

锰对仔鼠黑质神经元特异性烯醇化酶的影响

张本延, 宋世震, 朱长才, 彭晓武, 范丽蓉

(武汉科技大学医学院劳动卫生与环境卫生学教研室, 湖北 武汉 430080)

摘要: 目的 研究孕鼠染锰对其子代脑黑质中神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 的影响。方法 将已受孕大鼠随机分为 3 组, 在妊娠的第 1~15 d 隔日 1 次腹腔内注射氯化锰, 剂量分别为 0、7.5、15 mg/kg, 然后运用免疫组化法检测其 21 日龄仔鼠脑黑质和尾壳核的 NSE, 并用图像分析仪定量分析。结果 实验各组仔鼠脑黑质和尾壳核中 NSE 阳性神经元的平均吸光度、积分吸光度均明显低于对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 大鼠孕期染锰, 可导致子代脑黑质 NSE 阳性神经元减少, 引起中枢神经发育障碍。

关键词: 锰; 仔鼠; 黑质; 神经元特异性烯醇化酶

中图分类号: O614.71 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)05-0263-03

Effect of manganese on activity of neuron specific enolase in substantia nigra of filial rats

ZHANG Ben-yan, SONG Shi-zhen, ZHU Chang-cai, PENG Xiao-wu, FAN Li-rong

(Department of Occupational and Environmental Health, Medical School, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430080 China)

Abstract: **Objective** To study the effect of exposure to manganese in pregnant rats on the neuron specific enolase (NSE) in the substantia nigra of their offsprings. **Method** Pregnant rats were randomly divided into three groups receiving intraperitoneal injections of manganese chloride ($MnCl_2$) 0, 7.5 mg/kg and 15mg/kg, respectively, every other day for 8 times and then NSE in the substantia nigra and caudate putamen nucleus was detected by immunohistochemistry method for their 21-day-old filial rats and quantified by image analysis system. **Result** Average optical density and integral optical density of the NSE positive neuron in the substantia nigra and caudate putamen nucleus of 21-day-old filial rats in varied experimental groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$) decreased significantly, as compared with those in control group. **Conclusion** Exposure to manganese in pregnant rats could result in reduction of NSE positive neuron in the substantia nigra of their filial rats suggesting manganese could cause impairment of central nervous system development in rats.

Key Words: Manganese; Filial rat; Substantia nigra; Neuron specific enolase

锰对中枢神经系统的损害以锥体外系为主, 主要累及中脑黑质和纹状体等基底神经节^[1]。锰还具有生殖毒性, 女性在孕期接触锰, 能通过胎盘屏障转运至胚胎以及通过乳汁分泌影响后代, 对其子代的生长发育产生有害影响^[2,3]。神经元特异性烯醇化酶 (neuron specific enolase, NSE) 是脑内糖酵解过程中的一个关键酶, 它催化 α -磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸, 分布于已分化成熟的神经细胞中, NSE 是神经细胞分化成熟的标志^[4], 能够准确地预示神经元损伤^[5]。本研究通过对妊娠母鼠腹腔注射锰, 观察锰对仔鼠脑组织黑质和尾壳核中 NSE 活性的影响, 旨在探讨孕期接触锰对子代中枢神经毒作用机制, 为制订接触锰的女工劳动保护措施提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

选用 3 月龄健康 SD 大鼠共 66 只, 体重 (234 ± 17) g, 由上海西普尔-必凯实验动物中心提供, 其中雄鼠 33 只, 未曾受孕过的雌鼠 33 只。受试物: 氯化锰 ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$), 分析纯, 由上海化学试剂供应站提供。将氯化锰配成氯化锰生理盐水溶液, 消毒备用。选用上述大鼠, 雌雄按 1:1 比例同笼, 次日早晨检查雌鼠阴道涂片, 发现精子之日定为妊娠 0 天。孕鼠随机分为对照组 (0 mg/kg)、染毒 7.5 mg/kg 组和 15 mg/kg 组, 每组 7~14 只。染锰组自妊娠第 1~15 d, 隔日 1 次腹腔注射氯化锰生理盐水溶液, 共注射 8 次, 对照组隔日 1 次腹腔注射生理盐水。任其自然分娩。

