

# 辛硫磷慢性暴露对大鼠肝脏氧化应激的影响

李慧敏, 王富民, 顾建红, 曹学智, 冯亚杰, 刘宗平\*

(扬州大学兽医学院, 扬州 225009)

**摘要:** 本试验旨在研究辛硫磷(Phoxim)对大鼠的毒性作用, 探讨辛硫磷中毒的氧化应激机制。将 36 只 SD 大鼠分成对照组和 2 个染毒组, 染毒组大鼠分别以 30(低剂量组)和 300  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  体重剂量(高剂量组)灌服辛硫磷, 连续灌服 15、30 d 后, 分别测定血浆和肝脏胆碱酯酶(ChE)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量, 并观察肝脏组织学变化。结果表明: 辛硫磷染毒后大鼠血浆和肝脏 ChE 活性均极显著降低( $P < 0.01$ ), 尤其是高剂量染毒组, 大鼠血浆 ChE 最大降低至对照组的 22%, 肝匀浆中 ChE 活性降低至对照组的 75%。大鼠血浆和肝脏 SOD、GSH-Px 活性变化随染毒时间延长呈下降趋势, 血浆和肝脏 MDA 含量均呈上升趋势。组织学检查显示辛硫磷可造成肝细胞脂肪变性。本研究表明, 大鼠辛硫磷持续染毒可以诱导机体脂质过氧化增强, 并导致肝脏结构损伤, 说明氧化应激在辛硫磷的肝脏毒性中发挥着重要作用。

**关键词:** 辛硫磷; 大鼠; 肝脏; 氧化应激; 脂质过氧化

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)08-0861-05

## Effects of Chronic Exposure to Phoxim on Oxidative Stress in the Liver of Rats

LI Hui-min, WANG Fu-min, GU Jian-hong, CAO Xue-zhi, FENG Ya-jie, LIU Zong-ping\*

(College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** In order to study the toxicity of phoxim on rats, and explore the role of oxidative stress in the mechanism of phoxim intoxication, phoxim was administrated intragastrically to SD rats with the concentrations of 30 and 300  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  body weight. After 15 and 30 days, the content of malondialdehyde (MDA) and the activity of cholinesterase (ChE), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver tissue and plasma were determined and histopathological changes were detected. Results showed that activity of ChE in the plasma and liver were significant lower than that in the control group ( $P < 0.01$ ). Especially, the activity of ChE in high dosage group decreased to 22% in plasma and 75% in liver compared to the control. The activity of SOD and GSH-Px both decreased in plasma, the content of MDA increased in plasma and liver along with the exposed time extended. Histopathological changes showed that fatty degeneration in hepatocytes of rats. The results indicated that phoxim can induce enhanced lipid peroxidation on SD rats and lesions of structure in the liver. The oxidative stress plays an important role in the mechanism of hepatotoxicity.

**Key words:** phoxim; SD rat; liver; oxidative stress; lipid peroxidation

有机磷杀虫剂是目前应用最为广泛的一种杀虫剂, 该类化合物进入动物机体后主要抑制乙酰胆碱酯酶活性, 导致乙酰胆碱的大量积聚, 激活胆碱能受

体(毒蕈碱或烟碱受体), 从而产生毒性作用。另外, 有机磷农药的毒性还包括抑制 DNA 和 RNA 的合成<sup>[1]</sup>, 阻断信号传导通路<sup>[2]</sup>, 诱导机体氧化应激<sup>[3]</sup>,

收稿日期: 2006-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30440050; 305713647)

作者简介: 李慧敏(1980-), 女, 河南濮阳人, 硕士生, 主要从事中毒病与动物营养代谢病研究, 0514-7991448, E-mail: lihuimin516@163.com

\* 通讯作者: 刘宗平, E-mail: Liuzongping@yzu.edu.cn

导致细胞凋亡和坏死<sup>[4]</sup>等。本试验旨在通过测定胆碱酯酶、抗氧化酶的活性和脂质过氧化产物的浓度,了解低浓度的辛硫磷慢性暴露对大鼠氧化应激的影响及其对肝脏的损伤,为揭示有机磷农药的毒性机理提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

