

外源性谷胱甘肽对饮水砷暴露小鼠体内砷形态分布的影响

赵凤红, 钟媛, 于霄云, 郭连营, 李革新, 吕秀强, 孙贵范, 金亚平*

(中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 探讨外源性谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 对饮水砷暴露小鼠体内不同组织器官砷形态分布的影响。方法 将实验小鼠随机分为对照组、单纯染砷组及低、中和高剂量 GSH 干预组。小鼠经饮水染砷 4 周, 并于最后一周, 在染砷同时腹腔注射不同剂量 GSH。末次注射后 24 h 处死小鼠, 取血、肝和脑组织。分别检测无机砷 (iAs)、一甲基砷 (MMA) 和二甲基砷 (DMA) 的含量。结果 GSH 干预组小鼠的肝和血中 iAs 和 MMA 含量及血和脑中总砷含量 (TAs) 与单纯染砷组比较显著下降。GSH 干预组小鼠的肝和血一甲基化率 (PMR) 和二甲基化率 (SMR) 明显升高。其中, 高剂量 GSH 干预组小鼠的肝 PMR 和 SMR 及血 SMR 与单纯染砷组比较差异显著。结论 外源性 GSH 可以促进肝中 iAs 的甲基化, 加速砷化物从机体的排泄, 从而可减少血中砷化物的含量, 进而降低脑中砷化物的蓄积。

关键词: 砷中毒; 谷胱甘肽; 砷形态; 甲基化

中图分类号: R994.6 O613.63 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)06-0419-03

Effect of exogenous glutathione on distribution and morphous of arsenic

in mice exposed to arsenite through drinking water

ZHAO Feng-hong, ZHONG Yuan, YU Xiao-yun, GUO Lian-ying, LI Ge-xin, LV Xiu-qiang, SUN Gui-fan, JIN Ya-ping

(Department of Environmental and Occupational Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore the effect of exogenous glutathione (GSH) on the distribution and themorphous of arsenic in various organs or tissues of mice exposed to arsenite through drinking water. Methods Mice were randomly divided into five groups, which were control group, arsenic exposure group, low dose GSH group, medium dose GSH group and high dose GSH group, eight mice in each group. Mice in the experimental groups were exposed to sodium arsenite through drinking water contaminated with 50 mg/L arsenic for four consecutive weeks. At the fourth week, simultaneously with the arsenic exposure, 200 mg/kg, 400 mg/kg and 800 mg/kg GSH were intraperitoneally injected to them in group 3, 4, 5 respectively. Twenty-four hours after the cessation of GSH administration, mice were anaesthetized and rapidly killed, taking the samples of blood, liver and immediately for the detection of inorganic arsenic (iAs), monomethyl arsine (MMA) and dimethyl arsine (DMA) with HG-AAS method. Results It was showed that the contents of iAs and MMA in liver and blood, as well as the total contents of arsenic (TAs) in blood and brain of GSH treated mice were all significantly lower than those of As exposed mice. Additionally, the primary methylation ratio (PMR) and the secondary methylation ratio (SMR) both in liver and blood were higher than those of As exposed mice; the differences of PMR and SMR in liver and SMR in blood between high dose GSH treated mice and As exposed mice were quite significant. Conclusions The results suggested that the exogenous GSH might promote the methylation of inorganic arsenic in liver, increase the excretion of arsenide from living body, thereby decrease the content of arsenide in blood and its deposition in brain.

Key words: Arsenic poisoning; Glutathione; Morphous of arsenic; Methylation

无机砷 (inorganic arsenic, iAs) 是常见的自然环境与职业环境的污染物之一, 长期职业砷接触与环境砷暴露可以对人类健康造成严重损伤。职业性砷中毒是我国常见的职业病, 而饮水型砷中毒又是我国主要的地方病之一^[1]。iAs 进入人体后, 主要被甲基化代谢

