

鱼藤酮对大鼠纹状体兴奋性氨基酸及 NMDA受体表达的影响

刘辉, 尹芳秋, 郭魁亮, 高秋菊, 贺森, 孙海萍

(白求恩医学院卫勤教研室, 河北 石家庄 050081)

摘要: 目的 观察鱼藤酮对大鼠纹状体兴奋性氨基酸 (excitatory amino acid, EAAs) 及 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA)受体表达的影响。方法 采用 Alze微量泵背部埋植法建立大鼠鱼藤酮慢性中毒模型, 应用高效液相色谱法 (HPLC) 检测鱼藤酮染毒大鼠纹状体谷氨酸 (glutamate, Glu) 和天门冬氨酸 (aspartic acid, Asp) 浓度, RT-PCR技术观察 NMDA受体功能亚基 NR₁和调节亚基 NR_{2A}、NR_{2B}基因表达的变化。结果 与正常对照组比较, 鱼藤酮染毒大鼠中脑纹状体兴奋性氨基酸浓度明显升高, NMDA受体功能亚基和调节亚基基因表达异常。表现为 2.0 mg/kg与 4.0 mg/kg鱼藤酮染毒组 NR₁亚基表达明显上调 ($P < 0.05$), NR_{2A}亚基 mRNA表达亦显著升高 ($P < 0.01$), 而 NR_{2B}基因表达在 2.0 mg/kg鱼藤酮染毒组未见明显改变。结论 鱼藤酮染毒可致中脑纹状体 EAAs水平升高, NMDA受体结构功能发生改变, 从而诱导兴奋毒性损伤的产生。

关键词: 鱼藤酮; 纹状体; 兴奋性氨基酸; N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA)受体

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2010)04-0247-03

Effect of rotenone on levels of excitatory amino acids and expression of NMDA receptor in striatum of rat

LIU Hui, YIN Fangqiu, GUO Kuiliang, GAO Qiuju, HE Sen, SUN Hai-ping

(Department of Health Service, Norman Bethune Military Medical College, Shijiazhuang 050081, China)

Abstract: Objective To explore the effect of rotenone on the levels of excitatory amino acids (EAAs) and the expression of NMDA receptor (NMDAR) in the striatum of rat. Methods Chronic rotenone intoxicated model was established through subcutaneous injection of osmotic pump with rotenone in the back of rat. The levels of glutamate (Glu) and aspartic acid (Asp) in striatum of rat were detected by high performance liquid chromatography (HPLC), and the expression of NMDAR subunits' mRNA such as NR₁, NR_{2A} and NR_{2B} were measured by RT-PCR. Results Compared with those in control group, the levels of Glu and Asp in striatum of rotenone treated groups were increased significantly ($P < 0.01$), and mRNA expressions of NR₁ and NR_{2A} in all rotenone treated groups were obviously up-regulated, and the expression of NR_{2B} mRNA in high dose (4 mg/kg) rotenone treated group was also enhanced significantly. Conclusion It was suggested that rotenone could induce the increase of EAAs in the striatum and as a consequence, the expression of NMDAR mRNA was also up-regulated, which might be the possible mechanism of rotenone neurotoxicity.

Key words: rotenone; striatum; excitatory amino acids; N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor

鱼藤酮 (rotenone) 是线粒体抑制类农药, 长期接触该类化合物可导致黑质纹状体多巴胺神经通路损伤, 动物产生类似帕金森病 (PD) 的行为学改变^[1]。兴奋性氨基酸在 PD 的病理机制中具有重要作用。在 PD 发展过程中, 谷氨酸通路处于过度活化状态, 并通过多种受体发挥神经毒性作用^[2]。现今认为 PD 与 NMDA 受体的过度激活亦有关, 并依此建立了相关动物模型。本研究通过观察鱼藤酮染毒大鼠纹状体兴奋性氨基酸及其受体表达的变化, 初步探讨鱼藤酮的神

经毒理机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

鱼藤酮纯度 97.6% 购自 Sigma 公司, Tripure 购自 Roche 公司, 邻苯二甲醛色谱纯购自南京德宝生化公司, Alze 微量渗透泵由 Alzet corporation 公司提供。PCR 仪购自 Eppendorf 公司, 高效液相色谱为日本岛津公司产品。

