

氟化钠对大鼠脑突触体膜 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性的影响

赵西龙¹ 高文华¹ 赵忠良¹ 张 铨²

摘要 用体内和体外试验的方法观察 NaF 对大鼠脑突触体膜 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性的影响。NaF(0.3、1.6、8.0、20.0、40.0mmol/L)明显抑制该酶活性,抑制率分别为 6.6%、18.0%、41.0%、55.5%和 63.1%,半数抑制浓度为 14.8mmol/L,存在明确的剂量效应与时间效应关系。酶底物动力学分析表明,NaF 的这种效应属非竞争性抑制。在妊娠期和哺乳期饮用 5、15 和 50mg/L 加氟水 50 天后,母鼠脑突触体膜 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性有降低趋势,其子鼠在 15 和 50mg/L 组该酶活性抑制达 11.3%和 32.1%。

关键词 氟化钠类 脑

Effects of Sodium Fluoride on the Activity of $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in Synaptic Membrane in Rat Brain Zhao Xi-long, Gao Wen-hua, Zhao Zhong-liang, et al., Department of Environment Health Ningxia Medical College, Yinchuan, 750004

Effects of sodium fluoride on $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of synaptic membrane in rat brain were studied with in vitro or in vivo methods. Concentrations of sodium fluoride of 0.3, 1.6, 8.0, 20.0 and 40.0 mmol/L can significantly inhibit the activity of the enzyme with proportions of 6.6%, 18.0%, 41.0%, 55.5% and 63.1%, respectively, and with a half inhibitory concentration of 14.8 mmol/L reflecting an obvious dose-effect and time-effect relationship. Analysis of enzyme substrate kinetics showed the effect that sodium fluoride had was a non-competitive inhibition. Activity of $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase on synaptic membrane in female rat brain showed a decreasing tendency after feeding with water fluorinated with 5, 15 and 50 mg/L of fluoride during their gestation and lactation for 50 days, and that in their newborn offsprings with 5 and 50 mg/L of fluoride was inhibited by 11.3 and 32.1%, respectively.

Key words Sodium fluoride Brain

近年研究表明,氟摄入过量除引起骨组织病变,还可造成神经组织间接和直接损害^[1],而有关氟对脑组织生化功能影响的报道较少^[2, 3]。鉴于 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶在维持神经细胞钙稳态中的重要作用,我们选用体内体外试验观察了 NaF 对大鼠脑突触体膜 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性的影响,以期为氟神经毒理研究提供部分实验依据。

材料和方法

1. 试剂和仪器: NaF(GR 北京化工厂)、ATP- Na_2 (Sigma 公司产品)、其余均为市售分析纯试剂。日立高速冷冻离心机、岛津

UV-120-02 紫外可见分光光度计。

2. 脑突触体膜的制备:按 Cotman 等蔗糖密度梯度离心法^[4]进行,并稍作改良。用 Lowry 法测定膜蛋白含量,膜样贮于-40℃冰箱备用。

3. $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性测定:按 Reinila 等^[5]钼铵定磷法测定 ATP 酶解释放的微量无机磷。酶的活性单位为 $\text{nmol}/\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

4. 体内试验:成年受孕 Wistar 大鼠(北京

1 宁夏医学院环境卫生教研室 银川市 750004

2 北京医科大学公共卫生学院

第一作者现在同济医科大学环境毒理研究室

本研究为国家自然科学基金资助课题

医科大学实验动物部)随机分成 4 组, 分别饮用 5、15 和 50mg/L 含氟水和蒸馏水。母鼠自交配之日持续饮用含氟水至哺乳期结束, 平均 50 天, 子鼠饮含氟水至生后第 80 天。脑突触体膜制备和酶活性测定与体外试验相同。

