

二硫化碳对大鼠周围神经轴浆运输和能量代谢的毒作用效应

鲁洁波 黄金祥 戴柏 张寿林 宋文佳 姜国华

摘 要 为研究二硫化碳 (CS_2) 对周围神经系统的毒作用效应, 用亚慢性染毒方式建立 CS_2 所致周围神经病的大鼠模型后, 采用同位素示踪技术和反向高效液相色谱法 (RP-HPLC), 分别测定了染毒组和对照组大鼠的坐骨神经中轴浆运输和能量代谢的变化。结果显示, 同位素标记物 ^3H -亮氨酸在亚慢性 CS_2 中毒大鼠坐骨神经的运动和感觉神经中的运行距离均比对照组短; 坐骨神经中 ATP、ADP 和 AMP 的含量也均低于对照组。本研究表明 CS_2 引起大鼠的周围神经损伤出现轴浆运输和能量代谢功能障碍。这些改变与 CS_2 中毒性周围神经病在时间-剂量-反应上的关系尚待深入研究。

关键词 二硫化碳 轴浆运输 能量代谢 周围神经病

Toxic Effects of Carbon Disulfide on Axonal Transport and Energy Metabolism in Peripheral Nerves in Rats Lu Jiebo, Huang Jinxiang, Ding Maobo, et al. Institute of Occupational Medicine, Chinese Academy of Preventive Medicine. Beijing 100050

Abstract A model of peripheral neuropathy in rats caused by subchronic exposure to carbon disulfide (CS_2) was established to study the toxic effects of CS_2 on peripheral nervous system, and changes in axonal transport and energy metabolism in sciatic nerve in the exposed and control rats were measured by isotope tracing technique and reversed-phase high performance liquid chromatography. Results showed that the transport distance of isotope labelling ^3H -leucine in motor and sensory nerves of the rats with subchronic CS_2 poisoning reduced significantly, as compared with that of the controls. Contents of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP) in sciatic nerve of the exposed rats were lower than those of the controls. The research indicated that peripheral nerve damage caused by CS_2 could lead functional disturbance of axonal transport and energy metabolism. Dose-response relationship between these changes and toxic neuropathy caused by CS_2 should be studied further.

Key words Carbon disulfide, Axonal transport, Energy metabolism, Peripheral neuropathy

长期接触低浓度 CS_2 所致的周围神经病, 主要表现为四肢远端深浅感觉和运动障碍, 其病理类型已在人体和动物模型中证实为中枢-周围性远端型轴索病^[1,2]。 CS_2 损伤周围神经的病理改变与丙烯酰胺、甲基正丁基甲酮等所致相同, 已有研究证明后两种毒物均干扰大鼠的

轴浆运输, 并认为这是轴索病变产生的原因^[3-5]。 CS_2 能否损伤周围神经的轴浆运输至今尚未作深入研究。本实验通过观察亚慢性 CS_2 中毒大鼠的坐骨神经轴浆运输和能量代谢变化, 探讨其在发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

Tackard-2250型液体闪烁计数仪 (美国),

WZ-50型微量注射机 (浙江医大仪器厂), WX-

作者单位: 北京 100050 中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所 (鲁洁波、黄金祥、丁茂柏、张寿林、宋文佳), 北京师范大学分析测试中心 (姜国华)

753型微循环显微光源盒 (徐州医用光学仪器厂), Perkin Elmer高效液相色谱仪 (美国), Shimadzu SPD-6AV 型紫外检测器, 3390A型积分仪 (日本), UltraspereTM-C₁₈ (dp₃m) 4.6 × 250mm 色谱柱 (Beckman 公司), HITACHI20PR-520型高速离心机 (日本)。CS₂为市售分析纯,³H亮氨酸 1mCi, 冻干 (中国原子能科学院同位素研究所)。

1.2 建立亚慢性 CS₂ 中毒大鼠模型

雄性 Wistar大鼠 24只, 体重 180~ 220克, 随机分为染毒组和对照组。CS₂与色拉油按 1: 1比例配成染毒液, 腹腔注射, 第 1~ 4周按 200mg / (kg·d), 第 5~ 8周按 150mg / (kg·d), 每周染毒 5天; 第 9~ 10周按 150mg / (kg·d) 隔日染毒。对照组注射等量色拉油。建立的大鼠模型供以下两个实验 (1.3和 1.4) 使用。

