文章编号:1000-5404(2005)14-1421-03

论著

低剂量硫芥诱导大鼠脾脏氧化应激状态的改变

曾 惠[1],刘 勇[1],朱明学[2],张黎明[2],董兆君[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]第二军医大学海医系,上海 200433)

提 要:目的 探讨低剂量硫芥诱导大鼠脾脏氧化应激状态的改变及其意义。**方法** 皮下注射硫芥,梯度离心法分离大鼠脾线粒体。用紫外分光光度法检测ROS、SOD、MDA及细胞色素含量;荧光分光法检测细胞内GSH含量;HE染色法观察脾脏病理损伤。**结果** 低剂量硫芥作用下,脾脏出现水肿;组织和线粒体内ROS、SOD、MDA、GSH、GSSG含量出现不同程度的改变;线粒体电子传递链成分(细胞色素)含量出现不同程度的丢失。**结论** 氧化应激状态的改变是低剂量硫芥诱导机体免疫器官(脾)损伤的毒作用机制之一。

关键词:硫芥;脾脏;氧化应激
中图法分类号:R322.21;R995 **文献标识码**:A

Changes of oxidative stress in rat spleen induced by low-dose sulfur mustard

ZENG Hui[1], LIU Yong[1], ZHU Ming-xue[2], ZHANG Li-ming[2], DONG Zhao-jun[1] ([1]Department of Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To study the changes of oxidative stress in rat spleen induced by low-dose sulfur mustard. **Methods** A total of 30 Wistar rats were divided into control group and sulfur mustard group. The sulfur mustard group was injected sulfur mustard (0.6 LD_{50}, 1.92 mg/kg) subcutaneously, while the control group with the same volume of saline solution. In all rats, the spleen mitochondria were isolated by density gradient centrifugation. The levels of ROS, SOD, MDA and cytochrome were measured by ultraviolet spectrophotometry. The changes of GSH were detected by fluorescence spectrophotometry. The morphology of spleen was investigated with HE staining. **Results** Treated with low-dose sulfur mustard, the spleen was of edema, the concentrations of ROS, SOD, MDA, GSH and GSSG changed, and the cytochrome (c, c1, aa3, b) of the mitochondria respiration chain lost. **Conclusion** The change of oxidative stress is one reason for the damage of rat spleen induced by low-dose sulfur mustard.

Key words: sulfur mustard; spleen; oxidative stress

生物体内氧化物如活性氧等相对超负荷会引起机体氧化应激。正常的细胞结构和功能需要通过各种氧化还原途径维持和调节,持续的氧化应激会破坏细胞结构和功能。因此,生物体氧化应激状态与多种疾病的病理密切相关。已有资料显示硫芥中毒后机体组织细胞处于氧化应激状态,本实验即以大鼠脾脏为研究对象,探讨其硫芥(sulfur mustard, SM)中毒后氧化应激状态的变化。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

健康成年Wistar大鼠30只,雌雄各半,体质量(200±50)g,由第三军医大学实验动物中心提供。动物随机分为正常对照组、实验组4组(4个时相点),每组6只,实验期间进水饮食无限制。实验组动物皮下注射硫芥(0.6 LD_{50},1.92 mg/kg),对照组则以等量生理盐水代替。各组动物于中毒后各时相点活杀取材。每组各时相点保证存活5只。

1.2 病理学观察[1]

分离中毒大鼠脾组织,置入Boin液中固定,24 h更换液体1次。常规石蜡包埋,4 μm切片。切片HE染色。Olympus显微镜观察照相。

基金项目:全军"十五"医学科学技术研究重点项目(01L054)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (01L054)

作者简介:曾 惠(1978-),女,四川省隆昌县人,硕士研究生,主要从事烷化物的毒作用机制方面的研究。电话:(023)68752284
通讯作者:董兆君,电话:(023)68752285

