

二硫化碳对大鼠神经微丝及红细胞膜结构的影响

高艳华 梁友信 傅慰祖

摘要 以神经微丝及红细胞膜为模型, 选用 SD 雄性大鼠整体染毒 2 个月。从脊髓分离神经微丝, 超速离心法分离红细胞膜, 用变性聚丙烯酰胺电泳技术及薄层扫描技术观察 CS₂ 所致该两种结构的改变。结果表明: 染毒大鼠神经微丝亚单位含量减少; 红细胞膜电泳图谱薄层扫描分析有异常区带形成, 推测该异常区带可能为红细胞膜收缩蛋白 α 、 β 亚单位发生共价交联所形成的异质二聚体, 且其含量与 CS₂ 接触浓度有关。提示 CS₂ 所致的蛋白质共价交联可能是其病理及行为改变的基础。

关键词 二硫化碳 神经微丝 红细胞膜收缩蛋白 共价交联

Effect of Carbon Disulfide on Neurofilament and Erythrocytic Membrane Structure in rats Gao Yanhua^{*}, Liang Youxin, Fu Weizu^{*}. Department of Occupational Health, Shanghai Medical University. Shanghai 200032

Abstract In this study, the degradation of neurofilament protein and modification on erythrocyte spectrin was demonstrated in CS₂-treated rats at an exposure level of 1 200, 2 400 mg/m³ by inhalation for two months. Spinal cords were removed from both CS₂-treated and non-treated rats and NF-riched cytoskeletal protein from spinal cords was prepared. A significant decrease was found in two subunit (200 and 70KDa) of neurofilament by quantitative assessment of cytoskeletal protein using Dual-wave-length TLC scanner. The erythrocytic membrane was separated by ultra-centrifugation. Covalent crosslinking of erythrocyte spectrin was determined by SDS-PAGE and TLC scanner. An abnormal high-molecular-weight band was found in CS₂-treated animals and a dose-effect relationship was observed between the content of abnormal structure and CS₂ exposure level. It is suggested that the covalent cross-linking of proteins has been considered as a potential mechanism for toxicity of carbon disulfide.

Key words Carbon disulfide, Neurofilament (NF), Erythrocyte spectrin, Cross-linking

二硫化碳 (CS₂) 的研究可以说代表着神经性毒物的研究史。但迄今对其神经毒作用机理尚不十分清楚^[1]。近年研究认为不同有机溶剂神经毒物的结构虽有一些差异, 但其发病机理可能存在着某些共同通道 (common pathway)。最近 Duke 大学研究者^[2]发现 CS₂ 与正己烷这两种结构完全不同的化合物, 其病理和临床表现却极为相似, 并在体内外研究证实, 两种化合物均可引起蛋白质的共价交联 (covalent cross-linking), 为从分子水平探讨 CS₂ 的神经

毒作用的机理提供了新的途径。本研究以此为基础, 探讨 CS₂ 所导致的神经微丝 (neurofilament) 及红细胞膜骨架蛋白的异常。

1 材料与方法

1.1 实验动物与染毒途径

选用 SD 雄性大鼠, 初始体重 100~120 克, 由上海医科大学放射医学研究所提供。按体重随机分成 3 组, 每组 4~5 只。剂量设计为 0、1 200、2 400 mg/m³。采用筒式动式染毒装置, 每天染毒 4 小时, 每周 5 天, 共染毒 2 个月。

1.2 试剂与仪器

丙烯酰胺, 日本进口分装; N, N'-亚甲双丙烯酰胺, 日本进口分装; 十二烷基磺酸钠

作者单位: 200032 上海医科大学 (高艳华、梁友信), 上

海市劳动卫生职业病防治研究所 (傅慰祖)

(SDS), P. T Polekao进口分装; N, N, N'N'-四甲基乙二胺 (TEMED), E. Marck, Darmstadt; 过硫酸胺, 中国爱建试剂厂; 二硫苏糖醇 (DTT), 进口分装 (华美生物工程公司); 甘氨酸, 上海康达氨基酸厂出品; 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 进口分装 (华美生物工程公司)。

仪器主要有 DYY-III 5 型稳压稳流电泳仪 V 16 夹心式垂直电泳槽和双波长 CS-900 薄层扫描仪 (Dual-wave Length TLC scanner)

1. 3 神经微丝分离^[3]

动物断头处死后, 参照 de Sousa and Horrocks 的方法分离脊髓^[4], 加入 10ml 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 6. 8), 内含 2mmol/L EDTA, 2mmol/L PMSF, 0. 5% (v/v) Triton X-100, 制成匀浆, 13 000g 离心 1 分钟, 吸去上清液, 沉淀中加入含 0. 9mol/L 蔗糖的同样缓冲液, 如前离心, 去除飘浮层及上清液, 剩余沉淀主要为神经微丝, 悬浮于 0. 1mol/L 磷酸盐缓冲液中, 待分析。

