

## 牡丹籽油对环磷酰胺致小鼠遗传毒性和肝损伤的保护作用

彭安芳, 郭慧鹏, 冯秀宽, 谷佳

(南京大学金陵学院, 南京 210089)

**摘要:**通过骨髓微核实验、精子畸形实验和肝损伤保护实验测定小鼠骨髓微核率、精子畸形率, 肝组织中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)等指标, 探讨牡丹籽油(PSO)对环磷酰胺(CTX)致小鼠遗传毒性和肝损伤的保护作用。结果表明:低、中、高剂量 PSO 组的骨髓微核率和精子畸形率均显著低于模型组 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, PSO 低剂量组对 AST 的降低无显著作用 ( $P > 0.05$ ), 阳性对照(联苯双酯)组和中、高剂量组对 AST、ALT、MDA 水平均有显著降低作用 ( $P < 0.05$ ), 对 GSH、GSH-Px、SOD 水平的升高作用达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。说明牡丹籽油对环磷酰胺致小鼠遗传毒性和肝损伤有明显的保护作用。

**关键词:**牡丹籽油; 环磷酰胺; 遗传毒性; 肝损伤

中图分类号: TS225.1; R114

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)10-0074-04

### Protective effects of peony seed oil on cyclophosphamide – induced genotoxicity and liver injury in mice

PENG Anfang, GUO Huipeng, FENG Xiukuan, GU Jia

(Jinling College, Nanjing University, Nanjing 210089, China)

**Abstract:** To study the protective effects of peony seed oil (PSO) on cyclophosphamide (CTX) – induced genotoxicity and liver injury in mice, micronucleus test, sperm abnormality test and liver injury protection test were used to determine micronucleus rate, sperm malformation rate of mice, and alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in liver tissue of mice. The results showed that the micronucleus rate and sperm malformation rate of mice in PSO low, medium and high dose groups were significantly lower than those in model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, PSO low dose group had no significant effects on the reduction of AST ( $P > 0.05$ ), the bifendate group and PSO medium and high dose groups had significant effects on the reduction of AST, ALT and MDA levels ( $P < 0.05$ ) and had significant effects on the increase of GSH, GSH-Px and SOD levels ( $P < 0.05$ ). In summary, PSO had significant protection effect on cyclophosphamide – induced genotoxicity and liver injury in mice.

**Key words:** peony seed oil; cyclophosphamide; genotoxicity; liver injury

牡丹籽油(PSO)营养丰富独特, 不饱和脂肪酸含量达 90.74%, 其中以亚麻酸为主, 占 39.47%,

油酸和亚油酸分别占 24.11% 和 27.16%, 且富含多种人体必需微量元素<sup>[1]</sup>。毒理学实验表明, 牡丹籽油无急性毒性、遗传毒性和亚急性毒性, 具有较高的食用安全性<sup>[2-3]</sup>。近年研究结果发现, 牡丹籽油具有抗氧化<sup>[4-5]</sup>, 辅助降血脂<sup>[6]</sup>、降血糖<sup>[7]</sup>、保肝护肝<sup>[8]</sup>等作用, 具有较高的营养价值和保健功能。我

收稿日期: 2018-03-13; 修回日期: 2018-07-26

作者简介: 彭安芳(1981), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为毒理学(E-mail) aileenpaf@163.com。

国2011年3月22日发布《卫生部关于批准元宝枫籽油和牡丹籽油作为新资源食品的公告》，批准牡丹籽油为新资源食品<sup>[9]</sup>。

环磷酰胺(CTX)是一种烷化剂,被广泛应用于肿瘤化疗中,其主要的不良反应包括骨髓抑制、生殖毒性及肝损伤等<sup>[10]</sup>。本研究采用环磷酰胺作为复制小鼠遗传毒性和肝损伤模型的造模剂,观察牡丹籽油对环磷酰胺致小鼠遗传毒性和肝损伤的保护作用,探讨牡丹籽油的功能作用,旨在为新资源食品牡丹籽油的进一步开发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 药品

牡丹籽油,由菏泽尧舜牡丹生物科技有限公司提供,产品标准号:Q/YSMO 0001S,生产许可证号:QS371702011331。

注射用环磷酰胺,购自山西普德药业有限公司,产品批号:04150601。

#### 1.1.2 实验动物

昆明种健康小白鼠,购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2017-0001。饲养条件:室温22~26℃,通风,相对湿度50%~70%,每日光照12h,自由摄食饮水。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 小鼠骨髓微核率测定

