

DOI:CNKI:61-1390/S.20111216.1150.024

网络出版时间:2011-12-16 11:50

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111216.1150.024.html>

盐酸克伦特罗对小鼠肺脏组织结构及 抗氧化能力的影响

王 昱,何九军,杨小录,崔文辉,王振福

(陇南师范高等专科学校 生物系,甘肃 成县 742500)

[摘 要] **【目的】**通过对肺脏组织结构的观察及其抗氧化指标的测定,研究盐酸克伦特罗(C LH)对肺脏损伤的影响。**【方法】**给小鼠分别灌胃 12.5,25.0,50.0 mg/kg 的 CLH 连续 30 d,对照组灌胃等量生理盐水,在灌胃处理 5,10,20,30 d 时用生物显微技术观察小鼠肺脏结构的变化,用免疫组织化学方法观察 Bax 蛋白在肺脏的表达,用比色法检测肺脏 SOD、CAT 活性及 MDA 含量的变化。**【结果】**与对照组比较,灌胃 CLH 小鼠肺脏 SOD、CAT 活性降低,MDA 含量升高,肺泡直径、肺泡隔厚度、Bax 蛋白阳性表达的面密度值升高;CLH 对小鼠肺脏的影响具有时间-剂量效应;双因素方差分析表明,剂量因素对结果的影响大于时间因素。**【结论】**CLH 可破坏机体氧化与抗氧化的动态平衡,对小鼠肺脏组织结构的损伤可能与肺脏中 SOD、CAT 活性的降低及 MDA 含量的升高有一定相关性。

[关键词] 盐酸克伦特罗;肺脏;抗氧化能力;Bax 蛋白;小鼠

[中图分类号] S859.84

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)01-0029-08

Effects of clenbuterol hydrochloride on the structure of lung and antioxidant capacity of mice

WANG Yu, HE Jiu-jun, YANG Xiao-lu, CUI Wen-hui, WANG Zhen-fu

(Department of Biology, Longnan Teachers College, Chengxian, Gansu 742500, China)

Abstract: **【Objective】** The effects of clenbuterol hydrochloride (CLH) on the lung were studied through the observation of the structure of lung and determination of anti-oxidative index. **【Method】** Mice were continuously administered with CLH at the doses of 12.5, 25.0 and 50.0 mg/kg and the same amount of saline for 30 days. The changes of the lung were observed by light microscope. Expression of Bax protein was measured by immunohistochemical method. At the same time, activities of SOD, CAT and content of MDA were detected on the 5th, 10th, 20th, 30th days. **【Result】** Compared with the control group, the level of SOD and CAT tended to reduce, while the level of MDA seemed to be elevated. The diameter of alveolous, thickness of interalveolar septum and surface area density of the positive expression of Bax protein significantly increased than that of the control. The degree of pathological changes was in dose and time-dependent effect. Results of Two-Way ANOVA indicated that dose contributed more to CLH-induced lung damage than treatment time. **【Conclusion】** CLH could destroy the balance between oxidative stress and anti-oxidative function of the body, and this effect might be correlated with the low activities of SOD, CAT and high content of MDA in mice's lung.

Key words: Clenbuterol hydrochloride; lung; antioxidant capacity; Bax protein; mice

* [收稿日期] 2011-05-16

[基金项目] 甘肃省教育厅科研项目(1128B-01);陇南师范高等专科学校科研项目(2009LSZK06002)

[作者简介] 王 昱(1973—),男,甘肃天水人,副教授,硕士,主要从事细胞与发育生物学研究。E-mail: gswangyu@126.com

盐酸克伦特罗 (CLH), 俗称瘦肉精, 其既不是兽药, 也不属于饲料添加剂, 是一种名副其实的激素类物质, 严重危害着畜牧业的健康发展和畜产品的安全。CLH 在动物体内吸收快、分布广、生物利用度高、代谢慢、易残留^[1], 残留最高的组织是肺, 其次是肝和肾^[2]。若过量食入, 可使血压升高、血管扩张、心率加快、呼吸加剧、体温上升、心脏和肾脏负担加重, 并出现采食量下降、行为动作失调、神经紧张不安甚至全身震颤等剧烈反应, 并极大地影响蛋白质代谢、脂肪代谢及肝脏中的糖代谢, 严重影响动物正常的生长发育^[3-5]。目前, 有关 CLH 影响的研究主要集中在心、肝、免疫、生殖等器官, 如邹本草等^[6]报道了 CLH 对小鼠心肌 ATP 酶和抗氧化能力的影响; 王恩峰等^[7]研究了 CLH 对小鼠体质量及心脏组织形态学的影响; 聂木海等^[8]研究了 CLH 对大鼠免疫器官的影响; 李明祯等^[9]研究了 CLH 对小鼠肝脏损伤的影响; 张园园等^[10]研究了 CLH 对动物的生殖内分泌毒性。但 CLH 是否能导致小鼠肺脏结构及抗氧化能力的变化, 以及其影响机制如何, 均还未见相关的研究报道。为此, 本研究将 CLH 以灌胃方式对小鼠染毒, 观察小鼠肺脏结构的变化, 并检测其对小鼠肺脏超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性和丙二醛 (MDA) 含量的影响, 探讨 CLH 对小鼠肺脏的毒性及其可能机制, 以为临床 CLH 中毒的防治提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

