

己烯雌酚对染镉草鱼 GSH-Px、SOD 和 MDA 影响的研究

李媛伶, 蓝 昕, 司万童, 邴志桐, 黄德军, 张迎梅

(兰州大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730000)

摘 要:通过鱼缸染毒实验,研究了己烯雌酚(DES)对染镉(Cd)草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)抗氧化能力的影响。将实验草鱼(体长 (6.0 ± 1.0) cm,体重 (3.0 ± 0.5) g)随机分为5组,Ⅰ为空白组($0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES),Ⅱ为单独Cd处理组($1.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES),Ⅲ($1.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES)、Ⅳ($1.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES)、Ⅴ($1.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + $3.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES)为联合处理组。在染毒24、72和120h时测定草鱼肝胰脏谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)的含量。结果表明,Ⅲ组的抗氧化酶活性(GSH-Px,SOD)和抗氧化指数(GSH-Px/MDA)高于Ⅱ组,其中GSH-Px活性达显著($P < 0.05$),SOD活性在染毒120h时具显著性($P < 0.05$),抗氧化指数在72h和120h时达极显著($P < 0.01$);其MDA含量低于Ⅱ组,在72h和120h时差异显著($P < 0.05$)。表明DES在 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时对Cd具有显著的拮抗效应,增强了草鱼的抗氧化能力。Ⅳ、Ⅴ组与第Ⅲ组相比,抗氧化酶活性呈下降趋势,GSH-Px/MDA显著降低($P < 0.05$),MDA含量有所上升。说明随着DES浓度的增加,拮抗效应降低,抗氧化能力减弱。另外,随着染毒时间的延长,Ⅱ组的GSH-Px活性和抗氧化指数下降,MDA含量上升;Ⅲ组的抗氧化酶活性(GSH-Px,SOD)在120h时增强,抗氧化指数上升,MDA含量降低。

关键词:草鱼;镉;己烯雌酚;谷胱甘肽过氧化物酶;超氧化物歧化酶;丙二醛

中图分类号:X503.225 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)01-0350-04

Effect of Diethylstilbestrol on GSH-Px, SOD and MDA of Grass Carp Exposed to Cadmium

LI Ai-ling, LAN Xin, SI Wan-tong, BING Zhi-tong, HUANG De-jun, ZHANG Ying-mei

(School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The effect of diethylstilbestrol (DES) on antioxidation in hepatocyte of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) exposed to cadmium ($1.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was investigated. Grass carps (6.0 ± 1.0 cm long, 3.0 ± 0.5 g weight) were randomly divided into 5 groups, as control group I ($0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES), single Cd group II ($1.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES), experimental groups III ($1.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES), IV ($1.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES) and V ($1.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + $3.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES). The activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in hepatocyte of grass carp were measured after 24 h, 72 h and 120 h exposure. Both the activities of antioxidative enzymes (GSH-Px, SOD) and the antioxidation index (GSH-Px/MDA) of the experimental groups (III) were higher than those of the single Cd group (II): the activity of GSH-Px increased remarkably ($P < 0.05$), and that of SOD reached significant level after 120 h exposure ($P < 0.05$), the same as GSH-Px/MDA after 72 h and 120 h exposure ($P < 0.01$). The content of MDA was lower, showing significant difference after 72 h and 120 h exposure ($P < 0.05$). Such results suggested that DES ($1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) had an evident antagonistic effect on Cd, thus improved antioxidation in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) effectively. Compared with experimental group (III), in the experimental groups (IV, V), the activities of antioxidative enzymes (GSH-Px, SOD) decreased, and GSH-Px/MDA dropped prominently ($P < 0.05$) and the content of MDA increased, indicating that the antagonistic effect and antioxidation descended as the concentration of DES increased. And as the exposure time extending, the activity of GSH-Px and GSH-Px/MDA of the single Cd group (II) decreased with rising content of MDA, and in the experimental group (III), the activities of antioxidative enzymes (GSH-Px, SOD) increased after 120 h exposure with increasing of GSH-Px/MDA and decreasing of MDA.