收稿日期:2004-06-22;**修回日期**:2005-01-18

1.3 氧化还原状态的改变

1.3.1 组织及线粒体匀浆的制备 参照南京建成试剂公司说明书制备,用 Bradford 法定蛋白含量。

1.3.2 组织及线粒体匀浆中 SOD、MDA 、ROS 含量测定 参照南京建成试剂盒说明书进行检测。

1.3.3 组织匀浆 GSH、GSSG 含量测定[2] 取 50 μl 上清用于 GSH 检测:加入 50 μl 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 pH 8.0,100 μl 新鲜配制的 1 mg/ml OPT 溶液,室温孵育 15 min。在荧光分光光度计激发波长 420 nm,发射波长 350 nm 处测荧光强度。取 50 μl 上清用于 GSSG 检测:加入 20 μl 0.04 mol/L NEM,室温孵育 20~30 min 后,取 50 μl 加入 0.1 mol/L NaOH 溶液,100 μl 新鲜配制的 1 mg/ml OPT 溶液,室温孵育 15 min。在荧光分光光度计激发波长 420 nm,发射波长 350 nm 处测荧光强度。查标准曲线并换算成 μg/mg 蛋白。

1.4 线粒体呼吸链细胞色素 aa3、b、c 和 c1 含量测定[3,4]

根据 Williams'方法改良而成。

1.5 统计学分析

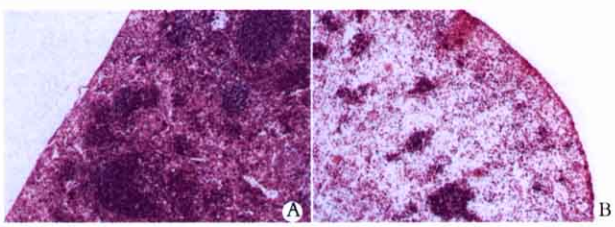
实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件包行单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠脾脏病理形态学改变

正常大鼠:脾脏包膜完整,边缘区清晰(图 1A)。

中毒大鼠:中毒大鼠脾脏包膜完整,但是脾内捕获抗原、识别抗原和诱发免疫应答的重要部位-边缘区水肿(图 1B)。



A: Normal rat spleen; B: Rat spleen intoxicated with sulfur mustard for 12 h

图 1 硫芥($0.6\ LD_{50}$)中毒大鼠脾脏病理学改变 (HE×100)

Fig 1 The pathological changes of rat spleen intoxicated with sulfur mustard of $0.6\ LD_{50}$ (HE×100)

2.2 氧化还原状态改变

2.2.1 脾脏 ROS、MDA、SOD、GSH、GSSG 含量的改变 机体通过酶系统和非酶系统产生氧自由基,氧自由基能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并由此形成脂质过氧化物,如醛基(MDA)等。SOD 活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力,而 MDA 的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。

脾脏 ROS 在硫芥中毒后 6 h 下降显著;SOD 活力在硫芥中毒后 2 h 显著增加;GSH 含量在中毒后 2 h 即显著下降。GSSG 含量、MDA 水平在正常范围内波动。由此可见,脾脏组织在硫芥中毒后 2 h 内即出现了应激状态,但无 ROS 的聚集,见表 1。

表 1 硫芥($0.6\ LD_{50}$)中毒大鼠脾脏氧化还原状态的改变($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Tab 1 Change of oxidation/deoxidation state in rat spleen treated with sulfur mustard of $0.6\ LD_{50}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Group	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	ROS (U/mg)	GSH (μg/mg)	GSSG (μg/mg)
Control	2.21±0.53	4.90±0.78	43.19±2.71	5.02±0.89	6.94±2.01
Sulfur mustard					
2 h	1.74±0.60	10.82±2.00**	45.21±11.73	3.30±0.61**	4.29±0.61
6 h	1.14±0.18	2.55±2.01	27.85±2.80**	2.64±0.32**	3.61±0.34
12 h	1.50±0.10	6.68±1.72	37.34±8.32	2.83±0.26**	4.19±0.89
24 h	2.02±0.80	6.04±2.20	32.19±1.85*	3.21±0.14**	4.35±0.30