5. 统计方法: 用两组均数 *t* 检验及相关分析法比较实验组与对照组待测指标的差异。

结 果

1. NaF 体外对脑 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATP 酶活性的作用: 将突触体膜与 NaF 在 37℃ 水浴中作用 10min 后, 在 1.6~40.0mmol/L 剂量下酶活性明显降低, 呈剂量效应负相关 ($r=-0.993, P<0.01$)。与对照组比较, 抑制率达 18%~63%, 半数抑制浓度为 14.8mmol/L。

表 1 氟化钠对大鼠脑突触小体膜 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATP 酶的活性的影响

氟化钠 (mol/L)	$Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATP 酶活性 ($\bar{x} \pm s_x$)	抑制率 (%)
溶剂对照	158.1 ± 11.0	—
3.2×10^{-4}	147.6 ± 3.6*	6.6
1.6×10^{-3}	129.7 ± 9.6**	18.0
8.0×10^{-3}	93.2 ± 6.6**	41.0
2.0×10^{-2}	70.4 ± 3.9**	55.5
4.0×10^{-2}	58.3 ± 4.4**	63.1

与对照组比较 * $P<0.05$ (单侧), ** $P<0.01$ (双侧), $n=5$

此外, 选择 20mmol/L NaF 观察了酶活性抑制的时效关系。如图 1 所示, 随 NaF 与膜蛋白作用时间的延长, 酶活性逐渐降低。半对数相关分析表明, 氟对该酶活性的抑制有明显的时效关系 ($r=-0.966, P<0.01$)。

