

Grape Seed Proanthocyanidin Protects Zebrafish' Early Stage Embryos from the Damage of UVB Irradiation

Zaili LUO, Wenwen WANG, Haibin ZHAO, Yongxiang SHI*

Shandong Provincial Key Laboratory Of Animal Cells and Developmental Biology, School of Life Science, Shandong University, Jinan, China 250100 Email:shivx@sdu.edu.cn

Abstract: Grape seed proanthocyanidin is a class of polyphenolic compounds with strong anti-oxidation. To study the protection of grape seed proanthocyanidin on zebrafish's early stage embryos from the damage of UVB irradiation, grape seed extract (GSE)(1 mg/ml) was injected into fertilized eggs before they were treated with UVB (36 mJ/cm²). We found that the survival rate was significantly higher and the rate of abnormalities was lower in the GSE-treated embryos than in the untreated group. After UVB irradiation, a variety of abnormal embryos occurred, the total antioxidative capacity decreased, SOD and CAT activities changed. While in the GSE-treated embryos, the total antioxidative capacity, SOD and CAT activities changed greatly. Our study provided evidence for GSE's further extensive application as an antioxidant.

Keywords: UVB; grape seed extract; oxidative damage; embryonic development; zebrafish

葡萄籽原花青素对紫外损伤斑马鱼早期胚胎的保护作用

罗在礼,王雯雯,赵海滨,时永香•

山东大学,生命科学学院,山东省动物细胞与发育生物学重点实验室,济南,中国 250100 Email: shiyx@sdu.edu.cn

摘 要: 葡萄籽提取物 (grape seed extract, GSE) 含有丰富的多酚化合物原花青素,抗氧化能力强。 斑马鱼受精卵注射 GSE 后,接受 36 mJ/cm² 的 UVB 照射,研究葡萄籽原花青素对 UVB 损伤斑马鱼胚 胎的保护作用。结果表明: UVB 照射导致胚胎存活率降低和各种畸形胚出现,使总抗氧化活力降低和 SOD、CAT 酶活力水平变化;GSE 注射组胚胎比未注射组 UVB 照射后存活率显著增加而畸形率降低, 总抗氧化活力、SOD 和 CAT 水平变化显著。该研究为葡萄籽原花青素的广泛应用提供了理论基础。

关键词: UVB; 葡萄籽提取物; 氧化损伤; 胚胎发育; 斑马鱼

1 引言

葡萄籽提取物(grape seed extract, GSE)主要成分 原花青素(proanthocyanidin)是一类由黄烷-3-醇缩合而 成的聚多酚类物质。在 GSE 中,原花青素含量高达 95%,具有很强的抗氧化作用,在体内其抗氧化、消 除自由基的能力是维生素 C 的 50 倍、维生素 E 的 20 倍^[1]。Jacqueline 等研究表明 GSE 中的原花青素抗氧 化能力与浓度、结构、聚合度及类黄酮环上的取代基 团有关^[2]。原花青素具有广泛的生理活性如抑制脂质 过氧化、防治心血管疾病、抗突变和衰老等[3,4]。

紫外线(ultraviolet, UV)是一种重要的与地球生物 密切相关的环境因素,适量照射可维持生物体正常生 命活动^[5]。在过去几十年中,大气中UV特别是UVB(波 长290-320 nm)照射明显增加,对生物体产生损害,主 要是破坏DNA和蛋白质等生物大分子的结构^[6]。当机 体表皮所含的色基吸收了UVB后,在多种酶和过渡金 属离子参与下生成活性氧物质(Reactive oxygen species, ROS),造成机体氧化性损伤,导致细胞凋亡^[7]。

正常细胞有比较完备的抗活性氧防御体系,包括: 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和金属蛋白等^[8]。生理状态下细胞产生少量的ROS,可被胞内的抗氧化酶如

资助信息:国家自然科学基金面上项目(30570199);山东省自然 科学基金重点项目(Z2007D07);山东省科技发展计划项目 (2008GG30008012);山东大学自主创新基金专项 (IIFSDU2009TS077)

SOD、CAT和GSH-Px清除。SOD是一种特殊的金属酶, 它能催化超氧阴离子自由基发生歧化反应;过氧化氢 酶(CAT)又称为触酶,是以铁卟啉为辅基的结合酶, 可促使H₂O₂分解为分子氧和水,从而使细胞免遭H₂O₂ 的毒害,是生物防御体系的关键酶之一。细胞中多种 抗活性自由基物质的存在有效地清除机体内超氧阴离 子自由基,是生物体重要的细胞防御机制之一^[9]。

