

· 实验研究 ·

乙体氯氰菊酯对小鼠脑组织谷氨酰胺酶活性及其 mRNA 表达的影响

Effects of β -cYPermethrin on phosphate activated glutaminase activity and mRNA expression in mouse brain安丽¹, 赵越¹, 阚忠媛², 陈丹², 孙静¹, 杨军¹

AN Li, ZHAO Yue, KAN Zhongyuan, CHEN Dan, SUN Jing, YANG Jun

(1. 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110004; 2. 辽宁省疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110005)

摘要: 健康成年小鼠按体重随机分成 1 个对照组及 3 个染毒组, 每组 10 只, 雌雄各半。染毒组小鼠以灌胃方式分别给予 20、40、80 mg/kg 剂量的乙体氯氰菊酯, 以食用色拉油稀释受试物质, 对照组给予等量色拉油。3 h 后处死小鼠, 采用分光光度法和 RT-PCR 法检测小鼠脑组织谷氨酰胺酶 (Phosphate activated glutaminase, PAG) 活性及其 mRNA 水平。结果 80 mg/kg 剂量组全部小鼠及 40 mg/kg 剂量组 3 只小鼠于染毒 2 h 后出现兴奋症状。小鼠脑组织 PAG 活性随染毒剂量的增加而递增, PAG mRNA 水平则随染毒剂量的增加而逐渐降低, 其中, 80 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 PAG 活性及其 mRNA 水平与对照组相比, 差异有统计学意义。

关键词: 拟除虫菊酯; 神经毒性; 谷氨酰胺酶

中图分类号: R595.4 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2009)04-0283-03

神经毒作用机制一直是拟除虫菊酯毒性研究的热点, 急性中毒时主要表现为中枢神经系统的强烈兴奋性症状, 其发生发展和脑中兴奋性氨基酸递质含量有很好的相关性^[1,2]。谷氨酸 (glutamate, Glu) 是哺乳动物中枢神经系统内一种主要的兴奋性神经递质, 由于 Glu 不能穿过血脑屏障, 脑内 Glu 主要由前体物质——谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 通过 Glu/Gln 循环通路合成和清除^[3]。文献报道, 拟除虫菊酯染毒大鼠脑组织对 Glu 的清除减少^[4,5], 但 Glu 合成是否增多未见报道。谷氨酰胺酶 (phosphate activated glutaminase, PAG) 是经 Glu/Gln 环路合成 Glu 的关键酶和限速酶, 本研究通过乙体氯氰菊酯染毒小鼠脑组织 PAG 活性及其 mRNA 表达的变化, 探讨该类药物对哺乳动物的兴奋性神经毒作用机制, 为中毒防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 受试物质

乙体氯氰菊酯, 分子式 $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$, 相对分子质量 416.3, 纯度 96%; 难溶于水, 易溶于酮类及芳烃等有机溶剂, 于弱酸性、中性介质中稳定, 遇碱分解, 由黄山农药厂提供。

收稿日期: 2008-11-24 修回日期: 2009-01-30

作者简介: 安丽 (1967-) 女, 副教授, 主要从事农药毒理学研究。

1.2 主要试剂和仪器

ADR L 谷氨酰胺、谷氨酰胺脱氢酶 (Sigma 公司)、考马斯亮蓝、 NAD^+ (华美公司)、RT-PCR 试剂盒 (Takara 大连分公司)、RNA out (天泽公司)、DNA 扩增仪 (Biotetra 德国)、凝胶成像仪 (UVP 美国)、凝胶成像分析系统 (Kodak 美国)、离心机 (RC-5C 美国)、紫外可见分光光度计 (UV300 英国)。

1.3 动物分组及处理

SPF 级健康成年昆明种小鼠, 由中国医科大学实验动物部提供, 在温度 $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $55\% \pm 15\%$ 、自然光照条件下适应性喂养 1 周后供试。选择生长状态良好, 体重 20~24 g 的小鼠, 按体重随机分成 1 个对照组及 3 个染毒组, 每组 10 只, 雌雄各半。染毒组小鼠以灌胃方式分别给予 20、40、80 mg/kg 剂量的乙体氯氰菊酯, 灌胃量为 $0.1 \text{ mL}/10 \text{ g}$ 体重。以食用色拉油稀释受试物质, 对照组给予等量色拉油。实验期间自由摄食及饮水, 3 h 后处死小鼠, 取脑组织供试。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 症状观察 染毒后连续观察并记录小鼠中毒症状出现的时间、中毒表现及死亡情况等。

