

慢性砷染毒对大鼠周围神经机械痛觉的影响及甲钴胺的干预作用

赖燕¹, 何麒麟², 段燕英²

1. 湖南省职业病防治院中毒医学科, 湖南 长沙 410007

2. 中南大学湘雅公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 湖南 长沙 410000

摘要:

[背景] 砷是广泛存在于自然界的一种有毒类金属元素, 经饮水摄入是其威胁人类健康的主要途径。慢性砷暴露造成多器官系统的损伤, 周围神经病变引起的感觉异常是最常见症状之一。

[目的] 探究慢性砷染毒对大鼠周围神经机械痛觉的影响及甲钴胺的干预作用。

[方法] 28只SPF级SD雄性大鼠随机分为对照组、25 mg·L⁻¹亚砷酸钠染毒组、100 mg·L⁻¹亚砷酸钠染毒组、100 mg·L⁻¹亚砷酸钠染毒+1 mg·kg⁻¹甲钴胺干预组(简称为干预组), 经饮水方式进行砷染毒。干预组在100 mg·L⁻¹亚砷酸钠溶液染毒的同时给予1 mg·kg⁻¹·d⁻¹甲钴胺溶液灌胃处理, 连续进行32周。在第10、20、30周时采用Von frey纤维丝测量大鼠后足机械痛阈值, 染毒结束时收取24 h尿样及坐骨神经。采用Western blotting法检测神经纤维髓鞘碱性蛋白(MBP)的表达, 免疫组化法检测炎症因子γ-干扰素(IFN-γ)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)的表达, 液相色谱-原子荧光联用法检测尿中砷代谢物浓度。

[结果] 染毒第20周时, 相比于对照组(14.67 g), 两个染毒组的机械痛阈值均值(9.14、6.80 g)分别下降了38%、54% ($P<0.05$), 干预组痛阈值(8.60 g)比100 mg·L⁻¹染毒组上升了27%, 但差异无统计学意义。两个染毒组坐骨神经中MBP表达水平(1.93±0.40、2.07±0.20)高于对照组(1.00±0.20) ($P<0.05$), 100 mg·L⁻¹染毒组炎症因子IFN-γ(14 287.98±10 218.73)、TNF-α(54.87±7.86)的表达均高于对照组(分别为5 704.22±1 341.28、37.28±10.12) ($P<0.05$)。相比于100 mg·L⁻¹染毒组, 干预组MBP表达(1.08±0.32)降低($P<0.05$), 炎症因子IFN-γ(9 408.49±3 228.92)、TNF-α(41.64±7.68)的表达无明显变化。染毒组尿中无机砷的质量浓度随染毒质量浓度的增高而增高($P<0.05$), 干预组[(704.42±207.88) μg·L⁻¹]比100 mg·L⁻¹染毒组[(479.04±92.91) μg·L⁻¹]更高($P<0.05$); 尿中二甲基砷也随染毒浓度的增高而增高($P<0.05$)。

[结论] 饮水慢性砷染毒引起大鼠机械痛阈值降低, MBP以及炎症因子IFN-γ、TNF-α表达升高。甲钴胺处理可降低MBP表达, 但在缓解砷诱导的机械痛觉异常中效果尚不明显。

关键词: 慢性砷染毒; 机械痛阈值; 甲钴胺; 髓鞘碱性蛋白; γ-干扰素; 肿瘤坏死因子α; 砷代谢

Effect of chronic arsenic exposure on peripheral nerve mechanical allodynia in rats and potential protection of mecobalamin LAI Yan¹, HE Qi-can², DUAN Yan-ying² (1. Poisoning Medicine Department, Hunan Provincial Institute for Occupational Health, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Department of Occupational and Environmental Health, Xiangya School of Public Health, Central South University, Changsha, Hunan 410000, China)

Abstract:

[Background] Arsenic is a toxic metalloid element widely distributed in natural environment, and a primary pathway for arsenic exposure is via drinking water. Chronic arsenic exposure may cause damage to multiple organs and systems, and sensory deficits caused by peripheral neuropathies are one of the most common complications.

[Objective] This experiment aims to explore the effect of chronic arsenic exposure on peripheral nerve mechanical allodynia in rats and the potential protection of mecobalamin.