CLH, 白色结晶性粉末, 由安徽淮南山河药用辅料有限公司提供。根据半数致死剂量, 将其用蒸馏水配制成 12.5、25.0 和 50.0 mg/kg 的水溶液^[5], 4~6 °C 下保存备用。SOD、CAT 活性及 MDA 含量检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。一抗 Bax 蛋白、免疫组织化学试剂盒及 DAB 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

主要仪器设备有 UV-VIS spectrophotometer (U-1800 型, Tokyo Japan) 全自动分光光度计; 高速台式冷冻离心机 (TGL-16M 型, Beckman 美国) 等。

1.2 试验动物与给药方式

选取刚断奶昆明小鼠 (购于兰州大学实验动物中心) 160 只, 雌雄各半, 体质量 18~20 g, 随机分为 4 组 (对照组 (CK) 和 I、II、III 3 个盐酸克伦特罗试验组), 每组 40 只。I、II、III 盐酸克伦特罗试验组分别用 12.5、25.0 和 50.0 mg/kg 的盐酸克伦特罗

灌胃, 每次 0.5 mL, 每天灌胃 2 次 (上午 9:00, 下午 16:00), 连续给药 30 d。对照组每天灌胃等量生理盐水。

1.3 小鼠肺脏的组织学观察

分别取处理 5、10、20、30 d 的小鼠肺脏 (每组每次取样 4 只), 投入体积分数 10% 的中性福尔马林液中固定 24 h, 常规石蜡包埋后切片 (片厚 6 μm), H. E 染色, 在显微镜 (Olympus, FX-35WA, Japan) 下观察并摄片, 每个样本随机取 5 张照片测量肺泡直径和肺泡隔厚度。

1.4 小鼠 SOD、CAT 活性及 MDA 含量的测定

分别取处理 5、10、20、30 d 的小鼠肺脏 (每组每次取样 6 只), 在预冷的生理盐水中漂洗, 滤纸吸干, 精确称质量后, 滴加肺脏组织质量 9 倍的生理盐水, 用匀浆器在冰水中匀浆 5 min, 再于 3 000 r/min 离心 10 min, 用微量移液器吸取上清液, 按试剂盒的操作要求用 UV-VIS spectrophotometer 全自动分光光度计分别测定 SOD、CAT 活性及 MDA 的含量。

1.5 小鼠肺脏组织的免疫组织化学观察

采用免疫组化 ABC 法 (链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物试剂盒), 将小鼠肺脏石蜡切片脱蜡至水, 微波处理进行抗原修复, 用 PBS 冲洗后, 以质量分数 3% H_2O_2 孵育消除内源性过氧化物酶活性, 正常马血清室温孵育 30 min 以封闭非特异性反应位点; 滴加一抗 (兔抗 Bax 蛋白, 工作浓度 1:200), 置 4 °C 冰箱过夜; PBS 冲洗后, 滴加生物素标记的二抗 (羊抗兔 IgG 抗血清), 37 °C 孵育 30 min; 滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物工作液, 37 °C 孵育 30 min; DAB 显色, 苏木精复染, 常规脱水, 透明、封片, 在显微镜下观察并摄片。同时设空白对照组, 以 PBS 代替一抗, 其余操作同上。

1.6 小鼠肺脏组织的体视学测量

取固定好的小鼠肺脏数块, 包埋后连续切片 (片厚 6 μm), 每个蜡带贴 1 张, 共 10 张, 每张切片随机选择 12 个视野观察、摄片 ($\times 400$)。采用方格测试系统 (测试面积 $0.810 \times 10^4 \text{ mm}^2$, 测试线总长为 $4.232 \times 10^3 \text{ mm}$, 测试线包括 23 条纵线和 24 条横线, 每小格长为 4 mm, 相当于实际长度 10 μm)。2 种测试线的交点为测试点, 总测试点数为 552 个, 交点计数法测算 Bax 蛋白阳性表达的面密度值 (S_v), 计算公式为: $S_v = 2I_x / L_c$, $L_c = \sum P_c \cdot a$, 式中 I_x 为阳性细胞与测试方格的交点数, P_c 为测试系统落在参照系的点数, a 为方格内 2 点间的距离^[11]。

1.7 数据处理

用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析处理,数据用“平均值±标准差”表示,2 组间的均数比较(试验组与对照组)采用双尾 *t* 检验,并使用双因素方差分析进行剂量、时间及剂量与时间交互作用对小鼠肺脏抗氧化能力影响的比较, $P<0.05$ 表示差异显著,

$P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 盐酸克伦特罗灌胃小鼠肺脏组织结构的变化
小鼠灌胃盐酸克伦特罗后,肺脏组织结构的变化如图 1 和表 1 所示。

