

牛黄酸与维生素C对慢性砷暴露小鼠肝组织DNA损伤的保护作用

刘爽, 朴丰源, 曲淑贤, 孙鲜策, 姚晓峰, 叶建新, 李秋娟

刘爽, 朴丰源, 曲淑贤, 孙鲜策, 姚晓峰, 叶建新, 李秋娟, 大连医科大学卫生学教研室 辽宁省大连市 116044
曲淑贤, 大连医科大学中心实验室 辽宁省大连市 116044
刘爽, 大连医科大学硕士研究生, 主要从事毒理学研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30571584; 30600488
辽宁省教育厅资助项目, No. 05L113
通讯作者: 朴丰源, 116044, 辽宁省大连市, 大连医科大学卫生学教研室. piaofy-dy@yahoo.com.cn
电话: 0411-86110330 传真: 0411-86110329
收稿日期: 2007-05-17 修回日期: 2007-11-10

Protective effects of taurine and vitamin C on liver DNA damage in mice chronically exposed to arsenic

Shuang Liu, Feng-Yuan Piao, Shu-Xian Qu, Xian-Ce Sun, Xiao-Feng Yao, Jian-Xin Ye, Qiu-Juan Li

Shuang Liu, Feng-Yuan Piao, Shu-Xian Qu, Xian-Ce Sun, Xiao-Feng Yao, Jian-Xin Ye, Qiu-Juan Li, Department of Hygiene, College of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Shu-Xian Qu, Central Laboratory, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30571584; 30600488. the Scientific Research Foundation of the Education Department in Liaoning Province, No. 05L113

Correspondence to: Feng-Yuan Piao, Department of Hygiene, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China. piaofy-dy@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-17 Revised: 2007-11-10

Abstract

AIM: To observe the protective effects of taurine and vitamin C on liver DNA damage in mice chronically exposed to arsenic (As).

METHODS: Forty mice were divided into 4 groups: As group (4 ppm As₂O₃), taurine protective group (4 ppm As₂O₃ + 150 mg/kg taurine), vitamin C protective group (4 ppm As₂O₃ + 45 mg/kg vitamin C), and normal saline group as controls. Liver tissues were obtained and HE staining was performed, 8-OH-dG expression was examined by immunohistochemistry.

RESULTS: Liver cells in mice in the As-treated groups showed swelling and ballooning degeneration. 8-OH-dG was strongly expressed in these groups compared with the control group ($P < 0.01$). The two protective groups showed mild damage with lower 8-OH-dG levels than the As group. The total optical density of 8-OH-dG immunohistochemical staining in the taurine protective group was lower than that in the vitamin C protective group (0.824 ± 0.1062 vs 246.7 ± 61.81 , $P = 0.012$).

CONCLUSION: Mouse livers showed severe tissue injuries and DNA oxidative damage after long-term As exposure. Taurine and vitamin C alleviated this damage significantly, with the taurine group showing better recovery than the vitamin C group.

Key Words: Arsenic; Liver; 8-hydroxy-2'-deoxyguanine; Taurine; Vitamin C; Immunohistochemistry

Liu S, Piao FY, Qu SX, Sun XC, Yao XF, Ye JX, Li QJ. Protective effects of taurine and vitamin C on liver DNA damage in mice chronically exposed to arsenic. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(34): 3567-3571

摘要

目的: 观察牛黄酸与维生素C对慢性砷暴露小鼠肝组织DNA损伤的保护作用。

方法: 将小鼠40只随机分为4组, 即: 染砷组(4 ppm As₂O₃)、牛黄酸保护组(4 ppm As₂O₃+150 mg/kg牛黄酸)、维生素C保护组(4 ppm As₂O₃+45 mg/kg维生素C)以及生理盐水对照组, 用HE染色法进行组织病理学观察, 用免疫组化及图像分析检测肝组织内8-OH-dG的水平。

