

亚砷酸钠对雄性大鼠炎症因子和氧化应激的影响

杨欢, 王素华, 苏鑫, 高艳荣

摘要:

[目的] 探讨亚砷酸钠对雄性大鼠血清中炎症因子和氧化应激水平的影响。

[方法] 将32只健康无特定病原雄性SD大鼠按体重随机分为4组,分别为对照组(超纯水)和低(10 μg/L)、中(100 μg/L)、高(1 000 μg/L)剂量亚砷酸钠溶液染毒组。每组8只,自由饮水染毒28 d。采用酶联免疫吸附试验测定大鼠血清中粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-10(IL-10)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶、活性氧簇酶(ROS)、总抗氧化能力和一氧化氮(NO)水平。

[结果] 亚砷酸钠染毒组大鼠血清GM-CSF表达量显著高于对照组($P < 0.05$),且1 000 μg/L组的GM-CSF水平最高;抗炎因子IL-10含量均低于对照组($P < 0.05$);1 000 μg/L剂量组ROS表达水平高于对照组($P < 0.05$);与对照组相比,各染毒组NO表达量升高($P < 0.05$),且存在剂量-反应关系。

[结论] 亚砷酸钠进入雄性大鼠机体后产生炎症损伤和氧化应激损伤,损伤机制可能与NO增多、IL-10降低有关。

关键词: 砷; 亚砷酸钠; 炎症因子; 氧化应激

引用: 杨欢, 王素华, 苏鑫, 等. 亚砷酸钠对雄性大鼠炎症因子和氧化应激的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(6): 542-544. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16812

Effects of sodium arsenite on inflammatory cytokines and oxidative stress in male rats YANG Huan, WANG Su-hua, SU Xin, GAO Yan-rong (School of Public Health, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014040, China). Address correspondence to WANG Su-hua, E-mail: bt_wangsu-hua@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To investigate the effects of sodium arsenite on serum inflammatory cytokine and oxidative stress levels in male rats.

[Methods] Thirty-two specific-pathogen-free healthy male SD rats were randomly divided into four groups: control group, low dose, medium dose, and high dose groups, with eight rats in each group. The three exposure groups were intoxicated by 10, 100, and 1 000 μg/L NaAsO₂ in drinking water, respectively, while the control group was given ultrapure water for free drinking. All the rats were sacrificed after 28 days. The levels of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-10 (IL-10), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, reactive oxygen species (ROS), total antioxidant capacity, and nitric oxide (NO) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay.

[Results] Sodium arsenite exposed rats showed significantly higher GM-CSF expression levels than the control group ($P < 0.05$), and the 1 000 μg/L group had the highest GM-CSF expression level. The anti-inflammatory cytokine IL-10 levels were lower in all exposure groups than in the control group ($P < 0.05$). The 1 000 μg/L group showed a higher ROS level than the control group ($P < 0.05$). NO expression levels were increased in all exposure groups compared with the control group ($P < 0.05$), and there was a dose-response relationship.

[Conclusion] Sodium arsenite exposure in male rats could lead to inflammatory injury and oxidative stress injury, and the mechanism may be related to elevated NO and reduced IL-10.

Keywords: arsenic; sodium arsenite; inflammatory cytokine; oxidative stress

Citation: YANG Huan, WANG Su-hua, SU Xin, et al. Effects of sodium arsenite on inflammatory cytokines and oxidative stress in male rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(6): 542-544. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16812

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81660532); 内蒙古科技计划项目(编号: 201502080)

[作者简介] 杨欢(1992—), 女, 硕士生; 研究方向: 职业卫生与职业流行病学; E-mail: 1152889552@qq.com

[通信作者] 王素华, E-mail: bt_wangsu-hua@163.com

[作者单位] 包头医学院公共卫生学院, 内蒙古 包头 014040

饮水型砷中毒是我国严重的公共卫生问题^[1]。研究表明,砷暴露可导致心血管疾病、神经系统疾病、肝肾疾病等的发生,甚至对孕妇和胎儿产生危害^[2-4]。砷毒性所涉及的细胞学和分子机制目前尚不明确,但炎症反应和氧化应激反应一直被认为是砷化物致机体损伤的机制之一,砷及其甲基化产物可诱导细胞内活性氧、自由基生成增多,进而导致靶器官的氧化损伤^[5-6]。因此,本实验拟通过大鼠自由饮用不同浓度含砷水,探讨饮水砷与雄性大鼠血清中炎症因子和氧化应激因子的剂量-效应关系,为砷中毒作用机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理

