

2, 3, 7, 8-四氯二苯并二恶英对 SD 大鼠肝脏 SOD、GST、MDA 影响的实验研究

汤乃军, 刘云儒, 任大林

(天津医科大学公共卫生学院, 天津 300070)

摘要: 目的 研究 2, 3, 7, 8-四氯二苯并二恶英 (TCDD) 对 SD 大鼠肝脏 SOD、GST、MDA 的影响。方法 把 50 只雌性 SD 大鼠随机分为 10 组: 染毒 24 h 组 (染毒剂量为: 0.01、0.1、1、10、50 $\mu\text{g/kg}$)、染毒 24 h 对照组; 染毒 72 h 组 (染毒剂量为: 0.1、1、10 $\mu\text{g/kg}$)、染毒 72 h 对照组, 每组 5 只。采用一次性腹腔注射染毒, 测定其肝脏中 SOD、GST 的活性和 MDA 的含量。结果 染毒 24 h 后, 与对照组相比, 各染毒组 SOD 活力有所下降, 但差异无显著性; 各染毒组 GST 活力都有所增加, 但只有 50 $\mu\text{g/kg}$ 组差异有显著性 ($P < 0.05$), 且染毒剂量与 GST 活力之间有剂量-效应关系; 各染毒组 MDA 含量都有所增加, 其中 10、50 $\mu\text{g/kg}$ 组差异有显著性 ($P < 0.05$), 且染毒剂量与 MDA 含量之间存在剂量-效应关系。染毒 72 h 后, 与对照组相比, 各染毒组 SOD 活力均显著下降 ($P < 0.05$), 且染毒剂量与 SOD 活力之间有剂量-效应关系; 各染毒组 GST 活力都有所增加, 但差异无显著性; 各染毒组 MDA 含量都有所增加, 其中 1、10 $\mu\text{g/kg}$ 组差异有显著性 ($P < 0.05$), 且染毒剂量与 MDA 含量之间存在剂量-效应关系。结论 急性染毒后, TCDD 对 SD 大鼠的肝脏具有脂质过氧化作用, 引起 MDA 含量增加, SOD 活力降低, TCDD 能诱导 GST 的活力, 但诱导作用不强。

关键词: TCDD; SOD; MDA; GST

中图分类号: O625.21 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)06-0335-03

Experimental study on the effects of TCDD on SOD, GST, MDA in livers of SD rats

TANG Nai-jun, LIU Yun-ru, REN Da-lin

(School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of TCDD on the levels of SOD, GST, MDA in livers of SD rats. **Method** 50 female SD rats were randomly divided into 2 groups: TCDD exposure for 24 h (according to exposure dose redivided into 6 subgroups: 0.01, 0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{gTCDD/kg bw}$ and control group); TCDD exposure for 72 h (redivided into 4 subgroups: 0.1, 1, 10 $\mu\text{gTCDD/kg bw}$ and control group according to exposure dose); 5 rats for each subgroup. The animals were injected with TCDD ip (controls with 0.3 ml DMSO). The activities of SOD and GST, the levels of MDA in livers of rats were determined. **Result** 24 h after injection with TCDD, the SOD activity showed decreasing tendency but no significant differences with control group; the GST activity showed increasing tendency in all TCDD-treated subgroups but only 50 $\mu\text{g/kg bw}$ subgroup had significant difference with control group ($P < 0.05$), and there was some dose-response relationship between TCDD dose and GST activity; the MDA level showed some increasing tendency in all TCDD-treated groups but only 10 and 50 $\mu\text{g/kg bw}$ groups had significant difference with control group ($P < 0.05$), and there was some dose-response relationship between TCDD dose and MDA level. 72 h after injection with TCDD, the SOD activity significantly decreased in all TCDD-treated subgroups ($P < 0.05$) and there was dose-response relationship between TCDD dose and SOD activity; the GST activity seemed increase in all TCDD-treated subgroups but no significant difference with control group; the MDA level only increased in 1 and 10 $\mu\text{g/kg bw}$ subgroup ($P < 0.05$) and there was dose-response relationship between TCDD dose and MDA level. **Conclusion** TCDD might cause hepatic lipid peroxidation in SD rats after acute exposure, induce MDA level increase, SOD activity decrease, but the effect of TCDD on GST activity seemed quite little.

