

富硒乳酸菌抑制镉诱发小鼠血浆 NO 和 TNF- α 释放作用

许龙兵¹, 陈龙¹, 江善祥², 周娟¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物医药功能材料工程研究中心, 210097, 江苏, 南京)

(2. 南京农业大学动物医学院, 210095, 江苏, 南京)

[摘要] 选择 48 只健康成年雄性小鼠, 随机分为对照组(C 组)、镉暴露组(Cd 组)、镉+低剂量富硒乳酸菌组(Cd-LSe 组)、镉+高剂量富硒乳酸菌组(Cd-HSe 组)。腹腔注射 CdCl₂ 进行镉暴露实验, 连续 6 d。研究富硒乳酸菌对镉暴露小鼠血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、一氧化氮(NO)水平及一氧化氮合酶(NOS)活性的影响。结果显示, 镉染毒暴露第 6 d, Cd 组血浆 NO 含量明显高于 C 组, Cd-LSe 和 Cd-HSe 组与 C 组无明显差异, 低于 Cd 组; Cd 组 NOS 活性高于 C、Cd-LSe 和 Cd-HSe 组, Cd-LSe 和 Cd-HSe 组 NOS 活性与 C 组无显著差异性; Cd 组 iNOS 活性明显高于 C、Cd-LSe 和 Cd-HSe 组, Cd-LSe 和 Cd-HSe 组 iNOS 活性与 C 组无显著差异; Cd 组血浆 TNF- α 升高, 而 Cd-LSe 和 Cd-HSe 组未见升高, 且低于于 C 组。提示富硒乳酸菌在有效缓解镉诱导血浆 iNOS 活性上升, NO、TNF- α 释放增加介导损伤过程中可能起重要作用。

[关键词] 富硒乳酸菌, 镉, 一氧化氮, 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] Q592.1, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)02-0075-04

Inhibited Effects of Se-enriched Lactobacillus on Plasma NO and TNF- α Release of Mice Induced by Cadmium

Xu Longbing¹, Chen Long¹, Jiang Shanxiang², Zhou Juan¹

(1. Jiangsu Engineering Research Center for Bio-medical Function Materials, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, 210095, Nanjing, China)

Abstract Forty-eight healthy adult male mice are chosen and randomly divided into a control group (group C), a Cd-exposed group (group Cd), a Cd plus low dose Se-enriched lactobacillus group (group Cd-LSe) and a Cd plus high dose Se-enriched lactobacillus group (group Cd-HSe). The Cd-exposed experiment is induced by abdominal injection of CdCl₂ per day over six days. Effects of Se-enriched lactobacillus on plasma Tumor necrosis factor- α (TNF- α), nitric oxide (NO) levels and nitric oxide synthase (NOS) activity in cadmium-exposed mice are studied. The results show that plasma NO content of group Cd is obviously higher than that of group C, and there are lower values in groups Cd-LSe and Cd-HSe than in group Cd on the 6th day post experiment. Plasma NOS activity of group Cd is higher than that of groups C, Cd-LSe and Cd-HSe, and the NOS values of groups Cd-LSe and Cd-HSe have no obvious differences as compared with that of group C. A higher iNOS activity value in group Cd than that in groups C, Cd-LSe and Cd-HSe is investigated, moreover, the iNOS activity of groups Cd-LSe and Cd-HSe have no significant differences as compared with that of group C. Plasma TNF- α level rises in group Cd, however, the values in groups Cd-LSe and Cd-HSe do not increase and is lower than that in group C. It is suggested that Se-enriched lactobacillus may play an important role in the remission of cadmium-induced iNOS activity increases and the massive release of NO and TNF- α .

Key words Se-enriched lactobacillus, Cadmium, Nitric oxide, tumor necrosis factor- α

收稿日期: 2004-11-10.

基金项目: 江苏省重点实验室开放基金资助项目(KJS02022).