1.3 同位素示踪大鼠坐骨神经中运动和感觉神经轴浆运输变化

1.3.1 脊髓前角内³H亮氨酸注射 用 1% 戊巴比妥钠按 50mg / kg将大鼠麻醉, 从背部切除胸 12椎板, 暴露腰 5脊髓。在离中线 1mm 左右处两侧同时进针, 针深 1.5~ 2.0mm, 每侧 3个点, 间距 1.5mm, 每点注射量为 4 μ l (2.5 μ Ci· μ l⁻¹)。24小时后, 取两侧腹根和坐骨神经。

1.3.2 背根神经节内³H亮氨酸注射 将大鼠麻醉 (方法同上), 切除腰 5椎板及两侧横突, 暴露背根神经节, 每侧注射 1 μ l (3 μ Ci· μ l⁻¹)。24小时后, 取两侧坐骨神经。

将以上取出的腹根、坐骨神经, 在 - 20℃ 下冷冻 2小时后, 由远端向近端按 5mm 等分切段。每段加 400 μ l 消化液 (50mmol·L⁻¹ Tris 加 2% SDS, pH6.8), 80℃ 水浴 1.5小时, 取 100 μ l 加入 10ml 闪烁液 (E-PP05g, POPO0.5g, 甲苯 700ml, 乙二醇独乙醚 300ml), 作闪烁计数。放射性计数值采用 CPM。

1.4 RP-HPLC 法测定大鼠坐骨神经中

ATP ADP和 AMP含量^[6]

1.4.1 色谱条件 流动相 A 为 1.15% NH₄H₂PO₄ 溶液, 流动相 B 为 1.15% NH₄H₂PO₄ 加 20% 甲醇溶液。两液新鲜配制, 1N NaOH调 pH至 5.5, G₆型过滤器过滤, 真空脱气。

洗脱程序: 流动相 A 90%, 流动相 B 10%, 12分钟。流速 1.5ml·min⁻¹, 波长 254nm, 灵敏度 0.05AUFS, 纸速 0.3cm·min⁻¹。

1.4.2 标准曲线制作及样品的制备和分析

以混合的三种核苷酸标准系列浓度对峰面积绘制标准曲线。

取大鼠坐骨神经, 用 3.6% 高氯酸制成 20% 的匀浆, 20,000g, 4℃ 离心 30分钟, 取上清液, 用 1N NaOH调 pH至 5.5, 再用 12,000g 离心 5分钟后, 取上清液 20 μ l 进样。

1.5 统计方法

t 检验, 直线回归与相关分析

2 结果

2.1 大鼠亚慢性 CS₂ 中毒的主要表现

染毒 9周后, 大鼠出现后肢肌力弱、伏地时双足间距增大、针刺后并拢反应慢、步态蹒跚等较典型的周围神经损害症状, 表明了亚慢性 CS₂ 中毒大鼠模型的建立。

2.2 大鼠坐骨神经轴浆运输变化

图 1和图 2分别显示³H亮氨酸在染毒组和对照组大鼠运动神经和感觉神经中的分布。曲线的平台部分分别反映了³H亮氨酸被注入脊髓前角细胞和背根神经节细胞 24小时后, 在轴浆中运输的范围, 主要代表了被合成的蛋白质顺向转运的距离。染毒组的运行距离均比对照组短 (见表 1)。

2.3 大鼠坐骨神经中三种核苷酸含量变化

表 2显示三种核苷酸回归方程的相关系数在 0.996~ 0.998之间, 说明实验浓度与峰面积有良好的直线相关关系。染毒组大鼠坐骨神经中 ATP ADP和 AMP的含量均显著低于对照组 (见表 3)。