而形成不同形态砷甲基化物。最新的体内砷代谢模式认为, iAs 的甲基化代谢是在砷-三谷胱甘肽复合物 (arsenic triglutathione, ATG) 的基础上进行的, ATG 在砷甲基转移酶 (Cyt9) 的催化下由 S-腺苷蛋氨酸提供甲基, 分别生成一甲基砷-二谷胱甘肽复合物 (monomethylarsonic diglutathione, MADG) 和二甲基砷-谷胱甘肽复合物 (dimethylarsonic glutathione, DMAG)。由于 ATG 和 MADG 均不稳定, 易受细胞内还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平的影响。因此, 当细胞内 GSH 水平过低时, ATG 和 MADG 可以脱 GSH 分别形

收稿日期: 2009-09-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30571590)

No. 30972441)

作者简介: 赵凤红 (1984-), 女, 硕士在读。

* 通讯作者, Email: jinyi@mail.cmu.edu.cn

成 iAs 和 MMA, 导致砷甲基化代谢的中断^[3]。这提示提升细胞内 GSH 的水平, 既可促进 ATG 的生成, 又可保持 MADG 的稳定, 从而有利于 iAs 的甲基化过程。故本实验拟通过给予外源性 GSH 探讨其对砷暴露小鼠体内不同组织器官砷形态分布的影响, 为指导砷中毒的防治工作提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用健康昆明种小鼠 40 只, 体重 (25.0±2.0) g, 由中国医科大学实验动物中心提供。适应性喂养 1 周后, 将实验小鼠随机分为 5 组, 分别是对照组、单纯染砷组 (As) 及低剂量 (As+GSH₁)、中剂量 (As+GSH₂) 和高剂量 (As+GSH₃) GSH 干预组, 每组各 8 只小鼠。

1.2 染毒与干预

将亚砷酸钠 (NaAsO₂, 分析纯, 上海分析试剂厂产品) 用蒸馏水配制成含砷 50 mg/L 的水溶液, 且每 24 h 新鲜配制。实验组小鼠以自由饮水方式饮用含砷水, 对照组小鼠饮蒸馏水, 共染砷 4 周。在染砷的第 4 周, 各 GSH 干预组小鼠分别被腹腔注射 200、400、800 mg/kg 的 GSH 溶液 (用生理盐水配制), 对照和 As 组小鼠被腹腔注射生理盐水, 共注射 7 d。末次注射 24 h 后处死小鼠, 快速取血、肝和脑组织, 并保存于 -40℃ 冰箱中待测。

1.3 砷形态与含量测定

取 50 mg 肝或脑组织, 加入 1.0 ml 蒸水, 制

成组织匀浆, 并与 2.0 ml 1.5 mol/L 的 H₂SO₄ 混合; 取 0.1 ml 全血与 2.0 ml 1.0 mol/L 的 H₂SO₄ 混合。超声消化 10 min 后, 采用氢化物发生-超低温捕集-原子吸收分光光度法 (HG-AAS) 测定消化液中 iAs、MMA 和 DMA 含量, 并计算各组织中总砷含量 (TAs) 及砷一甲基化率 (Primary methylation ratio, PMR) 和二甲基化率 (secondary methylation ratio, SMR)。

$$TAs = iAs + MMA + DMA, PMR (\%) = (MMA + DMA) / TAs, SMR (\%) = DMA / (MMA + DMA)$$

1.4 统计学分析

用 SPSS13.0 进行实验数据的统计分析与处理。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 t 检验 (SNK)。以 P<0.05 作为有统计学意义的判定标准。

2 结果

2.1 各组小鼠肝组织中砷形态的分布

表 1 可见, 各染砷组小鼠的肝中 iAs、MMA、DMA 和 TAs 含量均明显高于对照组。与单纯染砷组比较, 各 GSH 干预组小鼠的肝中 iAs 含量显著下降, 高剂量 GSH 干预组小鼠的肝中 MMA 含量也显著下降; 此外, 中、高剂量 GSH 干预组小鼠的肝中 iAs 含量及高剂量 GSH 干预组小鼠的肝中 MMA 含量也显著低于低剂量 GSH 干预组。各染砷组小鼠的肝中 DMA 和 TAs 含量均无显著差异。对照组小鼠的肝中 MMA 和 DMA 含量均未检出。

