

偏钒酸铵对小鼠脾脏微粒体抗氧化酶活力的影响

Effect of ammonium metavanadate on antioxidant enzyme activity in splenic microsomes of mice

孙素玲, 杨成群, 计芮
SUN Su ling YANG Cheng qun JI Rui

(安徽科技学院 安徽 凤阳 233100)

摘要: 选取 60 只小鼠, 随机分为 6 组。对照组饮用三重蒸馏水, 5 个实验组每天分别饮用 2.5、5、10、15 和 20 mg/kg 偏钒酸铵, 持续饮用 20 d。测定脾脏微粒体中谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione Peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活力和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量。结果实验组 GSH-Px、SOD 活力随偏钒酸铵剂量的增加而降低, MDA 含量随偏钒酸铵剂量的增加而增加, 与对照组相比, 5~20 mg/kg 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。说明偏钒酸铵在此剂量范围内可降低小鼠脾脏微粒体抗氧化酶活力。

关键词: 偏钒酸铵; 脾脏; 微粒体; 谷胱甘肽过氧化物酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R114 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2008)02-0116-02

由于近几年来钒环境污染的加剧, 人们对钒生物效应研究聚焦于钒的毒理学方面^[1]。钒排泄缓慢, 容易在组织中蓄积, 进入人体内的钒主要在胃、肾、肝和肺中累积^[2-4], 也能在脂肪和血浆类脂质中贮存^[2], 当钒在体内的累积达一定量时, 可损害人和动物健康。有关钒毒性作用研究的报道多为机体中毒的症状和病理变化方面。钒可致肺炎、剧烈瘙痒等, 接触大量钒化合物可出现呼吸道、消化道和神经系统症状, 并损害造血系统^[5-7], 改变新陈代谢及生化机能^[8], 抑制繁殖能力和生长发育^[9], 降低动物的抗毒素及抗癌的能力^[10], 甚至致死。本研究旨在观察钒对小鼠脾脏微粒体 SOD、GSH-Px 活力和 MDA 含量的影响, 为探讨钒对人和动物生理生化机能的影响提供依据, 为环境钒污染的安全性评价和治理提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年健康的昆明种小鼠 60 只, 实验动物生产许可证 SCXK(皖)2005-001, 普通级, 体重 22~25 g, 雌雄各半, 安徽科技学院实验动物中心提供。观察饲养 2 周。

1.1.2 主要试剂 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

收稿日期: 2007-09-18 修回日期: 2007-11-20

作者简介: 孙素玲 (1958-), 女, 副教授, 研究方向: 动物毒理学。

1.2.1 剂量与分组 60 只小鼠随机分成 6 组, 每组 10 只。5 个实验组分别饮用剂量为 2.5、5、10、15 和 20 mg/kg 的偏钒酸铵; 对照组饮用 20 ml/kg 的三重蒸馏水。每天早晨饮用, 每次饮用前禁水 3 h。染毒 2 h 后给水, 持续饮用 20 d。各组雌雄分笼饲养, 饲养室温度 22~25℃, 湿度 50%~60%, 自由采食、饮水 (禁水时间除外)。实验期间细心观察小鼠情况。

1.2.2 脾脏微粒体的制备 (钙沉淀法)^[11] 小鼠禁食 24 h 不禁水, 颈椎脱臼处死, 剖开腹腔取出脾脏, 用预冷的生理盐水洗净血污, 滤纸吸干脾脏表面的水分。称重后置于小烧杯中, 用手术剪剪碎, 按每克脾脏 3 ml 的比例加入蔗糖-Tris-HCl 缓冲液, 用玻璃匀浆机制备匀浆, 转速 600 r/min, 研杵上下移动 8 次。将匀浆液倒入量筒中, 用缓冲液洗涤匀浆管并将其倒入量筒中, 最后缓冲液加至约 5 ml/g 组织, 将脾脏匀浆移到离心管中, 以 6 000 r/min 离心 5 min, 弃去沉淀部分 (细胞碎片和细胞核), 取上清液以 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去沉淀部分, 量取去除线粒体的上清液的总体积, 加入 CaCl_2 溶液, 使其终浓度为 8 mmol/L, 用高速冷冻离心机以 25 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 沉淀部分即为粉红色、半透明状的微粒体。将微粒体沉淀悬于 KCl-Tris-HCl 缓冲液中, 充分混匀, 以 25 000 r/min 离心 15 min, 其沉淀部分即为经清洗过后的微粒体, 将其混悬于 KCl-Tris-HCl 缓冲液 (缓冲液用量为 1 ml/g) 中, 充分混匀, 超声破膜后待用。使用前用双缩脲法测定微粒体中蛋白含量。

