

牛磺酸和环孢素 A 对氯化锰致大鼠肝脏 线粒体氧化损伤作用的影响

王建军, 贾克

[摘要] 目的: 观察牛磺酸(taurine, Tau)和环孢素 A(cyclosporine A, CSA)对锰(Mn)致大鼠肝脏线粒体氧化损伤作用的影响, 并探讨 Mn 致肝脏毒性的细胞分子学机制。方法: 24 只雄性 SD 大鼠按体重随机均分为 4 组。第 1 组为对照组, 皮下注射生理盐水; 第 2 组为单纯染 Mn(MnCl₂)组, 皮下注射生理盐水; 第 3、4 组为预处理(Tau + MnCl₂ 组和 CSA + MnCl₂ 组), 分别皮下注射 Tau(100 mg/kg)和 CSA(1 mg/kg)。皮下注射 2 h 后, 第 1 组腹腔注射生理盐水, 第 2~4 组腹腔注射 MnCl₂ 溶液(32 mg/kg), 染 Mn 30 天, Tau 和 CSA 隔日注射 1 次, 共干预 15 次。最后 1 次染 Mn 后 24 h, 切取肝组织。测定肝线粒体膜肿胀度、膜电位、PT 孔和 SDH 活性、细胞色素 C 含量以及 GSH-PX 活性、OH·含量。结果: 大鼠单纯染 Mn 30 天后, 与对照组比较线粒体膜肿胀度光密度降低($P < 0.05$), PT 孔、线粒体膜电位光密度降低, GSH-PX 和 SDH 活性降低, 细胞色素 C 和 OH·含量升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$); Tau + MnCl₂ 组与 MnCl₂ 组相比, 线粒体膜肿胀度光密度、PT 孔、线粒体膜电位光密度升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$), GSH-PX 和 SDH 活性升高, 细胞色素 C 和 OH·含量降低($P < 0.01$); CSA + MnCl₂ 组与 MnCl₂ 组相比, PT 孔、线粒体膜电位光密度升高, GSH-PX 和 SDH 活性升高, 细胞色素 C 含量降低($P < 0.01$)。结论: Tau 和 CSA 对 Mn 引起的肝脏线粒体氧化损伤有不同程度的拮抗作用。

[关键词] 锰; 牛磺酸; 环孢素 A; 线粒体; 氧化应激; 大鼠

[中国图书资料分类号] R 595.2 **[文献标识码]** A

Effect of taurine and cyclosporine A on oxidative damage of liver mitochondrial induced by manganese chloride in rats

WANG Jian-jun, JIA Ke

(Department of Hygiene, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of different doses of manganese(Mn) on oxidative damage of liver mitochondrial induced by Mn chloride, and to explore the cell molecular mechanism of Mn-induced exotoxicity. **Methods:** Twenty four male SD rats were randomly divided into four groups by weight. The first group(control group) were given subcutaneous injection of physiological saline only; the second group(Mn-exposed group) were injected 32 mg/kg of MnCl₂ subcutaneously; the third and fourth groups were intraperitoneally injected 100 mg/kg of taurine(Tau) and 1 mg/kg of cyclosporine A(CSA), respectively. Two hours after subcutaneous injection, the first group were intraperitoneally injected physiological saline, and the other three groups received intraperitoneal injection of 32 mg/kg of MnCl₂ for 30 days, and Tau and CSA were injected every other day for 15 times. At the 24th hour after the last administration of MnCl₂, the rats were killed and the liver was taken to detect the mitochondrial swelling amplitude, mitochondrial membrane potential(MMP), permeability transition pore(PT pore), the activity of GSH-PX, SDH and the content of cytochrome C and OH·. **Results:** Compared with control group, the mitochondrial swelling amplitude, PT pore, MMP, the activity of GSH-PX and SDH decreased in the MnCl₂ group, while the content of cytochrome C and OH· increased($P < 0.05$ to $P < 0.01$). Compared with MnCl₂ group, the mitochondrial swelling amplitude, PT pore and MMP increased in Tau pretreatment group($P < 0.05$ to $P < 0.01$), while the activity of GSH-PX and SDH increased, and the content of cytochrome C and OH· decreased($P < 0.01$). Compared with control group, the activity of GSH-PX and SDH, PT pore and MMP increased in CSA pretreatment group, while the content of cytochrome C decreased($P < 0.01$). **Conclusions:** Tau and CSA have some antagonistic effects on oxidative damage of liver mitochondrial induced by manganese.

