

· 基础研究 ·

低砷染毒致小鼠肝功能及氧化损伤的实验研究*

郭有¹,高艳芳¹,范兴君²,王伯超¹,胡小山¹,胡姿浩¹,胡恭华^{1△}

(1. 赣南医学院预防医学系,江西赣州 341000;2. 牡丹江医学院,黑龙江牡丹江 157011)

摘要:目的 观察低剂量砷染毒致小鼠肝脏和血清肝功能及氧化损伤情况。方法 40 只健康 KM 小鼠随机分组,设染毒砷剂量为 0.0(对照组)、12.5(低剂量组)、25.0(中剂量组)、50.0(高剂量组) $\mu\text{g/L}$ 4 组,雌雄各半,经饮水途径染毒,染毒时间为 10 周,检测小鼠肝脏和血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。结果 血清中,高剂量组 AST 与对照组比较显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);GSH-Px 活性与对照组相比,GSH-Px 活性有明显改变,而中、高剂量组无明显变化。肝组织中,中剂量组清蛋白水平显著增高($P < 0.05$)。结论 低砷可以诱导小鼠肝功能损伤,但是抗氧化酶 GSH-Px 活性在染毒组则增高,对抗其氧化损伤作用。

关键词:亚砷酸钠;脂质过氧化;肝功能

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.23.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)23-2758-02

Effects on dimethylformamide liver function and oxidative stress of low level arsenic on mouse liver and serum*

Guo You¹, Gao Yanfang¹, Fan Xingjun², Wang Bochao¹, Hu Xiaoshan¹, Hu Zihao¹, Hu Gonghua^{1△}

(1. Department of Preventive Medicine, Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China;

2. Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China)

Abstract: Objective To observe the effects on dimethylformamide liver function and oxidative stress of low level arsenic on mouse liver and serum. **Methods** 40 health KM mice were randomly divided into 0, 12.5, 25.0, 50.0 $\mu\text{g/L}$ arsenic and exposed 10 weeks. The ALT, AST, MDA, SOD, GSH-Px in serum and liver were determined. **Results** In serum: the AST was significantly increase in 50.0 $\mu\text{g/L}$ dose ($P < 0.05$); GSH-Px were significant increase in 12.5 $\mu\text{g/L}$ dose ($P < 0.05$). In the liver: the albumin was significantly increase in middle dose ($P < 0.05$). **Conclusion** Low arsenic can induce liver damage on mice, but can increase antioxidant GSH-Px in arsenic group.

Key words: arsenic; oxidative stress; liver function

砷是公认的致癌物,可导致机体肝脏损伤,以往研究大部分都是在高浓度砷作用下而导致了肝功能损伤及脂质过氧化^[1-3]。随着美国国家环境保护局(EPA)将饮水砷浓度的标准降为 10 $\mu\text{g/L}$,使研究接触低浓度砷产生的健康效应具有很重要的意义^[4],而且因动物种属、受试物种类及染毒方式的不同而得出了不尽一致的结论^[5]。故本实验以代谢与人相似的小鼠为研究对象,通过饮水方式染毒,探讨低砷对小鼠肝脏和血清中肝功能和氧化损伤指标的影响,为低砷作用机制提供毒理学依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物分组及染毒 健康雄性昆明种小白鼠 40 只,雌雄各半,体质量 22~25 g,由赣南医学院动物实验中心提供。将其随机分为 4 组,每组 10 只,经饮水途径染毒。适应性饲养 1 周后开始染毒,染毒剂量为 0.0(对照组)、12.5(低剂量组)、25.0(中剂量组)、50.0(高剂量组) $\mu\text{g/L}$,染毒期限为 10 周。

1.1.2 主要试剂和仪器 亚砷酸钠(NaAsO_2)购于德国 Merck 公司,丙氨酸氨基转移酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(glutamic oxalacetic transaminase, AST)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。低温冷冻离心(DKC-2046,科大创新股份有限公司中佳分公司)、酶标仪(MK3,美国热电)、内切式组织匀浆机(浙西

机械厂)、可调微量移液器(美国 Thermo 公司)、超低温冰箱(DW-86L386/286,青岛海尔)。

1.2 方法 采取摘眼球取血法,取血后静置 30 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液储存于低温冰箱备用;肝脏用冰冷的生理盐水制成 10%匀浆液经 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液储存于低温冰箱备用。观察指标测定严格按照试剂盒说明书操作。

