论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1690-03

白藜芦醇减轻三氧化二砷所致大鼠过氧化毒性作用

刘中禄[1],毕玉田[2],袁 军[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]实验动物中心,[2]呼吸内科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨白藜芦醇(resveratrol, RES)减轻三氧化二砷对大鼠的毒性作用。**方法** 腹腔注射三氧化二砷连续4周,治疗组在注射三氧化二砷前给予RES 30、60、120 mg·kg^{-1}·d^{-1}。4周后取动物血清、肝、肺、脾及脑组织测定超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、NO含量。**结果** 与正常对照组相比,三氧化二砷引起动物血清、肝、肺、脾及脑组织NO和MDA水平显著增高,SOD和GSH-Px含量明显下降。RES治疗后显著改善三氧化二砷引起的上述变化,血清和肝、肺、脾及脑组织MDA、NO含量降低,而且总SOD、GSH-Px的活力均有明显升高,RES的作用呈剂量依赖性。**结论** RES可保护抗过氧化酶活性和抑制过氧化物产生。

关键词: 三氧化二砷;白藜芦醇;自由基
中图法分类号: R595.05;R979.3;R995 **文献标识码:** A

Resveratrol protects against peroxide toxicity in rats induced by arsenic trioxide

LIU Zhong-lu[1], BI Yu-tian[2], YUAN Jun[1] ([1]Laboratory Animal Center, [2]Department of Respiratory Diseases, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effects of resveratrol against toxicity induced by arsenic trioxide in rats. Methods Arsenic trioxide was given to SD rats intraperitoneally for 4 weeks. Resveratrol was injected intraperitoneally to the animals 4 h before arsenic trioxide challenge at dose of 30, 60, or 120 mg·kg^{-1}·d^{-1}. Four weeks later, the contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO), glutathione peroxidase (GSH-Px) in serum, lung, spleen, liver and brain tissues were measured. Results Compared with the normal control rats, arsenic trioxide challenge resulted in increases of NO and MDA contents in serum, lung, spleen, liver and brain tissues, and decreases of GSH-Px and SOD levels in the rats received arsenic trioxide only. Resveratrol significantly inhibited these changes induced by arsenic trioxide in rat serum, lung, spleen, liver and brain tissues in a dose-dependent manner. Conclusion Resveratrol can protect anti-peroxidase activity and inhibit peroxide productions.

Key words: arsenic trioxide; resveratrol; free radicals

支气管哮喘和肺纤维化都是世界范围内严重威胁公众健康的慢性疾病,采用现有的治疗方法,疗效不甚满意,更不能根治。因此,寻求和开发有效的治疗药物为当前迫切需要解决的问题。三氧化二砷,一种古老的中药,又名亚砷酸,20世纪90年代初开始被应用于急性早幼粒细胞性白血病的治疗。有研究者证实三氧化二砷对防治支气管哮喘和肺纤维化有积极的作用[1,2],但由于该药的毒副作用制约了其应用。

白藜芦醇(resveratrol, RES)化学名称为(E)-3, 4′, 5-三羟基二苯乙烯, 是广泛存在于葡萄皮、花生和多种药用植物中的一种多酚类化合物,因其具有抗氧化、清除自由基等功效,长期以来一直用于心、脑血管疾病的防治[3,4]。近来报道该药还可有效防治肺损伤[5,6]。由于自由基是三氧化二砷发挥毒理作用的重要媒介[7,8],本研究将探讨白藜芦醇减轻三氧化二砷毒性的作用。

1 材料与方法

1.1 药品

RES(湖南省洪江华光生物有限公司,批号20040618,纯度98%),三氧化二砷(哈尔滨伊达公司,批号20050510,含量10 mg/支),超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)测试盒均购自南京建成生物研究所。其余试剂均为市售AR级。

作者简介:刘中禄,男,重庆市人,硕士,副教授,主要从事实验动物生产管理、教学和科研方面的研究。电话:(023)68757695

收稿日期:2008-01-24;修回日期:2008-03-19

1.2　仪器设备

AR2010 型酶标仪由瑞典 ANSOSROSIS 公司生产,722 分光光度计由上海精密仪器厂生产,GF-1 型高速匀浆器由江苏海门麒麟医用仪器厂生产,8022 型离心机由上海医科大学仪器厂生产。

1.3　动物分组、给药与饲养

40 只清洁级 SD 大鼠,体质量(220 ± 20)g,由第三军医大学大坪医院动物实验中心提供(生产许可证 SCXK(军)2002008)。分为 5 组,A 组:正常对照组(NC);B 组:三氧化二砷对照组;C 组:RES_H + 三氧化二砷组(高剂量组);D 组:RES_M + 三氧化二砷组(中剂量组);E 组:RES_L + 三氧化二砷组(低剂量组),每组 8 只。C、D、E 组分别予 RES 120、60、30 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$腹腔注射,1 次/d,连续 4 周;A、B 组腹腔注射等量生理盐水;B、C、D、E 组还在每次注射 RES 后 4 h 腹腔注射三氧化二砷 2 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,连续 4 周。

