

美金刚胺对甲基汞致大鼠谷氨酸代谢障碍及氧化损伤的影响

刘巍, 徐兆发, 邓宇, 徐斌, 杨海波, 魏衍刚, 奉妹

(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 探讨盐酸美金刚胺 (memantine hydrochloride, MEM) 对甲基汞所致谷氨酸代谢障碍以及氧化损伤的影响。方法 实验用 Wistar 大鼠 30 只, 按体重随机分成 3 组。第 1 组为对照组, 第 2 组为单纯染汞组, 第 3 组为 MEM 预处理组。对照组和单纯染汞组皮下注射生理盐水, MEM 预处理组皮下注射 5 $\mu\text{mol/kg}$ MEM; 2 h 后, 对照组腹腔注射生理盐水, 单纯染汞组和 MEM 预处理组腹腔注射 12 $\mu\text{mol/kg}$ 氯化甲基汞, 注射容量为 5 ml/kg。干预隔日一次, 每周 3 次, 染毒每日 1 次, 每周 5 次, 连续干预与染毒 4 周。于最后一次染毒 24 h 后每组取 6 只大鼠, 麻醉后处死, 测定大脑皮质汞含量, 谷氨酸 (Glu)、谷氨酰胺 (Gln) 含量, 谷氨酰胺合成酶 (GS)、磷酸活化的谷氨酰胺酶 (PAG) 活力, 还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 含量, 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力。每组其余 4 只大鼠, 制备大脑皮质单细胞悬液, 测定活性氧簇 (ROS) 含量以及细胞凋亡率。结果 与对照组比较, 单纯染汞组大鼠大脑皮质汞含量显著升高, Glu 含量及 PAG 活力显著升高, Gln 含量及 GS 活力显著降低; GSH 含量、SOD 及 GSH-Px 活力显著降低, MDA 含量显著升高; 细胞内 ROS 含量及细胞凋亡率显著升高。MEM 预处理组大脑皮质汞含量与单纯染汞组相比差异无统计学意义, 其余指标均得到不同程度的拮抗, 差异有统计学意义。结论 MEM 对甲基汞导致的谷氨酸代谢障碍以及氧化损伤具有一定的保护作用。

关键词: 甲基汞; 谷氨酸代谢; 氧化损伤; 美金刚胺

中图分类号: R994.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-221X(2011)06-0425-03

Effect of memantine on dysbolism of glutamate and oxidative injury induced by methylmercury in rats

LIU Wei, XU Zhao-fa, DENG Yu, XU Bin, YANG Hai-bo, WEI Yan-gang, FENG Shu

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

Abstract: **Objective** To explore the effect of memantine (MEM) on the dysbolism of glutamate and the oxidative injury induced by methylmercury exposure in rats. **Methods** Thirty Wistar rats were randomly divided into three groups, the first group was normal control, the second group was the methylmercury exposed group, the third group was the memantine-pretreated group. The first and second groups were subcutaneously injected with 0.9% NaCl, the third group was given 5 $\mu\text{mol/kg}$ MEM in advance. Two hours, the first group was intraperitoneally injected with 0.9% NaCl, while the second and third groups were injected with 12 $\mu\text{mol/kg}$ methylmercury (5 ml/kg). The pretreatment was given 3 times a week, and while the methylmercury administration was 5 times a week, the experiment lasted for 4 weeks. 24 hours after the last injection, the Hg levels, activities of GS (glutamine synthetase), PAG (phosphate activated glutaminase), SOD (superoxide dismutase) and GSH-Px (glutathione peroxidase), the contents of Glu (glutamic acid) and Gln (glutamine), contents of GSH (glutathione) and MDA (malonaldehyde), intracellular ROS and apoptosis rate in brain cortex were all determined. **Results** Compared with control group, the mercury content, Glu content and PAG activity increased significantly, while Gln content and the activities of GS, GSH, SOD and GSH-Px were all decreased, while MDA content and apoptosis rate were increased significantly in methylmercury exposed group. All these changes mentioned above in memantine pretreated group were all reduced. **Conclusion** The results suggested that memantine has a definite protective effect on the dysbolism of glutamate and oxidative injury caused by methylmercury exposure.

