

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.18.003

还原型谷胱甘肽对微囊藻毒素-LR 染毒小鼠肝脏抗氧化功能的影响*

韩知峡¹, 杨 婷², 张春莲¹, 熊 伟¹, 张青碧^{1△}

(1. 西南医科大学公共卫生学院; 2. 西南医科大学公共卫生学院预防医学专业 2010 级, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨抗氧化剂还原型谷胱甘肽(GSH)对微囊藻毒素-LR(MC-LR)染毒小鼠肝脏抗氧化功能的影响。**方法** 选择健康清洁级 5 周龄昆明种小鼠 40 只,通过随机抽样的方法分为 5 组,生理盐水对照组、GSH 对照组、MC-LR 染毒组、MC-LR 染毒+GSH 低剂量组(GSH 低剂量干预组)、MC-LR 染毒+GSH 高剂量组(GSH 高剂量干预组),每组 8 只,雌雄各半,经腹腔注射持续染毒 15 d,检测肝脏组织病理变化情况以及肝脏组织 GSH 水平、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力和丙二醛(MDA)水平。**结果** 与生理盐水对照组比较,MC-LR 染毒组肝细胞 GSH 水平及 SOD、GSH-Px 活力明显降低($P<0.05$),MDA 水平明显增高($P<0.05$)。与 MC-LR 染毒组比较,GSH 低、高剂量干预组 GSH 水平及 SOD、GSH-Px 活力均增高($P<0.05$),MDA 水平均降低($P<0.05$)。**结论** GSH 干预后可减轻 MC-LR 所致小鼠肝脏氧化毒性,对肝脏具有一定的保护作用。

[关键词] 微囊藻毒素类;谷胱甘肽;抗氧化功能**[中图分类号]** R994.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)18-2457-03

Effect of glutathione on liver antioxidative function of microcystin-LR-induced mice*

Han Zhixia¹, Yang Ting², Zhang Chunlian¹, Xiong Wei¹, Zhang Qingbi^{1△}

(1. School of Public Health; 2. Grade 2010, Preventive Medicine Specialty, School of Public Health, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of glutathione(GSH)on liver antioxidative function of microcystin-LR(MC-LR)-induced mice. **Methods** Forty healthy clean class KM 5-week old mice were selected and divided into five groups by the random sampling method,including the normal saline control group,GSH control group,MC-LR group,MC-LR+low dose GSH group and MC-LR+high dose GSH group,8 cases in each group,half male and half female. The experiment lasted for 15 d by intraperitoneal injection of MC-LR,then the liver histopathological changes,liver tissue activity of superoxide dismutase(SOD),glutathione peroxidase(GSH-Px)and content of malondialdehyde(MDA) were detected. **Results** Compared with the normal saline control group,liver cell GSH level,SOD and GSH-Px activities in the MC-LR group were significantly decreased ($P<0.05$),while the MDA level was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the MC-LR group,the GSH level,SOD and GSH-Px activities in the MC-LR+low dose GSH group and MC-LR+high dose GSH group were significantly increased ($P<0.05$),while the MDA level was significantly decreased($P<0.05$). **Conclusion** The GSH intervention can alleviate MC-LR induced mouse liver oxidative toxicity and has protective effect on the liver to some extent.

[Key words] microcystin;glutathione;antioxidative function

近年来由于各种有机物的大量排入,内陆水体富营养化日益加剧,导致蓝藻类水华频繁发生,已成为全世界普遍关注的环境问题^[1]。其中,微囊藻毒素(microcystins,MCs)在蓝藻水华污染中是出现频率高、产量大、危害最严重的一类蓝藻毒素^[2],而且其在水体中不断累积导致浓度不断增高^[3]。其代表亚型 MC-LR 毒性最强,具有强烈的肝毒性、肾毒性^[4-5],严重威胁着人和动物的健康。近年来发现,MC-LR 诱导活性氧(ROS)产物增加引起细胞氧化损伤在其细胞毒效应中发挥了关键作用,表明氧化应激是 MCs 所致毒性损伤的作用机制之一^[6]。故作者推测通过对抗氧化系统的保护,可以适当减轻 MC-LR 对机体的毒性效应。还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH)是一种抗氧化物质,临床上常用于乙醇、病毒、药物及其他化学物质导致的肝损伤的辅助治疗药物^[7]。本研究旨在探讨抗氧化物质 GSH 对 MC-LR 染毒小鼠肝脏氧化损伤的保护作用,为今后研究抗氧化物质应用于 MCs 人群危害的化学预防和治疗提供科学依据和实验资料。