作者简介: 许龙兵, 1980—, 硕士研究生, 主要从事动物免疫生理学的学习和研究. E-mail: xulongbing2003@sohu.com

通讯联系人: 陈龙, 1964—, 博士, 教授, 主要从事内分泌、免疫生理学与生物化学的教学与研究. E-mail: lchen@njnu.edu.cn

0 引言

重金属镉可与血浆白蛋白等成分结合,并随血流分布到各器官,由于不能生物降解,易在体内蓄积,是一种对人和动物具有多器官、组织、细胞毒性的化学污染物^[1-4]。研究发现,急性镉暴露大鼠血浆一氧化氮(nitric oxide, NO)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor - α , TNF - α)水平明显升高,睾丸、心脏和肝脏组织中NO以及睾丸和心脏组织中TNF - α 也较明显上升,提示镉诱发NO、TNF - α 大量释放在导致机体多种器官机能活动障碍发生过程中可能起重要作用^[5]。有资料显示,硒是镉的一种拮抗剂,可以有效地减轻镉的毒性损伤而保护机体^[6]。富硒乳酸菌是借助乳酸菌利用无机硒转变而成的有机硒制剂,已有的研究证实,它能通过增强抗氧化酶活性有效保护CCl₄诱发的肝损伤过程,并改善和提高免疫细胞的功能活动^[7-8]。本研究采用经腹腔注射急性镉暴露,研究了日粮添加该有机硒对镉暴露小鼠血浆NOS活性及NO、TNF - α 水平的影响,旨在探讨有机硒干预镉致机体损伤过程中的保护作用及其机制,为开发功能性硒产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 富硒乳酸菌制剂全价饲料

首先借助乳酸菌利用亚硒酸钠转变成生物有机硒富集,获得生长密度为 5.88×10^7 /mL培养液的富硒乳酸菌,经加工制成富硒乳酸菌制剂,其含硒量为11.45 mg/g有机硒制剂,最后按配合饲料加工方法均匀混入普通全价饲料,再加工成含硒2 mg/kg和4 mg/kg饲料颗粒料。

1.2 实验动物

48只健康平均体重 38.71 ± 0.49 g成年ICR雄性小鼠,由南京医科大学动物实验中心提供,经3 d的适应性饲养后,随机分为对照组(C组)、镉染毒组(Cd组)、镉染毒+低剂量富硒乳酸菌组(Cd-LSe组)、镉染毒+高剂量富硒乳酸菌组(Cd-HSe组),每组12只。整个实验期为13 d(分为CdCl₂注射前7 d和注射后6天)。在整个实验期里,C组和Cd组均饲喂普通全价饲料,Cd-LSe和Cd-HSe组分别饲喂含有有机硒2 mg/kg和4 mg/kg饲料的富硒乳酸菌制剂全价饲料。常规饲养条件下饲养。

1.3 动物镉暴露

将分析纯CdCl₂ · 2.5H₂O(上海亭新化工试剂厂,批号970201)用生理盐水稀释成含镉0.1 mg/mL浓度的注射溶液高压灭菌。Cd组、Cd-LSe组和Cd-HSe组小鼠每天按含镉0.5 mg/kg体重腹腔注射CdCl₂注射液,C组用同样的方法注射与Cd-HSe组同等剂量的生理盐水,进行镉暴露实验,连续观察6 d,对每组小鼠称重。

1.4 样品采集和处理

在镉暴露后第6天,分别从各组取6只小鼠摘眼球采血样1 mL,迅速放入含有肝素钠(1:500)的塑料管内,混匀,置4℃离心(3000 r/min,20 min)分离血浆置-20℃保存用于指标的测定。

1.5 测定指标和方法

血浆NOS和iNOS活性:化学比色法;NO含量:硝酸还原酶法,试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。TNF - α 水平:放射免疫分析法,试剂盒由中国人民解放军总医院放射免疫研究所提供。以上试剂盒均严格按说明书进行。

1.6 数据处理

以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SEM)表示,实验数据用Statistics软件作方差分析以确定差异的显著性。

2 结果

2.1 小鼠表现

镉急性染毒后,Cd组小鼠精神抑郁,减食,毛色暗淡、紊乱,且第6天剖检发现一些有腹部肿大,脾脏比对照组明显肿大,睾丸质地硬,而C、Cd-LSe和Cd-HSe组未见明显临床症状和剖检病理表现。

2.2 富硒乳酸菌对镉暴露小鼠血浆NO含量的影响

镉暴露第6天,Cd组血浆NO含量明显高于C组;Cd-LSe组NO高于C组,但无显著差异性,且低于Cd组;Cd-HSe组与C组接近且明显低于Cd组(图1)。

2.3 富硒乳酸菌对镉暴露小鼠血浆NOS活性的影响

表1显示,Cd组NOS活性高于或明显高于C、Cd-LSe和Cd-HSe组;Cd-LSe和Cd-HSe组NOS活性低于C

组,但无显著差异性;Cd 组 iNOS 活性最高,明显高于 C、Cd-LSe 和 Cd-HSe 组,Cd-LSe 和 Cd-HSe 组 iNOS 活性与 C 组无显著差异。

