

丙烯酰胺中毒后 6J 鼠神经组织离子的改变

赫秋月¹, 韩漫夫¹, 饶明俐²

(1. 深圳市红十字会医院, 广东 深圳 518035; 2. 白求恩医科大学一院, 吉林 长春 130021)

摘要: 目的 观察丙烯酰胺对 6J 鼠神经组织离子的影响。方法 采用化学沉淀法电子显微分析技术对 6J 鼠脊髓背根神经节细胞、腓神经轴突及线粒体中的离子改变进行分析。结果 胞质中 K^+ 和 Cl^- 在实验组均比对照组低, 但以第 1 周组降低最明显, Ca^{++} 、 Na^+ 和 P^{5+} 均升高, 以 Ca^{++} 升高最明显。结论 丙烯酰胺中毒后胞浆中 Ca^{++} 超载但总量不变。

关键词: 丙烯酰胺; 鼠

中图分类号: O623.626; Q954.67 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2000)05-0265-03

Effect of acrylamide on the ions in nerve tissue of 6J mouse

HE Qiu-yue¹, HAN Man-fu¹, RAO Ming-li²

(1. Red Cross Hospital, Shenzhen 518035, China; 2. Bethune Medical University, Changchun 130021, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of acrylamide on the ions in nerve tissue of 6J mouse. **Methods** The methods of chemical precipitation electron microanalysis were utilized. **Results** In one week group, the levels of K^+ and Cl^- decreased, the levels of Ca^{++} , Na^+ and P^{5+} increased. **Conclusion** Acrylamide may induce the Ca^{++} increase in cytochylema, but total amount is not change.

Key words: Acrylamide; Mouse

一些急性和慢性损伤(如缺血,汞中毒)对细胞内外离子的失调已经引起人们的关注^[1],其中尤以 Ca^{++} 的失调更为重要。Spencer^[2]最早提出丙烯酰胺(ACR)的病理过程中可能有 Ca^{++} 的参与,但对这个问题的详细研究是近年来由 LoPaehin 率领的实验小组开展的。他们采用冰冻超薄切片电子显微分析法对轴突、线粒体、雪旺细胞等部位离子改变进行观察,但是目前尚未见到神经元中离子改变的报告。我们采用化学沉淀法电子显微分析技术对 6J 鼠的脊髓背根神经节细胞、腓神经轴突及线粒体中的离子改变进行定性、半定量分析,观察其动态变化,试图发现离子的改变在 ACR 病理机制中的作用和变化规律。

1 材料和方法

6J 鼠 24 只,体质量 22~38g,6 只作为对照组,其余为实验组。实验组动物按 50mg/kg 腹腔注射 1% 浓度的 ACR,隔日一次,连续 9 次,总量 450mg/kg,分别在停止注射后 1 周、3 周和 5 周时取腰 4~5 的背根神经节和腓神经,将所取材料经水洗后立即放入 2% 焦锑酸钾+1% 锇酸后固定液中固定 2 小时,再水

洗 2 次后梯度乙醇脱水, Epon 环氧树脂包埋并聚合,修块后用超薄切片机切片,厚度为 1 500 Å 左右,在注满乙二醇的水槽中展片,并捞至铜网上,不染色,经 Hu-5GB 真空喷涂仪喷碳后(厚约 100 Å 以防止标本被烧坏)备检。将制备完的 1 500 Å 厚片放入石墨样品架上,直接装入电镜加电压,在电镜下寻找至预检的部位,包括胞质、轴突和线粒体,然后缩小电子束斑进行能谱测量。统计学分析采用 $\bar{x} \pm s$, 实验组与对照组比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 元素的能谱图分析

从计算机绘制出的能谱图上看几种元素的峰较高,从左向右依次是 Na^+ 、 P^{5+} 、 Cl^- 、 K^+ 和 Ca^{++} 。胞质中的 K^+ 和 Cl^- 在实验组均比对照组低,但以第 1 周组降低最明显,以后有升高倾向。 Ca^{++} 、 Na^+ 和 P^{5+} 均升高,其中以 Ca^{++} 升高最明显,恢复缓慢。线粒体和轴突中的离子变化规律大致与胞质中相同,但线粒体中 Na^+ 的变化不显著,轴突中 P^{5+} 的变化不大(见图 1~3)。

