

褪黑素对锰中毒大鼠脑谷氨酸代谢和转运的影响

邓宇, 徐兆发, 徐斌, 王飞, 李晶

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 探讨氯化锰对大鼠脑谷氨酸代谢和转运的影响及褪黑素的干预作用, 为锰中毒的防治提供理论依据。方法 Wistar 大鼠 24 只, 按体重随机分成 3 组, 每组 8 只。第 1 组为对照组, 腹腔注射 0.9% 氯化钠, 第 2 组为单纯染锰组, 腹腔注射 0.9% 氯化钠, 第 3 组为褪黑素干预组, 腹腔注射 21.5 $\mu\text{mol/kg}$ 褪黑素, 2 h 后第 1 组皮下注射生理盐水, 第 2 组和第 3 组皮下注射 200 $\mu\text{mol/kg}$ 氯化锰。注射容量均为 5 ml/kg, 每日注射 1 次连续染毒 4 周; 染毒结束后 24 h, 将大鼠用乙醚麻醉, 腹主动脉取血, 断头分离大脑纹状体和皮质; 测定脑纹状体谷氨酸合成酶 (GS)、谷氨酰胺酶 (PAG) 的活性, 大脑皮质 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性和丙二醛 (MDA) 含量。结果与对照组比较, 单纯染锰组 GS、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶降低 14.93%、54.19% 和 46.55%, MDA 含量和 PAG 酶活性分别升高 1.54 倍和 1.43 倍。与单纯染锰组比较, 褪黑素干预组中 GS、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶分别升高至 1.13、1.62 和 1.35 倍, MDA 含量降低 13.36%, PAG 酶活性未见改变。结论 锰能导致大鼠脑谷氨酸代谢和转运障碍, 褪黑素对其有一定的拮抗作用。

关键词: 锰; 褪黑素; 谷氨酸

中图分类号: R994.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-221X(2011)06-0414-03

Effects of melatonin on metabolism and transport of glutamate in brain of manganese poisoned rats

DENG Yu, XU Zhao-fa, XU Bin, WANG Fei, LI Jing

(Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of manganese on the metabolism and transport of glutamate, and the intervention effect of melatonin on them. **Methods** 24 Wistar rats were randomly divided into three groups according to weight. The first was the control group given intraperitoneal (ip) injection of 0.9% NaCl only; the second was manganese exposed group received ip injection of 0.9% NaCl (5 ml/kg) first; the third was melatonin intervention group which was injected ip with 21.5 $\mu\text{mol/kg}$ melatonin. Two hours later, the control group was given subcutaneous (sc) injection of 0.9% NaCl (5ml/kg) again, the second and third group were given sc injection of 200 $\mu\text{mol/kg}$ MnCl_2 once a day, for 4 weeks. 24 hours after last injection, the activities of GS (glutamate synthetase) and PAG (phosphate-activated glutaminase) in striatum and the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$, the content of MDA in cerebral cortex were determined. **Results** Compared with control group, the activities of GS, levels of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ in manganese-exposed group were reduced 14.93%, 54.19% and 46.55% respectively, the content of MDA and the activity of PAG were increased 1.54 and 1.43 times respectively while the activities of GS, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ in melatonin group were 1.13, 1.62 and 1.35 times increased, the MDA content also showed obvious decrease compared with the manganese-exposed group. **Conclusion** The results suggested that manganese may cause dysfunction of glutamate in metabolism and transport, melatonin shows a definite antagonistic effect on it.