1.2 鱼藤酮染毒动物模型

SD 大鼠 24 只, 雄性, 体重 200~230 g 由河北医科大学实验动物中心提供。实验大鼠随机分为正常对照、溶剂对照 (二甲基亚砜)、2.0 mg/kg 和 4.0 mg/kg 鱼藤酮中毒 4 个实验组, 每组设 6 只动物。采

收稿日期: 2009-11-02 修回日期: 2010-01-24

作者简介: 刘辉 (1974-), 博士, 讲师, 研究方向: 环境毒物神经毒理机制研究。

用 Alze 微泵背部埋植法建立大鼠慢性中毒模型。将鱼藤酮溶液过滤除菌后注射至微泵并接上导管，分离大鼠颈静脉结扎远心端，将导管向近心端插入 2~3 cm 后结扎固定导管，将微泵植入背部皮下后缝合伤口，密切观察大鼠一般情况，加强护理及营养支持，染毒时间为 28 d。

1.3 高效液相色谱法检测纹状体 EAA 含量

采用高效液相色谱法柱前衍生荧光法检测谷氨酸 (Glu) 和天门冬氨酸 (Asp) 含量，具体操作参照文献 [3]。染毒大鼠处死后取纹状体，称重后以 1:9 (W/V) 加入生理盐水，手动玻璃匀浆器冰浴匀浆，匀浆液在 3 000 r/min 低温离心 15 min 取上清液 0.5 ml 加 1 mol/L HCl，10 000 r/min 离心 10 min 取 0.5 ml 上清液加入 2 mol/L K₂CO₃ 1 ml 10 000 r/min 离心 20 min 取上清液 30 μl 加入等体积邻苯二甲醛 (OPA) 衍生液，充分混匀，室温反应 2 min 进样。流动相含 0.1 mol/L Na₂HPO₄、0.1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) 和 30% 甲醇，激发波长为 380 nm，发射波长为 456 nm，柱温 38℃。

1.4 RT-PCR 检测 NMDA 受体 mRNA 的表达

按 Tripure 试剂说明书提取各实验组纹状体组织总 RNA，PCR 引物参照文献 [4] 设计，由上海英骏生物技术公司合成，设 GAPDH 阳性产物作为 PCR 内参照。NR₁ 亚基引物：上游 5-AGCGGGTAAACAA-CAGCAACAAAA-3' 下游：5-GAATCGGCCAAAGG-GACTGAA-3' 产物长度 305 bp；NR_{2A} 亚基引物：上游 5-TTATTGATGAACCGCACTGACC-3' 下游：5-GCATATCCCAGCCCACAAAG-3' 产物长度 388 bp；NR_{2B} 亚基引物：上游 5-GGCCTTCTTIGCIGIC-3' 下游：5-AGTICTTCCATCTCCCCATCTC-3' 产物长度 471 bp；设 GAPDH (542 bp) 阳性产物为内参照。逆转录反应体系包括 4 μg RNA oligo (dT) 15、RNA 酶抑制剂、dNTPs、5× RT 缓冲液和 M-MLV 逆转录酶，反应体积为 20 μl。设定 PCR 扩增条件 (NR₁: 95℃ 预变性 5 min，95℃ 变性 30 s，60℃ 复性 30 s，72℃ 延伸 45 s，循环 35 次，72℃ 延伸 10 min；NR_{2A}: 95℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 30 s，52℃ 复性 60 s，72℃ 延伸 60 s，循环 40 次，72℃ 延伸 10 min；NR_{2B}: 95℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 30 s，62℃ 复性 30 s，72℃ 延伸 60 s，循环 35 次，72℃ 延伸 10 min)。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳，BIO-RAD 凝胶成像分析系统进行灰度扫描。目的条带表达量的计算为目的条带灰度值 / GAPDH 条带灰度值。

1.5 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS12.0 软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 鱼藤酮染毒大鼠一般情况观察

与正常对照组比较，鱼藤酮染毒大鼠普遍出现进食减少、体重下降、毛色变黄、竖毛、行动迟缓、后肢无力等表现，且随着染毒时间增加上述症状更加明显，后期大鼠出现行动困难、木僵、肌肉震颤和弓背状姿势等类帕金森病候群特征。而溶剂对照组大鼠未见上述变化，行动、饮食正常。

2.2 鱼藤酮对大鼠纹状体 EAA 含量的影响

与正常对照组比较，溶剂对照组 Glu 和 Asp 含量变化并不显著；2.0 mg/kg 鱼藤酮组 Glu 和 Asp 含量均显著升高 (P < 0.05)，4.0 mg/kg 鱼藤酮组含量进一步升高，与正常对照组比较差异有统计学意义 (P < 0.01)，见表 1。