1 材料与方 法

1.1 材料 动物:健康清洁级 5 周龄昆明种小鼠 40 只,雌雄

各半,体质量 18 g~22 g,西南医科大学动物实验中心提供,许可证号 SYXK(川)2013-065。主要试剂:MC-LR 标准品购自瑞士 Alexis 公司,注射用还原型 GSH 购自山东绿叶制药有限公司,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)、还原型 GSH 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方 法

1.2.1 实验动物分组及处理 将 40 只小鼠于温度及湿度相对适宜的动物房适应性喂养 7 d 后,通过随机抽样的方法分为 5 组,生理盐水对照组(生理盐水腹腔注射)、GSH 对照组(100 mg/kg GSH 腹腔注射)、MC-LR 染毒组(5 μg/kg MC-LR 腹腔注射)、MC-LR 染毒+GSH 低剂量组(GSH 低剂量干预组,5 μg/kg MC-LR+100 mg/kg GSH 腹腔注射)、MC-LR 染毒+GSH 高剂量组(GSH 高剂量干预组,5 μg/kg MC-LR+200 mg/kg GSH 腹腔注射),每组 8 只,每只小鼠按 0.01 mL/g 注射,每天 1 次,记录基本情况及体质量,持续 15 d。实验结束次日晨处死小鼠,收集肝脏,检测脏器系数、肝脏组织病理变化、

* 基金项目:四川省卫生厅自然科学基金资助项目(120384);泸州医学院大学生科研项目(2012075)。 作者简介:韩知峡(1981-),讲师,硕士研究生,主要从事环境毒理学研究。 △ 通讯作者,E-mail:qingbizhang@126.com。

GSH 水平及 SOD、GSH-Px 活力和 MDA 水平。

1.2.2 指标测定方法 (1)脏器系数(肝体比):小鼠处死后取出肝脏组织,称体质量并记录,肝体比=肝脏质量(g)/体质量(g)×100%。(2)光学显微镜检测:迅速切取部分肝脏组织置于4%多聚甲醛固定液中,72 h后常规石蜡包埋切片,HE染色光镜下观察肝脏组织结构病理改变。(3)GSH水平及SOD、GSH-Px活力和MDA水平检测:肝组织匀浆后取上清液后采用黄嘌呤氧化酶法测量SOD活力,二硫代二硝基苯甲酸测GSH水平和GSH-Px活力,硫代巴比妥酸测量MDA水平,实验操作步骤均严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若方差齐,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量和脏器系数比较 实验期间40只小鼠均存活。15 d喂养后,各组小鼠体质量均增加,组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与生理盐水对照组比较,MC-LR染毒组肝脏指数则明显增高($F = 17.854, P = 0.000$);与MC-LR染毒组比较,GSH低、高剂量干预组肝脏指数则明显降低($F = 15.861, P = 0.000$),见表1。

2.2 各组小鼠肝脏病理改变比较 光镜下,HE染色观察到生理盐水对照组肝细胞结构完好,肝索呈放射状排列,中央静脉、肝血窦清晰,肝细胞呈多边形,细胞核居中,无明显病理改变;GSH对照组肝细胞结构基本完好,细胞质轻度浅染,肝板稍宽;MC-LR染毒组,肝索排列紊乱,肝细胞水肿,以肝小叶中

