

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)19-1733-04

金属硫蛋白对仔猪抗氧化功能及 SOD 基因表达的影响

李丽立¹, 刘云华², 侯德兴³, 印遇龙¹, 张彬², 侯振平¹, 邱细敏⁴ (¹中国科学院亚热带农业生态研究所, 湖南长沙 410125; ²湖南农业大学动物科技学院, 湖南长沙 410128; ³日本鹿儿岛大学农学部生物资源化学科, 日本鹿儿岛 890-8580; ⁴湖南师范大学医学院, 湖南长沙 410006)

Effects of metallothionein on anti-oxidative function and SOD gene expression in piglets

LI Li-Li¹, LIU Yun-Hua², HOU De-Xing³, YIN Yu-Long¹, ZHANG Bin², HOU Zhen-Ping¹, QIU Xi-Min⁴

¹Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Science, Changsha 410125, China, ²College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China, ³Department of Biochemical and Technology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890-8580, Japan, ⁴Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410006, China

【Abstract】 AIM: To investigate the effects of exogenous Zn-metallothionein (Zn-MT) on anti-oxidative function and gene expression of SOD in weaning piglets. METHODS: Eighteen piglets (Duroc × Landrace × Yorkshire) were selected and divided into 3 groups (1, 2 and 3) randomly. The piglets were sport to produce stress. Zn-MT of piglet liver dissolved in physiological saline were then injected into the piglets of group 1, 2 and 3 with the concentrations of 0, 0.8, 1.6 mg/kg, respectively. Three and 6 h later, 3 piglets were selected from each group randomly and slaughtered to get liver samples. The biochemical indexes related to antioxidation and the level of SOD gene expression in liver were determined. RESULTS: After Zn-MT injection, the activities of SOD and GSH-PX increased significantly ($P < 0.05$), the content of MDA decreased significantly ($P < 0.05$), and the level of anti-reactive oxygen species and anti-superoxide anion had the trend of improvement. Six hours after Zn-MT injection, the level of SOD gene expression in group 2 and 3 increased significantly as compared with that in group 1 ($P < 0.05$). The level of SOD gene expression in group 2 and 3 at 6 h enhanced significantly as compared with that at 3 h. Thus, our data indicated that Zn-MT

treatment stimulated SOD mRNA expression in a time- and dose-dependent manner. CONCLUSION: Activity of antioxidantase can be increased by supplement of Zn-MT, thereby improving the power of anti-stress.

【Keywords】 metallothionein; anti-oxidative enzyme; gene expression; piglet

【摘要】目的: 用仔猪作模型, 研究经锌元素诱导的外源性金属硫蛋白(Zn-MT)对机体抗氧化功能和超氧化物歧化酶(SOD)基因表达的影响. 方法: 选用杜长大杂交仔猪 18 头, 随机分为 3 组(1、2 和 3). 分别肌肉注射经生理盐水溶解的猪肝 Zn-MT 0 mg/kg (1 组), 0.8 mg/kg (2 组), 1.6 mg/kg (3 组), 让仔猪运动产生应激. 注射 MT 后 3 h 和 6 h, 分别从每组取 3 头仔猪屠宰取肝脏, 测定肝脏中与抗氧化有关的生化指标, 检测肝脏 SOD 基因表达水平. 结果: 在应激条件下, 补充外源性 Zn-MT 一段时间后, 仔猪肝脏 SOD、GSH-PX 活性显著升高($P < 0.05$), MDA 含量显著降低($P < 0.05$), 肝脏抗活性氧和抗超氧阴离子水平也有提高的趋势. 在注射 Zn-MT 后 6 h, 0.8 mg/kg、1.6 mg/kg 组仔猪肝脏 SOD 基因表达水平比对照组显著提高($P < 0.05$). 0.8 mg/kg 组和 1.6 mg/kg 组 6 h SOD 基因表达水平比 3 h 显著增加. 表明 MT 对 SOD 基因表达的诱导与时间和剂量关系密切. 结论: 补充外源性 Zn-MT 可提高应激机体的抗氧化酶活性, 从而提高机体的抗应激能力.