结果: 染砷组小鼠肝组织出现胞质疏松化和气球样变等病理学改变, 牛黄酸和维生素C保护组肝组织上述病理学变化较轻。免疫组化结果表明, 染砷组肝组织呈现8-OH-dG的高表

背景资料
砷是一种常见的环境毒物, 全世界有超过200万人饮用砷超标的水(我国现行饮水卫生标准 <0.05 ppm)而造成各种疾病。因此, 其损伤机制和防治的研究十分重要。

应用要点
本文以8-羟基脱氧鸟嘌呤作为砷毒性导致DNA损伤的标志物,观察到氧化损伤是砷肝损伤的机制之一。牛黄酸和维生素C有较好的保护作用,为砷损害的防治提供了依据。

达($P < 0.01$)。两保护组小鼠肝组织8-OH-dG的表达显著低于染砷组($P < 0.01$),其中牛黄酸保护组小鼠肝组织8-OH-dG免疫染色总光密度值(0.824 ± 0.1062)显著低于维生素C保护组($246.7 \pm 61.81, P = 0.012$)。

结论:牛黄酸和维生素C对慢性砷暴露小鼠肝组织DNA损伤具有保护作用,其中牛黄酸的保护作用更明显。

关键词:三氧化二砷; 肝脏; 8-羟基脱氧鸟嘌呤; 牛黄酸; 维生素C; 免疫组化方法

刘爽, 朴丰源, 曲淑贤, 孙鲜策, 姚晓峰, 叶建新, 李秋娟. 牛黄酸与维生素C对慢性砷暴露小鼠肝组织DNA损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2007; 15(34): 3567-3571
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3567.asp>

0 引言

砷是一种常见的环境毒物和已知的人类致癌物。Lu *et al*^[1]对贵州燃煤型砷中毒患者的肝脏活检中发现,肝组织有明显退化、变性等病理变化。Santra *et al*^[2]对248例饮水型砷中毒患者调查发现,190例有肝脏肿大,91.3%显示有非硬化性汇管区纤维化的改变。但是,砷对肝脏的毒性作用机制尚不清楚。目前认为,过量砷暴露可使机体产生过量活性氧族(Reactive oxygen species, ROS),导致组织细胞的DNA损伤很可能是砷的毒作用机制之一。因此,通过拮抗剂对砷的毒性作用进行干预,使机体生物大分子免受损伤是预防砷的毒性作用的研究重点。本研究以小鼠为研究对象,以8-羟基脱氧鸟嘌呤(8-OH-dG)作为砷毒性导致DNA损伤标志物,以牛黄酸和维生素C作为拮抗剂,通过免疫组化方法,观察拮抗剂对砷暴露小鼠肝组织DNA损伤的保护作用,为砷毒性损伤肝脏的预防和治疗提供实验动物依据。

1 材料和方法

1.1 材料 As₂O₃(Sigma, 美国),牛黄酸(北京奥博星生物技术责任有限公司),抗8-OH-dG mAb(Fukuroi, 日本),UltrasensitiveTM S-P超敏试剂盒及DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),其他试剂均为分析纯。石蜡切片机(YD-1508B, 浙江省金华市益迪医疗设备厂)、万用光学显微镜(Olympus BX-51, 日本)、数码相机(Kodak DC290, 日本)、图像分析处理系统(Image-pro plus 4.5)。健康昆明种小鼠40

只,雌雄各半,体质量 20 ± 2 g,由大连医科大学实验动物中心提供。按体质量将小鼠随机分为4组:染毒组(4 ppm As₂O₃),牛黄酸保护组(4 ppm As₂O₃+150 mg/kg牛黄酸),维生素C保护组(4 ppm As₂O₃+45 mg/kg维生素C),生理盐水对照组。小鼠正常饮食,室温18-22℃,通过自然饮用含不同浓度As₂O₃蒸馏水的方式使小鼠暴露于砷。保护剂是以灌胃方式投给,每星期2次。每天换水,连续染毒60 d,断头处死小鼠后立即取肝组织固定。

