

# 对氨基水杨酸钠对染锰大鼠脑酶的影响

广西医学院劳动卫生职业病教研室 葛利辉\* 姜岳明 纪淑琴 胡万达

**提 要** 每日给大鼠腹腔内注射(ip) 15mg/kg/d  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  60天, 然后分别以 80mg/kg/d, 120mg/kg/d PAS-Na ip治疗16天。结果提示, PAS-Na 能不同程度地恢复部分脑区受锰抑制的 ACP 和 ATPase 活性及各脑区的AChE活性, 其中以 120mg/kg/d 剂量的作用更为明显。治疗结果表明, PAS-Na的作用机理可能在于其能恢复被锰抑制的有关酶活性, 从而恢复神经细胞的正常功能和降低中枢胆碱能的突触功能。

**关键词** 对氨基水杨酸钠 锰中毒 酶学

众所周知, 慢性锰中毒是严重的职业病之一。一些金属络合剂如  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$ 、BAL等, 曾用于治疗出现椎体外系特征的慢性锰中毒患者, 但疗效不佳<sup>[1]</sup>。近年来, 我室试用对氨基水杨酸钠(PAS-Na) 治疗慢性重症锰中毒患者, 取得良好的效果<sup>[2]</sup>。然而, 其药理作用尚未清楚。本文拟以  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  进行亚慢性染毒, 然后用 PAS-Na 治疗, 观察大鼠各脑区乳酸脱氢酶(LDH)、酸性磷酸酶(ACP)、三磷酸腺苷酶(ATPase)和乙酰胆碱酯酶(AChE)的活性变化, 以期探讨PAS-Na对锰中毒治疗的药理作用。

## 材料和方法

### 一、实验动物和分组

由广西中医药研究所提供 Sprague-Dawley F<sub>1</sub>代雄性大鼠, 50只, 体重 $239 \pm 30\text{g}$ , 随机分为5组, 每组10只, 实验安排见表1。每周称重一次, 按体重调整剂量。

### 二、试剂

氯化锰( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 分析纯), 上海化学试剂采购供应部经销, 将其溶于生理盐水, 制成注射液。

注射用对氨基水杨酸钠, 粉剂, 北京第三

表1 实验安排一览表

| 组别                 | 染 毒                                                      |                       | 第77天   |
|--------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------|--------|
|                    | 第1~60天                                                   | 第61~76天               |        |
| I组(正常对照组)          | ip生理盐水(3ml/kg/d)                                         | ip生理盐水(3ml/kg/d)      | 处死作酶测定 |
| II组(PAS-Na药物对照组)   | ip生理盐水(3ml/kg/d)                                         | ip PAS-Na(80mg/kg/d)  |        |
| III组(锰阳性对照组)       | ip $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (15mg/kg/d) | ip生理盐水(3ml/kg/d)      |        |
| IV组(低剂量 PAS-Na治疗组) | ip $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (15mg/kg/d) | ip PAS-Na(80mg/kg/d)  |        |
| V组(高剂量 PAS-Na治疗组)  | ip $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (15mg/kg/d) | ip PAS-Na(120mg/kg/d) |        |

制药厂生产, 批号870321, 用前以生理盐水溶解。

### 三、匀浆液的制备

断头处死大鼠, 迅速剥离脑组织, 将其投入0.25M冰冷的蔗糖溶液中, 以下操作在4℃下进行, 除去多余的组织和血污, 将脑按大脑皮层、小脑、纹状体(主要指尾壳核)和脑其余部分分离, 采用上述蔗糖溶液作稀释液, 制

成10%的各脑区匀浆。

### 四、酶活性测定

LDH、ACP和 AChE 活性的测定按文献[3]介绍的方法进行。

ATPase活性的测定按 Harvald 描述的方法<sup>[4]</sup>略作改良, 反应总容积为2.0ml, 内含

\*现在南宁市卫生防疫站卫科

NaCl(0.1M)、MgCl<sub>2</sub>(0.006M)、KCl(0.02M)、Tri-HCl 缓冲液 (pH7.6, 0.005M) 和 ATP(0.0015M), 加入匀浆, 37°C水浴 30 分钟, 立即加入 20%三氯醋酸终止反应。然后按文献〔3〕方法测定分解出来的无机磷。

