文章编号:1000-5404(2012)07-0605-04

论著

直链烷基苯磺酸钠致小鼠肝脏氧化损伤的作用

赵文红[1],张建国[2],江城梅[1] (233030 安徽 蚌埠,蚌埠医学院:预防医学系营养与食品卫生学教研室[1],第一附属医院麻醉科[2])

[摘要] **目的** 探讨不同剂量直链烷基苯磺酸钠(linear alkylbenzenesulfonate,LAS)致小鼠肝脏损伤作用。**方法** 将40只健康成年ICR种小鼠按单纯随机抽样方法分为正常对照组和LAS低(150 mg/kg)、中(300 mg/kg)、高剂量组(600 mg/kg),采用灌胃方法,持续60 d,每10天称量1次,观察行为,60 d后称量处死,计算肝系数,做病理学检查;检测肝组织中超氧化物歧化酶(super oxidase dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)几种指标的水平。**结果** 实验过程中,各组小鼠出现不同程度的体质量增长缓慢甚至减轻($P<0.05$);低、中、高剂量组肝脏系数分别为(6.25±0.38)%、(6.94±0.52)%和(7.42±0.44)%,均明显高于对照组[(5.32±0.58)%,$P<0.05$];病理学检查发现有不同程度的损伤,高剂量组肝细胞出现水肿、点状坏死,肝窦充血现象;与对照组相比,各剂量组肝组织MDA含量明显增高,SOD及GSH-Px活性均明显降低($P<0.05$,$P<0.01$);同时,LDH与NOS活性有所增强($P<0.05$,$P<0.01$);**结论** LAS能抑制小鼠体质量的增长,对肝组织造成一定损伤,影响肝组织抗氧化功能。

[关键词] 直链烷基苯磺酸钠;小鼠;肝组织;氧化损伤
[中图法分类号] R363.13; R575.02; R914.4 [文献标志码] A

Oxidative damage of mouse liver induced by linear alkylbenzenesulfonate

Zhao Wenhong[1], Zhang Jianguo[2], Jiang Chengmei[1] ([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, Faculty of Preventive Medicine, [2]Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui Province, 233030, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the oxidative damage of mouse liver induced by linear alkylbenzenesulfonate (LAS). **Methods** Forty healthy ICR mice were divided into 4 groups using the method of simple random sampling, that is, control, low-dosage group of LAS(150 mg/kg), middle-dosage group of LAS (300 mg/kg) and high-dosage group of LAS(600 mg/kg) respectively, with every group including 5 male and 5 female mice. The test mice were administered by gavage for 60 d. The mice were weighed every 10 days and their behavior were observed. After 60 days, the mice were killed and liver index were calculated and pathological changes were examined. At the same time, the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), lactate dehydrogenase (LDH) and nitric oxide synthas (NOS) and the content of malondialdehyde (MDA) were detected. **Results** LAS treatment at different doses for 60 d resulted a reduce in body weight gain, even in the change of decrease in body weight (compared with the control group, $P<0.05$). Liver index of mice of the different dosage groups was increased [(6.25±0.38)%, (6.94±0.52)% and (7.42±0.44)% compared with the control group(5.32±0.58)%, $P<0.05$]. Pathological examination indicated that the damages of liver were found in different degrees. Hydropsia, spotty necrosis and sinusoidal congestion was found in hepatic cells of high-dosage group. The content of MDA and the activity of LDH and NOS in hepatic tissue of LAS groups were increased remarkably, while the activity of SOD and GSH-Px was decreased obviously (compared with the control group $P<0.05$, 0.01). **Conclusion** LAS inhibits the body weight gain, injures hepatic tissue and influences oxidative ability in mice.

[**Key words**] linear alkylbenzenesulfonate; mice; hepatic tissue; oxidative damage

Supported by the Natural Science Foundation of Department of Education of Anhui Province(KJ2007B362ZC). Corresponding author: Zhao Wenhong, E-mail: zwh3104@sina.com

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究项目(KJ2007B362ZC)
[通信作者] 赵文红,E-mail:zwh3104@sina.com

