

DDC 等药物对急性羰基镍中毒大鼠肝脏 SOD 活力及 Cu-Zn SOD 基因表达影响*

王宁¹, 程宁², 王秋英³, 闫铭峰², 吴喜江³

1. 西安医学院基础医学研究所 (陕西 西安 710021) 2. 兰州大学甘肃省新药临床前研究重点实验室
(甘肃 兰州 730000) 3. 金川公司金川镍钴工业卫生研究所 (甘肃 金昌 737103)

摘要: [目的] 评价大鼠急性羰基镍中毒后多种药物及药物联合干预对于肝脏 SOD 活力及 Cu-Zn SOD 基因表达的影响。[方法] 将 SD 大鼠分为正常对照组、染毒对照组和五个药物治疗组, 药物治疗组大鼠静态吸入 250 mg/m³ 羰基镍染毒 30min, 分别于染毒后 4h 和 30h 腹腔注射二乙基二硫氨基甲酸钠 (DDC)、甲泼尼龙、亚硒酸钠、DDC+甲泼尼龙、参附回阳汤, 染毒对照组染毒后不予药物治疗, 3d 和 7d 时取材, 应用黄嘌呤氧化酶测定法和反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法分别测定肝脏 SOD 活性并分析 Cu-Zn SOD 基因表达水平。[结果] 与正常组相比较, 染毒组肝脏 SOD 活力和 Cu-Zn SOD 基因表达均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。染毒后 4h 给药, 肝脏 SOD 活力明显高于染毒后 30h 给药, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。与染毒组相比较, 染毒后 4h、30h 给予 DDC, 3d 和 7d 时肝脏 SOD 活力和 Cu-Zn SOD 基因明显升高 ($P < 0.05$), 30h 时给予 DDC, 3d 和 7d 时肝脏 SOD 活力明显升高 ($P < 0.05$); 染毒后 4h 和 30h 给予甲泼尼龙, SOD 和 Cu-Zn SOD 水平未见明显升高, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 染毒后 4h 给予 DDC+甲泼尼龙, SOD 水平明显升高 ($P < 0.05$)。[结论] 急性羰基镍中毒后, DDC 对于逆转羰基镍急性中毒所造成的肝脏抗氧化酶及其基因损伤效果确切, 且早期给药效果优于晚期给药; DDC 联合甲泼尼龙也可逆转肝脏抗氧化酶的损伤, 但对于基因层面的损伤应用意义不大; 而亚硒酸钠和参附回阳汤对于逆转抗氧化酶水平和基因损伤效果尚不确切。

关键词: 羰基镍; SOD 活力; Cu-Zn SOD 基因; DDC; 甲泼尼龙; 亚硒酸钠; 参附回阳汤

羰基镍是急性毒性最强的一类多器官毒性镍化合物^[1]。研究显示羰基镍引起机体氧化应激反应, 甚至认为镍诱发的脂质过氧化作用可能是其主要毒性作用及致癌机制之一^[2]。肝脏作为人体内最大的消化腺和体内新陈代谢的中心站, 是其急性中毒的主要靶器官之一^[3]。目前对急性羰基镍中毒主要采取对症支持、驱镍治疗, 特异性解毒剂的应用价值及毒副作用尚不清楚, 给临床工作带来了一定难度。为深入研究急性羰基镍中毒药物治疗后器官修复情况, 本研究选取 DDC、甲泼尼龙、亚硒酸钠、参附回

作者简介: 王宁 (1982-), 女, 陕西西安人, 讲师, 主要从事医学免疫学教学工作和工业毒理学研究工作。通讯作者: 王宁

阳汤四种药物及药物组合治疗急性羰基镍中毒大鼠，观察对肝脏SOD活力及Cu-Zn SOD基因表达水平影响，评价药物治疗对急性中毒后肝脏氧化损伤修复情况。

1 材料与方法

1.1 实验药物与主要试剂

实验药物：甲泼尼龙（辉瑞制药），DDC（天津化学试剂研究所），亚硒酸钠（天津市德恩化学试剂公司），参附回阳汤（组分包括：参附注射液，四川雅安三九药业有限公司；丹参注射液，四川三精升和制药有限公司；甘草注射液，日本米诺发源制药株式会社）。主要试剂：Bradford 法蛋白定量试剂盒（上海捷瑞生物制品有限公司）；总 SOD 测定试剂盒（南京建成生物工程研究所），总 RNA 提取试剂盒（北京天根生化科技有限公司），逆转录反应试剂盒（Fermentas life sciences），Taq DNA Polymerase 和 dNTP（Fermentas life sciences），羰基镍（甘肃省金川公司羰基镍车间提供）。

