

巯基化合物对二甲基甲酰胺急性中毒的解毒实验研究

卢中秋 邱俏檬 缪心军 胡国新

【摘要】 目的 观察二甲基甲酰胺(DMF)急性中毒对小鼠肝组织氧化酶/抗氧化酶系统的影响及不同巯基化合物对肝脏的保护作用。**方法** 采用 DMF 灌胃制备小鼠急性中毒模型;于中毒后 6、12、24、48 和 72 h 取小鼠肝左叶,测定各组肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、黄嘌呤氧化酶(XOD)活性的动态变化。采用制备中毒模型后腹腔注射二巯基丙磺酸钠(Na - DMPS)、二巯基丁二酸(DMSA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、N - 乙酰半胱氨酸(NAC)四种巯基化合物的方法,观察其对 DMF 急性中毒小鼠的保护作用;并设相应给药的 4 种药物对照组。DMF 灌胃后 24 h 取肝左叶,测定各组肝组织 SOD 和 XOD 活性。**结果** DMF 灌胃后 24 h 小鼠肝组织 XOD、SOD 活性均明显升高(P 均 <0.01),48~72 h 恢复至正常水平。用 Na - DMPS、NAC、DMSA 治疗后 24 h,肝组织 SOD、XOD 活性较中毒模型组均明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);GSH 治疗 24 h 后,肝组织 XOD 活性较中毒模型组明显下降($P<0.05$),SOD 则无显著变化($P>0.05$)。4 种药物比较,Na - DMPS、NAC 和 DMSA 对 SOD 的作用比 GSH 好(P 均 <0.05),以 Na - DMPS 最佳,但 Na - DMPS、NAC 和 DMSA 组间比较差异无显著性。4 种巯基化合物对 XOD 的影响差异均无显著性。**结论** DMF 干扰了体内的氧化酶/抗氧化酶系统,可能是其导致肝损伤的机制之一。Na - DMPS、NAC 和 DMSA 可通过平衡氧化酶/抗氧化酶系统保护肝功能。

【关键词】 二甲基甲酰胺; 中毒,急性; 超氧化物歧化酶; 黄嘌呤氧化酶; 巯基化合物

Experimental study on detoxication effect of sulfhydryl compounds in acute poisoning of dimethylformamide

LU Zhong-qiu*, QIU Qiao-meng, MIAO Xin-jun, HU Guo-xin. * Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

【Abstract】 Objective To study the change in oxidase and antioxidase in liver of the mice poisoned by dimethylformamide (DMF), and the effects of the treatment with sulfhydryl compounds in acute poisoning of DMF. **Methods** The sulfhydryl compounds included sodium dimercaptopropan (Na - DMPS), N - acetylcysteine (NAC), glutathione (GSH) and dimercaptosuccinic acid (DMSA). The model of acute poisoning with DMF in mice was reproduced, and the left hepatic lobes were harvested at 6, 12, 24, 48 and 72 hours after DMF to detect the dynamic changes in the activities of superoxide dismutase (SOD) and xanthine oxidase (XOD) in liver homogenate. Treatment groups included intraperitoneal injection of Na - DMPS, NAC, GSH, DMSA respectively. In the control groups, the activities of XOD and SOD in liver were determined 24 hours after intragastric administration of DMF. **Results** The activities of XOD, SOD in liver were elevated at 24 hours after intragastric administration of DMF (both $P<0.01$), and returned to the normal levels at 48 - 72 hours. Compared to the poisoning group, the activities of XOD, SOD in liver homogenate were significantly lowered after the treatment of Na - DMPS, NAC and DMSA ($P<0.05$ or $P<0.01$). The activity of XOD in liver homogenate was reduced 24 hours after treating with GSH ($P<0.05$), and no obvious change was observed in SOD ($P>0.05$). As far as the activity of SOD was concerned, Na - DMPS, NAC, DMSA showed better effects than GSH (all $P<0.05$), and Na - DMPS was the best. There was no significant differences in XOD among the four sulfhydryl compounds. **Conclusion** The balance of oxidase and antioxidase is interrupted by DMF, which might be one of the mechanisms of damage to the liver. Na - DMPS, NAC and DMSA could protect liver function by restoring the balance.

