

signaling in fibroblasts by a protein kinase inhibitor protects against fibrotic tissue injury [J]. *Am J Pathol* 2005 166 (2): 367-375.

[3] Runyan CE Schnaper HW Poncelet AC The Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway enhances smooth-muscle-mediated mesangial cell collagen expression in response to transforming growth factor-1 [J]. *J Biol Chem* 2004 279 (4): 2632-2639.

[4] Antonious KM Magariopoulos GA Soufja G et al Expression analysis of Akt and MAPK signaling pathways in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. *J Recept Signal Transduct Res* 2010 30 (4): 262-269.

[5] Xia H Diebold D Nho R et al Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Exp Med* 2008 205 (7): 1659-1672

[6] 朱婉凌, 马希涛, 王思勤. P3K-α-SMA蛋白在特发性肺纤维化肺组织的表达及意义 [J]. *中国实用医刊*, 2008 6 (35): 27-30.

[7] Lu Y, J Azad N, Wang L, Y et al Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt regulates bleomycin-induced fibroblast proliferation and collagen production [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010 42 (4): 432-441.

茶多酚对汞致大鼠肝氧化损伤影响的实验研究

Experimental study on protective effect of tea polyphenols on hepatic oxidative injury caused by mercury in rats

邓宇, 徐兆发, 刘巍, 杨海波, 陈杰, 苏贤

DENG Yu XU Zhao-fa LIU Wei YANG Hai-bo CHEN Jie SU Xian

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 为研究汞致大鼠肝氧化损伤的机制及茶多酚的防护作用, 将 30 只大鼠均分为对照、染汞和茶多酚组, 测定肝组织 MDA、GSH、SOD、GSH-Px、ROS 及细胞凋亡。结果表明, 染汞组 GSH、MDA、ROS 和凋亡升高, GSH-Px 和 SOD 活力降低。茶多酚对以上指标有拮抗作用。提示茶多酚可通过抑制氧化损伤拮抗汞所致的肝毒性。

关键词: 汞; 茶多酚; 肝脏; 氧化损伤

中图分类号: R994.3 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2011)04-0284-02

研究发现氧化损伤可能是汞致肝毒性的重要诱发因素之一^[1]。茶多酚 (tea polyphenol, TP) 在茶叶中含量较高, 是一类含有多酚羟基的化学物质, 能清除人体内过多的活性自由基, 具有极强的抗氧化作用^[2]。本实验在给予大鼠染 Hg 和 TP 干预后, 检测大鼠肝脏丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及细胞凋亡的改变, 以探讨 Hg 致大鼠肝损伤的机制以及 TP 防护作用。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及染毒

由中国医科大学实验动物中心提供的实验用 Wistar 大鼠 30 只, 体重 (180±10) g, 雌雄各半。正式实验前饲养 7 d, 然后按体重随机分成 3 组。第 1 组为对照组, 第 2 组为染 Hg 组, 第 3 组为 TP 干预组。首先, 给予第 1、2 组大鼠色拉油灌胃, 第 3 组给予 1 μmol/kg TP, 2 h 后, 第 1 组大鼠均于皮

下注射 0.9% NaCl, 第 2、3 组大鼠皮下注射 8.8 μmol/kg HgCl₂。灌胃及注射容量均为 5 ml/kg。每天干预和染汞各 1 次, 共 2 d。

1.2 样品采集及测定指标

最后一次干预和染毒后, 各组 6 只大鼠麻醉处死, 切取肝组织制备成匀浆, 以硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量^[3], 以 DTNB 直接法检测 GSH 的含量^[4], 采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定 SOD 和 GSH-Px 活力, 蛋白含量测定用 Folin-Lowry 法^[5]。另取各组剩余 4 只大鼠的肝脏制备成单细胞悬液, 采用流式细胞仪 DCFH-DA 荧光法检测细胞内 ROS 水平^[6], 采用南京凯基生物科技有限公司 Annexin V-FITC/PI 试剂盒检测肝细胞凋亡。

1.3 统计分析

用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 实验所得数据以平均值±标准差表示, 采用单因素方差分析进行组间差异的显著性检验, 两组间比较用 Q 检验 (Student-Newman-Keuls, SNK)。

