

• 实验研究 •

乙体氯氰菊酯对小鼠脑组织 Glu、GABA 代谢酶活性的影响

Effects of beta-cypermethrin on enzyme activity for glutamate and γ -aminobutyric acid metabolism in mouse brain孙静^{1,2}, 邵岩¹, 韩阳¹, 曹德庆¹, 刘莉¹, 安丽¹SUN Jing^{1,2}, SHAO Yan¹, HAN Yang¹, CAO De-qing¹, LIU Li¹, AN Li¹

(1. 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001; 2. 佳木斯市疾病预防控制中心, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 为探讨乙体氯氰菊酯的神经毒性, 将健康成年昆明种小鼠按体重随机分为 4 组, 雌雄各半。染毒组小鼠以一次经口灌胃方式分别给予 20、40、80 mg/kg 剂量的乙体氯氰菊酯, 灌胃量为 0.2 ml/10 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。灌胃后 2 h, 采用分光光度法测定小鼠脑组织谷氨酰胺合成酶 (GS)、谷氨酰胺酶 (PAG)、谷氨酸脱羧酶 (GAD) 及 γ -氨基丁酸转氨酶 (GABA-T) 活性。结果显示, GABA-T 活性随着染毒剂量的增加而逐步降低, 其中 80 mg/kg、40 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 GABA-T 活性明显低于对照组 (分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$, $n = 10$)。各染毒组小鼠脑组织 GS、PAG、GAD 活性与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, $n = 10$)。提示 GABA-T 活性降低可能是拟除虫菊酯致 Glu 和 GABA 平衡紊乱的原因之一。

关键词: 拟除虫菊酯; 谷氨酰胺合成酶; 谷氨酰胺酶; γ -氨基丁酸转氨酶; 谷氨酸脱羧酶

中图分类号: R994.4 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2011)05-0357-02

乙体氯氰菊酯 (beta-cypermethrin) 是目前应用较为广泛的含 α 氰基的拟除虫菊酯 (pyrethroid, PD) 类农药, 本研究拟通过对该药染毒小鼠脑组织谷氨酸 (glutamate, Glu) 和 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 代谢酶谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS)、谷氨酰胺酶 (phosphate-activated glutaminase, PAG) 及谷氨酸脱羧酶 (glutamate decarboxylase, GAD)、 γ -氨基丁酸转氨酶 (GABA transaminase, GABA-T) 活性的检测, 探讨 PD 的神经毒性, 为该类农药的中毒防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物 乙体氯氰菊酯, 又名高效氯氰菊酯; 外观呈白色粉末状, 分子式为 $C_{22}H_{19}C_{12}NO_3$, 相对分子量 416.3; 有效成分为总酯 97.16%, 高效体含量 96%; 难溶于水, 易溶于酮类及芳烃等有机溶剂。

1.1.2 动物分组及处理 健康成年昆明种小鼠 80 只, 体重

18~22 g。按体重随机分为 4 组, 每组 20 只, 雌雄各半。染毒组小鼠以一次经口灌胃方式分别给予 20、40、80 mg/kg 剂量的乙体氯氰菊酯, 灌胃量为 0.2 ml/10 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。小鼠灌胃后 2 h, 乙醚麻醉处死, 取脑组织, 每组各 10 只小鼠左脑或右脑组织分别用于测定 GS、PAG 及 GAD、GABA-T 活性。

1.1.3 主要仪器和试剂 LIBRORAE40SM 电子天平, 日本 Shimadzu; UV-1601 紫外可见分光光度计, 日本 Shimadzu; 6K15 冷冻离心机, 德国 SIGMA GER; Multiskan MK3 酶标仪, 美国 Thermo; HH-60 恒温数显水箱, 江苏常州国华电器有限公司; 牛血清白蛋白、5'-磷酸吡哆醛、 γ -氨基丁酸, 美国 Sigma 公司; α -酮戊二酸、谷胱甘肽、ADP、NADH, 美国 Biosharp 公司; 考马斯亮蓝, 华美公司。