[Methods] A total of 28 SPF SD rats were randomly divided into four groups: control group, 25 mg·L⁻¹ NaAsO₂ group, 100 mg·L⁻¹ NaAsO₂ group, and intervention group (100 mg·L⁻¹ NaAsO₂+1 mg·kg⁻¹ mecobalamin). The rats were exposed to arsenic by free drinking, and the rats in the

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19741

基金项目

湖南省医药卫生科研计划(B2011-110); 2018年度研究生创新项目(2018zzts852)

作者简介

赖燕(1967—), 女, 本科, 主任医师;
E-mail: 1276676924@qq.com

通信作者

赖燕, E-mail: 1276676924@qq.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-10-30

录用日期 2020-02-04

文章编号 2095-9982(2020)03-0260-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

赖燕, 何麒麟, 段燕英. 慢性砷染毒对大鼠周围神经机械痛觉的影响及甲钴胺的干预作用[J]. 环境与职业医学, 2020, 37(3): 260-266.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19741

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LAI Yan, E-mail: 1276676924@qq.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-10-30

Accepted 2020-02-04

►To cite

LAI Yan, HE Qi-can, DUAN Yan-ying. Effect of chronic arsenic exposure on peripheral nerve mechanical allodynia in rats and potential protection of mecobalamin[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(3): 260-266.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19741

intervention group was additionally given $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ mecobalamin solution by gavage; the experiment lasted for 32 weeks. The hind foot mechanical pain threshold was measured at the 10th, 20th, and 30th weeks with Von frey filament, and the 24 h urine samples and sciatic nerve samples were collected at the end of the exposure. The expression of myelin basic protein (MBP) was detected by Western blotting, the expressions of interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by immunohistochemistry, and the concentrations of arsenic metabolites in urine were detected by liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry.

[Results] At the 20th week, compared with the control group (14.67 g), the mean mechanical pain thresholds of the $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAsO₂ group (9.14 g) and the $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAsO₂ group (6.80 g) decreased by 38% and 54% respectively ($P < 0.05$), and the threshold of the intervention group (8.60 g) was higher than that of the $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAsO₂ group by 27% without statistical difference. The expression levels of MBP in the $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAsO₂ group (1.93 ± 0.40) and the $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAsO₂ group (2.07 ± 0.20) were higher than that in the control group (1.00 ± 0.20) ($P < 0.05$), and the expressions levels of IFN- γ and TNF- α in the $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAsO₂ group (respectively $14\,287.98 \pm 10\,218.73$ and 54.87 ± 7.86) were higher than those in the control group (respectively $5\,704.22 \pm 1\,341.28$ and 37.28 ± 10.12) ($P < 0.05$). The expression level of MBP was decreased in intervention group (1.08 ± 0.32) compared to that in the $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAsO₂ group ($P < 0.05$), and the expression levels of IFN- γ ($9\,408.49 \pm 3\,228.92$) and TNF- α (41.64 ± 7.68) did not significantly change. The concentrations of inorganic arsenic and dimethylarsinic acid in urine were increased with higher arsenic exposure dose ($P < 0.05$). Compared with the $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAsO₂ group [$(479.04 \pm 92.91) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$], the intervention group showed a higher inorganic arsenic level [$(704.42 \pm 207.88) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$] ($P < 0.05$).

[Conclusion] Chronic arsenic exposure of rats via drinking water can result in decreased mechanical pain threshold and increased expression levels of MBP and inflammatory factors (IFN- γ and TNF- α). The intervention of methylcobalamin can reduce the level of MBP, but its effect on alleviating the allodynia evoked by arsenic exposure is not obvious.

Keywords: chronic arsenic exposure; mechanical pain threshold; mecobalamin; myelin basic protein; interferon- γ ; tumor necrosis factor- α ; metabolism of arsenic

砷是广泛存在于自然界的一种有毒类金属元素, 可通过呼吸道、消化道和皮肤等多种途径进入人体。饮水砷中毒是环境砷中毒的常见途径。高砷水的摄入使全球数亿居民受到慢性砷中毒的威胁, 可对机体造成多系统、多脏器的损害^[1]。慢性砷暴露引起的周围神经病变是神经系统最常见的并发症之一, 且通常会影响感觉传导、神经传导速度^[2]。慢性砷中毒患者常出现异常疼痛、痛觉过敏、四肢麻木感、针刺感、痒感等感觉障碍^[3-5], 病理研究亦见周围神经轴突变性、脱髓鞘^[6-7]。这种与神经损伤有关的异常性疼痛成为日益严重的临床问题, 而其影响痛觉感受的机制目前尚不清楚。无机砷在体内主要通过甲基化反应后代谢排出体外^[8]。甲钴胺为维生素 B₁₂ 的一种活性形式, 是体内甲基化反应的重要辅助因子, 也是治疗周围神经病的常用药, 对临床和实验性周围神经病变存在有益作用。然而, 在砷中毒引起的周围神经损伤中甲钴胺是否能发挥其神经保护作用、减轻砷中毒引起的痛觉异常, 尚未见有研究报道。本研究通过构建慢性砷染毒大鼠及甲钴胺干预模型, 测量其机械痛阈的改变, 检测坐骨神经髓鞘碱性蛋白及炎症因子表达的变化, 探究砷染毒大鼠周围神经病理性疼痛的可能机制及甲钴胺的干预作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Von Frey 纤维丝 (Aesthesio, 美国 Danmic 公司),