##### 1.2.1.1 灌胃染毒

小白鼠50只,雌雄各半,体重18~20g,适应性喂养1周后,按体重随机分为正常对照组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组10只,雌雄各半。每组按等体积灌胃法分别给以生理盐水、CTX溶液和低、中、高剂量的PSO与CTX混合液(表1)。每天灌胃1次,连续4d,于最后一次灌胃后24h颈椎脱臼法处死。

表1 骨髓微核实验设计(n=10)

组别	受试物	灌胃剂量
正常对照组	生理盐水	0.7 mL
模型组	环磷酰胺	35 mg/kg
低剂量组	牡丹籽油 + 环磷酰胺	1.25 g/kg + 35 mg/kg
中剂量组	牡丹籽油 + 环磷酰胺	2.50 g/kg + 35 mg/kg
高剂量组	牡丹籽油 + 环磷酰胺	5.00 g/kg + 35 mg/kg

##### 1.2.1.2 制片及骨髓微核率测定

取小白鼠胸骨,在洁净载玻片上滴一滴小牛血清,将骨髓挤入小牛血清,混合均匀后推片。晾干并放入染色缸中,甲醇固定15min,晾干后将推片放入临时制备的新鲜吉姆萨(Giemsa)染液中,染色10

min,显微镜观察计数,每鼠计数1000个骨髓嗜多染红细胞(PCE),并计算微核率。

#### 1.2.2 小鼠精子畸形率测定

##### 1.2.2.1 灌胃染毒

小白鼠50只,体重25~30g,适应性喂养1周后随机分为正常对照组、模型组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组10只,雄性。各组按等体积灌胃法分别给以生理盐水、CTX溶液和低、中、高剂量的PSO与CTX混合液(表2)。每天灌胃1次,连续5d,之后正常饲养30d,自由饮食饮水,于首次染毒后的第35天颈椎脱臼法处死。

表2 精子畸形实验设计(n=10)

组别	受试物	灌胃剂量
正常对照组	生理盐水	0.7 mL
模型组	环磷酰胺	30 mg/kg
低剂量组	牡丹籽油 + 环磷酰胺	1.25 g/kg + 30 mg/kg
中剂量组	牡丹籽油 + 环磷酰胺	2.50 g/kg + 30 mg/kg
高剂量组	牡丹籽油 + 环磷酰胺	5.00 g/kg + 30 mg/kg

##### 1.2.2.2 制片及精子畸形率测定

取出小白鼠两侧附睾,分离附睾尾部包膜,置于玻片上轻轻挤压,与适量生理盐水混匀后涂片。待涂片干燥后,放入甲醇液中干燥5min,取出晾干。将涂片于1%伊红溶液中染色15min,用自来水轻轻冲洗,晾干后于显微镜下观察计数,计算精子畸形率。

##### 1.2.3 肝损伤保护实验

小白鼠60只,雌雄各半,体重20~25g,适应性喂养1周后随机分为正常对照组(10只)和CTX模型组(50只),分别灌胃给以0.7mL生理盐水和0.7mL生理盐水+30mg/kgCTX,连续经口灌胃7d后,将CTX组小鼠随机分为5组,每组10只,分别为模型组、阳性对照(联苯双酯)组、PSO低、中、高剂量组(表3)。

表3 肝损伤保护实验设计(n=10)

组别	受试物	灌胃剂量
正常对照组	生理盐水	0.7 mL
模型组	环磷酰胺 + 生理盐水	30 mg/kg + 0.7 mL
阳性对照组	环磷酰胺 + 联苯双酯	30 mg/kg + 15.00 g/kg
低剂量组	环磷酰胺 + 牡丹籽油	30 mg/kg + 1.25 g/kg
中剂量组	环磷酰胺 + 牡丹籽油	30 mg/kg + 2.50 g/kg
高剂量组	环磷酰胺 + 牡丹籽油	30 mg/kg + 5.00 g/kg