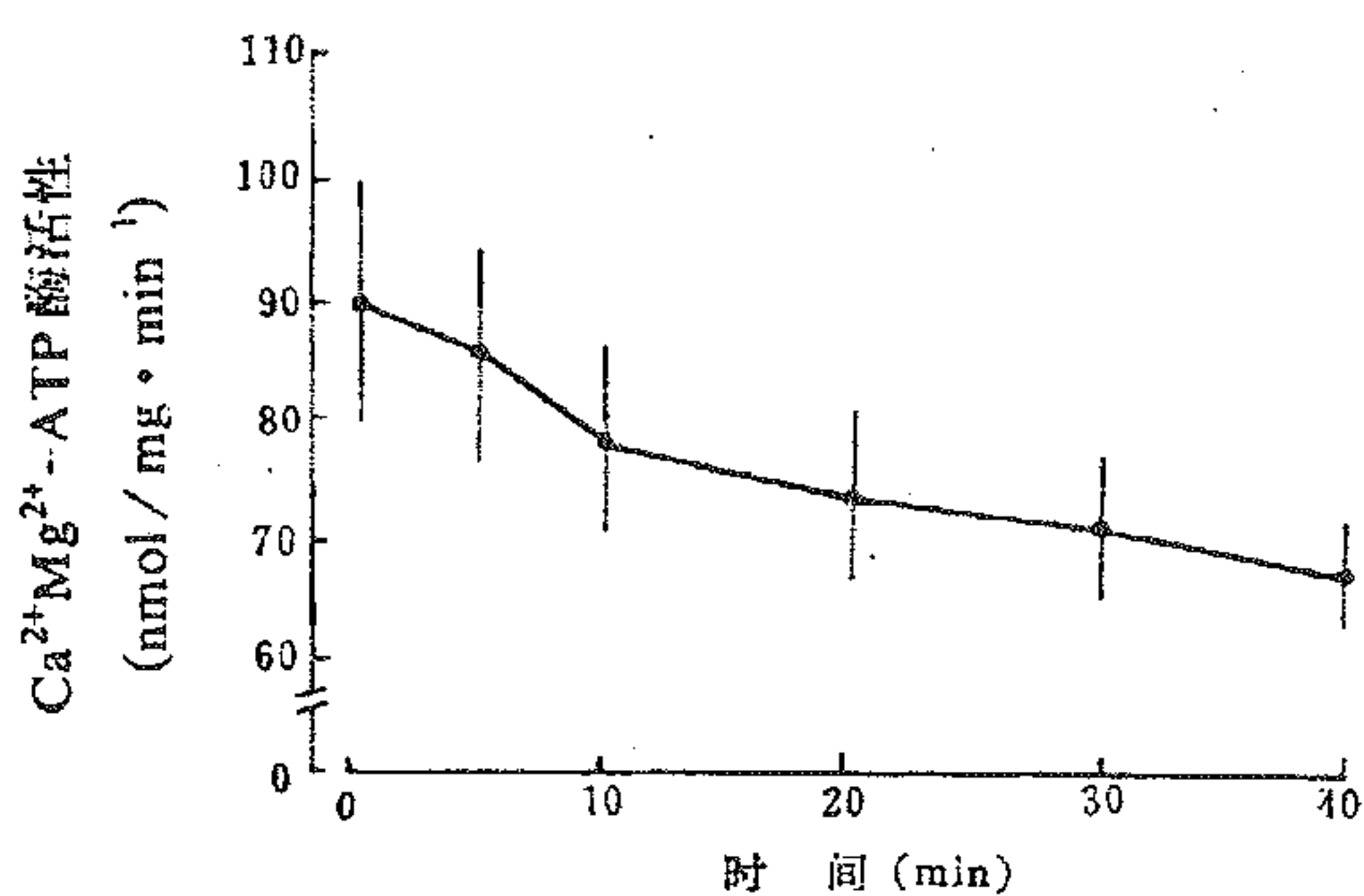
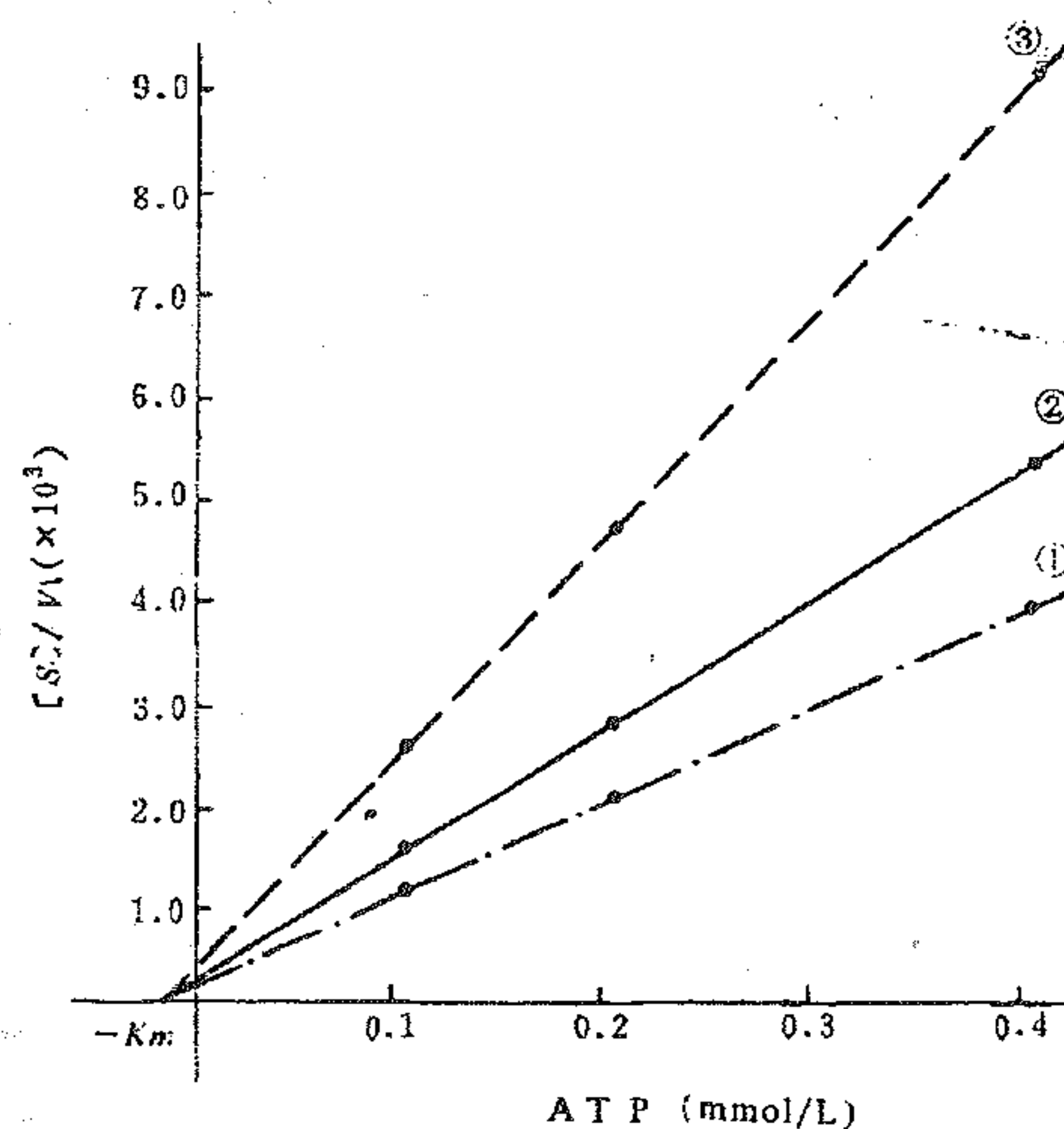