1.2 实验动物

无特定病原体（SPF）级 SD 大鼠 220 只，体质量 180~200 g[西安交通大学基础医学部动物中心提供，许可证号 SCXK（陕）2007-001]，万级洁净动物房分笼饲养，昼夜环境温度维持在 18-29℃，相对湿度为 40%-60%，SPF 级大鼠饲料（北京科傲协力饲料有限公司）喂养，自由采食饮水。

1.3 动物分组及处理

将 SD 大鼠分为 7 组，分别为：正常对照组（10 只）、染毒对照组（10 只），治疗组为甲泼尼龙组（20mg/kg）、DDC 组（100mg/kg）、亚硒酸钠组（10μmol/kg）、参附回阳汤组（0.25ml）、甲泼尼龙（20mg/kg）+DDC（100mg/kg）组，每组大鼠各 40 只，雌雄各半。正常对照组未予特殊处理，其余组大鼠给予羰基镍 250mg/m³ 静态吸入染毒 30min 后，各组分成 4h、30h 腹腔注射给药组，染毒后 3d、7d 取肝组织，每次 10 只大鼠，雌雄各半。

1.3 组织匀浆制备与蛋白含量测定

取肝组织称重并剪碎，按 1:10 加入预冷的匀浆介质，用玻璃匀浆器充分研磨 6~8 分钟，将制备好的 10%匀浆液置于高速低温离心机 3,000 r/min 离心 10 min，取上清（以上全过程均在 0-4℃ 条件下进行）。按照 Bradford 法蛋白定量试剂盒操作，使用酶标仪测量 595nm 处 OD 值，利用牛血清标准蛋白梯度绘制标准曲线，计算出肝组织匀浆中蛋白含量。

1.4 SOD 活力测定

取肝组织匀浆，稀释为所需浓度，应用 SOD 定量测试盒使用黄嘌呤氧化酶测定法，测定 550nm 处 OD 值，结合蛋白含量，计算出肝组织匀浆中 SOD 活力水平。

1.5 反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）

将肝组织在液氮中充分研磨，按照总 RNA 提取试剂盒操作提取总 RNA。利用紫外分光光度仪于 260nm 处定量总 RNA，RNA 纯度由 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值确定，本实验所有样品的 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均大于 1.8。取样品总 RNA 5ul，应用 Rever Aid First Stand cDNA Synthesis 试剂盒反转录总 cDNA。用于扩增 Cu-Zn SOD 的两条引物为 5' - GAAGCCGTGTGCGTGCTG-3' 和 5' -GGACACATTGGCCACACCG-3'，产物 399bp^[4]。以 GAPDH 为内参照，引物为 5' -GCTGGTGCTGAGTATGTCGT-3' 和 5' -TGGGAGTTGCTGTTGAAGTC-3'，产物 605bp，所用引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。反应系统中依次加入：Cu-Zn SOD 上下游引物各 1ul、GAPDH 上下游引物各 1ul、MgCl₂ 1.2 ul、dNTPs 0.4 ul、10×Taq buffer 5ul、Taq DNA Polymerase 0.4ul、RT 反应产物 4ul 及双蒸水 8ul，PCR 体系总体积为 20ul。循环参数：94℃ 预变性 5min，94℃ 变性 45s，56℃ 退火 30s，72℃ 延伸 45s，共 35 个循环，72℃ 终延伸 10min。

1.6 肝组织 Cu-Zn SOD 基因表达水平分析

取 RT-PCR 扩增产物，用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳并用 5mg/ml 溴化乙锭染色，使用凝胶成像分析系统扫描泳带并根据灰度半定量确定 PCR 产物的含量。为比较 mRNA 的相对表达水平，以 Cu-Zn SOD mRNA 与相应的 GAPDH mRNA 平均光密度值的比值来表示各组大鼠相对 mRNA 水平。

