

环磷酰胺诱导的尼罗罗非鱼体内外肝损伤模型的构建

曹丽萍^{1,2}, 杜金梁^{1,2}, 贾睿^{1,2}, 丁炜东^{1,2}, Galina Jeney^{2,3}, 徐跑^{1,2}, 殷国俊^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部鱼类免疫药理学国际联合实验室, 无锡 214081;

3. Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation, Ann Light 8, Szarvas H-4440, Hungary)

摘要:以环磷酰胺(CTX)为诱导物, 建立罗非鱼体内外急性肝损伤模型。体外, 0、5、10、15、20 和 25 mmol·L⁻¹ CTX 分别作用于离体培养的罗非鱼精密肝切片 (PCLS) 6 h 后, 测定切片培养上清中谷丙转氨酶 (GPT)、谷草转氨酶 (GOT) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 水平, 同时收集肝切片, 用噻唑蓝 (MTT) 法检测肝切片增殖活性, 测定切片内总抗氧化能力 (T-AOC)、丙二醛 (MDA)、过氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽 (GSH) 水平。体内, 采用胸腔注射法造模, 每千克鱼体重分别注射 0、10、25、75 和 100 mg 环磷酰胺 (下文以 mg·kg⁻¹ 表示), 每隔 3 d 给药 1 次, 连续 3 次。末次给药后第 4 天取血, 测定罗非鱼血清中 GPT、GOT 和 LDH 及肝组织匀浆中 T-AOC、MDA、SOD 和 GSH 水平。结果显示: 20~25 mmol·L⁻¹ CTX 作用体外培养精密肝切片 6 h 及 75~100 mg·kg⁻¹ CTX 胸腔注射罗非鱼后, 均可以导致 GPT、GOT 和 LDH 活力显著升高; T-AOC、SOD 活力及 GSH 含量显著下降, MDA 含量显著提高。同时, 20 和 25 mmol·L⁻¹ CTX 能导致肝切片增殖活性显著下降, 分别为空白对照组的 67.29%和 55.41%, 且有剂量依赖性。结果表明: CTX 可引起罗非鱼肝损伤; 分别采用 20 mmol·L⁻¹ CTX 作用体外培养 PCLS 6 h 或者采用 75~100 mg·kg⁻¹ CTX 胸腔注射罗非鱼, 每隔 3 d 给药 1 次, 连续 3 次, 均可以构建体内外急性肝损伤模型。

关键词: 环磷酰胺; 罗非鱼; 肝损伤模型; 体内外

中图分类号: S965.125; S941.91

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)01-0076-05

Establishment of the acute hepatic injury model induced by cyclophosphamide in tilapia (*Oreochromis niloticus*) in vivo and in vitro

CAO Liping^{1,2}, DU Jinliang^{1,2}, JIA Rui^{1,2}, DING Weidong^{1,2}, Galina Jeney^{2,3}, XU Pao^{1,2}, YIN Guojun^{1,2}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. International Joint Research Laboratory for Fish Immunopharmacology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation, Ann Light 8, Szarvas H-4440, Hungary)

Abstract: The present study aimed to develop acute liver injury models of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in vivo and in vitro using cyclophosphamide (CTX) as hepatotoxicant. In vitro, the precision cut liver slices (PCLS) were exposed to 6 concentrations of CTX (0, 5, 10, 15, 20 and 25 mmol·L⁻¹) for 6 h, and the levels of glutamate oxalate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT) and lactate dehydrogenase (LDH) in slices culture supernatant were determined. At the same time, the total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels in slices and the survival rate of the PCLS were detected. In vivo, tilapias were injected with 0, 10, 25, 50, 75 and 100 mg·kg⁻¹ CTX intrapleurally. It was administered for intrapleurally once every three days for three times. Samples were taken on the 4th day after the last administration. The GPT, GOT and LDH of serum and T-AOC, SOD, GSH and MDA of liver tissue homogenates were detected. The results showed that both in the PCLS treated with CTX at 20 - 25 mmol·L⁻¹ for 6 h and the tilapias injected with 75-100 mg·kg⁻¹ CTX, the activities of GPT, GOT and LDH were significantly increased, the MDA production were increased, while the activities of T-AOC, SOD and the GSH content were decreased. Meanwhile, 20 and 25 mmol·L⁻¹

收稿日期: 2021-04-08

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2019JBFM11)和江苏自然科学基金 (BK20201143) 共同资助。

