

其发病机制尚未阐明,但一般认为早期肺部炎症及肺损伤、晚期 ECM 的沉积是肺纤维化的必然发展过程^[10]。TGF β 可能通过下面几个途径导致肺纤维化。(1) TGF β 可以导致 ECM 合成增加以及胶原纤维的沉积。Sine PJ 等^[11]利用腺病毒载体将 TGF β_1 基因转染小鼠肺组织后发现肺纤维化,并且有大量 ECM 沉积在肺部。(2) TGF β 不仅自身在肺炎发生和纤维化过程中具有重要作用,而且能诱导肺脏高水平表达结缔组织生长因子(connective tissue growth factor CTGF),而 CTGF 已证实能导致肺纤维化^[12],二者一起加速肺纤维化的发生。(3) TGF β 受体活化。TGF β 有 3 种受体,即 T β RI、T β RII、T β RIII,已有研究表明,TGF β 受体的活化可能介导 TGF β 促进 ECM 合成与沉积效应^[13]。

本研究结果显示,矽肺患者血液中 TGF β_1 水平显著高于正常人群,说明矽肺患者与正常人群存在某些基因表达差异。然而,目前仍然没有充分的实验证实,TGF β_1 水平升高是发生在矽肺之前,还是发生在矽肺之后,因此,要证明 TGF β_1 是矽肺的易感基因还需要前瞻性的动物实验和分子流行病学研究证实。但是,本研究结果至少提示 TGF β_1 与矽肺密切相关,TGF β_1 可作为矽肺患者的血清学检测指标。

参考文献:

- [1] Kleberger SR, Peden D. Gene-environment interactions in asthma and other respiratory diseases [J]. *Annu Rev Med* 2005 56: 383-400.
- [2] Honek A, Kazimov A, Baranckov M, et al. Genetic predisposition and health effect of occupational exposure to asbestos [J]. *Neuro Endocrinol Lett* 2006 27 (Suppl2): 100-103.
- [3] Reinhold D, Bank U, Böhling F, et al. Transforming growth factor beta₁ inhibits interleukin-10 mRNA expression and production in pike-

- weed-mogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells and T cells [J]. *J Interferon Cytokine Res* 1995 15 (8): 685-690.
- [4] Ghio M, Ottonello L, Contini P, et al. Transforming growth factor beta₁ in supernatants from stored red blood cells inhibits neutrophil locomotion [J]. *Blood* 2003 102 (3): 1100-1107.
- [5] Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez Juan P, Mateo J, et al. Serum levels and genetic variation of TGF-beta₁ are not associated with Alzheimer's disease [J]. *Acta Neurol Scand* 2007 116 (6): 409-412.
- [6] 黄培堂,译.萨姆布鲁克, DW 拉塞尔,著.分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版.北京:科学出版社,2002: 518.
- [7] Lee C. Protein extraction from mammalian tissues [J]. *Methods Mol Biol* 2007 362: 385-389.
- [8] Schuster N, Krieglstein K. Mechanisms of TGF-beta mediated apoptosis [J]. *Cell Tissue Res* 2002 307 (1): 1-14.
- [9] Boesen CC, Radaev S, Morfka SA, et al. The 1.1 Å crystal structure of human TGF-beta type II receptor ligand binding domain [J]. *Structure* 2002 10 (7): 913-919.
- [10] Baoni T, Bodo M, D'Alessandro A, et al. Silica and its antagonistic effects on transforming growth factor beta₁ in lung fibroblast extracellular matrix production [J]. *J Invest Med* 2001 49 (2): 146-156.
- [11] Sine P, J, Xing Z, Galvan F L, et al. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor beta₁ induces prolonged severe fibrosis in rat lung [J]. *J Clin Invest* 1997 100 (4): 768-776.
- [12] Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, et al. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis [J]. *Am J Physiol* 1998 275 (2 Pt 1): 1365-371.
- [13] Khalil N, Parekh TV, O'Connor R, et al. Regulation of the effects of TGF-beta₁ by activation of latent TGF-beta₁ and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Thorax* 2001 56 (12): 907-915.

