

锰对大鼠肝脏线粒体氧化损伤的作用机制

申玲, 贾克

[摘要]目的:观察不同剂量的锰对大鼠肝脏线粒体的氧化损伤作用,探讨其相关机制。方法:将 24 只雄性 SD 大鼠随机均分为对照组和 MnCl₂ 低、中、高剂量组,分别腹腔注射生理盐水和 2、8、32 g/kg MnCl₂ 溶液,每天 1 次,连续 30 d 后取大鼠肝组织测定线粒体 PT 孔、线粒体膜肿胀度、线粒体膜电位、琥珀酸脱氢酶(SDH)、细胞色素 C、羟自由基(OH·)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)。结果:各间肝线粒体 PT 孔差异均有统计学意义($P < 0.01$);MnCl₂ 高剂量组线粒体膜肿胀度小于对照组和 MnCl₂ 低剂量组($P < 0.05$);MnCl₂ 高剂量组线粒体膜电位光密度均低于其他 3 组($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。与对照组和 MnCl₂ 低剂量组相比,MnCl₂ 中、高剂量组肝线粒体 SDH 均下降($P < 0.01$),且 MnCl₂ 中、高剂量组间差异亦有统计学意义($P < 0.05$);与对照组和 MnCl₂ 低剂量组相比,MnCl₂ 高剂量组肝线粒体细胞色素 C 上升($P < 0.05$)。MnCl₂ 高剂量组肝线粒体 OH· 显著高于其他 3 组($P < 0.01$);与对照组比较,MnCl₂ 低、中、高剂量组大鼠肝线粒体 GSH-PX 显著降低($P < 0.05$)。结论:锰可导致线粒体氧化损伤,引起大鼠肝线粒体 PT 孔开放、膜电位下降,SDH、GSH-PX 降低,细胞色素 C、OH· 显著升高,对机体产生毒性作用。

[关键词] 锰; 肝脏线粒体; 氧化损伤; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 595.2

[文献标识码] A

The mechanism of manganese induced oxidative damage on rat liver mitochondria

SHEN Ling, JIA Ke

(Department of Preventive Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the oxidative damage of rat liver mitochondria induced by different doses of manganese and explore the related mechanism. **Methods:** Twenty four male SD rats were divided into 4 groups, 6 rats in each group, including control group, low dose group, medium dose group and high dose group. The rats in control group were injected normal saline intraperitoneally and the rats in low dose, medium and high dose groups were injected 2 g · kg⁻¹ · d⁻¹, 8 g · kg⁻¹ · d⁻¹ and 32 g · kg⁻¹ · d⁻¹ MnCl₂ intraperitoneally respectively for 30 days. The rat liver tissue was extracted and mitochondria suspension was obtained by differential centrifugation separation to measure mitochondrial PT pore, the degree of mitochondrial swelling, the mitochondrial membrane potential and the content of succinate dehydrogenase (SDH), cytochrome C, hydroxyl radical OH· and glutathione peroxidase (GSH-PX). **Results:** The mitochondrial PT pore in the four groups was different and the differences had statistical significances ($P < 0.01$); the mitochondrial swelling degree in high dose group was lower than that in control and low dose group ($P < 0.05$); the mitochondrial membrane potential in high dose group was decreased compared with that of other groups ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); the content of SDH in medium and high dose group was decreased compared with that in control and low dose group ($P < 0.01$) and the difference of SDH between medium and high dose group had statistical significance ($P < 0.01$); the cytochrome C content in high dose group was higher than that in control and low dose group ($P < 0.05$); the content of hydroxyl radical OH· in high dose group was increased compared with that in other three groups ($P < 0.01$); in the same time, the content of GSH-PX in low, medium and high groups decreased compared with that in control group ($P < 0.05$). **Conclusions:** Manganese can induce mitochondrial oxidative damage. Manganese has the toxic effects on rat mitochondria and the toxic effects induce rat liver mitochondrial PT pore opening, decreasing the optical density of membrane potential and the content of SDH and GSH-PX, increasing the content of cytochrome C and hydroxyl radical OH· significantly.