直链烷基苯磺酸钠(linear alkylbenzenesulfonate, LAS)是一种阴离子型表面活性剂,是洗涤剂的主要成分。LAS化学性质稳定,不易降解,难以消除,随洗涤剂的生产和使用对环境造成污染。每日人体可通过日用品、食物、食具残留等摄入洗涤剂10 mg以上[1-2]。动物实验及流行病学调查表明,LAS对动物及人有一定有害作用。近年来,洗涤剂对环境的污染现象及对人体的有害作用已引起人们重视,但其机制还不清楚。本研究采用各剂量LAS连续60 d对小鼠灌胃的方法,旨在通过观察小鼠在较长时间接触LAS,其对小鼠肝脏氧化应激及抗氧化能力的影响,并初步探讨一氧化氮合酶(NOS)及乳酸脱氢酶(LDH)的变化及作用,揭示LAS对小鼠肝组织的损害作用及其机制,对修订家用洗涤剂的安全使用剂量有参考意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 试剂 LAS;甲醛;二甲苯;石蜡;苏木精;伊红;树脂;以上试剂均为国产分析纯试剂,购自蚌埠医学院试剂公司。超氧化物歧化酶(super oxidase dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒为南京建成生物工程研究所产品,产品批号为20090531。

1.1.2 仪器 722s型分光光度计(上海分析仪器厂);FA2004电子天平(上海越平科学仪器有限公司);DY89-I型电动玻璃匀浆机(宁波新芝有限公司);KDC-160HR高速冷冻离心机(科大创新公司);YL_3回转式切片机(上海仪表厂);B-80型制冰机(上海安亭科学仪器厂);PM-10ADS自动纤维照相仪(Olympus公司,日本)。

1.1.3 实验动物 40只健康成年ICR种小鼠,雌、雄各半,体质量(28±3)g。购自南京大学医学院实验动物中心,为清洁级动物,合格证号码为scxk(苏)2008-0010,动物房温度为(22±2)℃,相对湿度为65%,自由进食饮水。

1.2 实验方法

1.2.1 LAS剂量的确定 本研究所采用的LAS的剂量是参考本实验室以往的实验资料,并结合预实验而确定[3]。

1.2.2 小鼠分组及处理 ICR种小鼠40只,雌、雄各半,常规饲养1周后按单纯随机抽样方法分成4个实验组,每组10只,雌、雄各半;分别为正常对照组、低剂量组(LAS:150 mg/kg)、中剂量(LAS:300 mg/kg)和高剂量组(LAS:600 mg/kg)。采用灌胃方式,3个实验组分别以150、300、600 mg/kg的剂量连续灌胃60 d,灌胃溶液体积为0.1 ml/10g,正常对照组给予等量生理盐水。每10天称量1次,60 d后称量,颈椎脱臼处死,取出肝脏,用冷生理盐水冲洗,分离周围脂肪及结缔组织,用滤纸吸干表面水分后用电子天平称量肝脏湿质量,计算小鼠的肝脏系数。一部分留取固定做切片,一部分制成10%的肝匀浆,测定相关指标。

$$\text{肝脏系数}=\frac{\text{肝脏湿质量(g)}}{\text{体质量(g)}}\times 100\%$$ [4]

1.2.3 病理组织学观察 取小鼠右叶相同位置肝组织用4 ℃生理盐水冲尽残血,用滤纸拭干,用中性10%甲醛溶液固定12 h;组织经洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片;苏木精染色,伊红复染,中性树胶封片,加盖玻片,恒温箱中烘烤15 h后镜下观察。

1.2.4 肝组织匀浆制备 取部分肝脏,称量,加4 ℃生理盐水制成10%的肝匀浆,于3 000 r/min离心10 min,取上清液,按试剂盒要求,检测以下指标:小鼠肝组织匀浆MDA含量、SOD、GSH-Px、LDH及NOS活性。

1.3 统计学分析

用SPSS 17.0软件进行数据处理。数据经正态性检验,结果用$\bar{x}\pm s$表示,进行单因素方差分析和q检验。

2 结果

2.1 LAS对小鼠外观行为的影响

正常对照组小鼠在实验过程中未出现异常表现,LAS各剂量组小鼠则有异常现象。中、高剂量组小鼠在实验第18天,低剂量组小鼠30 d以后,出现不同程度的行动迟缓,被毛疏松无光泽,且在小鼠灌胃33 d时,高剂量组1只雄性小鼠腹部肿大,2 d后死亡,解剖发现,腹腔内有脓性液体,胃部有一穿孔,分析可能系灌胃时损伤小鼠致死。

2.2 LAS对小鼠体质量的影响

各剂量组小鼠灌胃10 d之内,体质量均有所增长,各组间差异无显著性($P>0.05$),从20 d开始,低、中、高剂量组小鼠体质量明显低于对照组,中、高剂量组小鼠从30 d体质量停止增长且有减轻的现象($P<0.05$);40 d时,中、高剂量组小鼠体质量低于低剂量组($P<0.05$),60 d,高剂量组小鼠体质量低于中剂量组($P<0.05$),表现出随剂量增加,体质量增加逐渐减少,甚至出现体质量下降趋势。见表1。

