

几种螯合剂解镍致小鼠胰脏毒作用比较

谢吉民* 朱卫华 高晓钦

(镇江医学院, 镇江 212001)

R979.3

小鼠腹腔注射氯化镍溶液(5 mg Ni/kg)染毒, 观察了 N-苯甲基-D-葡糖氨基二硫代甲酸钠(BGD)、二乙氨基二硫代甲酸钠(DDTC)、二羟乙氨基二硫代甲酸钠(DHED)及 *meso*-2,3-二巯基丁二酸钠(DMSA)等螯合剂对镍致小鼠胰脏毒性的解毒作用。镍染毒后引起小鼠胰脏胰蛋白酶活性升高和羧肽酶 A 活性降低以及组织中镍、钙、锌浓度增加; 镍染毒30 min 和24 h 后进行各螯合剂治疗(剂量均为400 $\mu\text{mol/kg}$), BGD、DDTC 和 DMSA 可明显抑制上述变化, 其中 BGD 解镍毒效果最好、自身毒性最小、对镍致小鼠胰脏毒性有更好的解毒作用。

DHED

DDTC

BGD

关键词: 氯化镍 螯合剂 胰脏 解毒作用

镍毒

人们早已认识到镍及其化合物的毒性^[1,2], 但是对镍中毒的防治措施尚不理想。我们近几年研究发现2,3-二巯基丁二酸钠(DMSA)及新型螯合剂 N-苯甲基-D-葡糖氨基二硫代甲酸钠(BGD)对组织中蓄积的镍有明显促进排泄作用^[3], 并对镍引起的动物睾丸毒性、肺脏毒性及肝脏毒性等有明显解毒作用^[4~7], 我们继续观察了这两种螯合剂对镍引起小鼠胰脏毒性的解毒作用, 并与其它两种螯合剂: 二乙氨基二硫代甲酸钠(DDTC)、二羟乙氨基二硫代甲酸钠(DHED)的解毒作用进行了比较。

1 实验部分

1.1 试剂

氯化镍($\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, G. R.), 日本 Nacalai Tesque 公司; BGD 及 DHED, 按文献[3]自制; DMSA 及 DDTC, 日本同仁化学公司; 胰蛋白酶活性测定用基质 Bz-Arg-MCA, 由日本蛋白质研究奖励会提供; 羧肽酶 A 活性测定用基质 Z-Gly-Phe, 由日本核酸研究所提供; 胰蛋白酶及羧肽酶 A 标准品, 美国 Sigma 公司; 其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器

UV-150-02分光光度计, 日本岛津公司; Z-8000型原子吸收分光光度计, 日本日立公司; Optima TL 型冷冻离心机, Beckman 公司; F-4010型荧光分光光度计, 日本日立公司。

1.3 试剂预处理

注射用氯化镍在临用前用生理盐水配成0.5 mg/ml Ni 溶液; DMSA 溶于0.2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液(与 NaOH 的摩尔比为1:2), BGD, DDTC 及 DHED 均用生理盐水溶解并调至

收稿日期: 1998-07-23。 收修改稿日期: 1998-09-01。

卫生部优秀青年科技人才专项科研基金及江苏省教委自然科学基金资助项目。

* 通讯联系人。

第一作者: 谢吉民, 男, 40岁, 副教授; 研究方向: 重金属毒性及其解毒。

pH7.0,各溶液在临用前用生理盐水配成 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。所有溶液在注射前均经微孔滤膜抽滤除菌。

1.4 动物处理

体重22~25 g的健康昆明种雄性小鼠(镇江医学院实验动物中心提供),随机分为10组:镍染毒组(Ni组)、BGD治疗组(BGD组)、DDTC治疗组(DDTC组)、DHED治疗组(DHED组)、DMSA治疗组(DMSA组)、生理盐水对照组(control)、BGD对照组、DDTC对照组、DHED对照组及DMSA对照组;镍染毒剂量及各螯合剂用量选择见文献[4]。镍染毒组及各治疗组腹腔注射氯化镍溶液(5 mg Ni/kg),各对照组同时注射生理盐水。将动物分成两批,一批在染镍后30 min、各治疗组及螯合剂对照组分别腹腔注射相应的螯合剂溶液($400\text{ }\mu\text{mol/kg}$);生理盐水对照组及镍染毒组分别注射生理盐水(10 ml/kg),经24 h处死全部小鼠;另一批在染镍后24 h注射各螯合剂和生理盐水,再经24 h处死全部小鼠。动物处死后,迅速摘出胰脏、称重。部分胰脏用 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ 湿法消化后,测定镍、钙、铁、铜、锌等金属浓度;另一部分胰脏用于其它有关指标测定。

