

# 离子液体 $[C_8mim]Cl$ 对泥鳅肝脏的氧化损伤效应

杜启艳,王亚星,南平,常重杰

(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

**摘要:**以泥鳅为实验材料,研究离子液体氯化 1-辛基-3-甲基咪唑 $[C_8mim]Cl$ 对其肝脏的氧化损伤效应.结果显示:各浓度组中活性氧(ROS)含量在染毒 1 d、4 d 和 8 d 后与对照组相比显著升高,1 d 时含量达到峰值;脂质过氧化物(LPO)含量在染毒 1 d 时其低、中、高浓度组与对照组相比显著升高,随着暴露时间的延长,在染毒 4 d 和 8 d 时各浓度组 LPO 含量下降并低于对照组水平;谷丙转氨酶(GPT)含量与对照组相比在低、中、高不同浓度组染毒 1 d、4 d 和 8 d 后,均显著下降;谷胱甘肽还原酶(GR)活力在染毒 1 d、4 d 和 8 d 后各浓度组与对照组相比均呈现出显著下降趋势,在第 8 d 时,达到最低水平.结果表明离子液体 $[C_8mim]Cl$ 对泥鳅肝脏有明显的氧化损伤效应.本研究结果对于人们正确认识“绿色溶剂”离子液体的安全性及其安全使用具有重要参考价值.

**关键词:**离子液体;泥鳅;氧化损伤;肝脏

**中图分类号:**R946.88

**文献标志码:**A

离子液体是一种完全由阴阳离子所组成的盐,在室温或者接近室温状态下呈现液态.根据阳离子的不同,可以分为 4 类:咪唑离子液体、吡啶离子液体、烷基季铵离子液体和烷基季磷离子液体.其阴离子包括 $Cl^-$ 、 $Br^-$ 、 $BF_4^-$ 和 $PF_6^-$ 等<sup>[1]</sup>.作为一种新型溶剂,离子液体具有热稳定性,不易燃,不挥发,没有蒸气压或其蒸气压接近于零等诸多优良特性<sup>[2]</sup>.因此,离子液体被称为环境友好型“绿色溶剂”<sup>[3]</sup>.目前,离子液体已经被广泛应用于有机合成、催化、化工分离和材料加工等领域<sup>[4]</sup>.近年来,有报道指出离子液体并非所谓的“绿色溶剂”其对生物体的毒性也是存在的<sup>[5-6]</sup>.

河流湖泊是地球上的主要生态系统,环境的污染首先表现在水体的污染.鱼类是水生生物链中的最高消费者,并且在维持水生生态系统平衡中扮演着重要角色,水体的污染首先影响的高等生物就是鱼类<sup>[7]</sup>.泥鳅是分布非常广泛的淡水鱼类,室内易饲养,对环境要求不高,越来越多地被用作作为毒理学实验中的模式生物来检测水生环境<sup>[8]</sup>.

本研究所采用的离子液体是 $[C_8mim]Cl$ ,以成体泥鳅为受试实验动物,检测了谷丙转氨酶(GPT)、活性氧(ROS)、谷胱甘肽还原酶(GR)和脂质过氧化物(LPO)等 4 种指标,探讨 $[C_8mim]Cl$ 对泥鳅肝脏的氧化损伤效应,以期为人们正确认识离子液体的安全性及其合理使用提供实验依据.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料与试剂

成体泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)体长为 7~9 cm,体质量为 10~12 g,从海鸿农贸市场(位于河南省新乡市)购买,实验前在实验室驯养一周,选取体型一致,健康活泼的个体进行实验.实验用水为暴晒一周的自来水,水温维持在 25 ℃左右.

$[C_8mim]Cl$ 试剂购自上海成捷化学有限公司,谷丙转氨酶(GPT)测试盒、活性氧(ROS)测试盒、谷胱甘肽还原酶(GR)测试盒,脂质过氧化物(LPO)测试盒和蛋白定量测试盒均购自南京建成生物工程研究所.

收稿日期:2018-01-30;修回日期:2018-11-01.

基金项目:国家自然科学基金(U1804116);河南省重点科技攻关项目(172102210048;172102110098).

