

亚硒酸钠对四氯化碳损伤草鱼 肝原代细胞与肝组织的保护作用

谢巧雄¹⁾ 朱心玲 卢全章

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

不同浓度四氯化碳(CCl_4)对草鱼肝原代细胞的损伤实验中, CCl_4 浓度为 $10\mu\text{l}/\text{ml}$ 可引起细胞血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)逸出量与细胞破损率显著增高,培养液中添加亚硒酸钠(Na_2SeO_3) $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$,则可降低ALT、AST、LDH的逸出量,减轻细胞破损程度。 Na_2SeO_3 保护实验中, $\text{Na}_2\text{SeO}_3+\text{CCl}_4$ 组预先腹腔注射(ip) $0.1\text{mg}/\text{kg.bw}$ 连续三日,末次ip CCl_4 混合液 $1\text{ml}/\text{kg.bw}$,24h内肝组织超氧化物歧化酶(SOD)相对活性比 CCl_4 组提高达91.5%,第七日仍提高达54.5%,与对照组的水平基本接近;血清中丙氨酸氨基转氨酶(ALT)水平逐渐降低。本实验还观察到 Na_2SeO_3 可引起肝脂质过氧化物显著降低,肝微粒体蛋白含量与细胞色素P-450活性升高;组织切片观察显示肝组织损伤程度减轻,72h后细胞核增多。表明 Na_2SeO_3 可提高草鱼肝清除自由基能力,增强肝脏解毒功能。

关键词 亚硒酸钠,肝原代细胞,肝组织,保护作用,草鱼

草鱼是我国主要淡水养殖鱼类之一,然而,由于草鱼易患细菌性与病毒性疾病,严重影响草鱼成活率。作者在进行草鱼出血病的病理生理研究中发现病原体对鱼体侵袭的靶器官主要是肝脏,损伤正常肝脏组织,破坏肝脏的正常功能,最终导致草鱼死亡^[1]。近年来,发现亚硒酸钠(Na_2SeO_3)对动物肝组织损伤有一定修复作用^[2],然而,关于 Na_2SeO_3 是否具抗肝病引起的鱼体肝组织损伤的作用,却报道较少,为此,本研究探讨采用 CCl_4 引起的草鱼原代细胞与肝组织损伤模型,观察 Na_2SeO_3 对草鱼肝组织的保护作用。

1 材料与方法

当龄草鱼(*Ctenopharyngodon idellus* Cuvier et Valenciennes)取自本所试验场,平均体重 $45\pm 5\text{g}$,在去氯气的自来水中静养24h,备用。

1.1 草鱼的原代肝细胞的分离与培养 无菌条件下,取出肝组织,切成2—4mm小块,0.1%胰蛋白酶冷消化,离心过滤后,分离和收集肝细胞,台盼蓝染色计数细胞后,用含

1) 现工作单位:贵州省水产技术推广站,贵阳 550001
1993年10月4日收到。

10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释至 3×10^6 个细胞 / ml, 接种于 15ml 培养瓶中, 在 28℃ 条件下培养。

1.2 肝细胞损伤模型 按[3]法分离的草鱼肝细胞以 3×10^6 个 / ml 预培养 1h 后, 分别加入 CCl_4 0、1、2、5、10 μl / ml, 培养 1h, 用倒置显微镜观察细胞, 计算细胞破损率, 取上清液按赖氏法测定丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (AST), 2, 4 二硝基苯肼显色法测定乳酸脱氢酶 (LDH) [3]。

1.3 Na_2SeO_3 对草鱼肝细胞的保护实验 细胞培养液中预先加入 Na_2SeO_3 0.2 μg / ml, 按[3]法分离的草鱼肝细胞以 3×10^6 个 / ml 预培养 1h 后, 加入 CCl_4 10 μl / ml, 继续培养 1h, 计算细胞破损率, 测定 ALT、AST、LDH 的逸出量。