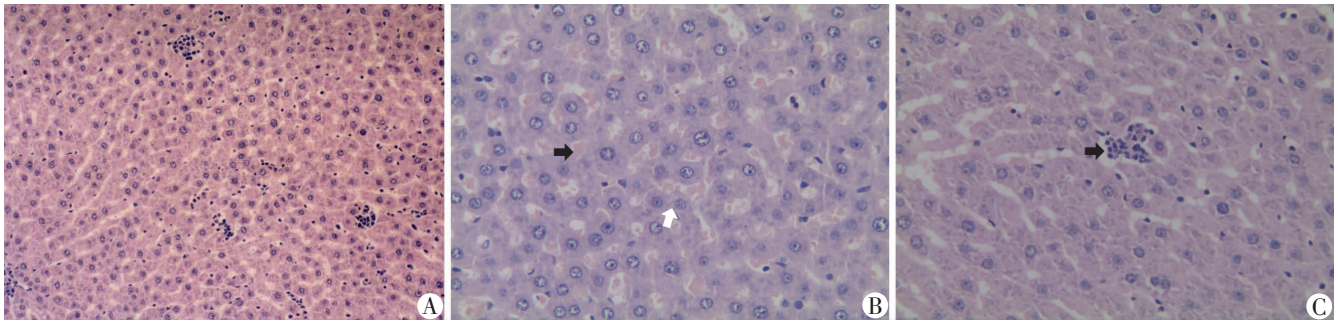
2.3 LAS对小鼠肝脏系数的影响

小鼠灌胃60 d后,低、中、高剂量组肝脏系数均明显高于对照组[(6.25±0.38)%、(6.94±0.52)%、(7.42±0.44)% *vs* (5.32±0.58)%,$P<0.05$];中、高剂量组小鼠肝系数均高于低剂量组小鼠($P<0.05$);中、高剂量组间无明显差异($P>0.05$)。

表1 LAS对小鼠不同灌胃时间体质量的影响($g, n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	0 d	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d
对照组	27.0±0.7	29.4±2.6	33.4±0.9	34.0±1.6	35.2±1.3	36.8±0.8	39.4±1.1
低剂量组	26.6±1.3	28.4±2.0	29.0±1.0[a]	30.0±2.0[a]	31.6±1.9[a]	32.2±1.1[a]	31.4±1.3[a]
中剂量组	26.8±1.6	28.0±1.0	30.0±1.2[a]	29.6±1.1[a]	29.2±1.3[ab]	29.6±0.6[ab]	30.6±1.7[ab]
高剂量组	25.8±1.3	27.6±0.9	28.2±1.3[a]	29.5±1.0[a]	29.2±1.6[ab]	29.0±1.9[ab]	28.7±1.4[abc]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与低剂量组比较;c:$P<0.05$,与中剂量组比较



A:高剂量组点状坏死 (×100); B:箭头(⬆):肝窦出血,箭头(⇧):肝细胞水肿,高剂量组小鼠肝细胞水肿及肝窦充血现象 (×400);C:箭头(⬆):肝细胞点状坏死,高剂量组点状坏死 (×400)

图 1 高剂量组小鼠肝组织病理学观察 (HE)

2.4 LAS 对小鼠肝脏组织形态学的影响

镜下观察小鼠肝组织切片可发现,正常对照组小鼠的肝组织细胞正常。而 LAS 各剂量组小鼠肝组织细胞均受到不同程度的损伤,高剂量组小鼠肝细胞受到的损伤则更明显如肝细胞发生中度水肿,肝窦充血、扩张,出现点状坏死,淋巴细胞浸润。见图 1。

2.5 LAS 对小鼠肝组织 MDA 含量、SOD、GSH-Px 活性的影响

由表 2 可知,小鼠接触 LAS 60 d 后,低、中、高剂量组肝组织 MDA 含量均明显高于对照组($P<0.01$);中、高剂量 MDA 含量均高于低剂量组($P<0.05$);中、高剂量组间无明显差异($P>0.05$)。

表 2 LAS 对小鼠肝脏组织 MDA 含量、SOD、GSH-Px 活性的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	MDA(nmol/mg)	T-SOD(U/mg)	GSH-Px(U/mg)
对照组	4.59 ±0.40	265.14 ±11.75	1 350.43 ±113.67
低剂量组	5.69 ±0.41[a]	236.51 ±6.27[a]	1 283.85 ±83.02
中剂量组	6.39 ±0.23[ab]	223.57 ±6.84[ab]	990.99 ±99.97[ab]
高剂量组	6.34 ±0.20[ab]	204.83 ±3.48[abc]	935.17 ±107.17[ab]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与低剂量组比较;c:$P<0.05$,与中剂量组比较