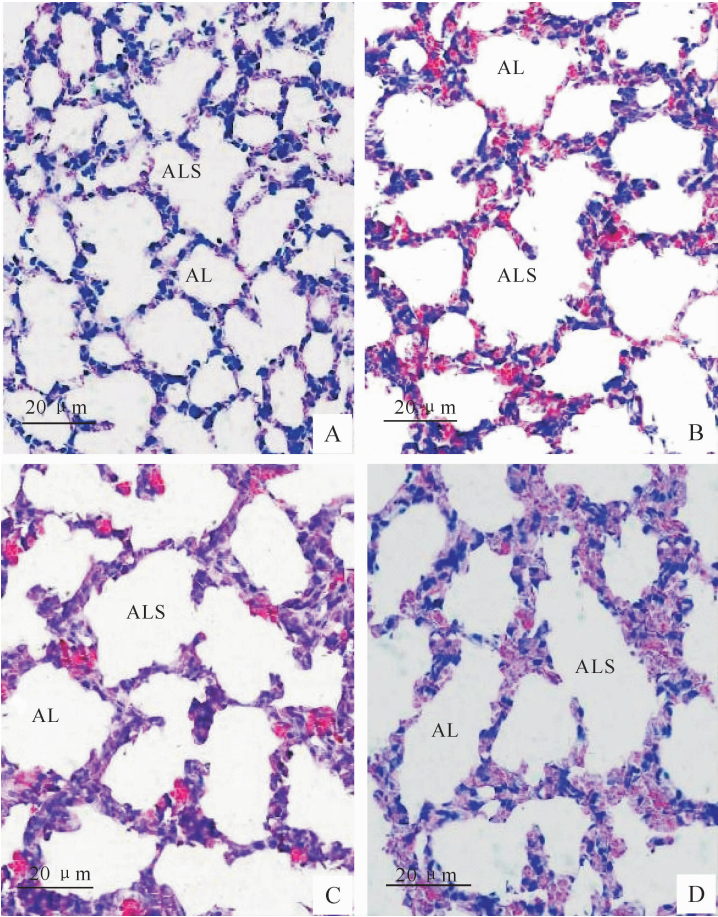


图 1 盐酸克伦特罗灌胃对小鼠肺脏组织结构的影响
A、B、C、D. 分别为对照组和 I、II、III 组灌胃处理 30 d 时小鼠肺脏的光镜结构;AL. 肺泡;ALS. 肺泡囊
Fig. 1 Effects of CLH on the structure of mice lung
A,B,C,and D. The light microscope structure of mice lung of control, I, II, and III groups after intragastrically treated at 30 days, respectively;AL. alveolous;ALS. alveolar sac

表 1 盐酸克伦特罗对小鼠肺泡直径和肺泡隔厚度的影响

组别 Group		肺泡直径/ μm Diameter of alveolous				肺泡隔厚度/ μm Thickness of interalveolar septum			
		5 d	10 d	20 d	30 d	5 d	10 d	20 d	30 d
CK		35.20 $\pm$ 2.64	33.87 $\pm$ 1.55	32.96 $\pm$ 2.38	30.44 $\pm$ 2.23	4.08 $\pm$ 0.20	3.96 $\pm$ 0.11	3.63 $\pm$ 0.24	2.85 $\pm$ 0.16
I		35.61 $\pm$ 2.11	34.09 $\pm$ 2.42	33.10 $\pm$ 1.56	33.03 $\pm$ 2.20*	4.11 $\pm$ 0.23	4.07 $\pm$ 0.15	3.95 $\pm$ 0.50	3.69 $\pm$ 0.43*
II		36.03 $\pm$ 2.22	36.13 $\pm$ 3.13*	35.67 $\pm$ 2.31*	35.14 $\pm$ 1.15**	4.18 $\pm$ 0.26	4.43 $\pm$ 0.22*	4.37 $\pm$ 0.18**	4.04 $\pm$ 0.32**
III		44.36 $\pm$ 2.82**	42.39 $\pm$ 4.70**	40.56 $\pm$ 3.44**	39.69 $\pm$ 3.77**	6.22 $\pm$ 0.50**	6.03 $\pm$ 0.29**	5.72 $\pm$ 0.30**	5.24 $\pm$ 0.36**

注:与对照组比较,同列数据后标*表示差异显著($P<0.05$),标**表示差异极显著($P<0.01$)。表 2,4,6,8 同。
Note:Compared with control group,data within a column with asterisk (*) show significant effect ($P<0.05$),** shows extremely significant effect ($P<0.01$). The tables 2,4,6,8 are the same.

由图 1 可以看出,盐酸克伦特罗使小鼠肺泡直径和肺泡隔厚度均有不同程度的增大。由表 1 可知,I 组在灌胃盐酸克伦特罗 5~20 d 时,小鼠肺泡直径和肺泡隔厚度与对照组相比差异不显著($P>0.05$);在 30 d 时,肺泡直径和肺泡隔厚度较对照组显著增大($P<0.05$)。II 组在灌胃盐酸克伦特罗 5 d 时,小鼠肺泡直径和肺泡隔厚度与对照组相比差异不显著($P>0.05$);在 10~30 d 时,肺泡直径和肺泡隔厚度与对照组的差异达显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)水平。III 组在灌胃盐酸克伦特罗 5~30 d 时,肺泡直径和肺泡隔厚度与对照组相比差异均达极显著水平($P<0.01$)。

表 2 盐酸克伦特罗对小鼠肺脏 SOD 活性的影响

Table 2 Effects of CLH on SOD activity in the lung of mice				U/mg
组别 Group	5 d	10 d	20 d	30 d
CK	101.04±9.11	113.05±12.74	124.71±11.66	136.05±13.58
I	90.24±3.06*	104.56±11.90*	111.35±12.04**	121.62±10.31**
II	85.50±2.89*	91.06±2.58**	107.92±3.42**	119.32±4.95**
III	77.81±1.21**	88.81±3.07**	95.82±2.20**	105.69±5.10**

表 3 盐酸克伦特罗剂量、作用时间对小鼠肺脏 SOD 活性影响的双因素方差分析

Table 3 Two-Way ANOVA analysis of effects of CLH dose and action time on SOD activity in the lung of mice				
变异源 Source	均方 MS	自由度 Df	F	偏 η^2 值 η^2 value
剂量 Dose	52 146.426	5	320.26**	0.939
时间 Time	1 351.802	3	47.693**	0.326
剂量×时间 Dose×time	1 627.312	9	12.295**	0.617
误差 Error	92.758	55		

注: * 表示影响显著($P<0.05$), ** 表示影响极显著($P<0.01$)。表 5,7 同。
Note: * shows significant effect ($P<0.05$), ** show extremely significant effect ($P<0.01$). The tables 5,7 are the same.