氯化锰致大鼠神经毒性机制的研究

邓宇¹, 徐冬辉², 徐斌¹, 冯雪英¹, 王飞¹, 关坤¹, 姜泓³, 徐兆发^{1*}

(1 中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110004; 2 中国医科大学附属第一医院临床药理教研室, 辽宁 沈阳 110004; 3 中国医科大学公共卫生学院卫生检验教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 为研究不同剂量的氯化锰对大鼠脑纹状体谷氨酰胺合成酶 (GS)、磷酸激活的谷氨酰胺酶 (PAG) 和大脑皮质 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活力的影响, 将 32 只 SD 大鼠, 按体重随机分成 4 组。第 1 组为对照组, 皮下注射生理盐水, 第 2~4 组为不同剂量染锰组, 分别皮下注射 50、100 和 200 $\mu\text{mol/kg}$ 的氯化锰溶液, 每周注射 5 次, 连续染毒 4 周。观察大鼠体重变化和一般表现。最后一次注射后 24 h 处死大鼠, 切取纹状体, 测定 GS 和 PAG 的活力; 切取大脑皮质, 测定 Ca²⁺-ATPase 和 Na⁺-K⁺-ATPase 的活力。结果显示, 随着染锰剂量的增加, 脑纹状体 GS 活力降低, PAG 活力升高, 大脑皮质 Ca²⁺-ATPase 和 Na⁺-K⁺-ATPase 活力降低。与对照组比较, 在 50、100 和 200 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组 GS 和 Na⁺-K⁺-ATPase 活力逐渐下降, 差异有统计学意义; 在 100 和 200 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组 PAG 的活力逐渐升高, Ca²⁺-ATPase 活力逐渐下降, 且差异有统计学意义。说明不同剂量氯化锰可引起大鼠脑纹状体 GS 活力降低, PAG 活力升高; 大脑皮质 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活力降低, 由此可引起谷氨酸代谢失衡, 产生神经毒性。

关键词: 氯化锰; 谷氨酰胺合成酶; 磷酸激活的谷氨酰胺酶; Na⁺-K⁺-ATPase; Ca²⁺-ATPase

中图分类号: R99 O612.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2008)02-0103-03

收稿日期: 2007-12-03 修回日期: 2008-03-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (项目编号: 30771834)

作者简介: 邓宇 (1981-), 女, 博士研究生, 研究方向: 锰中毒机制与中毒预防。

* 通讯作者, 教授, 博士生导师, 研究方向: 重金属中毒机制与防治。

Study on neurotoxicity mechanism induced by manganese chloride in rats

DENG Yu, XU Dong-hu, XU Bin, FENG Xue-yang, WANG Fei, GUAN Kun, JIANG Hong, XU Zhao-fei*

(1. Department of Environmental Health School of Public Health China Medical University Shenyang 110001 China
 2. Department of Clinical Pharmacology the First Affiliated Hospital China Medical University Shenyang 110001 China
 3. Department of Health Testing School of Public Health China Medical University Shenyang 110001 China)

Abstract: To study the effects of different doses of manganese chloride on activities of glutamine synthetase (GS) and Phosphate activated glutaminase (PAG) in striatum and the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ in cerebral cortex of rats. 32 SD rats were divided into four groups by weight at random. The rats in first group were subcutaneous injected with 0.9% sodium chloride. The rats in other three groups were injected with 50, 100 and 200 ($\mu\text{mol/kg}$) respectively for 4 weeks, 5 days a week. At the 24h after the last injection, the activities of GS, PAG in striatum and the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ in cerebral cortex were determined. The results showed that with the increase of manganese dosage, PAG activity increased, especially in 100 and 200 $\mu\text{mol/kg}$ MnCl_2 groups, while the activities of GS and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ were all decreased. It indicated that manganese could induce decrease of GS activity, increase of PAG activity in striatum and increase of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ activities in cerebral cortex, thereby leading to the imbalance of glutamate metabolism and producing neurotoxicity.

Key words: Manganese chloride; Glutamine synthetase; Phosphate activated glutaminase; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$

锰 (manganese, Mn) 既是人体必需微量元素, 同时又是一种神经毒物。迄今为止, 锰致神经细胞损伤的机制仍没有完全阐明。随着对脑内兴奋性氨基酸 (excitatory amino acid, EAA) 神经递质及其受体研究的不断深入, 发现兴奋性毒性在多种神经损害的发病机制中起作用^[1]。已有研究指出锰可致鼠脑组织突触间隙谷氨酸 (glutamate, Glu) 含量增加, 导致 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体过度活化, 引起兴奋性毒性^[2]。在锰中毒所致的神经损害过程中, 早期即可能发生 Glu 递质传递紊乱^[3,4]。本实验观察不同剂量的氯化锰致大鼠脑纹状体谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 和磷酸激活的谷氨酰胺酶 (phosphate activated glutaminase, PAG) 及大脑皮质 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力的变化, 探讨锰对脑组织谷氨酸代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组及染毒