1.2 检测指标和方法

1.2.1 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。

1.2.2 酶活性测定 以不同匀浆介质将脑组织制成相应浓度的匀浆液, 超声处理, 采用分光光度法测定 GS、PAG 及 GAD、GABA-T 活性。用预冷 PBS 缓冲液 (内含甘油、TritonX-100、GSH、5'-磷酸吡哆醛、 Na_2EDTA , pH6.8) 将脑组织制成 10% 匀浆, 参照文献 [1] 测定脑组织 GABA-T 活性。用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 将脑组织制成 10% 匀浆液, 参照文献 [2] 测定脑组织 GAD 活性。用预冷生理盐水将脑组织制成 1% 匀浆液, 参照文献 [3] 测定脑组织 GS 活性。用预冷 PBS 匀浆液 (内含磷酸钾、EDTA、Tris-HCl, pH7.8) 将脑组织制成 10% 匀浆液, 参照文献 [4] 测定脑组织 PAG 活性。

1.2.3 蛋白含量测定 将脑组织制成 1% 匀浆液, 采用考马斯亮蓝法^[5]测定脑组织蛋白含量。

1.3 数据处理和统计分析

计量资料实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 症状观察

80 mg/kg 剂量组全部小鼠于染毒后 1 h 出现舔身、多动、抓搔等症状; 染毒后 2 h 陆续出现流涎、痉挛、步态不稳、共济失调等中毒症状。40 mg/kg 剂量组个别小鼠于染毒后 2 h 出现舔身、多动、抓搔等症状。20 mg/kg 剂量组小鼠在整个受试期间未见异常。实验期间无动物死亡。

收稿日期: 2011-05-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30872144)

作者简介: 孙静 (1984—), 女, 硕士, 研究方向: 食品安全风险评估与评估。

通讯作者: 安丽, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经毒理。

2.2 酶活性

各组小鼠脑组织 GS、PAG 及 GAD、GABA-T 活性检测结果见表 1。统计结果表明, GABA-T 活性随着染毒剂量的增加而逐渐降低, 其中 80 mg/kg、40 mg/kg 剂量组小鼠脑组织

GABA-T 活性明显低于对照组 (分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。各染毒组小鼠脑组织 GS、PAG、GAD 活性与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠脑组织 GS、PAG 及 GAD、GABA-T 活性测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

染毒剂量 (mg/kg)	<i>n</i>	GS [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg P})$]	PAG [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg P})$]	GAD [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg P})$]	GABA-T [$\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg P})$]
0	10	0.37 ± 0.04	1.50 ± 0.27	0.12 ± 0.03	7.08 ± 2.14
20	10	0.38 ± 0.04	1.38 ± 0.23	0.13 ± 0.03	5.75 ± 1.18
40	10	0.36 ± 0.03	1.47 ± 0.28	0.13 ± 0.05	$5.33 \pm 1.44^*$
80	10	0.38 ± 0.05	1.30 ± 0.26	0.12 ± 0.03	$4.69 \pm 1.09^{**}$

注: 与 0 mg/kg 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

PD 类农药是一类化学结构和生物活性类似天然除虫菊酯的仿生合成杀虫剂, 具有杀虫广谱、高效、低毒、低残留等特点, 在人们的生产生活中有着广泛的应用。根据其化学结构的不同可将 PD 分为无 α 氰基的 I 型和含 α 氰基的 II 型^[6], 目前已商品化的 PD 达 50 多种^[7]。PD 急性中毒时, 主要表现为中枢神经系统的中毒症状, 其神经毒性一直是该药毒性研究领域的热点。Glu 和 GABA 是中枢神经系统中一对重要的兴奋性和抑制性神经递质。研究发现, PD 可致中枢神经系统 GABA 调控减弱、Glu 信号转导系统紊乱, 进而引起兴奋性神经毒性^[8-9]。Glu 不能透过血脑屏障, 脑内的 Glu 主要来自其前体谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 或三羧酸循环, 谷氨酸-谷氨酰胺 (Glu-Gln) 环路是脑内 Glu 代谢的主要途径^[10], GS 和 PAG 是此环路中合成和水解 Glu 的关键酶。GABA 在脑中含量较高, 脑内生成 GABA 的代谢通路称为 GABA 支路^[11], GABA-T 和 GAD 是 GABA 支路上的关键酶。Glu 和 GABA 在维持中枢神经系统兴奋/抑制平衡方面具有重要作用, 二者比例的失衡可导致细胞功能持久或不可逆的改变。