### 五、蛋白质测定

采用Folin-Lowry酚试剂法。

### 六、酶活性恢复计算方法参见文献〔1〕

表2 PAS-Na对染锰大鼠各脑区LDH活性(生成nmol丙酮酸/min/mg蛋白质)的影响

| 组别   | 鼠数 | 大脑皮层       | 小 脑        | 纹状体        | 脑其余部分      |
|------|----|------------|------------|------------|------------|
| I 组  | 9  | 695.0±50.5 | 529.0±47.8 | 678.1±65.3 | 617.2±36.7 |
| Ⅰ 组  | 10 | 713.0±63.2 | 687.6±63.8 | 774.4±60.2 | 702.0±61.3 |
| Ⅱ 组  | 8  | 739.0±46.4 | 692.6±59.3 | 649.2±64.0 | 668.5±47.3 |
| Ⅳ 组  | 9  | 741.6±52.2 | 661.9±53.8 | 738.3±46.5 | 695.7±57.6 |
| V 组  | 9  | 663.7±58.1 | 686.3±67.2 | 710.9±65.5 | 669.7±58.1 |
| F 检验 |    | P>0.05     | P>0.05     | P>0.05     | P>0.05     |

注: 表内数据为  $\bar{X} \pm SD$

表3 PAS-Na对染锰大鼠各脑区ACP活性(释出 nmol Pi/min/mg蛋白质)的影响

| 组别   | 鼠数 | 大脑皮层             |       | 小 脑              |       | 纹 状 体                                                                        |       | 脑其余部分            |       |
|------|----|------------------|-------|------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------|-------|------------------|-------|
|      |    | $\bar{X} \pm SD$ | 恢复(%) | $\bar{X} \pm SD$ | 恢复(%) | $\bar{X} \pm SD$                                                             | 恢复(%) | $\bar{X} \pm SD$ | 恢复(%) |
| I 组  | 9  | 6.37±0.91        | —     | 5.32±0.91        | —     | 6.32±0.81                                                                    | —     | 6.18±0.94        | —     |
| Ⅰ 组  | 10 | 6.44±0.85        | —     | 5.50±0.90        | —     | 6.19±0.80                                                                    | —     | 6.38±1.01        | —     |
| Ⅱ 组  | 8  | 6.13±0.83        | —     | 5.49±0.53        | —     | 4.62±0.96                                                                    | —     | 5.01±0.27        | —     |
| Ⅳ 组  | 9  | 5.29±0.85        | 无     | 5.40±0.99        | 无     | 6.37±0.83                                                                    | 103   | 5.26±0.70        | 20    |
| V 组  | 9  | 5.77±1.26        | 无     | 5.66±1.10        | 无     | 6.67±0.77                                                                    | 121   | 5.83±0.66        | 70    |
| F 检验 |    | P>0.05           |       | P>0.05           |       | P<0.01                                                                       |       | P<0.05           |       |
| Q 检验 |    |                  |       |                  |       | (I):(Ⅰ)** (Ⅱ):(Ⅳ)** (I):(Ⅱ)* (Ⅰ):(Ⅲ)** (I):(Ⅲ)** (Ⅲ):(V)** (I):(Ⅳ)* (Ⅰ):(Ⅳ)* |       |                  |       |