各组按对应剂量每天灌胃1次,连续7d,在末次给予受试物24h后,处死小白鼠,分离肝脏,制备肝匀浆液。采用酶联免疫吸附法测定肝组织中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、还原型谷胱甘肽

(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)等指标。

#### 1.2.4 统计学分析

利用 IBM SPSS Statistics 22 软件对实验数据进行  $t$  检验和单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异显著性判断标准, 结果用“平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )”表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 牡丹籽油对环磷酰胺致小鼠骨髓微核率的影响(见表4)

表4 牡丹籽油对环磷酰胺致小鼠骨髓微核率的影响

组别	微核数(个)	PCE(个)	微核率/%
正常对照组	1.65 $\pm$ 0.50	1 011	0.165 $\pm$ 0.50
模型组	32.33 $\pm$ 2.39 <sup>#</sup>	1 003	3.233 $\pm$ 2.39 <sup>#</sup>
低剂量组	5.89 $\pm$ 1.85 <sup>*</sup>	1 007	0.589 $\pm$ 1.85 <sup>*</sup>
中剂量组	6.23 $\pm$ 1.24 <sup>*</sup>	1 010	0.623 $\pm$ 1.24 <sup>*</sup>
高剂量组	6.46 $\pm$ 1.63 <sup>*</sup>	1 005	0.646 $\pm$ 1.63 <sup>*</sup>

注:与正常对照组相比, # $P < 0.05$ ;与模型组相比, \*  $P < 0.05$ ;下同。

由表4可以看出,与正常对照组相比,模型组的微核率显著升高( $P < 0.05$ ),说明环磷酰胺导致小鼠骨髓微核率显著增加,造模成功;低、中、高剂量组

的微核率显著低于模型组( $P < 0.05$ ),提示牡丹籽油对环磷酰胺导致小鼠骨髓微核率升高有明显保护效应;而3个剂量组之间微核率没有显著差别( $P > 0.05$ )。

### 2.2 牡丹籽油对环磷酰胺致小鼠精子畸形率的影响(见表5)

表5 牡丹籽油对环磷酰胺致小鼠精子畸形率的影响

组别	精子畸形数(个)	精子畸形率/%
正常对照组	22.20 $\pm$ 4.31	2.41 $\pm$ 0.95
模型组	109.83 $\pm$ 10.03 <sup>#</sup>	10.12 $\pm$ 2.58 <sup>#</sup>
低剂量组	42.25 $\pm$ 2.63 <sup>*</sup>	6.07 $\pm$ 0.82 <sup>*</sup>
中剂量组	40.63 $\pm$ 3.61 <sup>*</sup>	5.97 $\pm$ 0.93 <sup>*</sup>
高剂量组	47.25 $\pm$ 6.64 <sup>*</sup>	6.61 $\pm$ 0.68 <sup>*</sup>

由表5可以看出,模型组的精子畸形率显著高于正常对照组( $P < 0.05$ ),说明环磷酰胺能使小鼠精子畸形率显著升高;低、中、高剂量组的精子畸形率显著低于模型组( $P < 0.05$ ),提示牡丹籽油对环磷酰胺导致小鼠精子畸形率升高有明显保护作用;而3个剂量组之间精子畸形率没有显著差别( $P > 0.05$ )。