[Key words] manganese; liver mitochondria; oxidative damage; rats

锰是一种职业危害因素和环境污染物质。近年来,随着锰的大量使用,其对人类健康的危害不容忽视。肝脏是锰的主要蓄积器官,同时也是锰发挥毒

作用的主要靶器官。有研究^[1]表明,锰可以通过引起线粒体氧化损伤导致肝脏损伤,为进一步探讨锰对肝脏毒作用机制,本实验研究染锰对大鼠肝线粒体膜结构和功能影响、肝线粒体呼吸链和氧化应激功能影响,进一步阐明锰对肝脏的损害机制。

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伺

[收稿日期] 2011-04-20

[基金项目] 蚌埠医学院自然科学研究资助项目(BY0834)

[作者单位] 蚌埠医学院预防医学系,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 申玲(1973-),女,实验师。

[通讯作者] 贾克,硕士,讲师。E-mail: jake981005@126.com

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 d, 然后按体重完全随机分为 4 组, 每组 6 只。对照组, 腹腔注射生理盐水; MnCl₂ 低、中、高剂量组, 分别腹腔注射 2、8、32 g/kg MnCl₂ 溶液, 每天染毒 1 次。连续 30 d。

1.2 样品的采集与处理 最后 1 次染毒 24 h 后, 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^[2]。Lowry 法测定线粒体蛋白含量^[3], 调整蛋白浓度至 1 mg/ml。

1.3 测定指标与方法 琥珀酸脱氢酶(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^[4]。线粒体 PT 孔测量依据 540 nm 线粒体肿胀程度光密度转变^[5]。线粒体膜电位依据罗丹明 123 荧光强度改变进行测定^[6]。细胞色素 C 测定依据在 415 nm 处具有最大特征吸收峰测定其含量^[7]。通过 520 nm 线粒体渗透性转换测定线粒体膜肿胀度^[8]。超氧化物歧化酶(SOD) 活性(黄嘌呤氧化酶法), 谷胱甘肽过氧化物酶(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, 按照试剂盒的要求进行操作。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 锰对大鼠肝线粒体膜结构和功能影响 染锰各组间肝线粒体 PT 孔较对照组明显降低, 且高、中剂量组较低剂量组降低($P < 0.01$); MnCl₂ 高剂量组线粒体膜肿胀度小于对照组和 MnCl₂ 低剂量组($P < 0.05$); MnCl₂ 高剂量组线粒体膜电位均低于其他 3 组($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 1)。

2.2 锰对大鼠肝线粒体呼吸链的影响 与对照组和 MnCl₂ 低剂量组相比, MnCl₂ 中、高剂量组肝线粒体 SDH 均下降, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 且中、高剂量组间差异亦有统计学意义($P < 0.01$); 与对照组和 MnCl₂ 低剂量组相比, MnCl₂ 高剂量组肝线粒体细胞色素 C 上升差异有统计学意义($P < 0.05$) (见表 2)。

2.3 锰对大鼠肝线粒体氧化应激功能影响 染毒 30 d 后, MnCl₂ 高剂量组肝线粒体 OH· 显著高于其他 3 组($P < 0.01$); 与对照组比较, MnCl₂ 低、中、高剂量组大鼠肝线粒体 GSH-PX 依次降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$) (见表 3)。

表 1 各组大鼠肝线粒体膜结构和功能变化比较 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

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 低剂量组	0.185 ± 0.031**	0.197 ± 0.030	20.15 ± 5.03
MnCl ₂ 中剂量组	0.136 ± 0.024***	0.172 ± 0.027	17.88 ± 3.99
MnCl ₂ 高剂量组	0.112 ± 0.020***	0.151 ± 0.027* #	11.41 ± 1.65***△
<i>F</i>	18.16	3.87	8.40
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01
<i>MS</i> 组内	0.001	0.001	16.462

q 检验: 与对照组比较** $P < 0.01$; 与 MnCl₂ 低剂量组比较# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 MnCl₂ 中剂量组比较△ $P < 0.05$