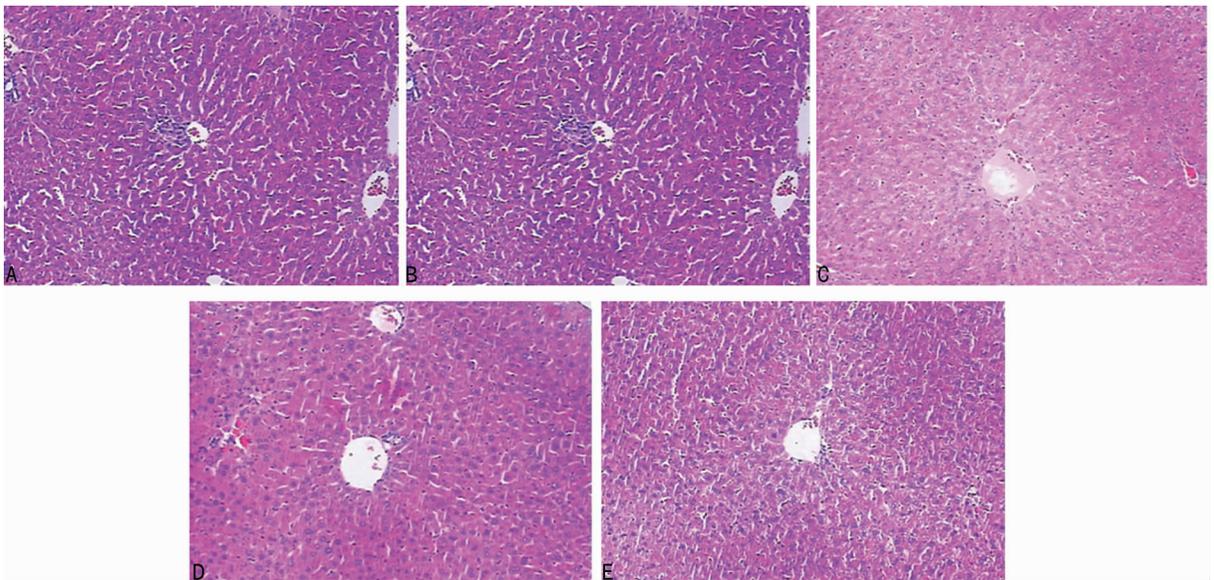
央最明显,肝血窦变窄;GSH低剂量干预组,肝血窦细小,肝细胞肿胀程度较轻,浅染程度也较MC-LR染毒组轻;GSH高剂量干预组,上述各种表现均较GSH低剂量干预组有所减轻,见图1。

表1 各组小鼠体质量及脏器系数比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	初始体质量(g)	终末体质量(g)	肝脏指数(%)
生理盐水对照组	26.91±2.69	30.87±1.94	0.044±0.003
GSH对照组	26.88±2.64	30.35±2.04	0.043±0.005
MC-LR染毒组	28.43±3.33	29.13±2.43	0.055±0.004 ^a
GSH低剂量干预组	26.68±2.02	28.60±0.85	0.050±0.002 ^b
GSH高剂量干预组	28.45±2.73	29.84±2.90	0.045±0.004 ^b

^a: $P < 0.05$,与生理盐水对照组比较;^b: $P < 0.05$,与MC-LR染毒组比较。

2.3 各组小鼠肝细胞MDA、GSH水平及SOD、GSH-Px活力比较 与生理盐水对照组比较,MC-LR染毒组肝细胞MDA水平明显增高($F = 10.551, P = 0.004$);与MC-LR染毒组比较,GSH低、高剂量干预组MDA水平均降低($F = 9.668, P = 0.006$)。与生理盐水对照组比较,MC-LR染毒组肝细胞GSH水平明显降低($F = 11.462, P = 0.003$),SOD、GSH-Px活力明显降低($F = 111.203, 1415.771, P = 0.000$);与MC-LR染毒组比较,GSH低、高剂量干预组GSH水平及SOD、GSH-Px活力均增高($F_{GSH} = 5.871, P_{GSH} = 0.023; F_{SOD} = 23.593, P_{SOD} = 0.000; F_{GSH-Px} = 40.027, P_{GSH-Px} = 0.000$),见表2。



A:生理盐水对照组;B:GSH对照组;C:MC-LR染毒组;D:GSH低剂量干预组;E:GSH高剂量干预组。

图1 各组小鼠肝脏病理学变化(HE×100)