2 结果

2.1 肝组织 GSH 和 MDA 含量

与对照组比较, 染 Hg 导致 GSH 和 MDA 含量升高; 与染 Hg 组相比, TP 导致两者降低。见表 1。

表 1 各实验组肝组织 GSH 和 MDA 的含量 (x±s)

组别	n	GSH	MDA
对照组	6	30.38±6.78	337.76±153.52
染 Hg 组	6	43.48±3.14**	763.52±96.47**
TP+染 Hg 组	6	33.19±3.78##	544.93±122.46##

注: 与对照组相比, ** P<0.01; 与染 Hg 组相比, ## P<0.01。

2.2 肝 GSH-Px 和 SOD 活力

与对照组比较, 染 Hg 导致 GSH-Px 和 SOD 活力降低; 与染 Hg 组相比, TP 导致两者明显增高。见表 2。

收稿日期: 2011-02-09 修回日期: 2011-03-30

作者简介: 邓宇 (1981-), 女, 讲师, 博士, 主要从事重金属毒理学研究。

通讯作者: 徐兆发, 教授, 博士生导师

表 2 GSH-Px和 SOD酶的活力 ($\bar{x} \pm s$) U/mg Prot

组别	n	GSH-Px	SOD
对照组	6	1 162.56 ± 247.03	133.69 ± 11.87
染 Hg组	6	506.61 ± 132.84**	57.50 ± 11.09**
TP+染 Hg组	6	831.64 ± 159.57##	81.37 ± 24.71#

注: 与对照组相比, ** P < 0.01; 与染 Hg组比较, # P < 0.05, ## P < 0.01.

2.3 肝细胞内 ROS水平和细胞凋亡率

与对照组比较, 染 Hg导致 ROS和凋亡率升高; 与染 Hg组对比, TP导致两者降低。见表 3

表 3 细胞内 ROS水平和细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ROS (平均荧光强度)	凋亡率 (%)
对照组	4	259.18 ± 56.24	2.97 ± 0.68
染 Hg组	4	467.10 ± 53.40**	60.03 ± 0.64**
TP+染 Hg组	4	314.01 ± 28.21##	5.26 ± 0.46##

注: 与对照组相比, ** P < 0.01; 与染 Hg组比较, ## P < 0.01.

3 讨论

本实验检测了肝组织中 GSH和 MDA的含量, GSH-Px和 SOD的活力, 细胞内 ROS和凋亡, 从氧化损伤的角度探讨 Hg致肝脏损伤的机制和茶多酚的干预作用。GSH是一种非蛋白抗氧化剂, 在拮抗氧自由基损伤、维持细胞蛋白质结构和功能等方面发挥着重要作用^[7]。MDA是体内重要的脂质过氧化物的代谢产物, MDA的含量可以反映体内脂质过氧化的程度并间接反映引起脂质过氧化的氧自由基的水平。体内 GSH-Px和 SOD是机体防御自由基脂质过氧化损伤保护系统主要酯酶类清除剂^[8]。ROS是化学性质更为活跃的氧的代谢产物或由其衍生的含氧产物。ROS水平失衡将导致细胞器损伤, 通过自吞噬作用清除, 或导致细胞凋亡^[9]。

从实验结果来看, 与对照组比较, 单纯染汞组 GSH和 MDA含量明显升高, GSH-Px与 SOD活力均降低, 细胞内 ROS水平和细胞凋亡率增加。本实验见 GSH含量显著升高, 推测可能是急性染 Hg后导致体内 GSH应激性增高。MDA含量升高, 可能由于细胞膜受到氧自由基攻击, 导致脂质过氧化反应, 激起自由基的连锁、增殖反应, 形成一系列的脂质自由基及其降解产物所致^[10]。本实验中 SOD、GSH-Px活力下降, 提示清除自由基的酶和非酶系统的防御功能减退^[11]。Hg可使肝细胞内 ROS水平增高, 进而证实 Hg可以通过氧化应激机制导致肝脏损伤。