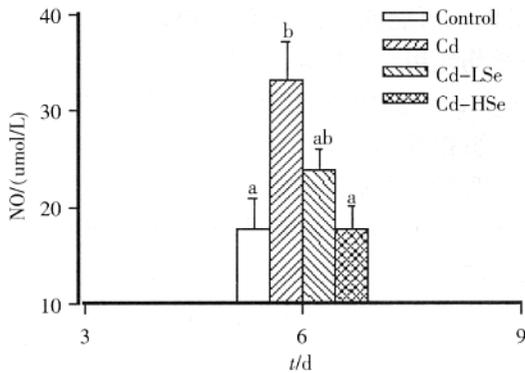


图 1 富硒乳酸菌对镉暴露小鼠血浆 NO 含量的影响

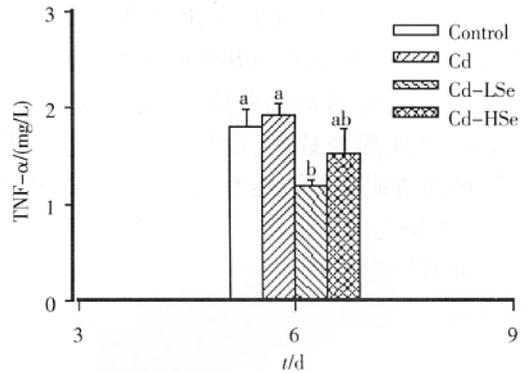


图 2 富硒乳酸菌对镉暴露小鼠血浆 TNF- α 水平的影响

表 1 富硒乳酸菌对镉暴露小鼠血浆 NOS 活性的影响 (n = 6, Mean \pm SEM)

Indice/(u/mL)	Groups	6th day post-injection with CdCl ₂
NOS	Control	13.21 \pm 1.68 ^{ab}
	Cd	17.84 \pm 2.35 ^a
	Cd-LSe	10.93 \pm 2.48 ^{ab}
	Cd-HSe	7.82 \pm 1.94 ^b
iNOS	Control	1.18 \pm 0.14 ^a
	Cd	3.90 \pm 0.98 ^b
	Cd-LSe	1.23 \pm 0.18 ^a
	Cd-HSe	0.96 \pm 0.16 ^a

Significant difference ($P < 0.05$) with superscript by a, b and indifference ($P > 0.05$) by same letter was indicated in the same column of table, respectively.

2.4 富硒乳酸菌对镉暴露小鼠血浆 TNF- α 水平的影响

镉暴露第 6 天,Cd 组血浆 TNF- α 升高,但与 C 组相比无显著性差异,而 Cd-LSe 和 Cd-HSe 组未见升高,低于或明显低于 C 组和 Cd 组(图 2)。

3 讨论

本研究显示,镉急性染毒后,小鼠腹部明显肿大,剖检可见腹水,脾脏比对照组明显肿大,睾丸质地硬,说明镉暴露导致的毒性损伤明显,且迅速而广泛地波及全身许多器官和组织。而 C 组与添加富硒乳酸菌的 Cd-LSe 和 Cd-HSe 组未见明显临床症状和剖检病理表现,暗示富硒乳酸菌减轻由镉诱发的损伤过程,有抗损伤保护效应。

已有研究证实,NO 在体内是通过 NOS 由 L-精氨酸合成,NOS 对维持机体 NO 动力学相对恒定有重要意义。正常生理条件下,钙依赖性 NOS 表达,产生少量 NO 发挥生理效应,而非钙依赖性 NOS 只在细胞受刺激被激活时才表达,可表达大量 NOS,产生大量 NO。过量的 NO 一旦漏出细胞外,就具有毒性作用,一方面可杀死细菌、寄生虫等,另一方面也损伤正常组织、生物大分子和细胞的膜结构,产生致病作用^[5,9-10]。本研究显示,镉暴露第 6 天,Cd 组小鼠血浆 NO 含量明显高于 C 组,而添加富硒乳酸菌的 Cd-LSe 和 Cd-HSe 组与 C 组无明显差异,低于或明显低于 Cd 组,说明镉暴露后伴有大量的 NO 产生,富硒乳酸菌通过抗损伤保护缓解其过量释放。由 NOS 和 iNOS 的实验结果进一步显示,Cd 组 NOS 活性高于或明显高于 C、Cd-LSe 和 Cd-HSe 组;Cd-LSe 和 Cd-HSe 组 NOS 活性与 C 组无显著差异性;并发现 Cd 组 iNOS 活性最高,明显高于 C、Cd-LSe 和 Cd-HSe 组,Cd-LSe 和 Cd-HSe 组 iNOS 活性与 C 组无显著差异。暗示富硒乳酸菌在抗损伤保护调节 NOS 活性特别是 iNOS 活性保持低水平状态,从而使 NO 释放减少可能起重要作用,这对机体疾病的转归、趋向或保持正常生理状态有重要意义。

