·专题交流·

亚急性铅暴露对小鼠体内抗氧化酶活性的影响

李革新，金亚平，赵 铭，刘轩军，陈爱莉，徐兆发
（中国医科大学公共卫生学院，辽宁 沈阳 110001）

摘要：实验动物经饮水方式染毒4周，饮水中醋酸铅的质量分数分别为0.03%，0.06%，0.09%，0.12%。结果显示，铅中毒引起实验动物血、睾丸组织SOD和血、肾、睾丸中GSH-Px活性升高，但高剂量染铅组的血和肾组织GSH-Px活性较低剂量组有不同程度下降。提示在亚急性铅中毒时，抗氧化酶活性的变化取决于铅暴露的水平。

关键词：铅中毒；抗氧化酶；超氧化物歧化酶（SOD）；谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）
中图分类号：R114；O614.433 文献标识码：A 文章编号1002－221X(2003)03－0163－03

Effects of subacute exposure to lead on activities of antioxidases in mice

LI Ge-xin, JIN Ya-ping, ZHAO Ming, LIU Xuan-jun, CHEN Ai-li, XU Zhao-fa
(*School of Public Health, China Medical University, Shenyang* 110001, *China*)

Abstract: Experimental mice were administered with lead acetate in distilled water by drinking daily at the concentrations of 0.03%, 0.06%, 0.09% and 0.12%, respectively, for four weeks. Four weeks later, the mice were killed and activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in blood, kidney and testis were determined. Results showed that lead levels and activities of SOD in blood, testis and GSH-Px in blood, kidney and testis in the experimental mice increased, which associated with concentrations of lead in drinking water, as compared with those in controls. But, the activities of GSH-Px in blood and kidney decreased in the group received the highest dose of lead, as compared with the group received lower dose of lead, indicating that changes in activities of SOD and GSH-Px depend on the doses of lead administered in subacute lead poisoning.

Key words: Lead poisoning; Antioxidase; Superoxide dismutase (SOD); Glutathione peroxidase (GSH-Px)

铅是环境中广泛存在的重金属污染物，对机体的多个器官和系统具有损伤作用。但到目前为止，铅损伤的确切机制尚不十分清楚。越来越多的研究结果表明，诱导产生自由基，导致氧化应激增强是铅引起机体损伤的主要机制之一[1,2]。由于自由基既是某些抗氧化酶的底物，又可直接影响非自身代谢酶的活性，因此，在不同的研究报道中，铅中毒既可引起抗氧化酶活性增强，也可导致其活性的降低。推测这可能与染铅的剂量和作用时间有关。GSH-Px和SOD是体内两种重要的抗氧化酶，目前有关在亚急性铅中毒状态下，该两种抗氧化酶活性变化的研究资料并不多见，为此，我们进行了本实验，为全面了解铅中毒对抗氧化酶活性的影响提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

选择健康雄性昆明种小鼠50只，体重（20±1）g，随机分5组，每组10只。将醋酸铅溶于蒸馏水中，作为饮水由实验小鼠自由摄取。4个实验组的饮水中醋酸铅质量分数分别为0.03%、0.06%、0.09%和0.12%，染毒4周。对照组小鼠饮蒸馏水。饲养期间喂饲全价颗粒饲料。饲料和小鼠均由中国医科大学实验动物中心提供。

1.2 检测指标和方法

染毒4周后，乙醚麻醉动物，摘眼球取血并处死动物，取肾和睾丸等脏器组织，检测如下指标：（1）血铅和脏器铅含量，原子吸收分光光度石墨炉法测定（美国Varian公司SpectrAA-40），同时进行美国CDC铅质控样品检测；（2）全血及脏器抗氧化酶（SOD、GSH-Px）活性，亚硝酸盐法和DTNB法检测，试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 统计方法

检测数据用SPSS软件进行方差分析。

2 结果

2.1 血和脏器中铅含量

表1表明，除实验1组的睾丸组织外，各实验组小鼠的血铅和各脏器铅含量均显著高于对照组。

表1 血液、肾脏和睾丸组织中铅含量（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	血液（μmol/L）	肾脏（μg/g 湿重）	睾丸（μg/g 湿重）
对照组	10	0.43±0.138	0.5±0.33	4.7±3.16
实验组1	10	2.14±0.466**	29.8±17.04**	5.8±2.17
实验组2	10	2.35±0.490**	33.5±10.94**	6.8±2.51*
实验组3	10	3.12±1.076**	38.3±10.97**	14.4±4.88**
实验组4	9	4.16±1.016**	77.4±34.60**	15.6±5.99**