Key words: methylmercury; glutamate metabolism; oxidative damage; memantine

甲基汞 (methylmercury, MeHg) 是一种毒性极强且具有致畸作用的神经毒物, 通过食物链进入人体^[1]。研究表明 MeHg 致神经毒性的机制主要包括兴

奋性神经毒性与氧化损伤两个方面^[2~4]。盐酸美金刚胺 (memantine hydrochloride, MEM) 为非竞争性 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体拮抗剂, 通过抑制钙通道的开放和延缓兴奋性神经递质的释放来发挥其生理作用^[5,6]。本实验通过观察 MEM 在拮抗兴奋性神经毒性作用的同时, 对氧化损伤是否起到保护作用, 从而更加深入地探讨二者之间

收稿日期: 2011-06-28; 修回日期: 2011-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81172631)

作者简介: 刘巍 (1986—), 男, 硕士在读, 从事重金属毒理学研究。

通讯作者: 徐兆发, 教授, 博士生导师。

的关系,为阐明 MeHg 神经毒性作用机制及其防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及染毒

中国医科大学实验动物中心提供的 Wistar 大鼠 30 只,雌雄各半,按体重随机分成 3 组。第 1 组为对照组,第 2 组为单纯染汞组,第 3 组为 MEM 预处理组。对照组和单纯染汞组皮下注射生理盐水, MEM 预处理组皮下注射 5 $\mu\text{mol/kg}$ MEM; 2 h 后,对照组腹腔注射生理盐水,单纯染汞组和 MEM 预处理组腹腔注射 12 $\mu\text{mol/kg}$ CH_3HgCl ,注射容量为 5 ml/kg。干预隔日 1 次,每周 3 次,染毒每日 1 次,每周 5 次,连续干预与染毒 4 周。

1.2 样品采集及处理

于最后一次染毒 24 h 后每组随机抽取 6 只大鼠,麻醉后处死,迅速开颅取出完整大脑,于冰浴下剥离大脑被膜,切取大脑皮质,测定大脑皮质汞含量、Glu 和 Gln 含量、GS 和 PAG 活力、GSH 和 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力。其余 4 只大鼠制备大脑皮质单细胞悬液,测定 ROS 含量及细胞凋亡率。

1.3 测定指标及方法

大脑皮质汞含量应用冷原子吸收法测定^[7], GS 活力依据 Renis 的方法测定^[8], PAG 活力依据 Curi 的方法测定^[9], GSH 含量应用 DTNB 直接比色法测定, MDA 含量应用硫代巴比妥酸比色法测定^[10], Glu 及 Gln 含量、SOD 及 GSH-Px 活力应用南京建成生物制品有限公司提供的试剂盒测定。ROS 含量应用二氢二氯双荧光染料 (DCFH-DA) 染色测定,细胞凋亡率应用凯基生物制品有限公司提供的试剂盒测定,组织蛋白含量应用 Lowry 法测定^[11]。

1.4 统计分析

实验所得数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,用 SPSS 11.5 软件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),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大脑皮质汞含量

与对照组 [(1.21 $\pm$ 0.20) $\mu\text{g/g}$] 比较,单纯染汞组大鼠大脑皮质汞含量 [(17.67 $\pm$ 0.62) $\mu\text{g/g}$] 显著升高 ($P < 0.01$); 与单纯染汞组相比, MEM 预处理组大鼠大脑皮质汞含量 [(16.48 $\pm$ 1.82) $\mu\text{g/g}$] 差异无统计学意义。

2.2 大脑皮质 Glu 和 Gln 含量、GS 和 PAG 活力

从表 1 可以看出,与对照组比较,单纯染汞组大鼠

Glu 含量及 PAG 活力显著升高, Gln 含量及 GS 活力显著降低 ($P < 0.01$); 与单纯染汞组相比, MEM 预处理组大鼠 Glu 含量显著降低, Gln 含量及 GS 活力显著升高 ($P < 0.01$), PAG 活力明显降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠大脑皮质 Glu 和 Gln 含量、GS 和 PAG 活力 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	Glu ($\mu\text{mol/g pro}$)	Gln (nmol/g pro)	GS [$\text{U}/(\text{min} \cdot \text{g pro})$]	PAG [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g pro})$]
对照组	56.63 $\pm$ 7.73	0.28 $\pm$ 0.11	56.76 $\pm$ 16.70	13.75 $\pm$ 2.98
单纯染汞组	69.78 $\pm$ 7.63 **	0.16 $\pm$ 0.03 **	21.74 $\pm$ 5.86 **	28.74 $\pm$ 5.32 **
MEM 预处理组	57.37 $\pm$ 9.59 ▲▲	0.26 $\pm$ 0.08 ▲▲	37.28 $\pm$ 6.31 **▲▲	24.19 $\pm$ 3.57 **▲