1.4.2 PAG 活性 用预冷 PBS 将脑组织制成体积分数为 5% 的匀浆液, 超声波处理, 参照文献 [6] 测定脑组织 PAG 活性。考马斯亮蓝法 [7] 测定蛋白含量, PAG 活性检测结果以每分钟每毫克组织蛋白催化生成的谷氨酸纳摩尔数 $[\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg Protein})]$ 表示。

1.4.3 PAG mRNA 水平 采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 并由大连宝生物工程有限公司合成。PAG 引物序列为 5'-GAGAAAGTGGAGATCGAAATT3' (sense), 5'-ACCAACATGG-AACGCAA3' (antisense), 扩增片段为 287 bp。 β -actin 引物序列为 5'-TGGAAATCCGTGGCATCCATGAAAC3' (sense), 5'-TAAAA-CGCAGCTCAGTAACAGTCCG3' (antisense), 扩增片段为 349 bp。以动物 RNA 提取脑组织总 RNA, 应用 RT-PCR 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA, 再进行 cDNA 扩增。逆转录条件: 30°C 10 min \rightarrow 42°C 30 min \rightarrow 99°C 5 min \rightarrow 5°C 5 min。扩增条件: 94°C 5 min 1 个循环, 94°C 30 s \rightarrow 50°C 40 s \rightarrow 72°C 1 min 30 个循环, 72°C 7 min 1 个循环, 4°C 保留。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后扫描成像, 再以凝胶成像分析系统进行行分析。以 β -actin 为内参照, 结果以积分光密度值 (integrated density value, IDV) 的相对比值表示。

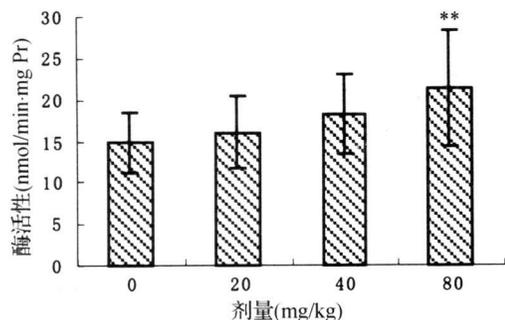
1.5 数据分析

应用 SPSS12.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析, 检验水准为 0.05

2 结果

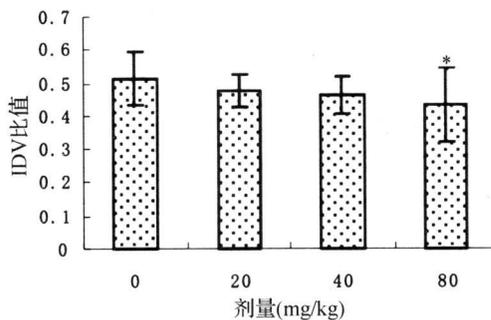
2.1 症状观察

80 mg/kg 剂量组 10 只小鼠于染毒后 2 h 陆续出现兴奋、不安、痉挛、流涎、抓搔等中毒症状, 其中 2 只雌鼠出现濒死状态; 40 mg/kg 剂量组 2 只雌鼠及 1 只雄鼠于染毒后 2 h 出现轻度兴奋症状; 20 mg/kg 组小鼠在整个受试期间未见异常。



2.2 PAG活性及其 mRNA水平

PAG活性检测结果见图 1a 随着染毒剂量的增加, 各组小鼠脑组织 PAG活性逐渐升高, 统计结果表明, 80 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 PAG活性明显高于对照组 ($P < 0.01$)。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后扫描结果见图 2 PAG和 β -actin 的 cDNA 扩增片段均在相应的位置呈现清晰的条带。凝胶成像分析结果见图 1b 随着染毒剂量的增加, 各组小鼠脑组织 PAG mRNA水平逐渐降低, 统计结果表明, 80 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 PAG mRNA水平明显低于对照组 ($P < 0.05$)。



与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 各组小鼠脑组织 PAG 活性 (a) 及其 mRNA 水平 (b) 变化

