

镧、铈、钕对小鼠肝细胞线粒体的氧化损伤作用

田蜜¹, 曹丽歌¹, 刘娜², 谢广云^{2,3}, 黄沛力^{2,*}

1. 首都医科大学医学实验与测试中心, 北京 100069
2. 首都医科大学公共卫生与家庭医学学院卫生毒理学与卫生化学系, 北京 100069
3. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100013

摘要: 轻稀土元素进入生物体后主要累积于肝脏, 进入肝细胞, 除蓄积在细胞核中, 还存在于线粒体中。为探讨轻稀土元素对小鼠肝细胞线粒体的氧化损伤作用, 选用5周龄雄性ICR小鼠分别以10、20和40 mg·kg⁻¹的镧(La)、铈(Ce)和钕(Nd)灌胃, 6周后测定小鼠肝细胞线粒体中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的活性, 以及谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的含量。结果显示, 与对照组相比, La中剂量组和Ce低剂量组SOD活性显著升高, La高剂量组和Nd中、高剂量组中SOD活性显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 除个别剂量组外, 各染毒组CAT和GPx活性与GSH含量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); Nd各剂量组、La高剂量组和Ce高剂量组的MDA含量显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。研究表明, La、Ce和Nd所导致的CAT和GPx活性以及GSH含量降低可能是造成肝细胞线粒体氧化损伤的主要原因。

关键词: 镧(La); 铈(Ce); 钕(Nd); 线粒体; 氧化损伤

文章编号: 1673-5897(2012)4-453-04 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Oxidative Damage Induced by Lanthanum, Cerium and Neodymium in Hepatocyte Mitochondria of Mice

Tian Mi¹, Cao Lige¹, Liu Na², Xie Guangyun^{2,3}, Huang Peili^{2,*}

1. Medical Experiment and Test Center, Capital Medical University, Beijing 100069, China
2. Department of Toxicology and Sanitary Chemistry, School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China
3. National Institute of Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

Received 3 February 2012 accepted 6 April 2012

Abstract: Light rare earth elements are found to mainly accumulate in the livers of receiving organisms. They can enter into hepatocytes and are mainly distributed in the mitochondria besides nuclei. To investigate the oxidative damage effects of light rare earth elements on the mitochondria isolated from the mouse liver, five-week-old male ICR mice were exposed to lanthanum (La), cerium (Ce) and neodymium (Nd) at different doses (10, 20 and 40 mg·kg⁻¹) by oral gavage for 6 weeks. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were determined as well as the contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA). Results showed that compared with the control group, SOD activity was significantly elevated in the La middle-dosage and Ce low-dosage groups, while SOD activity significantly decreased in the La high-

收稿日期: 2012-02-03 录用日期: 2012-04-06

基金项目: 国家自然科学基金(29890280)

作者简介: 田蜜(1968-), 女, 学士, 研究方向为卫生毒理学, E-mail: mitian1999@126.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: huangpl@ccmu.edu.cn

dosage, Nd middle-dosage and Nd high-dosage groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the activities of CAT and GPx, and GSH level significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) with only a few exceptions; MDA level significantly increased in the La high-dosage, Ce high-dosage and all Nd exposure groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). It is indicated that La, Ce and Nd decreased the activities of CAT and GPx and the level of GSH, which might be the main reason for inducing oxidative damage in hepatic mitochondria.