与对照组比较 *$P<0.05$，**$P<0.01$，以下同。

收稿日期：2002－12－09；修回日期：2003－03－25
基金项目：教育部留学归国人员科研启动基金项目［教外司留2000－479］；辽宁省科技厅博士启动基金项目［20011020049］
作者简介：李革新（1958－），女，学士，辽阳市人，主管技师，主要从事重金属毒理研究。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2. 2 血和脏器中 GSH-Px 活性

表 2 表明，实验组的血和脏器 GSH-Px 活性较对照组均有不同程度的升高，其中实验 2、3 和 4 组的血 GSH-Px 活性与对照组比较有统计学意义；实验 1 和 2 组的肾 GSH-Px 活性与对照组比较有统计学意义（$P<0.05$）。睾丸组织 GSH-Px 活性各实验组与对照组间未见显著差异。

表 2 血液、肾脏和睾丸组织中 GSH-Px 活性（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	血 (NU/g Hb)	肾脏 (NU/mg prot)	睾丸 (NU/mg prot)
对照组	10	12.7±3.48	462±94.8	90.8±14.14
实验组 1	10	13.3±1.53	569±89.4*	103.2±13.66
实验组 2	10	15.6±3.21*	557±53.4*	107.9±23.13
实验组 3	10	17.2±3.62*	504±95.9	104.2±21.82
实验组 4	9	15.7±3.98*	458±139.6	103.4±15.62

注：组织匀浆 GSH-Px 活力定义——每毫克组织蛋白，每分钟扣除非酶反应的作用，使反应体系中 GSH 浓度降低 1μmol/L 为一个酶活力单位。

2. 3 血和脏器中 SOD 活性

表 3 表明，实验组的血和睾丸 SOD 活性较对照组均有不同程度的升高。实验 3、4 组的血 SOD 活性及各实验组的睾丸 SOD 活性与对照组比较有统计学意义（$P<0.05$）。

表 3 血液、肾脏和睾丸组织中 SOD 活性（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	血 (NU/g Hb)	肾脏 (NU/mg prot)	睾丸 (NU/mg prot)
对照组	10	63.1±14.52	638.5±112.83	125.8±20.01
实验组 1	10	62.8±12.84	555.6±106.71	162.9±25.70*
实验组 2	10	71.6±18.72	597.8±60.68	155.0±28.52*
实验组 3	10	73.4±13.15*	538.8±72.44	146.9±22.52*
实验组 4	9	74.2±16.94*	570.9±84.70	168.5±35.78*

注：组织匀浆 SOD 活力定义——每毫克组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个亚硝酸盐单位。

3 讨论

目前认为，δ-氨基-γ-酮戊酸（ALA）在铅中毒致机体的氧化损伤中发挥着重要作用[3~5]。ALA 是卟啉代谢的中间产物，它在 δ-氨基-γ-酮戊酸脱水酶（ALAD）的催化下缩合形成卟胆原，并最终参与血红素的合成。铅中毒时，由于铅对 ALAD 活性的抑制作用，导致 ALA 代谢障碍，并使其在体内大量蓄积。ALAD 对铅毒性作用非常敏感，血铅水平在 200 μg/L 时，该酶活性就可受到明显的抑制作用。ALA 本身就是自由基，它在体内可以进行自氧化过程，产生如超氧阴离子和羟基等活性更强的自由基，进而引起机体的氧化损伤。由于超氧阴离子和羟自由基是 SOD 和 GSH-Px 的底物，因此，该两种自由基的增多可导致 SOD 和 GSH-Px 活性升高。

