

镉致大鼠肝线粒体氧化损伤的实验研究

Study on oxidative damage of hepatic mitochondria in rats exposed to cadmium

关坤，徐兆发^{*}，张芳林，邓小强，徐斌，邓宇

GUAN Kun XU Zhao-fa^{*}, ZHANG Fang-lin DENG Xiao-qiang XU Bin DENG Yu

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 通过线粒体孵育液染镉并用 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 干预研究镉致大鼠肝线粒体损伤的影响。结果显示, 随着染镉剂量的增加, MDA含量显著升高 ($P<0.05$); 线粒体复合体 (I + III)活性显著降低 ($P<0.05$); 线粒体释放细胞色素 C (Cytochrome C, CytC) 含量显著升高 ($P<0.05$)。且在一定范围内随着 $CdCl_2$ 剂量增加, 线粒体复合体 (I + III)活性有降低趋势, MDA含量和 CytC含量有升高趋势。与单纯染镉组比, NAC预处理组 MDA含量和 CytC含量显著降低, 线粒体复合体 (I + III)活性显著升高 ($P<0.05$)。提示镉可以剂量依赖性地诱导大鼠肝线粒体氧化损伤; NAC预处理能有效预防镉所致大鼠肝线粒体氧化损伤。

关键词: 镉; N-乙酰半胱氨酸; 氧化损伤; 线粒体损伤

中图分类号: R114 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2009)03-0207-03

镉 (cadmium, Cd) 是机体生长发育的非必需元素, 也是一种重要的环境污染物。镉极易在体内蓄积, 对肝、肾、肺等多系统均可造成损伤^[1]。镉的毒性机制很可能与线粒体的结构和功能异常有关, 镉致细胞毒性的早期靶部位可能是线粒体, 镉可引起大鼠肝细胞线粒体膜电位呈剂量依赖性下降, 其变化可以出现在细胞损伤之前^[2]。N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 是抗氧化剂, 也是巯基供给剂, 可阻断细胞凋亡过程^[3]。本实验通过线粒体孵育液染镉并用 NAC干预研究镉对大鼠肝线粒体氧化损伤的影响, 为阐明镉的毒性机制和为镉中毒的治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 肝线粒体制备

由中国医科大学实验动物中心提供实验用雄性 Wistar大鼠 6只, 体重 (180±10) g。实验前适应性饲养 7 d。线粒体制备用梯度离心法。将大鼠禁食 12 h后, 腹主动脉放血处死, 迅速剖取肝脏称重, 以 1:10 (W/V) 的比例加入预冷的匀浆介质 (蔗糖 250 mmol/L, 甘露醇 220 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, 0.25%牛血清白蛋白, pH 7.40), 用电动玻璃匀浆机在冰浴中制成匀浆。低温高速离心机 2 000 g离心 8 min, 弃沉淀, 取上清液, 于 10 000 g离心 2次, 弃上清, 每次 15 min, 用匀浆液冲洗沉淀, 使之悬于 1.0 ml匀浆液中

(以上过程均在 4℃下进行)。

1.2 线粒体孵育

将所得线粒体液分为 6组, 第 1组为对照组; 第 2~5组为不同剂量染镉组, 分别加入 10、100、1 000、10 000 μmol/L $CdCl_2$; 第 6组为 NAC预处理组, 线粒体液先用 500 μmol/L NAC预处理 30 min后加 $CdCl_2$ (浓度为 1 000 μmol/L)。各组于培养箱内 30℃孵育 1 h后测线粒体复合体 (I + III)活性、MDA及 CytC含量, 每个指标重复测定 6次。

1.3 测定指标及方法

线粒体复合体 (I + III)活性测定依据文献 [4] 描述的用细胞色素 C的变化量表示。线粒体 CytC含量按文献 [5] 法测定。丙二醛 (MDA)含量由硫代巴比妥酸比色法测定^[6]。蛋白含量由 Lowry法测定^[7]。

1.4 统计分析

实验所得数据以平均值±标准差表示, 用 SPSS 13.0软件单因素方差分析进行组间差异的统计学检验, 两组间比较用 Q检验 (Students-Newman-Keuls, SNK)。

2 结果

2.1 不同 $CdCl_2$ 浓度 MDA含量和线粒体复合体 (I + III)活性

从表 1可见, 与对照组相比, 100、1 000、10 000 μmol/L染镉组 MDA含量显著升高, 线粒体复合体 (I + III)活性显著降低 ($P<0.05$), 且在一定范围内随着 $CdCl_2$ 剂量增加, MDA含量有升高趋势, 线粒体复合体 (I + III)活性有降低趋势。

