

亚慢性染砷对小鼠脑组织线粒体琥珀酸脱氢酶活性及蛋白表达的影响

洪岩¹, 朴丰源^{1*}, 李盛², 王艳艳¹, 刘鹏¹

(1 大连医科大学劳动卫生与环境卫生学教研室; 2 大连医科大学生物化学教研室, 辽宁 大连 116044)

摘要: 目的 观察砷对小鼠脑组织线粒体琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性及其 α 亚单位 (Sdh α) 蛋白表达的影响, 以及牛磺酸和维生素 C 对上述影响的干预作用, 为探讨砷的神经毒作用机制提供分子毒理学依据。方法 SPF 级小鼠 50 只, 按体重将小鼠随机分为 1 ppm 三氧化二砷 (As_2O_3) 染毒组、4 ppm As_2O_3 染毒组、牛磺酸抗氧化干预组 (4 ppm As_2O_3 + 150 mg/kg 牛磺酸)、维生素 C 抗氧化干预组 (4 ppm As_2O_3 + 45 mg/kg 维生素 C) 和对照组。通过自然饮用含不同浓度 As_2O_3 蒸馏水的方式使小鼠染毒; 干预剂以灌胃方式投给, 每星期 2 次, 连续染毒 60 d。于染毒第 0 天、15 天、30 天、60 天时取脑, 提取脑组织线粒体, 检测 SDH 的活性和 Sdh α 蛋白表达。结果 在染砷第 60 天, 染砷组小鼠脑组织线粒体 SDH 活性和 Sdh α 蛋白表达量均下降, 尤其 4 ppm 染砷组小鼠脑组织线粒体的 SDH 活性和 Sdh α 蛋白表达量都明显低于对照组 ($P < 0.05$); 而牛磺酸和维生素 C 干预组, 小鼠脑组织线粒体 SDH 活性和 Sdh α 蛋白表达量均显著高于 4 ppm 染砷组。其中砷暴露后第 30 天和第 60 天的小鼠脑组织线粒体 SDH 活性和 Sdh α 蛋白表达量均显著低于染砷 0 天 ($P < 0.05$)。结论 亚慢性砷暴露能导致脑组织线粒体 SDH 的活性降低和 Sdh α 蛋白表达下调, 而牛磺酸和维生素 C 对砷导致的 SDH 毒性可能具有一定的拮抗作用。

关键词: 三氧化二砷; 脑组织; 线粒体; 琥珀酸脱氢酶; 牛磺酸; 维生素 C

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)04-0247-04

Effect of subacute arsenic exposure on activity and expression of mitochondrial SDH in brain of mice

HONG Yan¹, PIAO Fengyuan^{1*}, LI Sheng², WANG Yanyan¹, LIU Peng¹

(1. Department of Occupational and Environmental Health, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: Objective To explore the effect of subacute arsenic exposure on the activity of mitochondrial succinate dehydrogenase (SDH) and expression of its subunit A (Sdh α) protein in brain of mice and the protective effects of taurine and vitamin C. Methods 50 mice were randomly divided into 5 groups: group 1 were only given drinking water (control group); group 2 and 3 were treated with 1 or 4 mg/L arsenic trioxide respectively; mice in group 4 and 5 were administered with 4 mg/L arsenic trioxide and 150 mg/kg taurine or 45 mg/kg VitC respectively. Arsenic trioxide was dissolved into drinking water. Taurine and VitC were given by gavage twice a week. Experimental period was 60 days. At the 0, 15, 30 and 60th day after exposure, mice were killed by decapitation and their brains were taken. For the detection of the activities of mitochondrial SDH and expression levels of Sdh α protein. Results The activities of SDH and levels of Sdh α protein in mitochondria of brain were all decreased at the 60th day after As exposure, especially the group 4 which received 4 mg/L As_2O_3 ($P < 0.05$), while the activities of SDH and expression of Sdh α protein in protective groups were significantly higher than those received 4 mg/L As_2O_3 administration ($P < 0.05$). In the group 4 (received 4 mg/L As_2O_3), the activities of SDH and expression of Sdh α protein at 30th or 60th day after exposure were also significantly lower than those at the 0 day of exposure ($P < 0.05$). Conclusions The results showed that subacute arsenic exposure can induce the inhibition of the activities of SDH and the expression of Sdh α protein in mitochondria of brain, while taurine and VitC seem to have some antagonistic effect on these toxic effects of As.