【Key words】 dimethylformamide; acute poisoning; superoxide dismutase; xanthine oxidase; sulfhydryl compound

二甲基甲酰胺(DMF)作为有机溶剂在工业生产中应用广泛,常引起急性中毒^[1]。有关 DMF 的肝

毒性研究及临床报道认为,DMF 可能通过其中间代谢产物(N-羟甲基-N-甲基甲酰胺、甲基甲酰胺)中甲酰基而发生氧化,生成亲电子活性物质而起毒性作用^[2]。研究表明,DMF 肝损伤可能与其消耗肝脏还原型谷胱甘肽(GSH)有关^[3],但外源性 GSH 只有部分运至肝脏,分解后重新合成,故只能有限地提高肝细胞内 GSH 浓度^[4]。但关于 DMF 对肝脏氧化酶/抗氧化酶系统的影响以及不同巯基化合物的作

基金项目:浙江省温州市科技局基金资助项目(Y2004A130)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院急诊科(卢中秋,邱俏檬);温州医学院在职研究生(缪心军);温州医学院药学院药理学室(胡国新)

作者简介:卢中秋(1964-),男(汉族),浙江省人,教授,硕士生导师,主任医师(E-mail: lzq640815@163.com)。

用尚少见报道。因此,我们通过建立经口染毒的小鼠 DMF 急性中毒模型,旨在观察 DMF 对小鼠超氧化物歧化酶(SOD)、黄嘌呤氧化酶(XOD)的影响,以及巯基化合物二巯基丙磺酸钠(Na-DMPS)、GSH、N-乙酰半胱氨酸(NAC)、二巯基丁二酸(DMSA)对 DMF 急性中毒的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料:ICR 小鼠 128 只,体重 18~22 g,雌雄各半,由温州医学院实验动物中心提供;SOD、XOD 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;Na-DMPS 注射液由上海禾丰制药有限公司提供(批号:H31021514),GSH 由积华药业有限公司提供(批号:H20040005),NAC 由上海第一生化药业有限公司提供(批号:H31021961),DMSA 由上海新亚药业有限公司提供(批号:050605)。

1.2 实验方法:动物实验前禁食 12 h,自由饮水。

1.2.1 实验 1:ICR 小鼠 48 只,随机分为正常对照组和 5 个 DMF 中毒模型组,每组 8 只。中毒组给予 3 g/kg DMF 灌胃。分别于灌胃后 6、12、24、48 和 72 h 活杀后取肝左叶,测定肝组织 SOD、XOD 活性。

1.2.2 实验 2:ICR 小鼠 80 只,随机分为 10 组,每组 8 只。①正常对照组:用生理盐水(NS)灌胃,腹腔注射 NS;②急性中毒模型组:DMF 灌胃,腹腔注射 NS;③Na-DMPS 治疗组:DMF 灌胃,腹腔注射 Na-DMPS;④Na-DMPS 对照组:NS 灌胃,腹腔注射 Na-DMPS;⑤GSH 治疗组:DMF 灌胃,腹腔注射 GSH;⑥GSH 对照组:NS 灌胃,腹腔注射 GSH;⑦NAC 治疗组:DMF 灌胃,腹腔注射 NAC;⑧NAC 对照组:NS 灌胃,腹腔注射 NAC;⑨DMSA 治疗组:DMF 灌胃,腹腔注射 DMSA;⑩DMSA 对照组:NS 灌胃,腹腔注射 DMSA。上述各组 DMF 灌胃剂量均为 3 g/kg,腹腔注射剂量均为 1.0 ml/kg;于灌胃前 15 min 及灌胃后 3 h 和 12 h 各腹腔注射 1 次;Na-DMPS、GSH、NAC、DMSA 的腹腔注射剂量分别为 300、880、465 和 260 mg/kg(等巯基剂量)。灌胃后 24 h 断头放血,取肝左叶进行组织匀浆,测定肝组织 SOD 和 XOD 活性。

1.3 标本制备和检测:①匀浆介质制备:将 1.21 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)及 37.23 mg 的乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)加双蒸水至 500 ml,再用 0.5 mmol/L HCl 滴定中和至 pH 7.4,加 3.42 g 蔗糖、8 g 氯化钠,补充双蒸水至 1 000 ml,经微波消毒后于 4℃下备用;②肝组织匀浆制备:剪取肝组织 0.4~0.5 g,于冷 NS 中漂洗,滤纸吸干,称重,剪碎

后放入 10 ml 试管中,加 9 倍量匀浆介质,用超声细胞粉碎仪制备匀浆,3 000 r/min(离心半径 6.5 cm)离心 15 min,取 2 ml 上清液,于-30℃保存。各指标检测按试剂盒说明书操作进行。

1.4 统计学处理:应用 SPSS10.0 统计软件。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,非正态分布用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DMF 急性中毒小鼠肝组织 SOD、XOD 变化(表 1):肝组织 SOD、XOD 在 DMF 灌胃后 24 h 均明显升高(P 均 < 0.01),染毒后 48~72 h 恢复至正常水平(P 均 > 0.05)。

