

# 静脉注射<sup>53</sup>Cr 标记吡啶甲酸铬对仔猪肝细胞 DNA 的影响

郭亮<sup>1,2</sup>, 张敏红<sup>1\*</sup>, 郑姗姗<sup>1</sup>, 冯京海<sup>1</sup>, 谢鹏<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112)

**摘要:** 旨在研究静脉注射不同水平<sup>53</sup>Cr 标记吡啶甲酸铬(<sup>53</sup>Cr(pic)<sub>3</sub>)对仔猪肝细胞 DNA 的影响。选取体质量(15.0±1.0) kg、健康的瘦肉型三元杂交(杜×长×大)公猪 30 头,按体质量、遗传背景相近的原则随机分成 5 组,每组 6 头,单笼个体饲养。每天早 08:00-10:00 分别对各组猪进行静脉注射, I (对照)、II、III、IV、V 组分别注射 0、8、200、400 和 800 μg Cr·d<sup>-1</sup>用<sup>53</sup>Cr 标记的吡啶甲酸铬, 试验期 14 d。检测指标有肝脏中抗氧化酶活性、尿中 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)浓度、肝组织中示踪剂铬的浓度及 DNA 链断裂(彗星试验)情况。随着静脉注射吡啶甲酸铬剂量的升高, 肝脏中抗氧化酶活性、尿液中 8-OHdG 的水平均未发生显著变化( $P>0.05$ ); 吡啶甲酸铬在肝脏中的蓄积量随着静脉注射吡啶甲酸铬水平的升高而增加, 且在 200 μg 以上达到显著( $P<0.05$ ); 在肝细胞彗星形状指标上, 除 8 和 200 μg 组彗星尾长显著低于对照组( $P<0.05$ )外, 各处理组彗星形状指标与对照组比较, 差异均不显著( $P>0.05$ ), 但 400 和 800 μg 组各项彗星复合指标显著高于 8 μg 组( $P<0.05$ ); 静脉注射吡啶甲酸 14 d, 800 μg Cr·d<sup>-1</sup>剂量范围内, 仔猪肝脏抗氧化酶活性未发生显著变化, 肝细胞 DNA 未受到氧化损伤; 但吡啶甲酸铬在肝组织的蓄积量显著升高, 且肝细胞 DNA 完整性与肝铬蓄积量之间存在显著量效关系。

**关键词:** <sup>53</sup>Cr 标记吡啶甲酸铬; 静脉注射; 仔猪; DNA

中图分类号: S828; S816.72

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)10-1487-07

## The Effects of <sup>53</sup>Cr -chromium Picolinate Injected in Vein on Piglet Hepatocytes DNA

GUO Liang<sup>1,2</sup>, ZHANG Min-hong<sup>1\*</sup>, ZHENG Shan-shan<sup>1</sup>, FENG Jing-hai<sup>1</sup>, XIE Peng<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Tianjin Institute of Animal Science, Tianjin 300112, China)

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the effects of different level <sup>53</sup>Cr(pic)<sub>3</sub> injected in vein on piglet hepatocytes DNA. Thirty (15.0±1.0) kg body weight male crossbred (D×L×Y) piglets were divided into five treatments with six replication each treatment, each was raised in one cage. In the 14 days experimental period, piglets in each treatment were respectively injected with 0, 8, 200, 400, 800 μg Cr·d<sup>-1</sup> at 08:00-10:00 every morning. The antioxidant enzymes activity in liver, the level of 8-OHdG in urine, the content of chromic in liver, and comet figure were measured. About the antioxidant enzymes activity in liver and the level of 8-OHdG in urine, no significant difference was detected among all groups ( $P>0.05$ ). The content of chromium in liver was increased by increasing <sup>53</sup>Cr(pic)<sub>3</sub>. Compared to control, the concentration of chromium in liver was markedly increased while the chromium injected was more than 200 μg Cr (<sup>53</sup>Cr(pic)<sub>3</sub>) ( $P<0.05$ ). In comparison with control, no significant difference was discerned in

收稿日期: 2008-09-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571350)

作者简介: 郭亮(1982-), 女, 河北唐山人, 硕士, 主要从事饲料添加剂研究, E-mail: liangliang820202@sohu.com

\* 通讯作者: 张敏红, E-mail: zmh66@126.com

comet figure, except the tail length of 8 and 200  $\mu\text{g}$  group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared to 8  $\mu\text{g}$  group, the indicators of comet assay in 400 and 800  $\mu\text{g}$  group increased significantly ( $P < 0.05$ ). Chromium picolinate below 800  $\mu\text{g Cr} \cdot \text{d}^{-1}$  injected in vein for 14 day, does not induce the change of antioxidant enzymes activity in liver and DNA oxidative damage, but the content of chromium in liver was increased with  $^{53}\text{Cr}(\text{pic})_3$  increasing, it has dose-effect relationship between the content of chromium in liver and DNA integrity in hepatocytes of piglet.