2.2.2 CAT 活性 由表 4 可知,I 组在灌胃盐酸克伦特罗 5 d 时,小鼠肝脏 CAT 活性的下降幅度与对照组相比差异不显著($P>0.05$),在 10~30 d 时,CAT 活性明显下降,与对照组的差异达显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)水平;II 和 III 组在灌胃盐酸克伦特罗 5~30 d 时,小鼠肝脏 CAT 活性均低于对照组,且差异均

2.2 盐酸克伦特罗灌胃后小鼠肺脏 SOD、CAT 活性和 MDA 含量的变化

2.2.1 SOD 活性 由表 2 可知,盐酸克伦特罗灌胃后小鼠肺脏 SOD 活性均有不同程度的降低。I、II、III 3 个试验组在灌胃 5~30 d 时的 SOD 活性均低于对照组,且差异均达显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)水平。

由表 3 可以看出,盐酸克伦特罗剂量因素和作用时间因素对小鼠肺脏 SOD 活性有极显著影响,而且两因素间交互作用的影响也达极显著水平;由偏 η^2 值可以看出,剂量因素对小鼠肺脏 SOD 活性的影响远大于时间因素。

达显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)水平。

由表 5 可以看出,盐酸克伦特罗剂量因素对小鼠肺脏 CAT 活性有极显著影响,作用时间因素对小鼠肺脏 CAT 活性影响显著,两因素间的交互作用对其有极显著影响;由偏 η^2 值可以看出,剂量因素对小鼠肺脏 CAT 活性的影响大于时间因素。

表 4 盐酸克伦特罗对小鼠肺脏 CAT 活性的影响

Table 4 Effects of CLH on CAT activity in the lung of mice				U/mg
组别 Group	5 d	10 d	20 d	30 d
CK	141.24±4.88	152.72±10.70	164.31±8.63	179.62±11.57
I	138.15±2.02	144.56±6.93*	155.35±7.24*	162.02±4.33**
II	130.05±8.29*	136.61±5.82**	144.28±4.23**	151.07±9.45**
III	118.18±3.21**	125.47±6.07**	133.78±6.66**	146.11±8.12**

表 5 盐酸克伦特罗剂量、作用时间对小鼠肺脏 CAT 活性影响的双因素方差分析

Table 5 Two-Way ANOVA analysis of effects of CLH dose and action time on CAT activity in the lung of mice				
变异源 Source	均方 MS	自由度 Df	F	偏 η^2 值 η^2 value
剂量 Dose	23 146.406	5	122.24**	0.859
时间 Time	3 351.872	3	37.793*	0.362
剂量×时间 Dose×time	4 657.302	9	55.295**	0.707
误差 Error	79.658	55		

2.2.3 MDA 含量 由表 6 可知,灌胃盐酸克伦特罗后不同时间,各试验组小鼠肺脏 MDA 的含量均有不同程度的升高,I、II 和 III 3 个试验组在灌胃 5~30 d 时的 MDA 含量均高于对照组,且差异均达显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)水平。

表 6 盐酸克伦特罗对小鼠肺脏 MDA 含量的影响
Table 6 Effects of CLH on MDA content in the lung of mice nmol/g

组别 Group	5 d	10 d	20 d	30 d
CK	8.33±0.78	8.12±0.52	8.61±0.42	8.57±0.28
I	7.89±0.37 *	9.29±0.60 *	9.93±0.16 *	11.55±0.75 * *
II	9.07±0.22 *	10.76±0.49 * *	11.37±0.38 * *	13.63±0.45 * *
III	11.16±0.61 * *	13.05±0.70 * *	14.66±1.10 * *	16.81±0.83 * *

由表 7 可以看出,盐酸克伦特罗剂量因素和作用时间因素及两因素的交互作用对小鼠肺脏 MDA 含量均有极显著影响。由偏 η^2 值可以看出,剂量因素对小鼠肺脏 MDA 含量的影响大于时间因素。

表 7 盐酸克伦特罗剂量、作用时间对小鼠肺脏 MDA 含量影响的双因素方差分析
Table 7 Two-Way ANOVA analysis of effects of CLH dose and action time on MDA content in the lung of mice

变异源 Source	均方 MS	自由度 Df	F	偏 η^2 值 η^2 value
剂量 Dose	1 035.286	5	131.60 * *	0.857
时间 Time	421.028	3	22.936 * *	0.461
剂量×时间 Dose×time	657.116	9	10.207 * *	0.782
误差 Error	22.705	55		

2.3 盐酸克伦特罗灌胃后小鼠肺脏 Bax 蛋白表达的变化

盐酸克伦特罗灌胃后小鼠肺脏 Bax 蛋白表达的免疫组化检测结果见图 2。由图 2 可以看出,盐酸克伦特罗灌胃小鼠后,各期不同处理小鼠肺脏 Bax 蛋白的表达均有不同程度的增强。由表 8 可知,I 组灌胃 5~10 d 时小鼠肺脏 Bax 蛋白阳性表达的面密度值与对照组相比差异不显著($P>$