[Key words] manganese; taurine; cyclosporine A; mitochondrial; oxidative stress; rats

锰(Mn)是一种重要的环境污染物,长期过量接触可引起中毒,主要表现为神经系统损伤。Jayakumar 等^[1]报道, Mn 可通过引起肝脏损伤诱发

肝性脑病导致星型胶质细胞损伤。有报道^[2]显示, Mn 可通过引起线粒体功能障碍导致肝脏损伤,但其引起肝脏毒性的机制尚未完全阐明。牛磺酸(taurine, Tau)是内源性抗氧化剂,广泛分布在动物组织细胞内,具有保护细胞膜、抗氧化应激和免疫调节等广泛生物学效应^[3-4]。环孢素 A(cyclosporine A, CSA)具有特异性抑制线粒体可通透性转移孔道(mitochondrial permeability transition pore, PT 孔)开

[收稿日期] 2010-05-10

[基金项目] 蚌埠医学院科研资助项目(BY0834)

[作者单位] 蚌埠医学院 卫生学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 王建军(1984-),男,助教。

放的功能^[5]。本实验通过观察 Tau 和 CSA 对 Mn 引起的肝脏线粒体氧化损伤作用的影响,旨在为深入探讨 Mn 致肝脏毒性机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及染毒 由浙江省实验动物中心饲养的清洁级实验用雄性 SD 大鼠(实验动物许可证号:SCXK 浙 2008-0033) 24 只,体重(160 ± 10) g。正式实验前饲养 7 天,然后按体重完全随机分为 4 组,每组 6 只。第 1 组为对照组,皮下注射生理盐水;第 2 组为单纯染 Mn(MnCl₂)组,皮下注射生理盐水;第 3、4 组为预处理干预(Tau + MnCl₂ 和 CSA + MnCl₂)组,分别皮下注射 Tau(100 mg/kg)和 CSA(1 mg/kg)。皮下注射 2 h 后,第 1 组腹腔注射生理盐水,第 2~4 组腹腔注射 MnCl₂ 溶液(32 mg/kg),染 Mn 30 天,Tau 和 CSA 隔日注射 1 次,共预处理 15 次。

1.2 样品的采集与处理 最后 1 次染 Mn 后 24 h,将大鼠麻醉,切取 0.3~0.4 g 肝组织。加入 3.5 ml 线粒体匀浆液,玻璃匀浆器匀浆 2 min,差速离心分离线粒体悬液^[6],Lowry 法^[7]测定线粒体蛋白含量,调蛋白浓度至 1 mg/ml。

1.3 测定指标与方法 SDH 活性依据吩嗪二甲酯硫酸盐存在情况下二氯酚靛酚被还原时对波长 600 nm 吸光度降低的测定^[8]。线粒体 PT 孔测量依据 540 nm 线粒体肿胀程度光密度转变^[9]。线粒体膜电位依据罗丹明 123 荧光强度改变进行测定^[10]。细胞色素 C 依据在 415 nm 处具有最大特征吸收峰测定^[11]。通过 520 nm 线粒体渗透性转换测定线粒体膜肿胀度^[12]。SOD 活性(黄嘌呤氧化酶法)、GSH-PX(DTNB 比色法)、羟自由基(OH·)(Fenton 反应)试剂盒由南京凯基生物工程研究所提供,按照说明书要求进行操作。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 Tau 和 CSA 对 Mn 致大鼠肝线粒体膜损伤的影响 单纯染 Mn 30 天后,与对照组比较线粒体膜肿胀度光密度、PT 孔和线粒体膜电位光密度均降低($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。与 MnCl₂ 组相比,Tau + MnCl₂ 组 PT 孔、线粒体膜肿胀度、线粒体膜电位光密度均升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$);CSA + MnCl₂ 组 PT 孔、线粒体膜电位光密度均明显升高($P < 0.01$),线粒体膜肿胀度光密度无明显变化($P > 0.05$)(见表 1)。

2.2 Tau 和 CSA 对 Mn 致大鼠肝线粒体呼吸链的影响 与对照组比较,MnCl₂ 组纹状体 SDH 活性降

低,细胞色素 C 含量升高($P < 0.01$);与 MnCl₂ 组相比,Tau + MnCl₂ 和 CSA + MnCl₂ 组 SDH 活性升高,细胞色素 C 含量降低($P < 0.01$);与对照组比较,Tau + MnCl₂ 组 SDH 活性降低($P < 0.01$)(见表 2)。