【关键词】 金属硫蛋白; 抗氧化酶; 基因表达; 仔猪

【中图分类号】 R151 **【文献标识码】** A

0 引言

应激可使机体脂质过氧化反应增强, 继而通过产生自由基造成组织损伤, 致生物体病变, 生产力下降, 甚至死亡^[1]. 金属硫蛋白(metallothionein, MT)是分子量低、富含半胱氨酸的金属结合蛋白. 研究表明, MT 具有显著的清除自由基、抗脂质过氧化和增强机体免疫力的作用^[2-3]. 因此, MT 通过清除自由基, 可增强抗氧化酶的活性, 阻断脂质过氧化链式反应, 减少膜脂质过氧化损伤, 减少 DNA 损伤. 因而将 MT 应用于动物, 完全有可能达到缓解氧化应激, 提高生长速度, 减少疾病的发生, 减缓鲜肉氧化速度, 延长动物利用年限, 提高经济效益的目的. 但以往有关

收稿日期 2006-02-21; 接受日期 2006-05-30

基金项目 国家自然科学基金“金属硫蛋白拮抗氧自由基机理研究”(30170684) 湖南省自然科学基金(01JJY2032)

通讯作者 张彬. Tel 13975890729 Email Zhbin2119@sina.com.cn
作者简介 李丽立. 研究员, 硕士生导师. Tel (0731) 6643553 Email: lili@isa.ac.cn

金属硫蛋白的抗氧化、抗应激研究以内源性为主,而且大都仅从抗氧化酶的活性变化来探讨金属硫蛋白清除自由基、抗氧化的作用。有关 MT 在猪体内的研究鲜见报道。基于此,我们以杜长大杂交仔猪为对象,通过注射外源性 Zn-MT,测定肝脏与自由基有关的生化指标以及肝脏中 SOD 基因表达水平,从蛋白和基因水平探讨外源性 Zn-MT 在应激状态下对抗氧化酶的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

选用胎次、日龄相同并且体质量相近的杜长大三元杂交雄性仔猪 18 头,14 d 一次性断奶,单栏饲养,自由采食和饮水。试验前体质量(4.42 ± 0.24) kg。屠宰前 1 d 停食,不断水。梯度 PCR 仪:德国 Eppendorf 生产,型号为 5331055888;稳压稳流电泳仪:北京六一仪器厂生产,型号为 DYY-6B;凝胶成像系统:美国 UVP Bioluminescence System 生产,型号为 GDS-8000;紫外分析仪:北京六一仪器厂生产,型号为 WD-9403B;紫外分光光度计:德国 Eppendorf 生产,型号为 603105430;超低温冰箱:青岛海尔股份有限公司生产,型号为 BD-396LT-65W;台式离心机:德国 Eppendorf 生产,型号为 Centrifuge 5415D;低温离心机:德国 Eppendorf 生产,型号为 Centrifuge 5810R;微波炉:青岛海尔股份有限公司生产,型号为 HR-6702DW。猪肝 Zn-MT:本课题组提取的产品;BIOXY-TECH® SOD-525™ 试剂盒:购自 OXIS 公司;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、活性氧(ROS)测定试剂盒、超氧阴离子(SOA)自由基测定试剂盒:购自南京建成生物工程研究所;ISOGEN 总 RNA 抽提试剂盒:购自日本基因株式会社;RT-PCR 试剂:购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;琼脂糖及 Tris:购自 Roche 公司;Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder:购自 MBI Fermentas 公司。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

将 18 头供试仔猪,随机分为 3 组,每组 6 头。驱赶仔猪使其产生应激,然后 3 组分别肌肉注射经生理盐水溶解的猪肝 Zn-MT 0 mg/kg (1 组),0.8 mg/kg (2 组),1.6 mg/kg (3 组)。在注射 MT 后 3 h 和 6 h,分别从每组随机抽取 3 头仔猪,从前腔静脉放血屠宰,取肝脏,测定肝脏中与抗氧化有关的生化指标,检测肝脏 SOD 基因表达水平。

1.2.2 样品采集

解剖时取两份 1 g 左右的肝脏迅速用无菌锡铂纸包好并编号于液氮中速冻,再转移至 -70℃ 冰箱中以备总 RNA 的抽提和肝脏上清液的

制备。

1.2.3 肝脏上清液的制备

取 0.2 g 左右经低温保存的肝组织在冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,称质量,放入玻璃匀浆管中,然后用移液管量取预冷的生理盐水(8.6 g/L),生理盐水的体积是组织块质量的 9 倍。将匀浆管下端插入盛有冰水混合物的器皿中,上下转动捣杆数 10 次,充分研碎,使组织匀浆化。将制备好的 100 mL/L 的匀浆在 4℃,3000 r/min 离心 15 min,取上清液。

1.2.4 肝脏中与抗氧化有关的生化指标的测定

肝脏上清液中 SOD 活性, GSH-PX, MDA, ROS 和 SOA 自由基水平的测定按各试剂盒说明书操作。

1.2.5 基因表达分析

采用半定量 RT-PCR 方法,以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内标^[4]。

1.2.5.1 总 RNA 的提取

采用 ISOGEN-LS 总 RNA 抽提试剂盒,按说明书操作,提取的总 RNA 经紫外分光光度计测得 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.0 之间,可作为逆转录反应的模板。