Key words: 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD); SOD; MDA; GST

2001 年 5 月, 由包括中国在内的 91 个国家赞同的 POPs 公约 (斯德哥尔摩公约) 获得通过, 这个公

约要求各国立即控制和治理以二恶英 (dioxin) 为代表的 12 种在环境中具有高残留、高生物浓缩和高生物毒性的物质, 也就是 POPs (persistent organic pollutants) 物质。二恶英是一类化合物的统称, 包括多氯二苯并二恶英 (PCDDs) 和多氯二苯并呋喃

收稿日期: 2003-07-03

作者简介: 汤乃军 (1963—), 男, 硕士, 教授, 从事劳动卫生与职业病教学及职业性皮肤病学和工业毒理学研究工作。

(PCDFs), PCDDs 有 75 种同系物, PCDFs 有 135 种同系物。2, 3, 7, 8-四氯二苯并二恶英 (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD) 是二恶英类物质中毒性最强的, 被认为是世界上毒性最强的化合物。

很多毒物都能引起机体发生脂质过氧化作用, 二恶英能否引起脂质过氧化作用尚不完全清楚, 本实验欲研究在急性染毒的条件下 TCDD 对 SD 大鼠肝脏中 SOD 活力、GST 活力和 MDA 含量的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

2, 3, 7, 8-TCDD (美国 Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), 纯度 99%; 二甲基亚砜 (DMSO) 为国产分析纯; 超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒、谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; ECOM-F 型半自动生化仪 (德国 eppendorf 公司产品)。

1.2 动物分组及染毒

清洁级 SD 雌性大鼠 50 只, 体重 (180±20) g, 由天津市防病中心动物室提供。随机分成 10 组: 染毒 24 h 组 (染毒剂量为 0.01、0.1、1、10、50 μg/kg)、染毒 24 h 对照组, 染毒 72 h 组 (染毒剂量为 0.1、1、10 μg/kg)、染毒 72 h 对照组, 每组 5 只, 采用一次性腹腔注射染毒。TCDD 溶于 DMSO 中, 质量浓度分别为 0.005、0.05、0.5、5、25 μg/ml, 对照组给予 0.3 ml DMSO。

1.3 SOD、GST、MDA 的测定

染毒 24 h 或 72 h 后, 处死动物, 取肝脏, 制备 10 %肝匀浆。取适量的肝匀浆, 按试剂盒的说明分别测定总 SOD、GST、MDA, 用半自动生化分析仪测定吸光度, 波长分别为 546、405、546 nm, 计算总 SOD、GST 的活力, MDA 的含量, 肝匀浆中蛋白含量用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定。

1.4 统计学处理

数据用 SPSS 10.0 软件包进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析进行多组间比较及两两比较, 并进行相关分析。

2 结果

2.1 染毒 24 h

由表 1 可见, TCDD 染毒 24 h 后, 与对照组相比, 各染毒组 SOD 的活力都有所下降, 但差异无显著性, 进行相关分析, $r = -0.114$, $P > 0.05$; 各染毒组 GST 活力都有所增加, 但只有 50 μg/kg 组差异有

显著性 ($P < 0.01$), 且染毒剂量与 GST 活力之间呈剂量-效应关系 (相关系数为 $r = 0.567$, $P < 0.01$), 即随着染毒剂量的增加, GST 的活力随之增加; 各染毒组 MDA 含量都有所增加, 其中 10、50 μg/kg 组差异有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且染毒剂量与 MDA 含量之间呈剂量-效应关系 (相关系数为 $r = 0.849$, $P < 0.01$), 即随着染毒剂量的增加, MDA 的含量随之增加。

表 1 TCDD 染毒 24 h 肝匀浆中 SOD 活力、GST 活力和 MDA 含量 ($\bar{x} \pm s$)

剂量组 (μg/kg)	样品数 (n)	SOD 活力 (NU/mg prot)	GST 活力 (U/mg prot)	MDA 含量 (nmol/mg prot)
对照组	5	127.95±12.05	229.62±12.52	1.06±0.35
0.01	5	118.99±14.27	233.46±13.33	1.13±0.21
0.1	5	116.04±8.90	236.13±23.04	1.70±0.36
1.0	5	118.07±3.73	247.37±16.50	1.94±0.67
10.0	5	118.05±6.88	249.29±22.75	2.11±0.10 *
50.0	5	121.53±10.28	291.31±38.18 **	2.92±0.56 **