Key words: manganese; melatonin; glutamate

锰是人体内必需的微量元素之一, 但过量摄入可以产生神经毒性。锰中毒的症状以锥体外系神经障碍为主, 并伴有精神症状^[1]。锰可通过多种途径导致神经损害, 其中兴奋性神经递质谷氨酸传递异常起了重要作用。随着锰在工业上的广泛应用, 锰对作业工

人的健康影响日益受到重视。

褪黑素 (melatonin, MLT) 主要是松果体分泌的一种吲哚胺类激素, 化学名称为 *N*-乙酰基-5-甲氧基色胺。视网膜和胃肠道等组织也能少量合成。其作用非常广泛, 分泌量有明显的昼夜规律。褪黑素对人体的主要生理作用是维持生理节奏的昼夜规律, 有利于睡眠; 还具有增强人体免疫功能、抗衰老, 抑制肿瘤细胞生长作用^[2]。但是, 褪黑素对锰中毒大鼠脑内谷氨酸代谢和转运的影响尚未被完全阐明。

收稿日期: 2011-07-05; 修回日期: 2011-08-10

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, 讲师, 研究方向: 重金属毒理学。

通讯作者: 徐兆发, 教授, E-mail: zfxu@mail.cmu.edu.cn。

本研究运用动物实验,在建立大鼠染锰中毒模型之前,用褪黑素作为预处理物质,观察其对脑纹状体中谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 和磷酸激活的谷氨酰胺酶 (phosphate-activated glutaminase, PAG) 的影响,同时检测大脑皮质中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性和 MDA 含量的变化,进而探讨其对锰致大鼠的神经毒性及褪黑素的干预作用,为锰中毒机制的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 分组及染毒

由中国医科大学实验动物中心提供实验用清洁级 Wistar 大鼠 24 只,体重 (180 ± 10) g,雌雄各半。动物自由饮水摄食,实验动物室温度 17 ~ 23 °C,相对湿度 45% ~ 55%,予常规饲料。正式实验前饲养 7 d,随后按体重随机分成 3 组,每组 8 只。第 1 组为对照组,腹腔注射 0.9% NaCl,第 2 组为单纯染锰组,腹腔注射 0.9% NaCl,第 3 组为褪黑素预处理组,腹腔注射 21.5 μmol/kg MLT,2 h 后第 1 组皮下注射生理盐水,第 2 组和第 3 组皮下注射 200 μmol/kg MnCl_2 。注射容量均为 5 ml/kg。连续染毒 4 周,染毒结束后 24 h,将大鼠用乙醚麻醉,断头分离大脑皮质和脑纹状体。

1.2 样品采集及测定指标

GS 的活性测定依据 Renis 描述的 γ-谷氨酰转移酶的非生理学催化反应^[3]; PAG 活力按 Curi 的方法测定^[4]; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性用硫酸亚铁钼磷蓝定磷法测定^[5]; 脑丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定用硫代巴比妥酸法; 组织蛋白含量测定用 Lowry 法。

1.3 统计分析

用 SPSS13.0 软件进行数据处理,实验所得数据以平均值 ± 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 *Q* 检验 (Students-Newman-Keuls, SNK)。检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 脑纹状体 PAG 和 GS 活性

从表 1 见,与对照组比较,单纯染锰组大鼠 PAG 活性升高,且差异有统计学意义 ($P < 0.01$); GS 活性降低,且差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与单纯染锰组比较,褪黑素预处理组 GS 活性含量升高 ($P < 0.05$),PAG 活性未见明显改变。

2.2 脑皮质 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性和 MDA 含量

与对照组比较,单纯染锰组大鼠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、

$\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); MDA 含量升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与单纯染锰组比较,褪黑素预处理组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),MDA 含量降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 大鼠脑纹状体 PAG 和 GS 活性 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	PAG [μmol/(min · g pro)]	GS [U/(min · g pro)]
对照组	50.69 ± 9.20	59.26 ± 5.15
染锰组	72.24 ± 9.38**	50.41 ± 5.47**
褪黑素组	62.59 ± 10.71	56.86 ± 3.37 [#]

注:与对照组相比,** $P < 0.01$;与染 Mn 组相比,[#] $P < 0.05$ 。

表 2 脑皮质 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性和 MDA 含量 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ [μmol/(h · mg)]	$\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ [μmol/(h · mg)]	MDA (nmol/g pro)
对照组	4.65 ± 0.45	1.74 ± 0.51	51.25 ± 23.14
染锰组	2.13 ± 0.15**	0.93 ± 0.17**	78.73 ± 23.03**
褪黑素组	3.45 ± 0.38 ^{##}	1.26 ± 0.30 ^{##}	58.38 ± 15.15 [#]