2.2 元素成分的半定量分析

从上述仪器描述的 X 射线能谱图上,扣除本底,计算出 Xi 元素的特征, X 线峰值积分强度 I_{xi} , 然后利用下面公式计算出这些元素间的相对浓度 C_{xi} 。 K_i

收稿日期: 1999-08-24; 修回日期: 2000-02-23

作者简介: 赫秋月(1958—),女,吉林长春人,博士,副主任医师,研究方向为中毒性周围神经病。

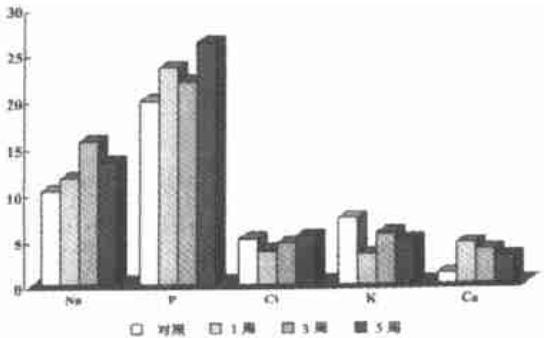


图 1 ACR 中毒后神经元胞浆中的离子改变

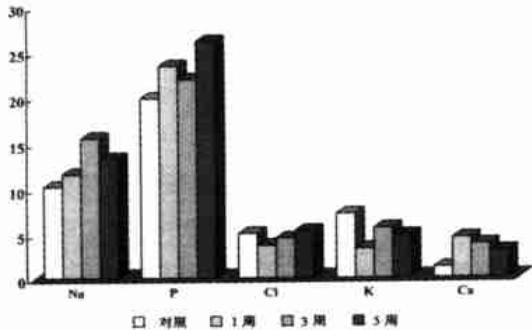


图 2 ACR 中毒后神经元轴突中的离子改变

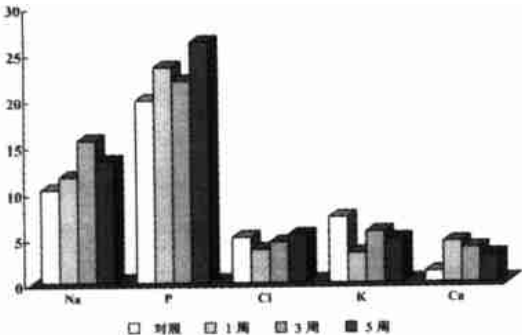


图 3 ACR 中毒后神经元线粒体中的离子改变

为Xi 元素的K 因子，可利用标样由实验测定。

$$C_{xi} = \frac{I_{xi}}{\sum K_i I_{xi}}$$

按公式计算出的Na⁺、P⁵⁺、Cl⁻、K⁺和Ca⁺⁺元素在胞质、线粒体和轴突中分布的相对浓度(见表1)。

3 讨论

Ca⁺⁺失调是由可逆到不可逆损伤的重要标志。近年LoPachin^[3,4]采用电子探针X线微分析技术对ACR中毒大鼠轴突节旁肿胀区和节内非肿胀区进行详细分析，发现节内非肿胀区轴浆内Na⁺增加，K⁺降低，节旁肿胀区轴浆和线粒体中Ca⁺⁺增加，其机制不清，可能是ACR所致的特异性改变。因为(1)此变化与神经毒性症状同时出现，且发生在后肢无力和明显的轴突变性之前；(2)以轴突的远端最明显；

表 1 胞质、轴突和线粒体中 5 种离子的相对浓度 Cxi ($\bar{x} \pm s$)

