

饮用水有机提取物对大鼠氧化应激及免疫功能的影响*

桂晓玲^{**}, 岑延利, 杨光红^{***}, 敖云霞, 李 骞, 王士然
(贵州医科大学 公共卫生学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨某地饮用水有机提取物对大鼠氧化应激及免疫功能的影响, 为当地饮用水卫生学评价及人群健康保护提供依据。方法: 采用固相萃取法提取水样中有机污染物, 40只SD大鼠随机均分成4组, 对照组给予玉米油、高中低剂量组给予80、20及5L/kg有机污染进行灌胃12周后, 取小鼠血清和肝匀浆, 分别采用黄嘌呤氧化酶法和硫化巴比妥法测定超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的活性与含量; 微量酶标法检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性; 透射比浊法检测血清中免疫球蛋白(IgM、IgG、IgA)与补体(C3、C4)的含量。结果: 与对照组相比, 血清SOD活力在低剂量组明显升高、高剂量组明显降低, GSH-Px活力在高剂量组明显下降, MDA含量在中、高剂量组均明显升高; 肝组织SOD活力仅在高剂量组降低, GSH-Px活力则在中、高剂量组都显著降低, MDA含量在中、高剂量组均明显升高, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。随着染毒剂量的增加, 中、高剂量组的IgM含量较对照组明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); IgA、IgG、C₃及C₄则无明显改变, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 该地较高剂量的饮用水有机污染物可诱导大鼠肝脏氧化损伤的发生, 并可诱导机体的初次免疫应答增强, 而对机体的再次免疫应答及非特异性免疫无明显诱导作用。

[关键词] 饮用水; 有机提取物; 抗氧化; 免疫球蛋白; 补体

[中图分类号] R114; R123.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)07-0699-04

Effect of Organic Extracts from Drinking Water on Rats' Oxidative Stress and Immune Function

GUI Xiaoling, CEN Yanli, YANG Guanghong, AO Yunxia, LI Qian, WANG Shiran
(School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the oxidative stress and immune function in rats exposed to organic extracts from drinking water and provide the scientific basis for hygienic evaluation of drinking water and health protection in G city. **Methods:** Organic pollutants in drinking water were extracted by solid-phase extraction method, which were dissolved in corn oil and made as 50 L/mL solution of organic pollutants. 40 SD rats were randomly divided into 4 groups: corn oil group (control group), high dose group (80L/kg), middle dose group (20 L/kg), low dose group (5 L/kg). The contamination exposure lasted 12 weeks by intragastric administration. The activities and content of SOD, MDA were measured by spectrophotometry. Trace enzyme labelling was adopted to measure the GSH-Px activity. Transmission turbidity method was used to detect the content of immunoglobulin (IgM, IgG, IgA) and complement (C₃, C₄). **Results:** Compared with control group, the enzyme activity of serum SOD in low dose group obviously increased while in high dose group significantly decreased. Serum GSH-Px in high dose group obviously decreased. The MDA content in serum significantly increased in middle and high dose group. In high dose group, SOD activity in liver tissue was significantly decreased. GSH-Px activity of liver tissue in middle dose, high dose groups was significantly decreased. The MDA

*[基金项目]贵州省科技厅基金项目[黔科合 LH 字(2014)7102]; 贵阳市科学技术计划项目[筑科合同(2013103)19号]

**贵州医科大学2012级硕士研究生

***通信作者 E-mail:280446859@qq.com

网络出版时间:2015-7-1 网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150701.1956.011.html>

content in liver tissue significantly increased in middle and high dose group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). With the rise of exposure dose, the level of IgM in middle dose and high dose group increased obviously compared with control group ($P < 0.05$) while the level of IgA, IgG, C₃ and C₄ showed no significant change ($P > 0.05$). **Conclusion:** The higher dose of organic pollutants in drinking water can induce oxidative damage of liver and primary immune response of body, but have no obvious effect on secondary immune response and non-specific immunity.

[Key words] drinking water; organic extracts; antioxidant; immunoglobulin; complement