1. 4 红细胞膜分离^[5]

大鼠断头处死后, 取肝素抗凝血液, 加入 3 倍预冷的 50mmol/L Tris-HCl 生理盐水等渗缓冲液, 4℃ 3 000 转/分离心 2 分钟, 吸去血浆及红细胞表面的绒毛状沉淀层, 重复 3 次。在洗净的红细胞中, 按 1: 40 体积加入预冷的 10mmol/L (pH7. 4) 低渗 Tris-HCl 缓冲液, 边加边缓慢搅拌, 置 4℃ 冰箱 1~ 2 小时, 然后 4℃, 9 000 转/分离心 2 分钟, 使红细胞膜沉淀, 重复洗涤, 离心

3~ 5 次, 最后获得乳白色的红细胞膜样品

1. 5 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

采用不连续变性聚丙烯酰胺凝胶电泳^[6]分离蛋白质。神经微丝及红细胞膜电泳分离胶浓度分别为 7% 和 5%, 浓缩胶浓度均为 3%。电极缓冲液为 Tris-甘氨酸电泳缓冲液 (含有 25mmol/L Tris, 250mmol/L 甘氨酸)。调整样本蛋白质含量适宜 (约 1mg/ml) 后, 将样本置于凝胶加样液 (50mmol/L Tris-HCl, pH= 6. 8 缓冲液, 内含 100mmol/L DTT, 2% SDS, 0. 1% 溴酚兰, 10% 甘油) 中, 在 100℃ 加热 3 分钟, 以使蛋白质变性, 按预定程序加样, 每样品约加 30μl, 采用稳压电泳 (15V/cm), 电泳 4~ 6 小时, 考马斯亮蓝染色观察。

1. 6 定量

将脱色后的凝胶, 用薄层扫描仪定量, 并以蛋白含量作校正。神经微丝亚单位含量以染毒组占对照组的百分比表示。红细胞膜收缩蛋白的共价交联结构含量用异质二聚体占单体的百分比表示。

2 结果

2. 1 神经微丝

2. 1. 1 染毒大鼠脊髓重量及细胞骨架蛋白含量 由表 1 可见, 染毒大鼠的体重有所下降, 但未达到显著性水平; 脊髓重量明显下降, 自 1 200mg/m³ 组达到显著性差异; 每克脊髓的神经微丝蛋白含量^[7] 有所增加, 与对照组相比差异未达到显著性。

表 1 CS₂ 染毒大鼠脊髓重量及神经微丝细胞骨架蛋白含量

染毒浓度 (mg/m ³)	n	体重 (g)	脊髓重量 (g)	蛋白含量 (mg/g 脊髓)
0	4	305.0± 14. 1	0. 650± 0. 129	12. 670± 2. 223
1 200	5	311. 4± 13. 8	0. 514± 0. 048	12. 439± 2. 206
2 400	4	286. 3± 21. 4	0. 487± 0. 043	15. 799± 1. 731
F		2. 69	4. 82	3. 39
P 值		0. 1160	0. 0343	0. 0753

2. 1. 2 电泳图谱 神经微丝由 种不同相对分子质量的蛋白质组成, 分别为 200 000

150 000 及 70 000Da 分离的神经微丝电泳图谱见图 1

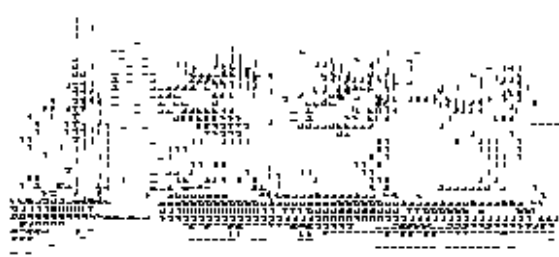


图1 分离的神经微丝电泳图谱

表2 接触CS₂对神经微丝亚单位的影响

浓度 (mg/m ³)	n	NFL	NFM	NFH
0	4	100.00± 7.10	100.00± 25.26	100.00± 13.92
1 200	5	65.69± 7.91 [†]	77.11± 24.44	73.27± 11.67
2 400	4	58.10± 26.26	52.27± 38.44	46.33± 20.92 [‡]
F		8.21	2.61	11.80
P值		0.0078	0.1226	0.0023

2. 1. 3 定量分析 对电泳图谱进行薄层扫描半定量分析。由表可见，染毒组神经微丝三种亚单位的含量均减少，在低相对分子质量与高相对分子质量亚单位达到显著性差异

2. 2 染毒大鼠红细胞膜结构改变

2. 2. 1 电泳图谱 正常红细胞膜在变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上，相对分子质量最高区带为收缩蛋白α、β亚单位（相对分子质量分别为240 000和220 000）。