1.4 CCl_4 对肝组织的影响及 Na_2SeO_3 的保护试验 临用前, Na_2SeO_3 配成 0.1mg / ml, CCl_4 与无菌液体石蜡按 1 : 3 的比例混和。取草鱼 80 尾, 分四组。两组 ip Na_2SeO_3 0.1mg / kg.bw; 两组 ip 等量的生理盐水。每日一次, 连续三日。末次 ip 12h 后, Na_2SeO_3 + CCl_4 组与 CCl_4 组均 ip CCl_4 混合液 1ml / kg.bw; Na_2SeO_3 对照组与空白组 ip 同量液体石蜡代替 CCl_4 。次日取肝组织制备成肝微粒体, 用 Lowry 方法测定蛋白质含量 [4], 用 Omura 方法测定微粒体细胞色素 P-450 含量 [5], Ohkawa 法测丙二醛 (MDA) [6]。间隔一、三、七日取血清用赖氏法测 ALT, 肝组织用 Misra 法测超氧化歧化酶 (SOD) [7]、Der Vies 法测定肝糖原 [8]。取鱼肝组织, 用 Bouin 氏液固定, 苏木精-伊红染色, 作光镜观察。

2 结果

2.1 CCl_4 的剂量对肝细胞的影响及 Na_2SeO_3 的保护作用 当 CCl_4 与肝细胞同时培养 1h, CCl_4 量为 1、2、5 μl / ml 时, 肝细胞的 ALT、AST、LDH 的逸出量与对照组无显著变化, 当 CCl_4 剂量为 10 μl / ml 时, 肝细胞的 ALT、AST 的逸出量明显增高 ($P < 0.01$), LDH 的逸出量增高 ($P < 0.05$)。 CCl_4 剂量为 5、10 μl / ml 时, 肝细胞破损率增高。

表 1 CCl_4 与 Na_2SeO_3 对肝原代细胞的影响 (n = 4x ± S.D)
Tab.1 Effects of CCl_4 and sodium selenite on primary hepatic cells in grass carp

$\text{CCl}_4(\mu\text{l} / \text{ml})$	ALT(U)	AST(U)	LDH(U)	细胞破损率(%)
				percentage of cells damage
0	41 ± 10	26 ± 11	1876 ± 546	12 ± 6
1	32 ± 13	32 ± 18	1783 ± 475	15 ± 5
2	47 ± 12	24 ± 13	1989 ± 621	22 ± 6
5	40 ± 8	35 ± 12	2139 ± 604	30 ± 14 *
10	83 ± 17 * *	75 ± 23 * *	3061 ± 711 *	81 ± 24 * *
10+ Na_2SeO_3	50 ± 15 *	42 ± 12 *	2256 ± 647	43 ± 12 *

备注(Note): * * $P < 0.01$, * $P < 0.05$

3×10^6 / ml 草鱼肝细胞分别加入含 Na_2SeO_3 0.2 μg / ml 的培养液与不含 Na_2SeO_3

培养液均培养 1h, 再加入 $\text{CCl}_4 10\mu\text{l} / \text{ml}$, 继续培养 1h, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{CCl}_4$ 组同 CCl_4 组相比, 肝细胞 ALT、AST、LDH 的逸出量分别下降 40%, 44%, 26%。肝细胞破损率下降 46% (表 1)。

2.2 Na_2SeO_3 对 CCl_4 引起肝组织 SOD 变化的影响

按方法 4 所述, ip CCl_4 间隔 1、3、7 日取样测定 SOD。结果表明, 第一日 CCl_4 组的草鱼肝组织 SOD 的相对活性仅为对照组的 60.9%, 下降了 39.1%, 第三日略有回升, 但第七日仍降低 37.2%; 而 $\text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{CCl}_4$ 组的草鱼肝组织 SOD 的相对活性在第一日为对照组的 116.6%, 比 CCl_4 组增高 91.5%, 到第七天为对照组的 97%, 基本保持与对照组一致水平, 仍比 CCl_4 提高 54.5%。 Na_2SeO_3 对照组 SOD 的相对活性在第一日比对照组提高 30.1%, 到第七日仍提高 7.9%。显示 Na_2SeO_3 不仅可增加肝 SOD 的活性, 而且能抑制 CCl_4 引起的 SOD 的下降 (表 2)。