**Key words:**  $^{53}\text{Cr}$ -Chromium picolinate; injected in vein; piglet; DNA

铬是动物机体的必需微量元素之一,是葡萄糖耐量因子的活性成分,参与碳水化合物、脂类、蛋白质和核酸代谢<sup>[1]</sup>。吡啶甲酸铬因具有较高的吸收率<sup>[2]</sup>(2%~5%)而被作为有机铬的供源普遍使用。但自 1995 年首次报道吡啶甲酸铬的危害性之后,吡啶甲酸铬的安全性问题成为研究热点。对吡啶甲酸铬的毒性研究已得到一些数据,但结论不尽一致。一些报道指出吡啶甲酸铬在原核细胞和真核细胞中都能产生基因毒性,造成 DNA 解旋、断裂及氧化等损伤<sup>[3-4]</sup>。但这些研究均为体外或静脉注射试验,并且是在铬添加量远高于生理剂量的情况下。而在活体上,却鲜有吡啶甲酸铬诱导动物细胞 DNA 损伤的报道,即使在日粮添加量高于生理剂量数百倍的情况下,也未见基因毒性效应<sup>[5]</sup>。更有报道显示,添加吡啶甲酸铬对细胞 DNA 产生了抗氧化的保护作用<sup>[6-8]</sup>。可见,在吡啶甲酸铬对 DNA 影响的研究上存在很大的分歧,仍需进一步研究探讨。

迄今关于吡啶甲酸铬毒性的研究主要集中在人、鼠上,而其对猪等其他哺乳动物是否存在 DNA 损伤尚未见相关报道。静脉注射的方法能够避免口服摄取对于研究产生的如消化道吸收的复杂性、采食量不稳定等限制因素的影响,保证进入血液中的吡啶甲酸铬的量是确定的。因此,本试验采用静脉注射的方法,研究不同水平吡啶甲酸铬对仔猪细胞 DNA 的影响,并结合  $^{53}\text{Cr}$  示踪研究吡啶甲酸铬在仔猪肝脏内蓄积情况与肝细胞 DNA 断裂及机体 DNA 损伤的关系来阐述吡啶甲酸铬的安全性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物与试验设计

选取体质量(15.0±1.0)kg、健康的瘦肉型三元杂交(杜×长×大)公猪 30 头,按体质量、遗传背景相近的原则随机分成 5 组,每组 6 头,单笼个体饲养。每天早 08:00-10:00 分别对各组猪通过耳缘静脉进行注射,Ⅰ(对照)、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组分别注射 0、

8(适宜量)、200(25 倍适宜量)、400(50 倍适宜量)和 800  $\mu\text{g Cr} \cdot \text{d}^{-1}$ (100 倍适宜量)的吡啶甲酸铬(分别以生理盐水注射液配制成不同浓度等体积的溶液),试验期 14 d。自由采食和饮水,日粮参照 NRC(1998)和我国瘦肉型猪饲养标准(NY/T 65-2004)推荐的营养水平进行配制。

猪饲料中添加吡啶甲酸铬的适宜量为 200  $\mu\text{g Cr} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,仔猪采食量为 800  $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ ,按照吸收率 5% 计算可得适宜注射量为 8  $\mu\text{g Cr} \cdot \text{d}^{-1}$ 。有报道称小鼠静脉注射 25 倍适宜量的吡啶甲酸铬对 DNA 产生损伤效应<sup>[9]</sup>,据此设置添加水平为适宜量的 25、50 和 100 倍。

### 1.2 样品采集和处理

试验进行至第 7 和 14 天时,分别采集仔猪尿样,用以测定尿液 8-OHdG(8-羟基脱氧鸟苷)指标。试验结束后进行屠宰,分别采集 30 头仔猪的肝脏样品,各取出约 5 g 放入 PBS 中 4℃ 保存,用于单细胞凝胶电泳试验。其余肝脏样品用 PBS 漂洗干净后编号装袋,迅速投于液氮冻存,用于测定组织中抗氧化酶活性、脂质过氧化物水平和示踪剂铬浓度。

