

镍对小鼠外周血红细胞膜 ATP_{ase}活性的影响Effect of nickel sulfate on the activity of ATP_{ase} in membrane of erythrocytes of mice

孙应彪, 朱玉真

SUN Ying-biao, ZHU Yu-zhen

(兰州医学院公共卫生学系, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 目的 探讨硫酸镍小鼠脑内微量注射染毒对其外周血红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP_{ase}、Ca²⁺-ATP_{ase}活性的影响, 为镍毒性的防治提供理论依据。方法 对小鼠采用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, 用定磷比色法检测红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP_{ase}、Ca²⁺-ATP_{ase}活性。结果 硫酸镍明显抑制红细胞膜 ATP_{ase}活性, 并呈剂量-效应关系。结论 镍可导致红细胞损伤, 从而引起脑组织缺氧; 其机制可能与其抑制细胞膜 ATP_{ase}活性有关。

关键词: 硫酸镍; 红细胞膜; Na⁺-K⁺-ATP_{ase}; Ca²⁺-ATP_{ase}

中图分类号: O614.813 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2002)06-0355-02

镍既是人体内的微量元素, 又是环境污染物之一。大剂量镍可致癌、致畸、致突变, 并引起机体多器官损伤^[1-3]。据报道镍可致神经系统损伤^[4], 但其详细机制不清。我们研究发现镍可引起脑组织中单胺类神经递质含量和脑突触体膜 ATP_{ase}、钙调蛋白活性的改变^[5-6]。因此, 为了进一步探求镍致神经系统损伤的机制, 本研究采用脑内微量注射染毒和膜毒理学方法探讨镍致红细胞的损伤, 为镍对神经系统损伤机制的探讨提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 (18±2) g, 由兰州医学院动物室提供。硫酸镍 (NiSO₄): 西安化学试剂厂。日立低温高速冷冻离心机。754 型紫外可见分光光度计, 上海第三分析仪器厂。

1.2 剂量选择和分组 染毒剂量的选择参考小鼠腹腔注射 LD₅₀=(40±0.56) mg/kg 进行。40 只小鼠随机分为 4 组: 生理盐水 (NS) 组, 硫酸镍 (NiSO₄) 0.2 mg/kg、0.4 mg/kg、0.8 mg/kg 组。

1.3 脑内微量注射染毒^[7] 将小鼠脑位固定, 酒精消毒。用 50 μl 微量注射器在小鼠两耳连接线与前眼连续线之间, 在稍偏离正中线的头盖骨部位上, 将注射针垂直刺入 0.5 cm, 各组小鼠一次性缓慢注射 10 μl 只染毒。

1.4 细胞膜的制备和 ATP_{ase}活性的测定 于染毒后 5 小时摘眼球采血, 用低渗溶血法制取红细胞膜, 并计数红细胞数。用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒检测 ATP 酶活性,

酶活性以每 10⁷ 个红细胞中 ATP_{ase} 每小时水解 ATP 所产生的磷 (Pi) 的量 (μmol) 表示。

2 结果

表 1 硫酸镍对小鼠红细胞膜 ATP_{ase}活性的影响

组别	动物数	剂量 (mg/kg)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP _{ase} [μmolPi/(10 ⁷ RBC·h)]	Ca ²⁺ -ATP _{ase} [μmolPi/(10 ⁷ RBC·h)]
NS	10	4.5	133.20±23.62	170.25±19.69
NiSO ₄	10	0.2	121.75±29.33	131.79±18.30**
NiSO ₄	10	0.4	104.56±14.41**	89.73±10.88**
NiSO ₄	10	0.8	55.58±4.83**	46.80±4.54**

**与 NS 组比较 P<0.01。

由表 1 可见, 硫酸镍可明显抑制外周血红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP_{ase}、Ca²⁺-ATP_{ase}活性, 尤以大剂量最显著, 并呈剂量-效应关系。

3 讨论

本研究结果表明, 硫酸镍小鼠脑内微量注射染毒后, 可明显抑制外周血红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP_{ase}、Ca²⁺-ATP_{ase}活性。提示, 镍可透过血脑屏障放入外周血液, 引起红细胞的损伤, 其机制可能与其抑制细胞膜 ATP_{ase}活性有关。