1.2 脑组织的灌注固定和切片

21 d 仔鼠经过 40 mg/kg 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉后, 用 18 号针从左心房至主动脉经左心室升主动脉插管, 剪开右心耳同时快速推注 $37^\circ C$ 150 ml 生理盐水, 然后滴注 $4^\circ C$ 的固定液 (pH7.4, 质量浓度为 4% 的多聚甲醛) 500 ml。调节滴速, 先快后慢, 持续约 1.5 h。将修整好的、已剔除脑膜的脑组织放

收稿日期: 2005-02-02; 修回日期: 2005-04-10

基金项目: 武汉市科委晨光计划 (20005004045)

作者简介: 张本延 (1948-), 男, 教授, 主要从事神经毒理学研

入 4% 多聚甲醛固定液中 4℃ 固定 4 h, 然后转至 20% 蔗糖 PB 液过夜, 直至组织块下沉。用 0.01 mol/L PBS 稍作冲洗, 在 -20℃ 低温切片机上作连续冠状切片, 切片厚 30 μm, 用甲苯胺蓝液显色定位。用 PBS 接片, 贴于铝明矾胶玻片, 冷气吹干。

1.3 冰冻切片免疫组化

用免疫组织化学 SP 法染色。(1) 用体积分数为 0.3% H₂O₂ 和体积分数为 0.1% 甲醇的 PBS, 室温下灭活内源性过氧化物酶 30 min; (2) 正常羊血清 (1:50) 37℃ 封闭 1 h; (3) NSE 鼠抗 (1:70) (北京中山) 4℃ 反应 24 h; (4) 生物素化的羊抗鼠 IgG 4℃ 反应 30 min; (5) 过氧化物酶标记的链霉卵白素 (北京中山) 4℃ 反应 30 min; (6) 浓度为 0.05% 的联苯二胺 (DAB) 体积分数为 0.01% 的 H₂O₂ 显色 15 min; (7) PBS 终止显色后, 常规脱水, 透明, 封片。每个步骤后都用 PBS 漂洗 5 min×3; 特异性对照采用 PBS 替代一抗, 其余步骤相同。

1.4 显微照相、图像分析及统计分析

1.4.1 照相 使用美国 Pixera Penguin 150CL 荧光显微数码专用相机选择脑黑质, 低倍选择 2 倍照相, 高倍选择 20 倍照相。

1.4.2 图像分析及统计分析 采用高清晰度彩色医学图文分析系统 HMIAS-2000, 对免疫组化反应的切片进行图像分析。所有切片放大倍数均为 20 倍。每只动物取 2 张切片, 对脑黑质进行分析。每个部位取 2 个视野, 分别测定平均吸光度、积分吸光度。以平均吸光度和积分吸光度值评价其活性变化。此外, 还

以相同方法和步骤对脑尾壳核的 NSE 进行观察。

1.5 数据分析

全部数据用 Excel 建表, 采用 SAS 软件在 PC 机上进行资料分析。

2 结果

NSE 存在于神经细胞及神经节细胞胞浆内, 正常胶质细胞不被染色。观察各组仔鼠脑黑质 NSE 阳性神经元, 阳性细胞胞浆呈淡棕黄色至深棕黄色, 胞核不着色。对照组胞浆染色较深, 胞体较大, 数量较多, 有的浓密聚集成团, 随着染锰剂量增加, 其胞体变小, 数量减少, 分散疏松, 胞浆染色变浅。在脑尾壳核观察到的 NSE 阳性神经元的形态和颜色等基本与黑质所观察到的相同。所有阴性对照实验均呈阴性。

2.1 锰对仔鼠脑黑质 NSE 的影响

如表 1 所示, 平均吸光度染毒 7.5 mg/kg 组、15 mg/kg 组与对照组比较, 下降趋势明显, 差异均有显著性 ($P < 0.05$); 15 mg/kg 组和 7.5 mg/kg 组之间差异尚无显著性 ($P > 0.05$)。积分吸光度, 各染毒组与对照组之间, 染毒 15 mg/kg 组和 7.5 mg/kg 组之间比较, 均明显下降, 差异均有显著性 ($P < 0.01$)。