1.3 观察指标 小鼠血清及肝组织中 ALT、AST、MDA、SOD、GSH-Px 水平。

1.4 统计学处理 使用 SPSS14.0 统计软件经单因素方差分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 SNK 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的一般情况 在整个实验过程中,对照组小鼠活动正常,皮毛光亮,染毒组状态稍差,并且活动也略有减少。

2.2 小鼠各浓度染毒后血清中各指标水平比较 与对照组比较,染毒组血清中清蛋白、ALT 变化差异均无统计学意义($P > 0.05$);AST 水平则随着染毒剂量的增加而增加,高剂量组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.3 小鼠各浓度染毒后肝组织各指标水平比较 与对照组相比,肝组织中清蛋白在中剂量组显著增高($P < 0.05$);而 ALT、AST 变化差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.4 各组小鼠血清氧化损伤指标变化 血清中 MDA 水平与对照组相比,各组之间变化不明显($P > 0.05$);SOD 活性低、高

* 基金项目:赣南医学院人才引进资助项目(2009052)。 作者简介:郭有(1980~),讲师,硕士研究生,主要从事环境污染物的分子毒理学研究。 △ 通讯作者, Tel:18970786506; E-mail: hgh129@163.com。

剂量组有增高,但差异无统计学意义($P>0.05$);GSH-Px 活性染毒组均比对照组有所增高,低剂量组明显增高($P<0.05$),见表 3。

表 1 低砷染毒对小鼠肝功能血清各指标的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	清蛋白(g/L)	ALT(U/mL)	AST(U/mL)
对照组	42.92±8.05	43.70±28.94	26.34±2.54
低剂量组	46.43±5.62	50.37±16.19	35.98±1.04
中剂量组	47.92±4.65	28.61±15.37	39.66±8.04
高剂量组	38.19±5.58	49.94±17.05	82.42±7.14*

*: $P<0.05$,与对照组比较。

表 2 低砷染毒对小鼠肝功能肝组织各指标的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	清蛋白(g/mg)	ALT(U/mg)	AST(U/mg)
对照组	2.87±0.02	45.66±4.15	103.56±53.51
低剂量组	0.90±0.53	46.49±4.51	82.17±20.52
中剂量组	4.72±0.79*	65.20±3.19	226.24±43.18
高剂量组	1.95±0.45	81.06±9.29	150.97±76.59

*: $P<0.05$,与对照组比较。

表 3 低砷染毒对小鼠血清氧化损伤指标结果($\bar{x}\pm s$)

组别	MDA(nmol/mL)	SOD(U/mL)	GSH-Px(U/mL)
对照组	34.78±9.72	146.47±4.18	313.44±160.93
低剂量组	28.29±5.28	151.16±5.94	801.08±539.49*
中剂量组	32.60±11.61	136.68±9.99	751.61±438.12
高剂量组	29.40±13.28	157.70±40.51	663.08±570.52

*: $P<0.05$,与对照组比较。

2.5 各组小鼠肝组织氧化损伤指标变化 肝组织中 MDA 水平在各组之间变化比较差异无统计学意义($P>0.05$);SOD 活性呈现先增高后降低的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$);GSH-Px 活性各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 4 低砷染毒对小鼠肝组织氧化损伤指标结果($\bar{x}\pm s$)

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	GSH-Px(U/mg)
对照组	37.20±10.41	119.91±43.35	1 598.99±311.61
低剂量组	33.17±5.40	142.02±35.82	1 449.06±811.31
中剂量组	30.41±10.64	134.34±50.10	1 586.53±425.57
高剂量组	26.31±7.98	118.49±7.72	1 674.70±125.35

3 讨 论

本次实验结果显示,ALT、AST 活性呈现增高趋势,表明低砷染毒对小鼠肝脏有损伤作用,砷及其砷化物经呼吸道、消化道等途径进入人体主要与血红蛋白结合,随血液分布到全身各组织器官中。肝脏是砷及其砷化物的主要解毒器官。砷及其砷化合物,对巯基具有较强亲和力,尤其易于与含有 2 个相邻巯基的酶结合,形成较稳定的二硫键,从而影响酶活力,抑制酶的正常功能。肝脏中有多种转氨酶可反映肝细胞的损伤情况,其中 ALT 和 AST 为最重要的 2 种。肝细胞内的 ALT 活性远远超过其他脏器,所以可以更为特异地反映肝脏损伤。血清中的 AST 主要来源于细胞浆和线粒体,肝细胞释放的 AST 为线粒体源性,正常血清中为胞浆源性^[6]。有研究表明:尿砷小于 0.1 mg/L 的职业接触者 ALT 和 AST 活性显著高于无砷接触人群,但仍属正常;尿砷大于 0.1 mg/L 职业接触