表 1 DMF 急性中毒小鼠肝组织 SOD、XOD 变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Dynamic change of SOD and XOD in liver tissues of mice with acute DMF poisoning($\bar{x} \pm s$) kU/g

组别	动物数(只)	SOD	XOD
正常对照组	8	32.14 ± 9.69	16.33 ± 3.65
中毒 6 h 组	8	1.02 ± 2.67	15.57 ± 1.56
中毒 12 h 组	8	5.79 ± 3.69	17.34 ± 2.77
中毒 24 h 组	8	65.42 ± 31.37**	22.16 ± 3.74**
中毒 48 h 组	8	32.56 ± 7.80	18.42 ± 5.06
中毒 72 h 组	8	32.04 ± 4.34	19.83 ± 3.34

注:与正常对照组比较:** $P < 0.01$

2.2 巯基化合物对 DMF 急性中毒小鼠肝组织的保护作用(表 2):用 Na-DMPS、NAC 和 DMSA 治疗 24 h 后,肝组织 SOD、XOD 均较中毒模型组明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);GSH 治疗 24 h 后,肝组织 XOD 较中毒模型组明显下降($P < 0.05$),但 SOD 无显著变化($P > 0.05$)。

表 2 巯基化合物对 DMF 急性中毒小鼠肝组织 SOD、XOD 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of sulfhydryl compounds on SOD and XOD in liver tissues of mice with acute DMF poisoning($\bar{x} \pm s$) kU/g

组别	动物数(只)	SOD	XOD
正常对照组	8	32.25 ± 4.37	16.30 ± 2.43
中毒模型组	8	45.09 ± 6.35**	19.97 ± 3.13*
Na-DMPS 治疗组	8	28.07 ± 5.90△△#	15.06 ± 2.13△△
GSH 治疗组	8	44.54 ± 8.54	15.15 ± 2.53△
NAC 治疗组	8	30.96 ± 6.19△#	13.87 ± 2.47△
DMSA 治疗组	8	31.89 ± 6.85△#	15.56 ± 2.06△△
Na-DMPS 对照组	8	21.80 ± 1.59	12.11 ± 1.48
GSH 对照组	8	34.94 ± 4.21	13.68 ± 1.84
NAC 对照组	8	30.02 ± 3.96	13.37 ± 1.41
DMSA 对照组	8	25.08 ± 3.06	13.18 ± 1.21

注:与正常对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与中毒模型组比较:△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与 GSH 治疗组比较:# $P < 0.05$

3 讨论

DMF 经呼吸道或皮肤引起急性中毒的主要临床表现为消化道症状和丙氨酸转氨酶升高^[5], 严重者可出现肝肿大、肝区叩痛、黄疸、肝性脑病等^[6]。DMF 的肝损伤作用可能与其消耗肝脏 GSH、改变 GSH 代谢和肝微粒体单加氧酶系统有关^[3], 亦可能与肝脏 Ca^{2+} -ATP 酶活性受抑有关, 降低线粒体、微粒体对 Ca^{2+} 的封闭能力, 最终可导致细胞钙稳态失调, 胞浆中 Ca^{2+} 浓度升高, 引起细胞损伤及死亡^[7]。SOD 是一种带阴性电荷的金属蛋白酶, 其主要功能是催化超氧阴离子歧化反应。由于超氧阴离子是活性氧生成过程中的初始产物, 故 SOD 被看作是活性氧防御的第一线。缺血、缺氧等病理情况下, XOD 增加, 催化黄嘌呤氧化反应, 产生大量自由基, 自由基可造成生物膜损伤、细胞内环境紊乱、能量代谢障碍、蛋白合成受抑制、各种水解酶及毒性活性物质释放等。有报道铝中毒沙土鼠的脑组织 SOD 活性在中毒后 24 h 升至高峰, 为正常对照组的 1.65~2.00 倍^[8]。Yilmaz 等^[9]发现, 顺铂中毒后大鼠肝组织 XOD 上升, 采用咖啡酸苯乙酯保护后其 XOD 会明显下降。本实验结果显示, 小鼠 DMF 急性中毒后肝组织 SOD 和 XOD 在中毒后 24 h 上升, 推测中毒后黄嘌呤脱氢酶活性受到抑制, 转化为 XOD, XOD 升高可催化黄嘌呤氧化反应, 使得体内自由基产生增多, 同时血中 SOD 被消耗; 肝组织 SOD 升高可能是一种代偿性反应; DMF 急性中毒可干扰体内氧化酶/抗氧化酶系统, XOD 可能是肝脏损伤有意义的指标, DMF 对肝脏的损害可能是通过干扰肝脏的氧化酶/抗氧化酶系统起作用的。

