

硝基苯的蓄积毒性和氧化损伤*

邢厚娟¹ 王殿奎² 张春红^{1,3} 徐世文^{1*}

(1 东北农业大学动物医学院, 哈尔滨, 150030; 2 黑龙江民族职业学院, 哈尔滨, 150081;

3 国家农业标准化监测与研究中心, 哈尔滨, 150036)

摘 要 以小鼠为对象, 对硝基苯 (NB) 的蓄积毒性和氧化损伤进行研究, 检测 SOD、GSH-Px、CAT、MDA 和蛋白质羰基含量。结果表明, 蓄积系数 (K) 为 4.76。亚急性试验随着染毒剂量的加大, 肾脏和脾脏的 MDA 含量逐渐升高, CAT、SOD 和 GSH-Px 酶活性逐渐降低, 蛋白质羰基含量呈上升趋势, 并表现出明显的剂量效应。表明 NB 对肾脏和脾脏具有明显的毒性作用, NB 可使自由基在机体内累积, 引起蛋白质氧化损伤, 导致机体发生氧化应激。

关键词 硝基苯, 蓄积毒性, 氧化损伤, 小鼠。

硝基苯 (NB) 是环境中常见的工业污染物, 工业废水中的 NB 受到人们极大关注。但目前有关 NB 毒理学的研究较少。

本试验对 NB 进行了蓄积毒性和氧化损伤的研究, 以期为进一步探讨 NB 对人体的毒性作用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 NB 蓄积试验

试验动物为哈尔滨肿瘤医院实验动物中心提供的清洁级昆明纯系小鼠, 6 周龄, 体重 (21 ± 2) g。采用蓄积系数法中的定期递增剂量法进行蓄积试验, 以 4 d 为一期, 试验开始后首期 4 d 每日给予小鼠 $0.1 LD_{50}$ 剂量染毒, 从第 5 天开始每 4 d 递增剂量 1.5 倍, 即 $0.1 LD_{50} \times 4 d$ 、 $0.15 LD_{50} \times 4 d$ 、 $0.22 LD_{50} \times 4 d$ 依此类推。试验期最长为 28 d。在试验期间如累积发生一半动物死亡即可终止试验, 也可在试验第 21 天时结束试验 (若此前动物未死亡或死亡数不足一半, 说明其累积剂量已达 $5.24 LD_{50}$, 即蓄积系数 (K) > 5)。

1.2 NB 亚急性毒性试验

取雄性小鼠 100 只, 随机分成 5 组, 每组 20 只, 第 I 组为对照组, 第 II 组为油对照组, 第 III、IV、V 组染毒剂量分别为 $26 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$ 、 $52 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$ 、 $105 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$, 每天染毒 1 次, 试验期为 20 d。于末次染毒第 2 d 将小鼠脱颈处死, 迅速取出脾脏和肾脏, 用于抗氧化指标和蛋白质羰基含量的检测。

1.3 检测方法

将取出的脾脏和肾脏, 冰浴下快速进行组织匀浆, 用于抗氧化指标的检测。谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性的测定: DTNB 显色法; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测定: 黄嘌呤氧化法; 丙二醛 (MDA) 含量的测定: 硫代巴比妥酸法; 总抗氧化能力 (T-AOC) 的测定: 化学比色法; 过氧化氢酶 (CAT) 活性的测定: 钼酸铵显色法; 蛋白浓度的测定: 考马斯亮蓝法。

2 结果与讨论

2.1 蓄积毒性

2008 年 4 月 7 日收稿。

* 黑龙江省教育厅研究项目 (No YJSCX2007-0043HLJ No 11515070)。* * 通讯作者 (责任作者), E-mail: xushiwen10@sohu.com