作者简介: 曹丽萍, 博士, 副研究员。E-mail: caoliping771004@126.com

* 通信作者: 殷国俊, 研究员, 博士生导师。E-mail: yingj@ffrc.cn

CTX significantly decreased PCLS viabilities (67.29% and 55.41%, respectively) compared to the control dose-dependently. Overall results proved CTX can cause liver injury in tilapia; PCLS cultured in vitro with 20 mmol·L⁻¹ CTX for 6 h or tilapia injected with 75 - 100 mg·kg⁻¹ CTX intrapleurally once every three days for three times can build acute liver injury models in vivo and in vitro, respectively.

Key words: cyclophosphamide; *Oreochromis niloticus*; hepatic injury model; in vivo and in vitro

随着集约化养殖程度的不断提高、养殖密度的加大以及养殖环境日趋恶化, 抗生素和杀虫剂的滥用等因素造成鱼类病害频发, 尤其是肝脏疾病。肝脏是鱼类物质和能量代谢的重要器官, 也是机体重要屏障器官, 其解毒和吞噬功能对机体有重要保护作用。肝损伤或病变往往导致鱼类机体代谢机能紊乱和抗病力降低, 极易造成继发传染性疾病的暴发^[1]。因此, 研究鱼肝损伤的发病机制, 研发保肝药物对于鱼类的肝保护有十分重要的意义。

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 经肝细胞色素 CYP450 酶系代谢, 生成了具有活性的代谢产物 - 磷酸胺氮芥, 丙烯醛及氯乙醛^[2-3]。它们与 DNA 等生物大分子产生共价结合后, 导致机体抗氧化防御体系的抗氧化能力下降, 大量自由基形成, 最终造成氧化应激性肝损伤^[4-8]。CTX 诱导的肝损伤模型在临床上有着广泛的应用和研究。梁园等^[9]利用环磷酰胺诱导小鼠肝损伤后来探讨玉郎伞多糖的治疗作用及保护机制; 王晓丹等^[10]也通过复制环磷酰胺诱导的小鼠肝损伤模型来观察黄伞脂溶性成分对肝损伤的保护作用。但是在罗非鱼上利用环磷酰胺构建的体内外肝损伤模型还没有相关的报道。本研究将以环磷酰胺作为肝毒剂分别诱导罗非鱼体外培养的精密肝切片 (precision-cut liver slice, PCLS) 及尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 来构建体外和在体的肝损伤模型, 以期对研究肝损伤信号转导机制、筛选及研究保肝药物提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

体重为 (150 ± 5) g 的健康淡水养殖尼罗罗非鱼由中国水产科学院淡水渔业研究中心渔场提供。饲养于循环水系统中 (每个缸体为 240 L), 饲养条件为 (27 ± 2) °C, pH 6.8 ~ 7.6, DO (dissolved oxygen) > 5 mg·L⁻¹, NH₃ < 0.05 mg·L⁻¹, H₂S < 0.01 mg·L⁻¹。每次投喂通威基础饲料 (28%粗蛋白, 6%粗脂肪和 12%粗灰分), 投喂量为鱼体质量的 2%, 每天投喂 2 次。

环磷酰胺购于美国 SIGMA 公司 (St. Louis, Missouri, USA)。L-15 培养基、青链霉素 (streptomycin/penicillin: P/S)、噻唑兰 [3-(4, - dimethylthiazol- 2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide,

MTT]、硅石-聚乙烯吡咯烷酮 (phytohaemagglutinin, percoll) 和肝素 (heparin) 购于美国 SIGMA 公司 (St. Louis, Missouri, USA)。小牛血清 (fetal calf serum, FCS) 和细胞培养板购自于 GIBCO 公司。

1.2 试验设计

1.2.1 CTX 诱导的罗非鱼精密肝切片 (precision cut liver slices, PCLS) 损伤模型制备 PCLS 预培 2 h 后, 移除培养上清, 换用含不同浓度 CTX (0、5、10、15、20 和 25 mmol·L⁻¹) 的 L-15 培养基继续培养, 500 μL·孔⁻¹, 每个实验浓度均设 6 个重复; 27 °C 培养 6 h, 收集培养上清, 测定谷草转氨酶 (glutamate oxalate transaminase, GOT)、谷丙转氨酶 (glutamate pyruvate transaminase, GPT) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH); 收集各组切片, 测定切片匀浆中总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、过氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽 (glutathione, GSH), 同时测定肝切片的活性。