\*P<0.05 \*\*P<0.01

表4 PAS-Na对染锰大鼠各脑区 ATPase活性(释出 nmol Pi/min/mg蛋白质)的影响

| 组别   | 鼠数 | 大脑皮层                                                                           |       | 小 脑              |       | 纹 状 体            |       | 脑其余部分            |       |
|------|----|--------------------------------------------------------------------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|
|      |    | $\bar{X} \pm SD$                                                               | 恢复(%) | $\bar{X} \pm SD$ | 恢复(%) | $\bar{X} \pm SD$ | 恢复(%) | $\bar{X} \pm SD$ | 恢复(%) |
| I 组  | 9  | 19.86±2.08                                                                     | —     | 12.15±0.53       | —     | 15.73±0.49       | —     | 23.50±0.95       | —     |
| Ⅰ 组  | 10 | 19.44±2.60                                                                     | —     | 11.52±0.58       | —     | 15.57±0.99       | —     | 23.39±0.78       | —     |
| Ⅱ 组  | 8  | 13.48±0.98                                                                     | —     | 11.74±0.88       | —     | 15.04±1.03       | —     | 14.23±0.82       | —     |
| Ⅳ 组  | 9  | 19.02±1.74                                                                     | 87    | 12.22±1.07       | 117   | 16.01±0.75       | 141   | 23.52±0.95       | 100   |
| V 组  | 9  | 21.56±2.39                                                                     | 127   | 12.28±0.64       | 132   | 15.66±0.91       | 90    | 23.63±0.70       | 101   |
| F 检验 |    | P<0.01                                                                         |       | P>0.05           |       | P>0.05           |       | P<0.01           |       |
| Q 检验 |    | (I):(Ⅰ)** (Ⅱ):(Ⅳ)** (I):(Ⅳ)* (Ⅲ):(Ⅳ)** (Ⅰ):(Ⅱ)** (Ⅲ):(Ⅳ)** (Ⅰ):(Ⅲ)** (Ⅲ):(Ⅳ)** |       |                  |       |                  |       |                  |       |

\*P<0.05 \*\*P<0.01

$$\text{恢复}(\%) = \frac{\text{IV 或 V 组酶活性} - \text{Ⅲ 组酶活性}}{\text{I 组酶活性} - \text{Ⅲ 组酶活性}} \times 100\%$$

## 结 果

各组大鼠之间各脑区的 LDH 活性没有显著性差异 ( $P>0.05$ ), 见表 2。表 3 结果显示, 低和高剂量的 PAS-Na 能有效地恢复纹状

体ACP活性(分别为103%和121%,  $P<0.01$ ), 高剂量 PAS-Na 还能部分恢复脑其余部分的该酶活性(70%,  $P<0.05$ )。无论低还是高剂量的PAS-Na均有恢复大脑皮层(分别为87%和127%,  $P<0.01$ )和脑其余部分(分别为100%和101%,  $P<0.01$ ) ATPase 活性的作用, 见表4。表5所示, 低及高剂量的 PAS-

Na均能有效地恢复各脑区AChE活性, 大脑皮层该酶活性恢复分别为88%和93%, 小脑为92%和101%, 纹状体为175%和169%, 脑其余部分为100%和102%。PAS-Na (80mg/kg/d) 除能增加正常鼠纹状体的 AChE活性( $P<0.05$ ) 外, 对其他脑区各酶活性均无影响。