作者简介(通信作者):杜启艳(1964—),女,河南卫辉人,河南师范大学教授,从事分子细胞遗传学研究,E-mail:041019@

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 成体泥鳅的染毒

根据预实验结果,设置低、中、高 3 个质量浓度处理组,分别为 20 mg/mL, 40 mg/mL, 80 mg/mL 和一个空白对照组,对泥鳅进行染毒处理,实验持续 8 d,每 24 h 更换一次与其原始处理液等体积等浓度的离子液体溶液.每个处理组有 15 条鱼,每一组实验用鱼饲养在 4 L 的玻璃容器内,实验期间不提供食物.分别在染毒的第 1 d、4 d、8 d 各取一次材(3 尾/组),每组实验重复 3 次.实验期间没有鱼死亡.

### 1.2.2 样品制备和氧化指标的检测

在染毒的第 1 d、4 d 和 8 d,每个实验组随即选出 3 条鱼,将泥鳅断尾放血并进行解剖,取出肝脏,用生理盐水洗去肝脏上多余的血液,称取重量,迅速放置已经预冷的研钵中,根据样品的质量比加入 9 倍体积的预冷生理盐水,冰上研磨至匀浆,以肉眼条件下看不到组织块为准.然后将匀浆转移至 1.5 mL EP 管中,用离心机以 2 500 r/min 离心 10 min,小心的吸取上清液转移至新的离心管中,即为粗酶液,做好标记,4 °C 保存备用.用考马斯亮蓝法测定样品蛋白浓度后,按照试剂盒生产商的说明书,依次测定肝脏组织中的谷丙转氨酶(GPT)、活性氧(ROS)、谷胱甘肽还原酶(GR)和脂质过氧化物(LPO)的含量.

### 1.3 数据分析

利用 SPSS17.0 对实验数据进行单因素方差分析,并用最小显著极差法(LSD)进行多重比较, $p$  值小于 0.05 时达到统计学意义上的显著差异, $p$  值小于 0.01 时达到统计学意义上的极显著差异.

## 2 结 果

### 2.1 离子液体 $[C_8mim]Cl$ 对 ROS 含量的影响

不同浓度的离子液体 $[C_8mim]Cl$ 处理泥鳅 1 d、4 d、8 d 后,测得其对肝脏中 ROS 含量的影响结果如图 1 所示.ROS 含量以相对荧光强度表示.与对照组相比,染毒 1 d、4 d、8 d 后,低、中、高浓度组 ROS 含量均显著升高.低浓度和中浓度组,ROS 含量在 1 d 时含量达到极值,高浓度组 ROS 在 4 d 时含量最高.

### 2.2 离子液体 $[C_8mim]Cl$ 对 LPO 含量的影响

不同浓度组离子液体 $[C_8mim]Cl$ 处理泥鳅 1、4、8 d 后,测得其对肝脏中 LPO 含量的影响结果如图 2 所示.染毒处理 1 d 时,肝脏中 LPO 含量与对照组相比显著增加,低浓度处理组与中浓度和高浓度处理组相比 LPO 含量最低.4 d 和 8 d 时,各浓度组 LPO 含量下降且低于对照组浓度.

### 2.3 离子液体 $[C_8mim]Cl$ 对 GPT 活力的影响

不同浓度组离子液体 $[C_8mim]Cl$ 处理泥鳅 1 d、4 d、8 d 后,测得其对肝脏中 GPT 活力的影响结果如图 3 所示.与对照组相比,经染毒处理的泥鳅肝脏 GPT 活力显著降低.在低浓度和高浓度组,暴露时间在 1 d、4 d、8 d,GPT 活力随着时间的延长而减小,中浓度组在 4 d 和 8 d 时,彼此间 GPT 活力没有明显的变化.在 1 d 和 4 d 时,低、中、高不同浓度的处理组中,随着离子液体 $[C_8mim]Cl$ 处理浓度的升高,GPT 活性降低,表现出时间效应和剂量效应.在 8 d 时,高浓度组 GPT 活力达到最低水平.