LC-AFS6500 原子荧光形态分析仪 (中国北京海光仪器有限公司), AFS8230 原子荧光光度计 (中国北京吉天仪器有限公司), PRP-X100 阴离子交换色谱柱 ($250.0 \text{ mm} \times 4.1 \text{ mm} \times 10.0 \mu\text{m}$, 瑞士 Hamilton 公司), 一次性水系针头微孔过滤器 ($0.22 \mu\text{m}$, 中国上海安谱科学仪器有限公司), 蛋白免疫印迹试验仪器设备 (中国北京市六一仪器厂), Tanon-5500 全自动化学发光成像分析系统 (中国上海天能科技有限公司), 正置光学显微镜 (中国江苏世泰实验器材有限公司), CF160 光学成像系统 (日本尼康)。

亚砷酸钠 (纯度 $\geq 95\%$, 中国山东西亚化学工业有限公司), 甲钴胺胶囊 (中国山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司), 多克隆兔抗髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 抗体 (中国武汉 ABclonal 公司), 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法蛋白定量试剂盒 (中国杭州联科生物技术股份有限公司), 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔 IgG (美国 Bioworld 公司), 化学发光试剂盒 (美国 Genview 公司), γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 一抗、HRP 标记的山羊抗兔二抗、DAB 显色试剂盒 (中国武汉塞维尔生物科技有限公司)。

亚砷酸钠染毒溶液的配制: 准确称取 1 g 亚砷酸钠溶于 100 mL 蒸馏水中, 配成 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的亚砷酸钠储备液; 染毒前, 将储备液用蒸馏水稀释成 25 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的亚砷酸钠溶液。

1.2 实验动物分组及染毒方法

选用健康4周龄SPF级雄性SD大鼠28只,体重为100~120g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物合格证号:SCXK(湘)2016-0002。实验室内温度为20~26℃,湿度为50%~70%。实验期间,大鼠可自由摄食、饮水。适应性喂养1周后,采用随机数表法将大鼠随机分为4组,分别为对照(蒸馏水)组、25 mg·L⁻¹亚砷酸钠染毒组、100 mg·L⁻¹亚砷酸钠染毒组、100 mg·L⁻¹亚砷酸钠染毒+1 mg·kg⁻¹甲钴胺干预组(简称为干预组)。采用自由饮水方式进行连续亚砷酸钠染毒及甲钴胺灌胃干预32周。甲钴胺溶于蒸馏水中,按0.1 mL·kg⁻¹灌胃体积配成合适浓度,每日予1 mg·kg⁻¹灌胃。观察大鼠的一般情况变化,每周测量1次体重。

亚砷酸钠及甲钴胺浓度的设定均参考前人研究。大鼠亚砷酸钠半数致死剂量(median lethal dose, LD₅₀)为41 mg·kg⁻¹,取1/4 LD₅₀作为高染毒剂量,以每100g大鼠每日饮水量为10 mL计,确定本研究中亚砷酸钠高剂量组染毒质量浓度为100 mg·L⁻¹(即100 ppm),与Aguirre-Bañuelos等^[5]研究中的亚慢性染毒最高剂量一致;低剂量组为1/4高剂量组质量浓度,即25 mg·L⁻¹。常见的慢性砷染毒动物实验染毒时间多为6个月(24周)或者终生染毒,尚少见长于6个月又非终生的染毒期限,本研究为观察此阶段的变化选取32周作为染毒期限,占大鼠生命周期的1/4。Okada等^[9]的研究显示,在大鼠坐骨神经损伤模型中,1 mg·kg⁻¹·d⁻¹甲钴胺可促进神经再生和功能恢复,因此本研究以此作为干预剂量。

1.3 后足机械异常痛阈值测量

在第10、20、30周分别检测各组大鼠后足机械异常痛阈值。用后足缩足行为来评定大鼠机械痛阈值,具体方法参考Dilley等^[10]的研究。将大鼠置于金属网格笼中,适应环境15 min后,将Von Frey纤维丝通过底部网孔垂直扎向后爪的足底中部,给予的力度以可使纤维丝轻微弯曲为准,并保持6~8 s。若大鼠在此期间出现迅速缩爪或舔足现象,则记录此时的纤维丝克数。各纤维丝从2 g开始加量(4、6、8、10、15、26 g)并逐一测试,若2 g时大鼠有反应则测试1、1.4 g,间隔至少为5 s,直至大鼠出现缩足行为。实验重复5次,取5次纤维丝克数的均值作为阈值。