Na⁺-K⁺-ATP_{ase}是由 α、β 两个亚单位组成的跨膜蛋白, 广泛存在于机体细胞膜上, 主要功能是水解 ATP 产生能量, 驱动细胞内外 Na⁺、K⁺的主动转运, 调节细胞渗透压等方面起重要作用^[8]。Ni²⁺进入体内, 可能产生自由基^[9], 引起膜脂质过氧化, 产生膜结构的改变; 也可能是与酶的功能位结合, 抑制 Na⁺-K⁺-ATP_{ase}活性。Ca²⁺-ATP_{ase}也是细胞膜上的跨膜蛋白, 在维持细胞钙稳态方面起重要功能。据报道^[10], 离子半径与 Ca²⁺相近, 外层电子结构能满足 Ca²⁺结合区配位键的金属离子, 能替代 Ca²⁺而抑制 Ca²⁺-ATP_{ase}。Ni²⁺为二价金属离子, 在体内可与细胞膜上的 Ca²⁺竞争钙通道而抑制 Ca²⁺-ATP_{ase}活性, 导致细胞内 Ca²⁺浓度持续升高, 引起钙稳态失调而致细胞损伤^[11]。因此, 硫酸镍的细胞毒作用可能与其抑制细胞膜酶的功能有关。有研究表明, 镍与细胞膜能够牢固结合^[12], 这种结合则会破坏细胞膜的稳定性。因而本文推测, 镍化合物可能是通过改变膜结构而影响膜酶活性; 也可能是直接作用于膜酶而影响其活性, 从而引起细胞的损伤, 其详细机制还有待于进一步的研究。

本研究采用脑内微量注射硫酸镍染毒, 探讨镍对红细胞的损伤, 属于镍致中枢神经系统毒性及其机理系列研究之一。中枢神经细胞是机体细胞中对缺氧最敏感的细胞, 镍导致红

收稿日期: 2002-03-26; 修回日期: 2002-05-08

作者简介: 孙应彪 (1967-), 男, 甘肃人, 硕士, 副教授, 主要从事重金属毒理学研究。

细胞损伤, 可使其携氧或供氧能力下降, 从而使中枢神经细胞缺氧, 间接引起神经细胞的损伤。

参考文献:

[1] Nieboer E. Nickel and human health: current perspectives [M]. A wiley interscience publication. 1992. 37.

[2] 王箴兰, 刚葆琪. 现代劳动卫生学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 534.

[3] 袁宝珊, 梁超珂. 环境污染物致癌致畸致突变 [M]. 兰州: 兰州大学出版社, 1995. 25.

[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.

[5] 孙应彪, 朱玉真. 硫酸镍对小鼠脑组织钙调素、ATP 酶活性的影响 [J]. 中国公共卫生, 2000, 16 (12): 1101.

[6] 朱俐冰, 朱玉真. 硫酸镍对小鼠脑组织单胺类神经递质的影响 [J]. 中国职业医学, 2001, 27 (6): 56.

[7] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 135.

[8] 杨抚华. 医学细胞生物学概论 [M]. 第3版. 成都: 四川科学技术出版社, 1996. 72.

[9] 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, 1990, 64 (1): 1.

[10] Chao Sheng-Hao, YasuhiRo Suzuki, John R ZYSK, et al. Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius [J]. Mol Pharmacol, 1984, 26 (1): 75.

[11] 姜悦, 谭炳德, 董秀清. 镉致肾小管细胞膜 $N_a^+-K^+$ -ATP 酶与钙稳态的变化 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1995, 13 (3): 199.

[12] 罗圣庆. $NiCl_2$ 处理的大鼠脂质过氧化作用增强 [J]. 国外医学卫生学分册, 1986, 13 (4): 243.