Keywords: lanthanum; cerium; neodymium; mitochondria; oxidative damage

稀土元素(rare earth elements, REEs) 具有独特的物理和化学性质, 广泛应用于医药卫生、工业和农业等领域。稀土元素的大量使用, 使其不可避免地进入环境, 并最终通过食物链进入人体。稀土元素进入环境后, 对生态环境和人体健康的影响和危害, 是人们普遍关心的问题。已有的研究表明, 稀土元素不仅会引起肝脏形态学的改变, 且进入肝细胞后的稀土元素可与多种蛋白质分子发生相互作用, 并影响多种酶的活性, 还可通过信使分子干扰肝脏正常的生理功能^[1]。卢振伟等^[2]研究了用作肥料添加剂的一种混合稀土硝酸盐(含镧、铈、钕和镨)对 Wistar 大鼠肝脏中 7 种常见酶(ALT、ICD、AST、LAP、ALP、r-GT 和 CHE)活性的影响, 发现稀土对多种酶表现出低剂量激活、高剂量抑制的小剂量刺激作用(hormesis), 但产生刺激作用的剂量随酶的种类不同而不同。夏青等^[3]考察了混合稀土(含镧、铈、钕和镨)对大鼠肝脏代谢的影响, 发现较低剂量($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)混合稀土对大鼠肝脏代谢无显著影响, 高剂量($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)则可导致肝细胞损伤, 使肝细胞代谢酶活力降低。本研究组在前期研究中发现, 稀土元素镧、铈和钕(La、Ce 和 Nd)会蓄积在小鼠肝细胞核和线粒体内, 且随着染毒剂量的增加, 肝细胞核和线粒体中 La、Ce 和 Nd 的含量增加^[4]; La、Ce 和 Nd 可显著影响小鼠肝细胞核的各种抗氧化酶(SOD、CAT 和 GPx)的活性, 进而导致肝细胞核的氧化损伤^[5]。细胞中线粒体的主要功能是将有机物氧化产生的能量转化为腺嘌呤核苷三磷酸(ATP), 是有氧呼吸产生能量的主要场所。细胞生命活动所必需的能量, 大约 95% 来自线粒体。每个肝细胞约含 1 300 个线粒体, 占细胞体积的 20%, 线粒体是对各种损伤最为敏感的细胞器之一。然而, 稀土元素对肝细胞线粒体的氧化损伤作用尚鲜有报道。本研究选用雄性 ICR 小鼠分别以 10、20 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 La、Ce 和 Nd 灌胃, 6 周后测定小鼠肝细胞线粒体中 SOD、CAT、GPx 的活性, 以及 GSH 和 MDA 的含量, 旨在进一步探究稀土元素对小鼠肝细

胞的氧化损伤作用。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 仪器和试剂

仪器: AX200 电子分析天平(日本 Shimadzu 公司), MR23i 型低温高速离心机(美国 Thermo 公司), Milli-Q Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore 公司), UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司)。

试剂: $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99.999%)、 CeCl_3 (99.99%) 和 NdCl_3 (99.99%) 购于 Sigma-Aldrich 公司(中国上海), SOD、CAT 和 GPx 活性, GSH、MDA 和蛋白含量测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物及分组

80 只 SPF 级 ICR 小鼠, 5 周龄, 雄性, 由军事医学科学院实验动物中心提供。饲养在温度(20 ± 2) $^\circ\text{C}$ 、相对湿度(55 ± 10)% 的动物房内, 用灭菌颗粒料和纯净水喂养。正式实验前, 小鼠有 1 周以上的时间适应本实验室的饲养条件。按体质量均衡的原则将小鼠随机分成 10 组, 每组 8 只。分别为: 空白对照组, 灌喂生理盐水灌胃; La 染毒组, 以 La 溶液 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (高剂量组)、 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (中剂量组) 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (低剂量组) 灌胃; Ce 染毒组, 以 Ce 溶液 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (高剂量组)、 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (中剂量组) 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (低剂量组) 灌胃; Nd 染毒组, 以 Nd 溶液 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (高剂量组)、 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (中剂量组) 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (低剂量组) 灌胃。连续以 6 周, 每周日除外。

1.3 肝细胞线粒体的提取及其抗氧化指标的测定

各组染毒结束后, 在提取肝细胞线粒体前使小鼠禁食 16 h, 之后按 $50 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊巴比妥钠进行麻醉, 待麻醉完全后打开小鼠腹腔, 原位用 0°C 的 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液灌洗肝脏, 然后将肝脏剪碎; 使用差速离心法分离线粒体^[6]。用新鲜蔗糖缓冲液 IV ($320 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 约为 7.4) 按 $4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 的比例将肝组织制成匀浆, 在 4°C 、 $1\,000 \times g$ 下离心 5 min, 将沉淀重新悬浮于蔗糖缓

冲液 IV 中, 在 4℃、12 000 × g 下离心 10 min, 制得线粒体。采用 Lowry 法测定线粒体的蛋白含量。SOD、CAT 和 GPx 活性, GSH、MDA 及蛋白含量测定严格按照试剂盒操作规程进行。

1.4 统计分析

实验数据用平均值 ± 标准偏差表示, 使用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 各染毒组与对照组之间用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计分析, P < 0.05 和 P < 0.01 定义为显著和极显著差异。

2 结果 (Results)

与对照组相比, La 中剂量组 (P < 0.01) 和 Ce 低剂量组 (P < 0.05) 的肝细胞线粒体中 SOD 活性显著升高, La 高剂量组 (P < 0.01)、Nd 中剂量组 (P < 0.05) 和 Nd 高剂量组 (P < 0.01) 的 SOD 活性显著降低 (图 1); 如图 2 和图 3 所示, 除 Ce 低剂量组外, 各染毒组 CAT 和 GPx 活性较对照组显著降低 (P < 0.01, P < 0.05); 除 La 中剂量组外, 各染毒组 GSH 含量较对照组显著降低 (P < 0.01, P < 0.05) (图 4); 如图 5 所示, Nd