注: 与对照组比较 ** $P < 0.01$; 与单纯染汞组比较 ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ 。

2.3 大脑皮质 GSH 和 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力

从表 2 可以看出,与对照组比较,单纯染汞组大鼠 GSH 含量、SOD 及 GSH-Px 活力均显著降低, MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与单纯染汞组比较, MEM 预处理组大鼠 GSH 含量、SOD 及 GSH-Px 活力明显升高, MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠大脑皮质 GSH 和 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	GSH ($\mu\text{mol/g pro}$)	MDA (nmol/mg pro)	SOD (U/mg pro)	GSH-Px (U/mg pro)
对照组	32.72 $\pm$ 3.11	2.35 $\pm$ 0.25	79.57 $\pm$ 8.60	20.17 $\pm$ 3.67
单纯染汞组	21.22 $\pm$ 4.05 **	3.73 $\pm$ 0.76 **	38.53 $\pm$ 7.95 **	10.30 $\pm$ 3.95 **
MEM 预处理组	26.87 $\pm$ 4.46 *▲	3.01 $\pm$ 0.32 *▲	50.36 $\pm$ 14.07 **▲	16.82 $\pm$ 2.53 ▲

注: 与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与单纯染汞组比较, ▲ $P < 0.05$ 。

2.4 大脑皮质 ROS 含量及细胞凋亡率

与对照组 (101.58 $\pm$ 14.00) 比较,单纯染汞组大鼠 ROS 平均荧光强度 (399.90 $\pm$ 20.75) 显著升高 ($P < 0.01$); 与单纯染汞组比较, MEM 预处理组大鼠 ROS 平均荧光强度 (313.82 $\pm$ 14.69) 显著降低 ($P < 0.01$)。与对照组 [(2.98 $\pm$ 1.87) %] 比较,单纯染汞组大鼠细胞凋亡率 [(19.58 $\pm$ 6.17) %] 显著升高 ($P < 0.01$); 与单纯染汞组比较, MEM 预处理组大鼠细胞凋亡率 [(11.78 $\pm$ 4.07) %] 显著降低 ($P < 0.01$)。

3 讨论

谷氨酸 (glutamate, Glu) 在突触活动中具有重要的生理功能^[12], 其在突触间隙中的作用是通过受体的灭活与 Glu 的重摄取而达到平衡状态,形成“谷氨酸-谷氨酰胺循环”^[13]。当此循环被破坏时, Glu 在突触间隙蓄积,过度激活 Glu 受体而导致兴奋性神经毒性,细胞内钙超载从而诱发细胞凋亡^[14, 15]。本实验结果显示, MeHg 暴露可导致 Glu 代谢发生障碍,引发兴奋性神经毒性。

有文献指出,过量生成的 ROS 与 MeHg 的神经毒性有密切关系^[16]。MeHg 一方面可抑制体内抗氧化酶,降低机体清除自由基的能力;另一方面又可诱导自由基产生^[17]。此外,超氧阴离子能与 NO 作用形成过氧亚硝酸根离子和羟自由基,损伤线粒体内膜,导致离子平衡紊乱而诱发细胞凋亡坏死^[18]。本实验结果显示,MeHg 暴露导致 ROS 生成显著增加,自由基对体内的抗氧化物质及抗氧化酶起到明显的抑制作用,过氧化产物大量生成。

兴奋性神经毒性与氧化损伤并不是孤立存在的两个方面,二者可能共同构成 MeHg 神经毒性的最终通路^[19]。突触间隙内 Glu 大量蓄积会过度激活 NMDA 受体,导致细胞内 Ca^{2+} 浓度持续增高。 Ca^{2+} 浓度升高,可能通过增加脂质水解,干扰线粒体功能,抑制氧化磷酸化等途径增加 ROS 生成而导致氧化损伤;反过来,ROS 可动员线粒体内贮存的 Ca^{2+} 释放,增加胞浆游离的 Ca^{2+} 水平间接促进兴奋性功能;ROS 还可抑制 GS 活力而导致中枢 Glu 蓄积,加剧兴奋性毒性^[20]。此外,大量自由基会直接造成细胞膜损伤,使得细胞内 Ca^{2+} 流出受阻而加剧细胞内钙超载,进而诱发细胞凋亡坏死^[21]。