### 2.4 离子液体 $[C_8mim]Cl$ 对 GR 活力的影响

不同浓度组离子液体 $[C_8mim]Cl$ 处理泥鳅 1、4、8 d 后,测得其对肝脏中 GR 活力的影响结果如图 4 所

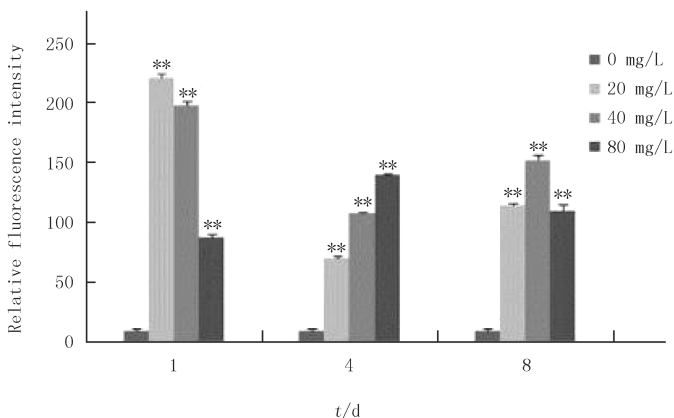


图 1 不同质量浓度的离子液体 $[C_8mim]Cl$ 对泥鳅肝脏 ROS 含量的影响

Fig.1 Effects of different concentration of ionic liquid  $[C_8mim]Cl$  on ROS content in Loach Liver

示.泥鳅经离子液体 $[C_8mim]Cl$ 处理后,与对照组相比,各浓度组肝脏中 GR 活力均显著降低.低浓度处理组,在染毒 8 d 时,GR 活力最低;中浓度和高浓度处理组,在 4 d 和 8 d 时,彼此间 GR 活力基本没有变化.1 d、4 d 和 8 d 时,低浓度处理组 GR 活力均比中浓度和高浓度处理组高,1 d 时,中浓度处理组 GR 活力最低.

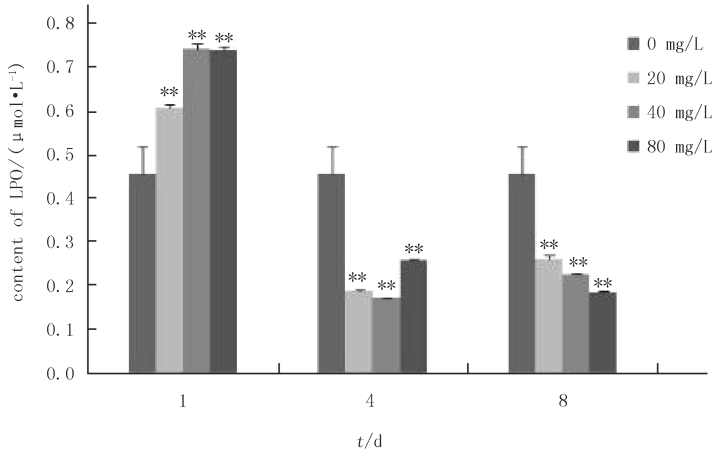


图 2 不同质量浓度的离子液体  $[C_8mim]Cl$  对泥鳅肝脏 LPO 含量的影响

Fig.2 Effects of different concentration of ionic liquid  $[C_8mim]Cl$  on LPO content in Loach Liver

### 3 讨 论

机体在正常代谢过程中,能够产生多种活性氧(ROS),包括超氧自由基、过氧化氢以及下游产物过氧化物和羟化物等.这些氧化剂会使蛋白质和核酸变性,破坏细胞内各种还原性物质的生物活性,使膜结构发生脂质过氧化反应等<sup>[9]</sup>.机体内的抗氧化酶系统具有清除活性氧的功能<sup>[10]</sup>.一旦机体遭受损害,就会导致体内自由基含量升高.本研究中,受试鱼经染毒后,与对照组相比,ROS 含量显著升高,但随着暴露时间的延长,机体内抗氧化酶系统被激活,清除部分 ROS,导致机体内 ROS 含量有所下降.