1.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性羰基镍中毒药物治疗后大鼠肝脏 SOD 活力的变化

2.1.1 大鼠羰基镍染毒后 4h 给药 3d 和 7d 时肝脏 SOD 活力变化

与正常对照组相比较，3d 取材时亚硒酸钠组、参附回阳汤组、染毒对照组肝脏 SOD 活力均明显降低 ($P<0.05$)，7d 取材时参附回阳汤组、染毒对照组明显降低 ($P<0.05$)；与染毒对照 3d 取材组相比较，3d 时 DDC 组、DDC+甲泼尼龙组明显升高 ($P<0.05$)，7d 时 DDC 组、亚硒酸钠组、DDC+甲泼尼龙组明显升高 ($P<0.05$)；与染毒对照 7d 取材组相比较，3d 取材时 DDC 组、DDC+甲泼尼龙组明显升高 ($P<0.05$)。各药物处理组 3d 和 7d 取材时两两比较无统计学差异 ($P>0.05$)，见表 1。

表 1 大鼠染毒后 4h 给药 3d 和 7d 时肝脏 SOD 活力 (U/mgprot) ($\bar{x} \pm s$)

给药分组	动物数	染毒 4h 后给药	
		3d	7d
甲泼尼龙	10	286.35±11.18	293.53±15.04
DDC	10	333.26±37.12 ^{bc}	306.07±20.03 ^b
亚硒酸钠	10	286.06±31.31 ^a	311.03±26.18 ^b
参附回阳汤	10	258.34±36.40 ^a	278.39±11.09 ^a
DDC+甲泼尼龙	10	324.38±24.09 ^{bc}	303.93±66.54 ^b
染毒对照组	10	252.45±12.78 ^a	273.56±9.86 ^a

正常对照组	10	329.08±17.02 ^{bc}	329.08±17.02 ^{bc}
-------	----	----------------------------	----------------------------

注：^a与同时点的正常对照组相比较， $P<0.05$ ；^b与染毒对照 3d 取材组相比较， $P<0.05$ ；^c与染毒对照 7d 取材组相比较， $P<0.05$ 。

2.1.2 大鼠羰基镍染毒后 30h 给药 3d 和 7d 时肝脏 SOD 活力

与正常对照组相比较，3d 和 7d 取材时甲泼尼龙组、参附回阳汤组、染毒对照组肝脏 SOD 活力均明显降低（ $P<0.05$ ）；与染毒对照 3d 取材组相比较，3d 时 DDC 组明显升高（ $P<0.05$ ），7d 时 DDC 组、DDC+甲泼尼龙组明显升高（ $P<0.05$ ）；与染毒对照 7d 取材组相比较，3d 取材时参附回阳汤组明显降低（ $P<0.05$ ）。各药物处理组 3d 和 7d 取材时两两比较显示，参附回阳汤组 7d 时 SOD 活力高于 3d 时（ $P<0.05$ ），其余组无统计学差异（ $P>0.05$ ），见表 2。

表 2 大鼠染毒后 30h 给药 3d 和 7d 时肝脏 SOD 活力（U/mgprot）（ $\bar{x} \pm s$ ）

给药分组	动物数	染毒 30h 后给药	
		3d	7d
甲泼尼龙	10	283.44±13.62 ^a	281.04±7.82 ^a
DDC	10	311.56±21.80 ^b	299.95±12.86 ^b
亚硒酸钠	10	286.75±28.14	289.16±12.84
参附回阳汤	10	224.52±32.35 ^{ac}	270.59±27.53 ^a
DDC+甲泼尼龙	10	285.18±17.27	304.26±37.73 ^b
染毒对照组	10	252.45±12.78 ^a	273.56±9.86 ^a
正常对照组	10	329.08±17.02 ^{bc}	329.08±17.02 ^{bc}

注：^a与同时点的正常对照组相比较， $P<0.05$ ；^b与染毒对照 3d 取材组相比较， $P<0.05$ ；^c与染毒对照 7d 取材组相比较， $P<0.05$ 。

2.2 急性羰基镍中毒药物治疗后大鼠肝脏 Cu-Zn SOD 基因表达的变化

2.2.1 大鼠羰基镍染毒后 4h 给药 3d 和 7d 时肝脏 Cu-Zn SOD 基因表达的变化

与正常对照组相比较，3d 取材时甲泼尼龙组、参附回阳汤组和染毒对照组肝脏 Cu-Zn SOD 基因表达均明显降低（ $P<0.05$ ），7d 取材时染毒对照组降低（ $P<0.05$ ）；与染毒对照 3d 取材组相比较，3d 时 DDC 组和亚硒酸钠组升高（ $P<0.05$ ），7d 时 DDC 组升高（ $P<0.05$ ）；各药物处理组 3d 和 7d 取材时两两比较显示，甲泼尼龙组 7d 时 SOD 活力高于 3d 时（ $P<0.05$ ），其余组无统计学差异（ $P>0.05$ ），见表 3。