Key words: Arsenic trioxide (As_2O_3); Brain tissue; Mitochondria; Succinate dehydrogenase (SDH); Taurine; Vitamin C

地方性砷中毒是世界性公共卫生问题之一, 其中

砷对中枢神经系统的毒性作用已引起人们的高度关注。人群流行病学调查和动物实验结果显示, 砷可引起记忆障碍、智力低下等神经行为异常, 但其神经毒作用机制并不十分清楚。目前认为砷诱导神经组织产生过多的活性氧 (ROS) 是砷的神经毒作用机制之一。线粒体是产生 ROS 的主要场所。谢瑶芸通过病

收稿日期: 2009-01-12 修回日期: 2009-04-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30571584)

作者简介: 洪岩 (1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 毒理学, E-mail: hongyan2895@163.com

*: 通讯作者, 男, 博士生导师, 教授, 研究方向: 毒理学, E-mail: piaofydx@yahoo.com.cn

©1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

理形态学观察,发现砷可引起线粒体嵴稀疏、断裂及空泡变性^[1]。Patlolk等认为,砷可通过抑制线粒体的各种酶活性而损害细胞的功能^[2]。以上研究均提示线粒体可能是砷神经毒性作用的靶部位。琥珀酸脱氢酶(SDH)是线粒体的标志酶,它是联系线粒体三羧酸循环和电子传递链的关键酶,其活性异常将直接影响线粒体电子传递和氧化呼吸作用,并通过呼吸链上的电子漏产生过多的ROS^[3]。而牛磺酸和维生素C具有一定的抗氧化作用。因此本研究通过观察亚慢性砷暴露对小鼠脑组织神经细胞线粒体SDH的活性和蛋白表达的影响,以及牛磺酸和维生素C对砷导致SDH毒性的干预作用,为探讨砷的神经毒作用机制提供靶标依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

三氧化二砷(As_2O_3)、维生素C和牛磺酸(Sig-ma,美国),PVDF膜(Millipore,美国),SDH试剂盒(南京建成生物工程研究所),琥珀酸脱氢酶 α 亚单位(Sdh α)抗体(Abcam,美国),凯基BCA蛋白含量检测试剂盒(凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 仪器

超声细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HC-2518R高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);微电脑电热恒温水槽(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);DYCZ-240型垂直板电泳槽(北京市六一仪器厂);DYY-12型电脑三恒多用电泳仪(北京市六一仪器厂);酶标仪(Thermo Electron Corporation,美国)。

1.3 动物分组及处理

SPF级小鼠50只,雌雄各半,体重26.3~30.9 g,购于大连医科大学实验动物中心。按体重将小鼠随机分为1 ppm三氧化二砷(As_2O_3)染毒组、4 ppm As_2O_3 染毒组、牛磺酸干预组(4 ppm As_2O_3 + 150 mg/kg牛磺酸)、维生素C干预组(4 ppm As_2O_3 + 45 mg/kg维生素C)和对照组。通过自然饮用含不同浓度 As_2O_3 蒸馏水的方式使小鼠暴露于砷,连续染毒60 d。干预剂从染毒第一天开始到染毒第60天,按小鼠体重给药,以灌胃方式投给,每星期2次。

1.4 线粒体提取

小鼠砷暴露第0天、15天、30天、60天时,颈椎脱臼法处死小鼠后立即取脑,新鲜脑组织放在冷匀浆液(0.01 mol/L Tris, 0.001 mol/L EDTA- Na_3 , 0.01 mol/L蔗糖, 0.8%氯化钠溶液, pH 7.4)中进行匀浆。脑组织匀浆后,以1 000×g离心5 min,收

集上清液。以4 000×g离心10 min,再收集上清液。以15 000×g离心20 min,收集沉淀物(为线粒体),-80℃保存备用。整个操作过程在4℃条件下进行。

1.5 琥珀酸脱氢酶活性测定

在线粒体沉淀物中加500 μ l匀浆液,混匀后按南京建成生物工程研究所提供的试剂盒操作方法进行测定。

1.6 线粒体蛋白的提取

线粒体沉淀物溶解在裂解液(10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA- Na_3 , 1% Triton-100 and 1 mmol/L RBSF (pH 7.5)中,室温放置30 min,15 000×g离心45 min,收集上清液,-80℃保存备用。线粒体蛋白是通过BCA法进行定量。