表 1 大鼠肝线粒体 MDA含量和线粒体复合体 (I + III)活性 ($\bar{x} \pm s$)

$CdCl_2$ (μmol/L)	样品数	MDA (μmol/g protein)	复合体 (I + III) [nmol/(min·mg protein)]
0	6	10.97±0.84	262.40±9.76
10	6	11.06±0.78	254.09±8.23
100	6	11.75±0.86*	232.51±7.27*▲
1 000	6	14.79±0.73**▲▲	169.96±8.40**▲▲
10 000	6	22.64±0.55**▲▲■	97.87±8.10**▲▲■

与对照组比较, * $P<0.05$; 与 10 μmol/L染镉组比较, ▲ $P<0.05$; 与 100 μmol/L染镉组比较, ★ $P<0.05$; 与 1 000 μmol/L染镉组比较, ■ $P<0.05$ 。

2.2 不同 $CdCl_2$ 浓度肝线粒体释放 CytC含量

从表 2可见, 与对照组相比, 1 000、10 000 μmol/L染镉组 CytC含量显著升高 ($P<0.05$), 且在一定范围内随着 $CdCl_2$ 剂量增加, CytC含量有升高趋势。

收稿日期: 2008-09-05

作者简介: 关坤 (1982-), 女, 硕士研究生。

1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 不同 CdCl₂浓度下大鼠肝线粒体释放 CytC含量 (x±s)

CdCl ₂ (μmol/L)	样品数	CytC (nmol/mg prot)
0	6	1.48±0.15
10	6	1.52±0.13
100	6	1.74±0.07
1 000	6	1.93±0.08*▲■
10 000	6	2.67±0.54*▲★★

与对照组比较, * P<0.05 与 10 μmol/L染镉组比较, ▲ P<0.05, 与 100 μmol/L染镉组比较, ★ P<0.05 与 1 000 μmol/L染镉组比较, ■ P<0.05

2.3 NAC预处理大鼠肝线粒体 MDA含量和线粒体复合体(I+III)活性

从表 3可见, 与对照组比较, 单纯染镉组 MDA含量显著升高, 线粒体复合体(I+III)活性显著降低(P<0.05); 与单纯染镉组比较, NAC预处理组 MDA含量显著降低, 线粒体复合体(I+III)活性显著升高(P<0.05)。与对照组比较, NAC预处理组 MDA含量和线粒体复合体(I+III)活性差异有统计学意义(P<0.05)。

表 3 各组大鼠肝线粒体 MDA含量和线粒体复合体(I+III)活性 (x±s)

组别	样品数	MDA (nmol/g prot)	复合体 (I+III) [nmol/(min·mg prot)]
对照组	6	17.24±0.68	872.25±4.83
CdCl ₂ 组	6	24.22±0.51*	743.01±5.15*
NAC+CdCl ₂ 组	6	22.46±0.96▲	915.75±6.15▲

与对照组比较, * P<0.05 与 CdCl₂组比较, ▲ P<0.05

2.4 NAC预处理大鼠肝线粒体 CytC含量

从表 4可见, 与对照组比较, 单纯染镉组线粒体释放 CytC含量显著升高(P<0.05); 与单纯染镉组比较, NAC预处理组线粒体释放 CytC含量显著降低(P<0.05)。与对照组比较, NAC预处理组线粒体 CytC含量差异有统计学意义(P<0.05)。

表 4 各组大鼠肝线粒体释放 CytC含量 (x±s)

组别	样品数	CytC (nmol/mg prot)
对照组	6	1.48±0.15
CdCl ₂ 组	6	1.93±0.08*
NAC+CdCl ₂ 组	6	1.69±0.11*▲

与对照组比较, * P<0.05 与 CdCl₂组比较, ▲ P<0.05

3 讨论

镉引发脂质氧化的机制尚不明确。Watjen等^[8]研究表明, 镉可能通过置换细胞胶质和膜蛋白络合的铁、铜等金属离子使其释放出来经 Fenton反应发生氧化应激。线粒体内自由基含量经常高达 10⁻¹¹mol/L, 高浓度的活性氧自由基极易使生成自由基的线粒体呼吸链本身及其邻近的线粒体内膜、DNA等超微结构氧化损伤, 导致线粒体功能丧失, 最终引起细胞坏死或凋亡^[9]。脂质过氧化是机体接触毒物后最早出现的直接损害之一, 是毒物作用于机体所启动的初级作用。毒物经过各种途径进入体内后, 经过一系列的反应可以产生大量的自由基, 自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸而产生