辛硫磷(连云港立本农药厂,89%);花生油调和油(山东鲁花集团有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、胆碱酯酶(ChE)、丙二醛(MDA)检测试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供;722光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

### 1.2 实验动物及其处理

健康4周龄SD大鼠36只(由扬州大学实验动物中心提供),试验前隔离饲养1周。辛硫磷用不含抗氧化剂的花生油溶解,将大鼠随机分为对照组和2个染毒组,高剂量组(H)按300  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  体重,低剂量组(L)按30  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  体重剂量灌胃染毒,对照组(C)给予等量的花生油,每3 d称重1次,以调整

剂量。分别连续灌服15、30 d后,心脏采血并分离血浆,处死后摘取肝脏,一部分按比例加入冷生理盐水研磨制成组织匀浆待测;一部分用13%甲醛固定,按常规方法制作石蜡切片,HE染色,光镜观察。

### 1.3 血浆和肝匀浆中 ChE、SOD、GSH-Px、MDA 测定

按照试剂盒说明书,分别测定血浆、肝组织匀浆中 ChE、SOD、GSH-Px 活性和 MDA 浓度。

### 1.4 数据处理

用 Excel 进行数据处理,结果用平均值 $\pm$ 标准差表示,经  $t$  检验方法进行差异显著分析。

## 2 结果

### 2.1 血浆和肝匀浆中 ChE、SOD、GSH-Px 活性和 MDA 浓度的变化

如表1所示,与对照组相比,染毒组大鼠血浆和肝组织匀浆中 ChE 活性均极显著降低( $P < 0.01$ ),尤其是染毒30 d的高剂量组大鼠血浆 ChE 活性降低至对照组的22%,肝匀浆中 ChE 降低至对照组的75%。同一剂量组随着染毒时间延长,胆碱酯酶活力呈下降趋势。

表1 辛硫磷染毒不同时段对大鼠血浆、肝脏中 ChE、SOD、GSH-Px、MDA 的影响 ( $\bar{X} \pm SD, n=6$ )

Table 1 Levels of ChE, SOD, GSH-Px and contents of MDA in liver and plasma of rats after phoxim exposed for 15 and 30 days (mean  $\pm$  SD, n=6)

分组 Groups	ChE		SOD		GSH-Px		MDA	
	血浆/ (U/mL)	肝脏/ (U/mg)	血浆/ (U/mL)	肝脏/ (U/mg)	血浆/ (U/mL)	肝脏/ (U/mL)	血浆/ (nmol/mL)	肝脏/ (nmol/mg)
染毒 15 d Exposed to phoxim for 15 days								
C	75.056 $\pm$ 1.282	11.456 $\pm$ 0.906	184.925 $\pm$ 22.244	181.342 $\pm$ 6.277	1 968.142 $\pm$ 148.870	101.149 $\pm$ 2.393	2.373 $\pm$ 0.606	12.219 $\pm$ 0.156
L	54.711 $\pm$ 1.367**	9.953 $\pm$ 1.566**	177.349 $\pm$ 10.278	189.210 $\pm$ 6.723	2 015.929 $\pm$ 135.733	107.960 $\pm$ 2.168	3.052 $\pm$ 0.254	13.252 $\pm$ 0.613
H	53.536 $\pm$ 1.954**	8.776 $\pm$ 1.159**	148.600 $\pm$ 12.218**	213.654 $\pm$ 9.294**	1 191.15 $\pm$ 104.139**	191.490 $\pm$ 2.752**	3.927 $\pm$ 0.601**	23.691 $\pm$ 1.928**
染毒 30 d Exposed to phoxim for 30 days								
C	74.05 $\pm$ 2.045	10.082 $\pm$ 0.736	191.529 $\pm$ 9.401	180.843 $\pm$ 4.902	1 916.19 $\pm$ 149.861	102.151 $\pm$ 2.989	2.646 $\pm$ 0.278	10.967 $\pm$ 0.787
L	41.559 $\pm$ 1.833**	8.170 $\pm$ 0.855**	113.247 $\pm$ 11.941**	210.745 $\pm$ 7.125**	1 322.143 $\pm$ 179.104**	129.340 $\pm$ 5.406**	4.228 $\pm$ 0.263**	17.910 $\pm$ 1.73**
H	16.398 $\pm$ 1.333**	7.518 $\pm$ 0.811**	151.903 $\pm$ 4.758**	119.711 $\pm$ 4.094**	1 029.524 $\pm$ 52.455**	81.857 $\pm$ 6.021**	5.265 $\pm$ 0.454**	22.017 $\pm$ 1.876**