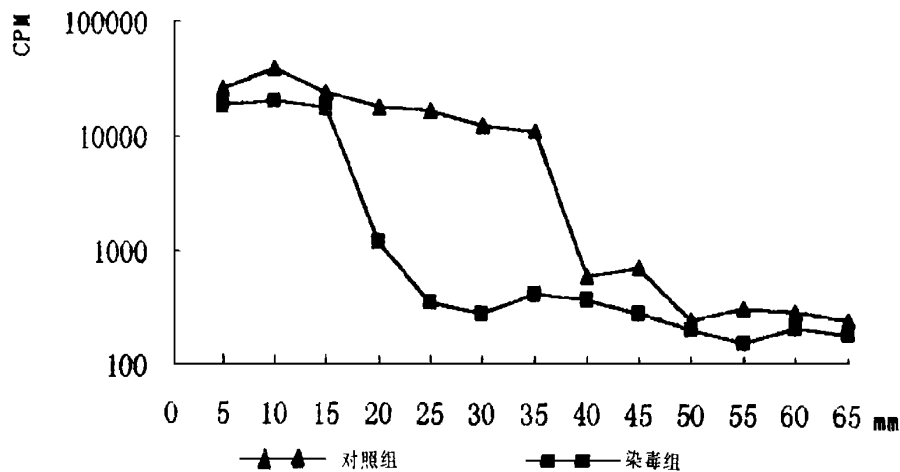


图 1 大鼠坐骨神经的运动神经中³H-亮氨酸的分布

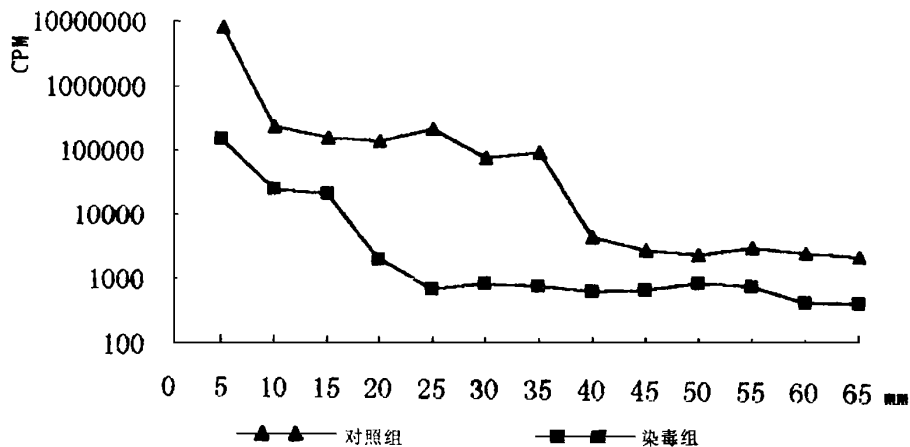


图 2 大鼠坐骨神经的感觉神经中³H-亮氨酸的分布

表 1 ³H-亮氨酸在大鼠坐骨神经中

运行距离 ($\bar{x} \pm s$) (cm)

组别	运动神经 (n)	感觉神经 (n)
对照组	3.64±0.76 (6)	3.30±0.27 (6)
染毒组	1.38±0.27 (6)	1.30±0.27 (6)

* $P < 0.01$

3 讨论

轴浆运输是神经元及其轴索的主要功能之一。轴索结构的维持和更新,胞体对突触机能的调控,以及轴索和周围环境向胞体的分子信息传递,都必须依赖轴浆运输来完成^[7]。对转运物质起支持作用的轴索骨架网络和提供

表 2 三种核苷酸标准品的直线方程和相关系数

核苷酸	浓度范围 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	直线方程	相关系数
ATP	80~400	$Y = 3288.08X - 46656.0$	0.998
ADP	40~200	$Y = 5687.85X - 342.0$	0.996
AMP	20~100	$Y = 7784.85X - 8429.0$	0.996

表 3 大鼠坐骨神经中三种核苷酸含量 ($\bar{x} \pm s$)

($\mu\text{mol/g}$ 湿重)

组别	n	ATP	ADP	AMP
对照组	5	0.94±0.18	0.37±0.18	0.2±0.041
染毒组	5	0.56±0.062*	0.25±0.034*	0.12±0.018*

* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$

转运动力的能量产生过程,则是神经细胞实现轴浆运输功能所依赖的两大基础,已有实验表明,CS₂及其代谢产物能致轴索内连接神经丝和微管等骨架蛋白的高离子区域的电荷中性化,使神经丝从微管上脱落,并可直接导致神经丝蛋白分子内和分子间的交叉联接(cross-linking),从而破坏轴索的骨架结构^[8]。在本实验中,CS₂染毒组大鼠坐骨神经中三种高能核苷酸的含量均显著低于对照,说明CS₂可使周围神经能量代谢产生障碍。所以可以认为,CS₂对轴索骨架结构和细胞能量代谢过程的双重破坏作用,是导致周围神经轴浆运输障碍的重要原因。

本实验发现,在已出现较典型的周围神经损害症状的亚慢性CS₂中毒大鼠中,同位素示踪显示其坐骨神经的感觉和运动神经中³H亮氨酸的转运距离均明显低于对照组,提示CS₂对轴浆运输功能的损害与周围神经病变存在一定的联系。轴浆运输系统的破坏,使胞体合成的神经递质、分泌囊泡等在质和量上都不能完整到达轴索末梢,使神经肌接头的运动调节和感觉传递等功能受到影响,这种影响的结果在临床上即表现为感觉和运动障碍。

本研究认为,CS₂引起轴浆运输系统结构

性破坏和功能性障碍,是其致周围神经病变重要的病理生理基础。对CS₂损害轴浆运输功能与其所致周围神经病在时间、剂量、反应上的关系,还需进一步研究。

4 参考文献

- 1 Beuchamp RO, Bus JS, Popp JA, et al. A critical review of the literature on carbon disulfide toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol*, 1983, 11 (3): 169
- 2 何凤生. 职业性中毒性周围神经病的病理及发病机制. *中国工业医学杂志*, 1989, 2 (3): 48
- 3 Sayre LM. Pathogenesis of experimental giant neurofilamentous axonopathies: A unified hypothesis based on chemical modification of neurofilaments. *Brain Res Rev*, 1985, 10: 69
- 4 Chang LW (ed). *Neurotoxicology: Approaches and methods*. New York: Academic Press Inc, 1995: 465~481
- 5 Sickles DW. Toxic Neurofilamentous axonopathies and fast anterograde axonal transport. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1991, 108: 390
- 6 张金松,等. 反相高效液相色谱法测定大鼠脑组织中高能核苷酸及其代谢产物. *色谱*, 1993, 11 (5): 289
- 7 Ochs S. Axoplasmic transport and its relation to other nerve function. New York: John Wiley and Sons Inc, 1982.
- 8 Graham DG, Amamath V, Valentine WM, et al. Pathogenetic studies of hexane and carbon disulfide neurotoxicity. *CRC Crit Rev Toxicol*, 1995, 25 (2): 91

锦州铁路系统尘肺病调查分析

韩雨凯 富振国

1 资料来源

锦州铁路系统职业病管理已30年,在全民制工人中,共诊断职业病104例,其中各种尘肺病94例,占90%,男性91例,女性3例。

2 结果分析

2.1 工种分布 采石工占首位为41.49%,其次铸工占27.66%,电焊工占15.96%。爆破、隧道和其他工种共占15.89%。

2.2 接尘工龄 30年、35年组各占31.91%,32.98%;25年组以下共占35.11%;最短10个月为隧

道施工者,平均接尘工龄为24年。

2.3 发病年龄 55岁、65岁组各占34.04%与28.72%;45岁组占25.53%;35岁组以下占11.71%;最小20岁,最大65岁;平均发病年龄53岁。

2.4 尘肺分期 I期占首位,为50%;以下依次为I⁺占25.53%,II占12.77%,II⁺占7.45%,III占4.25%。III期均为原工程局、铁道兵隧道凿岩者,合并肺结核7例,占7.45%。30年累计可疑尘肺0者85例。

2.5 肺功能 中度减退占首位,为40.42%,多为隧道、采石及部分电焊工;轻度减退占29.79%;重度减退占19.15%。

(下转第231页)

作者单位: 121000锦州铁路防疫站