

几种螯合剂对锰致小鼠肺脏和睾丸毒性的解毒作用比较

荆俊杰, 谢吉民, 陈敏, 陆晓菁, 吴云龙

摘要: [目的] 寻找理想的锰中毒解毒剂。[方法] 小鼠一次性腹腔注射 MnCl_2 (100 mg MnCl_2/kg) 24 h 后分别给予 L-组氨酸(L-His)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙基二硫代氨基甲酸(DDTC)、meso-2, 3-二巯基丁二酸(DMSA)及 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)等五种螯合剂(2 mmol/kg, 腹腔注射), 观察小鼠肺脏、睾丸脂质过氧化物值(LPO)和组织中锰、钙、锌浓度的变化。[结果] 小鼠一次性腹腔注射 MnCl_2 (100 mg MnCl_2/kg) 2 d 后, 小鼠肺脏和睾丸中 LPO 值分别为 (2.42 ± 0.29) 和 $(2.74 \pm 0.33) \mu\text{mol/g} \cdot \text{prot}$, 锰浓度分别为 (2.60 ± 0.33) 和 $(2.41 \pm 0.68) \mu\text{g/g}$, 均明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。分别染锰 24 h 后腹腔注射各螯合剂, 治疗 24 h 后 L-His 对锰引起的肺脏、睾丸 LPO 值和锰浓度的升高有显著的抑制作用。[结论] L-His 对锰致小鼠肺脏和睾丸毒性有较好的解毒作用, 且自身毒性小, 有望成为理想的锰解毒剂。

关键词: 锰; 螯合剂; 肺; 睾丸; 解毒作用

Comparison on Antidotal Effects of Chelating Agents on Lung and Testicular Toxicity in Mice Induced by Acute Exposure to Manganese JING Jun-jie, XIE Ji-min, CHEN Min, LU Xiao-jing, WU Yuan-long (School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China). Address correspondence to XIE Ji-min, E-mail: xiejm391@yahoo.com.cn

Abstract: [Objective] To develop new antidotes of manganese (Mn). [Methods] Mice were injected intraperitoneally with MnCl_2 (100 mg MnCl_2/kg) 24 h before they were injected intraperitoneally with chelating agents, including L-Histidine (L-His), ethylene diaminetetraacetic acid(EDTA), Diethyldithiocarbamate (DDTC), meso-2, 3-dimercapto succinic acid (DMSA) and N-acetylcysteine (NAC). The effects of those chelating agents on lipid peroxidation (LPO) and concentrations of Mn, Ca, Zn in lung were observed. [Results] The Mn injection significantly increased the LPO levels (2.42 ± 0.29) and $(2.74 \pm 0.33) \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{prot})$ respectively as well as the concentrations of Mn (2.60 ± 0.33) and $(2.41 \pm 0.68) \mu\text{g/g}$ wet tissue respectively in lung and testes of mice ($P < 0.05$) in 2 days. L-His effectively prevented the increases of above indices. [Conclusion] L-His is more effective than the other chelating agents in preventing changes caused by acute exposure to Mn. L-His is a promising antidote to Mn.

Key Words: manganese; chelating agents; lung; testes; detoxication model

锰是人及动植物所必需的微量元素之一, 但摄入过量的锰则会对人和动物多种器官产生危害^[1,2]。长期接触锰会对人体的生殖和肺脏功能产生损害作用^[3,4]。当今, 随着锰的大量使用, 特别是使用甲基环戊二烯三羰基锰(MMT)替代四乙基铅作为汽油的抗爆剂后, 锰正以前所未有的速度扩散到了环境中^[1], 对人体健康造成的威胁日趋严重。使用解毒剂驱排体内蓄积的锰, 是防治锰中毒的根本措施之一, 但目前临床上用的锰解毒剂由于毒副作用较大, 因而都不够理想。本课题组以前的工作发现, 锰对小鼠肺脏和睾丸有较大毒性^[1]。本研究拟通过比较内源性物质螯合剂 L-组氨酸(L-His)与现有人工合成的螯合剂乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙基二硫代氨基甲酸(DDTC)、meso-2, 3-二巯基丁二酸(DMSA)、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)对锰引起小鼠肺脏和睾丸毒性的解毒作用, 为开发解锰中毒的高效低毒新型解毒剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

电感耦合等离子体-原子发射光谱法(ICP-OES)等离子发射光谱仪(美国瓦里安公司); UV-2450型紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, AR)(国药集团化学试剂有限公司); L-组氨酸(L-His)(国药集团化学试剂有限公司); 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)(长沙市有机试剂厂); 二乙基二硫代氨基甲酸(DDTC)(国药集团化学试剂有限公司); meso-2, 3-二巯基丁二酸(DMSA)(美国 Sigma-Aldrich 公司); N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)(国药集团化学试剂有限公司)。其他试剂均为国产分析纯, 所用试剂均以重蒸水配制。