C. 对照组; L. 低剂量组; H. 高剂量组; 与对照组相比, \* .  $P < 0.05$ , \* \* .  $P < 0.01$

C. Control; L. Low dosage group; H. High dosage group; Compared with control, \* .  $P < 0.05$ , \* \* .  $P < 0.01$

所测大鼠血浆和肝脏 SOD、GSH-Px 活性变化趋势一致,大鼠血浆 SOD 和 GSH-Px 活性随染毒时间延长呈下降趋势,与对照组相比,低剂量组 30 d、高剂量组 15 和 30 d 均有极显著的差异( $P < 0.01$ )。肝脏 SOD 和 GSH-Px 活性在低剂量组 30 d 和高剂量组 15 d 均极显著高于对照组( $P < 0.01$ ),而高剂量组 30 d 则显著降低( $P < 0.01$ )。随着染毒时间的延长和剂量增大,血浆和肝脏 MDA 含量均呈上升趋势,低剂量组在 30 d,高剂量组在 15、30 d 均与对照组有极显著的差异( $P < 0.01$ )。

## 2.2 病理组织学变化

组织学变化表明(图 1~6),低剂量染毒组 15 d 肝脏结构无明显改变;30 d 肝小叶周围散在分布肝细胞脂肪变性。而高剂量染毒组 15 d 肝细胞肿胀,

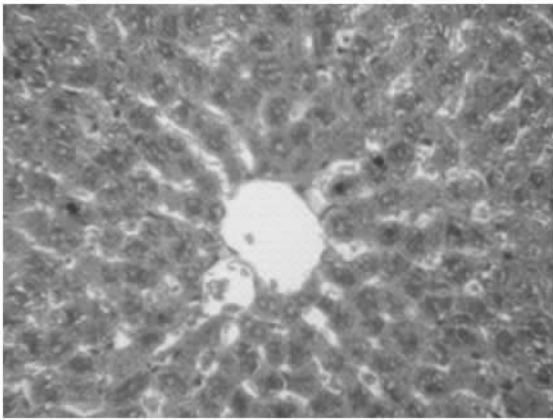


图 1 对照组正常肝细胞 HE 400×

Fig. 1 Normal hepatocytes in control group HE 400×

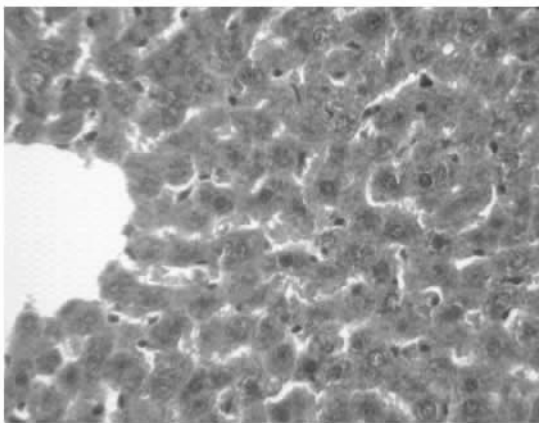


图 2 30 μmol/kg 体重辛硫磷染毒 15 d,肝细胞正常,无明显变化 HE 400×

Fig. 2 Exposed to phoxim at the dose of 30 μmol/kg b. w. for 15 days, no visible histopathological changes HE 400×

