

内毒素致大鼠肝组织氧化应激作用

解静芳¹, 郝婷娟¹, 刘丽娜¹, 金国文¹, 郭晓君¹, 李瑞金²

摘要: [目的] 探讨内毒素腹腔注射染毒对大鼠肝组织抗氧化酶的影响。[方法] 采用腹腔注射技术, 以脂多糖(LPS)对Wister大鼠进行染毒, 染毒浓度分别为0.01、0.05、0.10、1.00 mg/kg, 对肝组织匀浆上清液中的超氧化物歧化酶(SOD)、Cu, Zn-SOD酶、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性以及谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量进行测定。[结果] 与对照组相比, 染毒浓度分别为0.01、0.05和0.10 mg/kg时, SOD酶活性变化无统计学差异($P>0.05$); 染毒浓度为1.00 mg/kg时, 有明显降低($P<0.01$)。与对照组相比, Cu, Zn-SOD酶活性随着染毒浓度的增大, 呈现先升后降的趋势, 浓度达0.05 mg/kg时, 升高具有统计学意义($P<0.01$)。与对照组相比, CAT酶活性和MDA含量的变化呈现先降后升的趋势, 二者下降的最低点分别为0.05 mg/kg和0.01 mg/kg; GSH含量和GSH-PX活性均呈现先增后减的趋势, 染毒浓度为0.05 mg/kg时, 二者的增高具有统计学意义($P<0.01$)。[结论] 低浓度的LPS可致大鼠肝组织产生适应性反应; 高浓度的LPS可引起大鼠肝组织抗氧化能力降低, 提示高浓度LPS对大鼠肝的毒作用可能与诱发体内产生过量自由基有关。

关键词: 脂多糖; 氧化损伤; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 过氧化氢酶; 丙二醛

Oxidative Stress in Rat Liver Tissues Induced by Endotoxin XIE Jing-fang¹, HAO Ting-juan¹, LIU Li-na¹, JIN Guo-wen¹, GUO Xiao-jun¹, LI Rui-jin² (1.College of Environment and Resource, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China; 2.Research Center of Environmental Science and Engineering, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China) • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the influences of endotoxin via intraperitoneal injection on several antioxidant enzymes in livers of rats. [Methods] The rats received injection of lipopolysaccharides (LPS) at different doses of 0.01, 0.05, 0.10, 1.00 mg/kg. The activity of superoxide dismutase (SOD), Cu, Zn-SOD enzyme, catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-PX), and the content of GSH and malonaldehyde (MDA) in the supernatant of hepatic tissue homogenate were determined. [Results] Compared with the control group, there was no significant difference of SOD activity in the rats treated with 0.01, 0.05 and 0.10 mg/kg LPS ($P>0.05$), but it decreased significantly at 1.00 mg/kg ($P<0.01$); the activity of Cu and Zn-SOD increased first and then decreased, and a significant difference was found in the 0.05 mg/kg group ($P<0.01$); the activity of CAT and the content of MAD decreased first and then increased, and they declined to the lowest point when treated with 0.05 mg/kg and 0.01 mg/kg respectively; the activity of GSH-PX and the content of GSH increased first and then decreased, and a significant difference was found in the 0.05 mg/kg group ($P<0.01$). [Conclusion] Low dose of LPS can induce adaptive responses in rat liver tissues, while high dose of LPS can lead to decrease of antioxidation in rat liver tissues, indicating that the toxic effects of LPS on rat livers may involve inducing excessive free radicals.

Key Words: lipopolysaccharide; oxidation damage; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; catalase; malonaldehyde

内毒素(endotoxin, ET)是革兰氏阴性菌细胞壁的最外层结构,其主要化学成分为脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),是内毒素产生毒性效应的主要生物活性成分,可诱导产生多种炎症介质,引发炎症反应^[1-2]。研究表明,内毒素在室内灰尘和室外细颗粒物等多种空气环境中都已检测到,暴露人群广泛,接