截至目前大量的研究数据表明，慢性铅接触工人的血 SOD 和 GSH-Px 活性较正常人群明显升高[6~8]。动物实验结果也显示，慢性铅暴露的实验动物血和脏器中 SOD 和 GSH-Px 活性较对照组动物明显升高[9~12]。但在急性实验中，有报道铅中毒可引起实验动物血或脏器 SOD 和 GSH-Px 活性降低[13]。这说明在慢性铅中毒时，由于诱导产生大量自由基，导致机体抗氧化酶活性增强；但在急性实验条件下，由于短时间内大剂量铅进入机体，而诱导产生大量的自由基，可超出机体的代偿清除能力，未被及时清除的自由基可对细胞产生明显的毒性损伤，导致细胞活力的下降，引起包括抗氧化酶在内的细胞内酶活性的降低。同时自由基本身对非自身代谢酶也有直接的损伤作用，如羟自由基对 SOD 活性及超氧阴离子对 GSH-Px 活性均有一定抑制作用。因此，在铅中毒时，机体内可同时存在两种反应：自由基诱导的抗氧化酶活性增强及自由基对细胞和抗氧化酶活性的直接损伤而引起的抗氧化酶活性下降。

在本研究中，我们研究了亚急性实验条件下，铅中毒对抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性的影响。实验结果表明，血、睾丸组织内 SOD 和血、肾、睾丸的 GSH-Px 活性较对照组有不同程度的升高。在血、肾组织 GSH-Px 活性的变化较明显，而在睾丸组织 SOD 活性变化较明显。同时我们也看到，实验 4 组的血 GSH-Px 和实验 3、4 组的肾 GSH-Px 活性均较前一实验组有一定的降低。上述结果提示，在亚急性实验条件下，铅中毒对抗氧化酶活性的影响，在较低水平铅暴露时，以诱导抗氧化酶活性增强为主，而在较高水平铅接触时，自由基对细胞及抗氧化酶的直接损伤作用可部分抵消自由基诱导的抗氧化酶活性的增强。综上所述，在亚急性铅中毒时，抗氧化酶活性的变化主要取决于铅暴露的水平。

参考文献：

[1] Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? [J] Free Radical Biology & Medicine, 2000, 29: 927-945.

[2] Pande M, Flora SJ. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of alpha-lipoic acid and succimers in rats [J]. Toxicology, 2002, 177: 187-196.

[3] Costa CA, Trivelato GC, Pinto AM, et al. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers [J]. Clin Chem, 1997, 43: 1196-1202.

[4] Bechara EJ. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid [J]. Braz J Med Biol Res, 1996, 29: 841-851.

[5] Demasi M, Penatti CA, DeLucia R, et al. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias [J]. Free Radical Biol Med, 1996, 20: 291-299.

[6] Solliway BM, Schaffer A, Pratt H, et al. Effects of exposure to lead on selected biochemical and haematological variables [J]. Pharmacol Toxicol, 1996, 78: 18-22.

[7] Osman K, Schultz A, Akesson B, et al. Interactions between essential and toxic elements in lead exposed children in Katowice, Poland [J]. Clin Biochem, 1998, 31: 657-665.

[8] Machartova V, Racek J, Kohout J, et al. Indicators of effects of free radicals in workers at risk of lead exposure [J]. Vnitr Lek, 1998, 44: 83-85.

[9] Adonaylo VN, Oteiza PI. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain [J]. Toxicology, 1999, 135: 77-85.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[10] Hermes Lima M, Valle VG, Vercesi AE, et al. Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning [J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1056: 57-63.
[11] Skoczynska A, Smolik R, Jelen M. Lipid abnormalities in rats given small doses of lead [J]. Arch Toxicol, 1993, 67: 200-204.
[12] Monteiro HP, Bechara EJ, Abdalla DS. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning [J]. Mol Cell Biochem, 1991, 103: 73-83.
[13] Othman AI, Missiry MA. Role of selenium against lead toxicity in male rats [J]. Biochem Mol Toxicol, 1998, 12: 345-349.