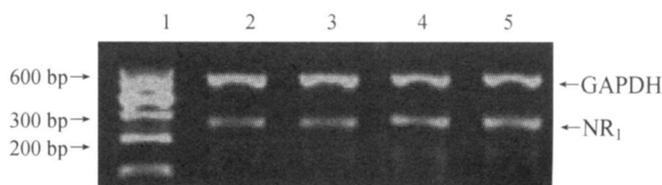
表 1 鱼藤酮染毒大鼠纹状体 Glu 和 Asp 含量的变化

| 组别 | (n=6 $\bar{x} \pm s$) | |
|----------------|------------------------|---------------|
| | Glu 含量 | Asp 含量 |
| 正常对照组 | 11.95 ± 1.35 | 7.27 ± 0.58 |
| 溶剂对照组 | 12.05 ± 1.42 | 7.85 ± 0.66 |
| 2.0 mg/kg 鱼藤酮组 | 13.06 ± 1.58 | 8.04 ± 0.75* |
| 4.0 mg/kg 鱼藤酮组 | 15.83 ± 1.84** | 9.98 ± 0.81** |

注：与正常对照组比较，* P < 0.05 ** P < 0.01

2.3 染毒大鼠纹状体 NMDA 受体亚基 mRNA 的表达变化

图 1 可见，与正常对照组比较，2.0 mg/kg 和 4.0 mg/kg 鱼藤酮染毒组大鼠纹状体 NR₁ mRNA 表达显著增强 (P < 0.05)，见表 2。图 2 可见，2.0 mg/kg 鱼藤酮染毒组大鼠 NR_{2A} mRNA 表达与对照组相比差异无统计学意义，4.0 mg/kg 鱼藤酮中毒组 NR_{2A} mRNA 表达则明显增强 (P < 0.05)，见表 2。图 3 可见，随着鱼藤酮染毒剂量的增加，大鼠纹状体 NR_{2B} mRNA 表达逐步升高，与对照组相比差异有统计学意义 (P < 0.01)，见表 2。



1—Marker 2—正常对照组；3—溶剂对照组；4—2.0 mg/kg 鱼藤酮组；5—4.0 mg/kg 鱼藤酮组；图 2 图 3 同。

图 1 NR₁ 亚基 mRNA RT-PCR 扩增产物

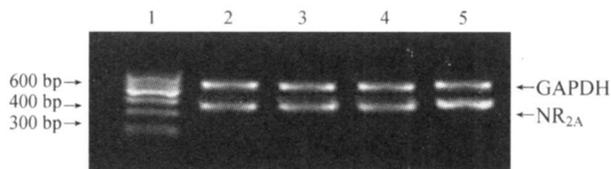


图2 NR_{2A}亚基 mRNA RT-PCR 扩增产物

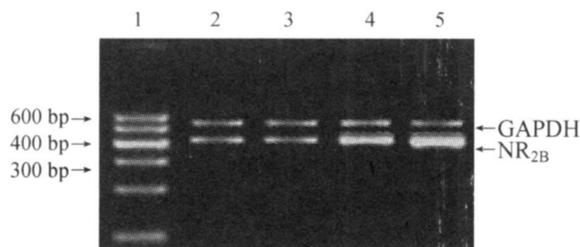


图3 NR_{2B}亚基 mRNA RT-PCR 扩增产物

表 2 染毒大鼠纹状体 NR₁、NR_{2A}和 NR_{2B}亚基 mRNA

表达的相对值 (x±s)

| 组别 | $A_{(NR_1)} / A_{(GAPDH)}$ | $A_{(NR_{2A})} / A_{(GAPDH)}$ | $A_{(NR_{2B})} / A_{(GAPDH)}$ |
|----------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常对照组 | 0.249±0.048 | 0.987±0.178 | 1.365±0.269 |
| 溶剂对照组 | 0.315±0.051 | 0.946±0.098 | 1.405±0.315 |
| 2.0 mg/kg 鱼藤酮组 | 0.658±0.096* | 0.995±0.152 | 2.687±0.996** |
| 4.0 mg/kg 鱼藤酮组 | 0.780±0.105* | 1.459±0.117* | 4.038±1.178** |