1.2.2 CTX 诱导的罗非鱼在体肝损伤模型制备 健康罗非鱼, 随机分为 6 组, 每组 20 尾, 2 个平行重复, 每缸 10 尾。分别为不同浓度的环磷酰胺药物组 (5 组) 和空白对照组 (1 组)。罗非鱼隔食 12 h 后, 称体重, 环磷酰胺药物组按每公斤鱼体重分别胸腔注射 10、25、50、75 和 100 mg 环磷酰胺 (下文以 mg·kg⁻¹ 表示), 空白对照组注射相同剂量的生理盐水。每隔 3 d 给药 1 次, 连续 3 次。整个养殖及试验过程中罗非鱼死亡率为 0。末次给药后第 4 天采样, MS-222 麻醉后各组随机挑选 8 尾, 每尾分别称重并采集血液和肝组织待用, 测定血清中 GOT、GPT 和 LDH 及切片匀浆中 T-AOC, MDA、SOD 和 GSH。

1.3 罗非鱼精密肝切片 (PCLS) 的制备

参照曹丽萍等^[11]的方法进行。随机选择的罗非鱼经麻醉放血处死, 75%酒精消毒处理, 超净工作台内取其肝脏置于预先以氧饱和的冰 Krebs-Henseleit (克-亨氏液, pH 7.4) 缓冲液中, 去除包膜及凝血后, 用解剖刀处理成体积为 5 mm×5 mm×5 mm 的组织块, 然后包埋入 2.5%低熔点胶内。待组织包埋物冷凝后, 置于含缓冲液的标本槽内进行切片, 切片的厚度为 300 μm, 整个过程持续通氧。挑选完整切片置于 48 孔板中, 每孔 5 片, 每孔加入

500 μL L-15 培养基(含 1% S/P、0.2% heparin 和 5% FCS), 27 $^{\circ}\text{C}$ 水平振荡 (120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 培养。

1.4 精密肝切片增殖活性检测

参照曹丽萍等^[11]的方法进行。精密肝切片转移至 48 孔板内, 每孔加 450 μL L-15 和 50 μL MTT (7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 27 $^{\circ}\text{C}$, 作用 15 min。弃上清, 每孔再加入 500 μL 二甲基亚砜, 酶标仪上振荡 20 min 促使结晶物溶解充分。每孔吸取 100 μL 转移至 96 孔板上, 在酶联免疫检测仪上, 570 nm 波长测定光吸收值。所有的操作在室温下避光进行。

切片存活率按公式^[12]计算: 切片存活率=

$$A_{570}(\text{处理组}) / A_{570}(\text{对照组}) \times 100\%$$

1.5 生化指标的测定

各组血样 4 $^{\circ}\text{C}$, 静置 2 h 后, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 分离血清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。按照试剂盒操作说明分别测定血清及肝切片培养上清中 GPT、GOT 和 LDH 活力。

各试验组肝切片或肝组织用滤纸吸去表面水分, 称重, 用眼科剪刀剪碎, 移入匀浆管中, 加入 9 倍体积的生理盐水 (体积分数为 0.86%) 进行匀

浆。该匀浆以 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清。肝组织匀浆中 T-AOC、SOD、GSH 和 MDA 等氧化指标按照试剂盒操作。试剂盒均购自于南京建成生物工程研究所科技有限公司。

1.6 数据分析

使用 SPSS 20.0 软件包进行数据分析, 所有数值均以均值 \pm 标准误表示。所有数据通过 One-way ANOVA 分析, 并对不同组间数据进行 Duncan 多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 CTX 诱导的罗非鱼 PCLS 损伤模型的建立

2.1.1 CTX 对罗非鱼 PCLS 培养上清中 GOT、GPT 和 LDH 的影响 由表 1 中的数据可知, 当 0~25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CTX 作用于罗非鱼紧密肝切片 6 h 后, 随着 CTX 作用浓度的升高, 切片培养上清中 GPT、GOT 和 LDH 活力显著升高。其中, 与空白对照组相比, 10~25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CTX 能显著促进 GPT 和 LDH 水平 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 20~25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CTX 能显著促进 GOT 水平 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 CTX 对罗非鱼精密肝切片培养上清液中 GOT、GPT 和 LDH 的影响