1.2.3 脾脏微粒体中蛋白含量测定 (双缩脲法)^[12] 取 6 支试管, 分别加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml 的标准酪蛋白溶液, 再分别加入 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0 ml 蒸馏水, 然后各加 4.0 ml 双缩脲试剂, 室温放置 30 min, 于 540 nm 波长下比色。最后以酪蛋白含量为 Y, 光密度为 X, 绘制标准曲线, 计算出回归方程。

吸取 1 ml 微粒体匀浆, 加入 1.0 ml 蒸馏水和 4.0 ml 双缩脲试剂, 与前同样比色, 根据吸光度和回归方程求出待测样品蛋白含量。

1.2.4 GSH-Px、SOD 活力及 MDA 含量测定 按试剂盒说明书操作。

1.2.5 统计处理 用 SPSS 1.0 软件对实验数据进行统计分析, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 确定差异显著性作 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小鼠的一般状况

2.5 mg/kg 组和对照组小鼠在实验期间无异常现象, 5

10 mg/kg组各有 2只小鼠在第 16天时出现轻微的食欲下降, 20 mg/kg组小鼠在第 17天时出现食欲下降, 精神萎靡。至染毒结束时无动物死亡。

2.2 待测样品蛋白含量

根据标准酪蛋白的含量和吸光度计算出回归方程为: $y=0.065+1.76x$, $r^2=0.9823$ 根据测得的脾脏微粒体的吸光度利用回归方程计算出待测样品蛋白含量。

2.3 GSH-Px、SOD活力和 MDA含量

由表 1可见, 随着偏钒酸铵剂量的增大, 脾脏微粒体中 GSH-Px、SOD活力逐渐降低, 与对照组相比, 2.5 mg/kg组的脾脏微粒体中 GSH-Px、SOD活力降低不显著 ($P>0.05$); 5~20 mg/kg组差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$)。实验组 MDA含量随偏钒酸铵剂量的增加而升高, 与对照组相比, 2.5 mg/kg组升高不显著 ($P>0.05$); 5 mg/kg组显著升高 ($P<0.05$); 10~20 mg/kg组升高极显著 ($P<0.01$)。

表 1 偏钒酸铵对小鼠脾脏微粒体 GSH-Px、SOD 活力和 MDA含量的影响

组别	GSH-Px活力 [μmol/(mg·min)]	SOD活力 [μmol/(mg·min)]	MDA含量 (μmol/ml)
染毒 2.5mg/kg	149.82±20.50	65.74±1.18	24.19±0.74
染毒 5mg/kg	125.39±5.23*	63.82±2.32*	25.93±1.57*
染毒 10mg/kg	121.53±3.70*	59.35±0.85**	28.53±1.56**
染毒 15mg/kg	84.80±24.82**	48.21±2.10**	34.25±1.21**
染毒 20mg/kg	78.71±10.84**	40.89±1.50**	40.10±0.68**
对照组	154.49±22.47	69.43±1.30	22.04±0.75