1.4 Western blotting法测定MBP表达

每组随机抽取5根大鼠坐骨神经,剪碎后加入5 mL·g⁻¹的RIPA裂解液(含1%蛋白酶抑制剂)匀浆,置于

4℃、以12 000 r·min⁻¹离心(离心半径为3.2 cm)30 min,取上清液,测定总蛋白浓度;将各样品的蛋白体积和浓度调整至一致,在蛋白提取液中加入1/4提取液体积的5×SDS上样缓冲液,再置于100℃水浴变性5 min。取20 μg总蛋白,于15%的SDS-PAGE凝胶中电泳2 h,将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上,3%脱脂牛奶封闭1 h,加入1:1 000的兔抗大鼠一抗,4℃摇床孵育过夜,用Tris-HCl+吐温缓冲液洗膜3次后加入1:5 000的HRP标记的山羊抗兔IgG,室温摇床孵育1 h,再次洗膜,并采用化学发光试剂盒检测蛋白表达量。灰度值分析采用Gel-Pro Analyzer 4.0软件进行,以GAPDH为内参蛋白,以目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达水平。实验独立重复3次。

1.5 免疫组化法测定IFN-γ、TNF-α表达

取大鼠坐骨神经,用4%多聚甲醛溶液固定24 h,常规脱水,石蜡包埋,切片(厚度为4 μm),常温下保存备用。采用免疫组化法检测IFN-γ、TNF-α的表达情况,具体操作步骤严格按照DAB显色试剂盒说明书进行。显微镜下观察,采集图像,阳性产物呈棕黄色或褐色,染色深浅表示阳性程度。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件计算阳性信号的积分光密度值(integrated optical density, IOD)。

1.6 尿中砷代谢物检测

采用液相色谱-原子荧光联用法。染毒结束时收集24 h尿样,根据过滤处理后尿样中的总砷浓度,用流动相将其稀释到合适范围,流动相为4 mmol·L⁻¹(NH₄)₂CO₃+4 mmol·L⁻¹(NH₄)₂SO₄混合液,pH为8.9。采用自动进样器自动进样,使用阴离子交换柱对不同形态砷进行分离,采用原子荧光检测器进行检测。

1.7 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行统计学分析。计量数据以均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析。各组间两两比较,正态分布且方差齐则采用LSD检验,否则采用Wilcoxon秩和检验法。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况

染毒32周后无动物死亡。对照组大鼠饮食、饮水量均正常,体重稳步增长,精神状态较好,行动、外观正常。亚砷酸钠染毒各组大鼠饮食、饮水量无明显变化,精神状态稍差,体重增长相比于对照组有所减慢,

但差异无统计学意义。干预组大鼠体重增长明显低于两个染毒组 ($P<0.05$)。各组大鼠体重变化见表 1。

2.2 后足机械异常痛阈值

在第 10、20、30 周分别检测各组大鼠后足机械异常痛阈值, 结果如表 2 所示: 染毒第 20 周时, 两个染毒组

的机械痛阈值均值 (9.14、6.80g) 比对照组 (14.67g) 下降了 38% 和 54% ($P<0.05$)。与对照组相比, 干预组机械痛阈值 (8.60g) 下降了 41% ($P<0.05$); 与 100mg·L⁻¹ 亚砷酸钠染毒组相比, 干预组机械痛阈值有所升高 (27%), 但差异无统计学意义。

表 1 亚砷酸钠染毒与甲钴胺干预对大鼠体重的影响 (n=7, $\bar{x}\pm s$, g)

组别	实验前	第 8 周	第 16 周	第 24 周	第 32 周
对照组	112.57±5.80	500.57±18.53	590.00±27.10	646.14±38.83	696.00±38.82
25 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒组	111.14±5.27	485.71±26.15	588.43±30.37	635.14±34.04	671.14±48.56
100 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒组	114.00±5.94	492.14±10.06	576.43±20.53	620.43±29.02	652.00±24.53
100 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒 +1mg·kg ⁻¹ 甲钴胺干预组	111.00±2.51	454.43±27.21 ^{ab}	530.43±45.25 ^{ab}	571.00±55.55 ^{ab}	611.57±54.06 ^a

[注] a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与 100mg·L⁻¹ 亚砷酸钠染毒组比较, $P<0.05$ 。

表 2 亚砷酸钠染毒与甲钴胺干预后大鼠后足机械痛阈值变化 (n=7, $\bar{x}\pm s$, g)

组别	第 10 周	第 20 周	第 30 周
对照组	18.00±7.84	14.67±1.76	12.20±5.07
25 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒组	16.20±9.55	9.14±3.43 ^a	9.13±4.77
100 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒组	9.40±3.13	6.80±1.72 ^a	6.67±3.04
100 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒 + 1 mg·kg ⁻¹ 甲钴胺干预组	13.60±8.26	8.60±1.14 ^a	7.07±3.18

[注] a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.3 坐骨神经 MBP 表达水平

亚砷酸钠染毒和甲钴胺干预后, 大鼠坐骨神经中 MBP 表达水平的变化如图 1、表 3 所示。与对照组相比, 两个染毒组的 MBP 表达量均增高 ($P<0.05$)。与 100mg·L⁻¹ 亚砷酸钠染毒组相比, 干预组的 MBP 表达量降低 ($P<0.05$)。

