

相关效应性生物标志物 TOSC 和 GSH 对百草枯灌胃染毒的反应

邢鸣鸾, 翁登坡, 郑一凡, 徐进, 徐立红*

(浙江大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 浙江大学劳动卫生与环境卫生研究所, 浙江 杭州 310006)

【摘要】背景与目的: 通过与抗氧化检测单指标 GSH 的比较, 探讨抗氧化能力相关效应性生物标志物 TOSC 的特点及适用性。材料与方法: 用 0 mg/kg (生理盐水对照组)、6.25、12.5、25 和 50 mg/kg 百草枯 (Paraquat, PQ) 对随机分组的 NIH 小鼠灌胃染毒, 24、48、72 h 后分别测定其肝、脑、心、肾、肺的 TOSC 值, 以及肝的 GSH 水平。结果: 小鼠各脏器于 PQ 染毒 24、48、72 h 后, TOSC/mg 蛋白值与对照相比下降不显著; 肝 GSH 水平明显降低。结论: TOSC 是综合反映机体实际抗氧化能力即时水平的综合性指标, 在体现氧化剂对机体的早期效应时却不如 GSH 灵敏。

【关键词】氧化损伤; TOSC; GSH; 生物标志物; 小鼠

中图分类号: R994.6

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2004)05-0263-04

An Exploration of the Biomarker Related with Antioxidant System: Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC)

XING Ming-luan, WENG Deng-po, ZHENG Yi-fan, *et al*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Institute of Occupational and Environmental Health, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: The characteristic and application of TOSC which is a biomarker related with antioxidant system were explored and compared with GSH, a general indicator of oxidative stress. **MATERIAL & METHODS:** The NIH mice were divided randomly into groups, which were oral perfused by 0 mg/kg (saline control group) and 6.25, 12.5, 25 and 50 mg/kg paraquat (PQ) respectively. After exposure for 24, 48, 72 hours, TOSC values of livers, brains, hearts, kidneys and lungs of mice were measured. Correspondingly GSH of livers was determined at the same time. **RESULTS:** After scheduled exposure time for PQ, the levels of TOSC/mg protein in all experimental groups showed a faint decrease. However, the amount of liver GSH reduced obviously. **CONCLUSION:** TOSC was an integrated biomarker, which reflected actual status of organism's antioxidant system. Nevertheless, when showed the early damage of the oxidant, TOSC was less sensitive than GSH.

【KEY WORDS】oxidative damage; TOSC; GSH; biomarker; mice

TOSC 法 (Total oxyradical scavenging capacity) 是一种检测机体组织抗氧化能力的方法, 与反映抗氧化成分变化的单项指标相比, 它能综合反映出任何可与氧自由基结合的物质所具有的抗氧化能力, 可以全面反映机体氧化防御系统的实际应激水平并判

断是否发生氧化损伤, 因此正逐渐成为一种毒理学研究的新型生物标志物^[1-5]。还原型谷胱甘肽 (GSH) 在组织中起着细胞防御因子的作用, 能有效抵抗活性氧成分 (ROS) 的生成^[6], 因而组织中 GSH 的水平作为评价外源性物质对生物的氧化损伤指标而被广泛

应用。百草枯(paraquat, PQ)是农业上的一种强效除草剂,它主要是通过循环往复的氧化还原反应,产生大量的活性氧成分(ROS)而对哺乳动物的多种脏器造成严重的氧化损伤^[7,8],因此很多学者^[8~11]在进行氧化损伤相关研究时都采用百草枯作为诱导物。本研究拟采用百草枯构建氧化损伤的小鼠模型,测定染毒小鼠5个常见受损脏器的TOSC值,同时测定常规脏器肝的GSH含量。通过比较TOSC水平的变化和GSH含量的改变,对TOSC这个抗氧化能力相关生物标志物的特点及适用性进行探讨和评价。

1 材料与方法

1.1 试剂

百草枯(paraquat, PQ), Sigma公司产品;4-甲硫基-2-丁酮酸(α -keto- γ -methiolbutyric acid, KMBA), Sigma公司产品;2,2'-偶氮-双(2-咪基丙烷)二盐酸盐(2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, ABAP), Wako公司产品;高纯度乙烯标准气体上海优华气体供应站产品(>99.999%);牛血清白蛋白(BSA),上海市浦江应用化学研究所产品;5,5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸(DTNB), Fluka公司产品;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

岛津GC-14BTFD气相色谱仪, Bio-TEK Synergy HT酶标仪, Microfuge R高速离心机, DKZ-2型电热恒温振荡水槽。

1.3 实验动物及染毒设置

NIH雄性小鼠,按体重(25~27g)随机分组,以文献报道PQ对实验小鼠 $LD_{50} = (35 \sim 55) \text{ mg/kg}$ 为参考^[10,12,13],设计0 mg/kg(生理盐水对照组)、6.25、12.5、25和50 mg/kg共5组,每组9只,以腹腔注射方式染毒,以颈椎脱臼法处死。染毒24、48、72 h后分别取样。

