性差异的水平($P > 0.05$)。说明桑叶生物碱通过调控 MUTYH 的 mRNA 表达水平进而使 MUTYH 酶活水平升高而进行 DNA

氧化损伤修复的。

3 讨论与结论

近年来,桑叶因其营养价值和药理作用而引起研究者的广泛关注。生物碱类化合物是桑叶的重要活性成分之一,具有较好降糖、降脂等功能^[21-22],但其在对 DNA 氧化损伤的作用及机理鲜有报道。

实验动物注射外源性 D-Gal 后,机体会产生大量 ROS,造成生物大分子(蛋白质、脂质、DNA)的氧化损伤,是目前公认的造氧化应激模型的方法^[23]。本研究以 DNA 氧化损伤小鼠为考察对象,探讨不同剂量桑叶生物碱对 DNA 氧化损伤的改善作用及作用机理。当 DNA 的碱基受到 ROS 的攻击时,由于鸟嘌呤的分子轨道具有较高的能级,其第 8 位碳原子极易被氧化损伤而生成修饰碱基 8-OH-dG,进而发生 G : C→T : A 颠换突变^[24]。FEIG 等^[25]采用氧基试剂处理脱氧胞嘧啶三磷酸苷,并用阴离子交换高效液相色谱柱分离其反应产物后,通过人体免疫缺乏反转录酶插入含有靶位基因的 DNA 中,测定其产生的突变,证实了 DNA 另一种重要氧化损伤产物 5-OH-dC。同时也有研究发现 5-OH-dC 诱导 C→T 转换的突变率要大于其他氧化损伤产物^[26-27]。ULLAH 等^[28]研究表明,咖啡碱能降低机体 8-OH-dG 水平,改善 DNA 氧化损伤。本研究也发现,氧化应激小鼠血浆中 8-OH-dG、5-OH-dG 极显著高于正常小鼠,经灌胃不同剂量桑叶生物碱后,随着生物碱剂量的增加,8-OH-dG、5-OH-dG 呈现降低趋势,且有明显的量效关系,200 mg/(kg·BW)的桑叶生物将它们恢复至正常水平($P>0.05$),而且结果与 DNA ladder 的结果一致,说明桑叶生物碱对 DNA 氧化损害具有较好的修复作用。

DNA 是生命体重要的遗传物质,其完整性对维持机体健康具有重要意义。机体 DNA 损伤增加会导致基因变异、基因功能障碍及基因组不稳定,进而引发疾病,如肿瘤、多神经退行性疾病等^[29-30]。生物体自身存在多种对 DNA 损伤的修复系统,包括错配修复、核苷酸切除修复、BER 途径、同源重组等^[31]。BER 途径是生物体针对氧化损伤、烷基化等因素导致碱基变异的主要修复机制,涉及多个步骤、多种酶参与。BER 途径中的 MTH1 基因,主要负责在 DNA 复制前水解核苷酸池中氧化的 dGTP、GTP、dATP 和 ATP 产物,如 8-OHdGTP,从而防止其作为原料进入 DNA 链的复制过程,有效防止 A : T→G : C 的颠换^[32]。OGG1 基因,同时具有 AP 裂解酶和糖苷酶的活性,具有特异切除

8-OH-dG 的功能,它能启动 BER 修复系统^[33]。MAMBO 等^[34]研究发现,OGG1 mRNA 低表达与 DNA 氧化损伤修复减弱有关。MUTYH 基因,只具有糖苷酶的活性,主要负责切除 DNA 复制后与 8-OH-dG 错配的 A,进而阻止 G : C→T : A 的颠换^[35]。本研究表明,一定剂量的桑叶生物碱可促进 MTH1、OGG1、MUTYH mRNA 表达,同时能使 DNA 氧化损伤小鼠机体 MTH1、OGG1、MUTYH 的酶活力恢复至正常水平,进而改善小鼠 DNA 的氧化损伤水平。