的脂质过氧化产物, 最终形成丙二醛(MDA)等, 因此测定MDA含量可以反映脂质过氧化的程度, 从而间接反映细胞损伤程度。本研究观察到镉剂量依赖性的引起线粒体MDA含量升高, 说明镉在线粒体内产生过量的自由基, 引起脂质过氧化和线粒体内抗氧化系统受损, 镉引起线粒体膜脂质过氧化, 使线粒体膜结构的完整性受到破坏, 进而使线粒体功能受损。NAC预处理使MDA含量降低到一定水平, 表明NAC预处理对镉引起线粒体氧化损伤有很好的预防作用。线粒体呼吸链酶复合体I(NADH:CQ还原酶)和复合体III(CytC还原酶)是活性氧物质产生的主要部位, 当1个电子从线粒体复合体I或III逃逸时, 它可和1分子氧结合形成超氧阴离子, 超氧阴离子可转化为H₂O₂及其他活性氧物质^[10]。复合体I或III受抑制使自由基产生增多, 过多的自由基又使其进一步损伤, 形成恶性循环^[11]。本研究发现, 镉剂量依赖性地引起其活性下降, NAC预处理使其活性升高, 说明镉引起的氧化损伤特别是线粒体膜的脂质过氧化导致线粒体复合体(I+III)活性降低, NAC预处理使受损的线粒体复合体(I+III)活性恢复成接近正常的水平。细胞色素C是一种可溶性色素蛋白, 其色素辅基是含铁的卟啉衍生物。CytC是构成线粒体呼吸链的主要成员之一, 在线粒体复合体III和复合体IV之间传递电子。在正常状态下, CytC特异定位于线粒体, 位于内、外膜之间, 且不能透过生物膜^[11]。在病理条件或外界理化因子刺激下, 线粒体膜的通透性发生改变, CytC释放到胞浆, 线粒体内CytC含量下降。本研究显示, 镉可剂量依赖性的引起线粒体释放CytC含量升高, NAC预处理使CytC含量降低, 说明镉引起的氧化损伤导致线粒体膜通透性增高, 线粒体释放CytC含量升高, NAC预处理后线粒体膜通透性降低, CytC含量恢复成一定水平。CytC从线粒体释放到胞浆, 可水解caspase-9酶原成caspase-9, 又进一步水解caspase-3酶原, caspase-3被激活后, 可能作用于胞质中的细胞骨架蛋白, 或作用于细胞核中的DNA酶, 引起DNA断裂, 从而引发不可逆转的细胞凋亡^[12]。

综上所述, 镉可以使线粒体内自由基含量增加, 损伤线粒体电子呼吸链, 导致线粒体释放CytC含量升高, 进而导致细胞凋亡, 这可能是镉毒作用的重要途径之一。NAC能有效的拮抗镉导致的氧化损伤, 对线粒体有很好的保护作用。近年来NAC已较多用于呼吸、心血管、神经系统临床和实验中^[13], 而在重金属特别是镉毒性的研究和治疗中却不多见, 因此利用NAC深入研究镉的毒性机制和治疗镉中毒方面具有广阔的前景。

参考文献:

- [1] Wanles M P, Coogan T P, Barter R A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium [J]. Crit Rev Toxicol 1992; 22: 175-201
- [2] Martel J, Maron M, Denizau F. Effect of cadmium on membrane potential in isolated rat hepatocytes [J]. Toxicol 1990; 60: 161-172
- [3] Zafarullah M, Li W Q, Sylvester J, et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions [J]. Cell Mol Life Sci 2003; 60(1): 6-20
- [4] 伍期专, 陈燕. 线粒体肌病患者的线粒体呼吸及呼吸链酶复合体活

- 力测定 [J]. 中华神经精神科杂志, 1993 26(5): 262-264.
- [5] 张均田. 现代药理学实验方法 (下册) [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 2000: 1228-1229.
- [6] 万伯健. 卫生毒理学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1991: 216-217.
- [7] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 36.
- [8] Watjen W, Beyersmann D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress [J]. Biometals 2004 17: 65-78.
- [9] Formanek-andree P, Emster L, Daltner G, et al. Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain en-

- zymes of submitochondrial particles [J]. Free Radic Biol Med 1997 22 (3): 391-400.
- [10] Sørensen M, Skov H, Autrup H, et al. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes [J]. Sci Total Environ 2003 9(30): 69-80.
- [11] 王明, 刘玉峰. 细胞色素 C与细胞凋亡的研究进展 [J]. 中国小儿血液, 2004 9 (4): 181-183.
- [12] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis [J]. Science 1998 281 (5381): 1309-1312.
- [13] 李毅敏, 赵树仪. N-乙酰半胱氨酸的研究进展 [J]. 天津药学, 2003 15 (2): 50-53.