表 1 4 组实验大鼠肝线粒体膜损伤的比较($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	PT 孔	线粒体膜肿胀度	线粒体膜电位
对照组	0.213 ± 0.029	0.204 ± 0.036	22.59 ± 4.68
MnCl ₂	0.112 ± 0.020 **	0.151 ± 0.027 *	11.41 ± 1.65 **
Tau + MnCl ₂	0.160 ± 0.017 * Δ	0.198 ± 0.030 Δ	17.33 ± 2.30 * Δ Δ
CSA + MnCl ₂	0.187 ± 0.045 Δ Δ	0.169 ± 0.018	20.12 ± 2.92 Δ Δ
<i>F</i>	12.57	4.58	14.44
<i>P</i>	< 0.01	< 0.05	< 0.01
<i>MS</i> 组内	0.001	0.001	9.610

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 MnCl₂ 组比较 Δ $P < 0.05$, Δ Δ $P < 0.01$;线粒体膜电位为 10 μg 的光密度变化值,线粒体膜肿胀度为 300 μg 的光密度测定值,PT 孔为 200 μg 的光密度测定值

表 2 4 组实验大鼠肝线粒体纹状体 SDH 活性和细胞色素变化的比较($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	SDH(U/mg pro)	细胞色素 C(mmol/g pro)
对照组	43.71 ± 4.16	2.36 ± 0.09
MnCl ₂	19.58 ± 2.61 **	3.44 ± 0.79 **
Tau + MnCl ₂	31.75 ± 3.53 * Δ Δ	2.57 ± 0.35 Δ Δ
CSA + MnCl ₂	38.34 ± 6.03 * Δ Δ	2.53 ± 0.15 Δ Δ
<i>F</i>	35.58	7.27
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01
<i>MS</i> 组内	18.235	0.194

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 MnCl₂ 组比较 Δ $P < 0.01$;与 Tau + MnCl₂ 组比较 # $P < 0.05$

2.3 Tau 和 CSA 对 Mn 致大鼠肝线粒体氧化应激功能影响 与对照组比较,MnCl₂ 组纹状体 GSH-PX 活性降低,OH·含量升高($P < 0.01$);Tau + MnCl₂ 和 CSA + MnCl₂ 组 GSH-PX 活性均降低($P < 0.01$),CSA + MnCl₂ 组 OH·含量升高($P < 0.01$);与 MnCl₂ 组相比,Tau + MnCl₂ 组 GSH-PX 活性升高,OH·含量降低($P < 0.01$),CSA + MnCl₂ 组 GSH-PX 活性升高($P < 0.01$)(见表 3)。

3 讨论

近年来有研究证明,免疫抑制剂量以下的小剂量 CSA 能减轻一些理化因素及外科手术因素造成的肝细胞损伤,包括缺血再灌注后线粒体损伤。特异性抑制 PT 孔的开放、减轻 MPT 作用引起的细胞损伤可能是 CSA 发挥细胞保护性作用的重要机制。Tau 作为自由基清除剂在体内可能具有非常重要的生理意义,其作用远大于其他含硫氨基酸如还原型谷胱甘肽(GSH)、金属硫蛋白等;Tau 是机体重要的细胞保护物质,Tau 能抑制神经递质,维持神经

表 3 4 组实验大鼠肝线粒体纹状体 GSH-PX 活性与 OH· 变化的比较 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	OH· (U/mg pro)	GSH-PX(U)
对照组	170.36 ± 24.15	224.24 ± 15.01
MnCl ₂	262.42 ± 25.41**	107.94 ± 18.04**
Tau + MnCl ₂	181.58 ± 20.57 $\Delta\Delta$	147.10 ± 13.76 $\Delta\Delta$ *
CSA + MnCl ₂	231.18 ± 29.23 $\Delta\Delta$ *	187.93 ± 17.70 $\Delta\Delta$ *
F	17.77	57.71
P	<0.01	<0.01
MS _{组内}	626.62	263.342

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 MnCl₂ 组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$;与 Tau + MnCl₂ 组比较 # $P < 0.05$

细胞膜的稳定性^[13]。目前临床上已将其用于治疗充血性心力衰竭、癫痫等疾病,用于治疗急慢性肝炎也被证明很有价值。Tau 可抑制细胞内钙离子超载升高,起到保护细胞的作用。细胞色素 C 被认为是细胞凋亡的重要启动促进剂,激发 caspases 的活化,引起细胞凋亡。Tau 参与膜主要成分磷脂代谢,保护膜磷脂免受降解,具有直接膜稳定作用,并调节膜对离子通透性^[14]。作为一种安全可靠的细胞保护剂和抗氧化剂,在与自由基损伤有关疾病的防治上可能具有广阔的应用前景。Centonze 等^[15]报道, Mn 通过过度激活皮质-纹状体通路神经元,引起兴奋性传递,导致纹状体神经元的兴奋性毒性。