2.2 锰对仔鼠脑尾壳核 NSE 的影响

表 1 显示, 无论是平均吸光度, 还是积分吸光度, 染毒 15 mg/kg 组与对照组比较差异均有显著性 ($P < 0.01$); 7.5 mg/kg 组也低于对照组 ($P < 0.05$); 而染毒 15 mg/kg 组与 7.5 mg/kg 组之间比较, 虽有下降趋势, 但差异尚无显著意义 ($P > 0.05$)。

表 1 大鼠孕期染锰对 21 日龄仔鼠脑黑质和脑尾壳核 NSE 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$)

组别	脑黑质		脑尾壳核	
	平均吸光度	积分吸光度	平均吸光度	积分吸光度
对照组	0.277 5 ± 0.042 3	19 858 1 ± 2 110 2	0.316 3 ± 0.046 8	15 383 1 ± 2 534 1
染毒 7.5mg/kg 组	0.236 0 ± 0.036 5 *	12 081 3 ± 2 104 0 **	0.278 6 ± 0.034 9 *	8 857 2 ± 1 263 6 *
染毒 15mg/kg 组	0.220 5 ± 0.028 9 *	6 306 4 ± 0 082 5 **▲	0.177 6 ± 0.023 5 **	7 949 5 ± 1 025 3 **

与对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与染毒 7.5mg/kg 组比较 ▲ $P < 0.01$

3 讨论

锰是一种神经毒物, 过量的锰进入机体可引起广泛的病理损伤, 透过血脑屏障沉积于脑部, 产生相应的神经系统受损症状^[6,7]。锰不仅具有神经毒性, 而且具有生殖毒性。长期以来, 人们对锰的毒性作用进行了多途径、多方面的研究, 但对其毒作用机制至今仍不清楚。

烯醇化酶是细胞能量代谢过程中参与糖酵解过程的关键酶, 以二聚体形式存在, 由 α、β、γ 3 种

亚基组成 αα、ββ、γγ、αβ、αγ 5 种同工酶, 它们的特性与分布有所不同, αα 型同工酶组成非神经特异性烯醇化酶 (NNE), 主要分布于神经胶质细胞与神经母细胞中, αγ 型同工酶主要分布于神经内分泌细胞内, γγ 型同工酶组成 NSE, 分布于已分化成熟的神经细胞中, 神经母细胞分化为成熟的神经细胞后, 烯醇化酶也由非神经元特异性 (αα, NNE) 转变为神经元特异性烯醇化酶 (γγ, NSE)。在神经系统发育的过程中, NNE 细胞型的数目逐渐减少, 免疫组织化

研究表明, NSE 阳性细胞随发育成熟而逐渐增加, 因此可作为神经元发育成熟的标志物。

脑的发育有相当一部分是在出生前, 即胚胎时期至出生后婴儿期, 脑的正常复杂结构的功能取决于其发育过程中诸事件的有顺序出现, 若其中任一过程发生障碍, 均将导致某些结构的功能丧失。胚胎期至婴儿期正是脑组织细胞生长、增殖、迁移、发育的极关键时期。发育中的脑未成熟的内皮细胞不能阻止重金属进入脑组织, 此时的脑组织比成年脑对重金属毒性更为敏感^[9]。动物实验表明, 母鼠孕期染锰, 锰主要在其仔鼠脑黑质等部位蓄积^[10], 过量蓄积的锰可能破坏锥体外系黑色素神经元的保护屏障, 从而对其产生损害。现有研究表明, 锰通过损伤线粒体引起能量代谢障碍而导致神经细胞退行性变性^[1]。至于损伤线粒体引起能量代谢障碍的机制, 尚未见到报道。本次研究观察到母鼠染锰后其 21 日龄仔鼠脑黑质 NSE 阳性神经元减少。由于 NSE 与能量供应有密切关系, 推测可能锰影响 NSE 的合成, 从而影响到能量代谢供应, 进而影响神经细胞的发育, 其详细机制尚待进一步探讨。由于脑组织具有细胞增殖的“一次性完成”的特点, 已分化的神经细胞如受到致命损伤, 意味着细胞的生命也会就此结束。大鼠出生后 21 d 内, 正是其脑发育的关键时期, 这可以解释智力发育受损与这些部位在临界期发育受损的关系。付承红等也证实父母职业接触锰可以影响到子女智力的发育^[11]。锰对黑质中 NSE 合成的影响, 也许是孕期接触锰导致其子代智力改变的途径之一。