谷胱甘肽还原酶(GR)由辅酶 NA DPH 供氢,催化氧化性谷胱甘肽(GSSG)还原成还原型谷胱甘肽(GSH),它作为体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂,与自由基、重金属等结合,从而把机体内有害的毒物转化为无害的物质,排泄出体外<sup>[11]</sup>.有报道称,随着暴露时间的延长 GR 活力降低将导致机体过氧化氢和氧自由基的积累,进而导致氧化损伤和机体死亡<sup>[12]</sup>.经离子液体 $[C_8mim]Cl$ 染毒后,与对照组相比,GR 活力显著降低,受试鱼体内自由基过氧化物含量增加,GSH 不断与过氧化物结合,导致 GSH 含量下降,GR 将 GSSG 还原成 GSH,GR 活力不断降低,在染毒后期,GR 活力降到最低,基本不再变化.

肝脏是机体尿素合成和分解的主要器官.肝脏中谷丙转氨酶(GPT)活力的变化是反应机体遭遇有毒物质攻击时的一个重要指标<sup>[13]</sup>.本篇研究中,离子液体 $[C_8mim]Cl$ 对受试鱼进行染毒处理,GPT 作为检测肝中毒的一项指标,结果表明,与对照组相比,各处理组 GPT 活力显著降低,并表现出明显的时间效应和剂量效应.可能的原因是在正常环境中,肝脏中 GPT 的含量是相对较高的,但是肝脏一旦受到损伤,肝脏细胞的细胞膜渗透性改变,肝脏中的 GPT 将转移到血清中,造成肝脏中 GPT 活力减少. $CCl_4$  处理鲤鱼 72 h 后,血

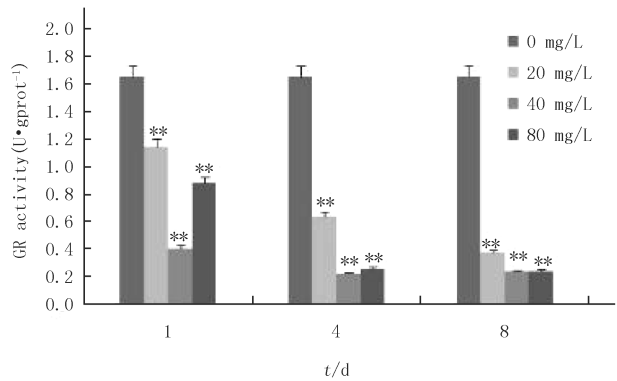


图 3 不同质量浓度的离子液体  $[C_8mim]Cl$  处理对泥鳅肝脏中 GPT 含量的影响

Fig.3 Effects of different concentration of ionic liquid  $[C_8mim]Cl$  on GPT content in Loach Liver

清中 GPT 含量与对照组相比显著升高<sup>[14]</sup>。有报道称,经吡虫啉染毒后的成年泥鳅,肝脏 GPT 含量与对照组相比减少<sup>[15]</sup>,结果与本实验一致。

体内自由基与细胞膜上的不饱和脂肪酸反应可导致体内的脂质过氧化。脂质过氧化是细胞受损的一种形式,可以作为细胞和组织中氧化应激的一种指标<sup>[16]</sup>。脂质过氧化可导致 DNA 损伤和细胞癌变<sup>[17]</sup>。在本研究中,1 d 时,其处理组与对照组相比,LPO 含量均高于对照组,可能由于毒性物质对有机体的刺激导致 LPO 在肝脏迅速积累。

氟中毒的鸡血液中 LPO 含量与对照组相比会显著升高<sup>[18]</sup>。随着暴露时间的延长,在 4 d 和 8 d 时,处理组 LPO 含量与对照组相比显著下降,体内抗氧化酶系统被激活,抗氧化防御系统可能清除了自由基导致 ROS 含量下降并对脂质过氧化进行了修复。与本实验结果相一致的是,MDA 是脂质过氧化物的最终产物,低剂量的离子液体溴化 1-辛基-3-甲基咪唑能够引起太行隆肛蛙蝌蚪体内活性氧产生并引起脂质过氧化,但在随后的检测中并未发现 MDA 含量的变化<sup>[19]</sup>。

