

# 百草枯染毒小鼠血清的总抗氧化态变化

刘鹏<sup>1</sup>, 周越塑<sup>1</sup>, 牟劲松<sup>1</sup>, 赫兢<sup>1</sup>, 何跃忠<sup>2</sup>

(1. 解放军302医院急诊科, 北京 100039; 2. 军事医学科学院, 北京 100850)

**摘要:** **目的** 探讨小鼠腹腔注射百草枯对其血清总抗氧化态的影响。**方法** 小鼠随机分为对照组和百草枯染毒组(PQ组), PQ组小鼠又分别按照50、70、100、150、200和300 mg/kg的百草枯染毒剂量分成6组, 给予一次性腹腔注射百草枯; PQ组小鼠分别在染毒后1 h和3 h留取血样, 与对照组比较血清ABTS自由基清除率; 每个血样采集点均有5个样本。**结果** 不同染毒剂量组小鼠染毒后1 h、3 h的血清ABTS自由基清除率显著低于对照组小鼠( $P < 0.05$ ); 血清ABTS自由基清除率与染毒剂量和检测时间之间无显著相关性。**结论** 百草枯染毒后小鼠的血清ABTS自由基清除率下降, 血清总抗氧化态降低。

**关键词:** 百草枯中毒; ABTS自由基清除力; 总抗氧化态; 小鼠

中图分类号: R595.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2015)04-0256-03 DOI:10.13631/j.cnki.zgggxyx.2015.04.006

## Changes of serum total antioxidant status in paraquat treated mice

LIU Peng<sup>\*</sup>, ZHOU Yue-su, MU Jin-song, HE Jing, HE Yue-zhong

(\* . Department of Emergency, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

**Abstract: Objective** To observe the change of serum total antioxidant status (TAS) of mice treated with paraquat by injection ip. **Methods** The mice were randomly divided into control groups and PQ groups, and the mice in PQ groups were re-divided into 6 subgroups, which were received 50、70、100、150、200 and 300 mg/kg, respectively, of paraquat by i. p. injection. The blood samples were taken at 1 h and 3 h after administration, respectively for measurement of ABTS [2, 2'-Azinobis-(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonate)], a signal of radical scavenging activity, 5 mice for each blood sampling point. **Results** The serum ABTS level at either 1 h or 3 h after PQ administration were all significantly lowered than that in control group ( $P < 0.05$ ), and the decrease was also not dependent on dosage or time. **Conclusion** The serum free radical scavenging activity and total antioxidant status were reduced in mice after PQ administration, which was not correlated to administration time and dosage.

**Key words:** paraquat poisoning (PQ); ABTS [2, 2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)]; total antioxidant status (TAS); mice

百草枯(paraquat, PQ)中毒是临床上较常见的急性中毒之一, 口服中毒患者的病死率高达50%~70%<sup>[1]</sup>。大量研究表明百草枯进入机体后, 产生大量活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS), 破坏了机体的过氧化-抗氧化系统, 引起脏器损伤<sup>[2-6]</sup>。本实验探讨了不同剂量百草枯染毒小鼠的血清总抗氧化态(total antioxidant status, TAS)的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

清洁级BALB/c小鼠, 雄性, 6~8周, 体重19.5~21.6 g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 饲养环境: 室温18~25℃, 湿度60%~72%; 百草枯纯品(Sigma, 美国); ABTS(Sigma, 美国), CP224S电子精

密天平(sartorius, 赛多利斯), 高速离心机TGL-16G(上海安亭), Cary 50 Bio UV-visible spectrophotometer紫外分光光度计(美国瓦里安公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 小鼠染毒方法** 实验开始前BALB/c小鼠禁食12 h, 不禁水。小鼠随机分成对照组和PQ组, PQ组小鼠又分别按照50、70、100、150、200和300 mg/kg的百草枯染毒剂量分成6组, 并给予一次性腹腔注射百草枯; PQ组小鼠分别在染毒后1 h和3 h断头取血置于肝素抗凝试管中, 并以3000 r/min离心10 min, 取上清液立即进行血清ABTS自由基清除率的检测, 并以同样的方法测定对照小鼠的血清ABTS自由基清除率。每个血样采集点均有5只小鼠样本。

