

锰对小鼠脑内四种氨基酸类神经递质的影响

Effects of manganese on four amino acid neurotransmitters in brain of mice

杨欣欣, 王璨, 宋奇繁, 于海洋, 金亚平, 徐斌, 刘巍, 徐兆发, 邓宇

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110122)

摘要: 将24只小鼠按体重随机均分为对照组及低、中、高染锰组, 计算脑脏器系数, 检测脑组织四种氨基酸含量及组织蛋白含量。与对照组相比, 随染锰浓度提高, γ -氨基丁酸(GABA)含量逐渐降低, 谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)逐渐增高, 呈剂量依赖趋势。中、高锰组Glu和Asp含量明显高于对照组。高锰组GABA明显低于对照组。锰可对小鼠脑内氨基酸类神经递质产生影响, 其可能是锰神经毒性作用靶点之一。

关键词: 氯化锰; 脑; 氨基酸神经递质

中图分类号: R99; O614.711 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2016)03-0205-02

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2016.03.015

锰是人体必需微量元素, 但过量会导致神经毒性。锰暴露可以干扰脑内神经递质信号的传递, 有体外实验表明锰可以影响谷氨酸(glutamic acid, Glu)和天冬氨酸(aspartic acid, Asp)的摄取, 也可以使脑脊液中 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)和谷氨酸浓度下降^[1]。近年来很多研究表明兴奋性氨基酸参与了帕金森黑质纹状体多巴胺能神经元的变性过程, 进而与帕金森的发生相关, 而脑内氨基酸类神经递质间又存在着复杂的联系^[2,3]。因此研究锰对脑内四种氨基酸类神经递质的影响对进一步阐明锰引起的神经毒性机制具有重要意义。本实验以锰中毒小鼠为研究对象, 测定小鼠脑组织中GABA、甘氨酸(Gly)、Glu和Asp含量的变化, 为深入研究锰致神经毒性机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

氯化锰(分析纯), 上海金山试剂; 氨基酸标准品GABA、Gly、Glu和Asp, 上海原叶生物科技有限公司; 邻苯二甲醛, 美国Sigma公司; 乙酸钾为分析纯; 甲醇为色谱纯。高效液相色谱仪, Waters公司; C18色谱柱(150 mm×4.6 mm×5 μ m), 大连依利特公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波科生仪器厂。

1.2 动物分组及染毒

收稿日期: 2015-11-11; 修回日期: 2015-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81302406); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题新教师类(编号: 20112104120017)

作者简介: 杨欣欣(1991—), 女, 硕士研究生在读, 主要从事重金属中毒机制研究。

通讯作者: 邓宇, 副教授, 博士生导师, 主要从事环境污染健康危害研究, E-mail: dengyu.emu@163.com。

选择健康清洁级昆明种小鼠24只, 雌雄各半, 体重(30 \pm 2)g, 由中国医科大学实验动物部提供, 实验动物许可证号为SYXK(辽)2008—0005。实验前适应性饲养1周, 按体重均衡原则将实验动物随机分4组, 每组6只, 分别为对照组及低、中、高染锰组, 分别腹腔注射生理盐水及12.5、25、50 mg/kg MnCl₂, 注射容量均为5 ml/kg, 染毒14 d, 1次/d。

1.3 样品制备

使用分析天平称取150 mg脑组织, 按1:9(W/V)加入预冷生理盐水, 用电动匀浆机在冰水浴条件下匀浆20 s 超声45 s。以3 500 r/min将脑组织匀浆4 $^{\circ}$ C离心20 min, 取上清100 μ l用于检测蛋白含量。另取上清500 μ l, 以10 000 r/min 4 $^{\circ}$ C再离心20 min, 取上清, 抽滤后用于氨基酸含量测定。