2.4 坐骨神经炎症因子的表达水平

各组大鼠坐骨神经中炎症因子 IFN- γ 、TNF- α 的表达情况分别见图 2 和表 4。相对于对照组, 100 mg·L⁻¹ 亚砷酸钠染毒促进坐骨神经炎症因子 IFN- γ 与 TNF- α

的表达 ($P<0.05$), 但甲钴胺干预对炎症因子的表达影响不明显。

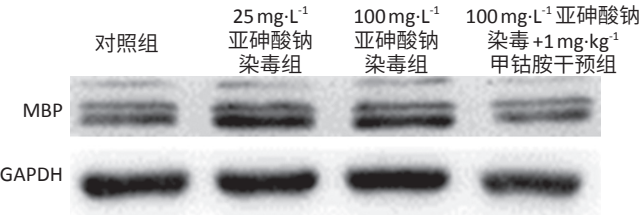
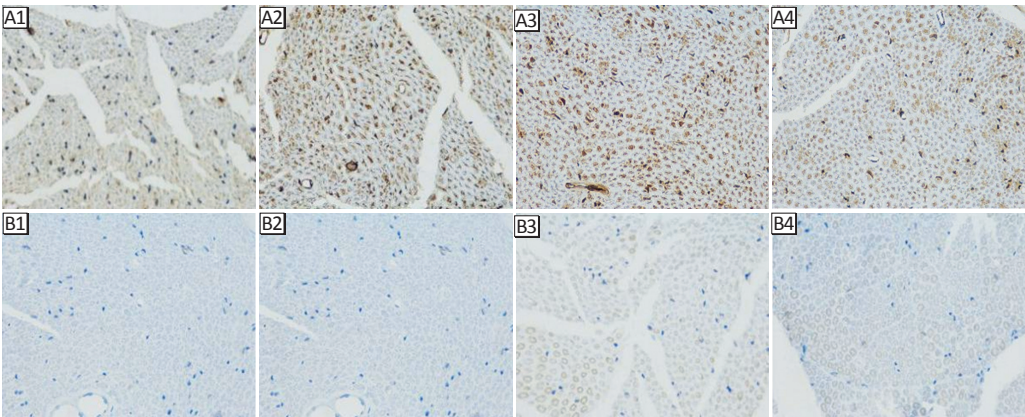


图 1 亚砷酸钠染毒与甲钴胺干预后大鼠坐骨神经髓鞘碱性蛋白 (MBP) 的表达水平 (n=3)

表 3 亚砷酸钠染毒与甲钴胺干预后大鼠坐骨神经髓鞘碱性蛋白的表达水平 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	MBP 相对表达水平
对照组	1.00±0.20
25 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒组	1.93±0.40 ^a
100 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒组	2.07±0.20 ^a
100 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒 +1mg·kg ⁻¹ 甲钴胺干预组	1.08±0.32 ^b

[注] a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与 100mg·L⁻¹ 亚砷酸钠染毒组比较, $P<0.05$ 。



[注] A: IFN- γ ; B: TNF- α 。1: 对照组; 2: 25 mg·L⁻¹ 亚砷酸钠染毒组; 3: 100 mg·L⁻¹ 亚砷酸钠染毒组; 4: 100 mg·L⁻¹ 亚砷酸钠染毒 +1 mg·kg⁻¹ 甲钴胺干预组。阳性产物呈棕黄色或褐色, 染色深浅表示阳性程度。

图 2 亚砷酸钠染毒与甲钴胺干预后大鼠坐骨神经中炎症因子 IFN- γ 和 TNF- α 的免疫组化结果 (×400)

表4 亚砷酸钠染毒与甲钴胺干预后大鼠坐骨神经中炎症因子 IFN- γ 和 TNF- α 表达的积分光密度值 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	IFN- γ	TNF- α
对照组	5 704.22 $\pm$ 1 341.28	37.28 $\pm$ 10.12
25 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒组	11 409.75 $\pm$ 2 631.87	35.14 $\pm$ 5.11 ^b
100 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒组	14 287.98 $\pm$ 10 218.73 ^a	54.87 $\pm$ 7.86 ^a
100 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒 + 1 mg·kg ⁻¹ 甲钴胺干预组	9 408.49 $\pm$ 3 228.92	41.64 $\pm$ 7.68

[注] a : 与对照组比较, $P<0.05$; b : 与 100 mg·L⁻¹亚砷酸钠染毒组比较, $P<0.05$ 。

2.5 尿中无机砷及二甲基砷浓度

亚砷酸钠染毒对大鼠尿中无机砷、二甲基砷的影响如表5所示。随着亚砷酸钠染毒质量浓度的增高,大鼠尿中无机砷的质量浓度增高 ($P<0.05$)。与 100 mg·L⁻¹亚砷酸钠染毒组相比,干预组中无机砷质量浓度增高 ($P<0.05$)。大鼠尿中二甲基砷浓度也随着亚砷酸钠染毒浓度的增高而增高 ($P<0.05$),然而甲钴胺干预组和 100 mg·L⁻¹亚砷酸钠染毒组相比,二甲基砷质量浓度差异无统计学意义。