### 1.2.2 ABTS法测定小鼠血清总抗氧化态

**1.2.2.1 ABTS法检测原理<sup>[7]</sup>** ABTS [2, 2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)]是一种广泛应用于各种物质抗氧化活性评估的人工合成自由基, 它可以在抗

收稿日期: 2015-03-13; 修回日期: 2015-04-30

作者简介: 刘鹏(1978—), 男, 主治医师, 医学博士, 研究方向: 急诊与危重症研究。

通讯作者: 周越塑, 副主任医师, E-mail: iamldb@hotmail.com; 牟劲松, 副主任医师, Jinsongmu@126.com。

氧化剂存在的情况下由墨绿色变为无色,通过分光光度分析法检测抗氧化剂的抗氧化能力。

ABTS 原液与过硫酸钾在室温黑暗中反应 5 h 以上,产生单阳离子自由基  $ABTS^+$ ,在 735 nm、415 nm 处有最大吸收峰,而 ABTS 稳态物在 340 nm 处有最大吸收峰。加入抗氧化剂后一段时间,  $ABTS^+$  变为 ABTS,这主要取决于样品的抗氧化活性和浓度,在 735 nm、415 nm 处最大吸收峰会降低,而 ABTS 稳态物在 340 nm 处最大吸收峰升高,说明自由基被清除,部分生成了 ABTS 稳态物。以 415 nm 处吸光度来表示褪色的程度,以百分率表示  $ABTS^+$  的清除率。

### 1.2.2.2 小鼠血清 ABTS 自由基清除率的检测方法

将 2.8 mmol/L 过硫酸钾和 7 mmol/L ABTS 的蒸馏水溶液混合,避光放置至少 5 h,由此配制成 ABTS 自由基 ( $ABTS^+$ ) 原液。应用磷酸盐缓冲液 (PBS: 10 mmol/L 磷酸钠, pH 值 7.4, 120 mmol/L 氯化钠, 3 mmol/L 氯化钾) 将此原液稀释 125 倍,以获得含有约 36  $\mu\text{mol/L}$   $ABTS^+$  和 18  $\mu\text{mol/L}$  ABTS 的标准溶液。通过 340 nm 处的 ABTS 和 415 nm 处的  $ABTS^+$  的吸光度变化监测反应情况。

添加小鼠血清 0.01 ml 至 3 ml ABTS 自由基溶液中进行反应,以消耗残留的 ABTS 自由基后立即进行反应产物的终点监测。应用 Cary 50 Bio UV-visible spectrophotometer 紫外分光光度计,在反应的第 600s 对吸光度值进行检测,将对照小鼠血清在此时 415 nm 处吸光度所表示的褪色程度设定为 100%,以此表示 ABTS 自由基的清除率,间接反映血清总抗氧化态。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件对实验数据进行分析,实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用成组设计  $t$  检验;染毒小鼠 1 h、3 h 的血清 ABTS 自由基清除率与染毒剂量间进行相关性分析;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 对照组与 PQ 组小鼠染毒后不同时间血清自由基清除率的比较

表 1 可见,小鼠腹腔分别注射不同剂量百草枯后 1 h、3 h,血清 ABTS 自由基清除率均小于对照组小鼠 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 PQ 组小鼠染毒后不同时间自由基清除率的比较

染毒同一剂量后 1 h、3 h 小鼠血清 ABTS 自由基清除率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 1 小鼠染毒后不同时间血清自由基清除率的比较 ( $n=5$ ) %

染毒剂量 (mg/kg)	对照组	PQ 组			
		1 h	$P_1$ 值	3 h	$P_2$ 值
50	100.00±0.00	96.34±2.13	0.04	91.47±3.55	0.01
70	100.00±0.00	93.97±2.60	0.02	91.08±2.15	<0.01
100	100.00±0.00	92.89±2.59	0.01	94.02±1.10	<0.01
150	100.00±0.00	94.60±2.80	0.03	97.03±0.68	<0.01
200	100.00±0.00	94.06±3.24	0.03	93.43±1.27	<0.01
300	100.00±0.00	93.74±3.73	0.04	95.16±2.81	0.04