Keywords: grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*); cadmium (Cd); diethylstilbestrol (DES); glutathione peroxidase (GSH-Px); superoxide dismutase (SOD); malondialdehyde (MDA)

收稿日期:2007-03-16

基金项目:国家自然科学基金资助(30470320)

作者简介:李媛伶(1984—),女,重庆万州人,硕士研究生,从事环境毒理学研究工作。

通讯联系人:张迎梅 E-mail:ymzhang@lzu.edu.cn

工业废水和城市废水的肆意排放,造成了水体和土壤中含有大量的镉(Cd)。Cd是一种通过食物链进行转移蓄积的重金属污染物。越来越多的实验表明,Cd的毒性和氧化损伤有关。一方面Cd可以通过增强细胞膜系统的脂质过氧化反应,产生大量自由基,造成细胞氧化损伤;另一方面Cd可以抑制主要抗氧化酶的活性,降低内源性抗氧化物谷胱甘肽(GSH)的水平,使自由基不能及时清除,造成机体氧化损伤^[1]。Cd还可以造成DNA的损伤^[2],具有明显的免疫毒性^[3]和雌激素样作用^[4]。

己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)属人工合成的雌激素类药物。有报道表明不合适剂量的DES可以引起细胞的凋亡^[5,6],而一些研究发现DES对体外培养的脑神经元具有保护作用,并具有浓度依赖性^[7]。关于DES对氧化损伤的作用的报道不多,张亚卓^[8]等发现DES可以使小鼠脑MDA含量显著降低,SOD活性明显提高。王树元等^[9]发现DES可以使大鼠失血性休克脏器脂质过氧化物含量明显的降低。也有很多报道表明与DES结构相似的雌性激素雌二醇具有抗氧化作用^[10,11]。而DES常被用作药物及饲料添加剂,常与Cd共存于水体中。研究表明,当两种或两种以上的化学物质共同作用于生物体时,往往会引起与单一毒物作用完全不同的毒性效应^[12]。已有报道表明在某些矿区的水体中镉浓度可高达1.40 mg·L⁻¹左右^[13],因此与实际情况相结合,本实验选择研究在Cd(1.46 mg·L⁻¹,120 hLC₅₀/2)存在条件下,不同浓度DES(1.00、2.00、3.00 mg·L⁻¹)在草鱼抗Cd诱导的氧化损伤过程中的作用,为更好地保护渔业资源提供依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

实验用草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*),体长(6.0±1.0)cm,体重(3.0±0.5)g,购于兰州市雁滩花鸟鱼市场。买回鱼苗驯养一周,选取行动活泼、表面无损伤的健康草鱼,随机分为5组,每组15条,养于15L的鱼缸中。水温为(16.0±1.0)℃,pH(7.3±0.5)。实验期间每天换2/3染毒液以保持浓度稳定,染毒期间不投喂饲料。

1.2 实验药品

分析纯CdCl₂·2.5H₂O(中国亭新化工厂);己烯雌酚(DES)(石家庄协和药业有限公司)。

2 实验方法

2.1 染毒质量浓度设计

镉和己烯雌酚的浓度设计见表1。

表1 镉和己烯雌酚的浓度设计

Table 1 The concentrations of cadmium and diethylstilbestrol in the experimental treatment

组别	镉浓度/mg·L ⁻¹	己烯雌酚浓度/mg·L ⁻¹
I组	0.00	0.00
II组	1.46	0.00
III组	1.46	1.00
IV组	1.46	2.00
V组	1.46	3.00

注:各组在染毒24、72、120h时取样测定。

2.2 氧化指标的测定

GSH-Px活性的测定方法参照董青等^[14],略有改动(增测了样品空白管,反应终止剂改用三氯乙酸);MDA含量的测定方法参照瞿执谦^[15](将过滤去杂质的步骤改为了离心);SOD活性的测定方法参照蔡骏等^[16];蛋白质定量采用考马斯亮蓝法^[17]。

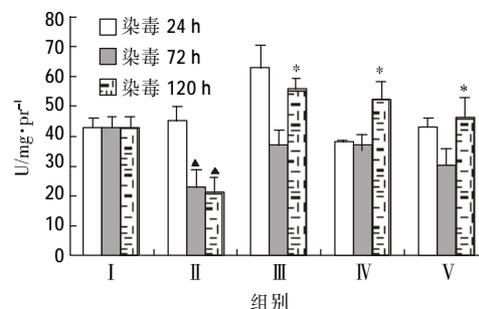
2.3 数据分析

差异显著性检验用方差分析进行,统计分析用Excel2000软件。

3 实验结果

3.1 GSH-Px活性、MDA含量和SOD活性的变化

如图1所示,与空白组相比,染毒24h时,II和III组的GSH-Px活性有所上升;染毒72h和120h时,II组始终低于空白组,联合处理组在72h低于空白组,而在120h高于空白组。III组三个染毒时段(24、72、120h)的GSH-Px活性比II组高,在120h具有显著性