总之,离子液体[C<sub>8</sub>mim]Cl对泥鳅肝脏具有明显的氧化损伤效应。离子液体虽然号称“绿色溶剂”,但对于其“绿色性”应该有正确认识,在使用时应当高度重视其不安全的一面。

## 参 考 文 献

- [1] Li Z H, Chen L, Wu Y H, et al. Effects of mercury on oxidative stress and gene expression of potential biomarkers in larvae of the Chinese rare minnow *Gobiocypris rarus*. [J]. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, 2014, 67(2): 245-251.
- [2] Jungnickel C, Łuczak J, Ranke J, et al. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution [J]. Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects, 2012, 316(1/3): 278-284.
- [3] 赵卫星,姜红波,王艳,等.绿色溶剂——离子液体及其毒性[J].山东化工,2010,39(8):21-24.
- [4] 吴波,张玉梅,王华平.离子液体的安全性研究进展[J].化工进展,2008,27(6):814-818.
- [5] 石长应,王凡,张合彩,等.不同烃链长度咪唑类离子液体对日本三角涡虫的急性毒性[J].河南师范大学学报(自然科学版),2014(4):178-182.
- [6] 井长勤,刘振华,王燕,等.氯化 1-辛基-3-甲基咪唑对 EMT6 细胞的毒性及其 DNA 损伤作用[J].河南师范大学学报(自然科学版),2014(2):124-130.
- [7] Salazar-Lugo R, Mata C, Oliveros A, et al. Histopathological changes in gill, liver and kidney of neotropical fish *Colossoma macropomum* exposed to paraquat at different temperatures [J]. Environmental Toxicology & Pharmacology, 2011, 31(3): 490-495.
- [8] Min S K, Kim J H, Kim S, et al. Various biomarker and bioindicator responses in muddy loach (*Misgurnus anguillicadatus*) exposed to endosulfan for 21 days [J]. Toxicology and Environmental Health Sciences, 2010, 2(2): 125-131.
- [9] 李兴太,张春英,仲伟利,等.活性氧的生成与健康及疾病关系研究进展[J].食品科学,2016,37(13):257-270.
- [10] Chen M, Yin J, Liang Y, et al. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish [J]. Aquatic Toxicology, 2016, 174: 54-60.
- [11] 姜晓东,吴旭干,张金彪,等.三种饵料模式对中华绒螯蟹种早期养殖性能、非特异免疫性能及抗病力的影响[J].动物学杂志,2017(1):85-96.
- [12] Jiang J, Qin C, Shu X, et al. Effects of copper on induction of thiol-compounds and antioxidant enzymes by the fruiting body of *Oudemansiella radicata*. [J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2015, 111(2): 60-65.
- [13] Lin L, Zeng X L, Zhang J. Effect of profenofos poisoning on liver lipid peroxidation and liver function in rabbits [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2004, 8(21): 4380-4381.
- [14] Jia R, Cao L P, Du J L, et al. Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 152(152C): 11-19.

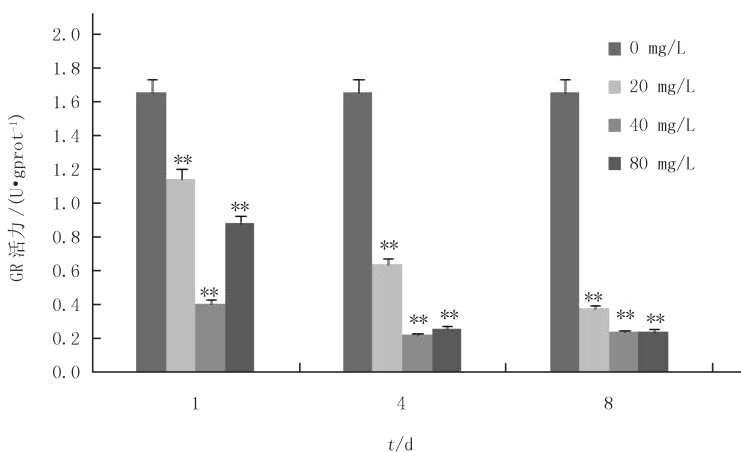


图 4 不同质量浓度的离子液体 [C<sub>8</sub>mim]Cl 处理对泥鳅肝脏中 GR 含量的影响  
Fig.4 Effects of different concentration of ionic liquid [C<sub>8</sub>mim]Cl on GR content in Loach Liver