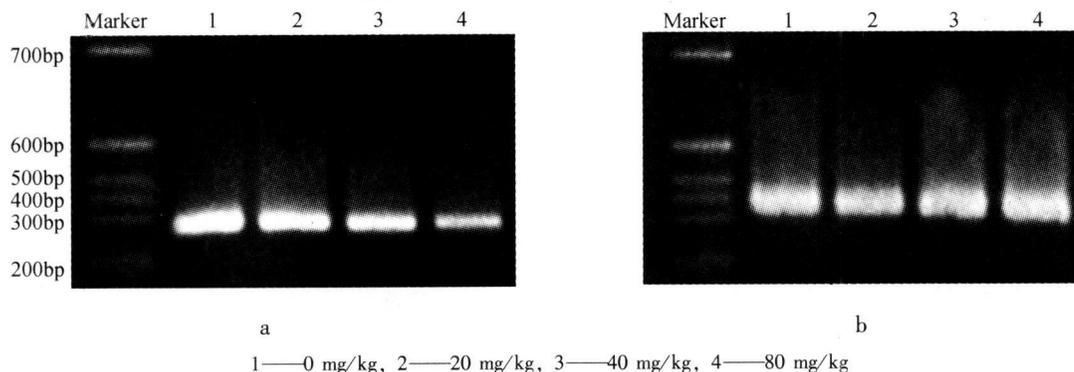


图 2 PAG (a: 287bp) 及 β -actin (b: 349bp) cDNA 扩增片段琼脂糖凝胶电泳扫描结果

3 讨论

拟除虫菊酯类杀虫剂可致脑内 GABA 递质传递紊乱, 使 Glu 与突触后膜上的受体结合增多, 进而引发兴奋性神经毒性 [2-8]。

具有合成和清除 GABA 双重作用的 GABA 循环通路是脑内 GABA 代谢主要途径 [3]; 星形胶质细胞 (astrocyte AC) 提供 GABA 通过细胞间隙释放到神经元内, 经 PAG 的作用水解成 GABA 再被转运至突触囊泡, 释放到突触间隙, AC 膜上的谷氨酸转运体 (glutamate transporter, GLT-1) 将多余的 Glu 摄取 (神经元摄取的极少) 经谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase GS) 的作用重新合成 GABA 构成 GABA 代谢循环通路。

文献报道, 拟除虫菊酯可降低大鼠突触体对 Glu 的摄取功能 [4], 大鼠脑皮质 GABA 含量明显降低 [9], 海马谷氨酰胺合成酶的活性受到明显抑制 [5]。本研究发现, 乙体氯菊酯可使小鼠脑组织 PAG 的活性升高, 其 mRNA 水平并未升高, 反而下降, 提示 PAG 的活性增强可能是由于 GABA 含量减少而导

致的神经元内 PAG 的堆积所致。可能的机制是拟除虫菊酯首先抑制 GS 活性, 阻止 GABA 合成 GABA 使酶反应的产物——GABA 含量减少, 从而使神经元摄取的 GABA 减少, 引起神经元内 PAG 堆积, 负反馈降低其 mRNA 水平; 而 AC 内 GABA 的堆积, 可负反馈作用于 GLT-1, 使之对 GABA 的重摄取减少, 进而使突触间隙 Glu 不能及时清除, 引起一系列中枢神经系统的兴奋症状。

拟除虫菊酯致哺乳动物脑内 GABA 递质传递紊乱是否主要由清除功能下降所致, 尚有待进一步证实。

参考文献:

[1] 谢卓丘, 董英, 冯致英, 等. 溴氰菊酯对大鼠脊髓中递质氨基酸含量的影响 [J]. 卫生毒理学杂志, 1987, 1 (1): 12
 [2] 牛玉杰, 石年, 李龙, 等. 拟除虫菊酯对大鼠脑组织谷氨酸和天门冬氨酸含量的影响 [J]. 河北医科大学学报, 1999, 20 (1): 1-4
 [3] 杨晓运, 李智, 秦绿叶, 等. 星形胶质细胞和神经元之间谷氨酸谷氨酰胺的代谢偶联 [J]. 生命科学进展, 2003, 34 (4): 350-352

- [4] 吴建平, 夏若寒, 石年, 等. 拟除虫菊酯对大鼠突触体谷氨酸摄取功能的影响 [J]. 卫生研究, 1999 28 (5): 261-262
- [5] 安丽, 赵越, 杨军, 等. 乙体氯氰菊酯对雄性大鼠海马谷氨酰胺合成酶活力的影响 [J]. 毒理学杂志, 2006 20 (2): 105-106
- [6] Curthoys RF, Weiss. Regulation of renal ammoniogenesis: subcellular localization of rat kidney glutamine isoenzymes [J]. J Biol Chem 1974 249: 3261-3266

- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem 1976 72 (7): 248-254
- [8] Mayer ML, Westbrook GL. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system [J]. Pharmacol Rev 1989 40: 145
- [9] 赵越, 安丽, 杨军, 等. 乙体氯氰菊酯对大鼠脑皮质谷氨酰胺及谷胱甘肽的影响 [J]. 中国公共卫生 2006 22 (11): 1352