表5 PAS-Na对染锰大鼠各脑区AChE 活性(水解nmol乙酰胆碱/min/mg蛋白质)的影响

| 组别    | 鼠数 | 大脑皮层                                                                |       | 小 脑                                                                 |       | 纹 状 体                                                            |       | 脑其余部分                                                              |       |
|-------|----|---------------------------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------|-------|
|       |    | $\bar{X} \pm SD$                                                    | 恢复(%) | $\bar{X} \pm SD$                                                    | 恢复(%) | $\bar{X} \pm SD$                                                 | 恢复(%) | $\bar{X} \pm SD$                                                   | 恢复(%) |
| I 组   | 9  | 138.4 ± 10.8                                                        | —     | 108.0 ± 9.6                                                         | —     | 151.2 ± 14.5                                                     | —     | 178.8 ± 11.8                                                       | —     |
| II 组  | 10 | 137.7 ± 9.4                                                         | —     | 109.7 ± 11.1                                                        | —     | 172.7 ± 10.0                                                     | —     | 190.3 ± 14.5                                                       | —     |
| III 组 | 8  | 95.4 ± 8.5                                                          | —     | 75.5 ± 7.3                                                          | —     | 126.8 ± 15.8                                                     | —     | 144.6 ± 13.7                                                       | —     |
| IV 组  | 9  | 133.1 ± 11.5                                                        | 88    | 105.3 ± 13.1                                                        | 92    | 169.4 ± 17.0                                                     | 175   | 178.9 ± 11.1                                                       | 100   |
| V 组   | 9  | 135.5 ± 9.1                                                         | 93    | 108.2 ± 10.8                                                        | 101   | 168.0 ± 13.0                                                     | 169   | 179.5 ± 14.8                                                       | 102   |
| F检验   |    | $P<0.01$                                                            |       | $P<0.01$                                                            |       | $P<0.01$                                                         |       | $P<0.01$                                                           |       |
| Q检验   |    | (I):(II)** (II):(IV)** (I):(III)** (II):(V)** (I):(IV)** (II):(V)** |       | (I):(II)** (II):(IV)** (I):(III)** (II):(V)** (I):(IV)** (II):(V)** |       | (I):(II)* (I):(III)** (I):(IV)** (II):(V)** (I):(IV)* (II):(V)** |       | (I):(II)** (II):(IV)** (I):(III)** (II):(V)** (I):(IV)* (II):(V)** |       |
|       |    | (I):(II)** (II):(V)** (I):(III)** (II):(V)**                        |       | (I):(II)** (II):(V)** (I):(III)** (II):(V)**                        |       | (I):(IV)* (II):(V)**                                             |       | (I):(IV)* (II):(V)**                                               |       |
|       |    |                                                                     |       |                                                                     |       | (I):(V)*                                                         |       | (I):(V)*                                                           |       |

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$

## 讨 论

迄今为止, 文献上除报道过 PAS 能恢复染锰大鼠肝LDH和琥珀酸脱氢酶(SDH) 及睾丸 LDH 活性外<sup>[1]</sup>, 尚未见有更深入研究的报告。他们认为其作用是由于PAS的分子量相对低和分子空间排列障碍相对小, 结果使得PAS易于接近锰的结合部位, 因此, 考虑PAS可以作为慢性锰中毒的治疗药物<sup>[1]</sup>。

锰对 LDH 活性的影响各家报道不一, 有认为可导致其活性下降<sup>[5]</sup>。我们的结果表明锰本身没有抑制 LDH 活性的作用, PAS-Na 对其亦无明显影响。据报道, 锰主要分布在 ACP和单胺氧化酶(MAO) 活性区域<sup>[6]</sup>, 并将 ACP作为锰中毒的观察指标之一<sup>[5,7]</sup>。我们发现锰可抑制部分脑区ACP活性, 而PAS-Na有恢复此酶的作用, 提示PAS-Na可拮抗锰对这些脑区溶酶体水解酶活性的抑制, 从而有利于细胞行使正常的生理功能。ATPase是能量代谢的重要酶之一, 如果锰对该酶抑制, 将会干

扰能量代谢<sup>[5]</sup>。ATPase 还直接参与突触中儿茶酚胺的贮存和释放, 它的改变可能妨碍脑组织的代谢。曾有报道染锰后, 大鼠脑组织及其微粒体和突触体的 ATPase活性下降<sup>[8~9]</sup>, 而本研究结果表明, PAS-Na 能恢复大脑皮层和脑其余部分ATPase 活性, 这意味着恢复了细胞的正常供能, 保证了神经介质的合成及其传递功能的正常进行。据报道染锰大鼠脑组织及其各部位的AChE活性明显地受到抑制<sup>[9~10]</sup>。锰对 AChE 活性的抑制, 从而影响脑中乙酰胆碱的转化, 说明锰能引起神经递质水平的改变<sup>[9]</sup>。PAS-Na 能恢复各脑区被锰所抑制的AChE活性。提示可使原来过多积聚在神经突触的乙酰胆碱得到分解, 因而降低了中枢胆碱能的突触功能。