32只健康雄性SD大鼠,SPF级别,体重在215~225 g。动物室温度23~27℃,相对湿度40%~45%。饲料由北京科澳协力饲料公司提供,大鼠在正式实验前适应性饲养一周,称重后采用随机数字表法将32只SD雄性大鼠随机分为4组,参照文献[7-8],以超纯水配制10、100、1 000 μg/L亚砷酸钠染毒剂量组(低、中、高剂量组),以超纯水为对照,采用大鼠自由饮水的方式连续染毒28 d。

1.2 药物、试剂和实验器材

亚砷酸钠(分析纯)(成都艾科化学技术有限公司,中国)染毒溶液配制:用超纯水分别配成10、100、1 000 μg/L的亚砷酸钠溶液,每天染毒时现配。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国);550型酶标仪(Bio-Rad,美国);微量加样器(Eppendorf,德国);低速台式离心机(长沙湘仪仪器有限公司,中国);AR224CN电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 血清收集 染毒28 d结束后,用质量分数0.3%戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉采血。常温下,3 000 r/min(离心半径为12.3 cm)离心15 min,分离血清,收集上清液,放于-80冰箱中冷冻备用。

1.3.2 炎症因子和氧化应激因子的测定 取血清,常温下解冻,酶标包被板上设置空白孔2孔,标准孔10孔,其余设为样品孔。分别将不同浓度标准品(100 μL/孔)加入相应孔中,样品孔加10 μL样品和40 μL样品稀释液,随后用封板胶封住反应孔,37℃孵育30 min。洗板5次,反应孔加50 μL酶标试剂,孵育20 min后加入显色剂,避光孵育20 min,加入终止液50 μL/孔,混匀后在酶标仪450 nm波长处测定各孔吸光度值。

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件。计量资料经正态性检验符合正态分布或近似正态分布,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示。多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。用Pearson相关分析计算相关系数。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

对照组大鼠皮毛有光泽,饮食正常,精神状态良好,未见异常表现。亚砷酸钠高剂量组大鼠均出现活动减少,皮毛暗淡无光泽,有少量掉毛、枯黄等现象。实验期间,对照组与染毒组均无大鼠死亡。

2.2 各组大鼠血清中炎症因子水平比较

与对照组比较,亚砷酸钠染毒组大鼠血清中GM-CSF水平均升高,IL-10水平均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 亚砷酸钠染毒大鼠血清GM-CSF和IL-10水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	GM-CSF(ng/L)	IL-10(ng/L)
对照组(超纯水)	1200.08 ± 180.83	409.06 ± 33.06
低剂量组(10 μg/L)	1425.80 ± 211.19 ^a	334.48 ± 57.54 ^a
中剂量组(100 μg/L)	1421.92 ± 230.78 ^a	322.84 ± 55.48 ^a
高剂量组(1 000 μg/L)	1474.45 ± 169.62 ^a	329.01 ± 24.56 ^a
F	3.005	6.465
P	0.047	0.002

[注]a:与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠血清中氧化应激水平比较

4组大鼠间血清NADPH氧化酶、ROS、总抗氧化能力差异无统计学意义,但NO表达水平的差异有统计学意义($P<0.05$);两两比较结果显示:低、中、高剂量组大鼠的NO表达水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.4 炎症因子和氧化应激指标的相关关系

相关分析结果显示,GM-CSF分别与总抗氧化能力、NO水平呈正相关(相关系数 r 分别为0.407

和0.324, $P<0.01$ 和 $P<0.05$); IL-10与NADPH氧化酶、总抗氧化能力、NO水平无相关关系(r 分别为0.005、-0.257、-0.099, 均 $P>0.05$)。

表2 亚砷酸钠染毒大鼠血清氧化应激水平($\bar{x} \pm s$, ng/L, $n=8$)

组别	NADPH氧化酶	ROS	总抗氧化能力	NO
对照组(超纯水)	4.67 ± 0.65	261.10 ± 33.91	24.48 ± 3.07	5.99 ± 0.63
低剂量组(10 μg/L)	5.23 ± 0.85	266.72 ± 42.99	28.08 ± 4.65	6.74 ± 0.60 ^a
中剂量组(100 μg/L)	5.17 ± 1.01	285.62 ± 40.10	27.89 ± 4.04	6.85 ± 1.07 ^a
高剂量组(1000 μg/L)	5.55 ± 0.67	303.61 ± 21.65	29.80 ± 4.04	7.15 ± 0.32 ^a
F	1.647	2.355	1.839	3.853
P	0.201	0.093	0.163	0.020