0.05),20~30 d 时肺脏 Bax 蛋白阳性表达的面密度值显著($P<0.05$)增大;II 组在灌胃 5 d 时小鼠肺脏 Bax 蛋白阳性表达的面密度值与对照组相比差异不显著($P>0.05$),10~30 d 时肺脏 Bax 蛋白阳性表达的面密度值与对照组间的差异达显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)水平;III 组在灌胃 5~30 d 时,肺脏 Bax 蛋白阳性表达的面密度值与对照组相比差异均达极显著($P<0.01$)水平。

表 8 盐酸克伦特罗对 Bax 蛋白在小鼠肺脏表达的面密度值的影响
Table 8 Effects of CLH on surface area density of Bax protein in mice's lung μm^{-1}

组别 Group	5 d	10 d	20 d	30 d
CK	0.036 7±0.002 1	0.035 4±0.002 3	0.034 2±0.001 5	0.032 0±0.001 2
I	0.037 6±0.001 8	0.036 9±0.001 4	0.036 2±0.002 1 *	0.035 7±0.001 5 *
II	0.038 2±0.003 2	0.037 4±0.002 1 *	0.037 0±0.001 8 * *	0.036 5±0.002 6 * *
III	0.050 2±0.002 1 * *	0.047 4±0.001 7 * *	0.045 1±0.001 9 * *	0.043 7±0.002 6 * *

3 讨 论

3.1 CLH 对发育期小鼠肺脏抗氧化酶活性的影响

SOD 是生物体内惟一直接以自由基为底物的酶,能催化超氧化物阴离子自由基(O_2^-)发生歧化反应,将其转变为 H_2O_2 和 O_2 ,是生物重要的保护酶。SOD 的活性和含量反映了机体清除氧自由基的能力^[12]。本研究表明,CLH 灌胃后,12.5、25.0 和 50.0 mg/kg 3 个剂量组中小鼠肺脏 SOD 的活性均呈降低趋势,表明 CLH 诱导机体产生了过量的自由基,超出了机体的清除能力,体内自由基产生与清除之间的动态平衡被破坏,从而使 SOD 活性降低。这与李明祯等^[9]关于 CLH 对小鼠肝脏损伤的研究

结果相似,即 CLH 使小鼠肝脏 SOD 和 GSH-PX 的活性显著下降。聂木海等^[8]的研究也表明,CLH 可使大鼠血清中的 SOD 活性显著降低。本试验结果表明,CLH 的使用剂量越高,灌胃时间累积越长,对小鼠肺脏 SOD 活性的作用越明显,对 SOD 防御系统的损害越严重。

CAT 是机体抗氧化体系中另一种重要的抗氧化物酶,能够清除 SOD 催化活性氧自由基所产生的 H_2O_2 ,使其转化为 H_2O 和 O_2 ,以减轻生物体受到的伤害^[13-15]。本试验显示,CLH 灌胃后,12.5、25.0 和 50.0 mg/kg 3 个剂量组小鼠肺脏的 CAT 活性均有不同程度的降低,这可能是当机体遭受 CLH 等药物胁迫时,机体在短时间内产生了大量的羟自由