目前我国水环境污染状况不容乐观。由于工业废水、生活污水的大量排放及饮用水氯化消毒副产物的生成,使饮用水有机物污染成为了重要的公共卫生问题。水体中的有机物分布广泛,具有毒性大、难降解、生物富集等特点,能够通过长期积累达到危害人类及其他生物的水平,主要干扰神经系统、免疫系统、生殖系统功能等,有的还能在组织内部改变和破坏细胞的DNA结构,产生致癌作用^[1]。课题组的前期调查发现,某地饮用水存在有机物污染,居民存在不孕不育、消化系统慢性病相对高发等健康问题^[2]。课题组萃取当地饮用水有机污染物,复制动物模型后证实该地饮用水有机污染物具有致突变性和雄性生殖毒性^[3-4]。本实验将在课题组既往研究基础上,从氧化应激和免疫功能的角度研究当地饮用水有机污染物对机体的损害,为当地饮用水卫生学评价及肝脏毒性影响提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与仪器 免疫球蛋白(IgM、IgG、IgA)试剂盒与补体(C₃、C₄)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司),超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)测试盒、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)测试盒(南京建成生物工程有限公司)。二氯甲烷、甲醇(色谱纯,美国TEDIA公司),XAD-2大孔树脂(粒度60-80目,美国TEDIA公司),玉米油(美国Sigma公司)。主要实验仪器有RE-3000型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器有限公司),SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸公司),SC-1型离心机(美国KOCOUR公司),AR1530/C电子天平(美国奥克斯豪公司),721分光光度计(山东高密彩虹分析仪器有限公司),AU400型全自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司),酶标仪(美国Thermo公司)。

700

1.2 水样采集及有机物提取 于2012年7~9月(丰水期)采集G市某地管网末梢水水样20 000 L,利用固相萃取法提取水样中有机污染物^[5]。将挥干浓缩后的有机提取物用玉米油定容至50 L/mL(每1 mL溶液中含有50 L水的有机提取物),于4℃冰箱保存,备用。

1.3 动物模型制备 清洁级(Sprague Dawley)SD大鼠40只,雌雄各半,体质量80~100 g,由中国人民解放军第三军医大学提供,合格证号SCXK(渝)2012-0003。染毒前适应性饲养1周,清洁级动物房相对湿度50%~70%,温度(23±2)℃。40只SD大鼠按随机区组法分为对照组、高中低剂量组4组,每组10只,雌雄各半。对照组给予玉米油、其余低中高剂量组根据参考文献[6]分别给予5、20及80 L/kg进行灌胃染毒,灌胃体积为10 mL/kg,1次/d,每周染毒5 d,连续12周。最后一次染毒结束后,用0.9%戊巴比妥钠麻醉大鼠,采集股动脉血与肝脏,制备血清及肝匀浆,于-80℃冰箱保存备用。

1.4 抗氧化酶、氧化产物、免疫球蛋白及补体检测 取已制备的血清和肝匀浆。采用黄嘌呤氧化酶法测定血清与肝匀浆中SOD活性。采用微量酶标法测定血清及肝匀浆中GSH-Px的活性。采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定血清及肝匀浆MDA的含量。采用透射比浊法检测血清免疫球蛋白(IgM、IgG、IgA)与补体(C₃、C₄)的含量。

1.5 统计学方法 采用SPSS 17.0软件进行数据分析。实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较用LSD检验或Games-Howell检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血清及肝组织SOD、GSH-Px活力及MDA含量 与对照组相比,血清SOD活力在低剂

量组明显升高、高剂量组明显降低, GSH - Px 活力在高剂量组明显下降, MDA 含量在中、高剂量组均明显升高; 肝组织 SOD 活力仅在高剂量组降低,

GSH - Px 活力则在中、高剂量组都显著降低, MDA 含量在中、高剂量组均明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 大鼠血清及肝组织 SOD、GSH - Px 活力及 MDA 含量($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The enzyme activities of SOD, GSH - Px in rat serum and liver tissues exposed to organic extracts from drinking water ($n = 10, \bar{x} \pm s$))

组别	血清			肝脏组织		
	SOD(U/mL prot)	GSH - Px(U/mL prot)	MDA(μmol/L)	SOD(U/mL prot)	GSH - Px(U/mL prot)	MDA(μmol/L)
对照组	186.51 ± 18.39	307.35 ± 24.95	5.48 ± 1.34	329.94 ± 30.68	111.24 ± 11.46	11.46 ± 1.66
低剂量组	209.78 ± 24.06 ⁽¹⁾	325.67 ± 32.77	5.61 ± 1.19	341.94 ± 43.48	124.49 ± 15.76	11.77 ± 2.26
中剂量组	175.04 ± 13.98	286.12 ± 37.09	8.10 ± 1.41 ⁽¹⁾	287.63 ± 18.93	88.40 ± 13.90 ⁽¹⁾	17.92 ± 2.41 ⁽¹⁾
高剂量组	158.03 ± 19.63 ⁽¹⁾	238.49 ± 37.09 ⁽¹⁾	12.34 ± 2.07 ⁽¹⁾	261.35 ± 35.56 ⁽¹⁾	74.12 ± 14.91 ⁽¹⁾	25.56 ± 5.81 ⁽¹⁾