巯基化合物具有抗氧化作用, 通常作为各种化学物急性中毒的解毒药物^[5,10]。郭风华等^[11]发现, 腹腔注射 DMF 后肝组织 GSH、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶在注射后 24 h 降低, 给予 NAC 连续灌胃后上述指标改善。司良毅等^[12]体外研究 NAC 对心肌细胞缺氧/复氧性损害的干预作用时发现, NAC 可减少缺氧和炎症介质白细胞介素-1 β 刺激所造成的细胞内 SOD 和 GSH 下降幅度以及丙二醛(MDA)升高幅度。本实验中观察了 4 种不同巯基化合物对 DMF 急性中毒后氧化酶/抗氧化酶毒性的保护作用。为了方便 4 种药物之间的比较, 我们采用等巯基剂量给药。结果发现, Na-DMPs、NAC 和 DMSA 对 DMF 急性中毒后肝组织升高的 SOD、XOD 有降低作用, GSH 对中毒后肝组织 XOD 升高

有下降作用, 但对 SOD 无明显影响, 该结果提示, Na-DMPs、NAC 和 DMSA 可通过平衡氧化酶/抗氧化酶系统对 DMF 中毒有治疗作用, 保护肝功能。

外源性 GSH 被广泛用于各种肝炎的治疗。但有研究指出, 由于 GSH 不能以还原型进入细胞内, 且其在血中半衰期很短, 故并不能有效地提高细胞内 GSH 含量^[13]; 而大剂量或连续给予其前体物质半胱氨酸有一定的治疗效果。本实验中发现, DMF 急性中毒时使用 GSH 干预, 可对 XOD 产生影响, 但未见对 SOD 产生影响, 关于 GSH 对氧化酶/抗氧化酶系统的影响以及肝功能保护作用的确切疗效有待于进一步研究。

参考文献:

- 1 史懋功, 战波, 李莉. 急性二甲基甲酰胺中毒事故的调查[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21(6): 446.
- 2 黄芙蓉, 戴秀莲. 二甲基甲酰胺毒性及中毒机制研究近况[J]. 化工劳动保护, 2000, 21(4): 141-143.
- 3 Imazu K, Fujishiro K, Inoue N. Effects of dimethylformamide on hepatic microsomal monooxygenase system and glutathione metabolism in rats[J]. Toxicology, 1992, 72(1): 41-50.
- 4 郑全美, 皮静波, 刘宣军, 等. 谷胱甘肽单乙基酯对小鼠体内 GSH 含量的影响[J]. 中国公共卫生学报, 1996, 15(4): 218-220.
- 5 邱俏樱, 陈春泉, 卢中秋, 等. 二甲基甲酰胺急性中毒的临床诊断与治疗[J]. 中国急救医学, 2005, 25(7): 532-533.
- 6 史懋功, 李莉, 唐玉清. 急性二甲基甲酰胺中毒致亚急性肝坏死一例[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22(3): 234.
- 7 菅向东, 陶宝甜, 乔赐彬, 等. 二甲基甲酰胺对肝脏钙稳态影响的实验研究[J]. 中国公共卫生学报, 1997, 16(3): 180-182.
- 8 Micic D V, Petronijevic N D, Vucetic S S. Superoxide dismutase activity in the mongolian gerbil brain after acute poisoning with aluminum[J]. J Alzheimers Dis, 2003, 5(1): 49-56.
- 9 Yilmaz H R, Sogut S, Ozyurt B, et al. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats; protective effect of caffeic acid phenethyl ester[J]. Toxicol Ind Health, 2005, 21(3-4): 67-73.
- 10 张永田, 田永强, 王维成, 等. 二巯基丙磺酸钠联合维库溴胺治疗毒鼠强中毒的临床效果[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(10): 607.
- 11 郭风华, 杨文福, 穆进军, 等. N-乙酰半胱氨酸对二甲基甲酰胺所致急性肝损伤的保护作用[J]. 职业与健康, 2002, 18(8): 8-10.
- 12 司良毅, 陈运贞. N-乙酰半胱氨酸对培养心肌细胞缺氧/复氧性损害的干预研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(10): 602-605.
- 13 Aebi S, Assereto R, Lauterburg B H. High-dose intravenous glutathione in man, pharmacokinetics and effects on cyst(e) in plasma and urine[J]. Eur J Clin Invest, 1991, 21(1): 103-110.

(收稿日期: 2006-10-28 修回日期: 2007-03-02)

(本文编辑: 李银平)