

亚硝酸盐对实验小鼠的神经毒性作用

张兆强 林 立 张春芝 聂继池

(济宁医学院公共卫生学院, 济宁 272067)

摘要 **目的** 探讨经消化道亚硝酸盐染毒对实验小鼠产生的神经毒性作用。**方法** 将 80 只小鼠随机分为对照组、低剂量、中剂量和高剂量组, 每组 20 只。对照组给予自来水, 低剂量、中剂量、高剂量组分别自由饮浓度为 0.055mg/ml、0.11mg/ml、0.22mg/ml 的亚硝酸钠溶液。2 周后, 分别进行小鼠后肢撑力、饥饿觅食、走格、鼠尾悬挂测试等反映神经毒性的系列实验。**结果** 小鼠后肢落地间距, 中剂量、高剂量组明显低于对照组 ($P < 0.05$), 与低剂量组比, 中、高剂量组的后肢落地间距均变低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而中、高剂量组间无统计学意义 ($P > 0.05$); 饥饿觅食试验第 1 次成功觅食时间, 各剂量组均明显比对照组时间长 ($P < 0.05$), 第 2 次成功觅食时间, 中剂量、高剂量组长于对照组 ($P < 0.05$), 且 2 个成功觅食时间都有随剂量增加时间更长的趋势; 穿格次数, 高剂量组显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其他组间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 鼠尾悬挂实验挣扎时间则表现为低剂量、中剂量、高剂量组比对照组短 ($P < 0.05$), 与低剂量组比, 中剂量组无统计学差异 ($P > 0.05$), 高剂量组则有统计学差异 ($P < 0.05$); 高剂量组与中剂量组也有统计学差异 ($P < 0.05$), 且剂量越大, 挣扎时间越短。**结论** 亚硝酸盐对实验小鼠具有神经毒性。剂量越大, 毒性越明显。

关键词 亚硝酸盐; 行为功能; 神经毒性; 小鼠

中图分类号: R114 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2016)02-017-04

The neurotoxic effects of nitrite on the experimental mice

ZHANG Zhaoqiang, LIN LI, ZHANG Chunzhi, NIE Jichi

(School of Public Health, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract; Objective To study the neurotoxic effects of nitrite on the experimental mice. **Methods** 80 mice were randomly divided into control group, low dose group, middle dose group and high dose group. The control group was fed with tap water, and the low, middle, high dose group were fed with different concentration sodium nitrite (0.055mg/ml, 0.11mg/ml, 0.22mg/ml). 2 weeks later, all the mice were measured with after-arm supporting force, hunger for food experiment, go grid, mouse tail suspension test. **Results** In the after-arm supporting force test, compared with the control group, the average length of middle dose and high dose group were significantly low ($P < 0.05$). Compared with the low dose group, the average length of after arm supporting force of middle dose and high dose group were significantly lower ($P < 0.05$), but there was no significant difference between middle dose and high dose groups ($P > 0.05$). In the hungry for food experiment, the 1st successful foraging time of 3 experimental groups were all longer than the control group ($P < 0.05$), and the 2nd successful foraging time of middle and high dose group were longer than the control group ($P < 0.05$). Each of the 2 successful foraging time showed an increasing trend with the increasing dose ($P < 0.01$). In go grid the time of high group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$), and there was no significant difference between the other groups ($P > 0.05$). In the mouse tail suspension test, compared with the control group, the struggling time of 3 dose groups were shorter ($P < 0.05$). Compared with the low dose group, the middle dose group had no significant difference, while the high dose group had statistical differences. And there was significant difference between high dose group and middle dose group. The struggle became shorter with the increasing dose. **Conclusion** Nitrite exposure had a neurotoxicity effects on the experimental mice. The higher the dose, the more obvious the toxicity.

Keywords: Nitrite; Behavior function; Neurotoxicity; Mice

作为食品中常用作发色剂和防腐剂使用^[1]的亚硝酸盐,在腌肉工业上有着特殊的用途,然而,过量使用会对人体造成一定的危害^[2]。目前对亚硝酸钠的危害研究多集中在其高铁蛋白生成作用而产生的血液毒性上,至于其对神经系统的影响,目前国内外尚未有相关报道。鉴于此,本文拟采取经消化道亚硝酸盐对小鼠染毒 2 周,通过测定了小鼠的后肢撑力、饥饿觅食、走格、鼠尾悬挂等试验,综合评价亚硝酸盐对小鼠神经系统的损害,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