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

2.2.2 线粒体 ROS、MDA、SOD、GSH、GSSG 含量的改变 脾脏线粒体内 GSH 含量在硫芥中毒后 2 h 内显著增加;GSSG 含量在硫芥中毒后 6 h 内显著增加;ROS 在硫芥中毒后 2 h 内显著下降;MDA 水平在硫芥中毒后显著升高,2 h 升至最高水平;SOD 水平在中毒后 2 h 内急剧升高($P<0.01$)。可见脾脏线粒体受到 ROS 攻击,见表 2。

表 2 硫芥($0.6LD_{50}$)中毒大鼠脾脏线粒体氧化还原状态的改变($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Tab 2 Changes of oxidation/deoxidation state in mitochodria of rat spleen treated with sulfur mustard of $0.6\ LD_{50}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

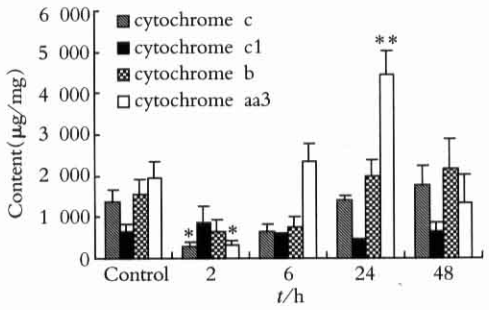
Group	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	ROS (U/mg)	GSH (μg/mg)	GSSG (μg/mg)
Control	2.75±0.16	2.69±1.08	5.30±1.02	3.13±0.09	1.77±0.27
Sulfur mustard					
2 h	4.17±0.19**	16.86±3.54**	3.31±0.58**	4.15±0.50**	1.95±0.14
6 h	1.97±0.11*	7.87±3.37	3.30±0.30**	2.79±0.15	2.29±0.30**
12 h	2.66±0.85	8.48±4.0*	3.39±0.86**	3.19±0.14	2.55±0.40**
24 h	2.31±0.04	3.84±2.46	3.28±0.30**	2.36±0.31	1.75±0.18

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

2.3 线粒体呼吸链细胞色素 aa3、b、c 和 c1 含量的改变

NADH 呼吸链是线粒体的主要组成部分,呼吸链有 3 个环节:底物脱电子环节,由谷氨酸和苹果酸等组成;递电子中间环节,由黄素二核苷酸、辅酶 Q 和细胞色素 b、c、c1 组成;呼吸链终末环节,由细胞色素 aa3 和 O_2 组成,上述 3 个环节中任意 1 个出现障碍即可引起电子传递障碍,导致"细胞窒息",从而使氧自由基生成增加[5]。

大鼠脾脏线粒体电子传递链成分 cyt-c、cyt-aa3 在硫芥中毒后 2 h 内丢失显著,cyt-c1 及 cyt-b 含量在正常范围内波动(图 2)。进一步说明线粒体内 ROS 聚集,ROS 的聚集又致使线粒体损伤。



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

图 2　硫芥(0.6 LD_{50})中毒大鼠脾脏线粒体细胞色素含量变化

Fig 2　Changes of cytochrome content in rat splenic mitochondria treated with sulfur mustard of 0.6 LD_{50}

3　讨论

氧化应激系指机体内抗氧化物系统和氧化物生成系统之间的不平衡状态。主要表现为自由基生成过量，产生细胞毒性效应。

ROS 是自由基的一种，主要包括超氧阴离子、过氧化氢、羟基自由基及氮氧自由基(NO·)，主要由线粒体产生；同时胞质氧化也生成 ROS。ROS 是生物活性极强的化学基团，能氧化线粒体生物膜，导致膜通透性增加；可修饰许多细胞内信号通路如蛋白磷酸酶、蛋白激酶以及转录因子等。其中，过氧化氢又可作为细胞内信使通过丝氨酸－苏氨酸或酪氨酸残基调节蛋白质磷酸化。ROS 的大多数效应是通过信号通路而非单纯的非特意性损害[6]。消除 ROS 的抗氧化防御体系的主要酶系有：SOD、过氧化氢酶、GSH-px；非酶系主要有 GSH。正常情况下，由 GSH 依赖机制清除 ROS。