本文以斑马鱼(Danio rerio)为模式动物,通过考察 胚胎发育和细胞抗氧化能力研究葡萄籽原花青素对紫 外损伤斑马鱼早期胚胎的保护作用,为环境保护生物 学提供借鉴。

2 材料与方法

2.1 实验动物

AB系斑马鱼由中科院水生所贺江燕研究员惠赠。

2.2 主要仪器与试剂

荧光倒置显微镜(TE2000, Nikon),紫外灯管 (K53-15H, 30W,南京华强电子有限公司),显微注射 系统(德国Eppendorf),葡萄籽原花青素(宁波杰顺生物 科技有限公司),SOD、CAT、MDA、总抗氧化酶活 测定试剂盒(南京建成试剂公司)。

2.3 斑马鱼饲养及繁育

水温28℃,控制光周期,14h光照,10h黑暗。每两天换曝气自来水一半,饲料为人工海水中孵化的丰 年虾。受精卵于28℃预热的1/10 Holfreter液中孵化。

2.4 显微注射原花青素及 UVB 照射

收集斑马鱼受精卵,每组50个受精卵,采用显微 注射的方式,分别对0-1 hfp时期的胚胎注射2 nl浓度为 1 mg/ml的GSE,胚胎发育到囊胚期(约2-3 h)和原肠中 期(约6-7 h)时采用36 mJ/cm² UVB照射。

2.5 抗氧化活力及相关酶活测定

每组取20颗胚胎,放入匀浆器中加入pH 8.0的 Tris-HCl缓冲液,胚胎和Tris-HCl以质量体积比 1g:29mL混合,冰浴匀浆。将匀浆物在4℃离心机中 3500 r/min离心15 min后,取上清液测定总抗氧化活力 (T-AOC)、SOD酶活、CAT酶活和MDA含量。

3 结果



3.1 GSE 和 UVB 照射对斑马鱼胚胎发育的影响

受精卵注射 GSE,发育至囊胚和原肠胚分别进行 UVB 照射,存活率及畸形率统计结果见图 1 和图 2。

36 mJ/cm²紫外照射后,斑马鱼胚胎存活率显著降低(图 1)。注射了葡萄籽原花青素的胚胎在接受同等剂量的紫外照射时,存活率比未注射组明显提高。同时,原肠胚紫外处理组(UVB 组和 GSE+UVB 组)存活率明显低于囊胚期的。

此剂量紫外照射后,胚胎畸形率显著提高(图 2), 原肠胚产生畸形胚胎数量多于囊胚期的。注射 GSE 也 导致了一定数量畸胚的产生。

紫外照射产生畸胚类型较多(图 3),大体上分为 五类:不能出膜型,尾部畸形,腹部畸形,背部畸形, 头部畸形,全身畸形。其中,尾部畸形属于损伤较轻 的类型,一般能存活并长成成鱼。较严重的损伤表现 为骨骼的损伤及头腹部损伤。



Figure 1. Survival rate of blastula and gastrula, P<0.05. 图 1. 囊胚和原肠胚存活率, P<0.05。



 Figure 2. Rate of abnormalities in blastula and gastrula, P<0.05.</td>

 图 2. 囊胚和原肠胚畸形率, P<0.05。</td>





Figure 3. Different types of malformed zebrafish caused by UVB irradiation. A: normal embryos, B-J: abnormal embryos. 图 3. 紫外照射后出现的斑马鱼不同类型畸形胚胎, A: 正常胚 胎, B-J: 畸形胚胎。

3.2 UVB 照射和注射 GSE 对斑马鱼胚胎抗氧化 活力和相关酶活的影响

3.2.1 总抗氧化活力

受精卵注射 GSE,发育至囊胚和原肠胚分别进行 UVB 照射,10 hpf,24 hpf,36 hpf 时期分别取胚胎匀 浆处理,测定总抗氧化活力,结果见图 4。

胚胎发育至 10 hpf 期时,紫外照射组胚胎抗氧化 活力明显降低,发育到 24 hpf 抗氧化活力降低得更为 明显。但胚胎发育至 36 hpf 时,测得抗氧化活力并无 显著性差异。而注射了原花青素组胚胎在紫外照射后, 发育至 10 hpf 胚胎总抗氧化力与 UVB 组相比并无显



Figure 4. Total antioxidant capacity (T-AOC) in blastula and gastrula of zebrafish after UVB irradiation. "a" stands for the significant difference with the control group, "b" stands for the significant difference with the UVB group. The same bellows. *P*<0.05.