外源性化学物质在机体内的蓄积作用是其发生慢性中毒的物质基础, 很少出现蓄积作用小的物质在长期与人体接触后发生慢性中毒. 因此, 研究外源性化学物质在机体内有无蓄积及蓄积程度是评价外源性化学物质能否引起潜在慢性毒性的依据之一, 也是制定有关卫生标准时选择安全系数的依据之一. 测量化学物质的蓄积毒性通常采用生物学方法, 其蓄积系数(K)愈小, 表示受试化学物质的蓄积毒性愈大. 陈晓东^[1]等采用定量递增系数法检测 Vana化合物的蓄积毒性, 结果表明, Vana化合物的蓄积作用属轻度蓄积以下. 赵振升^[2]等在氯化钠对海兰褐雏鸡急性毒性和蓄积毒性试验中 $K > 5$, 为轻度蓄积. 刘仲霞^[3]等采用定量递增系数法检测二氧化氯消毒剂的蓄积毒性时 $K > 5$, 为弱蓄积毒性. 本试验检测结果在试验第 20 天时动物死亡数量达到一半, 此时 K 值为 4.76. 按照蓄积系数评价标准 NB 属于中等蓄积. 表明长期接触 NB 可以对动物产生毒性作用.

2.2 抗氧化能力的检测

由表 1 可以看出, 空白对照与油对照组的各项抗氧化指标差异均不显著($P > 0.05$), 表明溶剂对试验结果影响较小, 可以选择花生油作为溶剂. 随着染毒剂量的加大, MDA 含量逐渐升高, CAT, SOD 和 GSH-Px 酶活性逐渐降低; 与油对照组相比, 各剂量组均表现为差异极显著($P < 0.01$); 染毒组之间各项指标差异均极显著($P < 0.01$).

表 1 小鼠肾脏抗氧化功能的测定结果

Table 1 The detected results of antioxygen indexes of kidney in mice

染毒剂量	CAT $U \cdot mg^{-1}$ 蛋白	SOD $U \cdot mg^{-1}$ 蛋白	GSH-Px 活力单位	MDA /nmol $\cdot mg^{-1}$ 蛋白
I	117.867 \pm 1.037 ^{Aa}	138.327 \pm 0.491 ^{Aa}	158.581 \pm 0.300 ^{Aa}	0.728 \pm 0.013 ^{Dd}
II	116.313 \pm 1.367 ^{Aa}	137.121 \pm 1.793 ^{Aa}	157.367 \pm 0.346 ^{Aa}	0.742 \pm 0.003 ^{Dd}
III	100.023 \pm 1.520 ^{Bb}	126.113 \pm 3.359 ^{Bb}	151.231 \pm 2.111 ^{Bb}	0.827 \pm 0.017 ^{Cc}
IV	95.769 \pm 0.686 ^{Cc}	117.304 \pm 2.154 ^{Cc}	143.316 \pm 1.647 ^{Cc}	0.907 \pm 0.014 ^{Bb}
V	91.633 \pm 1.310 ^{Dd}	110.364 \pm 3.177 ^{Dd}	132.906 \pm 2.941 ^{Dd}	1.136 \pm 0.011 ^{Aa}

注: 同一列对照组与试验组角码小写字母相同者, 表示两组之间差异不显著($P > 0.05$), 小写字母不同者, 表示两组之间差异显著($P < 0.05$), 大写字母不同者表示差异极显著($P < 0.01$). 下同.

由表 2 可以看出, 空白对照与油对照组各项抗氧化指标的差异均不显著($P > 0.05$). 随着染毒剂量的加大, MDA 含量逐渐升高, CAT, SOD 和 GSH-Px 酶活性逐渐降低; 与油对照组相比, 各剂量组均表现为差异极显著($P < 0.01$); SOD 为 26 $mg \cdot kg^{-1}$ 和 105 $mg \cdot kg^{-1}$ 组差异不显著($P > 0.05$) 外, 其它各组差异均极显著($P < 0.01$).

表 2 NB 对小鼠脾脏抗氧化指标的影响

Table 2 Influence of NB on the antioxidative indexes of spleen in mice

染毒剂量	CAT $U \cdot mg^{-1}$ 蛋白	SOD $U \cdot mg^{-1}$ 蛋白	GSH-Px 活力单位	MDA /nmol $\cdot mg^{-1}$ 蛋白
I	87.220 \pm 1.107 ^{Aa}	102.146 \pm 0.566 ^{Aa}	97.266 \pm 1.054 ^{Aa}	1.117 \pm 0.043 ^{Dd}
II	85.281 \pm 1.118 ^{Aa}	104.956 \pm 0.818 ^{Aa}	96.033 \pm 1.340 ^{Aa}	1.283 \pm 0.035 ^{Dd}
III	75.594 \pm 1.050 ^{Bb}	97.427 \pm 1.748 ^{Bb}	92.146 \pm 1.582 ^{Bb}	1.755 \pm 0.229 ^{Cc}
IV	64.348 \pm 2.233 ^{Cc}	92.318 \pm 1.732 ^{Cc}	85.041 \pm 2.075 ^{Cc}	2.631 \pm 0.185 ^{Bb}
V	57.717 \pm 1.768 ^{Dd}	96.606 \pm 0.021 ^{Bb}	78.855 \pm 2.539 ^{Dd}	3.321 \pm 0.213 ^{Aa}

