

TBT 对大鼠肝脏 ROS、抗氧化酶和解毒系统酶的影响

王 燕¹,陈永刚¹,葛郑增¹,刘慧刚¹,郑一凡²,徐立红^{1*} (1.浙江大学医学院,浙江 杭州 310031; 2.浙江大学公共卫生学院,浙江 杭州 310031)

摘要: 研究了三丁基锡(TBT)对大鼠肝脏 ROS、抗氧化酶和解毒系统酶的影响。SD 大鼠随机分为 6 组,TBT 染毒剂量各组分别为,0,0.1,0.3,1.0,3.0,10.0mg/kg(B·W),连续灌胃 7d,第 8d 处死,取肝脏检测活性氧(ROS)水平、谷胱甘肽转硫酶(GST)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、谷胱甘肽还原酶(GR)活性和谷胱甘肽(GSH)含量。结果表明,ROS 随 TBT 浓度增加而升高,各浓度组均有显著性差异。在 0.3,1.0mg/kg 时,GST 活性升高且具有显著性差异,在 3.0,10.0mg/kg 有下降趋势;GR 活性也升高且具有显著性差异。CAT 活性及 GSH 含量在各浓度组均无明显变化。研究结果提示,染毒各组 ROS 水平明显升高,而与 ROS 去除有直接关系的 GSH 水平和 CAT 活性没有发生相关的变化,因此 TBT 在代谢转化过程中产生的自由基不能及时被清除可能是导致 ROS 水平明显升高的重要原因。

关键词: 三丁基锡; 大鼠; ROS; 抗氧化酶; 解毒酶

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2005)04-0428-04

Influence of TBT on ROS, antioxidant enzymes and detoxification system enzyme in rat liver. WANG Yan¹, CHEN Yong-gang¹, GE Zheng-zeng¹, LIU Hui-gang¹, ZHENG Yi-fan², XU Li-hong^{1*} (1.School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; 2.School of Public Health, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China). *China Environmental Science*, 2005,25(4): 428~431

Abstract: The influence of tributyltin chloride(TBT) on the ROS, antioxidant enzymes and the detoxification system in rat liver was studied. SD rats were divided into 6 groups randomly. The TBT exposure dosages of each group were 0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 and 10.0mg/kg(B·W) respectively. Consecutive gavage for 7d, the liver of the animals sacrificed on the 8th day was used to detect the reactive oxygen species (ROS) level, the activities of glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and content of glutathione (GSH). The ROS increased with the increase of TBT concentration and there was significant difference in all every exposure groups. The activities of GST increased at concentration of 0.3 and 1.0mg/kg with significant difference; and tended to decrease in the groups of concentration 3.0 and 10.0mg/kg differences. No obvious change of the activities of CAT and the content of GSH in each exposure group existed. Therefore the important cause inducing increase of the ROS level might be that the free radicals produced in the metabolism transformation process of TBT could not be removed in time.

Key words: tributyltin chloride; rat; ROS; antioxidant enzymes; detoxification enzyme

三丁基锡(TBT)是一种有机锡类化合物,海洋水体中的 TBT 主要来源于船体和海水中设施的表面涂料释放。TBT 是一种内分泌干扰物,类似于雄激素,可使海洋动物性成熟和繁殖推迟^[1]、贝类和腹足纲动物性畸变^[2-4],它可以在水生生物体内富集^[5],有可能通过食物链进入动物和人体内。水体中 TBT 半衰期由于环境条件如 pH 值、温度、混浊度和光线的变化而不同,一般是几天到几周,而海底沉积物中的 TBT 半衰期可以长达几年^[6],因此,虽然许多国家已经禁止使用 TBT,但

是它在海洋水体中依然会存在较长时间。

TBT 在离体条件下使海洋哺乳动物肝微粒体细胞色素 P450 含量下降,而 P420 含量升高,有可能是 P450 降解成 P420,代表 P450 家族活性的 7-乙氧基异吩恶唑-O-脱乙基酶(EROD)和 penthoxyresorufin O-depentylase(PROD)均受到明显抑制作用^[7]。TBT 还可以抑制人细胞色素 P450

收稿日期: 2004-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270257,20137010)

* 责任作者, 教授, xulihong@zju.edu.cn

芳香化酶的活性而且是其竞争性抑制剂^[8,9].有关 TBT 在生物毒性标记和细胞凋亡方面的研究亦受到关注^[10].