图 1 NaF 对脑突触体膜 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATP 酶活性作用的时效关系

2. 酶活性抑制的动力学分析: 实验中改变底物 ATP 浓度 (0.1、0.2、0.4mmol/L), 测定 ATP 酶解速率。用 Hanes 作图法进行酶底物动力学分析 (图 2), 随 NaF 剂量的加大, 最大反应速率 V_{max} 减小, 而米孟氏常数 K_m 值则无明显改变 (表 2), 即三条直线在横轴上相交一点。



- ① 1.6mmol/L NaF $Y_1=9.45X_1+0.14$
- ② 8.0mmol/L NaF $Y_2=12.86X_2+0.16$
- ③ 40.0mmol/L NaF $Y_3=21.12X_3+0.48$

图 2 NaF 抑制 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATP 酶活性的动力学分析曲线 (Hanes 作图法)

表 2 氟化钠对脑突触小体膜 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATPase 动力学参数的影响

氟化钠 (mol/L)	K_m (mol/L)	V_{max} (nmol/mg·min ⁻¹)
1.6×10^{-3}	1.48×10^{-5}	10.57
8.0×10^{-3}	1.24×10^{-5}	7.75
4.0×10^{-2}	2.27×10^{-5}	4.73

3. 体内实验: 母鼠饮用加氟水 50 天后, 脑突触体膜 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATP 酶活性随水中氟量增加而降低, 但与对照组比较差异无显著性 ($P>0.05$)。子鼠在出生后一直饮用含氟水至第 80 天, 其脑突触体膜 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATP 酶活性在 15 和 50mg/L 加氟组则明显降低 ($P<0.01$), 酶活性抑制率达 11.3%~32.1%,

明显高于同剂量组母鼠脑突触体膜该酶的活性, 并存在剂量效应关系(表 3)。

表 3 长期饮用高氟水对大鼠脑突触小体膜 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATP 酶活性的影响

饮水加氟 (mg/LF)	母鼠 ATP 酶 活性($\bar{x} \pm s_x$)	抑制率 (%)	子鼠 ATP 酶 活性($\bar{x} \pm s_x$)	抑制率 (%)
0	99.4 ± 16.7		94.4 ± 4.1	
5	96.0 ± 22.3	3.4	83.7 ± 13.4	11.3
15	92.8 ± 20.9	6.6	75.4 ± 5.2**	20.1
50	85.0 ± 15.8	14.5	64.0 ± 6.3**	32.1

