

多巴胺受体激动剂对丙烯酰胺诱导大鼠神经损伤的影响

王芳, 姚林*, 张艳淑, 王广增, 韩刚

(河北省煤矿卫生与安全实验室 华北煤炭医学院预防医学系, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 研究丙烯酰胺对大鼠中枢神经系统神经递质多巴胺含量的影响以及多巴胺受体激动剂对丙烯酰胺引起的神经损伤的影响, 探讨丙烯酰胺的神经损伤机制以及确定多巴胺受体激动剂对丙烯酰胺引起的神经损伤是否具有保护作用。方法 SD大鼠染毒组腹腔注射丙烯酰胺 4周, 每周 5次 (30 mg/kg); 溴隐亭给药组在腹腔注射丙烯酰胺的同时灌胃给予多巴胺受体激动剂溴隐亭 (低剂量组按 1.25 mg/kg给药, 高剂量组按 2.5 mg/kg给药); 正常对照组腹腔注射等量生理盐水。每周给药第 6天和第 7天对大鼠进行感觉神经功能测定以及自主性行为观察。给药结束后, 测定大鼠中枢神经系统多巴胺、肌酸激酶 (CK) 以及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的含量。结果 染毒组大鼠体重呈下降趋势, 与其他 3组大鼠体重均存在明显差异, 染毒组热反应灵敏度也较差, 给药组无论低剂量或高剂量组, 热反应灵敏度均比染毒组有所改善。此外, 染毒组 CK、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶以及多巴胺的含量均比正常对照组明显减少, 给药组各指标也比阳性对照组有所升高。结论 多巴胺受体激动剂溴隐亭对丙烯酰胺诱导的大鼠神经损伤有一定的保护作用。

关键词: 溴隐亭; 丙烯酰胺; 神经损伤

中图分类号: O623.626 R595 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)05-0295-03

Effect of dopamine agonists on nerve injury caused by acrylamide in rats

WANG Fang, YAO Lin*, ZHANG Yan-shu, WANG Guang-zeng, HAN Gang

(School of Public Health, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective To explore the protective effects of dopamine agonists on nerve injury induced by acrylamide in rats. Methods Exposed SD rats were injected intraperitoneally acrylamide (30 mg/kg), 5 times a week for 4 weeks; the rats in intervention group were intragastrically administered a dopamine agonist bromocriptine (1.25 mg/kg and 2.5 mg/kg) simultaneously with the injection of acrylamide; the control rats were only injected intraperitoneally with normal saline. The function test of sensory nerve and independent behaviour were observed on the 6th day and 7th day of each week during experiment. The contents of dopamine and the activities of creatine kinase and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ ases were also determined at the end of experiment. Results The body weights of exposed rats were decreased significantly compared with the other groups, and the response sensitivity to hot of exposed group was obviously lowered; however they all could be ameliorated both by low or high dose of bromocriptine. Additionally, the contents of DA and activities of CK and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ ases in exposed group were reduced significantly than that of control group, and they all could be improved by administration of bromocriptine. Conclusion The study indicated that dopamine agonist could reduce nerve damage induced by acrylamide.

Key words: Bromocriptine; Acrylamide; Nerve damage

丙烯酰胺 (acrylamide, ACR) 是一种蓄积性神经毒素, 对实验动物和人类都能引起中枢周围神经远端轴突病变。因其广泛应用于树脂合成、地下建筑、粘合剂、改良土壤、油漆、造纸等行业, 在生产和使用过程中接触人群广泛, 造成的职业危害也较严重, ACR生产性中毒报道屡见不鲜^[1,2]。聚丙烯酰胺对人体无害, 常用作高分子絮凝剂和整形外科软组织填充剂, 但其中常残留微量的丙烯酰胺单体, 对人体具有潜在危险^[3]。由于丙烯酰胺具有潜在的神经毒性、生殖毒性、遗传毒性和致癌性, 因此食品中丙烯酰胺