昆明种小鼠 80 只,体重 18 ~ 22g,由济宁医学院实验动物中心提供,动物质量合格许可证编号:SCXK(晋)2009-0001。适应性饲养 1 周后,随机分为对照组和低、中、高 3 个剂量组,对照组给予自来水,低、中、高剂量组分别给予 0.055mg/ml、0.11mg/ml、0.22mg/ml 的亚硝酸钠溶液。采取自由饮的模式染毒,自由进食,染毒 2 周。

1.2 方法

1.2.1 后肢撑力试验 末次染毒后,用手轻抓住小鼠背部皮肤,使其处于水平方向,距离下方着陆地面约 30cm,让小鼠自由下落,测量其着地时双后肢滑开的最远距离。间隔 30min 重复该试验,共重复 3 次,取均值作为该鼠的后肢落地间距。该指标反映动物动作的协调性及肌力。

1.2.2 饥饿觅食试验 本实验采用 3 个互为 120°的 Y 臂装置,在一臂端放鼠,一臂端放置食物,将动物禁食 1d,动物会进行觅食活动,记录从将动物放入到其找到食物的时间,5min 后重复该试验。第 1 次成功觅食的时间,反映小鼠学习能力;第 2 次成功觅食时间,反映小鼠的记忆能力。

1.2.3 走格试验 将长约 60cm 的方桌,平均划分为 9 格。将小鼠从中间格放入,如果动物三爪进入另一格,记为穿格 1 次,记录动物 5min 内的穿格次数,本指标反映动物的焦虑。

1.2.4 鼠尾悬挂试验 手拎小鼠尾部,使其距地约 1m,动物因倒垂而出现挣扎,最后会因为“绝望”而放弃挣扎(中间间隔 10s 不动为标准),记录从鼠尾开始悬挂到不挣扎所用的时间。该指标反映动物对外界不良刺激反抗不成功后的心理疲劳。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件对试验数据进行统计学处理,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间用 F 分析,并用 LSD 法进行两两比较。

2 结果

2.1 亚硝酸钠染毒对小鼠后肢撑力的影响

4 个组间的后肢落地间距总体有统计学差异($F = 4.59, P < 0.05$),两两比较发现:与对照组比较,低剂量组无统计学差异,而中、高剂量组的后肢落地间距变低($P < 0.05$);与低剂量组比较,中、高剂量组的后肢落地间距均变低($P < 0.05$);而中、高剂量组间则无统计学差异。结果见表 1。

表 1 各组小鼠量落地后两后肢之间的距离(cm, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	两后肢之间的距离
对照组	20	5.26 ± 0.34
低剂量组	20	5.39 ± 0.52
中剂量组	20	4.84 ± 0.74**
高剂量组	20	4.96 ± 0.59**

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与低剂量组比较, # $P < 0.05$ 。

2.2 亚硝酸钠染毒对小鼠饥饿觅食的影响

亚硝酸钠染毒对小鼠的学习能力和记忆能力均产生了影响。反映学习能力的第 1 次成功觅食时间,4 个组间总体上有统计学意义($F = 8.47, P < 0.05$);LSD 两两比较发现:与对照组比较,各剂量组成功觅食时间显著延长;与低剂量比较,高剂量有统计学差异,中剂量无统计学差异;高剂量与中剂量间也有统计学差异;第 1 次成功觅食时间与剂量之间的呈正相关($r = 0.96, P = 0.00$)。反映记忆能力的第 2 次成功觅食时间,也有同样的结果($F = 6.58, P < 0.05$);LSD 检验结果显示:低剂量组与对照组相比无统计学差异,而中、高剂量组的成功觅食时间均长于对照组和低剂量组($P < 0.05$);高剂量组与中剂量组相比,也有统计学差异;对第 2 次成功觅食时间进行与剂量进行相关性分析($r = 0.92, P = 0.00$)。2 次成功觅食时间均呈现剂量越大,成功觅食时间越长的趋势。见表 2。

2.3 亚硝酸钠染毒对小鼠走格试验的影响

4 个组间小鼠的穿格次数,总体间有统计学意义($F = 4.55, P < 0.05$),LSD 两两比较发现,仅高剂量组与对照组比较有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 小鼠饥饿觅食 2 次成功觅食时间(s, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 1 次成功觅食时间	第 2 次成功觅食时间
对照组	20	33.76 ± 11.86	25.55 ± 8.12
低剂量组	20	51.22 ± 17.53 *	24.91 ± 7.13
中剂量组	20	53.34 ± 19.75 *	29.83 ± 8.15 **
高剂量组	20	137.73 ± 32.14 ***	33.82 ± 11.90 ***