现有文献报道关于 TBT 哺乳动物活体实验比较少,本研究主要对 TBT 在活体情况下引起的大鼠肝脏 ROS、抗氧化酶和解毒酶变化进行全面检测,获得 TBT 对哺乳动物抗氧化系统和解毒系统酶影响的资料.

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠,雄性,体重 200 ± 20 g,由浙江省实验动物中心提供.

1.2 试剂与仪器

TBTCl, Acros 公司产品;还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG),1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB),NADPH Na_4 ,5,5-二硫代-双-2-硝基苯甲酸(DTNB),DCFH-DA(2,7-dichlorofluorescein diacetate),均为 Sigma 公司产品;小牛血清白蛋白(BSA),上海市浦江应用化学研究所产品;其余试剂均为分析纯.

Synergy HT 酶标仪,Bio-Tek 公司产品;Microfuge®高速离心机, BECKMAN 公司产品.

1.3 实验方法

1.3.1 暴露 SD 大鼠购进后,驯养 2d,随机分组,每组 5 只,共 6 组.将根据 WHO 的相关标准资料^[11]和预实验结果,TBT 的剂量分组:0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0mg/(kg·d).配置 TBT 的储液 300mg/mL,溶于无水乙醇,用生理盐水稀释至适当浓度,采用灌胃的染毒方式,根据灌胃体积 10mL/kg 和每只大鼠的体重计算用量,每天 1 次,共染毒 7d.

1.3.2 取样及样品处理 各剂量组均未见死亡,最后一次染毒 1d 后,解剖大鼠取肝脏,用生理盐水冲洗表面的血液,迅速放于液氮中速冻.速冻后取出放于 -70°C 冰箱保存.

1.4 检测方法

根据文献[12,13]报道的方法对活性氧(ROS)、谷胱甘肽转硫酶(GST)、谷胱甘肽还原

酶(GR)、谷胱甘肽(GSH)和过氧化氢酶(CAT)进行检测,以小牛血清白蛋白(BSA)作为标准 Lowry 法测定蛋白浓度.

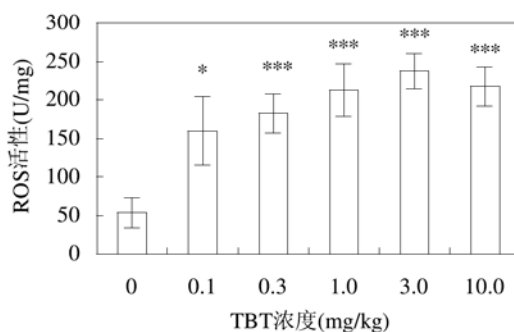
1.5 数据处理

实验数据采用 SPSS 软件的 Student's *t*-test 分析方法进行统计分析.

2 结果

2.1 TBT 对大鼠肝脏 ROS 的影响

图 1 显示随 TBT 剂量的升高,ROS 升高,且呈现良好的剂量-效应关系.0.1mg/kg 剂量组与对照组相比即出现显著性差异,0.3~10.0mg/kg 剂

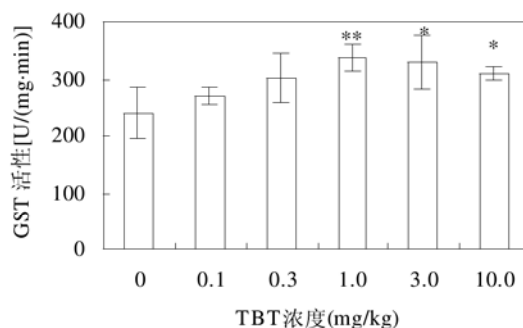


量组与对照组相比具有极显著性差异.