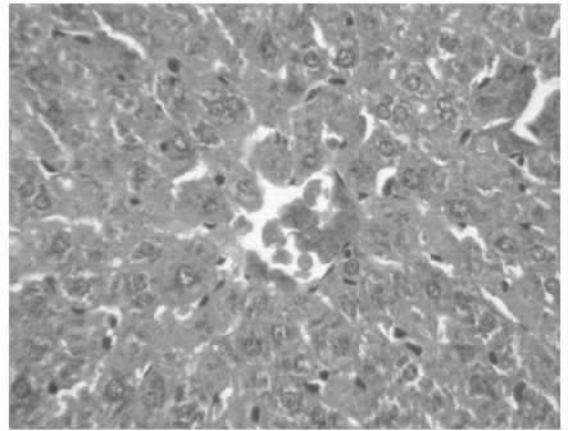


图 3 300 μmol/kg 体重染毒 15 d,肝细胞肿胀,颗粒变性 HE 400×

Fig. 3 Swelling and granular degeneration in hepatocytes after exposing to phoxim at dose of 300 μmol/kg b. w. for 15 days HE 400×



图 4 30 μmol/kg 体重染毒 30 d,肝小叶散在分布肝细胞脂肪变性,肝细胞索肿胀,静脉窦狭窄 HE 200×

Fig. 4 Rats treated with 30 μmol/kg b. w. phoxim for 30 days, fatty degeneration scattered in hepatic lobules, swelling of liver cell cord and stenosis of sinus venosus HE 200×

颗粒变性;染毒 30 d 肝小叶弥漫性脂肪变性,肝细胞索肿胀,肝静脉窦狭窄甚至闭塞,汇管区周围大量炎性细胞浸润。

## 3 讨论

有机磷农药进入机体后,主要是抑制胆碱酯酶(ChE)的活性。因此,ChE 测定是诊断有机磷农药中毒的有效指标<sup>[5,6]</sup>,对判断中毒程度、疗效及预后均极为重要。目前对于血浆中 ChE 活性降低到何

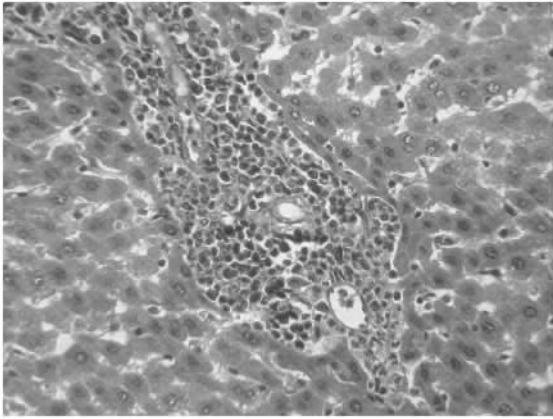


图5 300  $\mu\text{mol/kg}$  体重染毒 30 d, 汇管区周围大量炎性细胞浸润 HE 400 $\times$

Fig. 5 Rats treated with 300  $\mu\text{mol/kg}$  b. w. phoxim for 30 days, massive inflammatory cellular infiltration on the periphery of portal area HE 400 $\times$

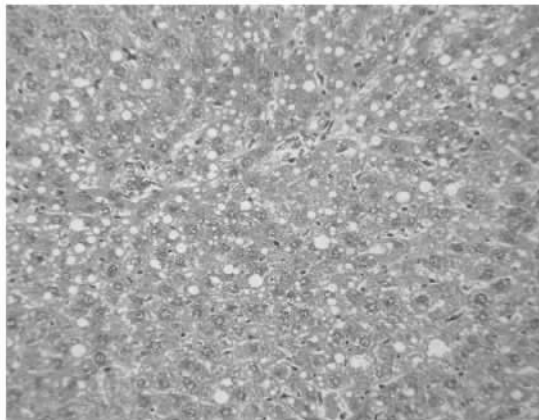


图6 300  $\mu\text{mol/kg}$  体重染毒 30 d, 肝小叶弥漫性脂肪变性, 肝细胞索肿胀, 肝静脉窦狭窄甚至闭塞 HE 200 $\times$