1.2.5.2 引物设计

根据网上(www.ncbi.nlm.nih.gov/)发表的基因序列(SOD:E06791, GAPDH:AF017079)采用引物设计软件进行设计,SOD 上游引物 5'-ATTCATGCGACGAAGGC-3',下游引物:5'-TCAATTACACCACAGGCCA-3',扩增长度 453 bp;内标 GAPDH 上游引物 5'-TGAACGGATTTCGC-CGCAT-3',下游引物 5'-TTCTCCATGGTCGTGAAGA-3',扩增长度 297 bp,引物均由日本株式会社 DNA 合成事业部合成。

1.2.5.3 RT-PCR 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

用 Read-to-Go RT-PCR beads 试剂采用一步法进行。

1.2.5.4 RT-PCR 产物定量

取 15 μL PCR 扩增产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳(含溴化乙锭),在凝胶成像系统下观察结果并拍照。采用图像处理系统对 PCR 产物条带进行密度扫描,以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为 RT-PCR 的质控,将待测 SOD 基因表达与其对应 GAPDH 表达的比值进行比较后得出—相对量,从而计算出各组的基因表达量的相对变化量。

统计学处理:计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SAS 6.12 统计软件进行方差分析(GLM 过程),并用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果

2.1 MT 对仔猪肝脏抗氧化能力的影响

仔猪应激时注射外源性 Zn-MT 一段时间后,仔猪肝脏 SOD,

GSH-PX 活性升高,MDA 含量降低,抗活性氧和抗超氧阴离子水平也有提高的趋势.尤其在注射 Zn-MT 后 6 h 肝脏 SOD,GSH-PX 活性,MDA 含量各组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 1).

同时由表 1 知,注射相同剂量 Zn-MT 6 h SOD,GSH-PX 活性比 3 h 提高,且 III 组 6 h SOD,GSH-PX 活性比 3 h 提高($P < 0.05$),MDA 含量降低($P < 0.01$).各组肝脏抗活性氧和抗超氧阴离子水平 6 h 与 3 h 相比也有提高的趋势.

表 1 不同剂量的 MT 对仔猪肝脏中与抗氧化有关的指标的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	MDA ($\mu\text{mol/g}$)	SOD ($\mu\text{kat/g}$)	GSH-PX ($\mu\text{kat/g}$)	ROS ($\mu\text{kat/g}$)	SOA ($\mu\text{kat/g}$)
3 h					
对照	4.00 \pm 0.54	1717 \pm 321	675 \pm 23	2534 \pm 352	14606 \pm 658
0.8 mg/kg	3.70 \pm 0.59	2259 \pm 331	746 \pm 47 ^a	2779 \pm 219	14892 \pm 469
1.6 mg/kg	3.35 \pm 1.21	2578 \pm 225 ^a	743 \pm 13 ^a	2756 \pm 445	15216 \pm 801
6 h					
对照	3.72 \pm 0.13	1739 \pm 112	702 \pm 93	2625 \pm 162	15102 \pm 763
0.8 mg/kg	2.61 \pm 0.15 ^{ac}	2779 \pm 130 ^a	859 \pm 54 ^a	2876 \pm 218	15480 \pm 676
1.6 mg/kg	1.97 \pm 0.17 ^{bc}	3586 \pm 292 ^{bc}	894 \pm 47 ^{ac}	2889 \pm 220	16603 \pm 362 ^a

^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs 同一时间对照组;^c $P < 0.05$ vs 相同剂量处理下 3 h.

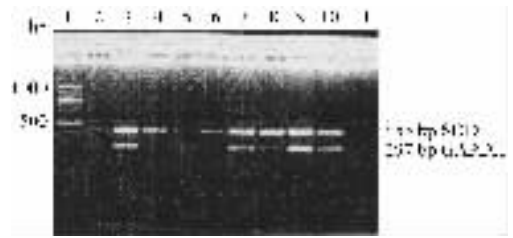
2.2 MT 对仔猪肝脏 SOD 基因表达水平的影响

由表 2 和图 1 2 可知,注射 MT 后 3 h 各组相比,肝脏 SOD 基因表达水平差异不显著($P > 0.05$).注射 MT 后 6 h 各组相比,III 组肝脏 SOD 基因表达水平比 I 组显著提高($P < 0.05$).注射相同剂量 Zn-MT 在不同的时间,第 1 组 3 h 与 6 h 肝脏中 SOD 基因表达水平相比差异不显著($P > 0.05$).第 2 组和第 3 组 6 h 肝脏中 SOD 基因表达水平比其 3 h 的显著提高($P < 0.05$).