著性差异,发育到 24 hpf 时总抗氧化力显著提高;发 育到 36 hpf 时,与对照组(cont 组)和 UVB 组相比,总 抗氧化力并无显著性差异。

3.2.2 SOD 酶活

受精卵注射 GSE,发育至囊胚和原肠胚分别进行 UVB 照射,10 hpf,24 hpf,36 hpf 时期分别取胚 胎匀浆处理,测定 SOD 酶活力水平,统计结果见图 5。



and gastrula of zebrafish after UVB irradiation. *P*<0.05. 图 5. 囊胚和原肠胚 UVB 处理后 SOD 酶活水平。*P*<0.05。

胚胎发育至 10 hpf 时,实验强度紫外照射显著 地降低了 SOD 酶活,而注射 GSE 后囊胚期 SOD 酶活 有所上升;胚胎发育至 24 hpf 时注射 GSE 组,SOD 酶活亦显著高于对照组;胚胎发育到 36 hpf 时,三个 处理组,SOD 酶活相差并不明显(囊胚 SOD 酶活虽有 显著性差异,但与 24 hpf 时期相比变化较小)。

3.2.3 CAT 酶活

受精卵注射 GSE,发育至囊胚和原肠胚分别进行 UVB 照射,10 hpf,24 hpf,36 hpf 时期分别取胚胎勾 浆处理,测定 CAT 酶活,统计结果见图 6。



Figure 6. Activity of catalase (CAT) in blastula and gastrula of zebrafish after UVB irradiation. *P*<0.05. 图 6. 囊胚和原肠胚 UVB 处理后 CAT 酶活水平。*P*<0.05。

紫外照射导致 10 hpf 期胚胎的 CAT 活性明显降低;发育至 24 hpf 时,UVB 组 CAT 活性显著高于另外两组,注射 GSE 照射组酶活降低;而发育到 36 hpf时,两个时期的各处理组 CAT 活性差异不大。CAT 酶活力的变化大体与 SOD 酶活力变化相一致。

3.2.4 MDA 含量

受精卵注射 GSE,发育至囊胚和原肠胚分别进行 UVB 照射,10 hpf,24 hpf,36 hpf 时期分别取胚胎匀 浆处理,测定 MDA 含量,统计结果见图 7。

10 hpf 和 24 hpf 时期 UVB 组胚胎, MDA 含量显 著高于对照组; UVB+GSE 组胚胎 MDA 含量与 UVB 组相比显著降低。胚胎发育至 36 hpf 期时,囊胚期和 原肠期各处理组 MDA 含量均无显著性变化(图 7)。



Figure 7. Malonaldehyde (MDA) content in blastula and gastrula of zebrafish after UVB irradiation. *P*<0.05. 图 7 囊胚和原肠胚 UVB 处理后胚胎 MDA 含量变化。*P*<0.05。

4 讨论

UVB 照射破坏 DNA 和蛋白质等生物大分子结构 从而损伤生物体^[10]。在我们研究的 UVB 照射强度下 可能胚胎基因表达变化导致大量死胚和畸胚。

有研究表明紫外照射产生的 ROS 导致线粒体、 核 DNA 等细胞元件的氧化性损伤,UVB 是皮肤晒伤 及皮肤肿瘤的主要诱发因素^[11]。Scully 等人认为 UVB 照射机体,由于吸收了溶解有机碳(DOC)而释放一些 过渡态的光化学因子^[12],更持久的光化学因子 H₂O₂ 导致了细胞内的过氧化状态^[8]。Kim 和 Friedberg 等认 为 UV 照射主要产生环丁烷嘧啶二聚体(CPDs)和 6-4 嘧啶光产物(6-4PPs)及其异构体这两种光产物,这两类 化合物可使 DNA 螺旋不同程度的弯曲或扭结^[8,13],导 致产生突变以及影响 DNA 的复制与转录,进而影响 细胞和生物组织的正常生长和发育,引起细胞异常凋 亡和发育畸型[14]。

我们的研究中当胚胎注射 GSE 后再进行紫外照 射,显著提高了胚胎存活率,并使畸胎率降低(图 1, 2)。可能的原因是当斑马鱼胚胎注射 GSE 后,提高了 胚胎的抗紫外损伤能力,表明 GSE 对斑马鱼胚胎有抗 紫外损伤保护作用。另外,囊胚期和原肠期是斑马鱼 胚胎发育过程中较为重要的两个时期,原肠胚处于胚 层分化与形成过程中,对外界变化更为敏感。因此, UVB 照射导致原肠胚更高的死亡率和畸形率。