动物饲养于屏障环境(SPF 级设施)内[许可证号:SYXK(军)2002-032],饲喂全价颗粒饲料,饲料经 121 ℃高压灭菌。垫料采用松木刨花 121 ℃灭菌 30 min。饮用水为重庆颐洋企业发展有限公司生产的 ADW1-120-C 型实验动物无菌水系统,经紫外线灭菌,动物自由饮用。

1.4　标本获取

停药后 24 h 处死动物,分离血清,-70 ℃保存。取肝、肺、脾、脑组织液氮中冻存,检测前用生理盐水制备成 10% 匀浆,3 000 r/min 离心 15 min,取上清用于生化指标测定。

1.5　生化指标检测

分别取大鼠的肝、肺、脾、脑组织块 0.2 ~ 1.0 g,生理盐水漂洗,滤纸拭干。取组织重 9 倍的生理盐水,制备 10% 组织匀浆。先将组织放入盛有经 4 ℃预冷总量 2/3 的生理盐水的烧杯内。用眼科小剪尽快剪碎组织块,倒入组织匀浆机中,再用剩下的 1/3 生理盐水冲洗残留在小烧杯中的碎组织,一起倒入组织匀浆机中制成组织匀浆。取组织匀浆 5 ~ 10 ml,离心,取上清液测定 SOD 活性(邻苯三酚自氧化法),MDA 含量(TBA 比色法),GSH-Px 活性(DTNB 法,以每毫克蛋白每分钟使 GSH 浓度下降 1 μmol 为 1 个酶活力单位)。NO 含量测定采用亚硝酸盐法。具体操作按试剂盒说明书进行。蛋白质测定采用考马斯亮蓝法。

1.6　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析,多组间两两比较行 q 检验。

2　结果

2.1　大鼠的一般状态

在不同药物连续治疗的 4 周内,对各给药组与对照组比较观察。正常对照组的动物在进食情况、活动及外观、大便等方面未见异常情况,毛发有光泽。与正常对照组比较,三氧化二砷对照组动物出现不同程度的烦躁、肌肉震颤,有的出现嗜睡、厌食、腹泻,给药后 1 ~ 3 d 症状较重,但未见动物死亡,随着时间延长,症状好转,但动物消瘦、体质量减轻;C 组动物表现与 A 组相似,一般情况良好;D、E 组动物一般状态较 B 组有明显改善,动物反应灵敏,无明显消瘦、体质量减轻,无稀便、血便及脓性、黏液便,无动物死亡。

2.2　大鼠血清和肝、肺、脾及脑组织 GSH-Px、MDA、SOD 及 NO 值的变化

与正常对照组相比,三氧化二砷处理组动物血清和肝、肺、脾及脑组织 GSH-Px 活力明显下降($P < 0.01$),RES 治疗后,血清和肺组织的 GSH-Px 活力都明显改善($P < 0.05$),RES 剂量越大,效应越明显。SOD 在相同组别中其变化情况与 GSH-Px 的活性变化相似,RES 也明显改善三氧化二砷引起的动物血清和肝、肺、脾及脑组织 SOD 表达降低。三氧化二砷处理引起大鼠血清和肝、肺、脾及脑组织 MDA 含量显著升高($P < 0.01$),RES 使升高的 MDA 明显下降,RES 剂量越大降低越甚,与三氧化二砷对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与正常对照组相比,三氧化二砷明显提高动物血清和肝、肺、脾及脑组织 NO 水平($P < 0.01$)。与三氧化二砷对照组相比,RES 治疗组的 NO 水平明显降低($P < 0.05$)。见表 1 ~ 5。

表 1　大鼠血清 GSH-Px、MDA、NO、SOD 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH-Px(U/L)	MDA(μmol/L)	NO(μmol/L)	SOD(kU/L)
A	8	171.10 ± 7.07	3.66 ± 1.39	37.22 ± 3.18	455.50 ± 57.55
B	8	110.05 ± 21.16[a]	13.55 ± 2.82[a]	49.20 ± 1.28[a]	131.46 ± 48.17[a]
C	8	159.14 ± 6.13[c]	4.22 ± 1.53[c]	38.69 ± 4.11[c]	471.31 ± 47.11[c]
D	8	149.37 ± 8.67[c]	7.01 ± 1.73[c]	41.36 ± 3.01[c]	319.21 ± 82.11[c]
E	8	138.95 ± 6.68[c]	11.06 ± 2.16[b]	43.10 ± 4.11[b]	161.74 ± 40.17[b]