研究结果表明, NB 能够引起小鼠脑抗氧化功能发生改变, 表现出神经毒性^[4]. 李桂珠等报道^[5], 哺乳动物对外源物进行生物转化过程中产生的活性氧自由基能够破坏机体的抗氧化防御系统, 使其酶活性发生改变, 表现其毒性. SOD, CAT 以及 GSH-Px 是生物体抵抗氧化损伤的主要酶系, 这三种酶可对环境胁迫产生响应, 维持机体氧化和抗氧化平衡^[6]. CAT 主要存在于组织细胞的过氧化物酶体内, 专门清除过氧化氢, 其在分解过氧化氢时, 常与 GSH-Px 协同作用^[7], 试验中二者的酶活性均逐渐降低, 表明机体内自由基水平有所增加, 构成机体防御自由基损伤的第二道防线被破坏. SOD 的活性主要受氧自由基影响, 但羟自由基与过氧化氢也可导致 SOD 失活^[8,9], NB 中毒时组织内酶活性的下降, 表明整个机体可能会受到超氧游离基的攻击造成细胞损伤. MDA 是机体组织脂质过

氧化的产物, 它含量的增加提示肾脏和脾脏组织中活性氧的增长超出了其抗氧化系统的处理能力, 表明动物机体在 NB 亚急性中毒过程中抗氧化能力降低, 发生了脂质过氧化反应, 导致机体的组织器官受到损害. 由此表明, NB 亚急性中毒可通过改变酶与非酶系统的抗氧化能力使机体的氧化与抗氧化平衡发生改变, 导致脂质过氧化物增多, 自由基在机体内累积, 使机体处于氧化应激状态.

2.3 蛋白质羰基含量的检测

自由基对蛋白质的主要作用是修饰氨基酸残基, 引起结构和构象的改变, 造成肽键断裂、聚合和交联^[10]. 在这些蛋白质氧化损伤的反应中, 都涉及到蛋白质羰基的产生. 蛋白质羰基的产生是蛋白质分子被自由基氧化修饰的一个重要标记, 是蛋白质氧化损伤敏感的指标^[11], 由于这一特征具有普遍性, 因而可以通过测定组织中蛋白质羰基含量来反映机体蛋白质氧化损伤的情况^[10-12]. 段丽菊报道, 小鼠吸入 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 甲醛后, 心和肝的蛋白质羰基含量均显著升高 ($P < 0.01$), 说明该浓度甲醛对小鼠心和肝的蛋白质氧化损伤作用显著.

由表 3 可知, 各组织空白对照和油对照之间差异均不显著 ($P > 0.05$). 随着染毒剂量的增加, 肾脏和脾脏中蛋白质羰基含量呈上升趋势. 肾脏和脾脏各剂量组与油对照组间差异均极显著 ($P < 0.01$); 染毒组之间, 除脾脏 $26 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $52 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组差异显著 ($P < 0.05$) 外, 其他各组差异均极显著 ($P < 0.01$), 并表现为明显的剂量依赖性, 表明 NB 能够导致小鼠肾脏和脾脏蛋白质氧化损伤.

表 3 NB 对小鼠肾脏和脾脏蛋白质羰基含量的影响

Table 3 The effect of NB on the protein carbonyl content in kidney and spleen in mice ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)

染毒剂量	样本数	肾脏	脾脏
I	20	$15.767 \pm 1.334^{\text{d}}$	$12.039 \pm 2.801^{\text{cd}}$
II	20	$17.344 \pm 1.583^{\text{d}}$	$10.876 \pm 1.240^{\text{cd}}$
III	20	$31.536 \pm 6.269^{\text{c}}$	$23.792 \pm 4.551^{\text{bc}}$
IV	20	$42.587 \pm 2.418^{\text{b}}$	$30.221 \pm 2.405^{\text{bb}}$
V	20	$58.964 \pm 3.064^{\text{a}}$	$45.366 \pm 3.431^{\text{a}}$

3 结论

NB 对小鼠肾脏和脾脏具有明显的毒性作用, NB 可通过改变酶与非酶系统的抗氧化能力使机体的氧化与抗氧化平衡发生改变, 导致脂质过氧化物增多, 自由基在机体内累积, 进而引起蛋白质氧化损伤, 使机体处于氧化应激状态.