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与染 Mn 组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

3 讨论

近年来,随着新型汽油 (用含锰的防爆剂甲基环戊二烯羰基锰来代替四乙基铅防爆汽油) 广泛应用,人们长期接触低浓度锰的机会日益增加^[6]。

锰的毒性损伤作用可能与兴奋性递质代谢与转运障碍有关。研究表明,锰中毒可以导致细胞外谷氨酸 (glutamate, Glu) 水平升高,进而导致谷氨酸受体过度活化,产生兴奋性神经毒性^[7]。但是,锰中毒造成 Glu 蓄积的机制尚未完全阐明。在生理条件下,细胞外液中 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 作用下转变成谷氨酰胺 (glutamine, Gln)。Gln 再回转至谷氨酸能神经元内,再在 PAG 的作用下重新生成 Glu,形成 “Glu-Gln 循环”。本实验对大鼠单纯染锰 4 周发现,脑纹状体 GS 活性明显下降,而 PAG 活性升高,表明锰可影响 “谷氨酸-谷氨酰胺循环” 通路,抑制谷氨酰胺合成酶的释放和合成^[8,9]; 褪黑素组与单纯染锰组比较,脑纹状体 GS 活性有较明显升高,而 PAG 活性略有下降,提示褪黑素对 “Glu-Gln 循环” 通路有保护作用,一定程度上可促进 GS 的释放和合成。

体外培养的神经元在持续谷氨酸作用下,会产生钙离子的短暂升高,经过一段潜伏期,会有第二次不可逆的钙离子升高,称之为延迟性钙失调。钙稳态失调是通往细胞死亡之路中不可逆的一步。神经元承受兴奋性损伤的能力也可能与其缓冲胞内钙的能力密切相关^[7]。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,或称钠泵,存在于大多数

动物细胞的细胞质膜中。 Ca^{2+} -ATPase 是普遍存在于组织细胞及细胞器膜上的一种蛋白酶,它在维持细胞内钙稳态、能量转换以及信息传递方面具有重要的作用,可将胞浆内 Ca^{2+} 泵出细胞外或泵入内质网,是胞浆 Ca^{2+} 流出的主要通道。 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶的作用是将细胞内的 Na^{+} 移出细胞膜外,同时把细胞外的 K^{+} 移入膜内,从而保持了膜内高 K^{+} 和膜外高 Na^{+} 的不均衡离子分布,形成细胞膜内外的渗透压梯度和跨膜电化学梯度,同时,其跨膜电化学梯度还能作为转运 Ca^{2+} 的能量;只有维持该酶的活性正常,才能维持正常的膜电位,以保持神经细胞膜正常的兴奋性和传导性。有研究表明氧化损伤与钙稳态失衡有关^[10]。在本实验中,单纯染锰组大鼠大脑皮质中 Na^{+} - K^{+} -ATP、 Ca^{2+} -ATP 酶活性与对照组比较均降低,提示锰可降低 Na^{+} - K^{+} -ATP、 Ca^{2+} -ATP 酶活性,造成钙稳态的失调。褪黑素组大鼠大脑皮质中 Na^{+} - K^{+} -ATP、 Ca^{2+} -ATP 酶活性与单纯染锰组比较均升高,提示褪黑素可对 Na^{+} - K^{+} -ATP、 Ca^{2+} -ATP 酶活性有一定保护作用,拮抗钙稳态失调,证实了以往研究发现褪黑素具备钙拮抗剂特点,可通过抑制外钙内流和内钙释放的作用来缓解钙超载的结论^[11]。

神经细胞过度兴奋引起胞内钙持续增高是兴奋性毒性和氧化应激之间相互联系的纽带。丙二醛(MDA)是体内重要的脂质过氧化物的代谢产物。MDA 的含量可以反映体内脂质过氧化的程度并间接反映引起脂质过氧化的氧自由基的水平。在本实验中,单纯染锰组大鼠肝、脑组织的 MDA 含量较对照组均升高,提示锰可致大鼠体内的氧化损伤;而褪黑素组肝、脑组织的 MDA 含量较单纯染锰组低,提示褪黑素可有效地拮抗锰引起的氧化损伤。