各剂量组、La 高剂量组和 Ce 高剂量组的 MDA 含量较对照组显著升高 (P < 0.01, P < 0.05)。

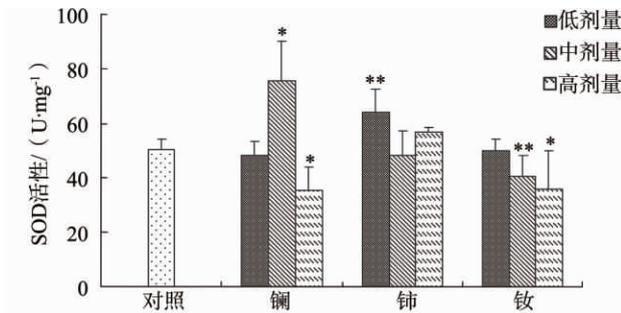


图 1 镧、铈和钕对小鼠肝细胞线粒体 SOD 活性的影响 (n = 8)
注: *、** 分别表示与对照组相比 P < 0.05、P < 0.01。

Fig. 1 Effects of La, Ce and Nd on SOD activity in hepatocyte mitochondria of mice (n = 8)

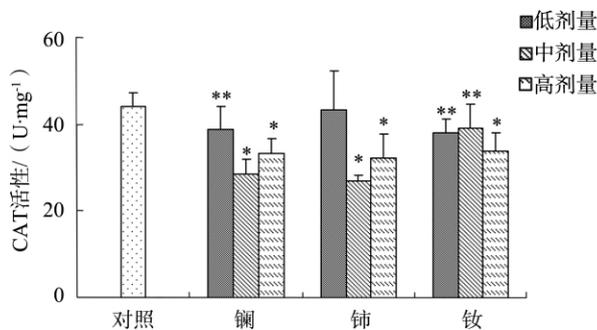


图 2 镧、铈和钕对小鼠肝细胞线粒体 CAT 活性的影响 (n = 8)
注: *、** 分别表示与对照组相比 P < 0.05、P < 0.01。

Fig. 2 Effects of La, Ce and Nd on CAT activity in hepatocyte mitochondria of mice (n = 8)

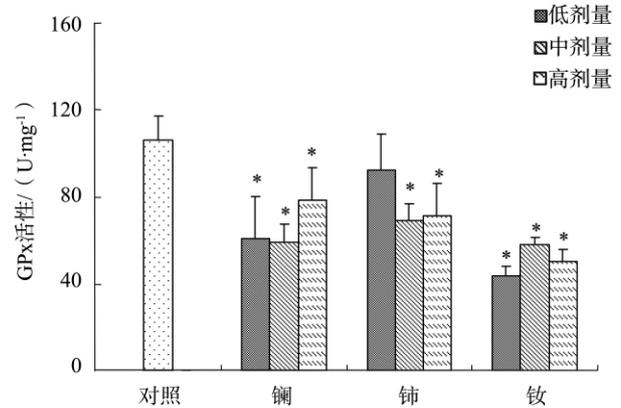


图 3 镧、铈和钕对小鼠肝细胞线粒体 GPx 活性的影响 (n = 8)
注: * 表示与对照组相比 P < 0.05。

Fig. 3 Effects of La, Ce and Nd on GPx activity in hepatocyte mitochondria of mice (n = 8)

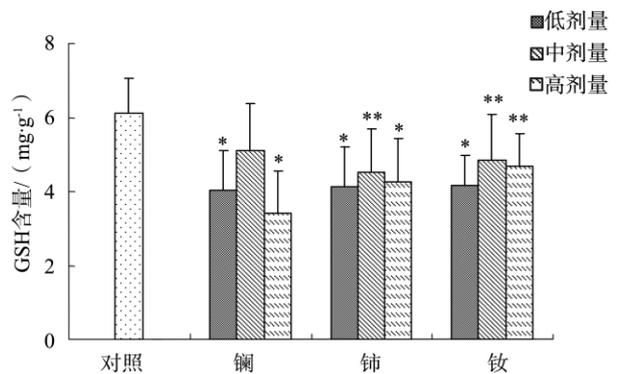


图 4 镧、铈和钕对小鼠肝细胞线粒体 GSH 含量的影响 (n = 8)
注: *、** 分别表示与对照组相比 P < 0.05、P < 0.01。

Fig. 4 Effects of La, Ce and Nd on GSH content in hepatocyte mitochondria of mice (n = 8)