TNF- α 由巨噬细胞产生,根据 TNF- α 在体内浓度的高低,具有截然不同的生物学效应。低浓度 TNF- α 以旁分泌和自分泌方式在局部发挥其生物学效应,激活炎性细胞在炎症局部发挥杀伤作用,同时具有干扰素样作用

用^[11],对机体产生保护作用,而高浓度 TNF- α 进入血循环中后,作为炎性介质过量将对机体产生不利影响。有研究显示,机体发生炎症反应时,血液中和组织中巨噬细胞被激活可产生并释放大量的毒性物质如自由基、PGs、LTs、TXs、TNF- α 、IL-1 等^[12],其中一个最关键因素可能就是其分泌的 TNF- α ,它可进一步介导巨噬细胞分泌包括自由基在内各种活性分子,进而发挥杀伤作用^[13]。但是,如果机体内致病因子不能及时地遏制或清除,体内这些分子可能就会产生过量,造成正常组织的伤害,起致炎作用^[14]。它们作为炎症介质在加重局部炎症的同时,还可通过循环引起远处组织损伤,严重者导致多系统器官障碍、衰竭^[13-15]。陈龙等研究发现随着镉在体内积累导致的多种器官机能活动障碍的机制与 TNF- α 大量释放介导有关^[5]。本研究结果也显示,Cd 组血浆 TNF- α 升高,但 Cd-LSe 和 Cd-HSe 组未见升高,低于或明显低于 C 组,且 Cd-HSe 组 TNF- α 水平高于 Cd-LSe 组。说明富硒乳酸菌制剂在调整机体内 TNF- α 发挥正常生理作用和有效地抑制机体损伤时 TNF- α 大量释放方面有积极效应,低剂量硒能够更好的保护机体免遭严重损伤。

综上所述,镉暴露小鼠血浆 iNOS 活性及 NO、TNF- α 水平显著提高,富硒乳酸菌制剂对镉诱导 NO、TNF- α 大量释放介导小鼠损伤有缓解作用。

[参考文献]

- [1] Holt W V, Palomo M J. Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation[J]. *Reprod Fertil Dev*, 1996, 8(2): 219—230.
- [2] Yang X F, Wang S Y, Zhao R C, *et al.* Changes in tissue metals after cadmium intoxication and intervention with chlorpromazine in male rat[J]. *Biomed Environ Sci*, 2000, 13(1): 19—25.
- [3] 陈龙,任文华,朱善良,等.慢性镉负荷雄性大鼠的睾丸及生殖内分泌功能活动[J]. *生理学报*, 2002, 54(3): 258—262.
- [4] 徐莉春,王沐沂,王心如.镉对大鼠精子运动能力影响的体外实验研究[J]. *环境与健康杂志*, 2000, 17(2): 67—69.
- [5] Chen L, Zhou J, Gao W, *et al.* Action of NO and TNF- α release of rats with cadmium loading in mediating malfunction of multiple system organs[J]. *生理学报*, 2003, 55(5): 535—540.
- [6] 吴志刚,陈学敏,刘四海,等.硒对镉引发氧自由基的清除作用研究[J]. *中国公共卫生*, 2001, 17(6): 507—508.
- [7] 周娟,陈龙,陈林君,等.富硒乳酸菌对肝损伤小鼠红细胞脂质过氧化和免疫功能影响[J]. *营养学报*, 2003, 25(4): 405—408.
- [8] 孙敬阳,陈龙,蒋英子,等.富硒乳酸菌在肝损伤大鼠生长及淋巴细胞转化中的保护作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2003, 19(4): 366—367.
- [9] Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity[J]. *Immunol Today*, 1992, 13(5): 157—160.
- [10] Moncada S, Palmer R M, Higgs E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology[J]. *Pharmacol Rev*, 1991, 43(2): 109—142.
- [11] 高天祥,田竟生. *医学分子生物学* [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [12] Karck U, Peters T, Decker, K. The release of tumor necrosis factor from endotoxin-stimulated rat Kupffer cells is regulated by prostaglandin E₂ and dexamethasone[J]. *J Hepatol*, 1988, 7(3): 352—361.
- [13] 苗会,薛全福.磷脂酶 A₂ 对炎症因子介导的多系统器官衰竭的调控[J]. *基础医学与临床*, 1994, 14(4): 9—11.
- [14] 贾因棠,王守义.肿瘤坏死因子在肝脏损伤中的作用及机理[J]. *中国病理生理杂志*, 1997, 13(6): 755—757.
- [15] Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A₂- α mediator between proximal and distal effectors of inflammation[J]. *Immunol Today*, 1991, 12(5): 143—147.

[责任编辑 孙德泉]