离子		胞质	轴突	线粒体
Na ⁺	对照	10.2±2.1	15.6±3.1	8.5±1.6
	1 周	11.6±2.3	14.8±2.5	9.2±1.9
	3 周	15.5±3.4 **	18.1±3.9	7.8±1.4
	5 周	13.3±2.6 *	17.9±3.5	10.1±2.1
P ⁵⁺	对照	19.8±4.0	42.3±9.8	24.5±5.3
	1 周	23.4±5.2	39.8±9.2	38.4±8.9 **
	3 周	21.9±4.2	41.2±9.8	32.5±7.5
	5 周	26.1±5.8	42.5±9.6	33.1±7.6 *
Cl ⁻	对照	5.0±1.1	38.1±8.7	40.3±9.1
	1 周	3.7±0.7 *	23.6±5.0 **	36.5±8.2
	3 周	4.5±0.9	25.3±5.4 *	34.3±7.5
	5 周	5.3±1.2	31.9±7.1	38.2±8.6
K ⁺	对照	7.2±1.9	40.7±9.2	44.2±10.6
	1 周	3.3±0.5 **	31.1±7.5	29.8±7.3 *
	3 周	5.6±1.6	34.5±7.9	32.1±6.9 *
	5 周	4.8±1.1 *	36.8±8.5	34.5±7.1
Ca ⁺⁺	对照	1.2±0.3	2.8±0.8	4.3±1.1
	1 周	4.5±1.1 **	4.8±1.1 **	5.9±1.5
	3 周	3.8±0.9 **	4.0±0.9 **	5.1±1.2
	5 周	3.0±0.8 **	3.5±0.7	4.0±0.8

*与对照组相比 P<0.05 **与对照组相比 P<0.01。

(3) 功能的恢复与轴浆内元素成分的恢复相关^[3]。我们的结果表明：胞质、轴突和线粒体中Ca⁺⁺在实验组均比对照组升高，以胞质第1周组最明显，以后下降，第5周仍明显高于正常，与LoPachin等报告的基本一致。Ca⁺⁺升高伴Na⁺的升高，K⁺的降低。病理结果表明：ACR病理改变第3周最显著，而离子改变第1周最明显，即胞质离子变化在先，轴突病理变化在后。

产生Ca⁺⁺增加的机理不清，曾经认为是继发或非特异的结果。由于神经微丝聚集或滑面内质网增多所致的轴突肿胀可能引起轴膜功能紊乱或激活对牵拉敏感的离子通道而提高非特异性Ca⁺⁺流入^[5]。随着研究不断深入，目前认为Ca⁺⁺是经Na⁺/Ca⁺⁺交换途径进入细胞^[9]。通常这种交换方式是利用Na⁺的跨膜梯度使Ca⁺⁺排出^[7]，然而，膜的去极化或轴浆内Na⁺升高导致Na⁺/Ca⁺⁺交换的逆转，使Ca⁺⁺进入轴浆内去交换Na⁺。已有研究证明ACR抑制Na⁺/K⁺-ATP酶，此酶在有髓纤维中呈节旁-节性分布，在空间上与ACR产生的节旁肿胀相一致。酶被抑制可能是由于(1)直接的神经毒易感酶的干扰；(2)能量代谢的抑制；(3)远端轴突蛋白激酶C的激活^[8]；或者是由于Na⁺/K⁺-ATP酶的顺行性运输的降低^[9]。

Na⁺/K⁺-ATP酶是维持Na跨膜梯度的基础，这

个酶被抑制将导致 Na^+ 经离子通道进入轴浆内。如上所述, Na^+ 和 K^+ 梯度的丧失伴随着膜的去极化发生, 为 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 交换的开放提供了一个必要的环境, 引起了 Ca^{++} 的内流, 结果引起由 Ca^{++} 始动的轴突变性。我们认为, 钙离子在 ACR 病理过程中的作用是钙在胞浆中的超载, 即钙离子在膜内外的分布发生变化, 由膜外向膜内转移, 钙离子的总量是不应该发生变化的。经 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 交换的非生理性浓度的 Ca^{++} 内流最初大多数可以被线粒体缓冲, 一部分被滑面内质网和膜上的 Ca^{++} -ATP 酶缓冲。然而, 在 ACR 中毒时肿胀轴突中的缓冲能力被破坏, 神经微丝在节旁的过度累积和随之发生的变性表明 Ca^{++} 的内流可能引起局部 Ca^{++} 依赖激酶和蛋白酶的激活, 这些酶对细胞骨架的完整性有重要作用, 并可以是变性的中间媒介。ACR 也可直接干扰细胞骨架的完整性^[10]。连续发生的轴突的破坏和 Ca^{++} 内流可以促使轴浆的崩解和远端轴突变性。ACR 产生的变性在远端轴突逆行性进展, 这种变性形式可能与由近端向远端的细胞体中轴浆物质的运输障碍有关。

了解 Ca^{++} 进入轴突的途径是深入研究化学毒物和其他类型神经损伤所致病理过程的基础, Ca^{++} 进入的分子机制可能是发掘有效治疗药物的焦点, 对预防或限制可逆性轴突损伤有一定意义。

(本文系作者在日本产业医科大学研修期间所做研究工作的一部分, 得到日本大西晃生教授的全力支持, 特此致谢!)