### 1.3 评价指标与测定方法

1.3.1 肝脏中抗氧化酶活性的测定 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutases, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)的活性使用南京建成生物工程研究所提供的相关试剂盒测定。

1.3.2 DNA 氧化损伤指标的测定 尿样中 8-OHdG 使用日本抗老化研究所(Japan institute for the Control of Aging)提供的试剂盒用酶联免疫法(ELISA)测定。用苦味酸法检测尿液中肌酐的水平以校正 8-OHdG 浓度,消除由于动物排尿量不同而引起的差异。尿液中的肌酐由南京建成生物工程研究所提供的相关试剂盒测定。

1.3.3 肝组织中示踪铬浓度的测定 所有玻璃器具每次使用前在 10% 硝酸溶液中浸泡 24 h 以

上,再用超纯水清洗,烘干。将仔猪肝组织烘干,粉碎。取 1 g 组织于 100 mL 三角瓶中加入 10 mL HNO<sub>3</sub>,放置过夜。以恒温电热板加热 180~200 °C,消化 6~8 h,至溶液澄清透明,消化完全为止。超纯水定容至 10 mL,ICP-MS 上机检测。

ICP-MS 工作条件:射频功率 1 400 W,反应气(H<sub>2</sub>) 5 mL·min<sup>-1</sup>,雾化器流量:1.0 L·min<sup>-1</sup>,采

$$R(52,53) = \frac{{}^{52}\text{An}(M_1/mn) + {}^{52}\text{An}(M_2/mn) + {}^{52}\text{As}(M_3/ms)}{{}^{53}\text{An}(M_1/mn) + {}^{53}\text{An}(M_2/mn) + {}^{53}\text{As}(M_3/ms)} \quad (1)$$

$$R(52,53) = \frac{{}^{52}\text{An}/mn(M_1+M_2) + {}^{52}\text{As}(M_3/ms)}{{}^{53}\text{An}/mn(M_1+M_2) + {}^{53}\text{As}(M_3/ms)}$$

其中,

$$M_1 + M_2 = Mt - M_3 \quad (2)$$

由公式(1)、(2)可得 M<sub>3</sub> 的计算公式。

R(52,53):肝组织中<sup>52</sup>Cr、<sup>53</sup>Cr 的原子数之比;  
<sup>53</sup>An、<sup>52</sup>An :<sup>53</sup>Cr、<sup>52</sup>Cr 各自的天然丰度(9.5%、83.8%);<sup>53</sup>As、<sup>52</sup>As :示踪剂中<sup>53</sup>Cr、<sup>52</sup>Cr 各自的丰度(98%、1.85%);mn、ms :天然 Cr、示踪剂 Cr 各自的平均原子量(51.996、52.982)。R(52,53)和 Mt 需要试验测定,其余量可查得。计算得到肝组织中示踪剂 Cr 的质量 M<sub>3</sub>,与肝组织取样质量的比值即为组织中示踪剂铬的浓度。

1.3.4 仔猪肝细胞 DNA 链断裂测定(单细胞凝胶电泳试验,彗星试验) 单细胞悬液的制备:将取出的新鲜仔猪肝脏用 PBS 冲洗,洗去血污,并用眼科弯剪剪成糜状,反复漂洗。然后用胶原酶(2 mg·mL<sup>-1</sup>)按 4 mL·g<sup>-1</sup>肝组织,37 °C 酶解 20 min。以胎牛血清终止酶解,200 目细胞筛过滤,将滤液以 900 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,去上清液,加入适量 PBS,900 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,洗涤 3 次。将细胞悬浮于 PBS 中,(加 PBS 要定量)所得细胞用 0.4%台盼蓝染色,检测细胞浓度和存活率,调细胞浓度至 >10<sup>6</sup>个·mL<sup>-1</sup>。存活率不低于 90%。置 4 °C 冰箱备用。

单细胞凝胶电泳方法:在毛玻璃上铺一层 0.9% 的正常熔点琼脂糖(75 μL),第二层为含大约 10 000 个细胞(<10 μL 细胞悬液)的 0.9%低熔点琼脂糖(75 μL)。将制好的玻片置于新鲜的细胞裂解液中裂解 1.5 h(4 °C,避光)。去裂解液,用蒸馏水清洗 2~3 次玻片,置于碱性电泳液中放置 20~30 min,使 DNA 双链解螺旋。然后在 25 V、300 mA 条件下电泳 20 min。用 Tris-HCl 中和液中中和 3 次,略干后,滴加 50 μL SYBR Green I(5 μg·mL<sup>-1</sup>)染色,盖上