者 ALT、AST 活性都显著高于无砷接触人群和尿砷小于 0.1 mg/L 的职业接触者,并且 ALT、AST 活性高于正常参考值。研究不同工龄砷接触作业工人肝功酶谱的变化发现,工龄 10~15 年的工人血清 ALT、AST 活性显著高于无砷接触人群,工龄大于或等于 15 年时,血清 ALT、AST、GGT、ALP 的活性都高于无砷接触人群。从而得出了 ALT、AST、GGT 和 ALP 可以作为职业接触砷工人肝脏损伤的早期联合监测指标^[7]。

有研究发现,MDA 水平显著升高,SOD 活性显著降低,其差异有统计学意义($P<0.05$);五氧化砷(As_2O_3)浓度为 5、25 mg/L 中 GSH-Px 活性显著降低,且呈剂量-效应关系^[8]。以前的实验多集中在高浓度砷对氧化应激的影响^[9],而本次实验研究是在 $NaAsO_2$ 浓度为小于或等于 5.0 $\mu\text{g/L}$ 的水平上研究砷对小鼠 MDA 水平、SOD 活力、GSH-Px 活力的影响。低剂量 $NaAsO_2$ 对小鼠 MDA 水平测定结果显示各实验组 MDA 水平比对照组低,显示低砷对小鼠脂质过氧化损伤不明显,可能因为砷的浓度低,也有可能是因为小鼠体内抗氧化酶的清除作用。对小鼠 SOD 活性测定结果显示低砷对小鼠 SOD 活性改变不明显,当 $NaAsO_2$ 浓度为 1.25 $\mu\text{g/L}$ 可引起小鼠血清 GSH-Px 活性明显增高,说明低剂量 $NaAsO_2$ 对 GSH-Px 起明显兴奋效应,且中、高剂量组中血清 GSH-Px 活性较低剂量组有降低趋势,进一步说明了低砷对 GSH-Px 的兴奋效应。由此可见,低剂量的 $NaAsO_2$ 对小鼠氧化系统有一定的兴奋效应,与以往研究结果一致^[10]。低砷具体的作用机制还需进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 周晓倩,何云,吴君.砷中毒所致氧化应激与肝脏损伤[J].中国地方病杂志,2007,26(1):114-116.
- [2] 李贞,安艳.砷毒性作用氧化应激机制研究进展[J].卫生研究,2009,38(5):643-646.
- [3] 蒋玲,李玲,吴君,等.氧化应激致慢性水砷暴露小鼠肝损伤作用[J].中国公共卫生,2008,24(5):593-595.
- [4] Ramsey KA, Larcombe AN, Sly PD, et al. In utero exposure to low dose arsenic via drinking water impairs early life lung mechanics in mice[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2013,14(1):13-21.
- [5] Ramos O, Carrizales L, Yáñez L, et al. Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissues by a mechanism independent of glutathione levels[J]. Environ Health Perspect, 1995,103(1):85-88.
- [6] 纪春艳,傅春玲,向全永,等.低砷饮水人群血管内皮损伤早期效应标志物的观察[J].中国地方病杂志,2011,30(5):493-497.
- [7] 杨晓光,彭珊苗,费成,等.职业接触砷工人肝功酶谱及肝功能变化[J].中国工业医学杂志,2005,18(2):85-87.
- [8] 王燕,贾汉·沙比提,刘开泰.砷致小鼠肝肾脂质过氧化的实验研究[J].新疆医科大学学报,2004,27(2):133-134.
- [9] 白彩军,刘丹,李冰.砷的氧化应激分子机制研究进展[J].实用预防医学,2012,19(2):314-316.
- [10] 杨萍,刘起展,李爱萍,等.亚砷酸钠所致人胚肺成纤维细胞增殖兴奋效应与氧化应激的关系[J].中华劳动卫生与职业病杂志,2006,24(2):103-105.