参考文献:

- [1] Trump B F, Beresky I K, Smith M W, et al. The relationship between cellular ion deregulation and acute and chronic toxicity [J]. *Tox Appl Pharmacol*, 1989, 97: 6-22.
- [2] Spencer P S, Schaumvig H H. Neurotoxic chemicals as probes of cellular mechanisms of neuromuscular disease. In: *Current Topics in Nerve and Muscle Research*, edited by A. J. Aguayo and G. Karpati North Holland: Elsevier, 1978 pp: 274-281.
- [3] LoPachin R M, Castiglia C M, Lehnig E J, et al. Effect of acrylamide on subcellular distribution of elements in rat sciatic nerve myelinated axons and Schwann cells [J]. *Brain Res*, 1993a, 608: 238-246.
- [4] LoPachin R M, Lehnig E J, Castiglia C M, et al. Acrylamide disrupts elemental composition and water content of rat tibial nerve; III. Recovery [J]. *Tox Appl Pharmacol*, 1993b, 122: 54-60.
- [5] Sachs F. Baroreceptor mechanisms at the cellular level [J]. *Fed Proc*, 1987, 46: 12-16.
- [6] LoPachin R M, Lehnig E J. Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, Apr, 143 (2): 233-244.
- [7] Allen T J A. Exchange in intact squid axons [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1991, 639: 71-84.
- [8] Lehnig E J, Mathews J, Eichberg J, et al. Changes in activities of Na^+/K^+ -ATPase and protein kinase C in peripheral nerve of acrylamide treated rats [J]. *J Toxicol Environ Health*, 1994, 42 (3): 331-342.
- [9] LoPachin R M, Lehnig E J, Stack E G, et al. 2, 5-Hexanedione alters elemental composition and water content of rat peripheral nerve myelinated axons [J]. *J Neurochem*, 1994, in press.
- [10] Carrington C D, Lapadula D M, Dulak L, et al. In vivo binding of [^{14}C] acrylamide to proteins in the mouse nervous system [J]. *Neurochem Int*, 1991, 18: 191-197.

《中国工业医学杂志》2001 年征订工作开始

《中国工业医学杂志》是中华人民共和国卫生部主管, 中华预防医学会主办的全国性学术刊物。本刊为预防医学、卫生学中文核心期刊, 国家科技部中国科技论文统计源期刊。

本刊贯彻“立足实际、放眼未来、百家争鸣、求新求实”的宗旨, 在坚持科学性、实用性的基础上, 以综合报道劳动卫生职业病为主要内容的同时, 近年又新增加了职业性外伤、烧伤, 农药中毒, 职业性妇科、五官科多发病等内容。本刊愿成为劳动卫生职业病工作者及厂矿工卫、安技人员和综合性医院医务工作者、医学院校师生的良师益友。在全国首届优秀科技期刊评比中本刊曾获三等奖, 并在中华预防医学会系列杂志评比中多次获得优秀期刊奖。

本刊设有论著、专题交流、讲座、综述、临床实践、调查报告、病例报告、知识更新、尘毒防治及劳动卫生管理、监测技术等栏目。

本刊为双月刊, A4 开本, 64 页, 每期定价 6.00 元, 全年定价 36.00 元 (含邮费)。邮发代号: 8—215。2001 年报刊征订工作已开始, 请订阅者速到当地邮局订阅。

在邮局漏订的订户, 可直接与编辑部联系。编辑部地址: 沈阳市铁西区南十一西路 18 号 (邮编 110024), 电话: 024-25741990/024-25731631 转 9824。开户行: 交通银行沈阳分行铁西办事处 (邮编 110021), 帐号: 203201502043-08, 帐户: 《中国工业医学杂志》编辑部。款到即寄发票。

欢迎订阅与投稿。