触时间长。空气中内毒素的主要来源包括农业粉尘、工厂污染的气溶胶、采暖系统和空调系统的污染、加湿器生成的水雾、居室环境中的香烟烟雾、湿气或水渍。急性吸入高浓度的内毒素能引起发热、咳嗽和呼吸困难^[3-7],内毒素对人体健康的潜在危害,已经成为环境卫生领域研究的热点和难点问题。肝脏是机体重要的解毒器官^[8],同时也是内毒素血症受损最早、最明显的靶器官之一^[9-10]。目前关于内毒素腹腔注射染毒对大鼠肝脏氧化损伤作用的研究还鲜见报道。

体内的活性氧在正常生理情况下,会被机体内的抗氧化防御系统清除;但是当活性氧的清除速率小于产生速率时,体内就会产生多余的活性氧,其中一部分履行生理作用,另一部分则可造成生物分子的氧化损伤^[11-13]。机体内抗氧化防御系统

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 30740037); 太原市环保局资助项目

[作者简介] 解静芳(1961—),女,博士,教授;研究方向:环境化学与毒理学;E-mail: xiejf@sxu.edu.cn

[作者单位] 1.山西大学环境与资源学院,山西太原 030006; 2.山西大学环境科学与工程研究中心,山西太原 030006

主要由抗氧化酶类和抗氧化物质构成, 抗氧化酶类主要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)等; 非酶性抗氧化物质如还原型谷胱甘肽(GSH)等, 它们之间相互协同、相互代偿、相互依赖而共同发挥抗氧化作用。通过测定活性氧消除系统酶和抗氧化物质的量, 可以对机体氧化应激进行定量评价。若氧化物质含量增大, 则表明产生了氧化损伤。因此研究这些抗氧化指标在体内的变化和相互关系, 有助于了解内毒素对大鼠肝组织的氧化损伤程度和机制。本实验拟就不同浓度LPS对大鼠肝组织抗氧化酶类(SOD、GSH-PX、CAT)的活性、非酶性抗氧化物质(GSH)以及脂质过氧化物丙二醛(MDA)的含量变化进行研究, 以分析LPS对大鼠肝组织的氧化损伤作用^[14]。

1 材料与方法

1.1 动物准备与处理

实验动物为5周龄、体重170~180 g的Wistar清洁级大鼠, 30只, 随机分成5组(每组6只), 即4个染毒组和1个对照组。用生理盐水配制成的不同浓度LPS溶液进行腹腔注射染毒, 染毒1次, 染毒浓度分别为0.01、0.05、0.10、1.00 mg/kg, 对照组注射等体积的生理盐水。染毒组在染毒浓度范围内, 24 h后不出现死亡。

1.2 组织匀浆液制备及测定方法

染毒结束24 h^[15]后处死(染毒结束至处死前禁食、禁水), 立即取出肝组织, 用冰冷的生理盐水洗净, 称重。根据组织重量加入一定体积的匀浆液(质量体积比为1:10)进行匀浆。匀浆液用冷冻离心机(美国Sigma公司)于4℃, 3 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心15 min, 取上清液, 立即进行后续测定。

CAT酶活性、总SOD酶活性、Cu, Zn-SOD酶活性、GSH-PX活性、GSH含量以及MDA含量的测定, 均采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行测定, 按试剂盒说明书进行操作。

蛋白质含量测定, 采用Lowry的考马斯亮蓝法进行^[16]。测定时小牛血清白蛋白标准溶液一定要现配现用, 且样品蛋白质浓度过高(超出标准曲线线性范围), 必须适当稀释后再测。

1.3 统计检验方法

用SPSS 12.0统计软件对数据进行统计分析, 用单因素方差分析LSD-*t*检验法, 检验各染毒组与对照组相比差异是否有统计学意义。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

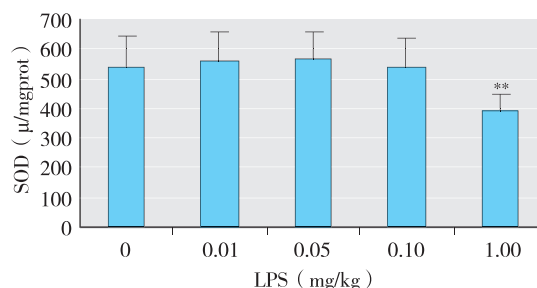
2 结果

2.1 LPS对大鼠肝组织SOD和Cu, Zn-SOD酶活性的影响

由图1可见, 当染毒浓度为0.01、0.05和0.10 mg/kg时, 染毒组大鼠肝总SOD活性与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$); 当染毒浓度为1.00 mg/kg时, 染毒组大鼠肝总SOD活性与对照组相比明显降低($P<0.01$)。