本实验还观察到高剂量 PAS-Na (120mg/kg/d) 的作用似乎更为明显。此结果为 PAS-Na 在临床上治疗锰中毒的可行性提供了有力的佐证。一般认为, 慢性锰中毒主要损害中枢神经系统, 锰能选择性地作用于突触, 破坏突触

的传递功能。推测PAS-Na的作用机理,在于恢复被锰所抑制的上述酶活性,从而恢复了神经细胞的正常功能及降低了中枢胆碱能的突触功能。由于锰中毒的机理是多方面的,因此,

PAS-Na对锰中毒治疗的药理作用尚需多方面深入研究和进一步完善。

### 参考文献

1. Tandon S K, et al. Chelation in metal intoxication I In vivo effect of chelating agents on liver and testis of manganese administered rats. Environ Res 1975;9:18.
2. 纪淑琴,等.对氨基水杨酸钠治疗慢性重度锰中毒2例报告.中华劳动卫生职业病杂志1990;8(1):17.
3. 王继贵,等.临床生化检验.第一版.湖南:湖南科学技术出版社,1981;227~262.
4. Harvald B, et al. Adenosine-triphosphatase deficiency in patients with non-spherocytic hemolytic anemia. Lancet 1964;2:18.
5. Singh J, et al. Biochemical and histopathological alteration in manganese toxicity in rats. Environ Physiol Biochem 1974; 4:16.
6. Suzuki H, et al. Role of brain lysosomes in the development of manganese toxicity in mice. Toxicol Appl Pharmacol 1983; 71:422.
7. Malik J K, et al. Studies on the interaction between manganese and fenitrothion in rat. Toxicol Lett 1987; 36:221.
8. Shukla G S, et al. Effects of manganese on rat brain microsomal  $Mg^{2+}$ - $Na^{+}$ - $K^{+}$ -ATPase. In vivo and in vitro studies. Environ Res 1983; 32:212.
9. Seth P K, et al. Effect of manganese on neonatal rat, manganese concentration and enzymatic alteration in brain. Acta pharmacol et toxicol. 1977; 40:553.
10. Sitaramayya A, et al. Effect of manganese on enzymes in rat brain. Acta pharmacol et toxicol 1974; 35:185.

## 水井中急性缺氧窒息合并CO<sub>2</sub>中毒死亡6例报告

绵竹县卫生防疫站

周书经 王林生

1988、1989年我县三口水井发生急性中毒事故,9人中毒,其中6人死亡,现报告如下。

1988年6月,城关一儿童跌落枯井中,两名邻居分别下井营救,接近井底时昏倒。另一人用绳系腰下井,至中途被井上人拉出时已不省人事,经人工呼吸约18分钟苏醒。井下三人用拉钩救出已经死亡。1989年7、8月,某村有两人分别下饮用水井捞物而昏倒井中,一人又直接下井营救同样昏倒。有三人拟下井抢救均难以坚持到井底,被用绳索拉出时已昏迷,约半小时方苏醒;井下三人救起时已死亡。6例死者中,1例为二岁半女孩,5例为青壮年男性。

水井卫生学调查:三口水井深4.4~4.7米,井底直径约1米,井口约0.6~0.7米,井壁为卵石砌成,呈底大口小的圆锥型井筒。二口井水深0.8~1.0米,水清见石,淤泥杂质很少,一口为干枯井。未闻及有异味。水质检测:井水无色透明,氨氮明显增高达