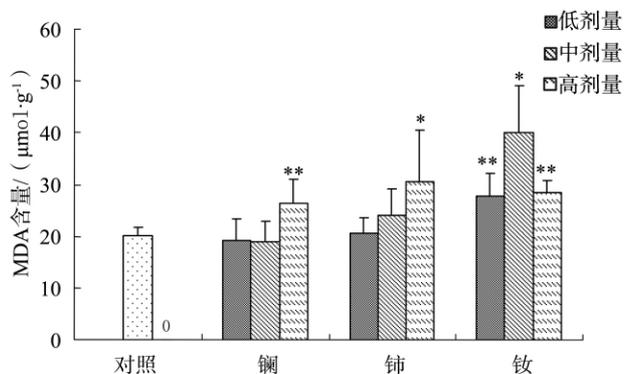


图 5 镧、铈和钕对小鼠肝细胞线粒体 MDA 含量的影响 (n = 8)
注: *、** 分别表示与对照组相比 P < 0.05、P < 0.01。

Fig. 5 Effects of La, Ce and Nd on MDA content in hepatocyte mitochondria of mice (n = 8)

3 讨论(Discussion)

线粒体最重要的功能之一是向机体提供能源,生成腺嘌呤核苷三磷酸,以维持机体生命活动的需要。通过呼吸进入体内的氧90%以上被线粒体利用。已有的研究表明,正常的生理条件下线粒体在利用氧的过程中会产生0.1%~2%的活性氧,且随着机体的老化活性氧的生成会相应增多,所以细胞内的线粒体是活性氧自由基产生的主要场所之一,同时也是自由基攻击的主要靶标。

本研究组前期的工作证实了La、Ce和Nd可引起肝细胞核抗氧化水平的改变,所导致的SOD和CAT 2种酶活性的降低是造成肝细胞核氧化损伤的主要原因^[5]。细胞核中La、Ce和Nd的含量约为线粒体中含量的10~30倍^[4]。尽管线粒体中La、Ce和Nd的含量较低,但本研究的结果显示,线粒体抗氧化水平的改变却也十分明显,这进一步说明了线粒体是自由基攻击的主要靶标。不过,本研究同时发现,La、Ce和Nd引起的肝细胞线粒体抗氧化水平的改变与细胞核的不同:(1)La、Ce和Nd对肝细胞核SOD活性的影响主要是抑制作用^[5],而La、Ce和Nd对肝细胞线粒体SOD活性的影响既有抑制作用(La高剂量组、Nd中剂量组和Nd高剂量组)也有诱导作用(La中剂量组和Ce低剂量组);(2)La、Ce和Nd使肝细胞核GPx活性和GSH含量升高^[5],而除个别剂量组外,各La、Ce和Nd染毒组肝细胞线粒体的GPx活性和GSH含量均显著降低。La、Ce和Nd在细胞核和线粒体内的蓄积量的差异,可能是造成二者的氧化损伤结果不同的原因之一。蓄积量的不同可能影响了稀土元素对部分生物酶活性“低剂量促进、高剂量抑制”的变化规律的具体表现。稀土元素对肝细胞核线粒体氧化损伤的机制还需进一步深入研究。

通讯作者简介:黄沛力(1963—),女,理学硕士,教授,硕士生导师,研究方向为纳米毒理学与自由基的毒作用机制。主持或参加国家自然科学基金、“十一五”国家高技术研究发展计划(863计划)、北京市教育委员会科技发展计划支撑项目等多项研究工作,发表科研论文50余篇。

参考文献:

- [1] 卢然,倪嘉缙. 稀土对肝脏的作用机制[J]. 中国稀土学报, 2002, 20(3): 193-198
Lu R, Ni J Z. Mechanism of rare earth effect on liver [J]. Journal of the Chinese Rare Earth Society, 2002, 20(3): 193-198 (in Chinese)
- [2] 卢振伟,陈东,刘颖,等. 混合稀土对大鼠肝脏中7种酶的小剂量刺激作用[J]. 化学应用, 2003, 20(1): 6-9
Lu Z W, Chen D, Liu Y, et al. The hormesis effect of rare earth elements on several enzymes in rats liver [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2003, 20(1): 6-9 (in Chinese)
- [3] 夏青,陈东,刘玉荣,等. 混合稀土“常乐”对大鼠肝脏代谢的影响[J]. 毒理学杂志, 2006, 20(1): 61-62
- [4] 于秋红,刘裕婷,韩莹,等. 镧、铈、钕在小鼠肝细胞核和线粒体中的蓄积[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(3): 203-205
- [5] 田蜜,曹丽歌,谢广云,等. 镧、铈、钕对小鼠肝细胞核的氧化损伤作用[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(5): 546-550
Tian M, Cao L G, Xie G Y, et al. Oxidative damage induced by lanthanum, cerium and neodymium in liver nuclei of mice [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2011, 6(5): 546-550 (in Chinese)
- [6] Fernández-Vizarrá E, López-Pérez M J, Enriquez J A. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells [J]. Methods, 2002, 26(4): 292-297