1.4 邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生高效液相色谱荧光检测氨基酸含量

(1) 标准液配制: 用1 mol/L NaOH溶液分别配制GABA、Glu、Asp、Gly标准品储备液, 浓度为1 mmol/L, 测定前用1 mol/L NaOH溶液稀释成0.3、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、12.0和20.0 μ mol/L的标准系列。(2) 衍生试剂配制: 量取0.5 ml β -巯基乙醇, 称取20 mg邻苯二甲醛溶于0.5 ml甲醇中, 再加入0.4 mol/L硼酸缓冲液(pH=10.5) 9.0 ml, 超声溶解, 避光保存。(3) 衍生化反应: 在室温下, 吸取氨基酸标准液或样品液100 μ l, 加入邻苯二甲醛衍生试剂200 μ l, 混匀静置2 min后, 进样20 μ l。(4) 色谱条件: 荧光检测器激发波长250 nm, 发射波410 nm; 色谱柱, C18色谱柱(150 mm×4.6 mm×5 μ m), 柱温30 $^{\circ}$ C; 流动相A, HPLC级甲醇; 流动相B, 0.1 mol/L醋酸钾溶液, pH=5.89; A相梯度洗脱条件, 0~2 min、20%~47%, 2~9 min、47%~53%, 9~12 min、53%~100%, 17 min 100%, 平衡6 min后, 23 min结束洗脱; 用外标法定量峰面积。

1.5 统计分析

采用SPSS 13.0软件处理所有数据, 各组测量结果均以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组之间均数的比较在满足正态性和方差齐的条件下采用方差分析法, 两两比较采用LSD法, 均以检验水准 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 动物的行为、体重和脏器系数的变化

MnCl₂染毒14 d, 各组大鼠饮食和饮水量无明显变化, 活动正常, 没有一般中毒的表现。高锰组部分大鼠出现毛色变暗, 欠光滑, 易激惹伴站立和活动减少等行为学变化。

随着染毒时间的增长, 各组小鼠体重增加, 但同一时间

不同染毒剂量组之间体重差异无统计学意义。各组小鼠脑脏器系数差异无统计学意义。

2.2 色谱图

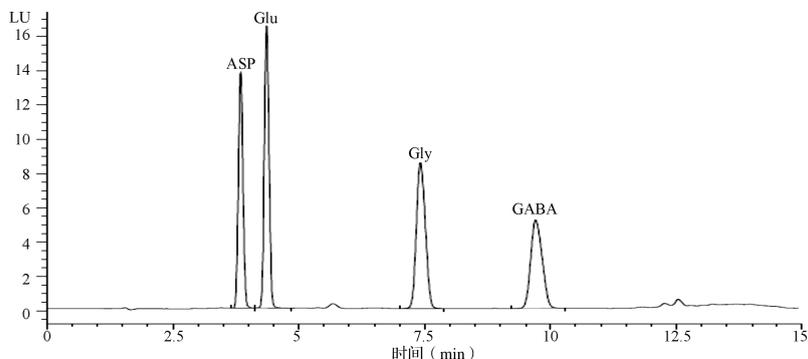


图1 氨基酸分离色谱图

2.3 脑组织中氨基酸类神经递质的含量

与对照组比较,随着染锰浓度的提升,小鼠脑内 GABA 含量逐渐降低, Glu 和 Asp 含量逐渐增高,呈现剂量依赖性趋势;而 Gly 含量未见显著性变化。与对照组相比,中剂量染锰组中 Glu 和 Asp 分别增高 28.63% 和 26.86% ($P < 0.05$, $P < 0.01$);在高剂量染锰组中 GABA 含量下降 28.75% ($P < 0.01$), Glu 和 Asp 含量分别增高 38.68% 和 47.47% ($P < 0.01$)。见表 1。

表1 各组小鼠脑组织中四种氨基酸神经递质

含量的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) $\mu\text{mol/g pro}$

组别	GABA	Gly	Glu	Asp
对照组	31.83±5.86	37.59±5.83	38.24±5.94	40.36±4.29
低锰组	29.24±3.87	41.66±5.49	40.61±4.06	43.27±5.77
中锰组	26.65±4.77	37.32±3.26	49.19±9.36*	51.20±8.38**
高锰组	22.68±5.12**	36.90±3.14	53.03±8.90**	59.52±5.21**