本实验选用了 NSE 作为指标, 采用免疫组化方法, 对比观察了母鼠孕期染锰对其仔鼠神经细胞发育的影响, 确定受影响的神经细胞的部位。实验结果表明, 实验组 21 日龄仔鼠大脑 NSE 阳性细胞发育较对照组落后, NSE 免疫阳性产物较少, 这种差异在黑质和尾壳核都比较明显。黑质是中脑最大的核团, 是锥体外系的重要组成部分之一, 位于中脑被盖和大脑脚底之间, 它占据中脑全长并伸入间脑尾部; 细胞大部含有黑色素, 黑色素对中枢神经细胞具有保护作用。尾壳核位于基底神经节, 由尾状核和壳核组成, 它与

黑质都是基底神经核运动环路的重要组成部分。其中的多巴胺通路具有调节运动环路的直接环路和间接环路的作用, 维持锥体外系的功能, 对随意运动的控制及信息处理起着重要的作用。我们曾发现, 母鼠孕期染锰后影响其子代新生鼠脑黑质 TH mRNA 阳性神经元的生长发育^[8], 可使多巴胺的合成出现障碍; 现在又观察到母鼠孕期染锰, 可影响其仔鼠脑黑质中 NSE 神经元的生长发育。锰是同时影响 TH 神经元和 NSE 神经元的发育, 还是先影响其中一种神经元的发育, 继而影响另一种神经元的发育, 有待进一步研究。

(本研究得到我校组织与胚胎学教研室杨逢春等老师的大力支持, 特此致谢!)

参考文献:

- [1] 何凤生. 中华职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 241-247.
- [2] Pappas BA, Zhang D, Davidson CM, et al. Perinatal manganese exposure: behavioral, neurochemical, and histopathological effects in the rat [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 1997, 19 (1): 17-25.
- [3] 张德兴, 贺新红, 黄绍明, 等. 小鼠出生后接触锰对脑发育的毒性影响 [J]. *卫生研究*, 2002, 31 (2): 73-75.
- [4] Pan Y, Chen X, Wang S, et al. In vitro neuronal differentiation of cultured human embryonic germ cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327 (2): 548-556.
- [5] Stalnacke BM, Tegner Y, Sojka P. Playing soccer increases serum concentrations of the biochemical markers of brain damage S-100B and neuron-specific enolase in elite players: a pilot study [J]. *Brain Inj*, 2004, 18 (9): 899-909.
- [6] Calne DB, Chu NS, Huang CC, et al. Manganese and idiopathic parkinsonism similarities and differences [J]. *Neurology*, 1994, 44: 1586-1593.
- [7] Aschurn, Aschner JL. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1997, 15: 333-340.
- [8] 张本延, 叶方立, 朱长才, 等. 锰对大鼠子代新生鼠黑质酪氨酸羟化酶的影响 [J]. *中国公共卫生学报*, 1999, 18 (2): 92-94.
- [9] Goyer RA. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences [J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104 (10): 1050-1054.
- [10] 杨伯宁, 张德兴, 檀进发, 等. 孕期锰染毒对仔鼠脑内锰、锌、铜、铁的影响 [J]. *卫生毒理学杂志*, 1997, 11 (2): 101-102.
- [11] 付承红, 邹云峰, 王承敏, 等. 父母职业接触锰对其子女智力的影响 [J]. *中国职业医学*, 2004, 31 (2): 26-28.

防治职业病, 保护劳动者健康。