与对照组比较, * $P<0.05$ ** $P<0.01$

3 讨论

本实验结果表明, 偏钒酸铵在 2.5 mg/kg剂量时对脾脏微粒体中 GSH-Px、SOD活力和 MDA含量无明显影响。在 5~20 mg/kg剂量范围内可显著降低小鼠脾脏微粒体 GSH-Px和 SOD活力, 升高 MDA含量。SOD、GSH-Px活力的降低及 MDA含量的升高说明机体分解和清除自由基的能力减弱, 破坏了体内自由基产生与清除之间的动态平衡, 使自由基在体内大量积累, 从而破坏生物膜脂质双层结构, 使膜流动性和通透性增加, 转运受到影响。微粒体主要成分为内质网膜, 内质网膜受损, 蛋白质合成、蛋白质糖基化和脂类合成等都会受影响。这种毒作用势必会影响到淋巴细胞正常的发育及免疫应答。除此之外, 也会影响到脾脏的其他功能。

李才等^[13]研究了钒酸盐对糖尿病大鼠组织自由基防御机制的影响, 在水中加入 100 mg/L和 200 mg/L的钒酸钠后, 大鼠肝中还原型谷胱甘肽含量和肾超氧化物歧化酶 (SOD)

活力无明显影响; 但肾谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性降低, 肾脂质过氧化物 (LPO) 含量上升, GSH-Px/LPO降低, 证明了钒酸盐具有过氧化性。其研究结果与本实验结论一致, 所不同的是鼠的机能状态不同, 研究的靶器官不同, 本实验是从亚细胞水平检测偏钒酸铵对抗氧化酶活力的影响。

本实验的不足之处在于所用动物数量相对较少, 也未对其组织损伤变化进行研究, 关于偏钒酸铵引起谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶活力的降低以及丙二醛含量升高的机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Soldi T, Rizzo C, Alberti G. Environmental vanadium distribution from an industrial settlement [J]. The Sci of the Total Environ 1996 181: 45-50.

[2] WHO. Vanadium: Environmental Health Criteria [S]. Geneva 1988 81.

[3] Edel J, Pietra R, Sabbioni E, et al. Ubertaini. Disposition of vanadium in rat tissues at different ages [J]. Chemosphere 1984 13: 87-93.

[4] Kuceva J, Sinkova M, Lener J, et al. Vanadium determination in rat tissues and biological reference materials by neutron activation analysis [J]. Radioanal Nuc Chem Articles 1990 141: 49-59.

[5] 袁莉, 杨鹰, 高铭宇. 微量元素钒的生物学效应 [J]. 中国兽医科学, 1999 29 (1): 21-23.

[6] Nriagu JQ. Vanadium in the environment [J]. John Wiley & Sons Inc 1988 403-410.

[7] Cantley LC, Cantley JL, Jove Phson L. A characterization of vanadate interactions with the (Na⁺)-ATPase [J]. J Biol Chem 1978 253: 7361-7368.

[8] Zaporowska H, Wasilewski W. Hematological effects of vanadium on living organisms [J]. Comp Biochem Physiol 1992 103: 223-231.

[9] Domingo JL. Vanadium: A review of the reproductive and development toxicity [J]. Repro Toxicol 1996 10 (3): 175-182.

[10] Martin BD, Felver RA, Stearns DM, et al. Vanadium quantitation: Essentiality and Pharmacologic and toxicological studies in rodents [J]. In: Watson RR, Wolinsky J. Methods nutrition research CRC Press Boca Raton FL [M]. 325-354.

[11] 张桥, 石年, 朱心强, 等. 卫生毒理学基础 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000 278-279.

[12] 陈钧辉, 陶力, 李俊, 等. 生物化学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2003 197-199.

[13] 李才, 刘松岩, 王丽娟. 经口给予钒酸盐对糖尿病小鼠组织自由基防御机制的影响 [J]. 白求恩医科大学学报, 1992 18 (1): 34-36.

本刊被新闻出版署首批认定为出版规范合格期刊

自 2007年 7月起, 国家新闻出版署对全国期刊进行出版形式规范检查。受检的 7300多种期刊经初检、复检, 并经各省新闻出版局报刊处认真核实, 最终确定首批 3305种为合格 (A类) 期刊, 本刊名列其中。首批合格期刊名单已在媒体和中国记者网上公布。

本刊编辑部