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与低剂量组比较, # $P < 0.05$;与中剂量组比较, ※ $P < 0.05$ 。

表 3 各组小鼠穿格次数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	穿格数
对照组	20	21.81 ± 10.96
低剂量组	20	20.53 ± 11.71
中剂量组	20	25.36 ± 12.31
高剂量组	20	27.12 ± 13.09 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 亚硝酸钠染毒对鼠尾悬挂试验的影响

3 个剂量组与对照组, 总体上有统计学差异 ($F = 7.56, P < 0.05$), LSD 检验显示, 低、中、高剂量组的挣扎时间均显著少于对照组 ($P < 0.05$); 与低剂量组比, 中剂量组无统计学差异, 高剂量组则有统计学差异; 高剂量组与中剂量组也有统计学差异, 对其进行相关分析 ($r = -0.97, P = 0.00$), 剂量与挣扎时间呈负相关, 剂量越大, 小鼠挣扎时间越少。见表 4。

表 4 鼠尾悬挂挣扎的时间分布(s, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	挣扎时间
对照组	20	378.25 ± 256.00
低剂量组	20	269.79 ± 111.63 *
中剂量组	20	235.76 ± 102.79 *
高剂量组	20	175.83 ± 75.89 ***

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与低剂量组比较, $P < 0.05$;与中剂量组比较, ※ $P < 0.05$ 。

3 讨论

亚硝酸盐是一个常用的食品添加剂, 在食品工业中作为发色剂和防腐剂限量使用。其半致死量为 22 mg/kg^[1], 属高毒类物质, 成人食入 0.3 ~ 0.5 g 即可引起中毒甚至死亡。亚硝酸盐在现实生活中使用广泛, 造成该类中毒有较高的发生率, 其原因主要是食用该盐超标的肉类制品或误服。早期发现对于救治尤为关键, 寻找亚硝酸盐中毒的早期指标成为重中之重。机体接触亚硝酸盐后, 会产生

一系列的病理生理改变, 其中以神经行为功能的变化出现的最早, 也最为敏感, 研究亚硝酸盐的神经毒性对于预防其中毒有着极其重要的意义。

反映动物神经行为功能的实验很多, 目前常采用组合实验, 从不同的角度测量动物的神经行为功能。本实验采取小鼠后肢撑力、饥饿觅食、走格、鼠尾悬挂等实验作为一组实验组合, 设备简单, 易于操作, 指标客观。通过该组合实验, 可以综合性的判断亚硝酸盐染毒对小鼠的神经毒性。

在本实验中, 反映小鼠动作的协调性及肌力的后肢撑力出现下降; 反映学习能力的第 1 次饥饿觅食时间和反映记忆能力的第 2 次饥饿觅食时间延长; 反映动物焦虑的走格试验中小鼠穿格次数增多, 反映小鼠对外界不良刺激反抗不成功后的心理疲劳的鼠尾悬挂试验的挣扎时间缩短, 且剂量越大, 作用越明显。这些结果说明, 亚硝酸钠染毒已经对小鼠的神经行为能力产生了有害影响。

研究提示, 亚硝酸盐进入机体后可氧化血红蛋白分子中的 Fe^{2+} , 生成高铁血红蛋白^[3]。从而使血红蛋白失去运输从呼吸系统吸收的氧的能力, 造成组织细胞氧的供给下降。由于神经细胞对缺氧非常敏感, 且代偿能力也比机体的其他细胞弱, 因此, 在其他细胞未出现明显的改变时, 神经细胞已经受到了影响, 并表现出本文出现的一系列神经毒性症状。

自由基在亚硝酸盐的毒性中也占据着重要意义, 张毅等发现体外神经细胞老化培养, 培养液 MDA 升高, SOD 降低, 并认为自由基是导致其老化的重要原因^[4]。亚硝酸盐本身就是一个强化剂, 进入机体后可分解为 $NO^{[5]}$, NO 与超氧阴离子 (O_2^-) 生成强效细胞毒性物质 $ONOO^{-[6]}$, 攻击体内组织, 诱发脂质过氧化, 生成一系列新的自由基^[7-8]。这些自由基可以攻击神经系统, 产生神经毒性^[9-10]。导致小鼠亚硝酸盐染毒后, 表现出协调性和肌力、学习和记忆能力减退以及动物对不良刺激的反抗容易出现绝望、焦虑等各种神经行为的改变。