由中国医科大学实验动物中心提供的实验用 SD 大鼠 32 只, 体重 (180 ± 10) g, 雌雄各半。正式实验前饲养 7 d, 然后按体重随机分成 4 组。第 1 组为对照组, 皮下注射 0.9% 的氯化钠, 第 2~4 组为不同剂量染锰组, 分别皮下注射 50, 100, 200 $\mu\text{mol/kg}$ 的氯化锰溶液, 注射容量为 5 ml/kg, 每周注射 5 次, 连续染毒 4 周。每周测量大鼠体重, 观察一般中毒的表现。

1.2 样品采集及测定指标

最后一次注射后 24 h, 各组大鼠用乙醚麻醉后处死, 断头并迅速开颅取完整的大脑, 冰浴下切取脑纹状体和大脑皮质, 制成相应的 5% 匀浆液。GS 活力的测定依据 Renis 描述的 γ -谷氨酰转移酶的非生理学催化反应进行^[5]; PAG 活力按 Curci 的方法测定^[6]; ATPase 活力用硫酸亚铁钼磷蓝定磷法测定^[7]; 蛋白含量测定用 Folin-Lowry 法^[8]。

1.3 统计分析

用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 实验所得数据以平均值

$\pm$ 标准差表示, 采用单因素方差分析进行组间差异的显著性检验, 两组间比较用 t 检验 (Student's newman-keuls, SNK)。

2 结果

2.1 大鼠体重变化和一般表现

在染毒期间, 各组大鼠体重均有增加。与对照组相比, 不同剂量染锰组大鼠体重增长差异无统计学意义。大鼠皮下注射氯化锰 4 周, 各组大鼠饮食和饮水量无明显变化, 活动正常, 没有一般中毒的表现。

2.2 脑纹状体 GS 和 PAG 活力

随着染锰剂量的增加, GS 活力降低, PAG 活力升高。与对照组相比, 在 50, 100 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组, GS 活力逐渐显著降低 ($P < 0.05$), 在 200 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组 GS 活力非常显著下降 ($P < 0.01$)。100 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组 PAG 活力显著升高 ($P < 0.05$), 在 200 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组 PAG 活力非常显著升高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠纹状体 GS、PAG 活力变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PAG [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g pro})$]	GS [$\text{U}/(\text{min} \cdot \text{g pro})$]
对照组	8	48.03 $\pm$ 4.04	62.16 $\pm$ 7.91
50 $\mu\text{mol/kg}$ MnCl_2 组	8	49.74 $\pm$ 4.82	54.96 $\pm$ 5.51*
100 $\mu\text{mol/kg}$ MnCl_2 组	8	54.72 $\pm$ 4.01*	49.94 $\pm$ 4.70*
200 $\mu\text{mol/kg}$ MnCl_2 组	8	73.28 $\pm$ 9.40**	44.62 $\pm$ 6.62**

与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 表 2 同。

2.3 大脑皮质 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力

随着染锰剂量的增加, 大脑皮质 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力降低。与对照组比较, 在 50 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力逐渐下降 ($P < 0.05$), 在 100, 200 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力明显下降 ($P < 0.01$)。100 和 200 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力明显下降。见表 2。

表 2 各组大鼠大脑皮质 Na ⁺ -K ⁺ -ATP和 Ca ²⁺ -ATP			
酶活力 ($\bar{x}\pm s$)		$\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$	
组别	n	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Ca ²⁺ -ATPase
对照组	8	7.29±0.41	4.62±0.56
50 $\mu\text{mol/kgMnCl}_2$ 组	8	6.62±0.40*	4.24±0.46
100 $\mu\text{mol/kgMnCl}_2$ 组	8	5.44±0.21**	3.96±0.63*
200 $\mu\text{mol/kgMnCl}_2$ 组	8	4.82±0.37**	3.17±0.44**

3 讨论

Glu是中枢神经系统中主要的兴奋性神经递质，它可通过ATP依赖性的H⁺离子梯度偶联机制被运送到突触囊泡中，随着神经末梢的去极化，囊泡和突触后膜融合，Glu被释放到突触间隙。突触间隙中大部分的Glu被高亲和力谷氨酸转运体（glutamate transporter GLUT）以ATP依赖的方式摄入到星形胶质细胞中，并在GS作用下转形成Gln。Gln再回转至谷氨酸能神经元内，在PAG的作用下重新生成Glu形成“Glu-Gln循环”。突触间隙中的Gln还可以和突触后神经元上的NMDA受体结合，发挥生理作用。有文献报道，锰中毒可以通过抑制谷氨酸转运体的活性^[9-10]，破坏“Glu-Gln循环”，使Glu向突触间隙大量释放并堆积^[11]。突触间隙中过量的谷氨酸，可以使NMDA受体过度激活，造成钙超载，引起细胞毒性^[12]。本实验观察染锰后脑纹状体GS和PAG活力的改变，可反映锰中毒对“Glu-Gln循环”的影响；观察染锰后脑皮质中Na⁺-K⁺-ATPase和Ca²⁺-ATPase活力的改变，可反映锰中毒对钙稳态的影响。