⁽¹⁾同类型样本对照组比较, $P < 0.05$

2.2 大鼠免疫功能 随着染毒剂量的增加, 中、高剂量组的 IgM 含量较对照组明显升高, 差异有统计

学意义($P < 0.05$); IgA、IgG、C₃ 及 C₄ 则无明显改变, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 饮用水有机提取物对大鼠免疫功能的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The effect of organic extracts from drinking water on rat immune function

组别	n	免疫球蛋白($\times 10^{-3}$)			补体($\times 10^{-3}$)	
		IgA	IgG	IgM	C ₃	C ₄
对照组	10	0.22 ± 0.13	1.30 ± 2.60	10.40 ± 4.20	47.00 ± 7.00	7.60 ± 2.00
低剂量组	10	0.23 ± 0.18	2.00 ± 1.00	10.00 ± 4.00	54.30 ± 10.00	7.80 ± 2.00
中剂量组	10	0.24 ± 0.19	1.80 ± 0.70	86.00 ± 5.00 ⁽¹⁾	54.90 ± 9.60	9.00 ± 3.30
高剂量组	10	0.28 ± 0.13	1.70 ± 0.60	103.80 ± 2.90 ⁽¹⁾	59.10 ± 3.30	9.40 ± 3.90

⁽¹⁾同指标对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

有研究认为, 在饮用水有机污染物的肝毒性机制研究中, 脂质过氧化作用可能发挥了重要作用^[7]。正常生理状态下, 机体产生自由基与清除自由基的能力处于动态平衡状态, 当机体自由基产生过多时, 机体的抗氧化酶可清除多余的自由基, 以保证细胞内环境的稳定, 从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害, 其主要的抗氧化酶有 SOD、GSH - Px 等。MDA 是脂质过氧化的产物, 反映了脂质过氧化的程度。因此, 联合测定 SOD、GSH - Px 及 MDA 可以反映外源化学物对机体氧化系统的损害程度。本实验发现, 低剂量饮用水有机物接触均可诱导 SOD 及 GSH - Px 活力升高, 而中、高剂量接触则可抑制肝组织及血清的 SOD、GSH - Px 活力。其原因可能为肝细胞受到自由基攻击后, 作为一种自身保护性机制, 肝脏内抗氧化酶活性代偿性增加; 但随着染毒剂量的增大, 产生的自由基过多, 消耗大量抗氧化酶, 致 SOD、

GSH - Px 含量减少, 活力降低。因此, 中、高剂量组 MDA 相应升高($P < 0.05$)。提示该地饮用水有机污染物随接触剂量增加, 可抑制大鼠肝脏抗氧化酶的活力、削弱其阻断脂质过氧化链锁反应的能力, 从而导致大鼠肝脏的氧化损伤加剧。这可能是该地饮用水有机污染物致肝脏毒性的重要机制之一。这与罗皓等^[8]的氯化饮水有机提取物对 HepG2 细胞具有明显的脂质过氧化作用相一致。本研究还发现, 同一染毒剂量组中, 血清中抗氧化酶活性及氧化产物水平与肝组织中各指标的变化趋势一致, 提示血清学氧化应激指标可在今后饮用水有机污染物暴露人群肝脏氧化损伤的动态监测中进行应用。

血清免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 是体液免疫的分子基础, 行使特异性免疫功能。其中 IgG 是生物体液内最主要的免疫球蛋白^[9], 由于 IgG 较其他类球蛋白更易扩散到血管外的间隙内, 因而在结合补体、增强免疫细胞吞噬病原微生物和中和细菌毒素的能力方面, 具有重要作用, 能有效地抗感染, 这是对机体有利的一面, 但某些自身免疫病, 如自身免

疫性溶血性贫血、血小板减少性紫癜、红斑狼疮以及类风湿的自身抗体都是 IgG,一旦它与相应的自身细胞结合,反而加强了组织损伤作用。IgA 在血清中的含量仅次于 IgG,按其免疫功能又分为血清型及分泌型两种,血清型 IgA 虽有 IgG 和 IgM 的某些功能,但在血清中并不显示重要的免疫功能。IgM 在免疫球蛋白中分子量最大,通常称为巨球蛋白,IgM 是初次体液免疫应答中最早出现的抗体,是机体抗感染抗损伤的“先头部队”;血清中检出 IgM 提示新近发生感染或出现新的损伤,可用于感染或新发损伤的早期诊断^[10]。除此之外,IgG、IgA、IgM 还可激活补体(C3、C4)传统途径,参与机体的非特异性免疫^[11]。本研究将饮用水有机提取物亚慢性染毒 SD 大鼠后,发现中、高剂量组 IgM 含量明显升高($P < 0.05$);IgA、IgG、C₃ 及 C₄ 各染毒组与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明该地饮用水有机提取物作为外源性抗原进入大鼠机体后,大鼠即启动免疫应答,IgM 抗体含量明显升高。提示该地饮用水有机提取物主要诱导机体免疫系统的初次免疫应答增强,而对机体的再次免疫应答及非特异性免疫无明显诱导作用。