综上所述,一定剂量的桑叶生物碱能显著改善 D-Gal 诱导小鼠 DNA 氧化损伤,具有较好的抗氧化作用,其作用机制可能是从转录水平调控 BER 途径中相关酶的活力从而修复 DNA 氧化损伤。该研究结果为桑叶生物碱抗氧化相关保健功能食品的开发提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] WANG T T, ZENG G C, LI X C, et al. *In vitro* studies on the antioxidant and protective effect of 2-substituted-8-hydroxyquinoline derivatives against H₂O₂-induced oxidative stress in BMSCs [J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2010, 75(2):214-222.
- [2] LI X, MAI W, CHEN D. Chemical study on protective effect against hydroxyl-induced DNA damage and antioxidant mechanism of myricitrin [J]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2014, 61(3):383-390.
- [3] 马骏,顾梦月,刘煜. DNA 修复酶 MTH1 抑制剂研究进展 [J]. *药学进展*, 2017, 41(2):65-75.
- [4] 蔡凌霄,曾昭睿,吴采樱. DNA 氧化损伤产物及其检测方法 [J]. *分析测试学报*, 2001, 20(5):88-93.
- [5] VISNES T, GRUBE M, HANNA B M F, et al. Targeting BER enzymes in cancer therapy [J]. *DNA Repair*, 2018, 71(11):118-126.
- [6] KOJIMA Y, KIMURA T, NAKGAWA K, et al. Effects of mulberry leaf extract rich in 1-deoxynojirimycin on blood lipid profiles in humans [J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2010, 47(2):155-161.
- [7] LI Y G, JI D F, ZHONG S, et al. 1-deoxynojirimycin inhibits glucose absorption and accelerates glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(7442):1-377.
- [8] 谢琼,谭德明,彭忠田,等. 脱氧野尻霉素抑制乙型肝炎病毒复制的体外实验研究 [J]. *中国感染控制杂志*, 2009, 8(1):3-6;17.
- [9] WANG R J, YANG C H, HU M L. 1-Deoxynojirimycin in-

- hibits metastasis of B16F10 melanoma cells by attenuating the activity and expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and altering cell surface glycosylation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (16): 8 988 – 8 993.
- [10] 王兴婷,王德萍,李层层,等. 桑叶 DNJ 提取物体外降血糖及抗氧化作用研究[J]. 食品科技, 2017(8):215–219.
- [11] 彭晓蝶. 桑叶生物碱粗提液对高脂饮食小鼠抗氧化作用及机理研究[D]. 重庆:西南大学,2018.
- [12] TANG L N, HUANG K, XIE J, et al. 1-Deoxynojirimycin from *Bacillus subtilis* improves antioxidant and antibacterial activities of juvenile *Yoshitomi tilapia*[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2017, 30:39–47.
- [13] 杨忠敏,王祖文,沈以红,等. 食源性桑叶生物碱在模拟胃肠消化过程中抗氧化及抗蛋白、DNA 氧化损伤[J/OL]. 食品与发酵工业:1-9[2019-06-02]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.019529>.
- [14] 杨忠敏,王祖文,黄先智,等. 桑叶生物碱对 D-半乳糖诱导小鼠生物大分子氧化损伤的改善作用及机理[J/OL]. 食品科学:1-10[2019-06-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20190517.1515.016.html>.
- [15] 于晨,董超然,张照辉,等. 8-羟基脱氧鸟嘌呤作为 DNA 氧化损伤标志物的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(13):1 267–1 270.
- [16] MULLINS E A, RODRIGUEZ A A, BRADLEY N P, et al. Emerging roles of DNA glycosylases and the base excision repair pathway[J]. Trends in Biochemical Science, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.04.006>.
- [17] DAVID S S, O'SHEA V L, KUNDU S. Base-excision repair of oxidative DNA damage[J]. Nature, 2007, 447 (7 147):941–950.
- [18] SUMAN S, PANDEY A, CHANDNA S. An improved non-enzymatic “DNA ladder assay” for more sensitive and early detection of apoptosis[J]. Cytotechnology, 2012, 64(1):9–14.
- [19] ARAI T, KELLY V P, MINOWA O, et al. The study using wild-type and Ogg1 knockout mice exposed to potassium bromate shows no tumor induction despite an extensive accumulation of 8-hydroxyguanine in kidney DNA[J]. Toxicology, 2006, 221(2-3):179–186.
- [20] ODA H, NAKABEPPU Y, FURUICHI M, et al. Regulation of expression of the human MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. Alternative splicing of transcription products[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272 (28):17 843–17 850.
- [21] 胡雪芹. 桑叶 1-脱氧野尻霉素降糖降脂机理及其产生菌的筛选[D]. 合肥:合肥工业大学,2017.
- [22] HU T G, WEN P, LINHARDT R J, et al. Mulberry: A review of bioactive compounds and advanced processing technology[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 83: 138–158.
- [23] DU Z, YANG Q, LIU L, et al. NADPH oxidase 2-dependent oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in the ventral cochlear nucleus of D-galactose-induced aging rats[J]. Neuroscience, 2015, 286:281–292.
- [24] SHI S S, JIA L P, MA R N, et al. A label-free electrochemical aptasensor for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine detection[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2015, 759:107–112.
- [25] FEIG D I, SOWERS L C, LOEB L A. Reverse chemical mutagenesis: Identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(14):6 609–6 613.
- [26] WOOD M L, DIZDAROGLU M, GAJEWSKI E, et al. Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome[J]. Biochemistry, 1990, 29(30):7 024–7 032.
- [27] CHENG K C, PERSTON B D, CAHILL D S, et al. The vinyl chloride DNA derivative N2,3-ethenoguanine produces G–A transitions in *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88(22):9 974–9 978.
- [28] ULLAH F, ALI T, ULLAH N, et al. Caffeine prevents D-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain[J]. Neurochemistry International, 2015, 90:114–124.
- [29] USMAN M, VOLPI E V. DNA damage in obesity: Initiator, promoter and predictor of cancer[J]. Mutation Research, 2018, 778:23–37.
- [30] AKKAYA Ç, YAVUZER S S, YAVUZER H, et al. DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione redox status in patients with Alzheimer's disease treated with and without memantine[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2017, 378:158–162.
- [31] MINTEN E V, YU D S. DNA repair: Translation to the clinic[J]. Clinical Oncology, 2019, 31:303–310.
- [32] RAI P, SOBOL R W. Mechanisms of MTH1 inhibition-induced DNA strand breaks: The slippery slope from the oxidized nucleotide pool to genotoxic damage[J]. DNA