Table 1 Effects of cyclophosphamide at different concentrations on GOT, GPT and LDH in PCLS culture supernatant of tilapias

组别	浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	GPT/ ($\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$)	GOT/ ($\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$)	LDH/ ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)
Control	0	15.48 \pm 2.75	8.66 \pm 1.50	2 699.29 \pm 175.39
CTX	5	19.43 \pm 1.77	11.36 \pm 1.56	2 685.68 \pm 151.56
	10	22.56 \pm 2.31*	10.26 \pm 1.49	3 238.18 \pm 158.50**
	15	21.64 \pm 1.27*	9.98 \pm 0.37	3 931.18 \pm 105.90**
	20	24.79 \pm 2.14**	13.48 \pm 1.24*	4 385.50 \pm 114.66**
	25	30.42 \pm 3.49**	16.15 \pm 2.12**	5 274.42 \pm 101.53**

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下同。

表 2 不同浓度 CTX 对罗非鱼精密肝切片中 SOD、MDA、GSH 和 T-AOC 的影响

Table 2 Effects of cyclophosphamide at different concentrations on SOD, MDA, GSH and T-AOC in PCLS of tilapias

组别	浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	SOD/ ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{pro})$)	MDA/ ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{pro})$)	GSH/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}(\text{pro})$)	T-AOC/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}(\text{pro})$)
Control	0	54.61 \pm 0.26	10.89 \pm 0.77	327.59 \pm 14.95	52.03 \pm 5.96
CTX	5	52.69 \pm 1.31	13.65 \pm 1.98	262.38 \pm 21.70	51.19 \pm 6.51
	10	51.59 \pm 1.07	13.73 \pm 0.45	272.24 \pm 37.05	51.42 \pm 4.57
	15	52.54 \pm 0.87	13.68 \pm 1.00	248.40 \pm 58.01	47.87 \pm 2.70
	20	50.91 \pm 1.25*	15.72 \pm 2.11*	227.40 \pm 24.14*	43.41 \pm 4.60*
	25	49.40 \pm 1.99**	15.61 \pm 1.79*	202.16 \pm 15.39*	40.00 \pm 4.54*

2.1.2 CTX 对罗非鱼 PCLS 中 SOD、MDA、GSH 和 T-AOC 的影响 由表 2 可知, 当 0~25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CTX 作用于罗非鱼精密肝切片 6 h 后, 切片匀浆中 SOD、MDA、GSH 和 T-AOC 等氧化酶也随着 CTX 浓度的升高而显著变化。与空白组相比较, 当 CTX 浓度为 20 和 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 切片匀浆中 SOD、T-AOC 活力及 GSH 含量显著下降, 同时过氧化产物 MDA 大量生成 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2.1.3 CTX 对罗非鱼 PCLS 增殖活性的影响 不同

浓度的 CTX 作用于罗非鱼 PCLS 后, 与对照组相比, 切片的活力下降显著, 且随着 CTX 作用浓度的提高细胞毒性愈加显著 (图 1)。20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CTX 作用于肝切片 6 h 后, 肝切片的活力维持在 65%。结合不同浓度 CTX 对罗非鱼精密肝切片生化指标及对切片活力的影响, 选择 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CTX, 损伤 6 h 作为构建 PCLS 损伤模型的条件。

2.2 CTX 诱导的罗非鱼在体肝损伤模型的建立

2.2.1 CTX 对罗非鱼血清中 GOT、GPT 和 LDH 的

影响 不同浓度的 CTX 作用于罗非鱼后, 血清中的 GOT、GPT 和 LDH 跟空白组相比较有显著差异, 且随着 CTX 作用浓度的升高差异愈加显著 (表 3)。75 和 100 mg·kg⁻¹ 的 CTX 能显著提高血清中 GOT 和 GPT 活力 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 50、75 和 100 mg·kg⁻¹ 的 CTX 能显著提高 LDH 活力 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

2.2.2 CTX 对罗非鱼肝组织中 SOD、MDA、GSH 和 T-AOC 的影响 不同浓度的 CTX 作用于罗非鱼肝脏后, 对肝组织抗氧化能力的影响见表 4。脂质过氧化产物 MDA 含量随着 CTX 作用浓度的升高而大量生成, 75 和 100 mg·kg⁻¹ 的 CTX 组的 MDA 含量与空白组比较显著提高 ($P<0.05$); 抗氧化酶类 SOD 活力和 GSH 含量随着 CTX 作用浓度升高而降低, 与对照组相比, 75 和 100 mg·kg⁻¹ 的 CTX 作用组的