表5 亚砷酸钠染毒与甲钴胺干预后大鼠尿中无机砷及二甲基砷质量浓度 ($n=5$, $\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

组别	无机砷	二甲基砷
对照组	0.00	77.78 $\pm$ 26.73
25 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒组	53.03 $\pm$ 73.29 ^a	3 960.97 $\pm$ 1 467.86 ^a
100 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒组	479.04 $\pm$ 92.91 ^a	10 529.44 $\pm$ 3 197.06 ^a
100 mg·L ⁻¹ 亚砷酸钠染毒 + 1 mg·kg ⁻¹ 甲钴胺干预组	704.42 $\pm$ 207.88 ^{ab}	9 811.62 $\pm$ 3 644.25 ^a

[注] a : 与对照组比较, $P<0.05$; b : 与 100 mg·L⁻¹亚砷酸钠染毒组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

在砷暴露所致多器官多系统的病变中,周围神经的损害不容忽视。有研究表明在职业砷中毒受访者中 33.3% 的人出现肢端疼痛、感觉异常^[11],且其病程长、恢复慢、损害作用不可逆,严重影响患者生活质量。这种神经系统损害导致的疼痛称为神经病理性疼痛^[12],而痛觉过敏是它最常见的表现。通常利用机械痛阈值来判断机械痛觉的异常。本研究发现慢性砷染毒降低了大鼠的机械痛阈值,与赵明^[13]的研究结果一致。本研究还发现砷染毒促进 MBP 和炎症因子 IFN- γ 和 TNF- α 的表达。

本研究通过饮水暴露于 0、25、100 mg·L⁻¹亚砷酸钠构建大鼠砷染毒模型,观察并查阅资料可知每 100 g 大鼠的日饮水量约为 10 mL,25、100 mg·L⁻¹亚砷酸钠暴露后实际体内暴露剂量约为 2.5、10 mg·kg⁻¹。暴露期间对各暴露组及干预组大鼠进行机械痛阈值测定,

由结果可见在染毒第 10 周时,并未见各组机械痛阈值明显改变,可能是由于染毒时间尚短,中毒损害尚浅。在 20 周时则可见染毒组痛阈值下降,但随着染毒时间延长至 30 周,各组间机械痛阈值的差异无统计学意义。一般来说染毒时间越长、暴露量越多,则损害越严重,但砷中毒引起的感觉障碍不仅包括痛觉过敏、异常疼痛、针刺感等,还可见麻木感、迟钝感、四肢末端手套袜套样感觉,并不一定观察到机械痛阈值的降低。且大鼠个体差异较大,个别大鼠的感觉麻木可能加大了机械痛阈值标准差,导致差异没有统计学意义。对此问题需要进一步的大样本研究。

MBP 是髓鞘的重要蛋白质,具有保持髓鞘结构、调节髓鞘膜之间黏附的作用。已有多项研究发现 MBP 可作为疼痛介质,诱发疼痛。Liu 等^[14]将 MBP84-104 肽段局部注射到正常大鼠坐骨神经后引发级联反应,使大鼠出现机械性异常疼痛,在这个过程中 MBP 免疫显性表位暴露。MBP 免疫表位(如 MBP84-104 和 MBP68-86)的暴露将激活 T 细胞(Th1、Th17)产生免疫应答,诱导机械性异常疼痛^[15]。本研究结果显示砷染毒诱导 MBP 蛋白表达增加,可能会使 MBP 的上述作用增强,这可能是砷诱导痛觉阈值降低的原因之一。

此外,促炎细胞因子在神经性疼痛中也发挥着举足轻重的作用。许多神经性疼痛的病例报道发现 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 等炎症因子在样本中的表达上调^[16-17],并且在外周神经性疼痛的动物模型中,结扎线松散放置在坐骨神经周围,即使未造成实际的机械损伤仍会发生痛觉过敏,说明炎症微环境和炎症介质的释放在神经性疼痛的发生中至关重要。早已有啮齿动物的研究证实,神经内施用 TNF- α 可诱导热痛觉过敏和机械性异常疼痛^[18],而阻断炎症因子 TNF- α 会减轻疼痛性神经病变模型中的痛觉过敏^[19]。外界因素通过诱导周围神经氧化损伤,促使施万细胞产生炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 。后者可直接刺激受损的神经纤维及神经元,使敏感性增加,出现机械性异常疼痛^[18]。本研究结果显示砷中毒大鼠出现机械异常疼痛,同时可见炎症因子 TNF- α 和 IFN- γ 表达上升,推测砷诱导的炎症因子水平增高在异常疼痛中发挥了一定的作用。此外,炎症和 MBP 也有一定关系。注射 MBP 诱导疼痛过敏时,研究者也观察到炎症因子的表达升高^[14]。炎症因子可以诱导施万细胞产生基质金属蛋白酶,后者降解 MBP^[20-21],暴露于髓鞘 A β 纤维,也可以导致机械性异常疼痛。