1.2 动物处理

健康昆明种雄性小鼠, 共 42 只, 体重 25~30 g(江苏大学实验动物中心提供)。随机分为 7 组, 每组 6 只: 生理盐水对照组(Control)、锰染毒组(Mn)、L-His 治疗组(Mn+L-His)、EDTA

[基金项目] 2010 年度江苏省基础 Research 计划项目(编号: BK2010144); 镇江市科技发展计划(社会发展)项目(编号: SH2010025)

[作者简介] 荆俊杰(1975—), 男, 博士生; 研究方向: 环境毒理学; E-mail: jingj1975@163.com

[通信作者] 谢吉民教授, E-mail: xiejm391@yahoo.com.cn

[作者单位] 江苏大学化学化工学院, 江苏 镇江 212013

治疗组 (Mn+EDTA)、DDTC 治疗组 (Mn+DDTC)、DMSA 治疗组 (Mn+DMSA)、NAC 治疗组 (Mn+NAC)。对照组小鼠腹腔注射生理盐水 100 mg/kg, 锰染毒组及各治疗组小鼠腹腔注射 MnCl₂/L 溶液 (100 mg/kg), 各组于染锰 24 h 后分别给各治疗组腹腔注射相应螯合物 (均为 2 mmol/kg: L-His 治疗组为 310 mg/kg、EDTA 治疗组为 745 mg/kg、DDTC 治疗组为 450 mg/kg、DMSA 治疗组为 364 mg/kg、NAC 治疗组为 326 mg/kg), 对照组及锰染毒组分别腹腔注射生理盐水。各组均于螯合剂治疗 24 h 后, 处死小鼠, 摘取肺脏和睾丸, 称重。部分肺脏和睾丸用于 LPO 测定, 其余部分经 HNO₃-HClO₄ 湿法消化后, 测定锰、钙、锌的浓度^[5]。

1.3 指标测定

各金属浓度测定采用等离子发射光谱法。LPO 测定采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法^[6], 以 1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷 (TEP) 为标准, 单位以生成丙二醛 (MDA) 的 nmol 数表示, 丙二醛 (MDA) 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.4 数据处理

实验数据均以 “ $\bar{x} \pm s$ ” 表示, 用 SPSS 13.0 统计软件进行数据的录入和处理。各组均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用最小显著差法 (least significant difference, LSD)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 锰染毒后各螯合剂对小鼠肺脏和睾丸 LPO 值的影响

表 1 显示, 染锰后小鼠肺脏和睾丸 LPO 值均有明显的升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。染锰 (100 mg/kg) 24 h 后分别腹腔注射各螯合剂治疗 (2 mmol/kg), 24 h 后, L-His 明显抑制了肺脏和睾丸 LPO 值的升高, EDTA、DDTC、DMSA 和 NAC 虽有降低肺脏和睾丸 LPO 值的趋势, 但与染毒组比较无显著性差异。

表 1 锰染毒后各螯合剂对小鼠肺脏和睾丸 LPO 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	LPO (nmol 丙二醛/mg 蛋白质)	
	肺	睾丸
对照组	1.85 ± 0.50	1.65 ± 0.22
Mn	2.42 ± 0.29*	2.74 ± 0.33*
Mn+L-His	1.91 ± 0.21#	2.12 ± 0.29**
Mn+EDTA	2.39 ± 0.23*	2.70 ± 0.31*
Mn+DDTC	2.44 ± 0.15*	2.65 ± 0.28*
Mn+DMSA	2.27 ± 0.29*	2.53 ± 0.31*
Mn+NAC	2.34 ± 0.22*	2.35 ± 0.23*

[注]*: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与染锰组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各螯合剂对染锰小鼠肺脏和睾丸中锰、钙、锌浓度的影响

由表 2 可见, 染锰组小鼠肺脏和睾丸中锰、钙含量明显高于对照组, 而锌含量明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。染锰 (100 mg/kg) 24 h 后分别腹腔注射各螯合剂治疗 (2 mmol/kg), 24 h 后, L-His 治疗组均明显降低了肺脏和睾丸中锰的浓度, 并抑制染锰引起的组织中钙浓度增加和锌浓度的降低; 其它各螯合剂对染锰引起的肺脏和睾丸中锰、钙浓度增