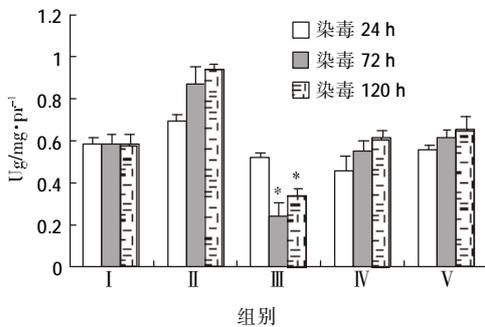


*与II组对应染毒时段相比差异显著(P<0.05);
▲与II组染毒24h相比差异显著(P<0.05)。

图1 己烯雌酚与镉对草鱼肝胰组织GSH-Px活力的联合作用
Figure 1 Combined effect of diethylstilbestrol and cadmium on GSH-Px activity in hepatocyte of grass carp

($P < 0.05$)。IV组和V组与III组相比,GSH-Px活性总体呈下降趋势,但两者在染毒72h和120h时仍高于II组。II组的活性在染毒72h和120h时与染毒24h相比显著下降($P < 0.05$),III组、IV组和V组的活性在120h时比72h高。

II组的MDA含量高于空白组,III组低于空白组,IV组和V组变化不大(图2)。III组在3个染毒时段(24,72,120h)均低于II组,且在染毒72h和120h显著低于II组($P < 0.05$);IV组和V组的MDA含量与III组相比呈上升趋势,但仍比II组低。随着染毒时间的延长,II组的MDA含量逐渐上升,III组在染毒72和120h的MDA含量都低于24h。



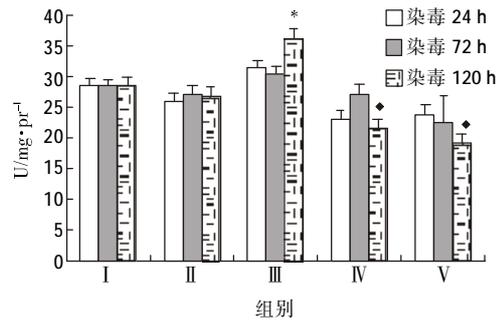
*与II组对应染毒时段相比差异显著($P < 0.05$)。

图2 己烯雌酚与镉对草鱼肝胰组织MDA含量的联合作用
Figure 2 Combined effects of diethylstilbestrol and cadmium on the content of MDA in hepatocyte of grass carp

从图3可得:II、IV组和V组都低于空白组,而III组略高于空白组。III组的SOD活性在24、72和120h与II组相比有所上升,并在染毒120h时具有显著性差异($P < 0.05$);IV组和V组的SOD活性呈下降趋势。III组的SOD活性随着时间的延长,在染毒120h时增强。

3.2 抗氧化指数(GSH-Px/MDA)

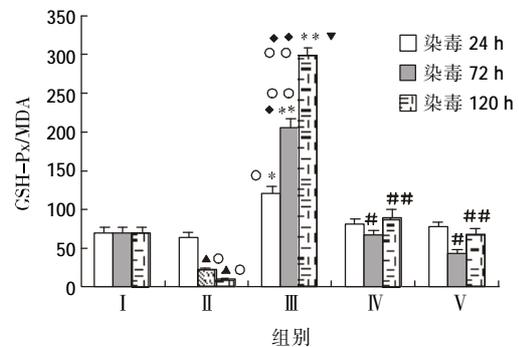
GSH-Px/MDA(GSH-Px活性/MDA含量)作为抗氧化指数,是反映机体内潜在抗氧化能力的重要标志,它可以准确反映组织细胞脂质过氧化的状态^[8]。从图4可以看出II组的抗氧化指数低于空白组,III组明显高于空白组,IV组和V组变化不大。III组在3个染毒时段(24、72、120h)的抗氧化指数高于II组,在染毒72和120h时极显著($P < 0.01$);IV组和V组的抗氧化指数与III组比显著下降($P < 0.05$)。随着染毒时间的延长,II组的抗氧化指数逐渐下降,III组的逐渐上升,而IV组和V组的变化则不明显。