- Repair, 2019, 77:18–26.
- [33] BOITEUX S, RADICELA J P. The human OGG1 gene: Structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2000, 377(1):1–8.
- [34] MAMBO E, CHATTERJEE A DE, SOUZA-PINTO N C, et al. Oxidized guanine lesions and hOgg1 activity in lung cancer[J]. Oncogene, 2005, 24(28):4 496–4 508.
- [35] BANDA D M, NUÑEZ N N, BURNSIDE M A, et al. Repair of 8-oxoG:A mismatches by the MUTYH glycosylase: Mechanism, metals and medicine[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2017, 107:202–215.

Repairing effects and underlying mechanisms of mulberry leaf alkaloids on *D*-galactose-induced DNA oxidative damage in mice

YANG Zhongmin¹, SHEN Yihong², HUANG Xianzhi², DING Xiaowen^{1*}

1(Chongqing Key Laboratory of Agricultural Products Processing and Store, National Demonstration Center for Experimental Food Science and Technology Education, College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

2 (Science and Technology Department, Southwest University, Chongqing 400716, China)

ABSTRACT In order to provide a theoretical basis for developing and utilizing mulberry leaf alkaloids, the resistance of mulberry leaf alkaloids on DNA oxidative stress in mice was analyzed. A DNA oxidative damage model was induced by *D*-Gal and different doses of mulberry alkaloids were administered. At the end of the 8th week, the contents of 8-OH-dG and 5-OH-dC, enzyme activities of MTH1, OGG1 and MUTYH in plasma, the liver DNA ladder results and the expressions of MTH1, OGG1 and MUTYH mRNA in liver tissue were detected. Compared with the control, the plasma 8-OH-dG and 5-OH-dC in mice significantly decreased by 65.35% and 59.13%, respectively, after intragastric administration of the highest dose of mulberry leaf alkaloids (200 mg/kg · BW) ($P < 0.01$). Moreover, the activities of MTH1, OGG1 and MUTYH in plasma increased by 37.09%, 134.44% and 114.29%, respectively, and their mRNA levels in liver increased by 192.35%, 103.96% and 109.36%, respectively ($P < 0.01$). In addition, there was no DNA ladder observed in liver in the highest dose mulberry leaf alkaloid group ($P > 0.05$). Therefore, mulberry leaf alkaloids have good repairing effects on *D*-Gal-induced DNA oxidative damage, and the mechanisms may be due to regulating relevant enzyme activity at transcription level through BER pathway.

Key words mulberry leaf alkaloid; *D*-galactose; DNA; oxidative damage; base excision repair