### 2.3 牡丹籽油对环磷酰胺致小鼠肝损伤作用的影响(见表6)

表6 牡丹籽油对环磷酰胺致小鼠肝损伤作用的影响

组别	AST/(U/g)	ALT/(U/g)	GSH/(g/L)	GSH-Px(活力单位)	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)
正常对照组	5.01 $\pm$ 0.97	4.40 $\pm$ 0.96	13.21 $\pm$ 1.50	97.65 $\pm$ 1.52	9.97 $\pm$ 1.04	75.02 $\pm$ 1.97
模型组	11.80 $\pm$ 1.38 <sup>#</sup>	16.21 $\pm$ 1.55 <sup>#</sup>	6.54 $\pm$ 1.13 <sup>#</sup>	26.55 $\pm$ 0.43 <sup>#</sup>	33.04 $\pm$ 1.36 <sup>#</sup>	51.01 $\pm$ 1.19 <sup>#</sup>
阳性对照组	6.50 $\pm$ 0.65 <sup>*</sup>	6.75 $\pm$ 0.95 <sup>*</sup>	11.15 $\pm$ 0.81 <sup>*</sup>	85.25 $\pm$ 3.53 <sup>*</sup>	12.28 $\pm$ 1.16 <sup>*</sup>	69.15 $\pm$ 1.47 <sup>*</sup>
低剂量组	10.22 $\pm$ 1.13	10.95 $\pm$ 1.58 <sup>*</sup>	9.27 $\pm$ 0.44 <sup>*</sup>	67.84 $\pm$ 3.53 <sup>*</sup>	14.45 $\pm$ 1.07 <sup>*</sup>	62.26 $\pm$ 2.50 <sup>*</sup>
中剂量组	8.28 $\pm$ 0.71 <sup>*a</sup>	10.73 $\pm$ 1.01 <sup>*</sup>	8.94 $\pm$ 0.31 <sup>*</sup>	65.27 $\pm$ 4.28 <sup>*</sup>	15.02 $\pm$ 0.60 <sup>*</sup>	62.07 $\pm$ 1.73 <sup>*</sup>
高剂量组	6.77 $\pm$ 1.30 <sup>*ab</sup>	10.61 $\pm$ 0.78 <sup>*</sup>	8.89 $\pm$ 0.50 <sup>*</sup>	64.77 $\pm$ 3.84 <sup>*</sup>	14.23 $\pm$ 2.19 <sup>*</sup>	63.45 $\pm$ 1.86 <sup>*</sup>

注:a表示与低剂量组比较  $P < 0.05$ ;b表示与中剂量组比较  $P < 0.05$ 。

由表6可以看出,与正常对照组比较,CTX模型组肝组织AST、ALT、MDA水平显著升高( $P < 0.05$ ),GSH、GSH-Px、SOD水平显著降低( $P < 0.05$ ),说明肝损伤模型复制成功。与模型组相比,除低剂量组对AST的降低无显著作用( $P > 0.05$ )外,阳性对照组和中、高剂量组对AST、ALT、MDA水平均有显著降低作用( $P < 0.05$ ),对GSH、GSH-Px、SOD水平的升高作用达到显著水平( $P < 0.05$ )。这表明牡丹籽油对于清除自由基、减少脂质过氧化起到了积极作用,对环磷酰胺导致的小鼠肝损伤有明显的保护效果。牡丹籽油各剂量组间比较显示,中、高剂量组降低AST水平的作用显著强于低剂量组,高剂量组降低AST水平的作用显著强于中剂量组( $P < 0.05$ );各剂量组对其余指标的影响在组间

无明显差异( $P > 0.05$ )。

## 3 结论

通过骨髓微核实验、精子畸形实验及肝保护实验,发现牡丹籽油对环磷酰胺致小鼠遗传毒性和肝损伤有明显的保护作用,适宜进行广泛的开发利用。本研究所设置的牡丹籽油各剂量组对环磷酰胺致遗传毒性和肝毒性的保护作用在组间没有很明显的强弱差异,其剂量反应关系与确切的作用机制,尚待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 翟文婷,朱献标,李艳丽,等.牡丹籽油成分分析及其抗氧化活性研究[J].烟台大学学报(自然科学与工程版),2013,26(2):147-150.

(下转第81页)

可在细胞层面增强健康小鼠脾淋巴细胞的免疫功能,以效应T细胞和吞噬细胞为主的迟发性变态反应结果也证明薏苡仁油也在一定程度上调节健康小鼠的细胞免疫功能;另一方面,薏苡仁油升高血清溶血素水平和增强抗体生成,说明在健康小鼠的体内环境下,经口灌胃的薏苡仁油也能通过增加小鼠的抗SRBC抗体生成,从而在体液免疫上发挥作用;NK细胞又称自然杀伤细胞,是先天免疫的核心组成部分,属于非特异性免疫,其活性水平的上升说明经口灌胃的薏苡仁油可诱导激活健康小鼠的先天免疫功能,从而迅速发挥增强免疫作用;但经口灌胃的薏苡仁油并未影响巨噬细胞的吞噬清除能力,说明薏苡仁油未在此非特异性免疫方面起到促进作用;薏苡仁油的安全性也得到过证明<sup>[13]</sup>,对机体体重、器官、脏器无毒性,同时本文采用灌胃给药方式,相比于静脉给药和腹腔注射给药方式更安全合理。