1.2 方法

1.2.1 组织形态学观察:肝组织经40 g/L甲醛固定后,常规石蜡包埋,5 μm连续切片,在65℃温箱中烤片60 min,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下进行组织形态学观察。

1.2.2 免疫组织化学观察:按照S-P免疫组化染色法,将未经HE染色的切片常规二甲苯脱蜡后,在肝组织切片上滴1:300稀释的鼠抗人8-OH-dG mAb,在4℃条件下孵育过夜,然后按UltrasensitiveTM S-P超敏试剂盒的步骤进行,DAB显色,苏木素复染细胞核,自来水冲洗返蓝。常规脱水、透明,中性树胶封片。阅片时,先观察整张切片,再随机选择不同区域的五个高倍视野,显微镜下拍照,并应用图像分析软件对8-OH-dG表达的总光密度值进行定量的分析。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件,计量资料用mean±SD表示。用单因素方差分析(ANOVA)比较各实验组与对照组间的统计学差异,以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 肝组织病理学观察 光镜观察的结果显示,对照组小鼠肝组织病理变化未见异常,而染砷组小鼠肝组织出现不同程度的肝细胞变性,可见肝细胞明显肿大,胞质疏松呈网状、半透明,肝细胞索排列紊乱、拥挤,肝窦受压变窄,偶见细胞核固缩等病理学改变。牛黄酸和维生素C保护组小鼠肝细胞肿胀较轻,未见核固缩(图1)。

2.2 小鼠肝组织抗8-OH-dG免疫组化的观察结果 对照组小鼠肝组织细胞中几乎无8-OH-dG的表达,染砷组细胞核内出现较多的棕褐色抗8-OH-dG阳性颗粒,表明8-OH-dG呈现明显的高表达(图2)。而两保护组小鼠肝组织8-OH-dG的表达较少。各组小鼠肝细胞抗8-OH-dG免疫组化染色总光密度检测结果如表1所示。染砷组抗8-OH-dG免疫组化染色总光密度值明显高于对照组,

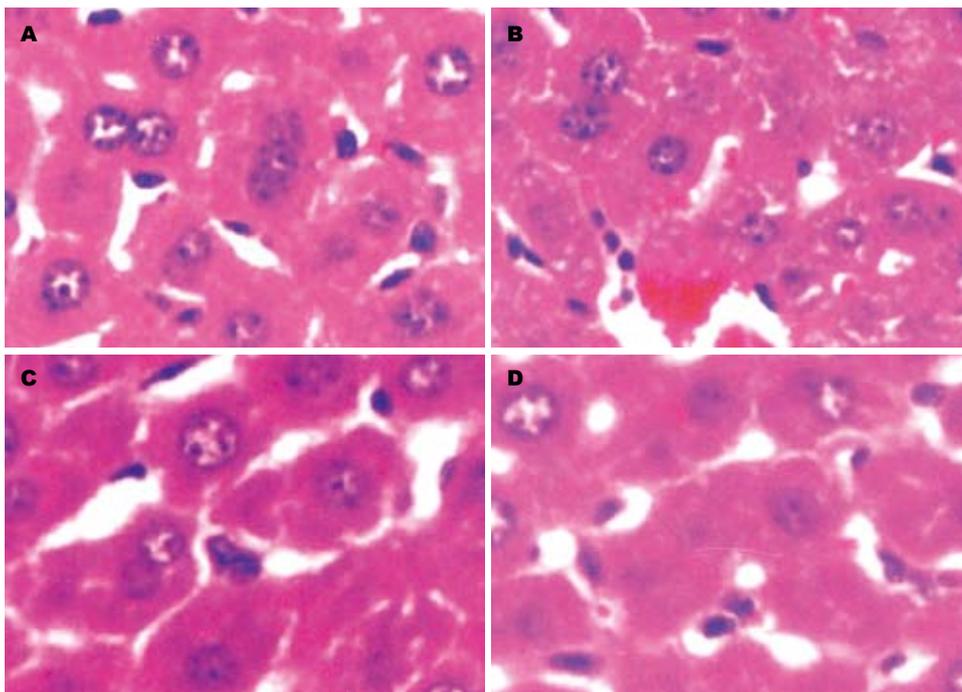


图 1 小鼠肝组织病理(HE × 400). A: 对照组; B: 染砷组; C: 牛黄酸保护组; D: 维生素C保护组.