与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下表同。

2.2 染毒 72 h

由表 2 可见, TCDD 染毒 72 h 后, 与对照组相比, 各染毒组 SOD 的活力都显著降低 ($P < 0.01$), 且染毒剂量与 SOD 活力之间呈剂量-效应关系 (相关系数为 $r = -0.845$, $P < 0.01$), 即随着染毒剂量的增加, SOD 的活力降低; 各染毒组 GST 活力都有所增加, 但差异无显著性 ($P > 0.01$), 进行相关分析, 相关系数为 $r = 0.333$, $P > 0.05$; 各染毒组 MDA 含量都有所增加, 其中 1.0、10.0 μg/kg 组差异有显著性 ($P < 0.01$), 且染毒剂量与 MDA 含量之间呈剂量-效应关系 (相关系数为 $r = 0.807$, $P < 0.01$), 即随着染毒剂量的增加, 肝匀浆中 MDA 的含量随之增加。

表 2 TCDD 染毒 72 h 肝匀浆中 SOD 活力、GST 活力和 MDA 含量 ($\bar{x} \pm s$)

剂量组 (μg/kg)	样品数 (n)	SOD 活力 (NU/mg prot)	GST 活力 (U/mg prot)	MDA 含量 (nmol/mg prot)
对照组	5	129.94±15.76	233.10±3.82	1.10±0.07
0.1	5	101.91±9.60 **	233.81±14.99	1.93±0.59
1.0	5	95.75±4.03 **	243.16±17.66	2.04±0.24 **
10.0	5	76.29±12.08 **	248.14±18.21	2.56±0.12 **

3 讨论

有一些文献曾报道 TCDD 能参与机体的脂质过氧化作用^[1~11], 如 TCDD 能增加 O_2^- 、 H_2O_2 等活性氧的产生, 脂质过氧化的中间产物如 MDA 等增加, 而抗

氧化酶如 SOD、GPx、过氧化氢酶等活力下降, 高脂食物能加重 TCDD 引起的脂质过氧化作用, 使抗氧化酶活力下降, 甲状腺切除能部分地防止 TCDD 造成的脂质过氧化作用, TCDD 引起的脂质过氧化作用可能是依赖于铁的。二恶英在代谢过程中产生活性氧的途径可能有两个: 一是二恶英被细胞色素 P450 代谢成易氧化还原的酚类或醌类物质, 在有氧的条件下, 它们在氧化还原的过程中能不断产生 O_2^- ; 另一途径是细胞色素 P450 在代谢二恶英时能不断生成 O_2^- 。一般认为, 二恶英作为 AHR 的配体, 与胞浆内的 AHR 结合后进入核内, 然后与特异的增强子序列结合, 诱导药物细胞色素 P450 基因表达, 细胞色素 P450 将二恶英代谢成易氧化还原的酚类或醌类物质, 而这些物质又是某些抗氧化酶 [如 GST, 葡萄糖醛酸转移酶和 NAD(P)H 醌还原酶等] 基因表达的诱导剂。Kono Y^[12] 等人的研究发现, 通过乳汁进入新生大鼠体内的 1, 2, 3, 4-TCDD, 从第 2 天开始抑制肝内一些抗氧化酶 (如 GPx、CuZn-SOD、CAT) mRNA 的表达, 到第 6 天开始恢复, 但 Mn-SOD mRNA 并不被抑制, 相反, 到第 10 天时显著高于对照组 ($P < 0.05$)。还有人研究发现 TCDD 能诱导培养细胞的 CuZn-SOD mRNA 表达和增加 CuZn-SOD 的活力^[13]。