基,这些积聚的羟自由基氧化修饰 CAT 的氨基酸残基,破坏 CAT 的结构,降低 CAT 与底物的结合能力,最终导致 CAT 活性降低。本试验结果表明,

小鼠肺脏 CAT 活性与 CLH 之间具有剂量相关性,CLH 的使用剂量越高,累积作用时间越长,其对小鼠肺脏 CAT 活性的影响程度越大。

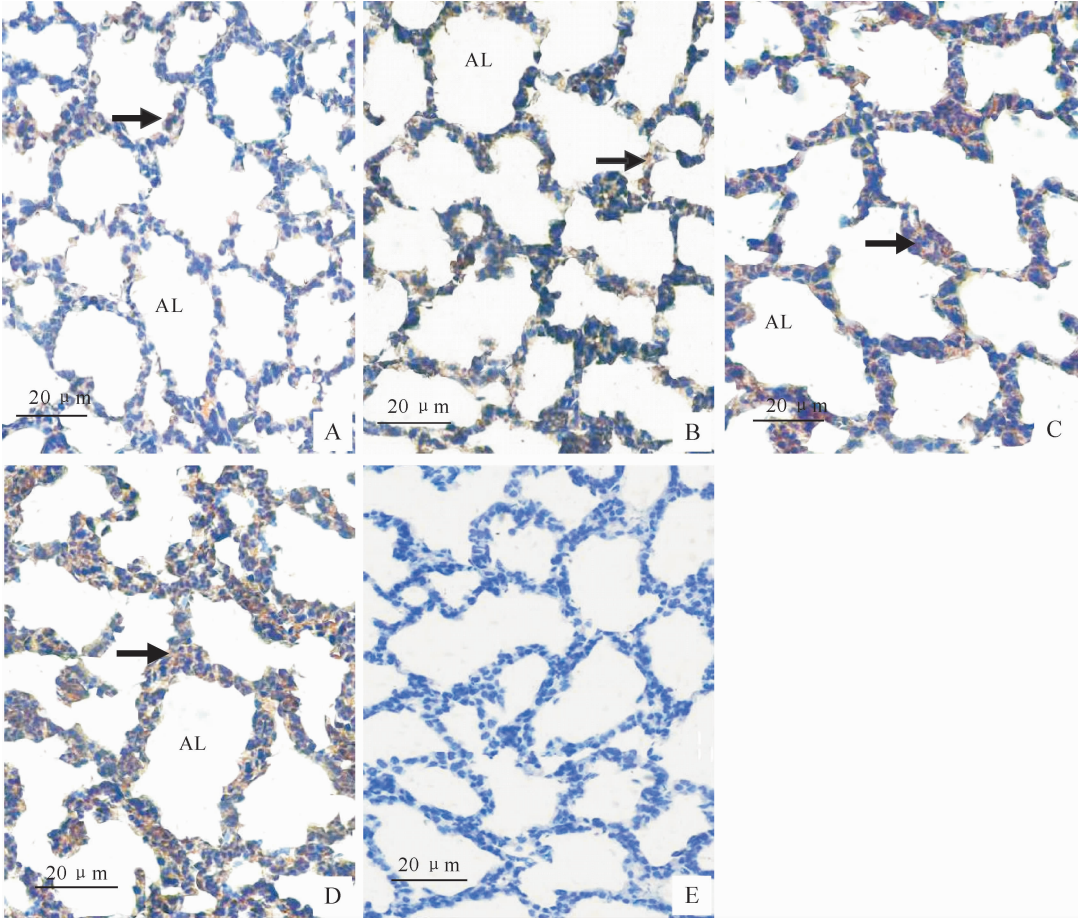


图 2 灌胃盐酸克伦特罗 30 d 后小鼠肺脏组织 Bax 蛋白的免疫组织化学观察

A、B、C、D. 分别为 Bax 蛋白在对照组和 I、II、III 组小鼠肺脏中的表达;E. 阴性对照;AL. 肺泡;→. 示阳性产物

Fig. 2 Immunohistochemical observation of Bax protein in mice lung after CLH treated at 30 d

A、B、C、and D denote respectively the expression of Bax protein in mice lung in control, I, II, and III groups at 30 days;

E. Negative comparison; AL, alveolous; →. Show positive product

活性氧最易攻击细胞膜上的不饱和脂肪酸,产生过氧化作用,其分解产物 MDA 可导致 DNA 分子链断裂或碱基缺失,使膜的流动性和弹性下降,也可直接破坏细胞膜结构的完整性^[6],同时又可与蛋白质的游离氨基作用,引起蛋白质分子内和分子间的交联,导致细胞损伤^[16]。所以,MDA 的含量可以反映脂质过氧化物的生成量,据此可以推断机体内的脂质过氧化损伤情况^[17]。本试验结果显示,CLH 灌胃后,12.5、25.0 和 50.0 mg/kg 3 个剂量组小鼠肺脏 MDA 的含量均呈升高趋势,表明机体摄入大量 CLH 后破坏了机体的抗氧化酶机制,抗氧化酶活性下降,过量的自由基无法被清除,导致大量脂质过氧化物降解,MDA 含量增加。这与前人对小鼠

肝脏和大鼠血清的研究结果一致,即 CLH 可使小鼠肝脏和大鼠血清的 MDA 含量升高^[8-9]。

以往的研究表明,CLH 对小鼠心、肝和大鼠血清的 SOD、GSH-PX 活性及 MDA 含量的影响具有明显的剂量效应关系^[6-9]。赵晶晶等^[18]研究发现,CLH 在小鼠毛发、肝肾和肌肉中的残留量与累积时间呈正向关系。本研究结果表明,CLH 对小鼠肺脏 SOD、CAT 活性及 MDA 含量均有影响,而且剂量因素对小鼠肺脏 SOD、CAT 活性及 MDA 含量的影响大于时间因素。这可能是由于 CLH 容易通过气-血屏障引起 SOD、CAT 活性及 MDA 含量的改变,进而对肺脏造成损害。Simth 等^[2]在比较 CLH 在动物肺、肝、心和肾中的残留量时发现,残留最高的