样深度 8.0 mm,样品提升率 100 μL·min<sup>-1</sup>,分析室真空 6.74×10<sup>-3</sup> Pa。

肝组织中的总 Cr 包括 3 部分:试验期前肝脏内存留 Cr、食源 Cr、源于示踪剂 Cr,3 部分 Cr 的质量分别为 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>,总 Cr 质量为 Mt,

同位素比值计算如公式(1):

盖玻片,5 min 后上镜观察。

运用荧光显微镜在蓝光下观察试验玻片,被染 DNA 核团和断裂的 DNA 呈绿色,整个图形在电泳条件下呈拖尾的彗星状,每张片观察 100~200 个细胞。然后彗星图像用 CASP 软件对每个细胞分析处理。所测指标包括:彗星尾部 DNA 百分比、彗尾长、彗尾长/彗星长度、尾矩、Oliver 矩。

#### 1.4 数据处理

运用 SAS9.0 软件中的一般线性模型(General linear model, GLM)程序对试验数据进行方差分析,F 检验差异显著时,使用 Duncan's multiple range test 比较各平均数间的差异显著性。试验结果以平均数±标准误表示。差异显著性标准为 P<0.05。

## 2 结果

### 2.1 静脉注射<sup>53</sup>Cr(pic)<sub>3</sub> 对肝脏中抗氧化酶活性的影响

肝脏中抗氧化酶活性的变化情况见表 1,随着静脉注射吡啶甲酸铬水平的升高,肝脏中抗氧化酶活性没有发生显著变化(P>0.05)。

表 1 静脉注射<sup>53</sup>Cr(pic)<sub>3</sub> 对肝脏中抗氧化酶活性的影响(n=6)  
Table 1 Effect of <sup>53</sup>Cr(pic)<sub>3</sub> injected in vein on antioxidant enzymes activity in liver(n=6) U·mg<sup>-1</sup> protein

处理/μg Treatment	CAT	GSH-Px	SOD
0	250.20±21.89	100.54±6.82	264.70±21.09
8	238.10±29.42	117.00±12.73	273.40±19.73
200	248.14±34.4	103.02±3.26	267.20±12.47
400	244.30±24.41	101.19±6.98	266.00±22.07
800	248.60±16.64	96.50±4.14	251.82±14.95

数值肩标有不同字母者表示差异显著(P<0.05)。下表同  
Means with different superscripts within a row differ significantly (P<0.05). The same as following tables

### 2.2 静脉注射吡啶甲酸铬对尿液中 8-OHdG 的影响

试验第 7、14 天时尿液中 8-OHdG 的含量变化情况见表 2,随着静脉注射吡啶甲酸铬剂量的升高,试验第 7 和 14 天时,尿液中 8-羟基脱氧鸟苷的含量都有先下降后再上升的变化趋势,但是各组的差异并未达显著水平( $P>0.05$ )。这说明本研究条件下吡啶甲酸铬对尿液中 8-羟基脱氧鸟苷无显著影响。

表 2 试验第 7 和 14 天时尿液中 8-OHdG 的含量变化情况 (n=6)

Table 2 Effect of chromium picolinate on 8-OHdG content of urine in 7 and 14 days(n=6)  $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  creatinine

处理/ $\mu\text{g}$	第 7 天	第 14 天
Treatment	7th day	14th day
0	32.22±7.52	28.06±4.02
8	24.55±4.85	23.67±3.29
200	30.33±6.36	24.27±4.77
400	31.65±5.6	25.56±4.29
800	30.95±7.9	26.56±3.1

### 2.3 静脉注射 $^{53}\text{Cr}(\text{pic})_3$ 对仔猪肝脏中示踪铬浓度的影响

静脉注射 $^{53}\text{Cr}(\text{pic})_3$ 对肝脏中示踪铬的浓度影响见表 3,随着静脉注射 $^{53}\text{Cr}(\text{pic})_3$ 剂量的升高,肝脏中示踪铬浓度也随之增加,与对照组相比,200  $\mu\text{g}$  以上各组均达到显著( $P<0.05$ ),表明静脉注射 $^{53}\text{Cr}(\text{pic})_3$ 剂量达 200  $\mu\text{g}$  可使仔猪肝组织中铬蓄积量显著增加。