MDA 是由 ROS 攻击生物膜中多不饱和脂肪酸，引发脂质过氧化作用而形成的脂质过氧化物，因而 MDA 水平高低可反映机体细胞受自由基攻击的严重程度，也可代表组织细胞内的 ROS 水平。

我们的实验结果显示，脾脏组织在硫芥中毒后 2 h 内即出现了应激状态，虽无 ROS 的聚集，但是脾脏线粒体受到 ROS 攻击，而且线粒体电子传递链成分丢失，将致使 ROS 的聚集，ROS 的聚集又致使线粒体损伤。由于氧自由基的主要损害是对细胞膜结构破坏，包括：膜磷脂不饱和脂肪酸过氧化，产生大量脂质过氧化产物；细胞膜流动性和通透性增加；组织细胞水肿坏死。我们在实验中又观察到脾脏组织在染毒后出现了明显的边缘区水肿。提示，ROS 可通过作用于线粒体来诱导脾脏出现病理学改变。

资料证实，低剂量硫芥能激发 PMNs 释放 ROS[7]；NO· 参与了硫芥诱导的损伤[8]；硫芥染毒致细胞死亡的脂质过氧化假说认为：GSH 消耗的结果使毒性脂质过氧化物形成[9]。Husain 在用亚致死剂量硫芥对小鼠染毒后发现，GSH-px 活性在白细胞、脾脏、肝脏中活性显著降低--硫芥在亚致死剂量下抑制白细胞和脾脏的抗氧化酶活性[10]。有研究报道，吸入或经皮吸收硫芥均可导致肝肺的氧化损伤(GSH 减少，MDA 增加)，用抗氧化剂能对抗硫芥所致的氧化损伤[11]。

由此可见，氧化应激状态的改变是低剂量硫芥诱导机体免疫器官(脾)损伤的毒作用机制之一。

参考文献：

[1] 蔡文琴，王泊沄. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 13－20.

[2] Hissin P J, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues[J]. Anal Biochem, 1976, 74(1): 214－226.

[3] 赵建钢，杨同书. 测定线粒体细胞色素 c、c1、b、aa3 含量的简单方法[J]. 生物化学与生物物理进展，1992，19(6)：483－484.

[4] Williams J N Jr. a method for the simultaneous quantitative estimation of cytochromes a, b, c1, and c in mitochondria [J]. Arch Biochem Biophys, 1964, 107(3): 537－543.

[5] 乔林，陈德昌，景炳文. 大黄对烫伤大鼠肠粘膜上皮细胞线粒体呼吸链的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志，2000，7(1)：17－20.

[6] Kumar O, Sugendran K, Vijayaraghavan R. Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulphur mustard administered to mice by inhalation or percutaneous routes[J]. Chem Biol Interact, 2001, 134(1): 1－12.

[7] Hug H, Enari M, Nagata S. No requirement of reactive oxygen intermediates in FAS-mediated apoptosis[J]. FEBS Lett, 1994, 351(3): 311－313.

[8] Armstrong J S, Steinauer K K, Hornung B, *et al*. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line[J]. Cell Death Differ, 2002, 9(3): 252－263.

[9] Levitt J M, Lodhi I J, Nguyen P K, *et al*. Low-dose sulfur mustard primes oxidative function and induces apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(5): 747－756.

[10] Husain K, Dube S N, Sugendran K, *et al*. Effect of topically applied sulphur mustard on antioxidant enzymes in blood cells and body tissues of rats[J]. J Appl Toxicol, 1996, 16(3): 245－248.

(编辑　龙　亮)