SOD 活性结果为:低、中、高剂量组小鼠肝组织 SOD 活性均明显低于对照组($P<0.01$);高剂量组最低,中剂量组次之,随 LAS 剂量增加,肝脏组织 SOD 活性降低加重。

GSH-Px 活性:中、高剂量组小鼠肝组织 GSH-Px 活性均明显低于对照组和低剂量组($P<0.01$);低剂量组与对照组之间及中、高剂量组间无明显差异($P>0.05$)。

2.6 LAS 对小鼠肝组织 LDH 活性及 NOS 的影响

小鼠灌胃 60 d 以后,中、高剂量组肝组织匀浆 LDH 活性均明显高于对照组($P<0.01$);低剂量组与对照组间无明显差异($P>0.05$);各剂量组之间,高剂量组高于低剂量组($P<0.01$);低、中剂量组及中、高剂量组间无明显差异($P>0.05$)。NOS 变化:与对照组相比,低、中、高剂量组 NOS 活性显著升高($P<0.01$);各剂量组中,高剂量组高于低、中剂量组($P<0.05$,$P<0.01$);低、中剂量组间无明显差异($P>0.05$),见表 3。

表 3 LAS 对小鼠肝组织 LDH 和 NOS 活性的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	LDH(U/g)	NOS(U/g)
对照组	13 760.32 ±3 924.98	264.8 ±37.8
低剂量组	17 796.09 ±4 579.11	379.4 ±64.7[a]
中剂量组	21 356.96 ±1 597.03[a]	446.8 ±90.9[a]
高剂量组	24 232.32 ±1 815.37[ab]	588.2 ±94.1[abc]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与低剂量组比较;c:$P<0.05$,与中剂量组比较

3 讨论

本实验发现 LAS 可使小鼠体质量增长受到抑制或体质量减轻、小鼠肝脏肿大,相关酶的指标也相应发生变化,如氧化应激指标 MDA 明显增加,抗氧化指标 SOD、GSH-Px 明显下降,LDH 和 NOS 活性明显增加。实验动物体质量增长的抑制或体质量减轻是一种综合毒性效应,可能受到多种毒效应的影响,包括食欲、消化功能、代谢和能量消耗变化等。肝系数增大可反映肝脏的肿大如增生、充血等变化。LDH 和 NOS 活性的变化及小鼠肝脏组织形态学的变化也可说明这种毒性作用。

蔡德雷等[5]发现,4 周龄的 NIH 雄性小鼠饮用不同浓度的餐具洗洁精,分别在染毒后第 4、8 天测定其肝脏谷胱甘肽还原酶(GR)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力,结果显示,各浓度组的 GSH-Px 活力未见明显影响($P>0.05$)。本研究与以上研究不同的是,小鼠较长时间接触 LAS 如 60 d,各剂量组小鼠肝匀浆 GSH-Px 活力显著下降,同时 SOD 活力显著下降,MDA 含量明显升高,表明 LAS 可诱发小鼠肝组织氧化应激,使自由基异常增多,可能是造成肝脏损伤的主要原因。与之前研究结果不同[5],主要原因是本研究中 LAS 剂量高于前者,作用的时间长于前者。本研究结果说明 LAS 毒性较小,但长期接触,特别是长期较高剂量接触可能对人的健康造成危害,提示我们在日常生活中经常接触尤其职业接触者应注意防护。我们在

前期研究[3]中观察到LAS对果蝇的生殖能力及果蝇的寿命产生了影响,LAS对果蝇的毒性作用,其原因可能为自由基链式反应的结果。张莹辉等[6]研究LAS对猪肝脏组织的毒性作用时发现,LAS蓄积可导致肝组织的氧化损伤,与本研究结果一致。SOD、GSH-Px是细胞内主要的抗氧化酶,其活性的高低反映了机体清除自由基的能力[7-8];MDA是脂质过氧化物降解的主要产物,其含量高低反映了机体细胞受自由基攻击及组织脂质过氧化损伤的严重程度[9-10]。在肝细胞病变过程中,自由基、酶及脂质过氧化均发挥重要作用,这些指标的水平可反映肝细胞损伤的程度[11-12]。在后续研究中应进一步检测LAS对肝功能指标的影响。