### 2.4 静脉注射 $^{53}\text{Cr}(\text{pic})_3$ 对仔猪肝细胞 DNA 损伤的影响

注射不同浓度吡啶甲酸铬对仔猪肝细胞 DNA 链断裂的影响见表 4 和图 1。其中,8  $\mu\text{g}$  组 DNA 断裂程度最小,随着吡啶甲酸铬浓度的增加,彗星尾部 DNA 含量逐渐升高,400 和 800  $\mu\text{g}$  组尾部 DNA 含量显著高于 8、200  $\mu\text{g}$  组( $P<0.05$ ),但 4 个处理组与对照组之间无显著差异( $P>0.05$ )。

表 5 不同水平吡啶甲酸铬对彗星复合指标的影响

Table 5 Effects of different concentration of chromium picolinate on indicators of comet assay of piglet hepatocytes

处理/ $\mu\text{g}$	彗星长/彗星长度	尾矩	Oliver 矩
Treatment	Ratio comet tail length to comet length	Tail moment	Oliver tail moment
0	0.125±0.006 <sup>ab</sup>	0.983±0.159 <sup>ab</sup>	0.778±0.116 <sup>ab</sup>
8	0.071±0.004 <sup>b</sup>	0.031±0.009 <sup>b</sup>	0.130±0.019 <sup>b</sup>
200	0.111±0.011 <sup>ab</sup>	0.278±0.189 <sup>b</sup>	0.321±0.159 <sup>b</sup>
400	0.167±0.028 <sup>a</sup>	2.936±1.338 <sup>a</sup>	1.943±0.716 <sup>a</sup>
800	0.162±0.021 <sup>a</sup>	3.073±0.882 <sup>a</sup>	1.940±0.537 <sup>a</sup>

仔猪肝细胞彗星尾长测定结果显示,8  $\mu\text{g}$  吡啶甲酸铬处理组彗星尾长最短,400 和 800  $\mu\text{g}$  组虽然与对照组差异不显著( $P>0.05$ ),但显著高于 8 和 200  $\mu\text{g}$  组( $P<0.05$ )。

表 3 静脉注射 $^{53}\text{Cr}(\text{pic})_3$ 对肝脏中示踪铬浓度的影响

Table 3 Effect of  $^{53}\text{Cr}(\text{pic})_3$  on the content of chromium in liver  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$

处理/ $\mu\text{g}$	示踪铬浓度
Treatment	The content of chromium
0	0.59±0.15 <sup>d</sup>
8	1.15±0.12 <sup>d</sup>
200	23.00±3.96 <sup>c</sup>
400	72.05±8.07 <sup>b</sup>
800	147.45±14.50 <sup>a</sup>

表 4 不同水平吡啶甲酸铬对猪肝细胞 DNA 完整性的影响

Table 4 Effects of different concentration of chromium picolinate on DNA integrity of piglet hepatocytes

处理/ $\mu\text{g}$	彗星尾部 DNA 百分比/%	彗星尾长/ $\mu\text{m}$
Treatment	Percentage of comet tail DNA	Comet tail length
0	3.288±0.458 <sup>ab</sup>	7.554±0.388 <sup>a</sup>
8	0.746±0.144 <sup>b</sup>	3.261±0.122 <sup>b</sup>
200	1.554±0.483 <sup>b</sup>	4.004±0.567 <sup>b</sup>
400	6.322±1.988 <sup>a</sup>	9.233±1.887 <sup>a</sup>
800	5.733±1.303 <sup>a</sup>	9.144±1.319 <sup>a</sup>

彗星长/彗星长度、尾矩和 Oliver 尾矩均为彗星试验复合指标,能较彗星尾部 DNA 百分比、彗星尾长更准确地反映 DNA 链的完整性。结果如表 5 和图 1 所示,随着吡啶甲酸铬注射量逐渐增大,彗星长/彗星长度、彗星尾矩、Oliver 矩在 8  $\mu\text{g}$  处最小,之后数值逐渐增大。400 和 800  $\mu\text{g}$  组彗星长/彗星长度显著高于 8  $\mu\text{g}$  组,400 和 800  $\mu\text{g}$  组的尾矩和 Oliver 尾矩显著高于 8 和 200  $\mu\text{g}$  组( $P<0.05$ )。其余各处理组间差异均不显著( $P>0.05$ )。