表 2 各组大鼠肝线粒体 SDH 和细胞色素 C 变化 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

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 低剂量组	41.80 ± 3.12	2.78 ± 0.35
MnCl ₂ 中剂量组	33.66 ± 2.99***	3.00 ± 0.24
MnCl ₂ 高剂量组	19.58 ± 2.61***##	3.44 ± 0.79***#
<i>F</i>	67.54	5.98
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01
<i>MS</i> 组内	10.698	0.203

q 检验: 与对照组比较** $P < 0.01$; 与 MnCl₂ 低剂量组比较# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 MnCl₂ 中剂量组比较△ $P < 0.01$

表 3 3 组大鼠肝线粒体氧化应激功能变化比较 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	OH· (U/mg pro)	GSH-PX(U)
对照组	170.36 ± 24.15	224.24 ± 15.01
MnCl ₂ 低剂量组	158.50 ± 28.87	192.81 ± 8.07**
MnCl ₂ 中剂量组	191.93 ± 24.04	141.64 ± 22.45***
MnCl ₂ 高剂量组	262.42 ± 25.41***##	107.94 ± 18.04***##
<i>F</i>	19.67	57.67
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01
<i>MS</i> 组内	660.072	279.967

q 检验: 与对照组比较** $P < 0.01$; 与 MnCl₂ 低剂量组比较## $P < 0.01$; 与 MnCl₂ 中剂量组比较△ $P < 0.01$

3 讨论

细胞凋亡过程中许多重要事件的发生都与线粒体密切相关, 线粒体 PT 孔是位于线粒体内外膜之间、由多个蛋白质组成的复合通道, 参与调节线粒体基质中的 Ca²⁺、pH 值和电荷等, 维持细胞内环境的稳定^[9]。PT 孔具有感受器的功能, GSH、NADH、NADPH、ADP、二价阳离子的浓度、线粒体基质的 pH 值, 这些参数的改变均能引起 PT。高浓度 Ca²⁺、低浓度、氧化应激、游离脂肪酸及电子传递链抑制剂均能诱导 PT 孔的开放^[10]。PT 孔开放可引起一系列与细胞凋亡相关的事件发生: 一方面, 可以破坏线粒

体膜电位,使氧化磷酸化脱偶联;另一方面,可导致 AIF(一种与细胞凋亡有关的因子)的释放。由于线粒体基质渗透压高,水分可通过开放的 PT 孔进入线粒体内,导致线粒体的肿胀。膜电位下降的细胞将不可避免的发生凋亡^[11]。本研究结果显示,大鼠染锰 30 d 后,与对照组比较,线粒体 PT 孔、线粒体膜肿胀度光密度,膜电位光密度下降。线粒体膜电位是维持线粒体功能和结构的根本,也是评价线粒体功能的敏感指标,它的改变将会造成线粒体膜发生一系列的功能和状态的改变,最终导致机体 ATP 合成障碍。锰对呼吸链酶复合体活性有影响,且随着染锰剂量增加,4 种线粒体复合体活性明显降低^[12]。本研究结果表明,中、高剂量锰引起 SDH 活性降低,细胞色素 C 增加,线粒体是氧化磷酸化合成 ATP 的关键部位,而 SDH 和细胞色素 C 是线粒体内膜呼吸链的关键酶,其活力直接影响线粒体的氧化磷酸化过程。同时过量锰引起氧化损伤诱导产生过量的活性氧物质(ROS) OH·,OH·引起脂质过氧化,从而对生物膜产生有害影响,正常情况下,机体主要依靠抗氧化酶如 SOD、CAT 和 GSH-PX 等清除 ROS,这对维持体内氧化还原状态的平衡至关重要,而 GSH-PX 直接反映线粒体内抗氧化系统功能的水平。本研究中发现,GSH-PX 活性降低,无法清除毒性强的 OH·,使得不饱和脂肪酸水平降低,脂质过氧化反应增强。从而使细胞膜中的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,造成生物膜结构发生一系列变化,生物酶活性丧失,线粒体、溶酶体等细胞器发生裂解,导致细胞死亡。