由图2可见, 随着染毒浓度的增加, 与对照组比, 肝组织Cu, Zn-SOD活性也呈现先升高后降低的趋势。当染毒浓度分别为0.01、0.05和0.10 mg/kg时, 染毒组大鼠肝中Cu, Zn-SOD活性均呈现上升趋势($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$); 当染毒浓度为1.00 mg/kg时, 染毒组大鼠肝中Cu, Zn-SOD活性与对照组

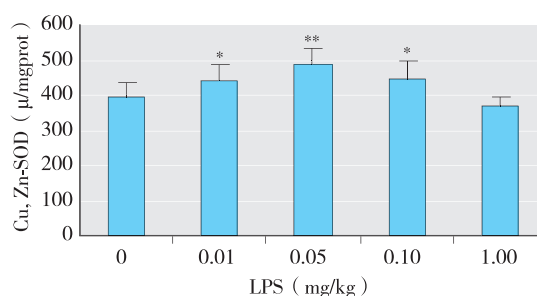
相比差异无统计学意义($P>0.05$)。



[注]**: 与对照组比较(Compared with the control group), $P<0.01$ 。

图1 LPS染毒浓度与SOD活性的关系

Figure 1 Relationship between LPS concentration and SOD activity



[注]*: 与对照组比较(Compared with the control group), $P<0.05$;

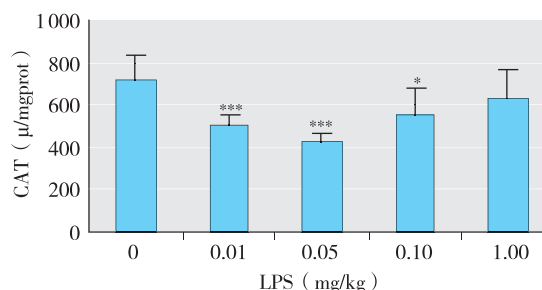
** $P<0.01$ 。

图2 LPS染毒浓度与Cu, Zn-SOD活性的关系

Figure 2 Relationship between LPS concentration and Cu, Zn-SOD activity

2.2 LPS对大鼠肝组织CAT活性的影响

由图3可见, 随着染毒浓度的增加, 与对照组相比, 肝组织CAT酶活性呈现先下降后上升的趋势。当染毒浓度为0.01、0.05、0.10 mg/kg时, 染毒组大鼠肝CAT活性与对照组相比明显降低($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.05$)。当染毒浓度为1.00 mg/kg时, 染毒组大鼠肝CAT活性与0.05 mg/kg染毒组相比有上升趋势; 与对照组相比, CAT活性差异无统计学意义($P>0.05$)。



[注]*: 与对照组比较(Compared with the control group), $P<0.05$;

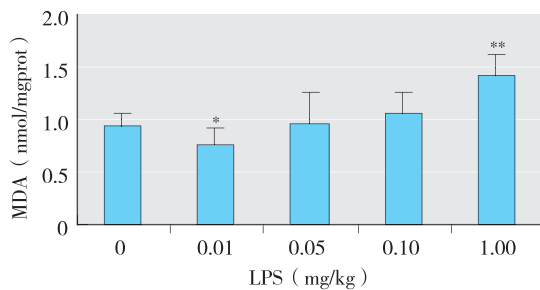
*** $P<0.001$ 。

图3 LPS染毒浓度与CAT活性的关系

Figure 3 Relationship between LPS concentration and CAT activity

2.3 LPS对大鼠肝组织MDA含量的影响

由图4可见, 与对照组相比, LPS染毒浓度为0.01 mg/kg时, 肝组织MDA含量降低($P<0.05$); 随着LPS染毒浓度的增加, 与对照组相比, 肝组织中MDA含量上升, 当染毒浓度达1.00 mg/kg时, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。