- [15] Xia X H, Xia X P, Huo W R, et al. Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2016, 45: 132-139.
- [16] Bonnail E, Buruaem L M, Araujo G S, et al. Multiple Biomarker Responses in *Corbicula fluminea* Exposed to Copper in Laboratory Toxicity Tests [J]. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 2016, 71(2): 1-8.
- [17] 刘晓麒, 曹恩华. 脂质过氧化引起的 DNA 损伤研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1994, 21(3): 218-222.
- [18] 余永新, 格桑顿珠, 杨小梅, 等. 氟中毒鸡血液中 SOD 和 LPO 含量的变化 [J]. *西南农业学报*, 2002, 15(2): 114-116.
- [19] 李效宇, 曾师虎, 张伟红, 等. 离子液体溴化 1-辛基-3-甲基咪唑对太行隆肛蛙蝌蚪的毒性及其抗氧化系统的影响 [J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(1): 138-141.

## Oxidative damage effect of ionic liquids [C<sub>8</sub>mim]Cl on the liver of loach

Du Qiyang, Wang Yaxing, Nan Ping, Chang Zhongjie

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** In this paper, we studied oxidative damage effect of the ionic liquid 1-octyl-3-methyl imidazole chloride ([C<sub>8</sub>mim]Cl) on the loach livers. Results showed that compared with control group: Reactive oxygen species (ROS) content significantly increased, and the highest level was at 1 d. Compared with control group, content of lipid peroxide (LPO) at 1 d significantly increased. With increasing exposures time, the content of LPO level decreased and was lower than the control group in 4 d or 8 d. Compared with control group, the content of GPT, were significantly decreased at 1 d, 4 d and 8 d after exposed to Ionic Liquids. Glutathione reductase (GR) activity showed a significant declining trend, and the lowest level was at 8 d. These results showed that the ionic liquid [C<sub>8</sub>mim]Cl had obvious oxidative damage effects on the liver of loach. The results of this paper have important reference for people to properly understand the safety and correct use of the "green solvent" ionic liquid.

**Keywords:** ionic liquid; loach; oxidative damage; liver

[责任编辑 王凤产]

(上接第 61 页)

- [10] 高金辉, 朱元培, 刘永. 基于灰色理论的电动汽车充电均衡控制 [J]. *电源技术*, 2015, 39(6): 1286-1288.
- [11] 王俊霞, 陈志刚, 郭葳, 等. 电动汽车换电智能监控系统的改进 [J]. *电力系统保护与控制*, 2018, 46(10): 81-87.
- [12] Gao J, Jia L, Li Y, et al. The design of a non-energy-consuming balance system for lithium-ion batteries [C] // *International Conference on Electrical & Control Engineering*. Piscataway: IEEE Press, 2010: 4403-4405.
- [13] 王彪, 尹霞. 实时电价下含 V2G 功能的电动汽车理性充放电模型及其分析 [J]. *电力系统保护与控制*, 2016, 44(24): 90-96.
- [14] 高金辉, 巴雁远. OCV 处于平台期的汽车锂电池 SOC 估算的研究 [J]. *现代电子技术*, 2017, 40(10): 175-177.
- [15] 丁丹军, 戴康, 张新松, 等. 基于模糊多目标优化的电动汽车充电网络规划 [J]. *电力系统保护与控制*, 2018, 46(3): 43-50.

## Study on state estimation of power lithium battery based on new power supply model

Gao Jinhui, Zhu Yingzheng

(College of Electronic and Electrical Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** The equivalent circuit model of lithium battery is not consistent with the internal electrochemical state of the battery. The estimation of the state of the battery has great errors inevitably, and the compensation based on the algorithm can not solve the problem completely. A new equivalent circuit model is proposed. This model is based on the relationship between the electrochemical reaction inside the battery and the external characteristics of the battery. The model was verified by experimental test. Its accuracy is higher than the existing battery model.

**Keywords:** equivalent circuit model; dual-power model; state of charge estimation

[责任编辑 杨浦]