表 3 大鼠染毒后 4h 给药肝脏 Cu-Zn SOD 基因相对表达水平（ $\bar{x} \pm s$ ）

给药分组	动物数	染毒 4h 后给药	
		3d	7d
甲泼尼龙	10	0.899±0.07 ^a	0.925±0.12
DDC	10	1.027±0.10 ^b	1.048±0.03 ^b
亚硒酸钠	10	1.053±0.18 ^b	0.972±0.01
参附回阳汤	10	0.871±0.03 ^a	0.738±0.12
DDC+甲泼尼龙	10	0.976±0.01	0.950±0.00
染毒对照组	10	0.897±0.03 ^a	0.868±0.05 ^a
正常对照组	10	1.049±0.06 ^{bc}	1.049±0.06 ^{bc}

注：^a与同时点的正常对照组相比较， $P<0.05$ ；^b与染毒对照 3d 取材组相比较， $P<0.05$ ；^c与染毒对照 7d 取材组相比较， $P<0.05$ 。

2.2.2 大鼠羰基镍染毒后 30h 给药 3d 和 7d 时肝脏 Cu-Zn SOD 基因表达的变化

与正常对照组相比较，3d 取材时甲泼尼龙组、参附回阳汤组和染毒对照组肝脏 Cu-Zn SOD 基因表达均明显降低 ($P<0.05$)，7d 取材时染毒对照组降低 ($P<0.05$)；与染毒对照 3d 取材组相比较，3d 和 7d 时 DDC 组明显升高 ($P<0.05$)；与染毒对照 7d 取材组相比较，7d 时参附回阳汤组升高 ($P<0.05$)；各药物处理组 3d 和 7d 取材时两两比较显示，参附回阳汤组 7d 时 SOD 活力高于 3d 时 ($P<0.05$)，其余组无统计学差异 ($P>0.05$)，见表 4。

表 4 大鼠染毒后 30h 给药大鼠肝脏 Cu-Zn SOD 基因相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

给药分组	动物数	染毒 30h 后给药	
		3d	7d
甲泼尼龙	10	0.906±0.09 ^a	0.960±0.21
DDC	10	1.008±0.10 ^{bc}	1.007±0.07 ^b
亚硒酸钠	10	0.997±0.09	0.958±0.00
参附回阳汤	10	0.881±0.13 ^a	1.031±0.02 ^c
DDC+甲泼尼龙	10	1.005±0.07	0.965±0.10
染毒对照组	10	0.897±0.03 ^a	0.868±0.05 ^a
正常对照组	10	1.049±0.06 ^{bc}	1.049±0.06 ^{bc}

注：与同时点的正常对照组相比较，^a $P<0.05$ ；与染毒对照 3d 取材组相比较，^b $P<0.05$ ；与染毒对照 7d 取材组相比较，^c $P<0.05$ 。

3 讨论

急性羰基镍毒性效应可累计肺脏、肝脏等多个重要器官，治疗不当易引起严重后果^[5,6]，但相关药物的治疗效果有待评估，给临床工作带来了一定难度。在前期急性羰基镍中毒机制实验研究中我们已经证实其可引起肺脏、肝脏氧化损伤，抗氧化酶活力及其基因表达均不同程度降低^[7,8]。本文在前期实验的基础上，探讨急性中毒后 4h 和 30h 给予药物治疗，3d 和 7d 时肝脏 SOD 活力和 Cu-Zn SOD 基因表达情况，观察药物治疗对于急性中毒引起的器官氧化损伤的恢复情况。

DDC 是一种正在研究中的解毒剂，可与二价镍形成亲脂螯合物，使有毒金属通过再分布而不全是排出以减少毒物在脏器的积累^[9]。Sunderman 用其治疗 50 例尿镍为 100-2470mg/L 的急性中毒者，疗效均明显，并于 3 周后恢复工作^[10]。虽然如此，但 DDC 进入体内与内源性配体、有毒金属、必需金属元素等存在复杂的竞争关系^[11]，临床应用十分谨慎。本次实验结果表明：急性羰基镍中毒后 4h、30h 给予 DDC 治疗，可逆转中毒所造成的肝脏 SOD 活力和 Cu-Zn SOD 基因水平下降，其中早期给药效果优于晚期给药，因此早期应用 DDC 对于减少脏器氧化损伤具有明显的作用，但因羰基镍中毒机制复杂，不仅仅涉及到氧化损伤，且 DDC 具有亲脂性，可能与含脂质较高的脑组织有较强的亲和力，致使脑组织镍含量增多，故其临床应用仍需进一步的实验研究。甲泼尼龙具有减轻炎症反应、抑制免疫反