研究[13-14]显示,细胞坏死使LDH释放入组织液中,因此可通过测定血清中LDH了解组织器官受损状态,报道较多的为检测血清中LDH活性了解不同组织的损伤情况[15],本研究采用的方法与以往不同,利用LDH试剂盒直接检测肝组织匀浆中LDH活性,其结果可能更能直接说明LAS对小鼠肝组织LDH活性的影响,且该方法操作简单,但其可靠性及是否受其他因素影响有待进一步研究。

对NO在各种疾病发生发展中起的作用尚存争议。NO作为一种重要的细胞内信使,具有各种生理功能,同时NO在许多疾病的发展过程中起重要作用,许多病理过程中常伴有NO生成量的改变[16]。有学者认为[17-18],NO可抑制细胞线粒体功能,抑制核酸酶的活性,抑制糖代谢和参与氧化损伤。我们在本实验中证实LAS可使各剂量组小鼠肝组织匀浆中NOS表达明显增加,提示LAS导致的肝组织损伤过程中可能有NO介导。因此,有理由认为LAS对小鼠肝组织产生损伤的机制之一可能是通过激活NOS生成大量NO,损伤蛋白质、核酸及脂质膜,其具体机制应经进一步研究才能得到证实。

综上分析,LAS可使实验小鼠体重增长受到抑制或直接造成体质量减轻,使小鼠肝脏肿大,肝细胞发生损伤,且使小鼠肝组织匀浆抗氧化能力降低。LAS为家用洗涤剂的主要成分,使人们在享受家用化学品带来的方便干净的同时,也造成了潜在的健康危害,构成了社会卫生和安全问题。

参考文献:

[1] Sanderson H, Dyer S D, Prece B B, *et al*. Occurrence and weight-of-evidence risk assessment of alkyl sulfates, alkyl ethoxysulfates, and linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in river water and sediments[J]. Sci Total Environ, 2006, 368(2/3): 695-712.

[2] 赵文红, 江城梅. 家用洗涤剂毒性作用及对食品污染的研究现状[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(1): 88-90.

[3] 赵文红, 张鼎, 周纯先, 等. 直链烷基苯磺酸钠对黑腹果蝇生殖能力及寿命的影响[J]. 中南大学学报:医学版, 2011, 36(2): 154-158.

[4] 王心如. 毒理学基础[M]. 第5版. 北京:人民卫生出版社, 2007: 131.

[5] 蔡德雷, 徐立红, 王晓峰, 等. 餐具洗洁精对小鼠肝脏解毒功能的影响[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(4): 267-269.

[6] 张莹辉, 王艳国, 刘松年, 等. 合成洗涤剂对猪肝脏的损伤作用[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(3): 346.

[7] 汪洪波,汪斌,向小勇. 厄多司坦预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤及心肌细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(1): 61-64.

[8] 张粟,冉云,王玲,等. 茶多酚对乙醇所致原代肝细胞损伤的保护作用研究[J]. 营养学报,2009, 31(4): 379-383.

[9] Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients[J]. Toxicology, 2003,189(1/2): 113-127.

[10] Mehmetcik G, Ozdemirler G, Kocak-Toker N, *et al*. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress [J]. Exp Toxicol Pathol, 2008, 60(6): 475-480.

[11] 郑荣梁, 黄中洋. 自由基生物学[M]. 第3版. 北京:高等教育出版社, 2007: 95-108.

[12] 丁伟,陈晓超,刘树滔,等. 酒精对肝细胞损伤的自由基机理研究[J]. 福州大学学报:自然科学版, 2009, 37(6): 924-928.

[13] 刘森泉, 高秋萍, 阮红, 等. 紫心甘薯多糖对四氯化碳肝损伤小鼠的保护作用[J]. 浙江大学学报:理学版, 2010, 37(5): 572-576.

[14] 李应冬,赵信科,李子佳,等. 当归红芪超滤物对急性心肌梗死大鼠的保护作用及对热休克蛋白70表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(1): 92-94.

[15] 张蓓,薛长湖,周鑫,等. 海参和海星脑苷脂对大鼠急性肝损伤影响的比较研究[J]. 营养学报, 2011, 33(1): 19-23.

[16] 黄晓丽, 唐望先, 但自力, 等. 日本血吸虫性病兔肝纤维化的酶组织化学研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2005, 14(3): 344-348.

[17] Wang H, Chen X P, Qiu F Z. Increased hepatic expression of nitric oxide synthase type II in cirrhotic rats[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(13): 1923-1927.

[18] Berges A, Van-Nassauw L, Timmermans J P, *et al*. Time-dependent expression pattern of nitric oxide and superoxide after myocardial infarction in rats[J]. Pharmacol Res, 2007, 55(1): 72-79.

(**收稿**:2011-10-20;**修回**:2011-11-29)

(编辑 吴培红)