图 1 TBT 灌胃对大鼠肝脏 ROS 的影响

Fig.1 ROS in the liver of rats exposed to TBT

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, $n = 5$



2.2 TBT 对大鼠肝脏 GST 活性的影响

图 2 TBT 灌胃对大鼠肝脏 GST 活性的影响

Fig.2 GST activities in the liver of rats exposed to TBT

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$

图 2 显示 TBT 暴露时大鼠肝脏 GST 活性随

TBT 浓度的增加逐渐升高,1.0mg/kg 剂量组与对照组相比有极显著性差异,3.0mg/kg 和 10.0mg/kg 剂量组和对照组相比虽然具有显著性差异,但活性比 1.0mg/kg 剂量组有下降趋势。

2.3 TBT 对大鼠肝脏 GR 活性的影响

图 3 显示 TBT 暴露对于大鼠肝脏 GR 活性的影响随浓度增加有升高的趋势,1.0mg/kg 剂量组和对照组相比具有极显著性差异,3.0mg/kg 和 10.0mg/kg 剂量组和对照相比具有显著性差异。

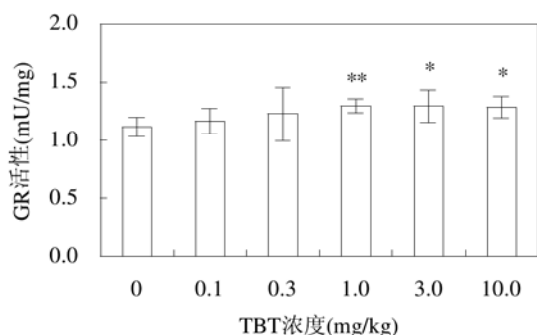


图 3 TBT 灌胃对大鼠肝脏 GR 活性的影响

Fig.3 GR activities in the liver of rats exposed to TBT

注同图 2

2.4 TBT 对大鼠肝脏 GSH 含量的影响

图 4 显示不同浓度 TBT 暴露对于大鼠肝脏 GSH 含量无明显影响。

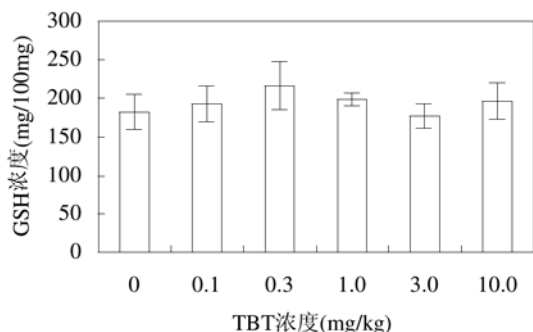


图 4 TBT 灌胃对大鼠肝脏 GSH 含量的影响

Fig.4 GSH content in the liver of rats exposed to TBT

$n=5$

2.5 TBT 对大鼠肝脏 CAT 活性的影响

图 5 显示不同浓度 TBT 暴露对于大鼠肝脏

CAT 活性无影响。

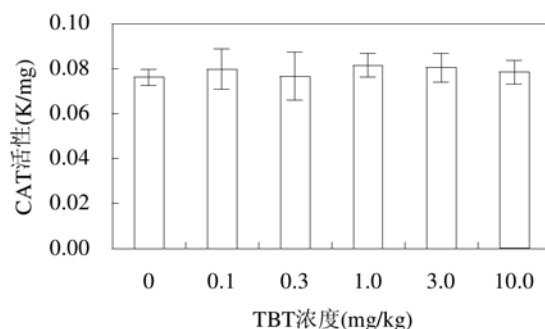


图 5 TBT 灌胃对大鼠肝脏 CAT 活性的影响

Fig.5 CAT activities in the liver of rats exposed to TBT

注同图 4

3 讨论

ROS 是评价外源性物质对生物体影响的常用指标.本研究结果显示,染毒第 8d 时各组 ROS 水平明显升高,而与 ROS 去除有直接关系的 GSH 水平和 CAT 活性没有发生相关变化,因此 TBT 在代谢转化的过程中直接产生自由基且不能及时被清除可能是导致 ROS 水平明显升高的重要原因。