的存在也引起了国际社会的高度重视^[4]。

有关研究表明, 丙烯酰胺的神经损伤机制主要包括能量代谢障碍、氧化损伤等方面, 并且有一定的多巴胺拮抗作用^[5]。溴隐亭是一种多巴胺受体激动剂, 用于内分泌系统疾病和神经系统疾病等。有关文献报道多巴胺 (DA) 受体激动剂直接作用于 DA神经元的受体, 不参与 DA的代谢过程, 被认为可能具有潜在的神经保护作用。这种神经保护作用可能是通过抗氧化、神经营养、抗凋亡和稳定线粒体膜的机制实现的^[6]。

本课题探讨丙烯酰胺的亚急性中毒模型的建立及其神经损伤机制, 溴隐亭对丙烯酰胺引起的神经损伤的影响以及溴隐亭对丙烯酰胺引起的神经损伤是否具有保护作用, 为丙烯酰胺中毒后的治疗提供依据。

收稿日期: 2008-01-29 修回日期: 2008-06-02

作者简介: 王芳 (1982-), 女, 在读研究生, 研究方向: 神经毒理学。

*: 通讯作者, 教授, 研究方向: 神经毒理学。

1 材料与方法

1.1 材料

丙烯酰胺, 北京华美; 甲磺酸溴隐亭片 (佰莫亭), 匈牙利吉瑞大药房生产; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及肌酸激酶试剂盒, 南京建成生物技术研究产品; 组织多巴胺酶联免疫试剂盒, 上海麦莎生物科技有限公司产品; RB-200智能热板仪, 成都泰盟科技有限公司产品; VERSA酶标仪, 美国; SD雄性大白鼠 (约180 g), 由华北煤炭医学院医学实验动物中心提供 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 建立 SD大鼠丙烯酰胺亚急性中毒模型 分为对照组、染毒组及给药组 (分高低剂量组), 共4组, 每组大鼠10只。依据相关文献报道, 采用40和20 mg/kg的 ACR给药进行预试验, 结果40 mg/kg ACR给药1周, 大鼠出现死亡; 以20 mg/kg的 ACR给药4周, 大鼠中毒症状不明显。根据以上结果确定阳性对照组以 ACR 30 mg/(kg·36 h) 腹腔内注射, 溴隐亭给药组在给予 ACR的同时以多巴胺受体激动剂溴隐亭 [低剂量组给药量为1.25 mg/(kg·36 h), 高剂量组给药量为2.5 mg/(kg·36 h)] 进行灌胃, 连续4周。对照组腹腔注射等量生理盐水。给药结束后, 断头处死大鼠, 分离小脑组织以及纹状体备用^[10-11]。

1.2.2 感觉神经测定 采用 RB-200型智能热板仪测定各组大鼠对热的反应时间。将热板仪预热, 温度稳定后将大鼠放入干燥的热板上, 盖上盖子开始计时, 待大鼠开始舔后爪停止计时, 并记录时间。55℃下每只大鼠测定3次, 每次间隔30 min以上, 结果取平均值。

1.2.3 生化检测

蛋白含量测定: 考马斯亮蓝测定法。

肌酸激酶 (CK) 的检测: 给药结束后将各组大鼠断头迅速取脑, 在冰浴条件下加9倍体积冰生理盐水制成10%组织匀浆。按试剂盒的说明书方法操作, 用酶标仪660 nm波长比色, 记录每一样品吸光度。

计算公式: 酶活力单位/毫克组织 = (测定管吸光度 - 测定空白管吸光度) / (标准管吸光度 - 标准空白管吸光度) × 标准品的酶活力。式中标准管与标准空白管吸光度由试剂盒原有试剂测得, 测定管与测定空白管吸光度由样品测得。CK量以酶活力单位/mg表示。

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的测定: 给药结束后将各组大鼠断头迅速取脑, 在冰浴条件下加9倍体积冰生理盐水制成10%组织匀浆。按试剂盒的说明书方法操作, 用酶标仪636 nm波长比色, 记录每一样品吸光度。计算公式: 组织匀浆中 ATPase活力 (U/mg prot) = (测定管吸光度 - 对照管吸光度) / (标准管吸光度 - 空白管吸光度) × 标准管浓度 × 6 × 7.8所取组织匀浆中蛋白量。式中标准管与空白管吸光度由试剂盒原有试剂测得, 测定管与对照管吸光度由样品测得。酶含量用 U/mg prot表示。