表2 各组小鼠肝细胞MDA、GSH水平及SOD、GSH-Px活力比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	MDA(nmol/mg prot)	GSH(mg/g prot)	SOD(U/mg prot)	GSH-PX(U/mg prot)
生理盐水对照组	1.24±0.07	0.11±0.01	125.96±3.57	709.39±5.47
GSH对照组	1.23±0.02	0.12±0.02	128.42±2.83	702.89±7.48
MC-LR染毒组	1.45±0.09 ^a	0.07±0.01 ^a	91.20±5.10 ^a	564.92±10.31 ^a
GSH低剂量干预组	1.29±0.04 ^b	0.11±0.02 ^b	96.56±4.33 ^b	589.04±6.98 ^b
GSH高剂量干预组	1.27±0.03 ^b	0.11±0.02 ^b	110.99±2.93 ^b	618.38±7.74 ^b

^a: $P < 0.05$,与生理盐水对照组比较;^b: $P < 0.05$,与MC-LR染毒组比较。

3 讨 论

MCs 具有多器官多系统毒性,特别是对肝脏毒性较强。本研究观察了 MCs 染毒小鼠后,导致小鼠肝脏损害的相应指标,结果显示,在连续染毒 15 d 后,各组小鼠体质量均增加,但组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而 MC-LR 染毒组小鼠的肝体比明显高于生理盐水对照组($P < 0.05$),提示小鼠的肝脏受到毒素损害,MC-LR 毒素可能导致了肝脏水肿,从肝脏病理改变中证实了 MC-LR 染毒组的肝细胞出现了水肿。

目前对 MCs 引起的肝脏毒性具体机制研究较多,而对其造成机体损伤的防护措施研究较少。近年来许多学者提出氧化应激也是 MCs 所致毒性损伤的作用机制^[8-9],故 MCs 对细胞的氧化损伤及抗氧化系统的反应逐渐成为研究热点。有研究表明,MC-LR 能诱发细胞内的 ROS 水平上升,使细胞处于氧化应激状态,SOD、GSH-Px 等参与 ROS 的清除,以消除或减轻 ROS 对细胞的毒害,而这些反应又会造成细胞内抗氧化物质的急剧减少以至耗竭^[10]。施玮等^[11]推测 MCs 引起的氧化损伤和肝细胞凋亡可能是其致肝脏毒性的原因。本研究结果显示,MC-LR 染毒能引起肝脏抗氧化物质 GSH 水平的减少,抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性降低,以及脂质过氧化产物 MDA 水平增加,这与大量研究的结果基本符合,提示 MC-LR 所致的肝脏毒性可能与肝脏的氧化损伤有关。故减轻肝脏的氧化损伤就能一定程度上减弱 MC-LR 所致的肝脏毒性。陈铁晖等^[12]报道在 MCs 染毒的同时口服姜黄素可抑制 MCs 引起的机体氧化应激,但随着给药剂量升高,预防效果消失,其最适剂量范围值需进一步探索。有研究发现,绿茶多酚及其主要活性物质表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)可减轻 MC-LR 引起的小鼠肝脏氧化损伤^[13-14]。故抗氧化物质 GSH 对 MCs 引起肝脏损伤的保护效应方面是本研究的另一重点。

还原型 GSH 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的一种三肽,能和过氧化物及自由基结合,以对抗氧化剂对巯基的破坏,同时对抗自由基对重要脏器的损害^[6]。外源性物质进入体内打破 GSH 的平衡会导致氧化损伤而损害机体^[15]。有研究表明,GSH 的前体物质剂 N-乙酰半胱氨酸物质具有缓解 MCs 毒性作用的功能^[16]。王琳等^[17]发现,在饲料中添加 GSH 可缓解了 MC-LR 对罗非鱼肝脏的毒性,也可缓解草鱼因 MCs 引起的中毒症。董桂芳等^[18]的实验表明,在黄颡鱼饲料中添加 500~800 mg/kg GSH 可降低 MCs 的毒性。以上研究表明,GSH 对 MC-LR 所致毒性具有一定保护性。本研究观察了 GSH 对 MC-LR 所致肝脏氧化损伤的保护作用,结果显示,GSH 低、高剂量干预组的小鼠肝体比与 MC-LR 染毒组相比明显降低,病理损害也减轻,MDA 水平均减少,同时 GSH 水平、SOD 活性和 GSH-Px 活性均增高,说明 GSH 具有很强的抗氧化作用,能清除体内的自由基,提高抗氧化物质含量和活性,从而减轻肝脏损伤,起到拮抗 MCs 对肝脏损伤的作用。

