

硫酸镍对雌性大鼠卵巢的毒性作用及其机制

王学习

(兰州医学院中西医结合研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 选健康性成熟 Wistar 雌性大鼠, 每次以 5.00 mg/kg、2.50 mg/kg、1.25 mg/kg 硫酸镍 (NiSO_4) 腹腔注射染毒, 0.2 ml/100 g 动物体重, 1 次/d, 连续 21 d。于最后一次染毒结束次日心脏采血放免法测雌二醇 (E_2)、孕酮 (P), 同时测定卵巢 NOS 酶活力、NO 含量及卵巢和子宫镍含量。结果染毒各剂量组动物子宫、卵巢镍含量及卵巢 NOS 酶活力与对照组比较差异有显著性; 5.00 mg/kg、2.50 mg/kg 染毒组血清 E_2 、P 含量, 卵巢 NO 含量与对照组比较差异有显著性。提示腹腔 NiSO_4 染毒引起雌性大鼠卵巢损伤, 血清 E_2 、P 下降, 其机制可能与卵巢镍含量升高诱导 NOS、NO 水平增高有关。

关键词: 硫酸镍; 雌二醇; 一氧化氮合酶; 一氧化氮

中图分类号: R955; O614.813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2003)03-0167-02

Toxic effect of nickel sulfate on the ovary in female rats and its mechanism

WANG Xue-xi

(Institute for Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China)

Abstract Nickel sulfate was injected intra-peritoneally for Wistar female rats with sexual maturation daily at different doses (5.00 mg/kg, 2.50 mg/kg, 1.25 mg/kg) for 21 days. On the 22nd day, blood specimens were collected from the heart of the rats, nickel contents in the uterus and ovary, serum levels of progesterone (P) and estradiol (E_2) (with RIA), activity of nitric oxide synthase (NOS) and nitric oxide (NO) content in the ovary were measured. Results showed that the nickel contents in the uterus and ovary and activity of NOS in the ovary of the rats given nickel sulfate were higher than those in the control rats ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); serum levels of E_2 and P in the rats with 5.00 mg/kg and 2.50 mg/kg of nickel sulfate were lower than those in the control rats ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and NO content in the ovary of the rats with 5.00 mg/kg and 2.50 mg/kg of nickel sulfate was higher than that in the control rats ($P < 0.05$). It indicates the ovary of the female rats was damaged by peritoneal injection of nickel sulfate, causing decrease in serum levels of E_2 and P, which was possibly associated with the increase in contents of NOS and NO.

Key words: Nickel sulfate; Estradiol (E_2); Nitric oxide synthase (NOS); Nitric oxide (NO)

镍是机体的一种必需微量元素, 具有许多生物学作用。但过多的镍进入机体, 则会引发机体相应的功能性、器质性、特异性和非特异性损伤。本研究采用整体动物实验探讨镍对雌性大鼠卵巢的毒作用及其机制, 为镍毒性的防治提供实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康性成熟 Wistar 雌性大鼠, 体重 180~200 g, 由兰州医学院动物中心提供。

1.2 试剂

硫酸镍 (NiSO_4 , AR), 西安化学试剂厂, 970426; 孕酮 (P)、雌二醇 (E_2) 测定试剂盒, 天津九鼎生物工程公司; 一氧化氮合酶 (NOS)、一氧化氮 (NO) 测定试剂盒, 南京建成生物工程公司。

1.3 实验方法

动物入室适应环境 3 d, 按体重分层随机分为 4 组: 正常对照组 (NS 组); 染毒高、中、低剂量组, 每次以 5.00 mg/kg、2.50 mg/kg、1.25 mg/kg 腹腔注射 NiSO_4 染毒, 0.2 ml/100 g

动物体重, 1 次/d, 连续 21 d; 正常对照组以生理盐水 0.2 ml/100 g 体重等体积腹腔注射对照。最后一次染毒结束次日心脏采血, 分离血清放免法测 E_2 、P; 同时处死动物摘取卵巢、子宫, 试剂盒法测卵巢 NOS 酶活力、NO 含量, 原子吸收分光光度法测卵巢、子宫镍含量。