a:$P < 0.01$,与 A 组比较;b:$P < 0.05$,c:$P < 0.01$,与 B 组比较

表 2　大鼠肺组织 GSH-Px、MDA、NO、SOD 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH-Px (U/mg)	MDA (nmol/mg)	NO (nmol/mg)	SOD (U/mg)
A	8	12.88 ± 2.35	7.32 ± 2.33	3.71 ± 0.65	154.01 ± 13.55
B	8	7.77 ± 1.64[a]	14.53 ± 2.01[a]	5.35 ± 0.78[a]	122.22 ± 22.16[a]
C	8	11.12 ± 2.35[c]	8.65 ± 3.98[c]	3.95 ± 0.61[c]	148.74 ± 9.87[c]
D	8	10.02 ± 1.18[c]	10.59 ± 2.13[c]	4.21 ± 0.78[c]	142.31 ± 15.32[c]
E	8	9.36 ± 1.60[c]	12.05 ± 2.56[b]	5.10 ± 1.67	131.61 ± 17.31[c]

a:$P < 0.01$,与 A 组比较;b:$P < 0.05$,c:$P < 0.01$,与 B 组比较

表 3　大鼠脑组织 GSH-Px、MDA、NO、SOD 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH-Px (U/mg)	MDA (nmol/mg)	NO (nmol/mg)	SOD (U/mg)
A	8	11.18 ± 2.15	4.32 ± 1.23	2.87 ± 0.75	147.01 ± 12.47
B	8	7.15 ± 0.74[a]	10.57 ± 2.63[a]	4.95 ± 0.66[a]	101.22 ± 27.06[a]
C	8	10.52 ± 1.36[c]	5.35 ± 2.28[c]	3.05 ± 0.41[c]	135.67 ± 12.33[c]
D	8	9.96 ± 1.08[c]	8.49 ± 2.17[c]	4.06 ± 0.78[c]	126.37 ± 15.33[c]
E	8	8.06 ± 1.33[c]	9.08 ± 1.59[b]	4.10 ± 0.65[b]	110.73 ± 10.86[b]

a:$P < 0.01$,与 A 组比较;b:$P < 0.05$,c:$P < 0.01$,与 B 组比较

表 4　大鼠肝组织 GSH-Px、MDA、NO、SOD 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH-Px (U/mg)	MDA (nmol/mg)	NO (nmol/mg)	SOD (U/mg)
A	8	14.38 ± 2.36	8.68 ± 3.03	5.01 ± 0.55	161.22 ± 15.71
B	8	8.83 ± 1.54[a]	15.57 ± 3.04[a]	8.65 ± 0.18[a]	133.27 ± 18.19[a]
C	8	13.07 ± 2.25[c]	9.65 ± 3.78[c]	5.94 ± 0.64[c]	158.54 ± 10.64[c]
D	8	11.16 ± 1.23[c]	11.67 ± 3.27[c]	6.37 ± 0.58[c]	148.71 ± 11.36[c]
E	8	9.78 ± 1.58[b]	13.06 ± 2.28[b]	7.83 ± 1.67	139.55 ± 12.35[b]

a:$P < 0.01$,与 A 组比较;b:$P < 0.05$,c:$P < 0.01$,与 B 组比较

表5 大鼠脾组织 GSH-Px、MDA、NO、SOD 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH-Px (U/mg)	MDA (nmol/mg)	NO (nmol/mg)	SOD (U/mg)
A	8	12.88 ± 2.35	6.95 ± 2.15	4.68 ± 0.59	138.58 ± 16.74
B	8	7.77 ± 1.64[a]	13.58 ± 1.78[a]	6.43 ± 0.67[a]	97.76 ± 18.83[a]
C	8	11.12 ± 2.35[c]	8.63 ± 2.95[c]	4.91 ± 0.51[c]	130.83 ± 10.37[c]
D	8	10.02 ± 1.18[c]	10.79 ± 1.83[c]	5.82 ± 0.68[c]	110.71 ± 18.38[c]
E	8	9.36 ± 1.60[c]	11.15 ± 1.58[b]	6.05 ± 0.38	105.91 ± 15.48[b]

a: $P<0.01$,与 A 组比较; b: $P<0.05$, c: $P<0.01$,与 B 组比较

3 讨论

氧化损伤是部分毒性物质对机体损伤的基本特征,其特点之一是大量的自由基生成,而自由基具有极为活跃的反应性,其一旦生成,即可经其中间代谢产物不断扩展生成新的自由基,形成连锁反应。NO 是一种活性很强的自由基,可使生物膜不饱和脂肪酸氧化和芳香氨基酸硝基化,造成生物膜脂质过氧化,引起细胞损伤[9,10]。