MEM 是一种低亲和力、非竞争性的 NMDA 受体拮抗剂,可抑制 NMDA 受体受到慢性过度刺激引起的 Ca^{2+} 内流及早期 Glu 释放,短暂封闭活化的 NMDA 受体,只阻断其病理作用,而保留其生理功能不变^[22]。本实验结果提示,MEM 能有效拮抗 MeHg 中毒所致中枢 Glu 代谢紊乱,减弱 NMDA 受体过度激活所致的细胞内钙超载。此外,由于 MEM 本身不具备抗氧化功能,却对 MeHg 暴露所致氧化损伤起到保护作用,提示兴奋性神经毒性与氧化损伤之间存在一定的交互作用,MEM 通过拮抗细胞内钙超载,从而减少 ROS 生成,对氧化损伤起到间接的保护作用。

参考文献:

- [1] Li P, Feng X, Qiu G. Methylmercury exposure and health effect from rice and fish consumption: a review [J]. Int J Environ Res Public Health, 2010, 7 (6): 2666-2691.
- [2] Liu W, Wang X, Zhang R, et al. Effects of postnatal exposure to methylmercury on spatial learning and memory and brain NMDA receptor mRNA expression in rats [J]. Toxicol Lett, 2009, 188 (3): 230-235.
- [3] Shanker G, Syversen T, Aschner J L, et al. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 137 (1-2): 11-22.
- [4] 胡卫萱, 王文华, 贾金平. 甲基汞在脑组织中的积累及脂质过氧化作用 [J]. 环境与职业医学, 2003, 20 (5): 331-333.
- [5] Sonkusare S K, Kaul C I, Ramarao P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders & memantine, a new hope [J]. Pharmacol Res, 2005, 51 (1): 1-17.
- [6] Kumar S. Memantine: Pharmacological properties and clinical uses [J]. Neurol India, 2004, 52 (3): 307-309.
- [7] 赵达维, 高京敏, 李庭俊, 等. 冷原子吸收光谱法测定尿汞规范研究——酸性氯化亚锡还原法 [J]. 工业卫生与职业病, 1990, 16 (4): 237-238.
- [8] 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 (6-7): 143-150.
- [9] Curi T C, DeMelo M P, DeAzevedo R B, et al. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase [J]. Am J Physiol, 1997, 273 (4Pt 1): 1124-1129.
- [10] 湖南医学院第二附属医院检验科. 临床生化检验 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1981: 417.
- [11] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 36.
- [12] Tsurugizawa T, Torii K. Physiological roles of glutamate signaling in gut and brain function [J]. Bio Pharm Bull, 2010, 33 (11): 1796-1799.
- [13] 田雅文, 徐兆发. 谷氨酸与甲基汞的神经毒性 [J]. 毒理学杂志, 2010, 24 (4): 328-331.
- [14] Gulnur S B, Irina S B, Elena B T, et al. Glutamate metabolizing enzymes in prefrontal cortex of Alzheimer's disease patients [J]. Neurochem Res, 2005, 30 (11): 1443-1451.
- [15] James J V, Ophelia I Weeks. Estradiol and lithium chloride specifically alter NMDA receptor subunit NR1 mRNA and excitotoxicity in primary cultures [J]. Brain Res, 2009, 1268: 1-12.
- [16] Limke T L, Atchison W D. Acute exposure to methylmercury opens the mitochondrial permeability transition pore in rat cerebellar granule cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2002, 178 (1): 52-61.
- [17] Stringari J, Nunes A K, Franco J L, et al. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 227 (1): 147-154.
- [18] Avshalumov M V, Rice M E. NMDA receptor activation mediates hydrogen peroxide-induced pathophysiology in rat hippocampal slices [J]. J Neurophysiol, 2002, 87 (6): 2896-2903.
- [19] Amonpatumrat S, Sakurai H, Wiriyaermskul P, et al. L-glutamate enhances methylmercury toxicity by synergistically increasing oxidative stress [J]. J Pharmacol Sci, 2008, 108 (3): 280-289.
- [20] Amoreaux W J, Marsillo A, Idrissi A. Pharmacological characterization of GABAA receptors in taurine-fed mice [J]. J Bio Med Sci, 2010, 17 (1): 14.
- [21] Atchison W D. Effects of activation of sodium and calcium entry on spontaneous release of acetylcholine induced by methylmercury [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1987, 241 (1): 131-139.
- [22] Grossberg G T, Pejovic V, Miller M L, et al. Memantine therapy of behavioral symptoms in community-dwelling patients with moderate to severe Alzheimer's disease [J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2009, 27 (2): 164.