1.5 各项指标的测定

各金属浓度测定采用原子吸收分光光度法;胰蛋白酶活性测定采用荧光分光光度法^[8];羧肽酶A活性测定按文献[9]进行;蛋白质浓度测定采用Lowry法^[10];各组数据最 $\bar{X}\pm\text{S.D.}$,显著性测定采用Duncan氏检验。

2 结果与讨论

2.1 染镍后各螯合剂对小鼠胰脏中各金属浓度的影响

由表1见,镍染毒24 h后,小鼠胰脏中镍浓度明显升高,钙和锌浓度也比对照组明显增加,铁和铜浓度无明显影响;染镍30 min后分别腹腔注射各螯合剂溶液,24 h后BGD、DMSA及DDTC明显降低了胰脏中镍浓度升高的幅度,同时也降低了由镍引起的钙和锌浓度增加的幅度,而单独注射这几种螯合剂对小鼠胰脏中必需金属浓度无明显影响(结果未列入)。染镍48 h后,小鼠胰脏中各金属浓度变化与染镍24 h组相似,但镍浓度比24 h组的低,表明镍在胰脏中的半衰期相对较短。镍染毒24 h后分别腹腔注射各螯合剂溶液,BGD、DMSA及DDTC同样降低了胰脏中镍、钙和锌浓度增加的幅度,其中以BGD效果最明显。DHED虽有降低胰脏中镍、钙和锌浓度增加的趋势,但与染毒组比较无显著差异。

组织损伤时往往会引起组织钙浓度升高,我们以前的工作发现镍可引起肝脏、肺脏及睾丸钙浓度的升高^[4~6],本实验结果得到镍也引起了胰脏钙浓度升高,提示镍也可能引起胰脏组织损伤,使细胞外钙离子内流。至于镍引起胰脏铁和锌浓度升高的确切原因尚不完全清楚,可能是高浓度的镍引起胰脏损伤后,破坏了这些元素的体内平衡机制所致。本实验未见DHED对镍引起的金属浓度变化有明显影响。

表1 染镍后各螯合剂对小鼠胰脏中各金属浓度的影响

Table 1 Effects of Chelating Agents on the Concentration of Ni and Essential Metals in Pancreas of Mice after Ni Administration

treatment	Ni	Ca	Zn	Fe	Cu
			($\mu\text{g/g wet tissue}$)		
24 h after Ni *					
control	n. d.	64.44 $\pm$ 5.59	29.78 $\pm$ 1.85	10.11 $\pm$ 1.21	1.01 $\pm$ 0.10
Ni group	1.35 $\pm$ 0.28	98.52 $\pm$ 9.22 ^{a)}	40.27 $\pm$ 3.77 ^{a)}	9.94 $\pm$ 1.69	1.05 $\pm$ 0.01
Ni+BGD group	0.40 $\pm$ 0.16 ^{b)}	72.73 $\pm$ 2.83 ^{b)}	31.94 $\pm$ 2.89 ^{b)}	11.34 $\pm$ 1.05	0.96 $\pm$ 0.12
Ni+DMSA group	0.52 $\pm$ 0.20 ^{b)}	66.51 $\pm$ 6.32 ^{b)}	31.54 $\pm$ 2.78 ^{b)}	10.76 $\pm$ 0.89	1.04 $\pm$ 0.08
Ni+DDTC group	0.66 $\pm$ 0.12 ^{b)}	70.51 $\pm$ 6.72 ^{b)}	32.08 $\pm$ 0.85 ^{b)}	11.11 $\pm$ 1.13	1.07 $\pm$ 0.09
Ni+DHED group	1.06 $\pm$ 0.22	85.51 $\pm$ 8.58	35.19 $\pm$ 2.44	9.66 $\pm$ 0.58	1.04 $\pm$ 0.04
48 h after Ni * *					
control	n. d.	68.88 $\pm$ 6.15	29.37 $\pm$ 2.22	11.06 $\pm$ 1.59	1.04 $\pm$ 0.10
Ni group	0.80 $\pm$ 0.16	92.20 $\pm$ 3.09 ^{a)}	38.06 $\pm$ 1.36 ^{a)}	9.82 $\pm$ 1.04	1.06 $\pm$ 0.03
Ni+BGD group	0.21 $\pm$ 0.11 ^{b)}	68.69 $\pm$ 2.61 ^{b)}	30.97 $\pm$ 2.21 ^{b)}	10.76 $\pm$ 1.80	0.96 $\pm$ 0.05
Ni+DMSA group	0.26 $\pm$ 0.10 ^{b)}	70.51 $\pm$ 8.58 ^{b)}	32.08 $\pm$ 0.78 ^{b)}	11.00 $\pm$ 0.99	1.07 $\pm$ 0.09
Ni+DDTC group	0.48 $\pm$ 0.12 ^{b)}	69.68 $\pm$ 6.44 ^{b)}	35.22 $\pm$ 0.85 ^{b)}	10.24 $\pm$ 1.13	1.05 $\pm$ 0.07
Ni+DHED group	0.69 $\pm$ 0.22	87.76 $\pm$ 4.35	36.19 $\pm$ 2.44	9.66 $\pm$ 0.58	1.08 $\pm$ 0.06

* Animals were treated with chelating agents 30 min after exposure to Ni and killed 24 h after exposure.