三邻甲苯磷酸酯诱发迟发性神经毒性动物模型的机制初探

Primary study on mechanism of OPIDN induced by TOCP in hens

刘黎, 谢广云, 王健, 郑敏, 赵文锦, 孙金秀

LIU Li, XIE Guangyun, WANG Jian, ZHENG Min, ZHAO Wenjin, SUN Jinxiu

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

摘要: 选取 12月龄的来亨母鸡 24只, 随机分为 4组, 分别作为赋性剂对照组和 3个三邻甲苯磷酸酯 (TOCP) 染毒组。TOCP染毒组的动物经口一次性灌胃染毒, 剂量分别为 250、500、750 mg/kg。观察中毒症状, 染毒后第 21天处死动物, 取脑组织, 匀浆后 Western blot 测定大脑组织蛋白激酶 A (PKA)、磷酸化环腺苷酸反应元件结合蛋白 (CREB)、微管相关蛋白 2 (MAP2) 和 Tau2 蛋白的含量。结果 500 和 750 mg/kg 剂量组动物出现不同程度共济失调症状。低、中、高剂量组 PKA 含量显著升高, 分别较对照组升高了 23%、46%、70% ($P < 0.01$); 中、高剂量组 CREB 显著升高, 分别较对照组升高了 23% ($P < 0.05$)、37% ($P < 0.01$); 中、高剂量组 MAP2 显著升高, 分别较对照组升高了 25% ($P < 0.01$)、23% ($P < 0.05$); Tau2 均未见显著性改变。

关键词: 三邻甲苯磷酸酯; 迟发性神经病; 蛋白激酶 A; 微管相关蛋白 2

中图分类号: R595.4 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2009)04-0285-03

有机磷酸酯类化合物可使人及敏感动物产生迟发性神经病 (organophosphate-induced delayed neuropathy, OPIDN), 其主要特征是在接触有机磷后 7~14 d 或更长时间出现肢体感觉异常、肌肉疼痛、无力、麻痹甚至瘫痪^[1]。我国发生过多起较大规模的 OPIDN 中毒事件, 近年来仍有有机磷杀虫剂中毒而致 OPIDN 病例的报道。然而, OPIDN 的发生的机制至今尚不完全清楚。

Johnson^[1]假设“神经毒性酯酶的抑制和随后发生的老化是 OPIDN 发生的前提条件”曾得到广泛认同。但老化后的 NTE 如何导致 OPIDN 的发生不甚清楚, 近来还有研究发现一些 OPs 引起 OPIDN 并不需要 NTE 的抑制和老化。

本实验试图用成年母鸡建立 OPIDN 动物模型, 检测其大

脑组织蛋白激酶 A (PKA)、磷酸化环腺苷酸反应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB)、微管相关蛋白 2 (microtubulin associated protein 2, MAP2)、Tau 蛋白的含量, 初步探讨 TOCP 引起 OPIDN 的可能机制。

1 材料与与方法

1.1 试剂

TOCP 为 Sigma 公司产品, 单克隆鼠抗 MAP-2 为 Millipore 公司产品, 单克隆鼠抗 Tau-2 为 Sigma 公司产品, 多克隆兔抗 CREB 为 Abcam 公司产品, 多克隆兔抗 PKA 和发光试剂盒为 Santa Cruz 公司产品, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 和 actin 抗体为碧云天生物技术研究所产品。

1.2 动物处理

选取 8~12月龄的健康成年产卵母鸡, 24只, 随机分为 4组, 每组 6只, 分别作为赋性剂对照组和 3个 TOCP 染毒组。TOCP 染毒组的动物经口一次性灌胃染毒, 剂量分别为 250、500、750 mg/kg。所有实验鸡在给药前 10 min 均给予硫酸阿托品 (10 mg/kg 皮下注射), 染毒后也根据需要注射阿托品, 以防止急性胆碱能中毒所致死亡; 对照组灌以等量的赋性剂, 其他处理与染毒组相同; 实验期限为 21 d。仔细观察动物的中毒症状, 按 Hollingshaus (1981) 进行 OPIDN 中毒症状分级 (I 级: 腿软, 站立姿势和步态稍异常; II 级: 步态严重异常, 行走时不断跌倒; III 级: 能勉强站立, 但多以足站立; IV 级: 不能站立, 通过扇动翅膀移动身体)。

1.3 蛋白检测

染毒后第 21 天处死动物, 迅速取出大脑, 置于液氮中, 随后转移至 -80°C 保存备用。将组织剪成细小碎片, 按照 20 mg 组织加入 100~200 μl 细胞裂解液的比例加入裂解液。用玻璃匀浆器匀浆, 直至充分裂解。之后, 10 000 g 离心 5 min 取上清液, -80°C 储存备用。采用 Western 印迹法分别进行 PKA、CREB、MAP2 和 Tau-2 蛋白的检测, 以 actin 作为内参。上样量均为 50 μg 。所有样品电泳均在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶系统中进行, 稳压 60 V。当染料前沿进入分离胶后, 将

收稿日期: 2009-04-15

作者简介: 刘黎 (1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 卫生毒理学。