注:  $P_1$ 、 $P_2$  表示 PQ 组小鼠染毒后 1 h、3 h 分别与对照组比较。

表 2 PQ 组小鼠染毒后 1 h、3 h 血清 ABTS 自由基清除率比较 ( $n=5$ ) %

染毒剂量 (mg/kg)	1 h	3 h	$P$ 值
50	96.34±2.13	91.47±3.55	0.061 5
70	93.97±2.60	91.08±2.15	0.230 2
100	92.89±2.59	94.02±1.10	0.301 4
150	94.60±2.80	97.03±0.68	0.068 0
200	94.06±3.24	93.43±1.27	0.901 9
300	93.74±3.73	95.16±2.81	0.151 4

### 2.3 染毒剂量与 ABTS 自由基清除率的相关性分析

小鼠染毒后 1 h 血清 ABTS 自由基清除率与染毒剂量的相关系数为  $-0.377$  ( $P = 0.462$ ),染毒后 3 h 血清 ABTS 自由基清除率与染毒剂量的相关系数为  $0.592$  ( $P = 0.216$ )。

## 3 讨论

自由基和活性氧在机体内可以执行许多正常的生理功能,与此同时,机体内也含有清除自由基和活性氧类的抗氧化防御体系。ROS 代谢形式和机体抗氧化剂清除速度构成机体的过氧化-抗氧化防御系统。生理状态下,该系统处于动态平衡<sup>[8]</sup>。百草枯中毒时,机体内通过氧化还原循环产生大量 ROS,包括氧自由基和非基团物质,如超氧阴离子 ( $O_2^-$ )、过氧化氢 ( $H_2O_2$ )、羟自由基 ( $OH^-$ ) 等,致使过氧化-抗氧化防御系统失衡,机体应答导致氧化应激 (oxidative stress, OxS) 状态,造成生物大分子如蛋白质、脂质、核酸等的氧化损伤,干扰正常生命活动<sup>[9,10]</sup>。因此,监测机体内抗氧化状态对于判断百草枯中毒的预后及抗氧化治疗具有重要意义。本研究结果可见,不同染毒剂量组小鼠染毒后 1 h、3 h 的血清 ABTS 自由基清除率显著低于对照组,表明小鼠染毒后血清 TAS 显著降低;同一剂量染毒后血清 ABTS 自由基清除率差异无统计学意义,即血清 TAS 下降程度相当;染毒后小鼠血清 ABTS 自由基清除率与染毒剂量间均无显著相关性。

TAS降低标志着机体内 ROS 生成过多和(或)抗氧化酶合成减少,或利用非酶性抗氧化物质能力减弱。TAS 不仅代表了机体内酶类和非酶类抗氧化物质的总和,而且反映了各抗氧化物之间相互联系、协同保护作用的关系。TAS 水平反映了不同状态下机体抗氧化能力的综合信息<sup>[11]</sup>。本研究通过 ABTS 法测定小鼠的血清 ABTS 自由基清除率,反映其血清 TAS,证实了百草枯可以显著降低 TAS 水平。百草枯中毒使得过氧化-抗氧化平衡失调,向氧化态方向转化,且这种转化的程度随着反应时间的延长和百草枯剂量的增大而增大。但本研究发现小鼠血清 TAS 的下降程度与染毒剂量间无显著相关性,这可能是由于染毒剂量过大所致,即使是最低染毒剂量也远远超过小鼠的半数致死量(30 mg/kg ip)<sup>[12]</sup>。小鼠染毒后 1 h、3 h 血清 TAS 无差异,与机体内过氧化-抗氧化缓冲体系短时间内难以恢复相关。在本实验研究中,由于百草枯染毒剂量大,小鼠于染毒 3 h 后很快死亡,所以无法连续监测血清 ABTS 自由基清除率,但不影响百草枯中毒造成血清 TAS 显著降低的评估。

#### 参考文献:

- [1] 刘鹏,何跃忠,李光,等.血液灌流结合连续性静脉-静脉血液滤过对急性百草枯中毒疗效的研究[J].中华劳动卫生职业病杂志,2011,29(4):266-269.
- [2] 刘鹏,梁宇光,何跃忠,等.百草枯中毒的基础研究及救治进展