Fig. 6 Rats treated with 300  $\mu\text{mol/kg}$  b. w. phoxim for 30 days, diffuse fatty degeneration of hepatic lobules, swelling of liver cell cord, stenosis even obliteration of sinus venosus HE 200 $\times$

种程度会出现明显的中毒症状还存在争论。据报道, 当血液中 ChE 活性降至正常值的 80% 时, 即可出现明显的中毒症状<sup>[7]</sup>。也有报道, 人脑中乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性下降至正常值的 60% 以下时, 出现中毒症状, 但如果只有血 ChE 活性下降, 而脑 AChE 活性仍超过 60% 时, 则不出现中毒症状和体征<sup>[8]</sup>。Abdollahi 等在饲料中添加 100、500 和 1 500 mg/kg 的马拉硫磷饲喂大鼠 4 周, 血浆 ChE 活性分别降低至对照组的 45%、48% 和 41%<sup>[9]</sup>。家兔灌服

215 mg/kg 的甲胺磷 1 h 后出现明显的中毒症状, 血清 ChE 活性降低至灌药前的 42%<sup>[10]</sup>。本研究分别用剂量 30、300  $\mu\text{mol/kg} \cdot \text{d}$  的辛硫磷持续灌服大鼠, 血浆和肝脏中 ChE 活性均显著降低。尤其是高剂量组染毒 30 d 血浆 ChE 活性降低至对照组的 22%, 肝匀浆中 ChE 活性降低至对照组的 75%, 但没有出现明显的临床中毒症状。由此可见, 中毒症状的出现不仅与血浆 ChE 活性降低程度有关, 可能更主要与降低速度有关。组织学研究表明, 虽然无明显的临床中毒症状, 但当 30  $\mu\text{mol/kg}$  体重剂量持续灌服 30 d, 血浆 ChE 活性降低到对照的 57%, 肝脏 ChE 活性降低到 81% 时, 肝细胞出现轻度脂肪变性、肝索肿胀, 表明大鼠肝脏组织结构已受到了一定程度的损伤。

机体在有氧代谢过程中产生的活性氧族 (Reactive oxygen species, ROS) 主要包括  $\text{OH}^\cdot$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{HOCl}$ 、 $\text{NO}$ 、 $\text{O}_3$  和单线态氧等, 对大多数细胞都具有毒性作用。在正常情况下, 机体内 ROS 的产生和 ROS 清除系统处于动态平衡状态。如因种种原因导致 ROS 产生增多或/和机体清除 ROS 能力降低, 机体就会出现氧化应激 (Oxidative stress)。当机体处于氧化应激状态时, 体内组织细胞 ROS 量相对升高, 超过机体的清除能力, 可导致机体组织脂质过氧化水平升高, 引起 DNA 氧化损伤和蛋白质的表达异常, 对机体造成损害。氧化应激使机体处于易损状态, 同时能增强致病因素的毒性作用, 可导致基因突变, 它不仅与多种疾病的发生发展有关, 也与细胞凋亡存在着十分密切的关系<sup>[11]</sup>。超氧化物歧化酶 (SOD) 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用, 此酶能清除超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 保护细胞免受损伤, 是细胞内抗脂质过氧化反应的酶保护系统的重要成分。谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 分解的酶, 它特异的催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的还原反应, 可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。因此, 这些酶活力的高低间接反映了机体清除氧自由基能力的大小<sup>[12]</sup>。对人和大鼠的研究显示, 有机磷农药导致 SOD 活性降低、脂质过氧化物产物增加、乳酸脱氢酶泄露和 GSH-Px 减少, 说明有机磷农药可以诱导大鼠和人的氧化应激<sup>[13~16]</sup>。刘茹等<sup>[17]</sup>用辛硫磷 5.88、29.4 和 98.0 mg/kg 连续染毒 30 d, 血清 SOD、GST 水平显著降低, MDA 含量升高, 但没有对卵巢的抗氧