此外信号传导系统在亚硝酸钠所致神经行为功能损伤中也起到了一个重要作用, 亚硝酸盐的代谢产物 $ONOO^-$ 可通过 PKC-IK-动作电位, 硝基化海马神经元电压门控的钾通道蛋白, 造成神经系统损伤^[11]。 $ONOO^-$ 还可通过 cGMP-INa-AP 信号级联系统作用于海马神经元^[12]。动物海马区的损

伤,直接导致了神经行为功能的异常,既可表现为神经系统的实质性伤害,如出现动作协调性、学习、记忆能力下降,也可能表达为情感方面的受损,如动物容易出现焦虑、遇事容易绝望等负性情感,这与进入机体的亚硝酸盐的量有直接关系。

综上所述,亚硝酸钠染毒可以对实验小鼠的神经行为功能产生影响,相同的剂量对情感和运动的影响是不一样的,这主要跟各指标的阈值不同有关。神经毒性常发生在器质性病变之前,因此,观察机体亚硝酸盐染毒后产生的神经行为的改变,可及时、早期的识别其中毒,并采取合理的救治措施,防止机体出现不可逆的器质性损伤。神经毒性的发生机制十分复杂,亚硝酸盐在致机体神经毒性的过程中,究竟发生了哪些分子事件,这些分子事件对于机体有何意义,能否作为神经毒性的生物标志物,都有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] 郭一凡. 浅谈亚硝酸盐的危害[J]. 微量元素与健康研究,2012,29(6):73-74.

[2] 曹会兰. 亚硝酸盐对人体的危害和预防[J]. 微量元素与健康研究,2003,20(2):57-58. DOI:10.3969/j.issn.1005-5320.2003.02.027.

[3] 陈善林,张德成. 急性亚硝酸盐中毒的临床治疗[J]. 吉林医学,2015,36(10):2001-2002.

[4] 张毅,苏敏,蔡琰. 神经细胞老化过程中细胞内脂质过氧化反应程度和超氧化歧化酶活性的动态变化[J]. 中国临床康复,2005,9(26):179-181. DOI:10.3321/j.issn:1673-8225.2005.26.084.

[5] 魏晓军,陈丽,朱婧. 亚硝酸钠在失血性休克复苏中

对肺组织的保护作用[J]. 当代医学,2013,19(4):153-154. DOI:10.3969/j.issn.1009-4393.2013.4.110.

[6] 梁敏,吴多志. 亚甲蓝对体内过氧亚硝酸阴离子的清除作用[J]. 中国热带医学,2007,7(9):1556-1558. DOI:10.3969/j.issn.1009-9727.2007.09.022.

[7] Zhang G X, Kimura S, Murao K, et al. Role of neuronal NO synthase in regulating vascular superoxide levels and mitogen-activated protein kinase phosphorylation [J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(2):389-399. DOI:10.1093/cvr/cvn304.

[8] Touyz R M, Schiffrin E L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension [J]. Histochem Cell Biol, 2004, 122(4):339-352. DOI:10.1007/s00418-004-0696-7.

[9] 赵保路. 自由基、天然抗氧化剂与神经退行性疾病[J]. 生物物理学报,2010,26(4):263-274. DOI:10.1016/S0305-0491(97)00296-4.

[10] 蒋涛. 自由基与颅脑损伤的关系研究现状[J]. 医学综述,2013,19(15):2728-2732. DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2013.15.014.

[11] 朝巍,刘仕昌,张涛,等. 过氧亚硝酸阴离子供体通过蛋白激酶 C 途径抑制 CA1 区神经元延迟整流钾电流[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(5):900-904. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2011.05.013.

[12] 刘朝巍,韩大东,杨茜,等. 过氧亚硝酸阴离子通过鸟苷酸环化酶途径抑制钠电流影响海马神经元兴奋性[J]. 生物化学与生物物理进展,2008,35(2):195-200. DOI:10.3321/j.issn:1000-3282.2008.02.011.

(收稿日期 2015-09-03)

· 简讯 ·

《济宁医学院学报》影响因子再一次提升

据中国科技期刊引证报告统计:2015 年《济宁医学院学报》全年载文总被引频次 616,影响因子由 2014 年的 0.492 提升到 0.562;中国学术期刊影响因子年报也显示:2015 年《济宁医学院学报》的影响因子由 2014 年的 0.319 提升到 0.441。

两家权威数据库的期刊评价结果均显示:《济宁医学院学报》的多项评价指标连续 5 年不断攀升。在山东省同类院校中名列前茅。

本刊编辑部