组织是肺,其次是心、肝和肾。同时,处于生长发育期小鼠的肺脏可能对外界有毒物质更敏感,即使少量的 CLH 都会引起机体生理功能的改变。

3.2 CLH 对小鼠肺脏组织结构的影响

CLH 的滥用已成为严重的社会问题,少年儿童的组织器官正处于快速发育和完善时期,接触有毒物品特别容易引起生理过程的损害。王恩峰等^[7]报道,CLH 可使小鼠心肌细胞颗粒变性、断裂、溶解,肌纤维横纹消失,大部分心肌表现为团块状物结构均质样的凝固性坏死。在对牛生殖系统的研究中发现,CLH 可引起卵巢卵泡闭锁性萎缩、功能性黄体的完全缺失、子宫内膜腺体数量的减少及子宫内膜细胞和腺上皮细胞胞浆体积的缩小^[19]。Illera 等^[20]报道,经口给予大鼠 CLH 时,可导致大鼠肾上腺分泌功能过度而使肾上腺皮质激素细胞增生。在试管内对人淋巴细胞进行分析时发现,CLH 可使染色体发生畸变^[21]。关于 CLH 对机体的损伤机制,可能在于 CLH 与 β -受体的结合是通过刺激蛋白(Gs)作用于腺苷酸环化酶(AC)并使之活化,活化的腺苷酸环化酶使三磷酸腺苷(ATP)转变为环腺苷酸(cAMP),环腺苷酸激活蛋白激酶 K(PK)或其本身被磷酸二酯酶(PDE)作用而失活,促使酶的磷酸化,导致大量 Ca 内流,使胞浆内 Ca^{2+} 超载,从而触发了一系列病理反应,包括线粒体发生肿胀,进而导致细胞死亡^[6,8];CLH 可以显著降低柠檬酸合成酶、细胞色素氧化酶和琥珀酸脱氢酶等氧化代谢过程中所必需的生物酶的活性^[10],从而引发代谢紊乱。有研究表明,肺泡是肺进行气体交换的功能单位,一旦肺泡结构出现异常,就会直接影响肺的呼吸功能,肺泡直径增大会影响单位面积内肺泡的数量,在一定程度上减少了肺泡表面积,即减少了肺呼吸面积,降低了肺内氧的利用率,而肺泡隔的增厚则会影响肺泡与肺毛细血管间的气体交换率^[22-23],因此,肺泡直径的增大和肺泡隔的增厚减少了肺气体扩散容量。本试验显示,CLH 使小鼠肺组织呈现出肺泡直径变大、肺泡隔增厚等病理学特点。与对照相比,50.0 mg/kg 剂量组小鼠肺泡直径和肺泡隔厚度变化极显著($P < 0.01$)增大或变厚,表明 CLH 对肺组织结构有损伤作用。这可能是由于 CLH 使肺脏 SOD 和 CAT 活性下降,过多的自由基不能被清除,膜脂质过氧化反应增强,产生的过氧化代谢产物(MDA)含量增加,引起膜结构破坏^[6],同时破坏了肺的气-血屏障,使毛细血管的通透性增加,进而表现出肺泡面积增大、肺泡隔增厚等病理学特征。

Bax 蛋白作为 Bcl-2 蛋白家族的一员,属于“多结构域”促凋亡蛋白,在正常细胞以单聚体形式存在于细胞质中。当细胞发生凋亡时,Bax 蛋白会从细胞质转移到线粒体,发生寡聚化的同时,通过其 C 端疏水结构域插入到线粒体外膜,导致线粒体膜通透性增加,跨膜电位消失,释放膜间隙凋亡相关蛋白,激活下游 Caspase 依赖性或非依赖性凋亡途径而促进细胞凋亡^[24-25]。本试验观察发现,CLH 灌胃后,小鼠肺脏 Bax 蛋白阳性表达增强,且随着剂量增加表达越强烈,表明 Bax 蛋白有直接促进细胞凋亡的功能,其表达在一定程度上能反应肺脏细胞凋亡的状况,可以作为肺脏受损程度的评价指标。

综上所述,CLH 对小鼠肺脏发育的影响具有时间-剂量效应,会引起小鼠肺脏结构的改变和抗氧化能力的下降,对小鼠肺脏组织结构的损伤可能与肺脏中 SOD、CAT 活性及 MDA 含量的变化有一定相关性,这种影响可能在小鼠发育后期表现出的临床症状中扮演着重要角色。

[参考文献]

- [1] Smith D J. Total radioactive residues and clenbuterol residues in swine after dietary administration of clenbuterol for seven days and preslaughter withdrawal periods of zero, or seven days [J]. J Anim Sci, 2000, 78: 2903-2912.
- [2] Smith D J, Paulson G D. Distribution, elimination, and residues of clenbuterol-HCl in Holstein calves [J]. J Anim Sci, 1997, 75 (2): 454-461.
- [3] Drennan W G. Clenbuterol not approved for use in cattle in Canada [J]. Can Vet J, 1994, 35(8): 474-475.
- [4] 张清安, 范学辉. 动物性食品中盐酸克伦特罗的研究进展 [J]. 食品科学, 2005, 26(4): 265-268.
Zhang Q A, Fan X H. Review on residue risk hazards of clenbuterol and methods of assay in animal food [J]. Food Science, 26(4): 265-268. (in Chinese)
- [5] 贾 强, 张振玲, 王筱芬, 等. 盐酸克伦特罗的急性毒性和致突变试验 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19(1): 75-76.
Jia Q, Zhang Z L, Wang Y F, et al. Studies on acute toxicities and mutagenicity of clenbuterol [J]. Journal of Toxicology, 2005, 19(1): 75-76. (in Chinese)
- [6] 邹本草, 刘焕奇, 邹 明. 盐酸克伦特罗对小鼠心肌 ATP 酶和抗氧化能力的影响 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(7): 33-35.
Zou B G, Liu H Q, Zou M. Effects of clenbuterol on levels of ATP and antioxidant capacity of myocardium in mice [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(7): 33-35. (in Chinese)
- [7] 王恩峰, 张 霞, 庞全海. 盐酸克伦特罗对小鼠体重及心脏组织形态学的影响 [J]. 中国动物检疫, 2010, 27(8): 37-40.
Wang E F, Zhang X, Pang Q H. Influence of clenbuterol hydrochloride on the weight and heart histomorphology of mouse