机体内存在一系列抑制和清除自由基的抗氧化酶和非酶系统,以抑制或消除各种自由基引起的损伤。其中 SOD 和 GSH-Px 是体内重要的抗氧化酶。SOD 可催化 O_2^- · 歧化为 H_2O_2 和 O_2,从而避免经反应生成毒性更强的 $\cdot OH^-$。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶。它特异地催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应,可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。二者酶活力的高低间接反应了机体清除氧自由基能力大小[9,10]。已经证明,三氧化二砷通过诱发活性氧自由基,促发脂质过氧化,主要是 H_2O_2 和 O_2^- · ,引起细胞 DNA 损伤,同时刺激释放与损伤有关的各种促炎症因子在组织表达,并可通过激发 Caspase 途径引起细胞凋亡,导致组织损伤[11-13]。本研究显示三氧化二砷处理组大鼠机体内血清和肝、肺、脾及脑组织 MDA 含量增高,SOD 水平降低,GSH-Px 活性减少,表明三氧化二砷作用大鼠后体内产生氧化损伤,机体清除氧自由基能力降低,脂质过氧化物在体内蓄积量增大。

加入 RES 后,上述失衡发生变化,RES 显著提高血清和肝、肺、脾及脑组织 GSH-Px、SOD 活性,减少 MDA 和 NO 的含量,说明 RES 具有良好的抗三氧化二砷所致的氧化损伤和抑制脂质过氧化反应的效应。

RES 具有酚羟基结构,与自由基清除剂维生素 E 的活性结构相似,但其活性明显强于维生素 E,具有较强的清除自由基和抗脂质过氧化效应[5,6,14]。本研究结果显示,RES 可明显干预三氧化二砷所致的大鼠氧自由基应激损伤,降低脂质过氧化水平及 NO 自由基形成,提高了机体的 SOD 及 GSH-Px 等抗氧化酶活性,提示 RES 不仅具有清除氧自由基的作用,而且可以减少体内 NO 自由基生成,减轻 NO 毒性。RES 这一作用对于维护机体内环境的稳定,对细胞结构和功能的稳定具有十分重要的意义。临床上有望与三氧化二砷合用益于后者防治支气管哮喘和肺纤维化作用的发挥。

参考文献:

[1] 孟淑燕, 李惠萍, 李 霞, 等. 三氧化二砷对大鼠肺纤维化模型的干预作用及其机制的探讨[J]. 国际呼吸杂志, 2006, 26(11): 801-805, 809.

[2] 莫诚航, 吴曙粤, 李建民, 等. 喷射雾化吸入三氧化二砷对哮喘豚鼠气道 EOS 的影响[J]. 广西中医学院学报, 2003, 6(4): 1-3.

[3] 王桂英, 王永梅, 张丽男, 等. 白藜芦醇对阿霉素致心衰大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1563-1565.

[4] Hung L M, Chen J K, Huang S S, *et al*. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes[J]. Cardiovasc Res, 2000, 47(3): 549-555.

[5] 包海荣, 刘继新, 刘晓菊. 白藜芦醇抗肺部疾病作用的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(9): 681-684.

[6] 王 铮, 马清涌, 任 雷, 等. 白藜芦醇对重症急性胰腺炎急性肺损伤作用的实验研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2006, 37(6): 904-907.

[7] 熊慧瑜, 符立梧. 三氧化二砷抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(8): 599-603.

[8] 刘 鹏, 朴丰源, 王艳艳, 等. 孕鼠慢性砷暴露对胎鼠脑组织 DNA 的损伤和子代记忆功能的影响[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2007, 24(4): 391-393.

[9] Black H S. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage[J]. Photochem Photobiol, 1987, 46(2): 213-221.

[10] 方允中, 李文杰. 自由基与酶: 基础理论及其在生物学和医学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 251-259.

[11] Perkins C, Kim C N, Fang G, *et al*. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L)[J]. Blood, 2000, 95(3): 1014-1022.

[12] Ninomiya M, Kajiguchi T, Yamamoto K, *et al*. Increased oxidative DNA products in patients with acute promyelocytic leukemia during arsenic therapy[J]. Haematologica, 2006, 91(11): 1571-1572.

[13] Sasaki A, Oshima Y, Fujimura A. An approach to elucidate potential mechanism of renal toxicity of arsenic trioxide[J]. Exp Hematol, 2007, 35(2): 252-262.

[14] 张兰胜, 刘光明. 白藜芦醇的研究概述[J]. 大理学院学报, 2007, 6(4): 72-74.

(编辑 王 红)