本实验结果表明,锰中毒可以造成脑内谷氨酸代谢和转运障碍,褪黑素对其具有一定的拮抗作用。

参考文献:

- [1] Guilarte T R. Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings [J]. Environ Health Perspect, 2010, 118 (8): 1071-1080.
- [2] 郑学芝,张承玉,郑路. 褪黑素生理作用 [J]. 牡丹江医学院学报, 2002, 23 (5): 51-53.
- [3] Renis M, Cardile V, Russo A, et al. Glutamine synthetase activity and HSP70 levels in cultured rat astrocytes: effect of 1-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine [J]. Brain Res, 1998, 783 (1): 143-150.
- [4] Curi T C, De Melo M P, De Azevedo R B, et al. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase [J]. Am J Physiol, 1997, 273 (4Pt1): C1124-1129.
- [5] 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, 24 (8): 972-974.
- [6] 宾萍,姜岳明,胡万达. 锰神经毒作用机理及其生物标志物研究 [J]. 铁道劳动安全卫生与环保, 2004, 31 (2): 102-103.
- [7] Xu B, Xu Z F, Deng Y. Effect of manganese exposure on intracellular Ca^{2+} homeostasis and expression of NMDA receptor subunits in primary cultured neurons [J]. Neurotoxicology, 2009, 30 (6): 941-949.
- [8] Erikson K M, Dorman D C, Lash L H, et al. Duration of airborne-manganese exposure in rhesus monkeys is associated with brain regional changes in biomarkers of neurotoxicity [J]. Neurotoxicology, 2008, 29 (3): 377-385.
- [9] Erikson K M, Dorman D C, Lash L H, et al. Manganese inhalation by rhesus monkeys is associated with brain regional changes in biomarkers of neurotoxicity [J]. Toxicol Sci, 2007, 97 (2): 459-466.
- [10] Harman A W, Maxwell M J. An evaluation of the role of calcium in cell injury [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995, 35: 129-144.
- [11] 徐海伟,黎海蒂,范晓棠,等. 褪黑素在叠氮钠所致的海马锥体细胞钙超载中的神经保护作用 [J]. 第三军医大学学报, 2003, 25 (3): 201-204.
- [12] Manoli E, Kouras A, Samara C. Profile analysis of ambient and source emitted particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from three sites in northern Greece [J]. Chemosphere, 2004, 56 (9): 867-878.
- [13] Simecik Matt F, Eisenreich Steven J, Lioy Paul J. Source apportionment and source/sink relationships of PAHs in the coastal atmosphere of Chicago and Lake Michigan [J]. Atmospheric Environment, 1999, 33 (30): 5071-5079.
- [14] Yang Hsi-Hsien, Tsai Cheng-Hsien, Chao Mu-Rong. Source identification and size distribution of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons during rice straw burning period [J]. Atmospheric Environment, 2006, 40 (7): 1266-1274.
- [15] Dallarosa Juliana Braga, Teixeira Elba Calesso, Pires Marçal. Study of the profile of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles (PM10) using multivariate methods [J]. Atmospheric Environment, 2005, 39 (35): 6587-6596.
- [16] 张利文. 颗粒物携带多环芳烃个体暴露来源解析研究与实例 [D]. 天津: 南开大学. 2007.
- [17] 张利文,白志鹏,游燕. 室内多环芳烃污染源的化学组成特征研究 [J]. 环境科学研究, 2006, 19 (6): 68-74.
- [18] Chuang J C, Callahan P J, Lyu C W. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposures of children in low-income families [J]. J Expo Anal Environ Epidemiol, 1999, 9 (2): 85-98.
- [19] Nisbet I C, LaGoy P K. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 1992, 16 (3): 290-300.
- [20] Tsai P J, Shieh H Y, Lee W J. Health-risk assessment for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a carbon black manufacturing industry [J]. Sci Total Environ, 2001, 278 (1-3): 137-150.