- [J]. China Journal of Animal Quarantine, 2010, 27(8): 37-40. (in Chinese)
- [8] 聂木海, 梁晓芸, 张全新, 等. 盐酸克伦特罗对大鼠 SOD、MDA 及免疫器官的影响 [J]. 实用预防医学, 2008, 15(5): 1572-1573.
- Nie M H, Liang X Y, Zhang Q X, et al. Effects of clenbuterol on levels of SOD, MDA and immunological organs of rats [J]. Practical Preventive Medicine, 2008, 15(5): 1572-1573. (in Chinese)
- [9] 李明桢, 刘焕奇, 邹明, 等. 盐酸克伦特罗对小鼠肝脏损伤的研究 [J]. 毒理学杂志, 2009, 19(3): 217-219.
- Li M Z, Liu H Q, Zou M, et al. Effects of clenbuterol hydrochloride on the functions of livers in mice [J]. Journal of Toxicology, 2009, 19(3): 217-219. (in Chinese)
- [10] 张园园, 吴永宁. 克伦特罗的毒性作用及其中毒机制 [J]. 卫生研究, 2002, 31(4): 328-330.
- Zhang Y Y, Wu Y N. Toxicological effects of clenbuterol in human and animals [J]. Journal of Hygiene Research, 2002, 31(4): 328-330. (in Chinese)
- [11] 王昱. 虎皮鹦鹉小脑皮层光镜和透射电镜观察及 Bax 蛋白的表达 [J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(5): 531-536.
- Wang Y. Light and transmission electron microscopical observation and expression of Bax protein of the cerebellar cortex structure of *Melopsittacus undulatus* [J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2009, 25(5): 531-536. (in Chinese)
- [12] Silvestra F, Dierick J F, Dumont V, et al. Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimation to cadmium [J]. Aquatic Toxicology, 2006, 79: 46-58.
- [13] 邓海平, 俞诗源, 陈玉琴, 等. X 射线辐射对仔鼠体重、皮毛生长及肝、肾脏组织 SOD、CAT 活力及 MDA 含量的影响 [J]. 动物学报, 2008, 54(6): 1029-1037.
- Deng H P, Yu S Y, Chen Y Q, et al. Effects of X-ray on post-natal body weight, growth of skin and hair, activities and content of superoxide dismutase, catalase and maleic dialdehyde in liver and kidney of mice [J]. Acta Zoologica Sinica, 2008, 54(6): 1029-1037. (in Chinese)
- [14] Burgeat T, Bocquene G, Porle C, et al. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea [J]. Marine Ecology Progress Series, 1996, 131(2): 125-141.
- [15] Peters I D, Livingstone D R. Antioxidant enzyme activities in embryological early larval stages of turbot [J]. J Biol, 1996, 49: 986-997.
- [16] 陈瑗, 周玫. 自由基医学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1991: 42-371.
- Chen Y, Zhou M. Free radical medicine [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 1991: 42-371. (in Chinese)
- [17] 方允中, 郑荣梁, 沈文梅. 自由基生命科学进展 [M]. 北京: 原子能出版社, 1998: 71-119.
- Fang Y Z, Zheng R L, Shen W M. Advances in free radical life sciences [M]. Beijing: Atomic Energy Press, 1998: 71-119. (in Chinese)
- [18] 赵晶晶, 李云兰, 梁晋琼, 等. 盐酸克伦特罗在小鼠毛发与肝肾和肌肉中残留量关系的研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(8): 1277-1281.
- Zhao J J, Li Y L, Liang J Q, et al. Contribution and correlation of residual clenbuterol hydrochloride in hair, liver, kidney and muscle of rat [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2009, 29(8): 1277-1281. (in Chinese)
- [19] Girardi C, Badino P, Re G, et al. Stato recettoriale e pruri anatomico istopatologici del tratto genitale fenanilico in vitelli a carne Bianca [J]. Atti Soc It Buiatria, 1990, 22: 357-367.
- [20] Illera I C, Silvan G, Blass A, et al. The effect of clenbuterol on adrenal function in rats [J]. Analyst, 1998, 123(12): 2521-2524.
- [21] 李美筠. 瘦肉精的毒性和致突变性研究进展 [J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(4): 653-655.
- Li X J. Study on toxicities and mutagenicity of clenbuterol [J]. Journal of Guangxi Medical University, 2009, 26(4): 653-655. (in Chinese)
- [22] 王晓君, 魏登邦, 魏莲, 等. 高原鼢鼠和高原鼠兔肺细叶的结构特征 [J]. 动物学报, 2008, 54(3): 531-539.
- Wang X J, Wei D B, Wei L, et al. Characteristics of pulmonary acinus structure in the plateau zokor *Myospalax baileyi* and plateau pika *Ochotona curzoniae* [J]. Acta Zoologica Sinica, 2008, 54(3): 531-539. (in Chinese)
- [23] 张欢乐, 吴伟, 吴兴中. 维生素 A 缺乏对大鼠肺脏发育的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(3): 220-223.
- Zhang H L, Wu W, Wu X Z. Effects of vitamin A deficiency on the development of lung in rats [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2008, 16(3): 220-223. (in Chinese)
- [24] Goll D E, Thompson V F, Li H Q, et al. The calpain system [J]. Physiol Rev, 2003, 83(3): 731-801.
- [25] 王昱, 李重阳, 俞诗源, 等. 注射海洛因、麻黄素对仔鼠大脑颞叶皮层结构及学习记忆能力的影响 [J]. 解剖学报, 2009, 40(5): 724-731.
- Wang Y, Li C Y, Yu S Y, et al. Effects on the structure of cerebral temporal lobe cortex and capability of learning and memory of filial mice after administration of heroin and ephedrine [J]. Acta Anatomica Sinica, 2009, 40(5): 724-731. (in Chinese)