表 2 Na_2SeO_3 对草鱼肝组织超氧歧化酶的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tab.2 Effect of sodium selenite on hepatic superoxide dismutase (SOD) activity in grass carp

组别 Groups	鱼数 Number of fishes	SOD 活性(μ / mg .肝蛋白) SOD activity (μ / mg .protein)			SOD 相对活性百分率(%) SOD relative activity (%)		
		第一日	第三日	第七日	第一日	第三日	第七日
		1st day	3rd day	7th day	1st day	3rd day	7th day
对照组 Control	6	28.9 \pm 4.0	22.7 \pm 6.4	26.6 \pm 3.3	100.0	100.0	100.0
CCl_4 组 CCl_4	6	17.6 \pm 2.0	18.4 \pm 4.6	16.7 \pm 3.4	60.9	81.1	62.8
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{CCl}_4$ 组 $\text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{CCl}_4$	6	33.7 \pm 4.7	31.1 \pm 3.7	25.8 \pm 2.3	116.6	137.0	97.0
Na_2SeO_3 对照组 Na_2SeO_3 control	6	37.6 \pm 8.7	29.0 \pm 1.2	28.7 \pm 3.3	130.1	127.8	107.9

注(Note):

SOD相对活性百分率(SOD relative activity %)= $\frac{\text{各组SOD活性(SOD activity of each group)}}{\text{对照组SOD活性(SOD activity of control)}} \times 100$

2.3 Na_2SeO_3 对 CCl_4 引起血清 ALT 变化的影响

表 3 所示, ip CCl_4 混合液 1ml / kg.bw 后 24h 内, 血清 ALT 活性显著升高 ($P < 0.01$), 直到第七日仍维持不变。 Na_2SeO_3 预处理的草鱼, 再 ip CCl_4 24h 内测得的血清 ALT 的活性与 CCl_4 无差异, 但第三、七日测得的血清 ALT 则明显降低 ($P < 0.05$)。 Na_2SeO_3 对照组的草鱼血清 ALT 的活性与对照组无差异 ($P > 0.05$), 但呈下降趋势。

2.4 Na_2SeO_3 对 CCl_4 引起肝丙二醛(MDA)、肝脏蛋白质变化的影响

Na_2SeO_3 预处理的草鱼肝 MDA 显著降低 ($P < 0.05$), 而微粒体蛋白含量增高 ($P < 0.05$)、细胞色素 P-450 活性则明显提高 ($P < 0.01$)。肝蛋白质无显著差异。 CCl_4 组

同对照组比较,MDA 显著升高,微粒体蛋白、细胞色素 P-450 均明显降低,肝蛋白含量呈下降趋势。各组肝糖原含量无显著性差异(表 3)。

表 3 草鱼血清丙氨酸氨基转移酶的变化
Tab.3 Change of alanine aminotransferase (ALT) in grass carp

组别 Groups	n	血清 ALT(U)	Serum ALT (U)	
		第一日 1st day	第三日 3rd day	第七日 7th day
对照组 Control	6	8.7±5.8	8.7±6.3	8.3±6.3
CCl ₄ 组 CCl ₄	6	20.2±9.2	22.7±6.0	21.0±7.2
Na ₂ SeO ₃ +CCl ₄ 组 Na ₂ SeO ₃ +CCl ₄	6	19.0±9.5	13.4±4.4 *	12.3±2.4 *
Na ₂ SeO ₃ 对照组 Na ₂ SeO ₃ control	6	11.2±3.4	9.6±4.6	5.9±3.8