无机砷的肝细胞毒性和氧化应激

Cytotoxicity and oxidative stress induced by inorganic arsenite on Chang liver cells

李冰, 张新玉, 李昕, 朱博

LIBING, ZHANG Xin-yu, LIXIN, ZHU BO

(中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 为研究亚砷酸钠 (NaAsO_2) 的肝细胞毒性和氧化应激作用。 NaAsO_2 (5, 10, 20, 40, 80, 100 和 $200 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 用 AlamarBlue 法检测细胞活力; NaAsO_2 (2.5, 5, 10 和 $25 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 或 NaAsO_2 ($10 \mu\text{mol/L}$) 染毒 2 h, 6 h, 12 h 和 24 h 用流式细胞术检测细胞内 $2', 7'$ -二乙酰二氯荧光素 (DCFH-DA) 的荧光强度, 间接反应细胞内氧化应激水平。结果 NaAsO_2 (5~ $200 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 能够显著降低 Chang 肝细胞的细胞活力, 且具有剂量效应关系 ($P < 0.01$); 不同剂量 NaAsO_2 (2.5, 5 和 $10 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 细胞内荧光强度明显增高, 分别是对照组的 1.67、1.96 和 2.30 倍 ($P < 0.01$); 而浓度 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 NaAsO_2 染毒组, 细胞内荧光强度在 12 h 和 24 h 均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。提示无机砷能够产生肝细胞毒性, 增强细胞内的氧化应激水平, 并且具有剂量和时间反应关系。

关键词: 亚砷酸钠; 氧化应激; Chang 肝细胞

中图分类号: R995 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2009)03-0209-02

砷是一种具有类金属特性的原生质毒物, 具有广泛的生物学效应, 已被美国疾病控制中心和国际防癌研究机构确定为致癌物^[1]。人类砷暴露主要来自于职业环境、自然环境以及含砷药物的医疗应用等三个方面。慢性砷中毒具有皮肤角化、色素沉着和脱发等典型的皮肤损伤以及远期潜在的致癌效应^[2]。关于慢性砷中毒的发病机制, 目前得到广泛认同的是无机砷能够诱发机体处于氧化应激状态, 产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 并造成机体多组织和器官的氧化性损伤。人群流行病学调查表明, 慢性砷暴露引起人群氧

化应激反应增强和 ROS 产生增多, 从而造成人体脂质和 DNA 等大分子氧化损伤。本实验用亚砷酸钠 (sodium arsenite, NaAsO_2) 对培养的正常人肝细胞株 Chang 肝细胞进行染毒, 观察 NaAsO_2 对 Chang 肝细胞的毒性和氧化应激作用, 为进一步的深入实验提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Chang 肝细胞株购自中国科学院细胞库, 亚砷酸钠 (NaAsO_2 , Fluka 美国), RPMI1640 培养基 (Gibco 美国), $2', 7'$ -二乙酰二氯荧光素 (DCFH-DA), AlamarBlue (Sigma 美国), CO_2 恒温培养箱 (Heraeus 荷兰), FACSCalibur 流式细胞仪 (BD 美国), 酶标仪 (Lab systems)。

1.2 细胞培养

Chang 肝细胞株购自中国科学院细胞库。5% CO_2 , 37°C 下常规培养于 RPMI1640 培养基, 10% 胎牛血清 (FBS), 1×10^5 U/L 青链霉素。细胞进入对数生长期后用 0.25% 胰蛋白酶消化和常规传代, 细胞生长至 80% 融合后进行染毒和相关试验。

1.3 细胞活力检测

采用 AlamarBlue 法^[3]。Chang 肝细胞以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于 96 孔板, 加入 NaAsO_2 (0, 5, 10, 20, 40, 80, 100 和 $200 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 将原培养液吸出, 换以含 10% AlamarBlue 的无血清 RPMI1640 培养基 $100 \mu\text{L}$ 。继续培养 4 h 用酶标仪在波长 570 nm 和 640 nm 处测定各孔光密度值, 并分别计算各孔的 AlamarBlue 还原率。实验结果以细胞存活率表示, 即: 细胞存活率 (%) = (实验组 AlamarBlue 还原率 / 对照组 AlamarBlue 还原率) $\times 100\%$ 。每个剂量组设 4 个平行样。

1.4 细胞内 ROS 平均荧光强度检测

Chang 肝细胞以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于 24 孔板, 加入 NaAsO_2 (0, 2.5, 5, 10 和 $25 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 或者将

收稿日期: 2008-12-26 修回日期: 2009-02-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600510)

作者简介: 李冰 (1974-), 女, 副教授, 博士。