### 3 结论

本文以薏苡仁油连续经口灌胃小鼠30 d,食用植物油为对照、测定胸腺指数与脾指数,并进行血清溶血素实验、抗体生成细胞检测、脾淋巴细胞转化实验、NK细胞活性实验、迟发性变态反应实验、碳廓清实验和腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验。发现高剂量组(1.00 g/kg)能显著增强脾淋巴细胞增殖能力和迟发性变态反应,升高血清溶血素水平,增强抗体生成能力和NK细胞活性。说明薏苡仁油具有增强小鼠免疫力的作用。

### 参考文献:

[1] UKITA T, TANIMURA A. Studies on the antitumor component in the seeds of *Coix lachryma-jobi* L. var. *mayuen* (Roman.) Stapf. isolation and antitumor activity of coixenolide [J]. Chem Pharm Bull, 1961, 9(1): 43-46.

(上接第76页)

[2] 朱文学,李欣,刘少阳,等. 牡丹籽油的毒理学研究[J]. 食品科学, 2010, 31(11):248-251.

[3] 周海梅,马锦琦,杨志勇,等. 牡丹籽油对大、小鼠的毒性试验[J]. 毒理学杂志, 2009(3):256.

[4] 张萍. 牡丹籽油的制备、纯化、成分分析及功效评价[D]. 北京:首都师范大学,2009.

[5] 杨鹿,王洪新,苏建辉,等. 牡丹籽油优势抗氧化剂研究[J]. 中国油脂, 2015, 40(2):46-49.

[6] 苏建辉. 牡丹籽油及其复方降血糖、降血脂活性及机理研究[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2016.

[2] TOKUDA H, MATSUMOTO T, KONISHIMA T, et al. Inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation and anti-tumor promoting activities of coix seed[J]. Planta Medica, 1990, 56(6): 653-654.

[3] 张栋霞,张涛. GC/MSD分析薏苡仁油组份[J]. 粮食与油脂, 2001(1): 42-43.

[4] 陈碧莲,祝明,陈勇,等. GC-MS分析薏苡仁油中不皂化物的主要成分[J]. 中成药, 2009, 31(6): 953-954.

[5] 谢春英,林乐维. 超临界CO<sub>2</sub>流体萃取薏苡仁油的GC-MS分析[J]. 中药材, 2011, 34(8): 1234-1236.

[6] 吴岩,潘沛,王彧杰,等. 康莱特注射液对Lewis肺癌小鼠免疫功能的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2009, 29(12): 1455-1458.

[7] 景俊杰,李小玲,南月清,等. 康莱特注射液对肿瘤治疗的作用研究进展[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(11): 1447-1448.

[8] 张荣标,陈润,陈冠敏. 灵芝多糖对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 预防医学论坛, 2012, 12(5): 916-920.

[9] 张迅捷,陈冠敏,陈润. 紫菜多糖对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 现代预防医学, 2017, 14(3): 2601-2603.

[10] 陆蕴,张仲苗,章荣华. 薏苡仁油抗肿瘤作用研究[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(6): 21-23.

[11] 姚玉龙,陈秀华,任文龙,等. 康莱特软胶囊对小鼠的免疫促进作用研究[J]. 中药新药和临床药理, 2002, 13(4): 233-235.

[12] 肖小年,易海斌,郭焯,等. 薏苡仁油微乳对雄性小鼠脏器的影响[J]. 南昌大学学报(理科版), 2012, 36(1): 65-68.

[13] 范伟忠,章荣华,傅剑云. 薏苡仁油的毒性研究及安全性评价[J]. 上海预防医学杂志, 2000, 12(4): 178-179.

[7] 董振兴,彭代银,宣自华,等. 牡丹籽油降血脂、降血糖作用的实验研究[J]. 安徽医药, 2013, 17(8):1286-1288.

[8] 翟文婷,朱献标,李艳丽,等. 牡丹籽油对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国油脂, 2013, 38(11):43-45.

[9] 朱宗磊,王凤山,毛文岳. 新资源食品牡丹籽油[J]. 食品与药品, 2014(2):62-65.

[10] 徐婧,张卓莉. 环磷酰胺治疗自身免疫疾病中的不良反应及防治[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(15):143-144.