[注] a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

巨噬细胞集落刺激因子是在炎症反应过程中由损伤的内皮细胞释放的一种多肽造血生长因子,参与炎症反应。GM-CSF调节巨噬细胞的多种功能,促进炎症因子白细胞介素-6(IL-6)和TNF- α 等的分泌。IL-10又称为细胞因子生成抑制因子,是IL-10家族的首要成员。本研究发现,砷染毒组大鼠血清中GM-CSF含量较对照组升高,而抗炎因子IL-10水平均下降($P<0.05$)。这提示亚砷酸钠可能通过促进GM-CSF,抑制IL-10表达,促进炎症反应的发生。

线粒体是ROS的来源之一。机体受到外源化合物刺激使线粒体受损时,会有大量ROS释放^[9]。随着ROS的增加,氧化程度超过氧化物清除的程度,氧化系统和抗氧化系统出现了不平衡,随之发生了氧化应激^[10]。在应激条件下,NADPH氧化酶是体内氧化还原的信号的关键酶,也是体内直接产生ROS的酶^[11-12]。本课题组前期研究发现砷接触可导致大鼠肺泡灌洗液中NADPH氧化酶和ROS大量增加^[6]。本次同样实验条件发现血清中NADPH氧化酶与ROS表达水平没有变化,这可能与采集不同样品有关,同时也提示血清样品中NADPH氧化酶和ROS指标不足以反映机体氧化应激水平。NO是由一氧化氮合酶催化L-精氨酸所产生的,是一种能有效反映机体氧化应激状态的重要指标。有研究证明,砷化物进入人体内可改变外周血单核细胞内NO水平^[13]。本研究结果与亚砷酸钠可诱导酵母细胞产生NO,且处理组细胞内NO水平明显高于对照组的研究结果一致^[14]。

综上所述,砷进入雄性大鼠体内后很可能通过NO表达增加,同时抗炎因子IL-10水平降低,最终引起炎症损伤和氧化应激损伤。另外,本实验仅探讨了雄性大鼠砷中毒作用机制,关于亚砷酸钠染毒对雌性

大鼠毒性作用的机制还需要进一步研究探讨。

参考文献

- [1] 孙贵范. 关注慢性砷暴露对健康危害的研究进展[J]. 中华地方病学杂志, 2014, 33(1): 1-2.
- [2] 胡蓓蓓. 低剂量五价无机砷对兔心血管系统影响的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2016.
- [3] Kharroubi W, Dhibi M, Mekni M, et al. Sodium arsenate induce changes in fatty acids profiles and oxidative damage in kidney of rats[J]. Environ Sci Pollut Res, 2014, 21(20): 12040-12049.
- [4] 邹爱霞, 亓云芳. 孕妇发砷含量及相关因素与新生儿先天性心脏病的联系研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2015, 30(6): 497-499.
- [5] 王惠惠, 朱佳玉, 陈锋, 等. 抗氧化剂对砷诱导人膀胱上皮细胞氧化应激相关通路的影响[J]. 环境与健康杂志, 2016, 33(3): 198-201.
- [6] 苏鑫, 王素华, 杨欢, 等. 亚砷酸钠对雄性大鼠肺氧化损伤作用研究[J]. 中国职业医学, 2016, 43(4): 420-423.
- [7] 苏鑫, 王春虹, 王素华, 等. 细胞自噬在砷暴露所致肺损伤中的作用[J]. 环境卫生学杂志, 2015, 5(4): 336-340.
- [8] 苏鑫, 王素华, 刘建国, 等. 亚砷酸钠致雄性大鼠肺损伤机制探讨[J]. 中国职业医学, 2016, 43(2): 143-147.
- [9] Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing[J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25(10): 502-508.
- [10] Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 345(1/2): 91-104.
- [11] Hayes P, Knaus UG. Balancing reactive oxygen species in the epigenome: NADPH oxidases as target and perpetrator[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 18(15): 1937-1945.
- [12] Paletta-Silva R, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes JR. NADPH oxidase biology and the regulation of tyrosine kinase receptor signaling and cancer drug cytotoxicity[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(2): 3683-3704.
- [13] Luna AL, Acosta-Saavedra LC, Lopez-Carrillo L, et al. Arsenic alters monocyte superoxide anion and nitric oxide production in environmentally exposed children[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 245(2): 244-251.
- [14] 吴丽华, 仪慧兰, 张虎芳. NO参与亚砷酸钠诱导酵母细胞死亡的调控[J]. 环境科学学报, 2012, 32(10): 2612-2616.

(收稿日期: 2016-12-20; 录用日期: 2017-04-14)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 陶黎纳)