参 考 文 献

- [1] 陈晓东, 李俊峰, 王英等. Vana 化合物蓄积作用的实验研究 [J]. 包头医学院学报, 2006, 22 (4): 376—377
- [2] 赵振升, 赵爱莲, 王晓港等. 氯化钠对海兰褐雏鸡急性毒性和蓄积毒性试验 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006, (9): 43—44
- [3] 刘仲霞, 蓝才燕, 苏伟东. 一种二氧化氯消毒剂对水的消毒效果及毒性观察 [J]. 中国消毒学杂志, 2005, 22 (2): 198—199
- [4] 邢厚娟, 王海波, 王敏等. 氧化胁迫在硝基苯致小鼠神经毒性中的作用 [J]. 生物技术通讯, 2007, 18 (4): 616—618
- [5] 李桂珠, 许运新, 赵晓松等. 人参床土中五氯硝基苯残留特性的模拟 [J]. 吉林农业科学, 2002, 27 (5): 55—57
- [6] 卜元卿, 骆永明, 滕应等. 铜暴露对赤子爱胜蚓 (*Eisenia fetida*) 抗氧化酶活性的影响 [J]. 环境化学, 2007, 26 (5): 593—597
- [7] 王金涛, 甘文平, 徐世文. 冷应激对雏鸡下丘脑及血清抗氧化功能的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34 (9): 8—11
- [8] Hodgson E K, Fridovich I. The Interaction of Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase with Hydrogen Peroxide Inactivation of the Enzyme [J]. *Biochemistry*, 1975, 14 (24): 5294—5299
- [9] Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A et al. Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase, and Catalase Inactivation by Peroxides and Oxygen Derived Free Radicals [J]. *Mech Ageing Dev*, 1990, 51 (3): 83—97
- [10] 文静, 张春华, 董雨等. 蛋白质羰基含量与蛋白质氧化损伤 [J]. 食品科学, 2003, 24 (1): 153—157
- [11] Stanley T, Omaye P, Peng Z. β -Carotene and Protein Oxidation: Effect of Ascorbic Acid and α -Tocopherol [J]. *Toxicology*, 2000, 146: 37—47

- [12] Frank J. Pompelka A, Biesalski H K. Histohemical Visualization of Oxidant Stress [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, 9 (121) : 1096-1105

STUDY ON THE ACCUMULATION TOXICITY AND OXIDATIVE DAMAGE OF NITROBENZENE

XINGHou-juan¹ WANGDian-ku² ZHANGChun-hong^{1,3} XUSHiwen¹

(1 College of Veterinary Medicine Northeast Agricultural University, Harbin, 150030, China)

(2 College of Heilongjiang Nation and Profession Technique, Harbin, 150081, China)

(3 Chinese Agriculture Standardize Monitor and Research Center, Harbin, 150036, China)

ABSTRACT

In the study of accumulative action, the periodically increasing dosimetry was adopted. 100 male Kunming mice were divided into 5 groups. Group I was the control group. Group II was the oil control group. The dosage of NB in group III, IV and V were $26 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$, $52 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$ and $105 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$ respectively (once a day). The experimental period was 20 d. The activity of SOD, GSH-Px and CAT and the content of MDA and protein carbonyl were detected. The results showed that the accumulation coefficient K was 4.76. With the increasing dosage of nitrobenzene (NB), the content of MDA and protein carbonyl gradually increased and the activity of CAT, SOD and GSH-Px gradually decreased in kidney and spleen. The results indicate that NB could produce significantly toxic effect on the kidney and spleen through the accumulation of the free radical, the protein oxidative damage and the oxidative stress in the organism.

Keywords nitrobenzene, accumulation toxicity, oxidative damage, mice