多巴胺含量测定: 给药结束后将各组大鼠断头迅速取脑, 剥离纹状体在冰浴条件下加9倍体积冰生理盐水制成10%组织匀浆。按试剂盒的说明书方法操作, 用酶标仪450 nm波长比色, 记录每一样品吸光度。以 OD值为纵坐标, 以标准品的浓度为横坐标, 绘制曲线图, 根据样品的 OD值查找对应的浓度范围。

1.3 数据分析

实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析 F检验。数据处理均应用 SPSS1.5软件包完成。

2 结果

2.1 一般状况

染毒组的大鼠活动减少、嗜睡、毛色发暗, 有的大鼠出现尿潴留, 高、低剂量组比染毒组大鼠的症状轻。对照组的大鼠体重4周内持续稳定增长, 染毒组的大鼠在第4周体重出现了负增长, 染毒组的大鼠与对照组、高剂量组以及低剂量组的大鼠体重相比在第2周差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表1。

表1 不同周次各组大鼠的体重 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	0周	1周	2周	3周	4周
对照组	282.9 ± 4.9	289.7 ± 4.1	342.1 ± 6.9	355.5 ± 7.7	397.6 ± 9.3
染毒组	284.7 ± 3.9	279.4 ± 5.0	328.7 ± 8.8	344.2 ± 6.7	334.8 ± 9.7*
低剂量组	283.5 ± 4.6	271.6 ± 4.9	311.0 ± 4.5*	310.9 ± 9.5*	336.6 ± 10.0*
高剂量组	274.7 ± 4.5	288.9 ± 6.3	324.7 ± 7.5	331.9 ± 9.7	358.1 ± 6.3*

与对照组相比, * $P < 0.05$

2.2 感觉神经变化

对照组的大鼠与染毒组、高剂量组以及低剂量组大鼠的热反应时间相比在第 2周差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 在第 4周染毒组与低剂量组以及高剂量组差异有统计学意义 ($P<0.05$), 低剂量组与高剂量组间差异无统计学意义。见表 2。

表 2 不同周次各组大鼠对热反应时间 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	1周	2周	3周	4周
对照组	9.06 $\pm$ 0.66 [#]	8.21 $\pm$ 0.43 [#]	7.17 $\pm$ 0.35 [#]	6.88 $\pm$ 0.43 [#]
染毒组	12.58 $\pm$ 0.97*	12.76 $\pm$ 0.90*	19.20 $\pm$ 1.79*	38.76 $\pm$ 2.73*
低剂量组	10.11 $\pm$ 0.83	14.45 $\pm$ 1.14*	20.63 $\pm$ 2.34*	30.93 $\pm$ 2.88*
高剂量组	10.32 $\pm$ 1.03	15.09 $\pm$ 1.23*	15.17 $\pm$ 2.06*	26.71 $\pm$ 1.95*

与对照组相比, * $P<0.05$ 与染毒组相比, # $P<0.05$

2.3 生化指标检测

各组动物给药结束后, 检测大鼠小脑组织匀浆 CK、 Na^+/K^+ -ATP酶以及纹状体多巴胺的含量。与对照组相比染毒组 CK的含量明显降低, 高剂量组 CK的含量明显升高, 染毒组与高剂量组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$)。 Na^+/K^+ -ATP酶含量染毒组与对照组、给药低剂量组以及高剂量组相比差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。多巴胺含量对照组、高剂量组与染毒组及低剂量组之间差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 结果详见表 3。

表 3 各组大鼠小脑 Na^+/K^+ -ATP酶、CK以及多巴胺的含量 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	Na^+/K^+ -ATP酶 (U/mg Prot)	CK (酶活力单位/mg)	DA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
对照组	2.085 $\pm$ 0.373	4.741 $\pm$ 0.67	25.63 $\pm$ 2.264 [#]
染毒组	0.832 $\pm$ 0.639*	3.428 $\pm$ 0.36	13.50 $\pm$ 6.094*
低剂量组	1.514 $\pm$ 0.376 [#]	5.076 $\pm$ 1.46	14.81 $\pm$ 6.907*
高剂量组	1.824 $\pm$ 0.906 [#]	7.054 $\pm$ 0.47 [#]	25.00 $\pm$ 9.500 [#]

