

尼莫地平对锰致大鼠肝脏 NO和 NOS改变的影响

徐斌, 徐兆发*, 邓宇, 关坤, 王飞, 冯雪英

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 研究尼莫地平对锰致大鼠肝毒性的影响, 重点观察肝脏 NO含量和 NOS活性的改变。方法 大鼠按体重随机分成 5组, 第 1组为对照组, 第 2~4组为单纯染锰组, 第 5组为尼莫地平干预组。第 1~4组腹腔注射生理盐水, 第 5组腹腔注射 $2.39 \mu\text{mol/L}$ 尼莫地平。2 h后, 第 1组皮下注射生理盐水, 第 2~4组分别皮下注射 MnCl_2 溶液 50 100 200 $\mu\text{mol/L}$, 第 5组皮下注射 MnCl_2 200 $\mu\text{mol/L}$, 注射容量 5 ml/kg 每周 5次, 共 4周。各组处理 4周后, 测定血清乳酸脱氢酶 (LDH)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 以及肝组织中 NO含量和 NOS的活性。结果 随着染锰剂量的增加, 大鼠血清 LDH和 ALT的活性以及肝脏 NO含量和 NOS活性逐渐升高。高剂量染锰组上述各指标均明显高于对照组和中、低剂量染锰组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。尼莫地平干预组与高剂量染锰组比较, LDH和 ALT活性以及肝脏 NO含量和 NOS活性均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 锰可致肝细胞内 NOS活性升高并产生大量的 NO, 钙离子拮抗剂尼莫地平可有效拮抗锰的肝毒性。

关键词: 锰; 肝毒性; 尼莫地平

中图分类号: O614.711 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)03-0174-02

Effect of nimodipine on changes of NO and NOS in rat liver caused by manganese

XU Bin, XU Zhao-fa*, DENG Yu, GUAN Kun, WANG Fei, FENG Xue-ying

(School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective The aim of this study was to determine whether nimodipine (Nim) can prevent the toxic effect of Mn on liver by measuring NO level and NOS activity. Methods SD rats were randomly divided into five groups by weight. The first group was the control which was only injected with 0.9% NaCl, second to fourth groups were intraperitoneally injected with MnCl_2 and the fifth group was given Nim $2.39 \mu\text{mol/L}$. Two hours later the control group was still given 0.9% NaCl subcutaneously, the second to fourth groups were subcutaneously injected with 50, 100 and 200 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 , the fifth group was given subcutaneous injection of 200 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 . Four weeks later after administration mentioned above, the rats were anaesthetized and taking the liver and serum samples for measuring the activities of LDH and GPT in serum, the NOS activity and NO level in liver were also determined at the same time. Results The results showed that with the increase of manganese dose, the activities of LDH and GPT in serum, the NOS activity and the NO level in liver of manganese exposed rats also increased significantly dose dependently ($P < 0.01$). Compared with the rats given highest dosage of manganese all the changes mentioned above in Nim group were significantly decreased ($P < 0.01$). Conclusion Manganese has hepatotoxicity which could produce large amount of NO by activating NOS, and nimodipine to a certain extent might reduce these adverse effect of manganese.

Key words: Manganese; Hepatotoxicity; Nimodipine

锰 (Manganese, Mn) 是人体的一种必需微量元素, 但过量摄入锰也会造成多种器官损伤, 产生中枢神经系统毒性、肝脏毒性、生殖毒性等^[1], 但对其肝脏毒性报道较少。一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 是一种生物信息传递体, 也是一种反应极强的自由基, 它兼有第二信使和神经递质作用, 介导和调节多种病理生理过程, 受到国内外医学科学工作者的高度重视。有研究表明钙离子通道阻断剂——尼莫地平 (nimodipine, Nim) 可以明显下调脑缺血动物的齿状回和培养细胞中诱导型一氧化氮合酶 (NOS) 表达, 降低 NOS的酶活性, 对脑缺血有保护作用^[2]。本文拟通过观察锰致肝损伤大鼠肝

脏中一氧化氮和不同类型一氧化氮合酶 (Nitric oxide synthase, NOS) 的活性变化, 初步探讨锰的肝脏毒性和尼莫地平对其的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及染毒