1.4 生物样品的制备

取受试动物肝、脑、心、肾、肺五脏器,用STE缓冲液(含0.25 mol/L sucrose, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA-Na, pH 7.4)混合匀浆(稀释比定为脑1:10,肝、肾、心、肺1:20), 10 000 g, 4℃离心20 min,取上清液待用。

1.5 TOSC测定原理及步骤

原理:根据Winston等人^[1]的报道,ABAP在加热条件下产生自由基,而KMBA在自由基作用下可氧化产生乙烯,若有抗氧化剂的存在,则可与KMBA竞争结合自由基,从而使乙烯的产量减少。根据有无抗氧化剂存在时乙烯量的变化,可计算所测样品中存在的抗氧化剂总量,从而判断氧化系统的总体受损

情况。

TOSC的计算公式为: $TOSC = 100 - \left(\frac{\int SA}{\int CA} \right) \times 100$

式中 $\int SA$, $\int CA$ 分别为样品(有外加抗氧化剂)和对照(无外加抗氧化剂)反应系统中产生的乙烯量(以峰面积表示)。当样品无抗氧化能力时, $\int SA = \int CA$, TOSC = 0;当样品抗氧化能力很强时, $\int SA$ 趋于0, TOSC接近100。

步骤:在20 ml顶空瓶内分别加入0.2 mmol/L的KMBA(用0.1 mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液配置)0.8 ml,上清液0.1 ml,密封瓶盖后,用1 ml注射器注入0.2 mol/L的ABAP 0.1 ml, 35℃水浴振荡1 h后,用1 ml微量进样器抽取0.6 ml瓶顶液上气进行检测,根据上述公式计算TOSC,并根据蛋白量计算TOSC/mg。

色谱条件:色谱柱5% GDX-502, chromosorb填充柱80~100目,玻璃柱2 m×3 mm,检测器:氢火焰离子化检测器,柱箱温度60℃,进样器温度150℃,检测器温度200℃,载气 N_2 (99.999%) 75 kPa,流速:35 ml/min,氢气流速:50 ml/min,空气流速:500 ml/min。

1.6 蛋白浓度测定

根据Lowry法测定蛋白浓度,以牛血清白蛋白(BSA)作为标准。各样品的总抗氧化能力最后以TOSC/mg蛋白为单位比较。

1.7 还原型谷胱甘肽(GSH)含量的测定

原理:DTNB能被-SH基团还原,产生等克分子2-硝基-5-巯基苯甲酸。硝基巯基苯甲酸阴离子呈黄色,在可见光412 nm波长处有吸收峰,可用于测定巯基。

Beutler^[14]改良法测定步骤:取新鲜组织,用4℃生理盐水漂洗,滤纸吸干水分,称重,按组织:5%冰三氯醋酸1:10匀浆;5 000 g, 4℃下离心15 min,制得无蛋白上清液待用。反应体系包括:上清液30 μ L, 0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 8.3) 150 μ L, DTNB试剂(0.04%,用1%柠檬酸钠配置)30 μ L,混匀,5 min内,500 nm波长处读吸光度。结果以0.01 μ g/mg组织进行比较分析。

1.8 统计处理

各剂量组分别与对照组相比,数据分析采用Dunnett-t检验法。

2 结果

2.1 不同脏器在PQ染毒不同时间后的总抗氧化能力(TOSC/mg蛋白)的变化情况

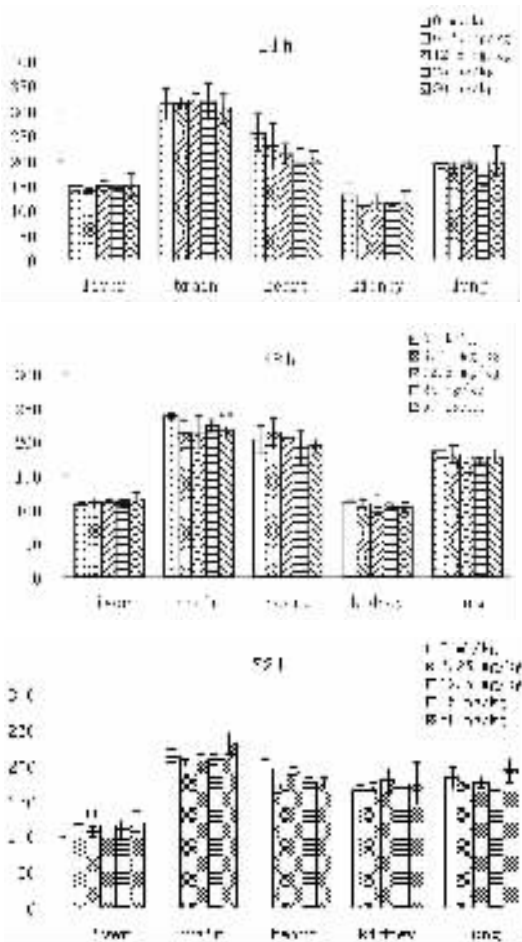


图 1 小鼠各脏器在 PQ 染毒不同时间的 TOSC/mg 蛋白变化情况 (单位: TOSC/mg 蛋白, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Figure 1 The variety of TOSC/mg protein in PQ-treated mice organs after exposure for different time (unit: TOSC/mg protein, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