GST 是生物体解毒系统 II 阶段重要的酶,由图 2 可以看出,TBT 在 1.0mg/kg 组使 GST 的活性明显增高,在 3.0~10.0mg/kg 组有下降趋势.国外曾报道 TBT 对双壳类软体动物消化腺细胞染毒时,GST 的变化亦呈先增高后下降的趋势^[14].这表明 TBT 可以对 GST 有诱导作用,但高剂量时 TBT 可能对酶蛋白本身产生影响,加上 ROS 的升高也可以影响酶蛋白的活性,从而导致高剂量组 GST 呈下降趋势。

文献报道 TBT 可以使大鼠胸腺细胞 GSH 含量明显下降^[15],巨噬细胞体外培养时,TBT 可以直接进入细胞与 GSH 结合,导致免疫毒性^[16].但是本实验中发现 GSH 与对照组相比没有明显改变,而对 GSSG 向 GSH 转变有重要作用的 GR 活性随 TBT 剂量增加有升高的趋势,这可能对 GSH 水平的维持具有一定意义。

4 结语

在设定的 TBT 浓度对 SD 大鼠染毒 8d 后,3 种指标 ROS、GST 和 GR 对 TBT 染毒有明显反应,而 ROS 在最低剂量组即有显著性改变,这表明作为反映 TBT 影响的指标,ROS 是最灵敏的。

参考文献:

- [1] Madoka Ohji, Takaomi Arai, Nobuyuki Miyazaki. Chronic effects of tributyltin on the caprellid amphipod *Caprella danilevskii* [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003,46:1263-1272.
- [2] 韩雅丽,周小鹏,李兴暖.三丁基锡致软体动物性畸变机制 [J]. *上海水产大学学报*,2003,12(2):174-178.
- [3] 熊振湖,黄国兰.内分泌干扰物三丁基锡诱导的腹足纲动物性畸变现象 [J]. *环境科学研究*,2002,15(3):56-60.
- [4] Birchenough A C, Barnes N, Evans S M, *et al.* A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002,44:534-543.
- [5] 李书霞,孙红文,王玉秋,等.三丁基锡的生物富集与分配行为 [J]. *环境科学学报*,2002,26(2):726-731.
- [6] Claude Alziell. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment [J]. *Ocean & Coastal Management*, 1998,40:23-36.
- [7] Gi Beun Kim, Haruhiko Nakata, Shinsuke Tanabe. In vitro inhibition of hepatic cytochrome P450 and enzyme activity by butyltin compounds in marine mammals [J]. *Environmental Pollution*, 1998,99:255-261.
- [8] Gerard M. Cooke. Effect of organotins on human aromatase activity in vitro [J]. *Toxicology Letters*, 2002,126:121-130.
- [9] Dagmar D. Heidrich, Stephan Steckelbroeck, Dietrich Klingmuller. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins [J]. *Steroids*, 2001,66:763-769.
- [10] 朱 欣,徐立红.三丁基锡诱导的细胞凋亡的机制 [J]. *环境与健康杂志*,2005,22(2):155-158
- [11] Dobson S, Cabridenc R. International programme on chemical safety, environmental health criteria 116: tributyltin compounds [EB/OL]. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc116.htm>. 2004-05-25.
- [12] James F Curtin, Maryanne Donovan, Thomas G Cotter. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis [J]. *Geneva: Journal of Immunological Methods*, 2002,265:49-72.
- [13] 庞占军,周 玫,陈 媛.自由基医学研究方法 [M]. 北京:人民出版社,2000.168-169,183-186,201-204,259-261.
- [14] Gaël Le Pennec, Marcel Le Pennec. Induction of Glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusc bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003,64:131-142.
- [15] Yoshihiko Okada, Yasuo Oyama, Lumi Chikahisa, *et al.* Tri-n-butyltin-induced change in cellular level of glutathione in rat thymocytes: a flow cytometric study [J]. *Toxicology Letters*, 2000,117:123-128.
- [16] Francesca Cima, Lorian Ballarin. Tributyltin-sulphydryl interaction as a cause of immunotoxicity in phagocytes of tunicates [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004,58: 386-395.

作者简介: 王 燕(1978-),女,山东平原人,浙江大学医学院劳动卫生与环境卫生研究所在读硕士研究生,研究方向为环境毒理学.发表论文 1 篇。