与对照组比较 ** $P < 0.01$ (双侧), $n = 5$

讨 论

我们观察到 NaF 对大鼠脑突触体膜 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATP 酶的功能有一定的毒作用。体外试验中 NaF 在 0.3~40.0mmol/L 可明显抑制该酶活性, 体内长期摄氟的大鼠及其子代脑突触体膜该酶活性也有降低, 并有剂量效应关系, 而且子鼠酶活性抑制程度比母鼠更明显。其原因可能是子鼠染毒时间长, 氟在脑组织蓄积增加及作用时间延长所致, 体外试验表明 NaF 对该酶的作用有明确的时效相关关系; 另一方面可能是发育中的脑组织对氟的损害比较敏感; 还可能是氟离子易透过子鼠发育尚不完善的血脑屏障所致。要搞清这个问题尚需进一步研究。从酶底物动力学分析结果发现, 氟对该酶的抑制属非竞争性抑制, 即氟离

子与酶活性中心以外的功能基团结合, 降低酶分子的催化活性。可能是 F^- 体积小而负电性强, 破坏酶活性部位周围功能团间的氢键或与某些基团形成新的氢键结构, 引起酶分子构型的改变所致^[6]。由于 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATP 酶是神经细胞维持钙稳态的重要机制之一, 受抑制后会影神经细胞的正常生理功能。总之, 有关氟对神经细胞毒性作用的机理还需要从多角度进行探索。

参 考 文 献

- 1 Editorial review. Nonskeletal fluorosis. Fluoride, 1978, 11: 111.
- 2 Frank J. Symposium on the nonskeletal phases of chronic fluorosis: the spinal cord. Fluoride, 1976, 9: 30.
- 3 独立, 万昌武, 曹序茂, 等. 慢性氟中毒对人胎脑发育的影响. 中华病理学杂志, 1992, 21: 218.
- 4 Cotman CW, Matthews DA. Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes: isolation and partial characterization. Biochem Biophys Acta, 1971, 249: 380.
- 5 Reinila M, MacDonald E, Salem N, et al. Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosine triphosphatase. Analytic Biochem, 1982, 124: 19.
- 6 Narayanan N, Su N and Bedard P. Inhibitory and stimulatory effects of fluoride on the calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum. Biochem Biophys Acta, 1991, 1070: 83.

(收稿: 1993-12-02 修回: 1994-03-15)
(本文编辑 刘 群)

济宁市单采浆献血员 HCV 感染状况调查

赵凤英 史晓光 郑家珍 刘梅馨 褚 楠

我们对济宁市 1 757 名单采浆献血员和 184 名正常人群进行了抗-HCV 调查。献血员抗-HCV 阳性率为 37.56%; 正常人群(年龄性别与献血组有可比性)为 4.89%, 献血员抗-HCV 阳性率显著高于对照人群 ($\chi^2 = 78.72, P < 0.001$), 相对危险性为 7.68, 特异危险性为 86.98%。

男性献血员抗-HCV 阳性率为 42.11% (283/672), 女性为 34.75% (377/1 085), 男性高于女性 ($\chi^2 = 9.60, P < 0.01$)。对照组性别间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

不同血型之间抗-HCV 阳性率的差异无显著性 ($\chi^2 = 6.96, P > 0.05$)。

不同献浆年限(次数)与 HCV 感染的关系: <1 年、1 年~、2 年~、3 年~、>4 年以上组 HCV 感染率(%)分别为 12.5、32.62、36.40、37.97 和 39.57, 即 HCV 感染率随献浆年限(次数)增加而增高。

ALT(赖式法)水平与 HCV 感染的关系: ALT 阴性者抗-HCV 阳性率 34.76%; ALT20~40 单位者阳性率 59.52%; >40 单位者阳性率 73.00%, 抗-HCV 阳性率与 ALT 水平呈正相关。

(收稿: 1993-10-19 修回: 1993-12-15)
(本文编辑 邵隽一)

作者单位: 山东省济宁市卫生防疫站 272145