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

氨基酸是中枢神经系统中数量最多、分布最广的神经递质,在众多的氨基酸中只有 Glu、Asp、Gly、GABA 可作为神经递质^[4]。近些年来研究发现 Glu 的兴奋性毒性在帕金森病(PD)的发病中发挥重要作用,相关的其他三种氨基酸类神经递质也被报道参与了 PD 的发病^[2]。本实验发现两种兴奋性神经递质 Glu 和 Asp 都随着染锰剂量的增加而增加,尤其是高锰组与对照组相比增加具有统计学意义,提示锰暴露确实可以导致小鼠脑内氨基酸类神经递质含量异常,可能是锰引起神经毒性损伤的主要机制之一。Chandra 等^[5]研究发现小鼠每天暴露 6 mg/kg 的锰会导致脑内锰的浓度显著增高而 GABA 的浓度显著下降,这与本实验结果相近。在成人脑中 GABA 是含量最丰富的抑制性神经递质^[6],GABA 能神经递质的减少可以导致严重的中枢神经系统紊乱,尤其可以导致癫痫发作^[7]。谷氨酸在谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)的作用下可以转换成 GABA^[8], Gregg 等^[9]通过实验发现长期暴露锰会导致尾状核的 GAD 含量与对照组相比减少。由此推断锰可能是通过 GAD 的减少使得 Glu 的含量增加而使 GABA 含量降低,但其机制需要进一步研究验证。对于 Gly,我们的实验结果表明各染锰组间差异无统计学意义。国外有

在本实验检测条件下四种氨基酸类神经递质在 12 min 内均得到较好分离。各种氨基酸峰形良好,无重合、双峰、拖尾等现象。见图 1。

报道 MnCl_2 25 mg/kg 可以导致 6 周雌性 Wistar 大鼠脑内 Gly 的含量显著增高^[10],这有可能是由于我们的染毒时间较短加之动物的品系及性别差异有关,还需进一步实验验证。

综上,锰可以对小鼠脑组织氨基酸类神经递质产生影响,而氨基酸类神经递质可能是锰神经毒性作用的靶点之一。

参考文献:

- [1] Andrew H M, Lindsey A C, Joseph P, *et al.* Intranasal exposure to manganese disrupts neurotransmitter release from glutamatergic synapses in the central nervous system in vivo [J]. NIH Public Access, 2012, 33 (5): 996-1004.
- [2] 罗慧琼,刘承伟.氨基酸类神经递质在帕金森病发病机制中作用的研究进展[J].医学综述,2009,15(9):1304-1307.
- [3] 王喜丰,孙圣刚,曹旭.托吡酯对帕金森病大鼠模型黑质纹状体中氨基酸含量的影响[J].华中医学杂志,2008,32(1):47-48.
- [4] 李振.帕金森大鼠氨基酸递质、GABA 能神经元及 GABA_A 受体亚单位 mRNA 表达变化的研究[D].第二军医大学,2003.
- [5] Chandra S V, Malhotra K M, Shukla G S. GABAergic neurochemistry in manganese exposed rats [J]. Acta Pharmacol Toxicol, 1982, 51 (5): 456-458.
- [6] Belebani R O, Carolino R O G, Pizzo A B, *et al.* Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: Pathological and neuropsychobiological relationships [J]. Cell Mol Neurobiol, 2004, 24 (6): 707-728.
- [7] Ana Gadea, Ana María López-Colomé. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters [J]. Journal of Neuroscience Research, 2001, 63 (15): 461-468.
- [8] Carlsson M, Carlsson A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia-implications for schizophrenia and Parkinson's disease [J]. Trends Neurosci, 1990, 13 (7): 272-276.
- [9] Gregg D S, Duncan B L, Valentina S, *et al.* Manganese exposure is cytotoxic and alters dopaminergic and GABAergic neurons within the basal ganglia [J]. NIH Public Access, 2009, 110 (1): 378-389.
- [10] Dinamene Santos, M Camila Batoreu, Isabel Almeida, *et al.* Manganese alters rat brain amino acids levels [J]. Biol Trace Elem Res, 2012, 150 (1-3): 337-341.