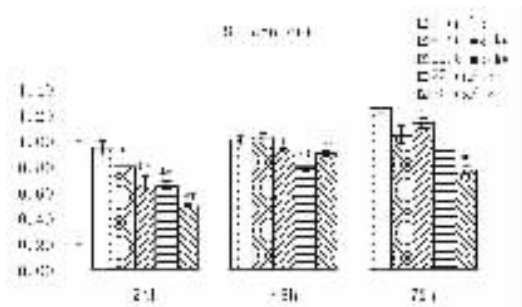


图 2 PQ 染毒肝 GSH 在不同时间的变化情况。(单位: $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Figure 2 The variety of GSH in PQ-treated mice livers after exposure for different time. (unit: $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

由图 1 可见 PQ 染毒 24 h 后, 脑、心、肾、肺的 TOSC/mg 蛋白有随剂量的增大而逐渐降低的趋势, 其中以心的变化为最明显; 肝的这种递减趋势基本上不存在。染毒 48 h 后, 各脏器 TOSC/mg 蛋白的变化与 24 h 类似。染毒 72 h 后, TOSC/mg 蛋白的变化趋势在所测脏器中都不明显。

2.2 肝脏在 PQ 染毒不同时间后 GSH 的变化情况

由图 2 可见 PQ 染毒 24、48、72 h 后, 肝脏各剂量

组 GSH 水平存在随染毒浓度的增加明显递减的趋势, 与对照相比大都具有统计学意义。其中以染毒 24 h 后, 肝脏的递减趋势最明确、显著。

3 讨论

总氧自由基清除能力 (TOSC) 指标为 Winston 于 1998 年创建, 因其操作简单, 反应灵敏, 可行性佳, 重现性好且综合全面等特有的优势, 已受到众多国内外学者的重视。虽然目前在氧化剂诱导和 TOSC 值变化的相关性上仍存在实验结果的分歧^[15-18], 但其发展前景和使用范围已得到了普遍的认可和拓展。以 Camus L 和 Regoli F 为代表的研究者通过对多种海洋水生动植物的 TOSC 测定分析认为: TOSC 虽然敏感性不是特别强, 但它能综合各类 ROS 的作用, 从整体上反映机体对氧化应激的感受程度, 是一个不错的“效应性生物标志物”^[19,20]。

PQ 属有机杂环类化合物, 是一种强氧化剂。它到达体内后经一系列氧化还原及歧化反应形成高活性自由基如 $\text{OH}\cdot$, 从而诱导脂质过氧化反应^[7], 造成多脏器损伤。本研究结果与上述结论一致, TOSC、GSH 两个指标的变化证实了 PQ 可以引起多脏器抗氧化系统的改变, 而对肝脏 GSH 与 TOSC 变化的比较则可以看出 GSH 更为灵敏。相关研究结果显示: 暴露于洗涤剂 4、8、12 d 后, 小鼠肝 TOSC 存在随剂量增大而降低的趋势^[4], 铅染毒 8 d 后, TOSC 亦呈同样的情况, 与机体长期暴露于氧化剂, 抗氧化能力减弱的事实相符; 但用 Cr^{6+} 染毒 2、4、12 h 时, TOSC 在小鼠各脏器中却呈随剂量增加而上升的趋势, 到 24 h 时上升趋势不明显, 这与机体在氧化剂诱导的初始时期, 抗氧化能力应激性上升情况一致。而本实验染毒 24~72 h, TOSC 变化趋势不明显可能因机体从代偿向失代偿过度所致, 间接提示: 作为一个综合性指标, TOSC 能反应机体实际抗氧化能力的即时水平。

GSH 是一个衡量组织或细胞氧化损伤程度的常用单指标, PQ 的氧化还原循环能导致有毒的活性氧激增并消耗 NADPH 及其他还原物质^[21], 降低还原型谷胱甘肽 (GSH) 的水平^[22], 本实验发现染毒 24、48、72 h 后, 各剂量组的 GSH 都呈明显的递减趋势, 而且以 24 h 的变化最大。PQ 对机体的急性氧化损伤作用在这一单指标中得到明确而显著的体现。但以前的结果^[4]却发现小鼠受氧化剂处理 4~12 d 后 GSH 的变化不是很灵敏, 提示其局限于早期效应的反映。