综上所述,外源性 MC-LR 进入机体后可导致机体抗氧化物质活性降低,而使具有细胞毒性的 MDA 水平增加,给予 GSH 干预后可拮抗这两种作用,从而达到保护肝脏的作用,但其具体机制还待进一步研究。

参考文献

[1] Michalak AM, Anderson EJ, Beletsky D, et al. Record-setting algal bloom in Lake Erie caused by agricultural and meteorological trends consistent with expected future conditions[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(16):6448-6452.
[2] Neilan BA, Pearson LA, Muenchhoff J, et al. Environmen-

tal conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria[J]. Environ Microbiol, 2013, 15(5):1239-1253.

- [3] Roegner AF, Brena B, González-Sapienza G, et al. Microcystins in potable surface waters: toxic effects and removal strategies[J]. J Appl Toxicol, 2014, 34(5):441-457.
[4] Haider S, Naithani V, Viswanathan PN, et al. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern[J]. Chemosphere, 2003, 52(1):1-21.
[5] Milutinovic A, Zivin M, Zorc-Pleskovic R, et al. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins-LR and -YR[J]. Toxicol, 2003, 42(3):281-288.
[6] Fastner J, Codd GA, Metcalf JS, et al. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material[J]. Anal Bioanal Chem, 2002, 374(3):437-444.
[7] 袁平戈, 张大志. 还原型谷胱甘肽的作用机制及临床应用[J]. 药品评价, 2006, 5(5):385-390.
[8] Guzman RE, Solter PF. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure[J]. Toxicol Pathol, 1999, 27(5):582-588.
[9] Moreno I, Pichardo S, Jos A, et al. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally [J]. Toxicol, 2005, 45(4):395-402.
[10] Weng D, Lu Y, Wei Y, et al. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice[J]. Toxicology, 2007, 232(1/2):15-23.
[11] 施玮, 朱惠刚, 晏晓蓉, 等. 低剂量微囊藻毒素亚急性肝毒性及其机制[J]. 环境科学, 2002, 23(5):47-51.
[12] 陈铁晖, 薛常镐, 汪家梨, 等. 姜黄素拮抗水华微囊藻毒素致动物肝氧化损伤[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(11):1402-1403.
[13] 许川, 舒为群, 曹佳, 等. 绿茶对微囊藻毒素诱导肝肾氧化损伤的拮抗效应[J]. 中华预防医学杂志, 2007, 41(1):8-12.
[14] 韩知峡, 杨澜, 张亮, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对微囊藻毒素 LR 所致肝细胞氧化损伤及细胞色素 P450E1 表达的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(1):24-29.
[15] Chen C, Jiang X, Hu Y, et al. The protective role of resveratrol in the Sodium arsenite-induced oxidative damage via modulation of intracellular GSH homeostasis[J]. Biol Trace Elem Res, 2013, 155(1):119-131.
[16] Puerto M, Prieto AI, Jos A, et al. Dietary N-Acetylcysteine (NAC) prevents histopathological changes in tilapias (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom [J]. Aquaculture, 2010, 306(S1/2/3/4):35-48.
[17] 王琳, 梁旭方, 陈晓艳, 等. 饲料添加剂硒和谷胱甘肽对微囊藻毒素胁迫下罗非鱼肝脏去毒相关基因诱导表达的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2010, 31(1):95-99.
[18] 董桂芳, 朱晓鸣, 杨云霞, 等. 黄颡鱼饲料中添加谷胱甘肽降低藻毒素毒性作用的研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(4):722-730.