同行评价
 本文选题新颖, 设计基本合理, 统计方法正确, 有一定创新. 获得的结果对砷暴露肝损伤的防治提供了一定的理论和实践价值的参考资料, 但文章撰写的严谨性和逻辑性方面稍有欠缺.

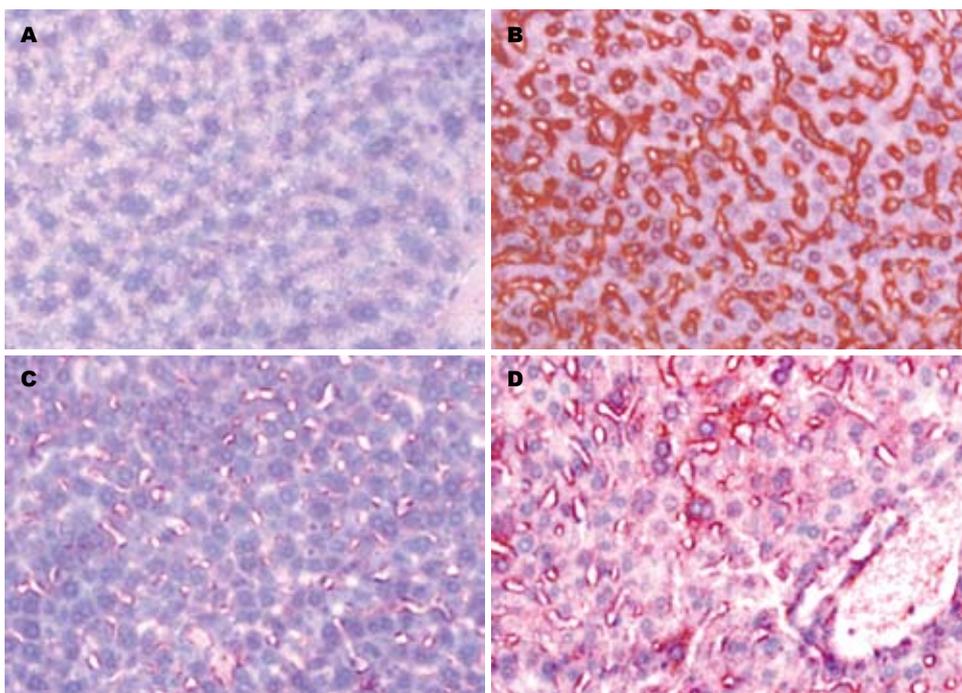


图 2 小鼠肝组织8-OH-dG免疫组化染色(× 200). A: 对照组; B: 染砷组; C: 牛黄酸保护组; D: 维生素C保护组.

具有显著性差异($P < 0.01$), 而牛黄酸及维生素C保护组的总光密度值明显低于染砷组($P < 0.01$). 其中牛黄酸的保护效果明显好于维生素C ($P = 0.012$).

3 讨论

慢性砷暴露可造成机体多器官损伤, 而肝脏是

砷毒性作用的靶器官之一^[3-6]. Guha Mazumder发现, 长期摄入高砷水可引起氧化性损伤, 导致小鼠肝脏脂肪浸润和纤维化^[7]. Gupta也报道了小鼠腹膜内砷暴露可引起氧化性指标的升高并伴随多种抗氧化酶水平的降低^[8]. 但关于慢性低剂量砷暴露与小鼠肝脏DNA氧化损伤之间的关系还未见报道.