本实验大鼠染锰4周后，随着染锰剂量的增加，脑纹状体GS活力逐渐降低，PAG活力升高；大脑皮质Ca²⁺-ATPase和Na⁺-K⁺-ATPase活力逐渐降低。与对照组比较，在50、100和200 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组，GS和Na⁺-K⁺-ATPase活力均依次出现不同程度的降低；在100和200 $\mu\text{mol/kg}$ 染锰组PAG的活力逐渐升高，Ca²⁺-ATPase活力逐渐下降，差异有统计学意义。实验结果表明染锰可以破坏脑组织“Glu-Gln循环”，影响谷氨酸的重摄取。突触间隙中蓄积大量的Glu可使NMDA受体过度激活，形成钙超载，引起神经毒性。

参考文献:

[1] Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor

mediated excitotoxic neuronal cell death [J]. Mol Neurosci 2001 24 (1-3): 107-129.

[2] Takeda A, Sonogaku N, Oku N. Influence of manganese on the release of neurotransmitters in rat striatum [J]. Brain Res 2003 965 (1-2): 279-282

[3] Fitsanakis V A, Au C, Erikson K M, et al. The effects of manganese on glutamate, dopamine and gamma-aminobutyric acid regulation [J]. Neurochem Int 2006 48 (6-7): 426-433

[4] Fitsanakis V A, Aschner M. The importance of glutamate, glycine and gamma-aminobutyric acid transport and regulation in manganese, mercury and lead neurotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2005 204 (3): 343-354

[5] Renis M, Cardile V, Russo A, et al. Glutamine synthetase activity and HSP70 levels in cultured rat astrocytes: effect of L-octadecyl-2-methyl-rac-glycerol-3-phosphocholine [J]. Brain Res 1998 783 (6-7): 143-150

[6] Curi T C, De Melo M P, De Azevedo R B, et al. Glutamine utilization by rat neurophilis: presence of phosphate-dependent glutaminase [J]. Am J Physiol 1997 273 (4 Pt1): C1124-1129

[7] 陈传义, 彭仁琇, 李元涛. 七氟醚麻醉对大鼠脑ATP酶的动态影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2004 21 (8): 972-974.

[8] Lowy O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem 1951 193 (1): 265-275

[9] Erikson K, Aschner M. Manganese causes differential regulation of glutamate transporter (GLAST), taurine transporter and metallothionein in cultured rat astrocytes [J]. Neurotoxicology 2002 24 (4-5): 595-602

[10] Erikson K M, Suber R L, Aschner M. Glutamate/aspartate transporter (GLAST), taurine transporter and metallothionein mRNA levels are differentially altered in astrocytes exposed to manganese chloride, manganese phosphate or manganese sulfate [J]. Neurotoxicology 2002 23 (3): 281-288.

[11] Nomandin L, Hazel A S. Manganese neurotoxicity: an update of pathophysiological mechanisms [J]. Metab Brain Dis 2002 17 (4): 375-387

[12] Cenione D, Gubellini P, Bernardi G, et al. Impaired excitatory transmission in the striatum of rats chronically intoxicated with manganese [J]. Exp Neurol 2001 172 (2): 469-476

(上接第 86 页)

3 小结

应用活性炭管采集空气中对特丁基甲苯，热解吸后，用气相色谱法氢火焰离子化检测器测定，结果表明测定对特丁基甲苯的效果良好。本方法在0~320 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 范围呈线性关系；样品在活性炭管中于4℃冰箱可保存10 d，方法的重现性好，不同浓度的相对标准偏差为0.65%~1.98%；方法的最低检出限为0.63 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (以采样3 L空气计)；平均解吸效率为83.49%~93.24%；当空气中的对特丁基甲苯

浓度为3.97~37.74 mg/m^3 时，活性炭的采样效率为100%；100 mg 活性炭的穿透容量>2.9 mg 。空气中和对特丁基甲苯共存的间特丁基甲苯、邻特丁基甲苯、甲苯、邻二甲苯等在本方法条件下不干扰测定。

参考文献:

[1] 夏元洵. 化学物质毒性全书 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1991: 338-339

[2] GBZ—2002 工作场所有害因素职业接触限值 [S].

[3] 杨树勤. 卫生统计学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 14-17, 103-109, 171-172