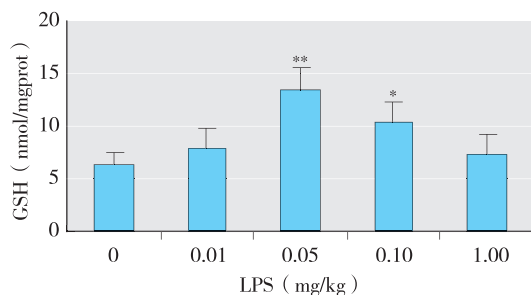
[注]*: 与对照组比较 (Compared with the control group), $P < 0.05$;
**: $P < 0.01$ 。

图 4 LPS 染毒浓度与 MDA 含量的关系

Figure 4 Relationship between LPS concentration and MDA content

2.4 LPS 对大鼠肝组织 GSH 含量和 GSH-PX 酶活性的影响

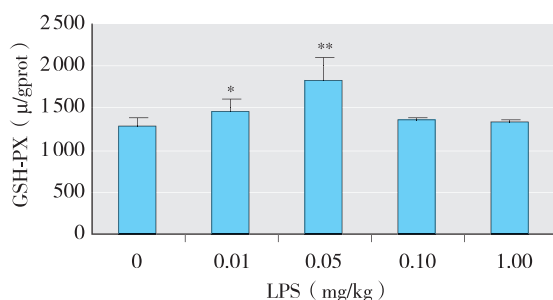
由图 5 可见, 当内毒素染毒浓度为 0.05 mg/kg 时, 与对照组相比, 大鼠肝 GSH 含量明显升高 ($P < 0.01$)。当染毒浓度为 0.10 mg/kg 时, 与 0.05 mg/kg 染毒组相比, 大鼠肝 GSH 含量开始下降, 但与对照组相比, 仍然升高且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。当染毒浓度为 1.00 mg/kg 时, 与对照组相比差异无统计学意义。由图 6 可见, 随着染毒浓度的增加, 大鼠肝组织中 GSH-PX 酶活性的变化与 GSH 含量的变化基本相似, 均呈现先增大然后减小的趋势。即在染毒浓度为 0.05 mg/kg 时, 出现一个最大值。



[注]*: 与对照组比较 (Compared with the control group), $P < 0.05$;
**: $P < 0.01$ 。

图 5 LPS 染毒浓度与 GSH 含量的关系

Figure 5 Relationship between LPS concentration and GSH content



[注]*: 与对照组比较 (Compared with the control group), $P < 0.05$;
**: $P < 0.01$ 。

图 6 LPS 染毒浓度与 GSH-PX 酶活性的关系

Figure 6 Relationship between LPS concentration and GSH-PX activity

3 讨论

在低浓度 (0.01、0.05 mg/kg) 染毒的情况下, LPS 可引起大

鼠肝组织清除自由基的酶类 (Cu, Zn-SOD、GSH-PX) 以及体内主要非酶性抗氧化物质 (GSH) 水平的升高, 而脂质过氧化产物 (MDA) 的含量却比对照组有所下降。其机理可能是, 由于内毒素进入机体后, 可诱导机体少量的介质分子如各种细胞因子、NO、活性氧自由基 (ROS) 等, 从而引起了肝脏的应激反应, 使得具有清除自由基作用的酶类活性适应性升高和 GSH 含量适应性增加以保护机体避免其受到氧化损伤。CAT 酶的活性在低浓度时与对照组相比表现为下降, 可能是由于在一般生理条件下, 组织细胞中 GSH-PX 对 H_2O_2 的分解代谢比 CAT 更为重要, 只有当 H_2O_2 浓度较高时, CAT 才逐渐成为主要作用, 而且 CAT 的活性部位巯基正是最容易受到自由基攻击的靶基团, 因此在低浓度染毒的情况下 CAT 活性呈下降趋势^[17]。而 MDA 的含量在 LPS 染毒浓度为 0.01 mg/kg 时相对于对照组降低可能是由于机体抗氧化防御系统的应激反应超过控制行为所造成的。提示少量的 LPS 可能会对机体产生保护作用^[18]。