由中国医科大学实验动物中心提供的实验用 SD大鼠 40只, 体重 (200±10) g, 雌雄各半。正式实验前饲养 7 d, 然后按体重随机分成 5组, 每组 8只。第 1组为对照组, 第 2~4组为单纯染锰组, 第 5组为尼莫地平干预组。第 1~4组腹腔注射生理盐水, 第 5组腹腔注射 $2.39 \mu\text{mol/L}$ 尼莫地平。2 h后, 第 1组皮下注射生理盐水, 第 2~4组分别皮下注射 MnCl_2 溶液 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$, 第 5组皮下注射 MnCl_2 200 $\mu\text{mol/L}$, 注射容量 5 ml/kg 每周 5次, 共 4周。

1.2 样品采集及处理

最后一次注射后 24 h 将大鼠用乙醚麻醉, 解剖腹主动

收稿日期: 2007-09-18 修回日期: 2008-01-10

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30771834)

作者简介: 徐斌 (1979-), 男, 讲师, 在读博士, 主要从事重金属毒理学研究。

*: 通讯作者, 教授, 博士生导师。

脉取血, 分离血清, 测定血清乳酸脱氢酶 (LDH) 和丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 切取肝组织, 在冰浴下制成 10% 的组织匀浆, 测定肝组织 NO 含量和结构型一氧化氮合酶 (eNOS) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的活性。

1.3 测定指标及方法

LDH 活性的测定用 2,4-二硝基苯胍比色法^[3], ALT 活性的测定用改良赖氏法^[4], NO 和 NOS 活性的测定由南京建成生物工程研究所提供 NO 和 NOS 检测试剂盒。具体操作按说明书要求进行。组织蛋白测定用 Lowry 法^[5]。

1.4 统计分析

实验所得数据以平均值 ± 标准误表示, 用 SPSS1.0 软件进行单因素方差分析, 组间差异的显著性检验、检验比较用 χ^2 。

2 结果

2.1 血清 LDH 和 ALT 变化

给大鼠染毒 4 周后, 大鼠血清 LDH 和 ALT 变化见表 1。

表 1 各组大鼠血清 LDH 和 ALT 活性 ($\bar{x} \pm s_x$)

分组	LDH (U/L)	ALT (U/L)
对照组	117.8 ± 21.24	25.55 ± 4.15
50 $\mu\text{mol/L MnCl}_2$	126.3 ± 29.94▲▲	26.40 ± 5.71▲▲
100 $\mu\text{mol/L MnCl}_2$	140.5 ± 26.83▲▲	31.98 ± 7.05▲▲
200 $\mu\text{mol/L MnCl}_2$	224.3 ± 34.50**	58.14 ± 7.52**
Nim+200 $\mu\text{mol/L MnCl}_2$	147.1 ± 36.98▲▲	33.57 ± 7.20**▲▲

与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与高剂量染锰组比较 ▲▲ $P < 0.01$

从表 1 可见, 随着染锰剂量的增加, 大鼠血清 LDH 和 ALT 的活性逐渐升高。高剂量染锰组 LDH 和 ALT 活性均明显高于对照组和中、低剂量染锰组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 尼莫地平干预组与高剂量染锰组比较, LDH 和 ALT 活性均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 肝脏 NO 和 NOS

给大鼠染毒 4 周后, 大鼠肝脏 NO 含量和 NOS 的活性变化见表 2。

表 2 各组大鼠肝脏 NO 含量和 NOS 的活性 ($\bar{x} \pm s_x$)

分组	NO ($\mu\text{mol/g prot}$)	NOS (U/mg prot)	
		eNOS	iNOS
对照组	0.25 ± 0.09	0.44 ± 0.26	0.21 ± 0.10
50 $\mu\text{mol/L MnCl}_2$	0.29 ± 0.12▲▲	0.58 ± 0.32	0.31 ± 0.16▲▲
100 $\mu\text{mol/L MnCl}_2$	0.50 ± 0.24**▲▲	0.43 ± 0.13	0.52 ± 0.99**▲
200 $\mu\text{mol/L MnCl}_2$	1.66 ± 0.41**	0.55 ± 0.38	0.73 ± 0.19**
Nim+200 $\mu\text{mol/L MnCl}_2$	0.70 ± 0.22**▲▲	0.38 ± 0.35	0.44 ± 0.21**▲▲