1.7 Western blot法检测蛋白表达

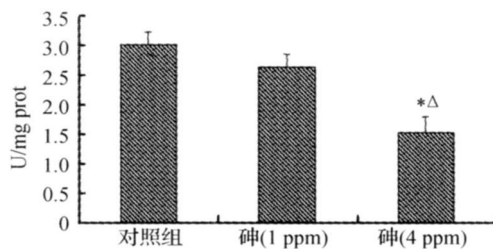
线粒体蛋白通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离,通过PVDF膜进行转膜。然后将PVDF膜放入封闭液(TBS (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween 20, 5% BAS)中进行4℃封闭过夜。然后将一抗Sdh α 抗体溶于TBS中(1:6000),在水浴箱37℃孵育2 h,用TBS洗3次,每次10 min。将PVDF膜溶于二抗,在水浴箱37℃孵育1 h,用TBS洗5次,每次10 min。通过发光剂和胶片对蛋白进行检测。

1.8 统计学分析

用方差和LSD检验分析计量资料的多组间差异,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,所有数据的统计分析都用SPSS 2.0统计软件进行。

2 结果

2.1 染砷组小鼠脑组织线粒体SDH活性及Sdh α 蛋白表达



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与1 ppm组比较, $\Delta P < 0.05$

图1 60 d时染砷组小鼠脑组织线粒体SDH活性

从图1所知,与对照组比较,染砷组随着染砷剂量加大,小鼠脑组织线粒体SDH活性明显降低,尤其4 ppm染砷组小鼠脑组织线粒体的SDH活性显著低于对照组($P < 0.05$)。而且如图2所示,4 ppm染砷组小鼠脑组织线粒体的Sdh α 蛋白表达量明显低于对照组,与上述酶活性检测结果相一致(β -actin作为内参)。

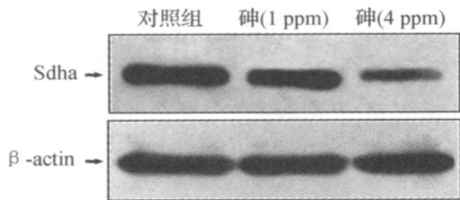
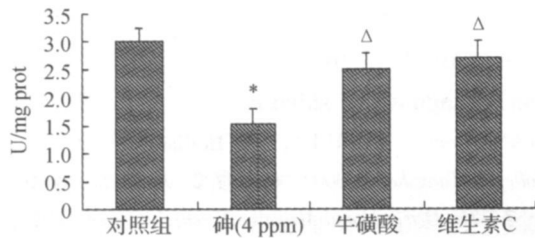


图 2 60 d时染砷组小鼠脑组织线粒体 Sdhα蛋白表达

2.2 干预组小鼠脑组织线粒体 SDH活性及 Sdhα蛋白表达

如图 3所示, 在牛磺酸和维生素 C干预组, 小鼠脑组织线粒体 SDH活性显著高于 4 ppm染砷组 ($P < 0.05$)。从蛋白表达水平看, 牛磺酸和维生素 C干预组 Sdhα蛋白表达水平也明显高于 4 ppm染砷组但低于对照组, 与酶活性的结果相吻合 (图 4)。



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 4 ppm 染砷组比较, Δ $P < 0.05$

图 3 60 d时干预组小鼠脑组织线粒体 SDH 活性

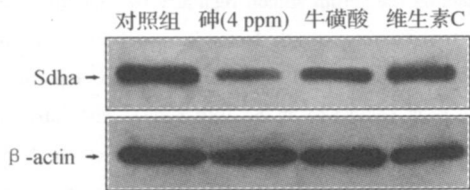
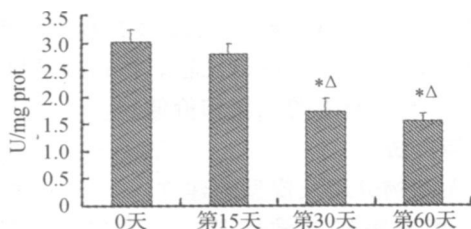


图 4 60 d时干预组小鼠脑组织线粒体 Sdhα 蛋白表达

2.3 砷暴露不同时间小鼠脑组织线粒体 SDH活性及 Sdhα蛋白表达

从图 5可知, 小鼠脑组织线粒体 SDH活性随着染砷天数的增加而降低, 其中第 30天和第 60天的 SDH活性均显著低于染砷 0天 ($P < 0.05$)。从蛋白表达水平看, 与染砷 0天比较, 小鼠脑组织线粒体 Sdhα蛋白表达量随着染砷天数增加呈现降低的趋势, 其中第 60天的 Sdhα蛋白表达量降低最为明显, 与上述酶活性检测结果相一致 (图 6)。