表 4 Na₂SeO₃ 对草鱼肝蛋白质与 MDA 的影响(\bar{x} ±SD)
Tab.4 Effect of sodium selenite on hepatic protein and MDA in grass carp

项 目	n	对照组 Control	四氧化碳组 CCl ₄	Na ₂ SeO ₃ +CCl ₄ 组 Na ₂ SeO ₃ +CCl ₄	Na ₂ SeO ₃ 对照组 Na ₂ SeO ₃ Control
MDA (nmol / mg 肝蛋白) MDA(nmol / mg.liver protein)	7	0.136±0.037	0.279±0.124	0.153±0.026 *	0.130±0.027 * *
肝糖原(mg / g 肝) Glycogen(mg / g.liver)	7	17.0±3.9	18.7±5.9	16.3±5.7	17.1±4.6
总肝蛋白(mg / g 肝) Protein (mg / g.liver)	14	78.3±6.0	73.1±7.5	76.8±5.1	78.0±7.0
微粒体蛋白(mg / g 肝) Microsome protein(mg / g.liver)	4	6.58±0.52	4.28±1.13	5.93±0.82 *	7.31±0.91 * *
细胞色素 P-450(nmol / mg 蛋白) P-450 (nmol / mg.protein)	3	0.39±0.15	0.18±0.13	0.47±0.11 * *	0.56±0.14 * *

2.5 CCl₄ 及 Na₂SeO₃ 预处理的草鱼肝组织学观察

草鱼的肝组织在 ip CCl₄ 24h 后,大量肝细胞的细胞质崩解,有的细胞核固缩、溶解,肝脏呈现弥漫性坏死。对肝细胞进行计数表明,正常细胞只占 20%以下,48h 肝组织损伤最严重,72h 受损率下降;而预先用 Na₂SeO₃ 处理的草鱼肝组织则明显可见只有局部受损,正常细胞约占 35%或更多,72h 后,部分肝组织细胞核增多,表明肝细胞呈恢复趋势。

3 讨论

3.1 CCl_4 对肝原代细胞的损伤与 Na_2SeO_3 的保护作用

本试验用不同浓度的 CCl_4 同草鱼肝原代细胞共同培养, 当 CCl_4 低于 $10\mu\text{l}/\text{ml}$, 反映肝损伤变化的 ALT、AST、LDH 的逸出量未呈显著性增加, 仅细胞破损率略有增高。只有当 CCl_4 浓度达 $10\mu\text{l}/\text{ml}$ 时, 各指标的变化十分明显, 表明 CCl_4 对草鱼肝原代细胞的损伤程度加剧, 因而, 进行 CCl_4 损伤草鱼肝原代细胞的浓度不应低于 $10\mu\text{l}/\text{ml}$ 。

ALT、AST、LDH 在肝脏中含量均高于其它组织中含量, 是反映肝细胞受损伤的主要敏感指标, 当肝细胞损伤, 常常伴有转氨酶的升高。试验中采用四氯化碳与草鱼肝原代细胞共同培养时, 转氨酶明显升高, 反映 CCl_4 可损伤草鱼肝细胞。因而, 可使用 CCl_4 这种化学毒物进行草鱼肝细胞或组织的损伤模型, 并进行药物对草鱼肝细胞或组织的保护实验。当用加 Na_2SeO_3 培养液培养肝原代细胞时, 发现加 Na_2SeO_3 培养液能不同程度地减少肝原代细胞内 ALT、AST、LDH 的释放, 减轻细胞的破损程度。提示 Na_2SeO_3 能维持肝原代细胞膜的结构完整性, 减轻 CCl_4 对肝原代细胞的损伤。

3.2 CCl_4 对肝组织的损伤与 Na_2SeO_3 的保护作用

一般认为, CCl_4 对机体肝组织的损伤是 CCl_4 经肝细胞微粒体内细胞色素 P-450 依赖的单加氧酶系代谢后, 产生三氯甲基自由基 (CHCl_3) 和氯自由基 (Cl), 肝脏出现明显的脂质过氧化增强现象, 从而引起肝细胞的损伤。在自由基损伤肝细胞的同时, 存在着自由基底物对超氧化物歧化酶的诱导合成作用^[9-12]。