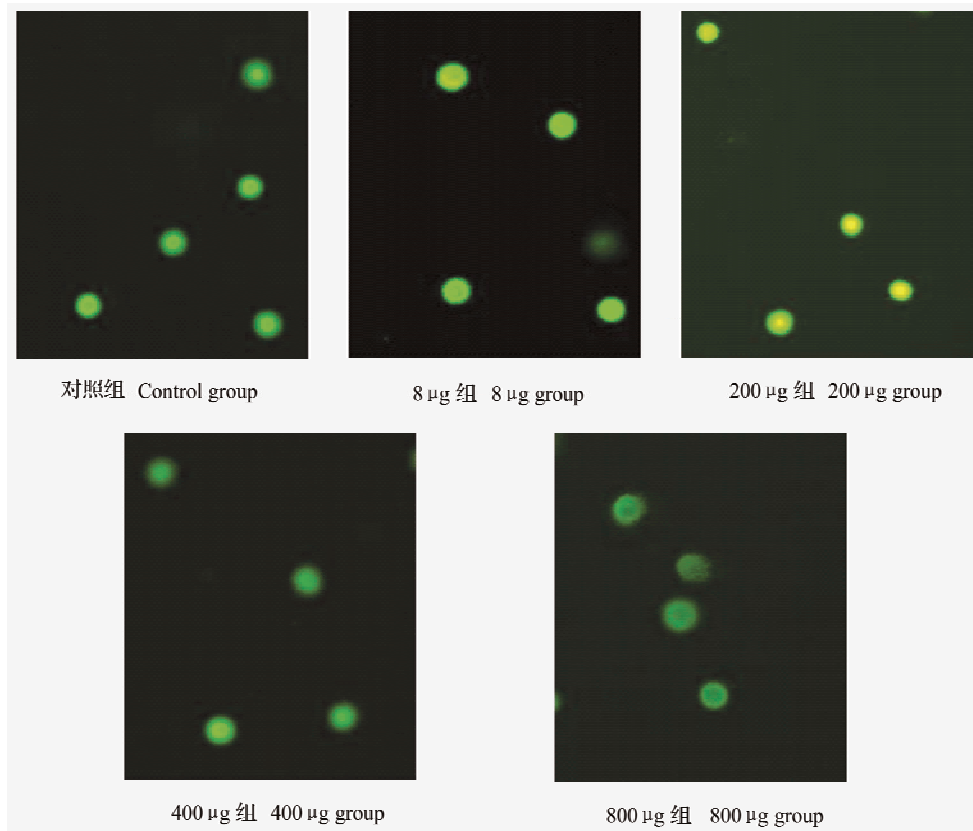


图 1 不同吡啶甲酸铬添加水平的猪肝细胞单细胞凝胶电泳(SCGE)图(200×)

Fig. 1 Photomicrographs of piglet hepatocytes following  $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$  treatments and single-cell gel electrophoresis(200×)

### 3 讨论

目前,吡啶甲酸铬对细胞 DNA 影响的研究结果不一致。一些研究得到高剂量吡啶甲酸铬能使细胞 DNA 产生损伤。Stohs 等<sup>[3]</sup>研究发现,高剂量( $120 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )吡啶甲酸铬可造成巨噬细胞 J774A.1 的 DNA 链断裂。小鼠淋巴细胞毒理试验表明,不管是否添加小鼠肝脏 S9 代谢激活物, $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (150 倍适宜量)、 $2.39 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 吡啶甲酸铬均显著诱导淋巴细胞基因突变<sup>[10]</sup>。而另外一些研究并未观察到高剂量吡啶甲酸铬损伤细胞 DNA。Gudi 等<sup>[11]</sup>向 CHO 细胞培养基中添加吡啶甲酸铬的剂量达  $770 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,不管是否添加 S9 代谢活化物,20 h 后并未发现 CHO 细胞出现明显的结构和数量上的染色体异常。Andersson 等<sup>[12]</sup>给小鼠腹腔注射  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$  吡啶甲酸铬,小鼠淋巴细胞和肝细胞都未产生 DNA 断裂。同时也有研究发现,低剂量吡啶甲酸铬对于 DNA 具有抗氧化的保护作用,Hininger 等<sup>[8]</sup>报道,低剂量( $5 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )吡啶甲酸铬显著降低了  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起

