

- [10] Hemes 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, 0.4 mg/kg and 0.8 mg/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。在小鼠两耳联结线与两眼联结线之间, 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 °C 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 °C 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。

线, 单位以脑匀浆离心的上清液中每毫克蛋白所含 CaM 的比活 (U) 表示。

1.2.5 取另一部分脑组织匀浆 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 TBA 法^[8]检测脑组织中 MDA 含量, 邻苯三酚自氧化改进法^[9]测定 SOD 活性, 用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量。

表 1 硫酸镍对小鼠脑突触小体 ATPase、CaM 活性和脑组织 MDA、SOD、GSH 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数	Ca ²⁺ -ATPase [μmol P/(h·mg prot)]	CaM (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)	SOD (U/mg prot)	GSH (mg/mg prot)
生理盐水组	4.5	10	19.30±3.70	1.29±0.15	36.35±4.37	45.17±2.71	0.23±0.11
NiSO ₄ 染毒组	0.2	10	12.35±1.83**	1.09±0.16**	43.28±5.45**	45.13±8.42	0.14±0.05*
	0.4	10	6.95±1.52**	0.90±0.15**	52.73±3.26**	41.30±3.62*	0.11±0.04**
	0.8	10	3.02±0.46**	0.84±0.16**	73.87±6.17**	32.30±1.28**	0.05±0.01**

与 NS 组比较 *P<0.05, **P<0.01

由表 1 可见, 硫酸镍明显抑制脑突触小体 Ca²⁺-ATPase 活性, 引起 CaM 含量下降, 且随着剂量的增加其效应明显增强; 脑组织中 MDA 含量显著升高的同时伴有 SOD 活性下降及 GSH 含量的减少。

3 讨论

结果表明, 硫酸镍抑制脑突触小体 Ca²⁺-ATPase 活性, 引起 CaM 含量下降及脑组织抗氧化能力的降低和脂质过氧化作用增强, 可能是其导致脑损伤的机制之一。

Ca²⁺-ATPase 是细胞膜上的跨膜蛋白, 在维持细胞钙稳态平衡过程中起重要作用, 即通过钙泵的主动转运, 将 Ca²⁺ 外排或促使其进入钙库贮存^[10]。CaM 是各类真核细胞内的 Ca²⁺ 受体, 它既传递 Ca²⁺ 信息, 也参与细胞内 Ca²⁺ 浓度的调节。当机体 Ca²⁺-ATPase 活性被抑制和 (或) CaM 活性下降时, 钙泵向细胞外主动转运 Ca²⁺ 的能力下降, 钙库中 Ca²⁺ 释放增多, 细胞内 Ca²⁺ 浓度异常增多, 导致细胞的损伤甚至死亡。研究发现^[11], 半径与 Ca²⁺ 相近、外层电子结构能满足 Ca²⁺ 结合区配位键的金属离子, 可替代 Ca²⁺ 而抑制 Ca²⁺-ATPase 活性。较大剂量的 Ni²⁺ 进入中枢神经组织中, 可能是通过抑制 CaM, 进而抑制其靶酶——Ca²⁺-ATPase, 导致 Ca²⁺-ATPase 活性降低, 神经细胞排 Ca²⁺ 能力减弱, 细胞内 Ca²⁺ 浓度持续升高而致神经细胞损伤; 另一方面, 也可能是 Ni²⁺ 占据 CaM 上 Ca²⁺ 的结合位点, 与 CaM 结合成复合物, 干扰了 CaM 正常的调控功能, 导致钙库失衡。因此可以推测, 重金属离子与 CaM 相互作用, 可能是重金属中毒的分子基础。

Ni²⁺ 进入脑内可产生自由基^[12], 攻击神经细胞膜不饱和脂肪酸烯丙基, 导致膜脂质过氧化, 从而引起脑组织脂质过氧化产物 MDA 含量升高, 而其清除物 SOD 的活性和谷胱甘肽含量降低。研究表明^[13], 机体细胞膜发生脂质过氧化反应, 可引起细胞膜流动性降低, 脆性增加, 膜上受体和酶类的功能改变, 膜通透性变化如 Ca²⁺ 内流、钙稳态失调等, 而致细

1.3 统计方法

采用 SPSS10.0 软件包进行方差分析及样本均数两两比较的 q 检验。

2 结果

2.1 硫酸镍对小鼠脑突触小体 ATPase、CaM 活性和脑组织 MDA、SOD、GSH 的影响

胞损伤甚至死亡。因此, 硫酸镍抑制脑突触小体膜 Ca²⁺-ATPase、CaM 活性, 可能是 Ni²⁺ 致突触小体膜脂质过氧化作用的结果。

参考文献:

[1] Nieboer E. Nickel and human health: current perspectives [M]. A wiley interscience publication, 1992, 37-48.
[2] 刚葆琪, 庄志雄. 我国镍毒理学研究进展 [J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14: 129-135.
[3] 袁宝珊, 梁超轲. 环境污染物致癌致畸致突变 [M]. 兰州: 兰州大学出版社, 1995, 25-26.
[4] 夏元洵. 化学物质毒性全书 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1991, 75-76.
[5] 徐淑云, 卞如瀛, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982, 135-136.
[6] Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A. Protein measurement with the Folin reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 263-268.
[7] Shama RK, Wang JH. Preparation and assay of the dependent modulator protein [J]. Adv Cyclic Nucleotide Res, 1979, 10: 187-195.
[8] 白荣. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17: 24-25.
[9] 谢亚华. 邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进 [J]. 医药工业, 1998, 19: 217-218.
[10] 文允镒. 钙与钙调素 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1989, 106-109.
[11] Chao Sheng Hao, Yasuhiro Suzuki, John R, et al. Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius [J]. Mol Pharmacol, 1984, 26: 75-82.
[12] Misra M, Ricardo E, Rodriguez S, et al. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: Correlation with nickel effect on antioxidant defense systems [J]. Toxicology, 1991, 64: 1-6.
[13] 张桥. 卫生毒理学基础 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 61-62.