表 1 各组小鼠肝组织中不同形态砷含量的比较 ($\bar{x} \pm s$) ng/g

组别	n	iAs	MMA	DMA	TAs
对照	8	32.69±20.68 ^a	<0.01 ^a	<0.01 ^a	32.69±20.68 ^a
As	8	253.62±42.33 ^b	126.97±34.99 ^b	159.94±39.87 ^b	540.53±77.00 ^b
As+GSH ₁	8	206.40±50.66 ^c	123.23±22.24 ^b	198.89±87.64 ^b	528.52±143.33 ^b
As+GSH ₂	8	147.56±59.30 ^d	98.78±28.74 ^{bc}	206.02±96.70 ^b	452.36±144.25 ^b
As+GSH ₃	8	115.65±19.25 ^d	87.81±14.34 ^c	256.58±108.85 ^b	460.04±127.08 ^b

注: 采用 ANOVA 与组间 SNK 检验, 字母不同的组间比较差异有统计学意义, P<0.05 下表同。

2.2 各组小鼠全血中不同形态砷分布的比较

表 2 可见, 各染砷组小鼠的血中 iAs、MMA、DMA 及 TAs 含量均明显高于对照组。与单纯染砷组比较, 各 GSH 干预组小鼠的血中 iAs 和 TAs 含量显

著下降, 中、高剂量 GSH 干预组小鼠的血中 MMA 含量也显著降低。此外, 高剂量 GSH 干预组小鼠的血中 MMA 含量也显著低于低剂量 GSH 干预组。对照组小鼠的血中 MMA 和 DMA 含量均未检出。

表 2 各组小鼠全血中不同形态砷含量的比较 ($\bar{x} \pm s$) ng/ml

组别	n	iAs	MMA	DMA	TAs
对照	8	1.44±0.69 ^a	<0.01 ^a	<0.01 ^a	1.44±0.69 ^a
As	8	13.48±4.28 ^b	18.66±4.84 ^b	32.17±5.49 ^b	64.32±10.40 ^b
As+GSH ₁	8	7.78±1.44 ^c	15.99±4.59 ^b	27.75±6.52 ^b	51.52±9.93 ^c
As+GSH ₂	8	7.41±2.84 ^c	13.39±6.04 ^{bc}	25.09±7.69 ^b	45.89±12.53 ^c
As+GSH ₃	8	6.24±2.99 ^c	9.57±3.64 ^c	27.55±5.14 ^b	43.36±8.36 ^c

2.3 各组小鼠的肝和血中砷甲基化率的比较

表3可见,各GSH干预组小鼠的肝和血PMR和SMR与单纯染砷组比较均明显升高。其中,各GSH干预组小鼠的肝PMR与单纯染砷组比较差异显著,且高剂量GSH干预组与低、中剂量GSH干预组比较

也差异显著;中、高剂量GSH干预组小鼠的肝SMR与单纯染砷组比较差异显著,且高剂量GSH干预组与低剂量GSH干预组比较也差异显著;高剂量GSH干预组小鼠的血SMR与单纯染砷组比较差异显著。

表3 各砷暴露组小鼠的肝和血中砷甲基化率的比较 (x±s) %

组别	n	肝		血	
		PMR	SMR	PMR	SMR
As	8	52.85±6.23 ^a	55.75±7.89 ^a	79.28±4.35 ^a	63.48±6.96 ^a
As+GSH1	8	60.53±5.73 ^b	60.23±7.35 ^{ab}	84.54±3.57 ^a	63.48±5.97 ^a
As+GSH2	8	66.87±9.39 ^b	66.32±6.62 ^{bc}	83.45±6.89 ^a	65.94±8.15 ^a
As+GSH3	8	73.96±5.45 ^c	72.85±7.09 ^c	85.78±4.95 ^a	74.67±7.88 ^b

2.4 各组小鼠脑组织中不同形态砷分布的比较

表4可见,各染砷组小鼠的脑中As、DMA及TA含量均明显高于对照组。中、高剂量GSH干预组小鼠的脑中DMA和TA含量与单纯染砷组及低剂量GSH干预组比较显著下降。各染砷组小鼠的脑中iAs含量未见显著差异,各组小鼠的脑中MMA含量及对照组小鼠的脑中DMA含量均未检出。