在高浓度 (0.10、1.00 mg/kg) 染毒的情况下, CAT 的活性较低浓度升高, 反映了肝组织中的 H_2O_2 水平处于较高浓度的状态, 同时抗氧化酶类 (SOD、Cu, Zn-SOD、GSH-PX) 活性降低, 说明由高浓度的 LPS 所诱导产生的大量的细胞因子、NO、ROS 等物质一方面大量消耗了抗氧化酶使其活性下降, 另一方面过多的自由基也会对这些抗氧化酶进行攻击使其活性降低, 导致自由基过剩; GSH 含量的下降可能是由于体内各种过氧自由基的产生和过剩, 消耗了大量 GSH, 以致肝组织 GSH 含量明显下降, 从而加剧过氧化自由基对组织的损伤作用。此外, 在 LPS 染毒浓度为 1.00 mg/kg 时 MDA 含量明显升高, 也表明高浓度 LPS 导致机体发生了脂质过氧化反应, 产生了氧化损伤。提示高浓度 LPS 对大鼠肝的毒作用与诱发体内产生过量自由基有关。

综上所述, 对大鼠进行 LPS 腹腔注射染毒后, 肝组织抗氧化系统酶受到影响, 在高低浓度时表现出双重作用。低浓度时可刺激机体免疫系统, 增强固有免疫功能; 高浓度时会引起广泛而强烈的炎症反应, 抑制机体免疫功能^[19]。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 何明宏, 朱德康, 陈华萍, 等. 脂质 A 参与免疫反应的结构基础研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(1): 112-114.
- [2] 张雁林, 赵金垣. 血红素加氧酶-1 的细胞保护作用研究进展[J]. 环境与职业医学, 2008, 25(2): 197-202.
- [3] MUELLER-ANNEILING L, AVOL E, PETERS JM, et al. Ambient endotoxin concentration in PM_{10} from Southern California[J]. Environ Health Perspect, 2004, 112(5): 583-588.
- [4] JOACHIM HEIBRICH, MIKE PITZ, WOLFGANG BISCHOF, et al. Endotoxin in fine ($PM_{2.5}$) and coarse ($PM_{2.5-10}$) particle mass of ambient aerosols. A temporospatial analysis[J]. Atmos Environ, 2003, 37(26): 3659-3667.
- [5] PURDY CW, STRAUS DC, PARKER DB, et al. Comparison of the type and number of microorganisms and concentration of endotoxin in the air of feedyards in the Southern High Plains[J]. Am J Vet Res,