2 结果

2.1 染毒动物的一般反应

染毒过程中个别动物出现腹泻、便秘等不同症状, 染毒后期 5.00 mg/kg 组动物进食量、体重下降, 一般状态较差。

2.2 染镍大鼠不同脏器镍含量变化

如表 1 所示, 染毒各剂量组动物子宫、卵巢镍含量与对照组比较差异有显著性或非常显著性。

表 1 染镍大鼠子宫、卵巢镍含量的变化 ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{g/g}$

NiSO_4 剂量 (mg/kg)	动物数	子宫	卵巢
0	10	0.202 ± 0.097	0.223 ± 0.094
1.25	10	$0.361 \pm 0.136^*$	$0.384 \pm 0.201^*$
2.50	10	$0.579 \pm 0.207^{**}$	$0.699 \pm 0.284^{**}$
5.00	10	$0.878 \pm 0.236^{**}$	$0.905 \pm 0.203^{**}$

与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下表同。

收稿日期: 2002-12-25; 修回日期: 2003-02-14

作者简介: 王学习 (1975-), 男, 讲师, 研究方向: 金属毒理。

2. 3 镍对大鼠血清性激素含量的影响

由表 2 可见, 5.00 mg/kg、2.50 mg/kg 组动物血清 E_2 、P 含量与对照组比较差异有显著性或非常显著性; 1.25 mg/kg 组动物血清 E_2 、P 仅有下降趋势, 与对照组比较无统计学意义。

表 2 镍对大鼠血清性激素含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

NiSO ₄ 剂量 (mg/kg)	动物数	E_2 (ng/L)	P (μ g/L)
0	12	81.87 $\pm$ 7.95	27.34 $\pm$ 4.71
1.25	12	80.43 $\pm$ 9.65	26.29 $\pm$ 6.22
2.50	13	71.84 $\pm$ 14.72 *	22.04 $\pm$ 7.08 *
5.00	11	60.51 $\pm$ 16.74 **	19.78 $\pm$ 6.33 **

2. 4 染镍大鼠卵巢 NOS 酶活力、NO 含量的变化

表 3 显示, 染毒高、中剂量组卵巢 NO 含量与对照组比较差异有显著性; 染毒各剂量组卵巢 NOS 酶活力与对照组比较差异有显著性或非常显著性。

表 3 镍对大鼠卵巢 NOS 酶活力、NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

NiSO ₄ 剂量 (mg/kg)	动物数	NO (nmol/g 组织)	NOS (U/mg prot)
0	10	28.87 $\pm$ 9.86	3.68 $\pm$ 1.32
1.25	10	28.84 $\pm$ 9.27	4.79 $\pm$ 0.98 *
2.50	10	37.98 $\pm$ 9.34 *	5.18 $\pm$ 1.34 *
5.00	10	41.07 $\pm$ 11.46 *	7.42 $\pm$ 2.47 **

注: NOS 酶活力单位 (U) 定义——每毫克组织蛋白每分钟生成 1nmol NO 为一个酶活力单位。

3 讨论

本研究结果表明, 腹腔注射 NiSO₄ 染毒, 可引起雌性大鼠卵巢损害, 表现为血清 E_2 、P 下降, 其机制可能为卵巢镍含量升高诱导 NOS、NO 水平增高。

过量镍进入机体, Ni²⁺ 与 DNA 碱基结合, 使有序的 DNA 氢系统不稳定, 引起 DNA-蛋白质交联和 DNA 单链断裂, 导致 DNA 损伤和细胞毒作用, 同时抑制多种酶活性, 如 ATP 酶、琥珀酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、细胞色素氧化酶等, 干扰组织器官代谢。另外, 过量镍可诱发体内产生金属硫蛋白 (MT), 结合镍的同时也可结合其他 Zn²⁺、Mg²⁺ 等金属离子, 加之二价离子竞争多功能位点作用可导致体内 Zn²⁺、Mg²⁺ 等离子浓度下降, 影响含锌酶和含镁酶功能, 进一步干扰组织器官代谢^[1], 上述机制可能诱导卵巢 iNOS 生成。iNOS 在静息细胞基础水平的条件下, 启动 NO 的合成, 持续产生大量 NO^[2], 染毒组动物卵巢 NO 水平升高。