化系统功能造成损伤。本研究表明,30  $\mu\text{mol/kg}$  剂量染毒 15 d,血浆和肝脏 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量均无明显变化,这也进一步说明辛硫磷是一种短效型低毒杀虫剂,对人畜的毒性较低。但是随着染毒时间的延长,染毒 30 d 后,肝脏抗氧化酶活性升高和 MDA 浓度升高,血浆抗氧化酶活性降低,是否表明肝脏的抗氧化能力代偿性增强,有待进一步探讨。300  $\mu\text{mol/kg}$  剂量的辛硫磷染毒 15 d,血浆 SOD、GSH-Px 活性降低,MDA 含量明显上升,但肝脏 SOD、GSH-Px 活性升高。持续染毒 30 d 时,血浆和肝脏 SOD、GSH-Px 活性均明显下降,MDA 含量极显著升高( $P < 0.01$ ),肝索肿胀,肝小叶弥漫性脂肪变性,汇管区周围大量炎性细胞浸润。表明大鼠持续染毒,不仅可引起氧化应激,而且可以通过诱导肝细胞发生脂质过氧化引起肝脏结构的损伤。

#### 参考文献:

- [1] Garcia S J, Seidler F J, Crumpton T L, *et al.* Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos involves glial targets; C6 glioma cell model [J]. *Toxicol*, 2001, 60(Suppl,1):240.
- [2] Ehrich M, Intropido L, Costa L G. Interaction of organophosphorus compounds with muscarinic receptors in SH-SY5Y human neuroblastoma cells [J]. *Toxicol Environ Health*, 1994, 43:51~63.
- [3] Crumpton T L, Seidler F J, Slotkin T A. Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos [J]. *Dev Brain Res*, 2000a (121): 189~195.
- [4] Carlson K, Jortner B S, Ehrich M. Organophosphorus compound induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 168(2):102~113.
- [5] Edwards C A, Fisher S W. The use of cholinesterase measurements in assessing the impacts of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates [A]. Mineau P. *Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment* [M]. New York:Elsevier, 1991. 256~275.
- [6] Chambers J E, Boone J S, Carr R L, *et al.* Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment [J]. *Human and Ecological Risk Assessment*, 2002, 8(1):165~176.
- [7] 李焕德,许树梧. 急性中毒毒物检测与诊疗[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2000. 501~505.
- [8] 方克美. 有机磷农药中毒急救治疗进展[J]. *急诊医学*, 2000, 9(4):283~285.
- [9] Abdollahi M, Sara M, Pournourmohammadi S, *et al.* Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2004, 137(1):29~34.
- [10] 任建新,刘学忠,刘宗平,等. 家兔甲胺磷急性中毒的血清酶活性改变[J]. *中国兽医学报*, 2005, 9(5): 517~519.
- [11] Ozaki M, Deshpande S S, Angkeow P, *et al.* Inhibition of the Rac1 GTPase protects against nonlethal ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis *in vivo* [J]. *FASEB*, 2000, 14: 418~429.
- [12] Fang Y Z, Yang S, Wu G. Free radicals antioxidants and nutrition [J]. *Nutrition*, 2002, 18 (10): 87~91.
- [13] Gupta R C, Milatovic D, Dettbarn W D. Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants [J]. *Neuro Toxicology*, 2001, 22(2): 271~282.
- [14] Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, *et al.* Biochemical evidence for free radical induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2003, 22: 205~211.
- [15] Banerjee B D. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends [J]. *Rev Environ Health*, 2001, 36~40.
- [16] Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. Induction of oxidative stress and acetyl cholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2002, 21:179~182.
- [17] 刘茹,陈建锋,何俊,等. 辛硫磷对大鼠卵巢抗氧化系统功能的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2004, 4: 94~97.