TOSC 作为衡量氧化防御系统应激水平的总体指标, 可以客观反映机体当前的实际抗氧化应激能力。染毒机体抗氧化系统的急性代偿和慢性失代偿

效应可以准确地从 TOSC 的变化中反映出来。当机体处于代偿向失代偿的过渡阶段或者各种抗氧化成分含量变化相互抵消时^[23], GSH 则能发挥更直接、明了的优势。但由于单指标反映内容的局限性,对损伤机制复杂的毒物及较长时间染毒作用后的实际氧化损伤, GSH 则难以客观反映。

TOSC 是一个综合性的抗氧化能力指标,它从整体的角度反应了机体实际的氧化应激水平,在检测慢性长期氧化损伤中有独特优势,与单项抗氧化指标同时运用,能有很好的实时、准确的效果。

(致谢:实验得到了唐建刚、俞紫莲、俞智勇、钱江同学的协助,在此表示感谢。)

参考文献:

- [1] Winston GW, Regoli F, Dugas AJ, *et al.* A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids[J]. *Free Radic Biol Med*, 1998, 24(3): 480-493.
- [2] 卢小英,叶怀庄,蔡德雷,等.生物样品及抗氧化剂总抗氧化能力的总氧自由基清除能力测定法[J].环境与健康杂志,2003,20(4): 45-46.
- [3] 叶怀庄,徐立红.生物组织总氧自由基清除能力检测方法的建立[J].中华预防医学杂志,2002,(6): 410.
- [4] 蔡德雷,徐立红.用多项生物标志物评价家用洗涤剂对小鼠的早期影响[J].中国环境科学,2002,22(3): 254-257.
- [5] 徐玫,朱心强.生物组织总氧自由基清除能力的检测方法及应用[J].国外医学卫生学分册,2003,30(4): 242-245.
- [6] Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263: 17 205-17 208.
- [7] 化工部上海化工毒物咨询中心.毒物登记指南(1)百草枯[S].职业卫生与应急救援,1996,14(2): 46.
- [8] Shimada H, Furuno H, Hivai KI, *et al.* Paraquat detoxicative system in the mouse liver postmitochondrial fraction[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 402: 149-157.
- [9] Lii CK, Wang ST, Chen HW. The detection of s-glutathionation of hepatic carbonic anhydrase III in rats treated with paraquat or diquat[J]. *Toxicol Lett*, 1996, 84: 97-105.
- [10] Day BJ, Crapo JD. A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic protects against paraquat-induced lung injury in vivo[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 140, 94-100.
- [11] Ali S, Diwakar B, Pawa S. Paraquat induces different pulmonary biochemical responses in wistar rats and swiss mice[J]. *Chem Biol Interact*, 2000, 125: 79-91.
- [12] Sato M, Apostolova MD. Susceptibility of metallothionein-null mice to paraquat[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 1996, 1(4): 221-225.
- [13] Hiroki S, Hidenori F. Paraquat detoxicative system in the mouse liver postmitochondrial fraction[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 402(1): 149-157.
- [14] 庞战军.自由基医学研究方法[M].北京:人民卫生出版社,2002.260-261.
- [15] Camus L, Birkely SR, Jones MB, *et al.* Biomarker responses and PAH uptake in *Mya truncata* following exposure to oil-contaminated sediment in an Arctic fjord (Svalbard)[J]. *Sci Total Environ*, 2003, 308(1-3): 221-234.
- [16] Camus L, Jones MB, Borseth JF, *et al.* Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure[J]. *Mar Environ Res*, 2002, 54(3-5): 425-430.
- [17] Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress[J]. *Aquat Toxicol*, 2000,(4): 351-361.
- [18] Winzer K, Winston GW, Becker W, *et al.* Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder[J]. *Aquat Toxicol*, 2001, 52: 143-155.
- [19] Regoli F, Nigro M, Bompadre S, *et al.* Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants[J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 49 (1-2): 13-25.
- [20] Regoli F, Gorbi S, Frenzilli G, *et al.* Oxidative stress in ecotoxicology from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach[J]. *Mar Environ Res*, 2002, 54(3-5): 419-423.
- [21] Chen N, Bowles MR, Pand SM. Prevention of paraquat toxicity in suspensions of alveolar type II cell by paraquat-specific antibodies[J]. *Hum Exp Toxicol*, 1994, 13(8): 551-570.
- [22] Melchiorri D, Reiter RJ, Attin AM, *et al.* Potent protective of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rat[J]. *Life Sci*, 1995, 56(2): 83-89.
- [23] 刘丽娜,赵金垣.还原性谷胱甘肽对急性百草枯中毒治疗作用的实验研究[J].职业卫生与应急救援,2003,18(1): 4-8.