表 2 不同剂量的 MT 对仔猪肝脏中 SOD 基因表达水平的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

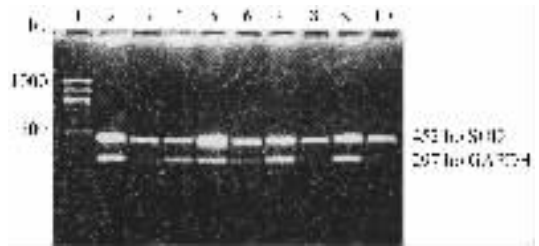
组别	3 h 肝脏 SOD/GAPDH	6 h 肝脏 SOD/GAPDH
对照	2.27 \pm 0.53	2.29 \pm 0.34
0.8 mg/kg	2.19 \pm 0.32	2.87 \pm 0.23 ^c
1.6 mg/kg	2.25 \pm 0.29	3.26 \pm 0.59 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 对照组;^c $P < 0.05$ vs 3 h.



1:marker;2~4:0.8 mg/kg 组;5~7:1.6 mg/kg 组;8~10:对照组;11:阴性对照组.

图 1 3 h 肝脏 SOD 基因表达的 RT-PCR 产物 20 g/L 琼脂糖电泳图



1:marker;2~4:对照组;5~7:0.8 mg/kg 组;8~10:1.6 mg/kg 组.

图 2 6 h 肝脏 SOD 基因表达的 RT-PCR 产物 20 g/L 琼脂糖电泳图

3 讨论

正常情况下,机体存在一个完整的包含酶系和非酶系的抗氧化系统,抗氧化酶有 SOD,GSH-PX 等,非酶系有 VE、还原性谷胱甘肽等,均有清除自由基的作用.在他们的协同作用下,使体内过多的自由基转变为无害的水,起到抗氧化的作用.羟自由基是最活跃,也是毒性较大的含氧自由基.由于至今体内尚未发现羟自由基的清除酶系,MT 有效地抗羟自由基作用显得重要. Adel 等^[5]比较了 MT 与谷胱甘肽抗羟自由基保护 DNA 的作用,发现当 MT 浓度为 13 $\mu\text{mol/L}$ 时,DNA 的降解几乎完全被抑制,而 10 mmol/L 的 GSH 才能达到此作用.而且在某些应激情况下,GSH 水平下降,而 MT 合成增加.本试验结果表明,注射外源 Zn-MT 后,在一定的时间和浓度下,可显著提高仔猪肝脏 SOD,GSH-PX 的活性,降低肝中 MDA 的含量.肝脏抗活性氧和抗超氧阴离子的水平也有提高的趋势,从而提高机体的抗应激能力.

本结果同时表明,仔猪应激时,外源性补充 Zn-MT 一段时间后,SOD mRNA 表达水平提高,SOD 的活性增加. Sugino 等^[6]研究小鼠的黄疸细胞发现 SOD 活性还受精胺的调控,这种调控是发生在转录水平. Zn-MT 中半胱氨酸含量丰富,在巯基化合物生成的同时,并有精氨酸残基,这样提供了 SOD 活性增强的物质基础.

【参考文献】

- [1] 祁克宗. 内毒素性微循环山羊氧自由基代谢的研究 [J]. 中国农业科学, 1999, 32(3): 90-95.
- [2] Zhou ZB. Effect of Zn7-metlothionein on oxidative stress in liver of rats with severe thermal injury [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(8): 764-760.
- [3] 郑军恒, 李海洋, 茹刚, 等. 金属硫蛋白清除羟自由基的研究 [J]. 北京大学学报: 自然科学版, 1999, 35(2): 573-576.
- [4] Hou DX, Fukuda M, Fujii M, et al. Transcriptional regulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase in murine hepatoma cells by 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocya-

nate, an active principle of wasabi (Eutrema Wasabi Maxim. [J]. Cancer Lett, 2000, 161: 195-200.

- [5] Adel J, de Ruiter N. Inhibition of hydroxyl radical-generated DNA degradation by metallothionein [J]. Toxicol Lett, 1989, 47: 191-196.
- [6] Sugino N, Telleria CM. Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in the rat corpus luteum induction of manganese superoxide dismutase messenger ribonucleic acid by inflammatory cytokines [J]. Biol Reprod, 1998, 59: 599-605.