Richard 等认为机体通过启动相关基因表达对损 伤进行修复,同时抑制相关抗氧化酶的超量表达[15]。 尹进等研究葡萄籽原花青素提取物结果降低小鼠血清 中 MDA 含量,提高 SOD 和 GSH-Px 酶活性^[16]。我们 的抗氧化活力及相关酶活测定结果(图 4-7)表明: 与对 照组相比,注射 GSE 并没有明显增加胚胎照射紫外后 在 10 hpf 时的总抗氧化活力和 CAT 酶活力,而 MDA 含量相对于紫外照射组胚胎显著降低。可能机制是 GSE 作为抗氧化剂降低 ROS 对胚胎的损伤,此时尚 未激活胚胎机体本身的抗氧化系统的抗氧化力。当胚 胎发育到 24 hpf 时, GSE+UVB 组 SOD、CAT、MDA 含量比 UVB 组胚胎显著降低,而总抗氧化活力显著 提高,表明 GSE 能够调节抗氧化酶系水平, 颉抗紫外 照射导致氧化损伤对机体的剧烈影响。胚胎发育到36 hpf 时,各处理组胚胎总抗氧化活力及相关酶活水平 总体上差异不大,表明此时接受紫外损伤后尚未致死 的胚胎机体通过修复平衡,维持了胚胎的正常发育和 生长所需要的各种酶活力水平。我们的研究结果表明 对斑马鱼早期胚胎注射葡萄籽原花青素,可以有效地 提高胚胎的抗氧化能力,对胚胎起保护作用。

目前,关于葡萄籽原花青素的作用位点和分子机 制尚不清楚,深入探讨其对 UVB 损伤的保护作用, 必将为环境保护生物学积累基础,推进原花青素的广 泛应用并促进人类健康事业的发展。

References (参考文献)

- Bagchi D, Garg A, Krohn RL, *et al.* Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro.Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1997, 95(2): 179-189
- [2] Jacqueline EWood, Senti T Senthilmophan, Alexander V Peskin. Antioxidantactivity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs.[J]. FoodChemistry. 2002, 77: 155-161.
- [3] Sarma AD. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation [J].Phytochemistry. 1997, 45(4): 671-674.
- [4] Sato M, Maulik G, Rayps, *et al.* Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischem ic reperfusion in



jury[J]. J Mol Cell Cardiology, 1999, 31(6): 1289-1297.

- [5] Worrest R. C., H. Van Dyke and B. E. Thompson. Impact of enhanced simulated solar ultraviolet radiation upon a marine community.[J]. Photochem. Photobiol.1978, 27, 471-478.
- [6] Young AR. Cumulative effects of ultraviolet on the skin: cancer and photoaging.[J]. Semin Dermatol. 1990 Mar; 9(1):25-31.
- [7] Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Colombatto S, et al. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis.[J]. Int J Biochem Cell Biol. 2009 Nov;41(11):2089-93.
- [8] Kim J. K., Patel D. and Choi B. S., Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity.[J]. Photochem Photobiol. 1995, 62, 44-50.
- [9] Scandalios J. G., Oxygen stress and superoxide dismutase.[J]. Plant Physiol. 1993, 101:7.
- [10] Goihman-Yahr M. Skin aging and photoaging: an outlook.[J]. Clin Dermatol. 1996 14:153-160.
- [11] Babu V. R., B. Misra and P. C. Joshi. Ultraviolet-B effects on occular tissues. Biochem.[J]. Biophys. Res. Commun. 1995, 210,

417-423.

- [12] Scully N. M., D. R. S. Lean, W. J. Cooper and D. J. McQueen. Hydrogen peroxide formation interaction of UV radiation and dissolved organic carbon in lakewaters.[J]. Limnol. Oceanogr. 1996, 41, 540-548.
- [13] Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W. DNA repair and mutagenesis.[J]. ASM Press, Washington DC, 1995.
- [14] Sinha RP, Häder DP. UV-induced DNA damage and repair: a review.[J]. Photochem Photobiol Sci. 2002, 1 (4): 225-236.
- [15] Richard A. Charron, James C. Fenwick, David R. S. Lean et al. Ultraviolet-B Radiation Effects on Antioxidant Status and Survival in the Zebrafish, Brachydanio rerio[J]. Photochemistry and Photobiology. 2000, 72(3): 327-333.
- [16] Yin Jin, Hu Yi-xiu, Hu Yu-ming, et al. Effect of the grape seed procyanidins extract on MDA、SOD and GSH-Px in senile mice.[J]. China Tropical Medicine. 2007, 7(8): 1285-1286(Ch). 尹进,胡怡秀,胡余明,刘秀英,马征. 葡萄籽原花青素提 取物对小鼠 MDA、SOD 和 GSH-Px 的影响[J]. 中国热带医学, 2007, 7(8): 1285-1286.