与 0 d比较 * $P < 0.05$ 与 15 d比较, Δ $P < 0.05$

图 5 砷暴露不同时间组小鼠脑组织线粒体 SDH活性

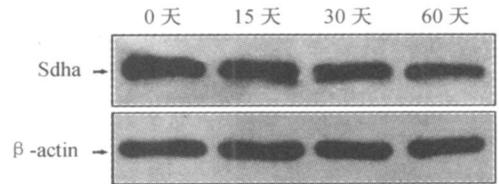


图 6砷暴露不同时间小鼠脑组织线粒体 Sdhα蛋白表达

3 讨论

许多研究证明砷是一种神经毒物, 但是砷对神经系统的影响机制尚不清楚。近年来, 越来越多的学者开始关注活性氧族 (ROS) 与砷的神经毒性作用关系。Rusti等认为, 琥珀酸脱氢酶复合体 (线粒体复合体 II, SDH) 与 ROS的形成密切相关^[4]。因为 SDH除了在呼吸链中起到传递电子的作用外, 在三羧酸循环中起到将琥珀酸盐氧化为延胡索酸并将氢离子转移给辅酶 Q 使辅酶 Q转变为还原型辅酶 Q 而还原型辅酶 Q具有抗氧化作用^[5]。当 SDH功能异常时, 使琥珀酸盐聚集, 会产生相反的电子流, 从线粒体复合体 II 流回线粒体复合体 I, 加速线粒体复合体 I 产生更多的 ROS 同时也会减少还原型辅酶 Q 的生成降低其抗氧化作用, 从辅酶 Q池生成较多的过氧化氢^[6]。此外, 由于电子的流动不畅, 也会使电子从 SDH漏出, 产生更多的 ROS

本研究结果显示, 染砷小鼠脑组织线粒体 SDH 的活性低于对照组, 尤其 4 ppm染砷组的 SDH活性降低明显。从 Western blot检测结果看, 染砷组 Sdhα 的蛋白表达量显著低于对照组, 与砷对 SDH活性影响结果基本吻合。上述结果表明, 亚慢性砷暴露能导致脑组织线粒体 SDH的活性降低和蛋白表达下调。Zhan等研究发现锰可作用于 SDH的黄素蛋白而抑制线粒体呼吸^[7], 而 SDH的黄素蛋白是由琥珀酸脱氢酶基因 Sdh所编码。提示 Sdhα很可能是一些重金属毒作用的靶点基因。Brè r等报道, Sdhα的表达异常可引起 SDH功能缺陷^[8]。根据我们的实验结果和文献资料推测, 砷暴露可能使脑组织线粒体 SDH的 α 亚单位 Sdhα基因表达下调, 减少了 SDH的蛋白合成, 从而导致了 SDH活性的降低。

本次实验结果还显示, 小鼠脑组织线粒体的 SDH活性和 Sdhα蛋白表达在牛磺酸和维生素 C两个干预组均显著高于 4 ppm染砷组, 说明这两个干预组对砷诱导的 SDH毒性作用有一定的拮抗作用。其拮抗作用可能与以下因素有关, 砷诱导神经组织生成过多的活性氧 (ROS) 主要在线粒体产生, 牛磺酸和维生素 C能清除自由基和活性氧^[9], 因此它们对线粒

(下转第 259页)

机械系,可能与不同专业教师的工作特点有关,体育系教师面对的教学任务主要是提高学生的身体素质,没有过多的科研项目,而该校是一所以工科为主的高校,机械系受到的重视程度及资助程度要明显高于体育和交通学院。机械系的工作是脑力、体力的综合;体育系的教师不满足于被认为只是体力的应用;交通学院教师多,工作量大,难以取得组织工作的普遍认同,因此导致其工作满意感的差异。

我国 1998~2002年高校本、专科及研究生招生急剧扩大^[10],高校教师资源匮乏严重;加之适应形势,不断开设一些新学科和新专业,现有的教师从数量和质量上都难以适应高等教育快速发展的需要。随着高等教育体制改革和教育全球化进程的深入,高校的生存和发展压力不断增加,教师面临的专业发展压力也越来越大,随之而来的与职业压力有关的心理体验和紧张反应也越来越突出。帮助教师缓解职业压力引起的紧张情绪,提高高校教师的职业热情、创造力、工作满意度,保护教师的身心健康,已成为当务之急。针对本次研究结果,我们认为应该根据不同院系的工作特征,采取有针对性的措施来降低教师的紧张程度,如对人打交道、友谊机会得分较低的院系应当增强教师之间的交流,促进他们之间的关系,可以定期组织娱乐活动,让其接触到更多的人和事,获