NO 产生过多对卵巢造成各种损害。NO 过多对卵巢细胞蛋白质功能产生影响, 其可直接与巯基化合物反应形成亚硝基硫醇 (RS-NO), 如 NO 可以和谷胱甘肽过氧化物酶反应生成 S-亚硝基谷胱甘肽, 同时快速激活磷酸己糖通路 (HMPS), 引起细胞内谷胱甘肽耗竭, 导致过氧化反应^[3]。NO 过多对卵巢细胞能量代谢产生影响, NO 可抑制三羧酸循环的顺乌头酸酶、NADH 泛醌氧化还原酶、琥珀酸泛醌氧化还原酶、细胞色素氧化酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶等的活性而减少 ATP 的生成,

耗竭细胞内的能量而使细胞损害甚至死亡^[4]。NO 还可与许多生物分子 (如 O₂) 发生反应, 生成一系列新的自由基, 引发体内自由基链式反应, 加重对卵巢的损伤^[5,6]。如新自由基过氧化物硝酸根 (ONOO⁻) 作为一种强氧化剂不但引起膜脂质过氧化, 还介导蛋白巯基和非蛋白巯基的氧化^[7], 引起正常的代谢通路和膜功能的破坏, 从而引起细胞代谢和合成功能异常, 导致细胞损伤甚至死亡。ONOO⁻ 也可通过对具有细胞调节作用的蛋白质 (如 Cu-Zn-SOD) 中的酪氨酸进行硝基化和强烈抑制细胞线粒体氧化呼吸而发挥毒性作用^[8]。NO 通过对卵巢细胞蛋白质功能、能量代谢的影响及其与生物分子反应生成产物对卵巢的影响造成功能性损害, 导致卵巢分泌 E_2 、P 能力受损, 血清 E_2 、P 水平下降, 是否出现实质性损伤还有待于病理组织学检测。

我国镍都金昌地区妇幼保健站承担的 V₆ 项目调查资料显示: 调查 18~50 岁妇女 540 人中有 69 例 32~39 岁中青年妇女闭经 (无结核、肝炎、甲状腺功能亢进、糖尿病), 占 12.8%, 平均闭经年龄 35.2 岁, 比我国妇女平均绝经年龄 (45~52 岁) 提前 8~10 年, 比发达国家平均闭经年龄 (48~54 岁) 提前 15~17 年。该人群体检发现阴道上皮脱落细胞角化, 发镍 12.35 μ g/g, 尿镍 15.47 μ g/L, 明显高于我国不同地区正常女性发镍含量 [广东 0.52 μ g/g, 南京 (1.01 $\pm$ 1.44) μ g/g, 山西 (0.29 $\pm$ 0.013) μ g/g]^[1], 而发、尿中 Mn、Mg、Cr、Co、Pb 无明显变化, 且排除子宫发育不良引发的子宫性闭经, 卵巢囊肿癌变引起的卵巢性闭经, 产后感染 DIC 引发的垂体性闭经, 精神紧张工作压力等引起的下丘脑性闭经及由甲状腺功能亢进、糖尿病、传染病等疾病引发的闭经。结合本实验研究推测该地区女性闭经提前与镍污染有关, 可能因体内镍含量升高诱导合成大量 NO 而导致卵巢损害, 其具体机制还需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 颜世铭, 洪昭毅. 实用元素医学 [M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 2000. 291-295, 678-682.
- [2] Billar TR. Nitric oxide: novel biology with clinical relevance [J]. Ann Surg, 1995, 221: 339-349.
- [3] Schroeder RA, Kuo PC. Nitric oxide: physiology and pharmacology [J]. Anesth Analg, 1995, 81: 1052-1059.
- [4] Asahi M, Fujii J, Suzuk K, et al. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide: implication for cytotoxicity [J]. J Biol Chem, 1995, 270: 21035-21039.
- [5] Brown GC. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase [J]. FEBS Lett, 1995, 369: 136-139.
- [6] Halliwell B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease [J]. Ann Rheu Dis, 1995, 54: 505-510.
- [7] Radi R, Bechman JS, Bush KM, et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 4244-4250.
- [8] Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase [J]. Arch Biochem Biophys, 1992, 298: 431-437.