饮用水有机污染物暴露导致的氧化损伤、免疫应答异常可能成为消化系统疾病相对高发的重要原因之一。但由于本实验为动物实验,尚需进一步的进行人群流行病学调查进行支撑。

4 参考文献

- [1] 沈成文,齐国艳,周慧民.工业废水等有机污染物污染水源所致危害分析[J].中国实用医药,2010(28):264–265.
- [2] 王士然,杨光红,张爱华,等.G 市某地水源水和管网末梢水水质检测分析[J].贵阳医学院学报,2014(2):187–190.
- [3] 徐文零,杨光红,王士然,等.G 市某区管网末梢水有机污染物对大鼠精子形态的影响[J].贵阳医学院学报,2013(2):134–137.
- [4] 杨光红,王士然,张爱华,等.G 市某区管网末梢水中有机提取物对雄性大鼠生殖激素分泌水平的影响[J].环境与职业医学,2013(5):342–345.
- [5] 曹贤文,杜海荣,张荣,等.不同预处理消毒饮用水中非挥发性有机提取物对 HepG2 细胞的损伤作用[J].环境与职业医学,2010(4):198–202.
- [6] 李骞,敖云霞,杨光红,等.饮用水有机提取物致大鼠肝脏 DNA 及蛋白质氧化损伤的研究[J].现代预防医学,2014(22):4138–4140.
- [7] 聂木海,张全新,朱伟,等.饮用水有机提取物对大鼠脂质过氧化影响[J].现代预防医学,2008(8):1551–1553.
- [8] 罗皓,杨慧,陈佳佳,等.饮水消毒副产物 DCN 对 HepG2 细胞的脂质过氧化作用[J].实用预防医学,2015(2):162–164.
- [9] 张时超,黄爱全,侯娅慧,等.IgG 在人肝细胞肝癌中的表达及其临床意义[J].中国医学创新,2014(18):23–26.
- [10] 宋秦伟,朱汝南,邓洁,等.血清特异性抗体检测在儿童呼吸道病毒感染病原诊断中应用的探讨[J].中华儿科杂志,2012(6):440–444.
- [11] 廖吕燕,马玉芳,李健,等.“芪苓”制剂多糖对环磷酰胺免疫损伤小鼠肠道菌群的影响[C].中国畜牧兽医学会 2010 学术年会暨第二届中国兽医临床大会,2010.

(2015-04-02 收稿,2015-05-31 修回)

中文编辑:吴昌学;英文编辑:刘 华

(上接第 698 页)

- [7] 张云,彭映辉,朦飞飞,等.椿叶花椒果实精油对两种蚊虫的生物活性及成分分析[J].昆虫学报,2009(9):1028–1033.
- [8] 王争艳,莫建初,侯建军.5 种植物粗提液对淡色库蚊的驱避效果,中国媒介生物学及控制杂志[J],2007(1):24–25.
- [9] 郭红祥,袁超,郭爱芳,等.超临界 CO₂萃取花椒挥发油的杀虫活性研究[J].河南农业大学学报,2005(1):79–82.
- [10] 孙红霞.植物精油对几种杀虫剂触杀毒力的影响及增效机理的研究[D].福建农林大学,2008.
- [11] LC R, RA W, MD B, et al. Mathematical models of the effectiveness and persistence of mosquito repellents[J]. J Am Mosq Control Assoc, 1985(1):56–62.

- [12] 胡逢蛟,许国章,董红军,等.2005~2006 年宁波市流行性感冒病毒的流行与优势株转换分析[J].中国卫生检验杂志,2007(3):428–430.
- [13] Barnard DR. Mosquito density, biting rate and cage size effects on repellent test [J]. Med Vet Entomol, 1998(1):39–45.
- [14] Lerdau M, Dilts SB, Westberg H, et al. Monoterpene emission from Pond Cypress Pine [J]. Geophya Res, 1994(99):16609–16615.
- [15] Rueda LM. Effect of skin abrasions on the efficacy of the repellent Deet against Aedes aegypti [J]. J Am Mosq Control Assoc, 1998(2):178–182.

(2015-04-28 收稿,2015-05-31 修回)

中文编辑:吴昌学;英文编辑:赵 豪