低浓度苯对大鼠 T 细胞亚群的影响

Effect of low level benzene exposure on T-lymphocyte subpopulation of rats

李 华¹, 刘 欧¹, 于文杰¹, 李雪欣¹, 苏树祥²

LI Hua¹, LIU Ou¹, YUN Wen-jie¹, LI Xue-xin¹, SU Shu-xiang²

(1. 北京燕山石化公司职工医院, 北京 102500; 2. 北京燕山石化公司职业病防治研究中心, 北京 102500)

摘要: 目的 探讨低浓度苯对大鼠 T 淋巴细胞亚群和 γ -干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素-4 (IL-4) 的影响。方法 把 Wistar 大鼠随机分为 4 组: 20 mg/m³、30 mg/m³、40 mg/m³ 染毒组和对照组, 每组 30 只, 雌雄各半。采用静式吸入染毒法, 每天 1 次, 每次 2 小时, 每周连染 5 天, 持续 1 至 3 个月。结果 与对照组比较, 染毒早期, 使 CD₃⁺、CD₄⁺、IFN- γ 、IL-4 增加, 之后, 出现 CD₃⁺、CD₄⁺ 减少。结论 较长期低浓度接苯 (30~40 mg/m³) 可能会引起外周血象 T 淋巴细胞亚群及功能上的改变。

关键词: 苯; 大鼠; T 淋巴细胞亚群; γ -干扰素; 白细胞介素-4

中图分类号: R135. 12 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2002)06-0356-02

研究证明, 苯可抑制机体的免疫功能^[1-3]。随着科技发展及生产工艺改革, 职业性苯接触的浓度已大大降低, 因而急性中毒和症状明显的慢性中毒已较少见, 而低浓度苯接触所致的亚临床危害日益受到重视。为了进一步探讨低浓度苯对 T 淋巴细胞亚群和 IFN- γ 、IL-4 的影响, 并为健康监护提供线索, 特进行了此次实验研究。

1 材料与与方法

收稿日期: 2002-06-24; 修回日期: 2002-08-07

作者简介: 李华 (1965-), 女, 辽宁沈阳人, 副主任检验师, 从事医学检验工作

1.1 材料 苯 (优级纯) 由北京双环化学试剂厂出品, 含量 > 99.7%。实验动物 Wistar 大鼠 (二级) 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。IFN- γ 和 IL-4 试剂由法国 Diadone 公司生产的大鼠 IFN- γ 、IL-4 专用 ELISA 试剂盒。T 淋巴细胞亚群检测试剂: T 淋巴细胞亚群单抗由卫生部武汉生物制品研究所提供; RPMI-1640 为 Serva 公司生产。检测仪器为伯乐 450 酶标仪。

1.2 染毒方法 将 120 只体质量 120~160 g 大鼠随机分为 4 组: 苯浓度 20 mg/m³、30 mg/m³、40 mg/m³ 染毒组和对照组, 每组 30 只, 雌雄各半。染毒方法: 在静式染毒柜中, 采用静式吸入染毒法, 每天染毒 1 次, 每次染毒 2 小时, 每周连续 5 天, 持续 1 至 3 个月。于开始染毒后 1 个月、2 个月、3 个月时, 分 3 批各组处死 10 只动物, 检测各项指标。染毒柜内苯浓度用气相色谱法测定。

1.3 观察指标和方法 IFN- γ 、IL-4 实验步骤: 加 100 μ l 标准液 (标准液浓度 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μ g/ml) 或样本于实验孔内, 加 50 μ l 生物素标记的抗 IFN- γ 或抗 IL-4 室温下 (18~25 $^{\circ}$ C) 孵育 2 h, 洗涤后, 加 100 μ l HRP, 室温下孵育 0.5 h, 洗涤, 加 100 μ l TMB, 室温下孵育 12~15 min, 用伯乐 450, 450 nm 波长读取 OD 值。结果分析: 制作一条标准曲线, 平均光吸收值作 Y 轴, 对应的 IFN- γ 和 IL-4 浓度作 X 轴, 各样本中的 IFN- γ 和 IL-4 含量通过标准曲线上样本 OD 值确定。T 淋巴细胞亚群测定: 分离淋巴细胞, 参照侯林浦等^[4]方法, 将分离获得的淋巴细胞用 Hank's 液调至 $5 \times 10^6/ml$, 37 $^{\circ}$ C