得更多的社会支持。由于影响工作满意度的因素较多,因此更应该根据各自不同的特点来采取措施,学校及家人不要给年轻的教师太多压力;对于有些院系,学校应该给与更多的重视和支持。

参考文献:

[1] 张湘洛. 中小学教师的职业紧张和舒缓 [J]. 教育探索, 2006 (10): 121-122

[2] 王治明, 兰亚佳, 李健, 等. 教师职业紧张研究 [J]. 现代预防医学, 2002 2 (29): 129-131

[3] Wolf G J. Visual strain during VDT work: the effect of viewing distance and darkness [J]. Ergonomics, 1998 31 (10): 1449-1451

[4] Peder S. Influence of personal characteristics, job-related factors on the sick build syndrome [J]. Scand J Work Environ Health 1989 15: 286

[5] 王治明, 兰亚佳, 李健, 等. 紧张和职业紧张 [J]. 现代预防医学, 2002 29 (2): 129-130

[6] 余善法, 张锐, 马良庆, 等. 职业紧张测量工具研究 [J]. 河南医学研究 2000 9 (2): 171-174

[7] 杨文杰, 李健. 工作场所中社会心理因素的测量——两种职业紧张测试模式的运用 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004 12 422-426

[8] 田宏远, 李涛, 杨树东, 等. 高等院校教师紧张因素及应对能力分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2007 20 (4): 260-262

[9] 吴建华, 沈文荣, 刘淮玉, 等. 教师职业紧张与抑郁症关系的探讨 [J]. 安徽预防医学杂志, 2006 12 (5): 331

[10] 宋爱芳. 效能感和职业紧张的特点及其关系研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2007.

(上接第 249页)

体具有一定的保护作用。所以,牛磺酸和维生素 C 对砷导致 SDH毒性的拮抗可能与它们的抗氧化作用有关。这些结果提示,活性氧可能参与砷对小鼠脑组织线粒体 SDH的毒性作用。从不同的染毒天数看,SDH酶活性和 Sdhα蛋白表达在第 30天和第 60天均明显降低,说明砷对 SDH酶活性和 Sdhα蛋白表达随染毒的天数增多,其抑制作用明显增强。

总之,亚慢性砷暴露能导致脑组织线粒体 SDH活性的降低和 Sdhα蛋白表达下调,而牛磺酸和维生素 C对砷导致的 SDH毒性可能具有一定的拮抗作用。今后进一步深入探讨砷暴露对脑组织线粒体 SDH毒性影响的确切机制以及与砷诱导脑组织氧化应激的内在联系是非常必要的。

参考文献:

[1] 谢瑶芸. 氟砷联合染毒对大鼠子代脑组织影响的电镜观察 [J]. 地方病通报, 2000 15 (2): 7-8

[2] Patil J A K, Tchounwou P B. Serum acetyl cholinesterase as a biomarker of arsenic induced neurotoxicity in sprague-dawley rats [J]. Int J Environ Res Public Health 2005 2 (1): 80-83

[3] 史永芝, 史献军, 康颂建, 等. 庆大霉素对豚鼠耳蜗血管纹琥珀酸脱氢酶的影响 [J]. 实用儿科临床杂志, 1999 14(2): 100

[4] Rustin P, Munnich A, Røtberg A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well known enzyme [J]. Eur J Hum Genet 2002 10 (5): 289-291

[5] Favier J, Brére J J, Strompf L, et al. Hereditary paraganglioma/ pheochromocytoma and inherited succinate dehydrogenase deficiency [J]. Hum Res 2005 63 (4): 171-179

[6] Zoccarato F, Cappellotto M, Alexandre A. Cberglycine and other propargylamine derivatives as inhibitors of succinate-dependent H₂O₂ release at NADH:UBQUINONE oxidoreductase (Complex I) in brain mitochondria [J]. J Bioenerg Biomembr 2008 40 (4): 289-296

[7] Zhang S, Fu J, Zhou Z. Changes in the brain mitochondrial proteome of male Sprague-Dawley rats treated with manganese chloride [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2005 202 (1): 13-17

[8] Brére J J, Favier J, Røtberg J, et al. Mitochondrial succinate is an essential for HIF-1α nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions [J]. Hum Mol Genet 2005 14 (21): 3263-3269.

[9] Kalja K, Florin S J. Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning [J]. J Occup Health 2005 47 (1): 1-21.