砷及其化合物在体内的代谢主要经砷甲基转移酶催化生成一甲基砷酸代谢物 (monomethylarsine, MMA) 和二甲基砷酸代谢物 (dimethylarsine, DMA), 通过尿液排出体外, 甲基化代谢过程是哺乳动物体内的解毒过程^[8]。流行病学调查发现, 膳食营养素如叶酸、蛋氨酸、维生素 B₂、维生素 B₆ 的摄入水平越高, 甲基化能力越强, 可通过降低尿液中的 MMA 或增加 DMA 来消除体内的砷^[22]。维生素 B₁₂ 是甲基化反应的重要参与者 S-腺苷甲硫氨酸合成的甲基供体^[23]。本研究结果显示甲钴胺干预后大鼠尿中无机砷浓度高于 100 mg·L⁻¹ 染毒组。2003—2004 年美国全国健康与营养调查研究^[24] 结果显示膳食维生素 B₁₂ 的摄入与尿中较高的无机砷、较低的 DMA 水平有关, 本研究的结果与之一致, 提示维生素 B₁₂ 可能会干扰尿中砷甲基化过程, 甲基供体与尿砷甲基化可能存在独立的其他关系, 具体机制的阐明仍需进一步的研究。维生素 B₁₂ 在疼痛治疗中亦有所应用, 有形态组织学的证据证实长期给予甲钴胺可促进髓鞘的合成和再生^[9], 抑制异位自发放电^[25], 进而改善周围神经病变中神经元功能、减轻疼痛发生。本研究中甲钴胺的应用虽对亚砷酸钠染毒后大鼠机械痛阈值和炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 表达的影响不明显, 但降低了 MBP 表达, 提示甲钴胺可能通过影响 MBP 来发挥作用。甲钴胺的保护作用仍需要通过阻断实验进一步证实。

在临床治疗中成人甲钴胺的剂量从 0.5~6 mg·d⁻¹ 均有使用^[23], 甚至在一项肌萎缩性侧索硬化患者长期 II、III 期随机对照研究中的使用剂量达 25 mg 和 50 mg, 未见明显毒副作用^[26-27]。目前一般认为维生素 B₁₂ 的安全性较高, 尚未知其容许摄入量的上限值。考虑到大鼠与人的差异, 药物的等效剂量并不与动物的体重成正比, 而是与单位体重的体表面积成正比, 小动物的等效剂量往往是人的数倍, 因此在动物实验中用药剂量可能较成人高。参考其他研究者在动物实验中的用量及效果^[9, 28-29], 本研究中甲钴胺的剂量选择为 1 mg·kg⁻¹。本实验中干预组出现体重下降可能与干预方式为灌胃有关, 此操作可能对大鼠食道产生损伤, 影响其进食, 但本实验未设计灌胃溶剂对照组, 存在缺陷。

综上所述, 本研究发现慢性砷染毒降低大鼠的痛觉阈值, 并促进 MBP 和炎症因子的表达。甲钴胺可以抑制 MBP 的表达, 但在缓解砷诱导的机械痛觉异常中效果尚不明显。

参考文献

- [1] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts [J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2012, 100 : 11-465.
- [2] 李曼莎, 刘露露, 杜勇, 等. 饮水途径慢性砷染毒大鼠坐骨神经髓鞘结构和功能的变化 [J]. 环境与健康杂志, 2018, 35 (1) : 34-38.
- [3] GARCÍA-CHÁVEZ E, SEGURA B, MERCHANT H, et al. Functional and morphological effects of repeated sodium arsenite exposure on rat peripheral sensory nerves [J]. J Neurol Sci, 2007, 258 (1/2) : 104-110.
- [4] MOCHIZUKI H, PHYU KP, AUNG MN, et al. Peripheral neuropathy induced by drinking water contaminated with low-dose arsenic in Myanmar [J]. Environ Health Prev Med, 2019, 24 (1) : 23.
- [5] AGUIRRE-BAÑUELOS P, ESCUDERO-LOURDES C, SANCHEZ-PEÑA LC, et al. Inorganic arsenic exposure affects pain behavior and inflammatory response in rat [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 229 (3) : 374-385.
- [6] MOCHIZUKI H. Arsenic Neurotoxicity in Humans [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (14) : 3418.
- [7] MOCHIZUKI H, YAGI K, TSURUTA K, et al. Prolonged central sensory conduction time in patients with chronic arsenic exposure [J]. J Neurol Sci, 2016, 361 : 39-42.
- [8] GRANDJEAN P, MURATA K. Developmental arsenic neurotoxicity in retrospect [J]. Epidemiology, 2007, 18 (1) : 25-26.
- [9] OKADA K, TANAKA H, TEMPORIN K, et al. Methylcobalamin increases Erk1/2 and Akt activities through the methylation cycle and promotes nerve regeneration in a rat sciatic nerve injury model [J]. Exp Neurol, 2010, 222 (2) : 191-203.
- [10] DILLEY A, RICHARDS N, PULMAN KG, et al. Disruption of fast axonal transport in the rat induces behavioral changes consistent with neuropathic pain [J]. J Pain, 2013, 14 (11) : 1437-1449.
- [11] SIŃCZUK-WALCZAK H, JANASIK BM, TRZCINKA-OCHECKA M, et al. Neurological and neurophysiological examinations of workers exposed to arsenic levels exceeding hygiene standards [J]. Int J Occup Med Environ Health, 2014, 27 (6) : 1013-1025.
- [12] LOESER JD, TREEDE R-D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology [J]. Pain, 2008, 137 (3) : 473-477.