本实验 ip $\text{CCl}_4 1\text{ml}/\text{kg.bw}$ 对草鱼肝组织有明显的毒性作用, 24h 内血清 ALT 的活性即显著升高, SOD 的活性则明显下降, 脂质过氧化物丙二醛 (MDA) 水平显著升高, 而微粒体蛋白与细胞色素 P-450 均明显减少, 细胞质崩解, 部分细胞核固缩、溶解。表明 CCl_4 本身或其生成的三氯甲基 (CHCl_3) 对细胞质膜损伤, 并与膜蛋白共价结合, 引起部分肝细胞破坏, 致使 ALT 释放进入血液循环; MDA 的增加则表明肝细胞膜脂过氧化作用增强。有报道认为膜脂过氧化是自由基所启动的重要二次反应^[10]。 CCl_4 染毒后 3、7 日 ALT 与 SOD 未呈进一步的上升与降低, 只作较小幅度的摆动, 因此, 作者认为 CCl_4 对草鱼肝组织的损伤过程主要在染毒 24h 内进行, 并达到高峰。这一结果同 CCl_4 对虹鳉鱼肝脏的损伤基本相近^[13]。

SOD 是机体内清除自由基的主要净化酶之一, 脂质过氧化物则被认为是自由基作用机体细胞的主要产物。SOD 活性的高低反映该酶对自由基的清除能力。本实验用 Na_2SeO_3 预处理的草鱼, 再 ip CCl_4 。24h 内, SOD 活性明显提高, MDA 蓄积减少, 表明 Na_2SeO_3 可提高 SOD 的活性, 增强清除自由基的能力。但 ALT 的活性无明显降低, 也许与 CCl_4 损伤了部分细胞膜, 导致肝 ALT 释放入血液中的缘故。染毒 3、7 日 SOD 活性逐渐下降, 但仍保持一定的水平。血清 ALT 的明显减少, 这表明一方面 SOD 发挥清除自由基的作用, 使肝细胞免受自由基进一步的损伤; 另一方面 SOD 在清除自由基过程中其活性也可能受到抑制, 或者是随着 Na_2SeO_3 的排泄代谢, Na_2SeO_3 提高 SOD 的作用会逐步减弱。 Na_2SeO_3 是谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-px) 的重要组成部分, GSH-px 能分解过多的脂质过氧化物, 从而保护生物膜免受过氧化损伤^[2, 14]。本试验同时发现预先