的人 HaCAT 细胞 DNA 链断裂数量。Jain 等<sup>[13]</sup>研究发现, $5 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cr(III)表现为对机体的抗氧化保护作用。在人 II-型糖尿病研究中,也发现 Cr(III)具有抗氧化作用<sup>[6-7]</sup>。但迄今为止,未见有关不同剂量吡啶甲酸铬对猪细胞 DNA 影响的报道。肝脏是动物体内具有物质代谢、免疫防御、血液凝固等多重功能的重要器官。因此,本试验通过测定仔猪肝脏氧化指标、尿中 8-OHdG 含量、肝脏<sup>53</sup>Cr 浓度及肝细胞 DNA 完整性研究不同剂量吡啶甲酸铬对仔猪肝脏 DNA 的影响及与<sup>53</sup>Cr 蓄积量的量效关系。

抗氧化酶系统是维持机体氧化状态平衡的屏障之一,主要包括 SOD、GSH-Px、CAT 等。SOD 是  $\text{O}_2^-$  的天然消除剂;GSH-Px 则对由活性氧和羟自由基诱发的脂质过氧化物及过氧化氢有极强的清除能力;CAT 能催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成  $\text{H}_2\text{O}$  与  $\text{O}_2$ ,使  $\text{H}_2\text{O}_2$  不至于反映生成有害的羟自由基( $\text{OH}\cdot$ ),以减轻  $\text{H}_2\text{O}_2$  对细胞的氧化损伤。这些抗氧化酶共同参与维持机体氧化状态的动态平衡。当机体 ROS(活性氧)的产生量超过体内自由基清除能力时,ROS 可

使 DNA 链上的鸟嘌呤碱基的 C-8 位发生羟化而生成 8-OHdG。机体修复时,8-OHdG 从 DNA 链上切下后入血经尿液排出体外。尿中 8-OHdG 是 DNA 氧化损伤的标志性产物<sup>[14]</sup>。本试验通过测定尿液中的 8-OHdG 水平这一指标来反应动物机体 DNA 的氧化损伤情况。试验中静脉注射吡啶甲酸铬剂量在 800  $\mu\text{g}$  范围内,对仔猪肝脏抗氧化酶活性无显著影响;尿液中 8-OHdG 水平无显著变化,表明试验剂量的吡啶甲酸铬并没有导致 DNA 氧化损伤。Kato 等对 10 位每日服用 400  $\mu\text{g}$  吡啶甲酸铬肥胖女士观察,发现 8 周后尿样中 DNA 碱基氧化产物 5-羟甲基尿嘧啶水平也没有发生变化<sup>[15]</sup>。

本研究采用同位素示踪法,准确评价静脉注射<sup>53</sup>Cr 标记吡啶甲酸铬剂量与仔猪肝脏<sup>53</sup>Cr 蓄积量的关系,以便进一步准确评价仔猪肝细胞 DNA 完整性与肝脏<sup>53</sup>Cr 蓄积量之间的量效关系。试验得出,肝脏中<sup>53</sup>Cr 蓄积量随静脉注射吡啶甲酸铬水平的增加而显著升高。这与 Anderson 和 Lindemann<sup>[5,16]</sup>等在猪上的研究结果类似。Lindemann 等<sup>[16]</sup>给繁殖母猪日粮中添加 0、200、600、1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cr (吡啶甲酸铬形式),肝中铬浓度呈线性增加。Anderson 等<sup>[5]</sup>给 30~60 kg 猪日粮中添加吡啶甲酸铬 300  $\mu\text{gCr} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,肝脏中总铬由 5.9  $\mu\text{g}$  增加到 8.8  $\mu\text{g}$ 。

单细胞凝胶电泳 (single-cell gel electrophoresis, SCGE) 又称彗星试验,是一种快速、灵敏、简便检测 DNA 损伤的方法。本试验发现,从适宜量开始,随着吡啶甲酸铬注射量的逐渐增大,各彗星指标值逐渐升高,高剂量(400 和 800  $\mu\text{g}$ )组虽与对照组差异不显著,但显著高于适宜量(8  $\mu\text{g}$ )组( $P < 0.05$ )。而肝脏<sup>53</sup>Cr 浓度也随吡啶甲酸铬注射水平的升高而增加,高剂量组肝脏<sup>53</sup>Cr 浓度(72.05、147.45  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )也显著高于适宜量组(1.15  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ),可见,肝脏<sup>53</sup>Cr 蓄积量与肝细胞 DNA 完整性之间存在显著量效关系。前已述及,静脉注射吡啶甲酸铬第 14 天,800  $\mu\text{g Cr} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量范围内,仔猪肝细胞 DNA 未受到氧化损伤,即不同试验剂量吡啶甲酸铬对肝细胞 DNA 完整性的影响并不是由氧化损伤引起。那么从已有的报道中可以推测,注射适宜量(8  $\mu\text{g}$ )吡啶甲酸铬与高剂量的吡啶甲酸铬处理相比,显著降低肝细胞的彗星形状指标的原因,可能是高剂量时 Cr(III)与 DNA 分子交联而引起损伤效应<sup>[17-18]</sup>。但其确切原因,有待于进一步研究。