- 2004, 65(1): 45-52.
- [6] 张青, 李琦, 毛宝龄, 等. 内毒素致伤大鼠肺组织促炎与抗炎细胞因子 mRNA 表达的时相性研究[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 169(10): 585-588.
- [7] SINGH J, SCHWARTZ DA. Endotoxin and the lung: Insight into the host-environment interaction[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(2): 330-333.
- [8] 高红霞, 刘英莉, 阎红, 等. 污灌土壤中有有机污染物对小鼠肝肾组织的氧化损伤[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(1): 34-35.
- [9] 贾晋斌, 谷峰, 陈尉华, 等. 内毒素血症在大鼠实验性肝硬化腹水形成中的作用及其与肿瘤坏死因子- α 和一氧化氮的关系[J]. 胃肠病学, 2006, 11(7): 420-422.
- [10] 张馨. 内毒素损伤肝脏机制的研究进展[J]. 国外医学: 消化系统疾病分册, 2002, 22(3): 163-166.
- [11] 解静芳, 王学峰, 孟紫强, 等. SO_2 致小鼠肝蛋白质氧化损伤和 DNA-蛋白质交联作用[J]. 中国环境科学, 2007, 27(13): 400-403.
- [12] ANSARI N, KHODAGHOLI F, AMINI M, et al. Attenuation of LPS-induced apoptosis in NGF-differentiated PC12 cells via NF- κ B pathway and regulation of cellular redox status by an oxazine derivative[J]. Biochimie, 2011, 93(5): 899-908.
- [13] 高红霞, 高振杰, 高铁利, 等. 污灌玉米中有机污染物对小鼠的遗传毒性及氧化损伤作用[J]. 环境与职业医学, 2009, 26(1): 46-48.
- [14] ZHANG S, HE B, GE J, et al. Characterization of chemical composition of Agaricus brasiliensis polysaccharides and its effect on myocardial SOD activity, MDA and caspase-3 level in ischemia-reperfusion rats[J]. Int J Biol Macromol, 2010, 46(3): 363-366.
- [15] 刘亮明, 罗杰, 张吉翔, 等. 内毒素诱导 D-半乳糖胺致敏大鼠急性肝衰竭的研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(30): 2122-2126.
- [16] 孟紫强. 环境毒理学基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 337-338.
- [17] 孟紫强, 张波. 二氧化硫吸入对大鼠脑组织细胞的氧化损伤作用[J]. 中国环境科学, 2001, 21(5): 464-467.
- [18] 王东红, 彭安, 王子健. 有毒物质低剂量刺激作用的研究进展[J]. 安全与环境学报, 2004, 4(1): 18-21.
- [19] WILLIAMS MA, WITHINGTON S, NEWLAND AC, et al. Monocyte anergy in septic shock is associated with a predilection to apoptosis and is reversed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor *ex vivo* [J]. J Infect Dis, 1998, 178(5): 1421-1433.

(收稿日期: 2011-08-30)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 郭薇薇; 校对: 郭薇薇)

(上接第 156 页)

识, 溶剂和工业中苯的使用大部分被禁止, 但汽油中仍存在苯, 并且是汽车尾气中相对较大的组分。除汽车尾气外, 虽然苯也出现在许多燃烧过程中, 但检测苯的含量对估计汽车尾气排放上限是有用的。

利用苯/甲苯(benzene/toluene, B/T)值可以初步确定 VOCs 中苯系物的来源^[8]。世界上不同城市的大气中 B/T 值介于 0.25~0.5 之间。徐汇区一年的 B/T 值为 0.36, 这说明随着近年来我国机动车尾气排放等一系列法律政策出台之后, 我国机动车的燃料结构与欧美发达国家的差别越来越小。

徐汇区 VOCs 的污染程度与气候变化密切相关, 冬季的污染最为严重, 秋季的污染最轻。建议结合相关的气象资料进一步统计分析, 采取综合措施进行改善, 以使徐汇区的大气质量能够得到提高。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 刘刚, 盛国英, 傅家谟, 等. 香港大气中有毒挥发性有机物研究[J]. 环境化学, 2000, 19(1): 61-66.
- [2] Entech Instrument Inc. 7100 Preconcentrator manual, Section 8[R].

CA(US): Entech Instrument Inc.

- [3] U.S.EPA. Compendium of methods for the determination of toxic organic compounds in ambient air-compendium method to-14A[EB/OL]. [2012-02-13]. <http://www.epa.gov/ttnamti1/files/ambient/airtox/to-14a.pdf>.
- [4] U.S.EPA. Compendium of methods for the determination of toxic organic compounds in ambient air-compendium method to-15[EB/OL]. [2012-02-13]. <http://www.epa.gov/ttnamti1/files/ambient/airtox/to-15r.pdf>.
- [5] 张靖, 邵敏, 苏芳. 北京市大气中挥发性有机物的组成特征[J]. 环境科学研究, 2004, 17(5): 1-5.
- [6] 杭维琦, 薛光璞. 南京市环境空气中挥发性有机物的组成与特点[J]. 中国环境监测, 2004, 20(2): 9, 14-16.
- [7] 周秀骥. 长江三角洲低层大气与生态系统相互作用研究[M]. 北京: 气象出版社, 2004.
- [8] 苗欣, 孙成, 王禹, 等. 南京市交通干道大气环境中挥发性有机物的研究[J]. 环境保护科学, 2003, 119(29): 6-9.

(收稿日期: 2011-11-25)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 郭薇薇; 校对: 徐新春)