与染汞组比较, TP干预组 GSH和 MDA含量明显降低,

GSH-Px与 SOD活力均升高, 细胞内 ROS水平和细胞凋亡显著下降。提示茶多酚有很强的抗氧化作用, 能有效抑制 Hg对机体的氧化损害。TP的酚羟基能作为供氢体, 提供质子 H⁺, 将单线态氧 ¹O₂ 还原成活性较低的三线态氧 ³O₂, 减少氧自由基的产生; 并能夺取过氧化过程中产生的脂质过氧化自由基, 生成活性较低的多酚自由基, 切断自由基氧化链反应, 有效清除体内自由基^[12]。在中性或酸性条件下, TP的邻位二酚羟基可与金属离子螯合, 阻止金属离子对活性氧等自由基的生成和链反应的催化作用, 发挥抗脂质过氧化的作用^[13]。实验结果表明茶多酚干预对 Hg致肝氧化损伤具有保护作用。

参考文献:

[1] 安建博, 张瑞娟. 低剂量汞毒性与人体健康 [J]. 国外医学地理分册, 2007, 28 (1): 39-42

[2] Eus V, Alug T, Belce A, et al. Green tea polyphenol(-)-epigallocatechin gallate prevents oxidative damage on periventricular white matter of infantile rats with hydrocephalus [J]. Tchoku J Exp Med 2003, 200 (4): 203-209

[3] 万伯健. 卫生毒理学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1994: 216-217.

[4] 张平. 分光光度法测定大鼠不同组织还原型谷胱甘肽含量 [J]. 中华实用内科杂志, 1989, 6 (3): 141-142.

[5] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem 1951, 193 (1): 265-275

[6] Chun Rong Li. Protective effect of paeniflorin on irradiation induced cell damage involved in modulation of reactive oxygen species and the mitogen-activated protein kinases [J]. Int J Biochem Cell Biol 2007, 39, 426-438.

[7] Richie J P Jr, Skowronski L, Abraham P, et al. Blood glutathione concentrations in a large scale human study [J]. Clin Chem 1996, 42, 64-70

[8] Munro I C, Nera E A. Chronic toxicity of methylmercury in the rat [J]. Environ Pathol Toxicol 1980, 3 (5-6): 437-447

[9] Circo M L, Aw T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis [J]. Free Radic Biol Med 2010, 48 (6): 749-762.

[10] 陈铁晖, 薛常锦, 汪家梨, 等. 姜黄素拮抗水华微囊藻毒素致动物肝氧化损伤 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22 (11): 1402

[11] Nohl H. Involvement of reactive calcium ions: a consequence or cause of senescence [J]. Br Med Bull 1993, 49 (3): 653

[12] 石碧, 狄茨. 植物多酚 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 175.

[13] Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies [J]. J Nutr 2003, 133 (10): 3275S-3284S

(上接第 271页)

参考文献:

[1] 李刚森, 彭言群, 杜慎白, 等. 长期低剂量医用工业电离辐射对眼晶状体损伤的流行病学研究 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 1995, 15 (5): 342-343

[2] 郭鹤, 王克为, 王子灿. 放射损伤病理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 256-257.

[3] 徐淑娟. 晶体光亮点与角膜类脂环、眼底动脉硬化及血脂的关系 [J]. 眼科研究, 1987, 5 (1): 19

[4] 杨华胜, 吴中耀. 彩色多普勒成像在正常眼和眼眶血管及血流动力学的研究 [J]. 眼科学报, 1993, 9 (4): 207-208

[5] 朱林平, 梁梅, 王超英, 等. 放射性白内障眼血流多普勒研究 [J]. 中国辐射卫生, 2009, 18 (4): 436-437

[6] Mendivil A, Cuameo V, Mendivil M P. Ocular blood flow velocities in patients with proliferative diabetic retinopathy and healthy volunteers: a prospective study [J]. Br J Ophthalmol 1995, 79 (5): 413.

[7] 胡兵, 黄琪仁, 宋玉英, 等. 正常人视网膜中央动脉血流超声检测 [J]. 中国超声医学杂志, 1992, 8 (6): 397-398