*与II组对应染毒时段相比差异显著($P < 0.05$);

◆与III组对应染毒时段相比差异显著($P < 0.05$)

图3 己烯雌酚与镉对草鱼肝胰组织SOD活力的联合作用
Figure 3 Combined effects of diethylstilbestrol and cadmium on SOD activity in hepatocyte of grass carp



*与II组对应染毒时段相比差异显著($P < 0.05$),**差异极显著($P < 0.01$);▲与II组染毒24h相比差异显著($P < 0.05$);◆与III组染毒24h相比差异显著,◆◆差异极显著($P < 0.01$);▼与III组染毒72h相比差异显著;#与III组对应染毒时段相比差异显著($P < 0.05$),##差异极显著($P < 0.01$);○与相应染毒时间空白组相比差异显著($P < 0.05$),○○差异极显著($P < 0.01$)。

图4 肝胰组织中己烯雌酚与镉联合作用的抗氧化指数
Figure 4 Combined effects of diethylstilbestrol and cadmium on GSH-Px/MDA in hepatocyte

4 讨论

生物体内氧自由基的生成与清除一般处于动态平衡,氧自由基生成过多或清除能力减弱时,过多的氧自由基通过损伤生物大分子,破坏细胞的结构和功能。而机体主要通过抗氧化酶(酶系统)和清除剂(非酶系统)清除氧自由基。Cd可以通过多种途径破坏体内自由基的平衡和抗氧化系统的功能,导致机体氧化损伤^[9]。雌激素DES是一种自由基清除剂^[20],可以降低MDA含量,提高抗氧化酶活性^[8,9]。

SOD和GSH-Px是机体内最主要的抗氧化酶,其活性的变化直接影响细胞内氧自由基和其终末产物

脂质过氧化物 (LPO) 的含量。MDA 含量可以直接反映动物细胞和亚细胞水平的脂质过氧化水平和机体受损伤的程度。本实验的研究结果表明,与空白组相比,随着染毒时间的延长,单独染 Cd 组 (II) 的 GSH-Px 活性和抗氧化指数下降,MDA 含量上升,SOD 的活性也低于空白组,说明染 Cd 草鱼的抗氧化系统受到损伤,抗氧化能力降低。已有很多研究报道 Cd 可以诱导机体产生自由基,抑制抗氧化酶的活性^[1,12,19]。加入 DES 后,与单独染 Cd 组 (II) 相比,抗氧化指数、GSH-Px 和 SOD 活性上升,MDA 含量下降,并且在第 III 组表现明显。这说明草鱼机体遭受的氧化损伤有所缓解,DES 可以提高草鱼的抗氧化能力,起保护作用。这与其他学者的结果一致^[8,9]。而 DES 的保护作用可能是通过清除 Cd 诱导产生的活性氧,消除了活性氧对抗氧化酶的抑制^[20],从而使抗氧化酶的活性升高,更进一步地清除活性氧。在本实验中,III 组的抗氧化指数、GSH-Px 和 SOD 的活性高于空白组,并随着染毒时间的延长而增强,而 MDA 的含量降低,可能是这种保护作用越来越明显或者机体自身的修复能力也越来越强。另外本实验观察到第 III 组与空白组相比,抗氧化酶活性有所上升,MDA 含量下降,抗氧化指数明显升高。这有可能是 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DES 除了直接缓解机体的氧化损伤,还通过其他途径间接提高机体的自我修复能力^[21,22]。Kusunoki 等发现雌激素可以影响抗氧化酶的产生^[23]。随着 DES 浓度的增大,IV 组和 V 组的 GSH-Px 和 SOD 的活性逐渐下降,MDA 的含量逐渐上升,说明 DES 的保护作用降低,机体的抗氧化能力减弱。DES 作为酚类抗氧化剂,兼具抗氧化和促氧化作用,低浓度抗氧化,高浓度促氧化^[20],这与本实验结果一致。本研究中,当 DES 的浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抗氧化指数升高达极显著 ($P < 0.01$) 水平,但当 DES 浓度上升时 ($2, 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),抗氧化指数显著下降 (见图 4)。