综上所述,过量锰可使肝线粒体 PT 孔开放,膜电位下降,导致线粒体氧化应激,阻碍线粒体正常能

量代谢,使线粒体结构的完整性受到破坏,降低电子传递链的活性,引起线粒体的氧化损伤。

[参 考 文 献]

- [1] 王建军,贾克.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[J].蚌埠医学院学报,2010,35(12):1217-1219.
- [2] Clark JB,Nicklas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization [J]. J Biol Chem,1970,245(18):4724-4731.
- [3] Lowry OH,Rosebrough NJ,Farr A,et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem,1951,193(1):193-265.
- [4] 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.
- [5] Kristal BS,Brown AM. Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition [J]. J Biol Chem,1999,274(33):23169-23175.
- [6] Emaus RK,Grunwald R,Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondrial: spectral and metabolic properties [J]. Biochem Biophys Acta,1986,850(3):436-448.
- [7] 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.
- [8] 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,2006,28(4):249-251.
- [9] 关坤,徐兆发.镉对线粒体损伤机制的研究进展[J].毒理学杂志,2009,23(4):156-158.
- [10] 袁凌燕,陆爱云.线粒体 PT 孔参与运动诱导细胞凋亡机制的探讨[J].上海体育学院学报,2005,29(1):26-29.
- [11] 赵峰,李国君,褚金花.锰染毒对老年大鼠心肌细胞线粒体功能的影响[J].环境与职业医学,2003,20(3):151-153.
- [12] 张杰,李洁,吴萍.氧化应激在锰神经毒性中的作用[J].首都医科大学学报,2008,10(29):664-666.

(本文编辑 章新生)

(上接第 1292 页)

- [2] 梁光波,张国平,金惠铭,等.体外定量测定细胞迁移方法的建立及应用[J].中国病理生理学杂志,2004,20(2):175-179.
- [3] Furlan A,Ferris JV,Hosseinzadeh K,et al. Gallbladder carcinoma update: multimodality imaging evaluation, staging, and treatment options [J]. AJR,2008,191(5):1440-1447.
- [4] Zhu AX,Hong TS,Hezelb AF,et al. Current management of gallbladder carcinoma [J]. Oncologist,2010,15(2):168-181.
- [5] Ben-Azhak O,Kaplan-Cohen V,Ilan N,et al. Heparanase expression in malignant salivary gland tumors inversely correlates with long-term survival [J]. Neoplasia,2006,8(10):879-884.
- [6] Mahtouk K,Hose D,Raynaud P,et al. Heparanase influences expression and shedding of syndecan-4 and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma [J]. Blood,2007,109(11):4914-4923.
- [7] Basche M,Gustafson DL,Holden SN,et al. A phase I biological

and pharmacologic study of the heparanase inhibitor PI-88 in patients with advanced solid tumors [J]. Clin Cancer Res,2006,12(18):5471-5480.

- [8] Chang XZ,Wang ZM,Yu JM,et al. Isolation of a human gallbladder cancer cell clone with high invasive phenotype in vitro and metastatic potential in orthotopic model and inhibition of its invasiveness by heparanase antisense oligodeoxynucleotides [J]. Clin Exp Metastasis,2007,24(1):25-38.
- [9] Mikami S,Oya M,Shimoda M,et al. Expression of heparanase in renal cell carcinomas: implications for tumor invasion and prognosis [J]. Clin Cancer Res,2008,14(19):6055-6061.
- [10] Zhang ZH,Chen Y,Zhao HJ,et al. Silencing of heparanase by siRNA inhibits tumor metastasis and angiogenesis of human breast cancer in vitro and in vivo [J]. Cancer Biol Ther,2007,6(4):587-595.

(本文编辑 刘璐)