表4 各组小鼠脑组织中不同砷形态含量的比较 (x±s) ng/g

组别	n	iAs	MMA	DMA	TAs
对照	8	13.75±4.75 ^a	<0.01 ^a	<0.01 ^a	13.75±4.75 ^a
As	8	25.13±4.24 ^b	<0.01 ^a	153.36±45.07 ^b	178.49±47.51 ^b
As+GSH1	8	25.49±8.33 ^b	<0.01 ^a	124.12±48.52 ^{bc}	149.62±49.15 ^{bc}
As+GSH2	8	22.45±4.28 ^b	<0.01 ^a	105.66±16.75 ^c	128.12±9.55 ^c
As+GSH3	8	22.45±5.56 ^b	<0.01 ^a	98.94±14.27 ^c	121.39±14.50 ^c

3 讨论

肝脏是iAs进入机体后甲基化代谢的主要器官,部分iAs在肝中被甲基化代谢形成MMA和DMA。因此,检测肝中各形态砷含量的变化,可以为评价肝组织的砷甲基化代谢能力提供参考。本研究结果显示,GSH干预可明显降低肝中iAs和MMA含量,并使肝中DMA含量升高,这表明给予外源性GSH可增强肝脏的砷甲基化代谢能力,从而促进了甲基化代谢终产物DMA的形成。另一方面,GSH干预可使肝PMR和SMR明显升高,这显示外源性GSH对肝中砷的一次与二次甲基化代谢均有明显的促进作用。

本研究中,GSH干预组小鼠的血和脑中TA含量均明显降低。这提示外源性GSH可能通过促进肝脏的砷甲基化代谢,加速了体内砷化物的排泄,进而降低了血液中各形态砷的含量,从而减少了脑组织暴露的砷化物水平,降低了脑及其他组织中的砷负荷。另一方面,各染砷组小鼠血中PMR和SMR的变化显示,各形态砷化物在随血液循环过程中可能被肝外组织再次甲基化代谢^[3],而大剂量GSH对肝外组织的

二次砷甲基化过程有促进作用。Rodríguez等人的研究发现^[4],将脑片在含有0.1μmol/L亚砷酸钠的细胞介质中培养一段时间后,在脑片的培养液中可以检测到MMA和DMA,证实脑组织可以对As进行甲基化代谢。

我们前期的研究发现^[5],不同砷化物对大鼠原代培养星形胶质细胞的毒性作用有很大差异,微摩尔浓度的MMA^V和DMA^V对星形胶质细胞几乎没有毒性作用,但是微摩尔浓度的无机砷却对其有明显的毒性作用。目前认为,不同形态砷的毒性大小顺序为:MMA^{III}、DMA^{III}>iAs^{III}>iAs^V>MMA^V、DMA^V^[6]。本实验结果进一步提示,由于外源性GSH能够促进砷在机体内的甲基化代谢,从而可改变不同组织器官内砷形态的分布和蓄积,进而可对各组织器官的砷毒性作用产生影响。

参考文献:

[1] Sun G F. Arsenic contamination and arsenicosis in China [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2004 198: 268-271.

[2] Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, et al. A new metabolic pathway of arsenite: arsenite-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt9 [J]. Arch Toxicol 2005 79: 183-191.

[3] 于霄云,钟媛,曲春清,等.谷胱甘肽与亚砷酸钠对饮水砷暴露小鼠体内砷代谢影响的研究[J].中华预防医学杂志,2008 42: 636-639.

[4] Rodríguez VM, DelRazo LM. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd mice brain and liver [J]. Toxicol Sci 2005 84: 157-166.

[5] Jin Y P, Sun G F, Li X, et al. Study on the toxic effects induced by different arsenicals in primary cultured rat astroglia [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2004 196: 396-403.

[6] Doppa E, Harmann M, Florea A M, et al. Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2004 201: 156-165.