表 1 8-OH-dG在各组小鼠肝组织中免疫组化染色的总光密度值($n = 10$, mean \pm SD)

分组	总光密度值
对照组	0.275 \pm 0.022
染砷组	1995 \pm 467.2 ^b
牛黄酸保护组	0.824 \pm 0.1062 ^d
维生素C保护组	246.7 \pm 61.81 ^{bdf}

^b $P < 0.01$ vs 对照组, ^d $P < 0.01$ vs 染砷组, ^f $P < 0.01$ vs 牛黄酸保护组。

动物细胞在应激条件下可以产生ROS。当其生成作用大于机体的清除作用时, ROS升高并造成细胞的膜脂质、蛋白质和DNA的氧化损伤^[9-10]。由于DNA的抗氧化能力不如膜脂质和蛋白质, DNA氧化产物的测定对于体内氧化损伤程度的估计是比较敏感的^[11]。DNA中的脱氧鸟嘌呤最容易被ROS氧化而生成8-OH-dG, 因此8-OH-dG可作为由ROS诱导的DNA损伤的特异性标记物。本实验发现慢性砷暴露小鼠肝组织8-OH-dG的水平增高, 提示砷可通过ROS引起肝组织DNA损伤。而8-OH-dG主要集中在细胞核内, 细胞质内染色很少, 这是因为dG主要在细胞核内表达。

病理学观察可见染砷组小鼠肝组织出现细胞变性, 胞质疏松化和气球样变及核固缩等病理学改变。使用牛黄酸和维生素C保护组小鼠肝组织的病理变化相对较少, 肝细胞水肿程度较轻、范围较小, 未见核固缩。结果显示, 染砷组8-OH-dG表达较强, 病理损伤也较重, 提示砷可能通过氧化性损伤造成肝脏的病理损害。

由于我们之前的研究已表明氧化应激参与砷的神经毒性作用^[12], 因此抑制或改善氧化应激是一种合理的干预途径。近期有报道将维生素C加入透析用水可明显降低血液透析患者体内OX-LDL水平, 改善氧化应激状态^[13]。我们用灌胃的方式给小鼠补充维生素C, 观察到小鼠肝细胞8-OH-dG表达较砷暴露组少, 说明维生素C能增强染砷小鼠的抗氧化能力。维生素C减轻氧化应激的机制可能为, 维生素C作为自由基的清除剂, 可能与超氧阴离子(O²⁻)、过氧化氢(H₂O₂)和羟自由基(OH[·])反应, 保护机体免受内源性氧自由基的损伤。在本实验中, 牛黄酸较维生素C对肝组织的保护作用强,

8-OH-dG的表达也显著降低。牛黄酸是一种含硫的 β 氨基酸, 有多种生物效应, 如降低小鼠脑组织中脂褐质的含量, 清除脂质过氧化物代谢产物丙二醛(MDA), 提高超氧化物歧化酶(SOD)的活性等^[14]。可能SOD通过清除氧自由基起到对DNA的保护作用。此外, 在胆汁的合成过程中, 牛黄酸的巯基也可能与组织中的砷发生螯合作用, 促进砷硫化物在肝脏中的排泄^[15]。

总之, 使用牛黄酸和维生素C可以缓解砷介导的机体氧化性肝损伤, 并且进一步证实了ROS在肝脏砷毒性中的作用。所以及早投放保护剂可以减轻或预防慢性低剂量砷暴露所致的机体损伤。