综上所述,通过测定 Cd 染毒草鱼肝胰脏组织的 GSH-Px、SOD 活性和 MDA 含量,以及对抗氧化指数变化的分析,得出以下结论:低浓度 ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) DES 与 Cd 之间存在明显拮抗作用,其可以提高机体的抗氧化能力,但当 DES 浓度增大时,拮抗作用降低,机体抗氧化能力降低。

参考文献:

- [1] 朱善良,陈 龙. 镉毒性损伤及其机制的研究进展[J]. 生物学教学, 2006, 31 (8) : 2-5.
- [2] 胡晓馨,周建华,时夕金. 利用单细胞凝胶电泳技术研究镉对鲫鱼淋巴细胞 DNA 的损伤[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(1): 43-45.
- [3] 丁 磊,黄鹤忠,吴 康,等. 镉对鲫非特异性免疫力的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(1): 64-66.
- [4] 李 宏,张文昌,汪家黎,等. 镉的雌激素样作用及相关机制体内的实验[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(3): 231-232.
- [5] Li H C, Chen Q, Wang Z M, et al. A preliminary study on the effect of prepubertal exposure of male rats to diethylstilbestrol on the apoptosis of spermatogenic cells after sexual maturation and its mechanism[J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2006, 12(9): 814-7821.
- [6] Brown N, Nagarkatti M, Nagakatti PS. Induction of apoptosis in murine fetal thymocytes following perinatal exposure to diethylstilbestrol [J]. *Toxicological sciences*, 2006, 25(1): 9-15.
- [7] 赵正梅,陈晓蓉. 己烯雌酚对体外培养中神经元的保护作用[J]. 神经解剖学, 2007, 23 (1) : 69-72.
- [8] 张亚卓,陈晓光,白书阁. 性激素对老年小鼠脑中 MDA、SOD 活性的影响[J]. 老年学杂志, 1992, 12 (3) : 165-166.
- [9] 王树元,刘复兴. 己烯雌酚对大鼠失血性休克脏器脂质过氧化物含量的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 1990, 16 (1) : 40-41.
- [10] Jin K K, Ali P, Mahnaz R, et al. Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms[J]. *Journal of biology chemistry*, 2006, 281(10): 6760-6767.
- [11] Mann V, Towell C, Kogianni G, et al. Oestrogen saves Osteocytes from Oxidant induced death via a receptor independent mechanism [J]. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 2006.
- [12] 王银秋,张迎梅,赵东芹. 重金属镉、铅、锌对鲫鱼和泥鳅的毒性[J]. 甘肃科学学报, 2003, 15(1): 35-38.
- [13] 王凯荣,陈朝明,龚慧群,等. 镉污染农田农业生态整治与安全高效利用模式[J]. 中国环境科学, 1998, 18(2): 97-101.
- [14] 蒙秋锁,董青,张惠萍. 应用 DTNB 直接显色法测定全血谷胱甘肽氧化酶活力的研究[J]. 陕西医学检验, 1994, 9(3): 169-170.
- [15] 瞿执谦. 用改进的 a- 硫代巴比妥酸 (TBA) 值法来测定肉类食品中脂肪的氧化[J]. 肉类工业, 1995.4: 24-25.
- [16] 蔡 骏,李 颖,尹宗宁. 邻苯三酚法测定超氧化物歧化酶缓释片中 SOD 的活性[J]. 华西药理学杂志, 2005.20(1): 54-55.
- [17] 李建武,余瑞元,袁明秀. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 174-176.
- [18] 庞战军,周 玫,陈 媛. 自由基医学研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 311-312.
- [19] 洪 峰,金 泰. 镉与氧化损伤研究进展[J]. 国外医学医学地理分册, 2002, 9, 23 (3) : 97-103.
- [20] 郑容梁,黄中洋. 自由基医学与农学基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001. 49, 51-52, 182.
- [21] 方 芳,黄敏丽,陈 行,等. 雌激素对雌性去势大鼠脑组织抗氧化能力的影响[J]. 复旦学报 (医学版), 2004, 31(1): 59-62.
- [22] Rosler M, Retz W, Thome J, et al. Free radicals in Alzheimer's dementia: currently available therapeutic strategies[J]. *J Neural Transm Suppl*, 1998, 54: 211.
- [23] Kusunoki T, Shiraishi H, Murata K. The role of estrogen and Cu, Zn-SOD on histological changes after menopause in female rat parotid [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2006, 33(1): 47-51.