- [J].中国工业医学杂志,2010,23(5):364-366.
- [3] 菅向东,张华,隋宏,等.百草枯中毒救治“齐鲁方案”(2014)[J].中国工业医学杂志,2014,27(2):119-121.
- [4] Sun S, Wang H, Zhao G, *et al.* Complement inhibition alleviates paraquat-induced acute lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45 (4): 834-842.
- [5] 刘鹏,周越塑,孟庆义,等.大剂量甲泼尼龙可能加速急性百草枯中毒小鼠死亡的初步研究[J].中国工业医学杂志,2013,26(5):330-334.
- [6] 刘鹏,何跃忠,王浩春,等.急性百草枯中毒患者预后影响因素的研究[J].中华劳动卫生职业病杂志,2011,29(3):51-54.
- [7] Liu C, Hong J, Yang H, *et al.* Frog skins keep redox homeostasis by antioxidant peptides with rapid radical scavenging ability [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48 (9): 1173-1181.
- [8] 俸家富,赵平武,王东.血液中总抗氧化态与疾病的关系[J].国际检验医学杂志,2009,30(6):571-573.
- [9] Toygar M, Aydin I, Agilli M, *et al.* The relation between oxidative stress, inflammation, and neopterin in the paraquat-induced lung toxicity [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2015, 34 (2): 198-204.
- [10] Nagamma T, Baxi J, Singh P P. Status of oxidative stress and antioxidant levels in smokers with breast cancer from western Nepal [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15 (21): 9467-9470.
- [11] 贾宁人,王钢.血清总抗氧化水平测定用于重症患者临床监护的意义初探[J].中国中西医结合急救杂志,2002,9(1):19-20.
- [12] Cagen S Z, Gibson J E. Liver damage following paraquat in selenium-deficient and diethyl maleate-pretreated mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1977, 40 (2): 193-200.

## 《中国工业医学杂志》第五届编委会委员大会纪要

经中华预防医学会预会发[2015]83号“中华预防医学会关于同意《中国工业医学杂志》组建第五届编辑委员会的批复”同意,《中国工业医学杂志》第五届编委会于2015年7月25日在沈阳召开,45名委员出席大会。

会议由第四届主编阎波主持。第四届主编周安寿向大会作了第四届编委会工作报告,报告对第四届编委会2006年组建以来的杂志工作做了详细的总结,并对杂志的今后发展和新一届编委会寄予了深切的希望,同时对多年来予以杂志关爱与支持的各级领导、专家和同仁表示衷心地感谢。

《中国工业医学杂志》编辑部主任曹明琳向大会汇报了第五届编委会委员产生情况说明及委员情况介绍。根据《中华预防医学会系列杂志编辑委员会通则》的要求及第四届编委会委员年龄、工作调动等实际情况,本刊编辑部提请主编、中华预防医学会职业病专业委员会主任委员同意,在进行编委会换届摸底、调查工作的基础上,经职业病专业委员会、资深编委会委员推荐,征求委员单位意见及考核同意,来自全国27个省、直辖市的大专院校及省、市、军队科研、医疗机构的55名委员组成第五届编委会。本届编委会是历届中委员分布区域最广、专业面最广及新委员最多、年龄最轻的一届。

中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所副所长孙承业宣读了“中华预防医学会关于同意《中国工业医学杂志》组建第五届编辑委员会的批复”及第五届编委会委员组成名单。阎波任主编,孙承业、曹明琳任副主编,毛丽君等15人任常务委员,同时聘请周安寿研究员、赵金垣教授为顾问。主编阎波为顾问颁发了聘书,副主编向全体委员颁发了聘书。

新一届主编阎波代表编委会讲话。讲话指出第四届主编周安寿所作的工作报告对杂志近十年的工作做了详实的总结,同时也对新一届编委会提出了工作重点和方向;新一届编委会的成立意味着期刊发展又开始了新的里程,新的工作任务在等待着我们的,我们要继承和发扬前辈们的优秀品质和工作作风,在保持杂志特色的基础上,积极促进职业医学与相关学科的有机结合与联系,拓展杂志的辐射功能,为更多的医务工作者提供新颖、丰富的科研信息,为我国职业医学水平的提高贡献一份力量;每一名编委既要珍惜这份荣誉,更要承担起应尽的责任和义务,尽其所能为杂志所思所想、所作所为,紧紧围绕期刊质量这个永恒的主题,发挥各自优势,把杂志办成有竞争实力的精品期刊,在构建和谐社会中发挥更大的作用。

大会在热烈、和谐的气氛中圆满结束各项日程。大会结束后,随即召开了讨论会,与会代表就杂志如何进一步坚持特色、提高学术质量及发展方向等提出了许多建设性的意见和建议。