应用 Na_2SeO_3 保护的草鱼, 不仅肝 SOD 活性明显提高, MDA 蓄积减少, 而且能提高肝微粒体蛋白质、细胞色素 P-450 的活性。组织切片显示肝细胞的损伤减轻, 细胞核增多。众所周知, 蛋白质合成特别是细胞的结构蛋白的合成, 与肝细胞结构受到损伤后的修复和功能的维持有密切关系^[12]。由此推测, Na_2SeO_3 对肝组织的保护作用, 一方面可能是通过提高 SOD 的活性, 直接清除自由基, 分解脂质过氧化物, 保护细胞膜结构的完整性; 另一方面可能通过提高肝蛋白质的合成能力, 利于肝细胞进行分裂, 或直接保护细胞膜, 从而进一步增强肝脏解毒功能。因本实验未能进行肝组织 GSH-px 活性的测定, 关于 GSH-px 在清除自由基, 保护草鱼肝细胞免受 CCl_4 损伤其作用机理需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 朱心玲、谢巧雄, 草鱼出血病病毒导致肝功能代谢失调机理的初步研究。鱼病学研究论文集, 海洋出版社, 1993。
- [2] 陈琼芳、庄文华等, 硒和别嘌呤醇对镉损伤小鼠肝的保护作用。中国药理学与毒理学杂志, 1990, 4(2): 131—133。
- [3] 上海市医学化验所, 临床生化检验, 上册, 上海科学技术出版社, 1982。
- [4] Lowry OH, et al., Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol. Chem.*, 1951, 193: 265.
- [5] Omura T, Sato R, The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239: 2370.
- [6] Ohkawa H, et al., Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem.*, 1979, 95: 351.
- [7] Misra HP, et al., Superoxide Dismutase: A photochemical augmenetation assay. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, 181: 308.
- [8] Der Boes J V, Two methods for the determination of glycogen in liver *Biochem. J.*, 1954, 57: 410.
- [9] 张罗修、潘德济、曹致芳, 四氯化碳气体对初代培养大鼠肝细胞的损害。中国药理学通报, 1991, 7(3): 187—189。
- [10] 仲来福、张瑾岗、张富勤、夏元洵, 四氯化碳致大鼠肝损伤的机理。中国药理学与毒理学杂志, 1989, 3(4): 298—303。
- [11] 胡恒龙、陈仁惇、马连虎, 四氯化碳诱导肝损伤大鼠自由基及微量元素含量的动态变化。中国药理学与毒理学杂志, 1991, 5(4): 301—305。
- [12] 符铁波、刘耕陶, 联苯双酯抗肝细胞损伤作用的实验研究。中华医学杂志, 1990, 70(4): 201—204。
- [13] Racicot J G, Gaudet M. and Leray C., Blood and liver enzymes in rainbow trout *Salmo gairdneri* Rich. with emphasis on their diagnostic use: Study of CCl_4 toxicity and a case of *Aeromonas* infection. *Journal of Fish Biology*. 1975, 7: 825—835.
- [14] Combs GF, JR, Noguchi T, Scott ML. Mechanisms of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. *Fed. Proc.*, 1975, 34: 2090.

THE ROLE OF SODIUM SELENITE IN PROTECTION OF PRIMARY HEPATOCYTES AND LIVER AGAINST CARBON TETRACHLORIDE TOXICITY IN GRASS CARP

Xie Qiaoxiong, Zhu Xinling and Lu Quanzhang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

The effect of different concentrations of carbon tetrachloride (CCl_4) was studied in the primary culture of grass carp hepatocytes. As the concentration of $10\mu\text{l} / 3 \times 10^6$ cells CCl_4 , the increase of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) as well as lactate dehydrogenase (LDH) released all from the hepatocytes was observed, and so was the increase of the percentage of damaged cells. The adding of sodium selenite ($0.2\mu\text{g} / \text{ml}$) to RPMI-1640 liquid medium and cultured hepatocytes reduced the release of ALT, AST, LDH and the extent of the cell damage. In another experiment evaluating the effect of sodium selenite and CCl_4 , grass carp fingerlings were injected intraperitoneally with Na_2SeO_3 $0.1\text{mg} / \text{kg.bw}$ each day for three consecutive days, and then with $1\text{ml} / \text{kg.Bw}$ CCl_4 . Twenty-four hours later, the relative activity of hepatic superoxide dismutase (SOD) was found to rise 91.5% higher in these fingerlings than those injected with CCl_4 only. Seven days later it was still 54.5% higher. The level of serum ALT decreased gradually. The activity level of hepatic lipid peroxide decreased significantly ($P < 0.05$) and that of P-450 increased significantly ($P < 0.01$) and so did the contained hepatic microsomal protein ($P < 0.05$) in those fingerlings injected with selenium and then CCl_4 . Light microscopic observations revealed a decrease of hepatic damage and an increase of nuclear numbers, suggesting that cell divisions might have taken place. It is indicated that sodium selenite may elevate the capacity of hepatic SOD in scavenging free radicals, and hepatic counteractions on CCl_4 toxicity.

Key words Sodium selenite Primary hepatocyte, Liver Protection, Grass carp