加和锌浓度的降低虽然也有一定的抑制作用, 但与染毒组比较无显著性差异, 其中 DDTC 还引起了肺脏中锰含量的升高。

表 2 锰染毒后各螯合剂对小鼠肺脏和睾丸中 Mn、Ca、Zn 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	湿组织 (μg/g)		
	Mn	Ca	Zn
肺 对照组	0.66 ± 0.13	54.81 ± 6.49	19.33 ± 1.04
Mn	2.60 ± 0.33*	80.14 ± 12.21*	17.40 ± 1.51*
Mn+L-His	1.65 ± 0.59**	63.46 ± 9.13**	18.39 ± 1.01*
Mn+EDTA	2.56 ± 0.27*	74.87 ± 535*	16.98 ± 1.10*
Mn+DDTC	2.90 ± 0.51*	75.96 ± 6.33*	16.88 ± 1.32*
Mn+DMSA	2.53 ± 0.80*	71.97 ± 3.93*	17.64 ± 1.72
Mn+NAC	2.45 ± 0.27**	70.87 ± 4.01*	17.66 ± 1.40
睾丸 对照组	0.79 ± 0.10	24.08 ± 4.79	19.70 ± 2.10
Mn	2.41 ± 0.68*	61.28 ± 8.68*	16.54 ± 1.27*
Mn+L-His	1.70 ± 0.47**	48.98 ± 5.12**	18.65 ± 1.87*
Mn+EDTA	2.34 ± 0.51*	58.57 ± 5.46*	17.03 ± 1.37
Mn+DDTC	2.24 ± 0.47*	57.47 ± 6.40*	17.29 ± 0.75
Mn+DMSA	2.20 ± 0.45*	56.84 ± 5.71*	17.70 ± 1.56
Mn+NAC	2.10 ± 0.18**	54.89 ± 6.10*	17.70 ± 1.90

[注]*: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与染锰组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

锰是一种很强的脂质过氧化诱导剂, 一定剂量的锰可引起细胞膜的脂质过氧化, 造成膜结构的破坏, 进一步引起组织损伤^[1-2]; 所以小鼠有关脏器 LPO 值的高低可反映相应脏器受损程度的大小^[7]; 钙、锌等必需微量元素在体内具有重要的生理作用, 许多疾病均表现有上述金属浓度异常^[7]。因此, 螯合剂对上述各指标抑制作用和对肺脏、睾丸中锰的驱排及对染锰引起的钙、锌浓度改变的抑制作用大小可反映其解毒效果的高低。

本研究首次使用 L-His 作为锰中毒的解毒剂, 并与现有三种传统重金属解毒剂 EDTA、DDTC、DMSA 及仍处于基础研究阶段的螯合剂 NAC 对锰致小鼠肺脏和睾丸毒性作用进行了比较。研究结果表明, L-His 均能有效地抑制锰染毒引起的小鼠肺脏和睾丸 LPO 值的升高, 并显著减少小鼠肺脏和睾丸中锰的浓度, 抑制染锰引起的肺脏和睾丸中钙浓度增加及锌浓度的降低; 其它各螯合剂对染锰引起的肺脏和睾丸中各指标的变化有一定的抑制作用, 但与染毒组比较无显著性差异, 其中 DDTC 还引起了肺脏中锰含量的升高。提示 L-His 对锰致小鼠肺脏和睾丸毒性有明显的解毒作用。

以上各螯合剂治疗锰过量的效果不尽相同, 可能是因为各螯合剂与锰结合的能力不同引起的。锰的典型氧化态为 +2, 按软硬酸碱理论分类, Mn(Ⅱ) 属于硬酸, 通常易形成 6 配位八面体结构。DDTC、DMSA 等巯基类螯合剂的分子中巯基 (-SH) 硫原子属于软碱, 而 L-His 分子中含咪唑基, 咪唑基中氮原子属于硬碱, 因而根据“硬亲硬”的原则, Mn(Ⅱ) 对咪唑基有较大的亲和力^[8], 因此 L-His 能与 Mn(Ⅱ) 形成比较稳定的配合物从而能有效地降低 Mn(Ⅱ) 的毒性; 而 DDTC、DMSA 中的

巯基与 Mn(II) 形成的配合物稳定性较差, 因而解过量锰中毒效果不理想。另外, 我们以前的研究显示, DDTC 等巯基类螯合剂会与重金属形成亲脂性大的螯合物, 产生重金属在脑中的重新分布, 从而导致脑中重金属浓度增加^[9-10], 本研究结果与以上报道相吻合。

本研究结果还表明, 氨基酸类螯合剂 EDTA 对锰的解毒作用较上述其他螯合剂差, 这可能是其进入细胞的能力较差所致^[11], 另外, EDTA 还会与体内必需微量金属离子结合, 不良反应也较大。