SOD 和 GSH 水平均显著降低 ($P<0.05$)。肝的总抗氧化能力 T-AOC 也随着 CTX 作用浓度的提高而显著下降, 75 和 100 mg·kg⁻¹ 的 CTX 作用组的肝内 T-AOC 活力显著低于对照组 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

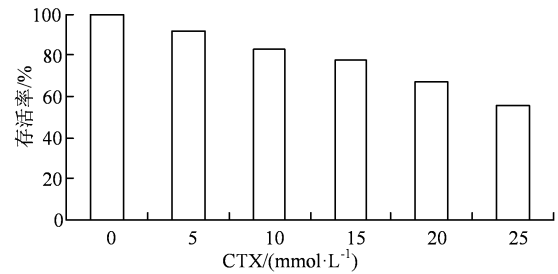


图 1 不同浓度 CTX 对罗非鱼精密肝切片增殖活率的影响 ($\bar{X} \pm SE, n=6$)

Figure 1 Effects of cyclophosphamide at different concentrations on viability in precision-cut liver slice of tilapias ($\bar{X} \pm SE, n=6$)

表 3 不同浓度 CTX 对罗非鱼血清中 GOT、GPT 和 LDH 的影响

Table 3 Effects of cyclophosphamide at different concentrations on GOT, GPT and LDH in serum of tilapias

组别	浓度/(mg·kg ⁻¹)	GPT/(IU·L ⁻¹)	GOT/(IU·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)
Control	0	2.88 ± 0.25	2.90 ± 0.38	2 756.73 ± 115.44
CTX	10	2.65 ± 0.59	3.88 ± 0.63	2 698.69 ± 150.96
	25	3.00 ± 0.57	3.86 ± 0.48	3 350.88 ± 123.50
	50	2.67 ± 0.51	4.05 ± 0.53	3 941.61 ± 117.90*
	75	5.62 ± 1.07*	6.96 ± 0.98**	4 528.16 ± 129.37**
	100	7.74 ± 1.24**	10.03 ± 0.91**	5 704.42 ± 166.59**

表 4 不同浓度 CTX 对罗非鱼肝组织匀浆中 SOD、MDA、GSH 和 T-AOC 的影响

Table 4 Effects of cyclophosphamide at different concentrations on SOD, MDA, GSH and T-AOC in liver homogenate of tilapias

组别	浓度/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹ (pro))	MDA/(nmol·mg ⁻¹ (pro))	GSH/(mg·g ⁻¹ (pro))	T-AOC/(μmol·g ⁻¹ (pro))
Control	0	86.83±6.04	0.59±0.03	58.687±19.44	78.66±6.37
CTX	10	84.08±7.52	0.57±0.07	25.56±15.16	73.99±6.04
	25	84.61±4.29	0.57±0.09	37.86±13.93	70.77±7.52
	50	70.53±5.29*	0.54±0.04	24.85±4.91	66.29±4.29
	75	71.45±4.18*	0.42±0.04*	16.67±9.39*	58.42±5.29*
	100	69.00±6.37*	0.39±0.01*	12.69±2.10*	48.77±4.18**

3 讨论与结论

高剂量的环磷酰胺进入肝脏后, 在肝组织中细胞色素 P450 酶作用下生成磷酰胺氮芥、丙烯醛、氯乙醛及活性氧自由基^[13]。这些产物可以引起急性肝毒性, 抑制肝细胞增殖, 导致肝损伤^[14], 主要表现为肝细胞重要功能酶活性改变、胆红素分泌异常等^[15-16]。何燕萍等^[17]利用环磷酰胺染毒原代培养乳鼠肝细胞, 发现 CTX 能显著降低肝细胞活力。马朝阳等^[18]连续 2 d 腹腔注射 CTX(50 mg·kg⁻¹)致小鼠肝损伤, 发现能显著提高降低小鼠血清中 GOT 和 GPT 水平。陈浩等^[19]也发现一次性大剂量 CTX (200 mg·kg⁻¹) 腹腔注射大鼠, 其血清中 GPT、GOT、碱性磷酸酶和总胆红素等显著升高。本研究中采用