40mg/L,细菌总数、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮、氯化物亦有偏高,其余项目符合生活饮用水卫生标准。点燃腊烛从井口缓慢下放,至距井口0.9~1.0米处熄灭。将小白鼠置笼内,下放至3~4米深时出现烦躁,10秒钟倒毙。将家鸡用绳吊放至3.5m深时亦抽搐死亡。

井下空气毒物测定:三天后在距井口3.5~3.8米处,用AQG-1型瓦斯检定器测定CO<sub>2</sub>浓度分别为13.0%①,6.0%②,3.9%③;CH<sub>4</sub>浓度为7.0%①,1.7%②,1.3%③。用沈阳产自动测氧仪测得O<sub>2</sub>含量为0.2%①,0.8%②,10.0%③。上下午各用检气管和硝酸银比色法测定CO、H<sub>2</sub>S均未检出。提示前述病例皆系急性缺氧窒息合并有CO<sub>2</sub>中毒而致。建议今后遇有下井工作时,应用简易方法测知井底有无缺氧情况,以免发生类似事故。

注:①为城关枯井,②③为饮用水井。

## Abstracts of original Articles

### Effect of Sodium Para-Aminosalicylate on Brain Enzymes in Manganese Treated Rats

Ge Lihui, et al

Rats pretreated for 60 days with Mn as  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  in a dose of 15mg/kg/day through intraperitoneal route, and then treated with sodium para-aminosalicylate (PAS-Na) in a dose of 80 or 120mg/kg, daily for 16 days. Acid phosphatase and adenosine triphosphatase activities inhibited by manganese in some brain regions, acetylcholinesterase activity inhibited by the metal in all regions of rats were restored in different degrees. The higher dose of PAS-Na appeared to be more effective. The results suggested that the mechanism of PAS-Na treatment may be restoration of normal functions of neural cells and decrease of synaptic function of the central cholinergic system through restoration of activity of related enzymes.

Key words: sodium para-aminosalicylate  
manganese toxication enzymes

### The Metabolic Activation of Cyclophosphamide in Hydra Assay

Fu Lijie, et al

The proteratogen cyclophosphamide (CP) was tested in the hydra assay in the presence and absence of an in vitro metabolic activation package (MAP) consisting of rat hepatic microsomes (0.06 nmol P-450/ml), 500  $\mu\text{M}$  NADPH, and 25  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ . Bioactivation of CP was confirmed under standard hydra assay conditions of pH 7.0 and 20°C, and compared with activation at 37°C. The results show the bioactivation increased the toxicity of CP by two orders of magnitude. The minimal effective concentration (MEC) in the adult and "artificial embryo" of the assay were decreased from 4000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to

20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and from 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to 4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. Since hydra attenuate apparently lacks MFO capacity thereby facilitating comparative studies employing microsomes of humans or any of the laboratory mammals routinely used in developmental toxicity safety evaluations.

Key words: cyclophosphamide  
proteratogen in vitro bioactivation hydra assay

### Prevalence Study on Hypertension of Heat Exposure Workers in Tangshan Steel Plant

Wang Zongyi, et al

3816 steel workers (male 3484, female 332) exposed to heat from Tangshan Steel Plant, and 1047 architectural and installing workers (male 811, female 236) from the same plant, as control group, were investigated. The prevalence rates of hypertension for female workers in exposed and control groups were 4.52% and 3.81% respectively, the difference had no significance. The prevalence rates of hypertension for male workers in two groups were 9.24% (adjusted rate 10.30%) and 6.29% (adjusted rate 5.01%) respectively, the significant difference was found ( $\chi^2 = 7.25$ ,  $P < 0.01$ ), and the rate also increased with the standing and the degree of heat exposure.

Key words: heat exposure hypertension prevalence steelworkers

### Study on Serum Prealbumin as a Sensitive Index in TNT Hepatic Damage

Wang Renyi, et al

The serum prealbumin of 42 workers exposed to low concentration ( $< \text{MAC}$ ) trinitrotoluene (TNT) were studied. The results showed that Hb, TTT, ZnTT, ALT all were