与对照组相比, * $P<0.05$ 与染毒组相比, # $P<0.05$

3 讨论

实验结果低剂量组大鼠对热反应时间比染毒组长, 其原因可能是 (1) 溴隐亭给药剂量不足, 没有明显的神经保护作用; (2) 溴隐亭具有导致嗜睡等副作用, 可能导致大鼠对热反应速度降低。

染毒组的大鼠小脑组织匀浆 CK、 Na^+/K^+ -ATP酶以及纹状体 DA的含量均比对照组的含量明显降低

($P<0.05$), 说明丙烯酰胺能够抑制能量代谢相关的酶, 从而影响小脑组织的能量代谢。溴隐亭高剂量组的大鼠小脑组织匀浆 CK、 Na^+/K^+ -ATP酶以及纹状体 DA的含量均比染毒组的含量有明显的提高 ($P<0.05$), 说明溴隐亭在一定程度上可以上调神经细胞能量代谢相关的酶, 降低丙烯酰胺的神经损伤程度。

DA含量对照组与染毒组、低剂量组之间差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 说明丙烯酰胺对大鼠中枢神经递质 DA含量有一定拮抗作用; 高剂量组与染毒组、低剂量组之间差异也有统计学意义 ($P<0.05$), 表明 DA受体激动剂溴隐亭在一定程度上能提高大鼠脑内纹状体 DA的含量, 降低丙烯酰胺对 DA的拮抗作用, 降低丙烯酰胺对实验大鼠的神经毒性。

实验结果表明 ACR亚急性中毒模型建立成功, 溴隐亭对丙烯酰胺诱导的大鼠神经系统损伤有一定程度的保护作用。

参考文献:

- [1] 丁茂柏. 科学评估丙烯酰胺危害 [J]. 中国职业医学, 2007, 34 (1): 61-63
- [2] Dan jánov, I. Friedman M. Mesotheliomas of the tunica vaginalis testes of Fischer 344 (F344) rats treated with acrylamide [J]. In vivo, 1998, (12): 495-502
- [3] 宋林丽, 吴崇荣. 丙烯酰胺毒性研究进展 [J]. 国外医学卫生分册, 2005, 32 (6): 325-328
- [4] Richard M L. Pachin, Richard A. Canada. Acrylamide Toxicities and Food Safety: Session IV Summary and Research Needs [J]. Neuro Toxicology, 2004, (25): 507-509.
- [5] 刘仁平, 童建. 丙烯酰胺毒性的最新研究进展 [J]. 职业与健康, 2006, 22 (1): 12-13
- [6] 杜芳, 李锐, 李俊枝, 等. 多巴胺受体激动剂的神经保护作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24 (2): 151-154
- [7] 苏敏, 刘春风. 多巴胺受体激动剂治疗帕金森病最新进展 [J]. 世界临床药物, 2004, 25 (10): 627-629.
- [8] 郝秋月. 丙烯酰胺中毒后小鼠脑中肌酸激酶和三磷酸腺苷含量的改变及意义 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2002, 20 (3): 195-196
- [9] 郝秋月, 韩漫夫, 饶明俐. 丙烯酰胺中毒后 6 周神经组织离子的改变 [J]. 中国工业医学杂志, 2000, 13 (5): 265-267
- [10] 沈玉芹, 吕立夏, 杨翠香. ViC 对丙烯酰胺诱导小脑损伤的保护作用 [J]. 同济大学学报, 2004, 25 (2): 372-373
- [11] 张法永, 张宁远. 丙烯酰胺亚急性中毒小脑损伤的动物实验研究 [J]. 南京医科大学学报, 1997, 17 (4): 358-360

保护劳动者健康

创建和谐社会