4 参考文献

- Lu T, Liu J, LeCluyse EL, Zhou YS, Cheng ML, Waalkes MP. Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci* 2001; 59: 185-192
- Santra A, Das Gupta J, De BK, Roy B, Guha Mazumder DN. Hepatic manifestations in chronic arsenic toxicity. *Indian J Gastroenterol* 1999; 18: 152-155
- Centeno JA, Mullick FG, Martinez L, Page NP, Gibb H, Longfellow D, Thompson C, Ladich ER. Pathology related to chronic arsenic exposure. *Environ Health Perspect* 2002; 110 Suppl 5: 883-886
- 刘爽, 朴丰源, 姚晓峰, 曲淑贤, 李秋娟, 孙鲜策, 叶建新. 慢性砷暴露对小鼠肾组织DNA损伤及牛黄酸和维生素C的保护作用. *毒理学杂志* 2007; 21: 248-250
- Waalkes MP, Ward JM, Diwan BA. Induction of tumors of the liver, lung, ovary and adrenal in adult mice after brief maternal gestational exposure to inorganic arsenic: promotional effects of postnatal phorbol ester exposure on hepatic and pulmonary, but not dermal cancers. *Carcinogenesis* 2004; 25: 133-141
- 许玲, 张信江, 刘杰, 程明亮, 周运书, 杜辉. 燃煤型砷中毒患者死因的调查. *中国地方病学杂志* 2002; 21: 484-486
- Mazumder DN. Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206: 169-175
- Gupta R, Dubey DK, Kannan GM, Flora SJ. Concomitant administration of Moringa oleifera seed powder in the remediation of arsenic-induced oxidative stress in mouse. *Cell Biol Int* 2007; 31: 44-56
- Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 1998; 30: 225-243
- Farinati F, Cardin R, Bortolami M, Guido M, Rugge M. Oxidative damage, pro-inflammatory cytokines, TGF- α and c-myc in chronic HCV-related hepatitis and cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2065-2069
- Akagi S, Nagake Y, Kasahara J, Sarai A, Kihara

T, Morimoto H, Yano A, Nakao K, Nanba K, Ichikawa H, Makino H. Significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in patients with chronic renal failure. *Nephrology (Carlton)* 2003; 8: 192-195

12 Piao F, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S, Cheng F, Zhong L, Yamauchi T, Kawanishi S, Yokoyama K. Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels. *J Occup Health* 2005; 47: 445-449

13 Shi XF, Ding F, Zhu QY, Xue J, Lu FM, Gu Y, Lin ST. Use of ascorbate-rich dialysate to attenuate oxidative stress in maintenance hemodialysis patients. *Ren Fail* 2005; 27: 213-219

14 周白云, 刘春蕾. 抗氧化剂对博莱霉素拮抗作用的研究. *泰山医学院学报* 2006; 27: 17-19

15 Quig D. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern Med Rev* 1998; 3: 262-270

编辑 程剑侠 电编 马文华

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WCJD 和 WJG 2008 年对同行评议及作者贡献分布 将开始实行公开策略

本刊讯 世界华人消化杂志(WCJD)和World Journal of Gastroenterology (WJG)为了确保刊出文章的质量,即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略,将同行评议者姓名,职称,机构的名称与文章一同在脚注出版.如:同行评议者:房静远教授,上海交通大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所;韩新巍教授,郑州大学第一附属医院放射科;匡安仁教授,四川大学华西医院核医学科.

WCJD和WJG即将开始实行在每篇文章的脚注内注明每个作者对文章的贡献率,如:作者贡献分布:陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献均等;此课题由陈湘川,庞丽娟,陈玲,杨兰,张金芳,齐妍及李洪安设计;研究过程由陈玲,杨兰,张金芳,蒋金芳,杨磊,李锋及曹秀峰操作完成;研究用新试剂及分析工具由曹秀峰提供;数据分析由陈湘川,杨兰及庞丽娟完成;本论文写作由陈湘川,庞丽娟及李洪安完成.

WCJD和WJG即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接,包括首次提交的稿件,同行评议人报告,作者给审稿人回信和作者修回稿,以PDF格式上传.读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足;作者也可以随时修改完善自己发表的论文.使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.(总编辑:马连生 2007-11-15)