应和抗过敏作用。临床实践证明，早期使用足量甲泼尼龙，可明显减轻羰基镍中毒引起脏器变性、水肿、坏死样损害，使组织细胞膜稳定，中毒性损伤在细胞层面进展时即被阻断，阻碍羰基镍或其代谢物被脏器吸收^[10]。本次实验结果也表明，于染毒后 4h 和 30h 单独应用甲泼尼龙并不能逆转 SOD 和 Cu-Zn SOD 基因的降低。另外，早期应用 DDC 联合甲泼尼龙治疗对于恢复 SOD 活力效果明显，优于单用甲泼尼龙。硒为机体必需微量元素，不仅是抗氧化酶系的重要组成成份，而且在增强免疫功能、减弱重金属毒性方面均有重要作用^[12]。本次研究发现亚硒酸钠也可减轻急性中毒所致的器官氧化损伤。此外，使用中药参附回阳汤效果并不明显，考虑到丹参活血化瘀功效可能与多活性成分之间存在协同、拮抗作用有关。

本研究结果提示大鼠急性羰基镍中毒后，DDC 对于逆转羰基镍急性中毒所造成的肝脏抗氧化物酶及其基因损伤效果确切，且 DDC 早期给药效果优于晚期给药；DDC 联合甲泼尼龙也可逆转肝脏抗氧化物酶的损伤，但对于基因层面的损伤应用意义不大；而亚硒酸钠和参附回阳汤对于逆转抗氧化物酶水平和基因损伤效果不确切，需要进一步研究观察。

参考文献:

- [1] Seet RC, Johan A, Teo CE, et al. Inhalational nickel carbonyl poisoning in waste processing workers[J]. Chest, 2005,128(1):424-429.
- [2] Chen CY, Wang YF, Lin YH, et al. Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes[J]. Arch Toxicol, 2003, 77(3):123-130.
- [3] Mahboob M, Shireen KF, Athinson A, et al. Lipid peroxidation enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury[J]. J Environ Sci Health B. 2001, 36(5):687-97.
- [4] Yeh CT, Ching LC, Yen GC. Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats[J]. Nutr Biochem, 2009, 20(3):163-171.
- [5] Doreswamy K, Shrilatha B, Rajeshkumar T, et al. Nickel-induced Oxidative Stress in Testis of Mice: Evidence of DNA damage and Genotoxic Effects[J]. Journal of Andrology, 2004, 25(6):996-1003.
- [6] Valeeva ET, Galimova RR, Karimova LK, et al. cases of nickel carbonyl acute poisoning at major petrochemical enterprises[J]. Med Tr Prom Ekol. 2009, 2009(11):17-19.
- [7] 王宁, 王秋英, 张小培, 等. 大鼠急性羰基镍中毒肺脏 SOD 活性及 Cu-Zn SOD 基因表达的实验观察[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(6):180-183.
- [8] Bai YN, Ma L, Wang QY, et al. The mechanism of acute lung injury induced by nickel carbonyl in rats[J]. Biomed Environ Sci, 2013, 7(26):625-628.
- [9] Bradberry SM, Vale JA. Therapeutic review : Do diethyldithiocarbamate and disulfiram have a role in acute nickel carbonyl

poisoning[J]. Journal of toxicology,1999,37(2):259-264.

- [10] Sunderman FW SR.Use of sodium diethyldithiocarbamate in the treatment of nickel carbonyl poisoning[J]. Ann clin Lab Sci,1990,20(1):12-21.
- [11] Bahn A,Knabe M,Hagos Y,et al.Interaction of the Metal Chelator 2,3-Dimercapto-L-propanesulfonate with the Rabbit Multispecific Organic Anion Transporter (rOAT1)[J]. Molecular Pharmacology, 2002,62(5):1128-1136.
- [12] Whanger PD.Selenium in the treatment of heavy metal poisoning and chemical carcinogenesis[J]. Trace Elem Electrolytes Health Dis,1992,6(4):209-221.