注: 与正常对照组比较, * P<0.05 ** P<0.01

3 讨论

鱼藤酮染毒大鼠出现自主活动减少、动作迟缓、弓背等行为学改变,且随着中毒时间的增加,部分大鼠出现肌肉震颤、四肢僵直等类 PD 症状甚至死亡。目前普遍认为,鱼藤酮能够诱导大鼠中脑黑质多巴胺神经元变性损伤,破坏黑质纹状体多巴胺正常代谢通路,可能是其最主要的神经毒理机制之一^[5]。但也有研究发现,纹状体内多巴胺的缺失并不是 PD 的唯一病理基础,脑内其他神经递质也可能参与 PD 的发病过程。其中,兴奋性氨基酸(如 Glu)与 PD 发生、发展的相关性已经成为研究热点之一^[6]。

兴奋性神经毒性即由兴奋性神经递质谷氨酸受体的过度持续活化而导致的神经元死亡过程。兴奋性氨基酸受体过度激活,使此类受体在正常生理条件下引起的第二信使效应得以扩大,突触后神经元过度兴奋并最终死亡。兴奋性神经毒性的重要机制之一是 NMDA 受体过度兴奋多介导的神经细胞迟发性损伤,以持续的 Ca²⁺内流为特征。大量 Ca²⁺内流引起钙超载,导致细胞钙稳态失调,最终引发神经细胞不可逆性的损伤或死亡^[7]。

NMDA受体由 NR₁、NR₂和 NR₃亚基组成,其中 NR₁是基本的功能单位,而 NR₂为调节亚基,主要由 NR_{2A}和 NR_{2B}等构成,其介入则修饰了整个受体的功能特征,影响 Glu和 NMDA受体的结合能力,调节受体通道活性。谷氨酸的结合区域是 NR₁和 NR₂的连接部,因此两种亚基的同时表达是形成功能型离子通道所必需的^[8]。

本实验发现,鱼藤酮染毒组大鼠纹状体兴奋性氨基酸 Glu和 Asp含量均显著升高,与正常对照组比较差异有统计学意义。进一步观察 NMDA受体表达发现,功能亚基 NR₁ mRNA在鱼藤酮染毒后表达明显增强,调节亚基 NR_{2A}和 NR_{2B}基因表达随染毒剂量的增加亦显著升高。NR_{2B}是 NR₂最主要的亚单位,与神经细胞发育和神经毒性密切相关^[8]。NR_{2B}的表达增强,提示此时出现受体通道的活性高峰,是神经元兴奋性升高的重要环节。上述实验结果显示,鱼藤酮染毒后有可能通过过度激活 Glu-NMDA受体通路损害神经细胞,为进一步探索鱼藤酮神经毒理机制和临床治疗药物的研发提供了新的思路。

参考文献:

- [1] He Y, Fan SZ, Dong ZJ, et al. Role of nitric oxide in rotenone-induced nigrostriatal injury [J]. J Neurochem 2003; 86 (6): 1338-1345
- [2] Bustos G, Abarrca J, Bustos V, et al. NMDA receptors mediate an early up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in substantia nigra in a rat model of presymptomatic Parkinson's disease [J]. J Neurosci Res 2009; 87 (10): 2308-2318
- [3] 吴强恩, 郑力行, 谢芳, 等. 反相高效液相色谱法测定脑组织中氨基酸类神经递质 [J]. 复旦学报(医学版) 2005; 32 (3): 355-358
- [4] 张彦文, 余争平, 谢燕, 等. 微波辐照对大鼠海马区 NMDA 受体亚基基因表达的影响 [J]. 卫生研究, 2008; 37 (1): 25-28
- [5] Cannon JR, Tapia V, Nair HM, et al. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease [J]. Neurobiol Dis 2009; 34 (2): 279-290
- [6] Adrian G D, Charles K M, Mitchell B, et al. A synaptic plasticity and glutamate function in a cholinergic mouse model of Parkinson's disease [J]. Exp Neurol 2004; 190 (1): 145-156
- [7] Foran E, Trotti D. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Antioxid Redox Signal 2009; 11 (7): 1587-1602
- [8] Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunit function and pharmacology [J]. Curr Opin Pharmacol 2007; 7 (1): 39-47
- [9] Yuan H, Hansen K B, Vance K M, et al. Control of NMDA receptor function by the NR₂ subunit amino terminal domain [J]. J Neurosci 2009; 29 (39): 12045-12058