- [13] 赵明. 慢性砷中毒大鼠背根神经节 NK-1 的表达 [D]. 石河子: 石河子大学, 2011.
- [14] LIU H, SHIRYAEV SA, CHERNOV AV, et al. Immunodominant fragments of myelin basic protein initiate T cell-dependent pain [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9 : 119.
- [15] KO JS, EDDINGER KA, ANGERT M, et al. Spinal activity of interleukin 6 mediates myelin basic protein-induced allodynia [J]. *Brain Behav Immun*, 2016, 56 : 378-389.
- [16] DE SOUZA GRAVA A L, FERRARI LF, DEFINO H L. Cytokine inhibition and time-related influence of inflammatory stimuli on the hyperalgesia induced by the nucleus pulposus [J]. *Eur Spine J*, 2012, 21 (3) : 537-545.
- [17] 黄姗姗, 徐文华, 马腾飞, 等. 三叉神经痛患者部分促炎因子水平变化及意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50 (5) : 711-713.
- [18] ZELENKA M, SCHÄFERS M, SOMMER C. Intraneural injection of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain [J]. *Pain*, 2005, 116 (3) : 257-263.
- [19] WAGNER R, MYERS RR, O'BRIEN JS. Prosaptide prevents hyperalgesia and reduces peripheral TNFR1 expression following TNF- α nerve injection [J]. *NeuroReport*, 1998, 9 (12) : 2827-2831.
- [20] CHATTOPADHYAY S, MYERS RR, JANES J, et al. Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia : implications for pathological processes and pain in injured nerve [J]. *Brain Behav Immun*, 2007, 21 (5) : 561-568.
- [21] HONG S, REMACLE AG, SHIRYAEV SA, et al. Reciprocal relationship between membrane type 1 matrix metalloproteinase and the algasic peptides of myelin basic protein contributes to chronic neuropathic pain [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 60 : 282-292.
- [22] LÓPEZ-CARRILLO L, GAMBOA-LOIRA B, BECERRA W, et al. Dietary micronutrient intake and its relationship with arsenic metabolism in Mexican women [J]. *Environ Res*, 2016, 151 : 445-450.
- [23] ZHANG YF, NING G. Mecobalamin [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, 17 (6) : 953-964.
- [24] KURZIUS-SPENCER M, DA SILVA V, THOMSON CA, et al. Nutrients in one-carbon metabolism and urinary arsenic methylation in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 [J]. *Sci Total Environ*, 2017, 607-608 : 381-390.
- [25] ZHANG M, HAN W, HU S, et al. Methylcobalamin : a potential vitamin of pain killer [J]. *Neural Plast*, 2013, 2013 : 424651.
- [26] KAJI R, IMAI T, IWASAKI Y, et al. Ultra-high-dose methylcobalamin in amyotrophic lateral sclerosis : a long-term phase II/III randomised controlled study [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2019, 90 (4) : 451-457.
- [27] IZUMI Y, KAJI R. Clinical trials of ultra-high-dose methylcobalamin in ALS [J]. *Brain Nerve*, 2007, 59 (10) : 1141-1147.
- [28] NISHIMOTO S, TANAKA H, OKAMOTO M, et al. Methylcobalamin promotes the differentiation of Schwann cells and remyelination in lysophosphatidylcholine-induced demyelination of the rat sciatic nerve [J]. *Front Cell Neurosci*. 2015, 9 : 298.
- [29] IKEDA K, IWASAKI Y, KAJI R. Neuroprotective effect of ultra-high dose methylcobalamin in wobbler mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 354 (1/2) : 70-74.
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 汪源; 校对: 陈姣)