以往的研究证实, 乙体氯氰菊酯染毒后 3 h, 小鼠脑组织 GS 活性降低, PAG 活性升高。本研究以相同剂量的乙体氯氰菊酯染毒小鼠, 染毒后 2 h 小鼠脑组织 GS、PAG 活性均未见改变, GAD 活性也未见改变, 而 GABA-T 活性明显降低。另有文献^[12]报道, 以丙烯菊酯和溴氰菊酯作为 I 型和 II 型 PD 的代表, 观察它们对大鼠脑组织 GABA-T 活力的影响时发现, 在体外, 溴氰菊酯和丙烯菊酯均对大鼠脑组织 GABA-T 活力无明显影响; 在体内, 一次性经口给予较大剂量溴氰菊酯可使大鼠大脑皮层、海马和小脑的 GABA-T 活力下降, 并且丙烯菊酯和溴氰菊酯对 GABA-T 活力的影响存在差异。综上所述, GABA-T 活性降低可能是 PD 导致 Glu 和 GABA 平衡紊乱的原因之一, 详细毒作用机制有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] 李玉凤, 关永彪, 廖明阳. 大鼠不同脑区中 γ -氨基丁酸转氨酶活

力的测定 [J]. 卫生毒理学杂志, 2004, 18 (4): 303-304.

- [2] 许建军, 江波许, 许时婴. 比色法快速测定乳酸菌谷氨酸脱羧酶活力及其应用 [J]. 微生物通报, 2004, 31 (2): 66-71.
- [3] Renis M, Cardile V, Russo A, *et al.* Glutamine synthetase activity and HSP70 levels in cultured rat astrocytes: effect of 1-octadecyl-2-methylrac-glycero-3-phosphocholine [J]. Brain Res, 1998, 783: 143-150.
- [4] Curthoys N P, Weiss R H. Regulation of renal ammoniogenesis sub-cellular localization of rat kidney glutaminase isoenzymes [J]. J Bio Chem, 1974, 249: 3261-3266.
- [5] Bradford M M. 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.
- [6] Gassner B, Wuthrich A, Scholtysik G, *et al.* The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex [J]. Pharmacol, 1997, 281: 855-860.
- [7] 胡文静, 屈艾, 仇敬运, 等. 环境物质拟除虫菊酯毒理学研究进展 [J]. 环境科学与管理, 2007, 32 (10): 52-54.
- [8] Lawrence L J, Casida J E. Stereospecific action of pyrethroids insecticides on GABA receptor-ionophore complex [J]. Science, 1983, 221: 1399-1401.
- [9] Bloomquist J R, Adams P M, Soderlund D M. Inhibition of GABA stimulated chloride flux in mouse brain vesicles by polychlorocycloalkane and pyrethroid insecticides [J]. Neurotoxicol, 1986, 7: 11-20.
- [10] Narahashi T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides [J]. Pharmacol Toxicol, 1996, 79 (1): 1-14.
- [11] Walls A B, Nilsen L H, Eyiolfsson E M, *et al.* GAD65 is essential for synthesis of GABA destined for tonic inhibition regulating epileptiform activity [J]. Neurochemistry, 2010, 115 (6): 1398-1408.
- [12] 纪之莹, 石年, 王袭青, 等. 拟除虫菊酯对大鼠脑 γ -氨基丁酸转氨酶活力的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21 (3): 197-199.