## 4 结 论

静脉注射吡啶甲酸铬 14 d,800  $\mu\text{g Cr} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量范围内,仔猪肝脏抗氧化酶活性未发生显著变化,肝细胞 DNA 未受到氧化损伤;但吡啶甲酸铬在肝组织的蓄积量随静脉注射吡啶甲酸铬水平的增加而升高,且肝细胞 DNA 完整性与肝铬蓄积量之间存在显著量效关系。

## 参考文献:

- [1] 张伟,韩友文. 铬的营养作用机制研究进展[J]. 中国饲料,2000,13:16-18,26.
- [2] ANDERSON R A, BRYDEN N A, POLANSKY M M, et al. Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats [J]. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 1996, 9(1): 11-25.
- [3] STOHS S J, BAGCHI D, BAGCHI M, et al. Comparative induction of oxidative stress in cultured J774A. 1 macrophage cells by chromium picolinate and chromium nicotinate [J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1998, 97: 335-346.
- [4] SPEETJENS J K, COLLINS R A, VINCENT J B, et al. The nutritional supplement chromium(III) tris (picolinate) cleaves DNA [J]. *Chem Res Toxicol*, 1999, 12: 483-487.
- [5] ANDERSON R A, BRYDEN N A, EVOCK-CLOVER C M, et al. Beneficial effects of chromium on glucose and lipid variables in control and somatotropin-treated pigs are associated with increased tissue chromium and altered tissue copper, iron, and zinc[J]. *J Anim Sci*, 1997, 75(3): 657-661.
- [6] ANDERSON R A, ROUSSEL A M, ZOUARI N, et al. Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus[J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2001, 20: 212-218.
- [7] CHENG H H, LAI M H, HOU W C, et al. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, 52: 1385-1389.
- [8] HININGER I, BENARABA R, OSMAN M, et al. Safety of trivalent chromium complexes: No evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2007, 42(12):

- 1759-1765.
- [9] HEPBURN D D D, BURNEY J M, WOSKI S A, et al. The nutritional supplement chromium picolinate generates oxidative DNA damage and peroxidised lipids *in vivo*[J]. *Polyhedron*, 2003, 22: 455-463.
- [10] WHITTAKER P, SAN H C R, CLARKE J J, et al. Mutagenicity of chromium picolinate and its components in *Salmonella typhimurium* and L5178Y mouse lymphoma cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43 (11): 1619-1625.
- [11] GUDI R, SLESINSKI R S, CLARKE J J. Chromium picolinate does not produce chromosome damage in CHO cells[J]. *Mutat Res*, 2005, 587 (1-2): 140-146.
- [12] ANDERSSON M A, PETERSSON GRAWE K V, KARLSSON O M, et al. Evaluation of the potential genotoxicity of chromium picolinate in mammalian cells *in vivo* and *in vitro*[J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(7):1097-1106.
- [13] JAIN S K, KANNAN K. Chromium chloride Inhibites oxidative stress and TNF- $\alpha$  secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2001, 289(3): 687-691.
- [14] LAMSON D W, PLAZA S M. The safe and efficacy of high-dose chromium[J]. *Alternative Medicine Review*, 2002, 7(3):218-235.
- [15] KATO I, VOGELMAN J H, DILMAN V, et al. Effect of supplementation with chromium picolinate on antibody titers to 5-hydroxymethyl uracil [J]. *Eur. J. Epidemiol*, 1998, 14: 621-626.
- [16] LINDEMANN M D, CARTER S D, CHIBA L I, et al. A regional evaluation of chromium tripicolinate supplementation of diets fed to reproducing sows[J]. *J Anim Sci*, 2004, 82: 2972-2977.
- [17] SNOW E T. Effects of chromium on DNA replication *in vitro* [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1994, 102(S-3):41-44.
- [18] KAREUS S A, KELLEY C, WALTON H S, et al. Release of Cr(III) from Cr(VI) picolinate upon metabolic activation[J]. *J Hazardous Mat*, 2001, B84: 163-174.