此外, L-His、NAC、DMSA、DDTC、EDTA 的 LD₅₀ 值分别为: 51.2、49.0、13.7、6.2、14.8 mmol/kg^[12]。表明 L-His 和 NAC 的自身毒性很小, 因此有望成为锰中毒的理想解毒剂。

参考文献:

- [1] 荆俊杰, 陈敏, 谢吉民, 等. 锰对小鼠肺脏和睾丸的急性毒作用[J]. 中国职业医学, 2009, 36(2): 98-101.
- [2] 荆俊杰, 陆晓菁, 陈敏, 等. 锰对小鼠脑和肝脏脂质过氧化及其钙、铁、锌的影响[J]. 毒理学杂志, 2009, 23(2): 138-140.
- [3] 姜岳明. 锰与工人生殖健康[J]. 铁道劳动安全卫生与环保, 1999, 26(4): 240-241.
- [4] 曹煜红, 王改仙. 电焊工肺通气功能的测定与分析[J]. 中国工业医学杂志, 2002, 15(1): 48-49.
- [5] 陈敏, 高晓钦, 荆俊杰, 等. 氯化汞染毒小鼠各脏器中汞和微量元素的测定及分析[J]. 光谱实验室, 2000, 17(5): 525-526.
- [6] UCHIYAMA M, MIHARA M. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test[J]. Anal Biochem, 1978, 86(1): 271-278.
- [7] 陈敏, 谢吉民, 程晓农, 等. 镉对小鼠肝脏的毒作用机理探讨[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2002, 12(4): 321-323.
- [8] 王夔. 生命科学中的微量元素[M]. 2版. 北京: 中国计量出版社, 1996: 202.
- [9] 谢吉民, 陈敏, 赵干卿, 等. 螯合剂对小鼠体内镉的排泄与分布的影响[J]. 江苏大学学报: 自然科学版, 2005, 26(6): 547-549.
- [10] 陈敏, 谢吉民, 荆俊杰. 五种螯合剂对镉致小鼠脏器脂质过氧化作用的影响[J]. 环境与职业医学, 2003, 20(3): 222-224.
- [11] JONES MM, CHERIAN MG. The research for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication[J]. Toxicology, 1990, 62(1): 1-25.
- [12] XIE JM, FUNAKOSHI T, SHIMADA H, et al. Effects of chelating agents on testicular toxicity in mice caused by acute exposure to nickel[J]. Toxicology, 1995, 103(3): 147-155.

(收稿日期: 2011-04-02)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 张晶; 校对: 葛宏妍)

【精彩预告】

塑料瓶装饮料中邻苯二甲酸酯的含量分析

李荔群, 陈蓉芳, 高强, 厉曙光

为了解塑料瓶装饮料中邻苯二甲酸酯类化合物(phthalates)的污染水平及其影响因素。研究人员随机购买市售的 49 种不同品牌的饮料作为研究对象, 采用气相色谱法检测饮料中的邻苯二甲酸酯含量。统计结果显示, 饮料中的邻苯二甲酸二丁酯(di-butyl phthalate, DBP)和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[di-(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP]的检出率分别为 98.0% 和 100.0%, 平均含量 0.038 mg/L 和 0.071 mg/L, 邻苯二甲酸二乙酯(di-ethyl phthalate, DEP)未检出; 其中, 茶饮料中 DBP 和 DEHP 的检出范围分别为 ND~0.047 mg/L 和 0.045~0.146 mg/L; 果汁饮料中 DBP 的最高检出浓度达 0.127 mg/L, DEHP 的检出范围为 0.060~0.371 mg/L; 咖啡乳饮料中检出 DBP 和 DEHP 的最大值分别为 0.081 mg/L 和 0.089 mg/L, 最小值分别为 0.032 mg/L 和 0.033 mg/L。果汁饮料和咖啡乳类饮料中 DBP 的含量均高于茶饮料($P=0.003$ 和 $P=0.002$), 果汁饮料中 DEHP 的含量高于茶饮料和咖啡乳类饮料($P=0.001$ 和 $P=0.002$); 拟合的线性回归模型结果显示, 与茶饮料相比, 果汁饮料和咖啡乳饮料中 DBP 浓度的对数值分别高出 0.36 个单位和 0.50 个单位; 果汁饮料中 DEHP 浓度的对数值高于茶饮料 0.47 个单位, 酸性组饮料中 DEHP 浓度的对数值比弱酸性组饮料高 0.30 个单位。研究者认为, 塑料瓶装饮料中 DBP、DEHP 检出率均高, 且在不同种类饮料中有显著差异, 饮料中邻苯二甲酸酯均在国家规定限值内; 但在饮料种类和存储时间固定的条件下, 饮料中 DEHP 含量水平随着 pH 值变小而增大。

此文将于近期刊出, 敬请关注!