与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与高剂量染锰组比较 ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$

从表 2 可见, 随着染锰剂量的增加, 大鼠肝脏 NO 含量和 NOS 活性逐渐升高。高剂量染锰组 NO 含量和 NOS 活性均明显高于对照组和中、低剂量染锰组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 尼莫地平干预组与高剂量染锰组比较, NO 含量和 NOS 活性均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 各实验组 eNOS 无明显变化。

3 讨论

NO 是脂溶性气体物质, 体内 NO 主要由 NOS 催化 L-精氨酸

生成, 它是组织损伤的诱发因子和各种病变的增强因子, 同时它又是生物体许多生理过程的信号分子和先天性免疫应答的调节性效应分子。NO 的这种双重性在人体的病理和生理过程中具有重要作用^[6]。组织中有两种类型 NOS, 即结构型 (eNOS) 和诱导型 (iNOS), eNOS 分布于血管内皮细胞和血小板等处, 促进合成的 NO 大部分释放入血液, 其生物效应以生理状态下细胞间信息传递为主, 具有扩张血管, 提高肝脏血液灌流而起到保护肝脏的作用; iNOS 分布于肝细胞、枯氏细胞等处, 可被脂多糖 (LPS)、内毒素及多种细胞因子诱导活化, 产生大量具有细胞毒性作用的内源性 NO, 参与各种肝病的病理过程^[7]。本实验染锰 4 周后, 随着染锰剂量的增加, 大鼠血清 LDH 和 ALT 活性逐渐升高。高剂量染锰组达到最高, 分别是对照组的 1.9 倍和 2.3 倍, 表明染锰可造成大鼠肝损伤, 大鼠肝损伤的同时, 肝脏中 NO 和 NOS 也发生了相应的变化, 随着染锰剂量的增加, 肝脏 NO 含量和 NOS 活性逐渐升高, eNOS 活性无明显变化^[8]。

钙离子通道阻断剂尼莫地平是近 20 年发展起来的 1,4-二氢吡啶类降压药物, 主要通过阻断细胞膜表面 L 型钙离子通道, 降低细胞内游离 Ca^{2+} 浓度而发挥作用。本实验用尼莫地平预处理后, 血清 LDH 和 ALT 活性与高剂量染锰组比较明显下降, 表明尼莫地平对锰致肝损伤有保护作用; 此外, 尼莫地平预处理可明显减低 iNOS 活性和 NO 含量, 这可能与其阻断 L 型钙离子通道, 降低细胞内 Ca^{2+} 诱导 NOS 基因的表达有关^[9]。

参考文献:

[1] Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, et al. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2007; 221 (2): 131-147.

[2] 张爱霞, 罗春霞, 王玮, 等. 尼莫地平对小鼠齿状回诱导型一氧化氮合酶的表达及其活性的影响 [J]. 中国药理学通报, 2005 21 (7): 790-794.

[3] 生物化学及生物化学检验技术编写组. 生物化学及生物化学检验技术 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1980: 237-239, 246-248.

[4] 沈同. 生物化学 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1980: 465-467.

[5] Lowry OH, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem 1951; 193 (1): 265-275.

[6] 魏思忱, 白文元. 一氧化氮及一氧化氮合酶与肝癌 [J]. 临床肝胆病杂志, 2005 21 (6): 393-395.

[7] Zafraques M, Kadkhodaei M, Arab H A, et al. Effects of co-administration of an NOS inhibitor with a broad-spectrum reactive species scavenger in rat renal ischemia/reperfusion injury [J]. Nephron Exp Nephrol 2006; 103 (3): 919-125.

[8] Azenabor A A, Yang S, Job G, et al. Expression of NOS gene in macrophages stimulated with 17 beta-estradiol is regulated by free intracellular Ca^{2+} [J]. Biochem Cell Biol 2004; 82 (3): 381-390.

[9] Luo CX, Zhu XJ, Zhang AX, et al. Blockade of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels inhibits ischemia-induced neurogenesis by down-regulating NOS expression in adult mouse [J]. J Neurochem 2005; 94 (4): 1077-1086.