* * Animals were treated with chelating agents 24 h after exposure to Ni and killed 48 h after exposure.

n. d. means not detected, n=6; ^{a)}P<0.01 vs control; ^{b)}P<0.05 vs Ni group.

2.2 镍染毒后各螯合剂对小鼠胰脏蛋白酶及羧肽酶 A 活性的影响

由表2见,镍染毒24 h及48 h后,小鼠胰脏胰蛋白酶活性均明显升高,而羧肽酶 A 活性均明显降低;染镍30 min或24 h后分别腹腔注射各螯合剂,BGD、DDTC及DMSA均明显抑制了这两种酶活性的变化。未染镍单独注射各螯合剂对这两种酶活性均无明显影响(结果未列入)。虽然染镍30 min后注射DHED部分抑制了镍引起的胰蛋白酶活性变化,但对羧肽酶 A 活性及染镍24 h后注射DHED对两种酶活性变化均无明显抑制作用。

胰脏内合成的胰蛋白酶原需在肠道内激活后才能变成胰蛋白酶,但在急性胰腺炎等病理状态时胰蛋白酶原可在胰脏内直接被激活。有资料表明,在钙离子存在下,胰蛋白酶原可被激活成胰蛋白酶^[11]。本实验中镍引起了胰脏钙浓度的明显升高,提示胰蛋白酶活性的增加可能是胰脏内钙浓度升高所致。

羧肽酶 A 为含锌酶,其活性中心的锌离子可被其它金属离子取代而失活。本实验结果得到的镍引起了胰脏内羧肽酶 A 活性降低,提示胰脏内大量的镍离子可能取代了羧肽酶 A 中的锌离子而使其失活。

表2 镍染毒后各螯合剂对小鼠胰脏蛋白酶及羧肽酶 A 活性的影响
Table 2 Effects of Chelating Agents on the Activity of Trypsin and Carboxypeptidase
A of Mice after Ni Administration

treatment	trypsin ($\times 10^6 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$)		carboxypeptidase A ($\times 10^2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$)	
	24 h after Ni [*]	48 h after Ni ^{**}	24 h after Ni [*]	48 h after Ni ^{**}
control	3.73 $\pm$ 0.42	3.75 $\pm$ 0.38	4.08 $\pm$ 0.38	4.11 $\pm$ 0.32
Ni group	5.40 $\pm$ 0.49 ^{a)}	5.46 $\pm$ 0.66 ^{a)}	2.90 $\pm$ 0.30 ^{a)}	2.31 $\pm$ 0.37 ^{a)}
Ni+BGD group	3.59 $\pm$ 0.22 ^{b)}	3.78 $\pm$ 0.40 ^{b)}	4.12 $\pm$ 0.42 ^{b)}	3.92 $\pm$ 0.28 ^{b)}
Ni+DMSA group	3.79 $\pm$ 0.31 ^{b)}	3.92 $\pm$ 0.48 ^{b)}	4.25 $\pm$ 0.59 ^{b)}	3.36 $\pm$ 0.24 ^{b)}
Ni+DDTC group	3.92 $\pm$ 0.46 ^{b)}	3.95 $\pm$ 0.44 ^{b)}	3.68 $\pm$ 0.38 ^{b)}	3.21 $\pm$ 0.19 ^{b)}
Ni+DHED group	4.63 $\pm$ 0.38 ^{b)}	4.92 $\pm$ 0.39	3.40 $\pm$ 0.38	2.81 $\pm$ 0.22

^{*} Animals were treated with chelating agents 30 min after exposure to Ni and killed 24 h after exposure.

^{**} Animals were treated with chelating agents 24 h after exposure to Ni and killed 48 h exposure.

n=6, ^{a)}P<0.01 vs control; ^{b)}P<0.05 vs Ni group.