CTX 作用于罗非鱼及其离体培养的精密肝切片, 结果表明 20~25 mmol·L⁻¹ 的 CTX 作用于肝切片 6 h 或 75~100 mg·kg⁻¹ CTX 连续 3 次胸腔注射罗非鱼, 切片培养上清及血清中的 GOT、GPT 和 LDH 活力均显著提高, 结论与上述的研究是一致的; 而且 CTX 作用于肝切片后, 随着浓度的升高, 肝切片活力下降显著。这些结果表明 CTX 具有肝细胞毒性, 诱导肝细胞损伤, 降低了肝细胞膜的稳定性, 使得肝细胞膜的通透性增加, 胞浆内的 GOT、GPT 和 LDH 等可溶性酶大量逸出。

氧化应激是 CTX 诱导肝损伤的主要机制之一^[20-21], 其主要代谢产物丙烯醛的亲电子能力导致机体抗氧化能力下降, 体内生成大量活性氧自由基, 氧自由基通过攻击肝细胞膜上的磷脂分子诱发脂质

过氧化。机体主要表现为 SOD 和 GSH 等关键氧化酶含量减少, 脂质过氧化产物 MDA 大量生成^[22], 以 100 mg·kg⁻¹ 腹腔注射小鼠发现 CTX 能降低 SOD 活力和 GSH 含量, 增加 MDA 含量。陈亚军等^[23]将 CTX 腹腔注射大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 后发现, 肝胰脏 MDA 含量和 SOD 活力显著高于对照组。本研究中, 不同浓度 CTX 作用于罗非鱼及罗非鱼 PCLS 后, 随着 CTX 作用浓度的升高, 肝组织及肝切片中 T-AOC、SOD 和 GSH 的水平而显著降低, MDA 含量显著升高。其中, 20~25 mmol·L⁻¹ 的 CTX 作用于肝切片 6 h 或 75~100 mg·kg⁻¹ CTX 连续 3 次胸腔注射罗非鱼均能对氧化酶含量产生显著的影响。这个结果表明, CTX 作用于罗非鱼后, 诱导了肝脏的氧化损伤, 机体清除自由基能力显著下降, 脂质过氧化产物 MDA 大量生成损伤肝细胞结构, 最终罗非鱼抗氧化能力显著下降。

目前 CTX 作为肝毒剂诱导肝损伤并构建肝损伤模型, 在小鼠^[24]、大鼠^[25]、雏鸡^[26]及雏鹅^[27]都有应用研究, 在水产上相关的研究却很少。本研究采用体外培养的罗非鱼 PCLS 来构建体外肝损伤模型, 通过测定培养上清中 GOT、GPT 和 LDH 及切片中 T-AOC、MDA、SOD 和 GSH 含量以及肝切片增殖活性, 确定了 CTX 诱导的 PCLS 损伤模型以 20 mmol·L⁻¹ 作用 6 h 为宜。罗非鱼在体肝损伤模型通过测定血清中 GOT、GPT 和 LDH 及肝组织匀浆中 T-AOC、MDA、SOD 和 GSH 水平, 推断 75~100 mg·kg⁻¹ CTX 胸腔注射、每隔 3 d 给药 1 次, 连续 3 次可以作为造模的条件。利用 CTX 诱导的罗非鱼 PCLS 损伤模型可以实现短时间内保肝药物高通量初筛, 而在体的肝损模型可以对靶向药物进行深入的机理研究, 对鱼类保肝药物的开发有着重要作用。

参考文献:

- BRUNT E M, RAMRAKHIANI S, CORDES B G, et al. Concurrence of histologic features of steatohepatitis with other forms of chronic liver disease[J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(1): 49-56.
- EL-SERAFAI I, AFSHARIAN P, MOSHFEGH A, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase influences CYP2B6 activity in cyclophosphamide bioactivation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0141979.
- SHEWEITA S A, EL-HOSSEINY L S, NASHASHIBI M A. Protective effects of essential oils as natural antioxidants against hepatotoxicity induced by cyclophosphamide in mice[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165667.
- DELEVE L D. Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: role of glutathione and site of metabolic activation[J]. *Hepatology*, 1996, 24(4): 830-837.
- OHNO Y, ORMSTAD K. Formation, toxicity and inactivation of acrolein during biotransformation of cyclophosphamide as studied in freshly isolated cells from rat liver and kidney[J]. *Arch Toxicol*, 1985, 57(2): 99-103.
- BHANUMATHI P, DEVI P U. Modulation of glutathione depletion and lipid peroxidation by WR-77913 an 2-mercaptopyrroline glycine in cyclophosphamide chemotherapy [J]. *Indian J Exp Biol*, 1994, 32(8): 562-564.
- KHAN S, RAMWANI J J, O'BRIEN P J. Hepatocyte toxicity of mechlorethamine and other alkylating anticancer drugs. role of lipid peroxidation[J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43(9): 1963-1967.
- 施畅, 廖明阳, 郭巧珍, 等. 环磷酰胺对离体大鼠肝细胞毒作用机理研究[J]. *解放军药学报*, 2001, 17(3): 128-131.
- 梁园, 龙腾云, 陈红霞, 等. 玉郎伞多糖对环磷酰胺致小鼠肝损伤的保护作用[J]. *中国药师*, 2014, 17(11): 1800-1803.
- 王晓丹, 杜军, 刘克, 等. 黄伞脂溶性成分对环磷酰胺致小鼠肝损伤的保护作用[J]. *中成药*, 2013, 35(9): 2013-2016.
- 曹丽萍, 杜金梁, 贾睿, 等. CCl₄ 诱导的建鲤精密肝切片损伤模型的构建及 CYP1A 对肝损伤的影响[J]. *安徽农业大学学报*, 2020, 47(1): 18-24.
- BRAIN S D, WILLIAMS T J, TIPPINS J R, et al. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator[J]. *Nature*, 1985, 313(5997): 54-56.
- 王新禹, 梁前进. 环磷酰胺的毒副作用机制及应对措施[J]. *药学进展*, 2006, 30(10): 452-456.
- 张晓峰. 环磷酰胺口服致老年人急性肝损伤[J]. *药物不良反应杂志*, 2005, 7(6): 436.
- SNYDER L S, HEIGH R I, ANDERSON M L. Cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in a patient with wegener's granulomatosis[J]. *Mayo Clin Proc*, 1993, 68(12): 1203-1204.
- ALQAHTANI S, MAHMOUD A M. Gamma- glutamyl-cysteine ethyl ester protects against cyclophosphamide-induced liver injury and hematologic alterations via upregulation of PPAR γ and attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 4016209.
- 何燕萍, 魏道智. 水飞蓟素对环磷酰胺致小鼠肝损伤的保护研究[C]//中药与天然药高峰论坛暨第十二届全国中药和天然药物学术研讨会论文集. 海口, 2012: 304-311.
- 马朝阳, 朱利娟, 罗晨曦, 等. 桦木酸对环磷酰胺致小鼠肝损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2020, 41(21): 147-153.
- 陈浩, 赵威, 俞浩, 等. 基于 FXR-MRP2/BSEP 通路探究车前子水提物对环磷酰胺致大鼠肝损伤的保护作用及机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(5): 85-90.
- 徐博, 吴畏难, 崔晓丽, 等. 杨梅素对环磷酰胺致小鼠肝损伤的保护作用及机制探讨[J]. *营养学报*, 2020, 42(2): 178-182.
- JAIN A, MALHOTRA P, SURI V, et al. Cholestasis in a patient of multiple myeloma: a rare occurrence of borte-zomib induced liver injury[J]. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 2016, 32(1): 181-183.
- HABIBI E, SHOKRZADEH M, CHABRA A, et al. Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice[J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(1): 10-15.
- 陈亚军, 李义, 徐乐, 等. 环磷酰胺对大鳞副泥鳅免疫抑制的研究[J]. *中国饲料*, 2015(14): 26-29.
- 张海峰, 高静, 林娜, 等. 环磷酰胺致肝损伤时肝细胞线粒体的变化[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2008, 18(1): 19-22.
- 施畅, 廖明阳, 王和枚, 等. 环磷酰胺与异环磷酰胺对离体大鼠肝细胞毒性机制[J]. *卫生毒理学杂志*, 2001, 15(3): 144-148.
- 付晶, 赵丹, 林桐, 等. 白术多糖对环磷酰胺致雏鸡肝脏细胞凋亡中线粒体通路的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2019, 50(4): 63-70.
- 钱隆, 刘洋, 李冰心, 等. 白术多糖可能通过 Toll 样受体 4 信号通路缓解环磷酰胺诱导的雏鹅肝脏损伤[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(2): 764-774.