编辑 黄良田

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)19-1736-01

静脉注射泵在心血管患者治疗中的应用与护理体会

梁悦平, 马小惠

(西安市第一医院干4科 陕西 西安 710002)

【关键词】静脉注射泵 心血管患者 护理 操作

【中图分类号】R472 【文献标识码】B

0 引言 静脉注射泵是一种用少量液体将药物精确、微量、均匀、持续地泵入体内的新型仪器, 在 ICU、CCU 病房广泛应用。我科从 2001-12 始使用静脉注射泵注射硝酸甘油、消心痛等药物治疗急、慢性心衰、冠心病、高血压危象等疾病。它能保持药物以均衡的速度 24 h 持续滴入, 符合心血管患者用药准确、剂量小、速度慢的特点, 保持治疗的稳定和顺利进行, 无不良反应发生。

1 临床资料 2001-12/2005-12, 360 例急慢性心衰、冠心病、高血压危象等患者均应用浙江大学医疗器械厂出产的 WU-50C2 型静脉注射泵治疗。静脉注射泵由泵、注射器、泵管 3 部分组成, 注射剂量 3~5 mL/h, 注射器选择一次 50 mL 规格, 泵管选择 80~120 cm 一次性延长管。泵入硝酸甘油或消心痛等注射液。固定注射泵, 连接交流电源, 检查注射泵的电路、管道和仪器状态。用 50 mL 注射器吸取液体 (按医嘱取 9 g/L 生理盐水 + 消心痛或硝酸甘油等均匀) [1]。其乳头与延长管的一端相连接, 排气后放入针管夹内, 推动滑座至可注射状态, 打开电源开关, 遵医嘱以每小时 3~5 mL 流量输入泵内显示器上, 按动启动键“Stop”, 可见注射指示, 为注射开始, 注射泵进入工作状态。

2 讨论 ①泵入前排尽注射器、延长管内空气, 防止空气栓

塞, 严格执行无菌操作技术, 每 24 h 更换注射器、延长管一次, 如有污染, 随时更换。②使用过程中注意检查液体是否渗漏或脱管, 当输液泵报警时, 应迅速查找原因, 作出相应处理。③加强监护, 密切观察病情。观察有无血压、脉搏、心率、呼吸及心电图改变, 血压每半小时测一次, 平稳后改 2 h 测一次, 密切观察患者面色、表情、四肢末梢循环及主诉, 病情一旦发生变化, 采取积极救护措施, 有效防止意外发生。

心血管患者液体量控制相对较严, 输液速度快则增加心脏负荷, 加重心衰; 单位时间内扩管药物进入过多过量, 则会引起血压突降、休克、甚至死亡; 输液速度过慢则易引起管道堵塞、凝血。目前此类患者普遍都用扩管药物, 根据药物作用及病情需要, 必须用尽可能少的液体, 使治疗用药准确、及时、缓慢、匀速注入体内 [2]。以上病例中的心血管患者若用普通输液器与液体连接, 静脉点滴此类药物时随着患者体位、肢体位置的改变, 输液速度忽快忽慢, 药量进入体内剂量不均, 容易引起各种不良后果, 需要护理人员随时观察和调节输液速度, 费时费力, 致使治疗延误, 影响病情恢复。使用注射泵则能维持恒定压力, 使药液按要求的剂量准确、均匀、持续地泵入, 当有堵塞时, 报警系统报警。报警常见原因有管道受压、扭曲或阻塞, 滑座与注射器分离, 停电或电源插销脱开。当患者烦躁、咳嗽、解大小便, 体位变换时容易出现。认真对待注射泵每一次报警, 护理人员及时排除报警原因, 是保证注射泵治疗的关键 [3]。使用注射泵最短的患者为 2~3 h, 最长的有连续 6~7 d 不间断 (根据病情和用药情况) 均没有发生不良反应。因此, 注射泵在心血管患者治疗过程中, 可随时观察药液注射速度, 随时调节, 易于观察患者病情变化, 并且使用方便, 用药剂量准确, 安全可靠, 节省人力物力, 保证了心血管患者病情及时控制, 达到早日康复的目的。

【参考文献】

- [1] 刘洋, 商行平. 硝酸甘油、多巴胺、多巴酚丁胺联合治疗难治性心力衰竭 [J]. 现代医学杂志, 2005, 22(18): 2828.
- [2] 尹红. 注射泵持续静脉注射硝酸甘油治疗冠心病心绞痛的探索 [J]. 现代医学杂志, 2005, 22(18): 2865.
- [3] 梁白香, 朱红梅. 中国医学理论与实践 [M]. 香港: 香港医药出版社, 2001: 725-726.

编辑 袁天峰

收稿日期 2006-08-22; 接受日期 2006-09-15

作者简介 梁悦平, 主管护师. Tel (029) 87630928