本次实验采用一次染毒, 分别观察 24 h 和 72 h 后肝脏中 MDA、SOD、GST 的变化情况。结果发现, 染毒 24 h 后, 各染毒组 MDA 的含量就有所增加, 尤其是高剂量组; 72 h 后, MDA 含量明显增加, 且染毒剂量与 MDA 含量之间有剂量-效应关系。染毒 24 h 后, 各染毒组 SOD 的活力有所下降, 但与对照组相比差异无显著性; 染毒 72 h 后, 各染毒组 SOD 的活力明显下降, 且染毒剂量与 SOD 活力之间存在着剂量-效应关系。由此可见, 一次大剂量染毒 TCDD 后, 很快就会对肝脏造成脂质过氧化作用, 同时使抗氧化酶 SOD 的活力下降, 但 SOD 活力下降得相对较慢, 这可能是由于 TCDD 进入肝脏后, 诱导了 SOD 基因的表达, 产生一些 SOD, 但这种诱导作用较弱, 而且持续时间很短, 这些都有待于进一步研究。染毒 24 h 后, 各染毒组肝脏中 GST 的活力有所增加, 但只有最高剂量组 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 差异有显著性, 染毒剂量与 GST 活力之间存在着剂量-效应关系; 染毒 72 h 后, 虽然各染毒组 GST 活力在数值上有所增加, 但与对照组相比, 差异都没有显著性, 可见 TCDD 对 SD 大鼠

肝脏中 GST 基因的诱导作用较弱。有文献曾报道过 TCDD 对大鼠肝脏 GST 基因的诱导作用相对较弱^[14], 本实验结论与此一致。

参考文献:

- [1] Jakoby WB, Ketterer B, Mannervik B. Glutathione transferases: nomenclature [J]. *Biochem-Pharmacol*, 1984, 33 (16): 2539-2540.
- [2] Maier A, Dalton TP, Puga A. Disruption of dioxin-inducible phase I and phase II gene expression patterns by cadmium, chromium, and arsenic [J]. *Mol-Carcinog*, 2000, 28 (4): 225-235.
- [3] Hassoun EA, Bagchi D, Stohs SJ. Evidence of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) induced tissue damage in fetal and placental tissues and changes in amniotic fluid lipid metabolites of pregnant CF1 mice [J]. *Toxicol Lett*, 1995, 76 (3): 245-250.
- [4] Bestervelt LL, Piper DW, Pitt JA, et al. Lipid peroxidation in the adrenal glands of male rats exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) [J]. *Toxicol Lett*, 1994, 70 (2): 139-145.
- [5] Nohl H, de-Silva D, Summer KH. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induces oxygen activation associated with cell respiration [J]. *Free Radic Biol Med*, 1989, 6 (4): 369-374.
- [6] Stohs SJ, Al-Bayati ZF, Hassan MQ, et al. Glutathione peroxidase and reactive oxygen species in TCDD-induced lipid peroxidation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1986, 197: 357-365.
- [7] Hemansky SJ, Mohammadpour HA, Murray WJ, et al. Effect of thyroidectomy on 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced lipid peroxidation [J]. *Pharmacology*, 1987, 35 (6): 301-307.
- [8] al-Turk WA, Shara MA, Mohammadpour H, et al. Dietary iron and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced alterations in hepatic lipid peroxidation, glutathione content and body weight [J]. *Drug Chem Toxicol*, 1988, 11 (1): 55-70.
- [9] Stohs SJ, Al-Bayati ZF, Hassan MQ, et al. Glutathione peroxidase and reactive oxygen species in TCDD-induced lipid peroxidation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1986, 197: 357-365.
- [10] Latchoumycandane C, Chitra KC, Mathur PP. The effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the antioxidant system in mitochondrial and microsomal fractions of rat testis [J]. *Toxicology*, 2002, 171 (2-3): 127-135.
- [11] Kem PA, Fishman RB, Song W, et al. The effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on oxidative enzymes in adipocytes and liver [J]. *Toxicology*, 2002, 171 (2-3): 117-125.
- [12] Kono Y, Okada S, Tazawa Y, et al. Response of anti-oxidant enzymes mRNA in the neonatal rat liver exposed to 1, 2, 3, 4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin via lactation [J]. *Pediatr Int*, 2002, 44 (5): 481-487.
- [13] Cho JS, Chang MS, Rho HM. Transcriptional activation of the human Cu/Zn superoxide dismutase gene by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin through the xenobiotic-responsive element [J]. *Mol Genet Genomics*, 2001, 266 (1): 133-141.
- [14] Gregus Z, Madhu C, Klaassen CD. Inducibility of glutathione S-transferases in hamsters [J]. *Cancer Lett*, 1989, 44 (2): 89-94.