本研究结果显示, Tau 和 CSA 对 Mn 致大鼠肝线粒体膜损伤有保护作用,大鼠单纯染 Mn 30 天后,与对照组比较线粒体膜肿胀度光密度降低,PT 孔、线粒体膜电位光密度明显降低, Tau + MnCl₂ 组 PT 孔、线粒体膜肿胀度、线粒体膜电位光密度升高, CSA + MnCl₂ 组 PT 孔、线粒体膜电位光密度明显升高,线粒体膜肿胀度光密度无明显变化。Tau 和 CSA 对 Mn 致大鼠肝线粒体呼吸链的影响可知, MnCl₂ 组纹状体 SDH 活性降低,细胞色素 C 含量升高; Tau 和 CSA 对 Mn 致大鼠肝线粒体氧化应激功能影响可知, MnCl₂ 组纹状体 GSH-PX 活性降低, OH· 含量升高。证实 Tau 能减轻 Mn 对线粒体的损伤,从而保护线粒体结构和功能的相对稳定;特异性抑制 PT 孔的开放、减轻 MPT 作用引起的细胞损伤可能是 CSA 发挥细胞保护性作用的重要机制;

CSA 可能是通过特异性地与 Cyclophilin D 结合抑制 PT 孔的开放,是目前发现的 PT 孔开放的最强有力的抑制剂^[14]。

[参 考 文 献]

- Jayakumar AR, Rama Rao KV, Kalaiselvi P, et al. Combined effects of ammonia and manganese on astrocytes in culture[J]. Neurochem Res, 2004, 29(11): 2051-2056.
- Zhang S, Zhou Z, Fu J. Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats[J]. Environ Res, 2003, 93(2): 149-157.
- 周玉宽. Tau 膜稳定作用的实验研究[J]. 中国药理学通报, 1997, 13(3): 277.
- 喻道军, 徐兆发, 王雨, 等. α -硫辛酸和 Tau 对急性镉氧化损伤影响的实验研究[J]. 中国工业医学杂志, 2005, 18(4): 199-201.
- Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A[J]. J Biol Chem, 2002, 277(38): 34793-34799.
- Clark JB. The metabolism of rat brain mitochondria[J]. J Biol Chem, 1970, 245(18): 4724-4731.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265-275.
- 钱涛, 高维娟, 丛斌, 等. 益肾降浊汤对小鼠脑缺血再灌注后线粒体功能的改善作用[J]. 山东医药, 2005, 45(10): 16-18.
- Kristal BS, Brown AM. Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition[J]. J Biol Chem, 1999, 274(33): 23169-23175.
- Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver-mitochondrial spectral and metabolic properties[J]. Biochim Biophys Acta, 1986, 850(3): 436-448.
- 陈月开, 黄登宇, 强玉丰, 等. 细胞色素 C 的快速测定研究[J]. 山西大学学报, 2003, 26(1): 64-66.
- 沈立, 沈伏, 薛雅静, 等. 杏花雨对外源性高钙致大鼠脑线粒体损伤的保护作用[J]. 河北医药, 2006(4): 249-251.
- 葛健, 项行, 徐建敏, 等. 不同浓度牛磺酸对兔角膜内皮细胞的影响[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2009, 29(7): 825-827.
- 秦建伟, 别平, 朱瑾. 环孢素 A 对大鼠肝脏缺血再灌注后线粒体细胞色素 C 释放及肝细胞凋亡的影响[J]. 消化外科, 2005, 4(6): 416-420.
- Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, et al. Impaired excitatory transmission in the striatum of rats chronically intoxicated with manganese[J]. Exp Neurol, 2001, 172(2): 469-476.
- 其临床病理意义[J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35(7): 512-523.
- Padera TP, Kadambi A, Tomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intra tumor lymphatics[J]. Science, 2008, 296: 1883-1886.
- 雷平光, 罗彦丽, 于东红, 等. 胃癌幽门螺杆菌 L 型感染与血管内皮生长因子表达及血管形成的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31(2): 126-127.

(上接第 1216 页)

- Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours[J]. Histopathology, 2005, 46(4): 396-402.
- 张梅娟, 张丽华. 免疫标记物 D2-40 在病理诊断中应用和意义[J]. 诊断学理论与实践, 2007, 6(3): 277-280.
- 孙微, 周晓军, 马恒辉, 等. 胃腺癌组织中微淋巴管密度的检测及