目前临床上常用的镍解毒剂有 EDTA 和 DDTC,但因 EDTA 易与体内钙、镁、锌、铜等必需金属元素结合而产生毒副作用。在本实验条件下,BGD、DDTC 及 DMSA 均能有效地抑制镍染毒引起的小鼠胰脏胰蛋白酶活性、羧肽酶 A 活性以及组织中金属浓度的变化,但 DDTC 可导致脑内镍浓度增加^[4],具有明显的神经毒性。已知 DMSA 在临床上已作为镉和铜等重金属的解毒剂,我们在以前的工作中发现 DMSA 可增加镍从尿中排泄,降低组织镍浓度^[4],本实验也得到 DMSA 具有一定的解镍引起的胰脏毒作用,但其解毒效果不如 BGD。

有人报道 DHED 可有效地排出肝脏及肾脏中的镉,具有明显的解镉引起的组织毒作用,但同时导致脑内镉的重新分布^[12]。我们在以前的工作中发现,DHED 虽能增加镍从粪便排泄,部分降低肝脏和肾脏等组织的镍浓度,但同时也导致脑内镍浓度增加^[3~7]。虽然染镍 30 min 后注射 DHED 部分抑制了胰蛋白酶活性变化,但对镍引起的其它各项指标的变化均无明显抑制作用。

Ni²⁺ 与蛋白质等生物大分子结合后可在体内蓄积。BGD、DDTC、DHED 及 DMSA 分子结构中均含有巯基(-SH),与 Ni²⁺ 都可形成 2:1 的螯合物,但其稳定性、水溶性及通过细胞膜的能力差异很大,因而在体内的半衰期、代谢及排泄途径等也有所不同^[3~5]。BGD、DDTC 与 DHED 与 Ni²⁺ 形成亲脂性较强的螯合物,主要经胆汁从粪便排出;而 DMSA 与 Ni²⁺ 形成亲水性较强的螯合物,主要经肾脏从尿液排出^[3]。虽然 BGD、DDTC 及 DHED 与 Ni²⁺ 均形成亲脂性螯合物,但却未见 BGD 引起镍在脑内重新分布,这可能是 BGD 的分子量大于 DDTC 及 DHED,BGD 与 Ni²⁺ 所形成的镍配合物因位阻效应,其通过血脑屏障的能力相对较差所致。

业已测出 BGD、DDTC、DHED 及 DMSA 的 LD₅₀ 值分别为^[4]:4.32、0.15、1.40 及 2.95 g/kg。表明 BGD 的自身毒性在所试螯合剂中最小。因此,BGD 有望成为镍中毒的有效解毒剂。

参 考 文 献

- [1] Coogan, T. P.; Latta, D. M.; Sano, E. T. et al *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 1989, 19, 341.
- [2] 刚保琪、那常筠、陈力等, 中华劳动卫生职业病杂志, 1994, 12, 8.
- [3] Xie, J. M.; Funakoshi, T.; Shimada, H. et al *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 1994, 86, 245.
- [4] Xie, J. M.; Funakoshi, T.; Shimada, H. et al *Toxicology*, 1995, 103, 147.
- [5] Xie, J. M.; Funakoshi, T.; Shimada, H. et al *J. Appl. Toxicol.*, 1996, 16, 317.
- [6] 谢吉民、船越崇行、儿岛昭次, 无机化学学报, 1997, 13, 216.
- [7] 谢吉民、船越崇行、胡继岳等, 中华劳动卫生职业病杂志, 1997, 15, 325.
- [8] Morita, T. et al *J. Biochem.*, 1977, 82, 1945.
- [9] Lee, Y. P.; Takahashi, T. *Anal. Biochem.*, 1966, 14, 71.
- [10] Lowry, O. H. et al *J. Biol. Chem.*, 1952, 193, 265.
- [11] 伊藤信也、和田达雄, 生理解剖学, 东京: 广川书店, 1988, 第139~141页.
- [12] Gale, G. R.; Atkins, L. W.; Walker, E. M., et al *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1983, 13, 444.

COMPARATIVE EFFECTS OF CHELATING AGENTS ON PANCREATIC TOXICITY IN MICE CAUSED BY NICKEL

Xie Jimin* Zhu Weihua Gao Xiaoqin
(Zhenjiang Medical College, Zhenjiang 212001)

N-Benzyl-D-glucaminedithiocarbamate (BGD), diethyldithiocarbamate (DDTC), dihydroxyethylthiocarbamate (DHED) and *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) were studied for their protective effects against the pancreatic toxicity in mice induced by acute exposure to nickel (Ni). Mice were injected intraperitoneally with NiCl_2 (5 mg Ni/kg) and 30 min or 24 h later, they were injected intraperitoneally with chelating agents (400 $\mu\text{mol/kg}$). Ni injection significantly increased the activity of trypsin and the concentrations of nickel, calcium and zinc, decreased the activity of carboxypeptidase A in mice pancreas. BGD, DDTC and DMSA significantly prevented those changes caused by Ni injection. The results suggested that BGD was not only more effective chelating agent in protecting the pancreas against toxicity induced by Ni, but also less toxic.

Keywords: nickel chloride chelating agent pancreas detoxification