镍致小鼠中枢神经毒性机制的研究

孙应彪，朱玉真
（兰州医学院公共卫生学院，甘肃 兰州 730000）

摘要：对小鼠脑内微量注射硫酸镍0.2 mg/kg，0.4 mg/kg，0.8 mg/kg一次性染毒，制备脑突触小体。检测脑组织Ca^{2+}-ATPase活性、钙调素（CaM）以及丙二醛（MDA）、还原型谷胱甘肽（GSH）含量和超氧化物歧化酶（SOD）活性。结果显示，硫酸镍明显抑制脑突触小体膜Ca^{2+}-ATPase活性，使CaM含量降低；脑组织中MDA含量升高的同时SOD活性受抑制，并引起GSH含量减少。说明硫酸镍可导致钙稳态失衡，同时引起神经细胞脂质过氧化作用增强而致脑损伤。

关键词：硫酸镍；中枢神经；腺苷三磷酸酶（ATPase）；钙调素；脂质过氧化
中图分类号：R994.3；O614.813 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2003)03－0165－02

A study on the mechanism of central nervous system toxicity caused by nickel in mice

SUN Ying-biao, ZHU Yu-zhen
(*School of Public Health, Lanzhou Medical College, Lanzhou* 730000, *China*)

Abstract: Nickel sulfate at varied doses of 0.2 mg/kg, 0.4mg/kg and 0.8mg/kg, respectively, was injected intracerebrally for mice. The cerebral synaptosome was prepared. Activity of Ca^{2+}-ATPase, the contents of calmodulin (CaM), malondialdehyde (MDA), GSH and activity of SOD in the brain were measured with enzyme and biochemical analysis. Results showed that activities of Ca^{2+}-ATPase and SOD in the cerebral synaptosome were inhibited significantly, its contents of CaM and GSH decreased and its content of MDA increased in the mice treated with nickel sulfate, indicating nickel sulfate could cause imbalance of stable state of calcium and enhancement of lipid peroxidation in nerve cells leading to brain damage.

Key words: Nickel sulfate ($NiSO_4$); Central nervous system; ATPase; Calmodulin; Lipid peroxidation

镍既是人体内的微量元素，又是环境污染物之一。大剂量镍可以致癌、致畸、致突变，并引起机体多器官损伤[1~3]。据报道可溶性镍盐动物急性毒性可致震颤、舞蹈症、瘫痪等神经系统症状及中枢神经系统水肿[4]，但其详细机制不清。本文采用脑内微量注射这一特殊方法对小鼠染毒后，检测脑组织钙-腺苷三磷酸酶Ca^{2+}-ATPase、SOD活性以及CaM、MDA、GSH的含量，以探讨镍致中枢神经损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康昆明种小鼠40只，雌雄各半，体重18~22 g，由兰州医学院动物室提供。随机分为4组：生理盐水（NS）组，染毒硫酸镍0.2 mg/kg、0.4 mg/kg、0.8 mg/kg组。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脑内微量注射染毒[5] 将小鼠腹位固定，酒精消毒。在小鼠两耳连结线与两眼连结线之间，稍微离正中线的头盖骨部位上，将50 μl微量注射器垂直刺入0.5 cm，缓慢注射，注射量不超过20 μl/只。

1.2.2 制备脑突触小体 于染毒后数小时颈椎脱位法处死小鼠，剪开颅骨，分离脑组织，称重后加入1∶10冰冷的Tris-HCl缓冲液（pH 7.4，内含0.25 mol/L蔗糖，1 mmol/L EDTA），用玻璃匀浆器制成10 g/L脑组织匀浆。取脑组织匀浆800 g离心10 min，弃沉淀，留上清液；然后再以匀浆介质液悬浮，15 500 g离心30 min，留沉淀部分再重新离心1次，剩余沉淀即为突触小体成分，以匀浆介质液悬浮待测（以上过程均在0~4 ℃条件下进行）。

1.2.3 采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒检测脑突触小体Ca^{2+}-ATPase活性，单位以每毫克蛋白每小时反应释放磷（P）的μmol数表示。用Lowry法[6]测定蛋白质。

1.2.4 用PDE法测定CaM含量[7] 脑突触小体悬浮液在95 ℃水浴中加热5 min，19 500 r/min离心60 min，取上清液制成2 mmol/L $CaCl_2$溶液，利用PDE系统间接测定其活力，再推算其含量。以标准CaM对PDE的刺激曲线作为测定的标准曲

收稿日期：2002－10－14；修回日期：2002－12－10
作者简介：孙应彪（1967－），男，副教授，研究方向：重金属镍、铬、钴毒性及其防治的研究。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net