2. 2. 2 定量评价 图2为对照组和染毒组大鼠电泳凝胶的薄层扫描图谱；正常组出峰时间在0.93—1.13处，类似于染毒组出峰时间的0.91—1.15处所出现的波谱，并对应于前述的电泳图谱中的α、β亚单位；染毒组大鼠在0.39

处出现异常波谱，其电泳距离小于α、β亚单位，说明该产物相对分子质量较大，迁移速度慢，推测为α、β亚单位分子内或分子间共价交联所形成的二聚体^[8]；随着CS₂浓度的增加，二聚体的含量亦增高（图3）。

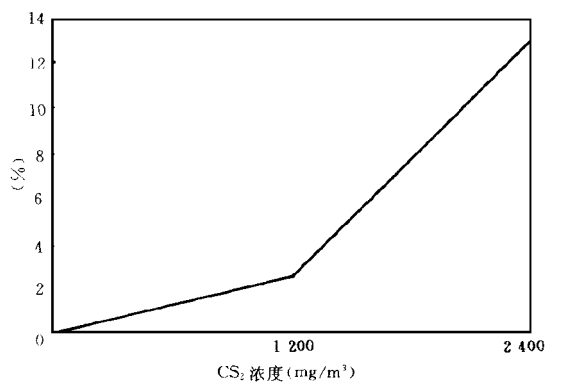


图3 CS₂染毒大鼠红细胞膜异常二聚体含量（以占单体的百分比表示）

3 讨论

神经微丝(NF)是神经元的骨架蛋白,由低、中、高三种相对分子质量的亚单位组成,相对分子质量为70 000的蛋白质构成其中心,其他两种相

处则出现异常波谱，其电泳距离小于α、β亚单位，说明该产物相对分子质量较大，迁移速度慢，推测为α、β亚单位分子内或分子间共价交

图2 红细胞膜凝胶电泳的薄层扫描图谱

对分子质量的蛋白质呈螺旋状环绕这一中心。NF与微管等构成光镜下用重金属染色可见的神经原纤维,其主要作用是与物质运输和维持细胞的结构有关。CS慢性中毒中最常见的改变是终末端感觉运动神经病变^[9],在实验动物中可见以外周和中枢的长轴突为主的神经纤维轴突末端肿胀。本研究中神经微丝电泳图谱发现染毒动物的NF亚单位减少,推测可能是CS或其代谢产物与NF亚单位结合形成分子内或分子间的共价交联结构所致^[2]。

红细胞是人体内结构最为简单的细胞,取材方便,常被用于研究药物或毒物的膜结构模型。Korpela^[10]认为红细胞内外侧膜与神经细胞内外侧胞突膜对于毒物的反应相似。在研究有机溶剂对神经细胞的作用时,完全可用红细胞代替,红细胞在一定程度上可视为神经细胞的平行标志物。收缩蛋白(Spectrin)是红细胞骨架蛋白的主要组成成分,由 α 、 β 亚单位组成,相对分子质量分别为240 000、220 000,正常状态下这两条肽链平行地互相缠绕在一起,在SDS-PAGE电泳图谱上为两条相对分子质量最高的区带。CS可引起红细胞膜收缩蛋白的结构发生改变,在电泳图谱上表现为高分子的异常区带。Valentine^[8]研究证实该异常区带相对分子质量约为420 000,肽谱(Peptide mapping)分析发现这种结构为红细胞膜收缩蛋白 α 和 β 亚单位发生共价交联所形成的异质二聚体。蛋白质结构的共价交联学说不仅限于CS中毒^[11,12],在其他神经毒物中也有报道,如正己烷、丙烯酰胺等。目前这种学说尚处于初始阶段,许多问题还未解决,如:神经微丝的共价交联如何导致神经肿胀、变性;尽管交联结构已被检出,但这种结构如何影响正常生理功能;与其他已有的发病机理间有何联系等。红细胞膜的共价交联结构能否在人体中检测出来,是否可作为人群接触的敏感标志物等,均有待以后进一步探索。

综上所述,CS引起蛋白质的交联学说,为

探讨CS神经毒性提供新的可能的机理及分子水平标志物

4 参考文献

- 1 Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, et al. A critical review of the literature of carbon disulfide toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 1982, 11 (3): 169-278
- 2 Graham DG, Amarnath V, Valentine WM, et al. Pathogenetic studies of hexane and carbon disulfide neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 1995, 25 (2): 91-112
- 3 Chiu FC and Norton WT. Bulk preparation of CNS cytoskeleton and the separation of individual neurofilament protein by gel filtration: dye-binding characteristics and amino acid compositions. *J Neurochem*, 1982, 39: 1252-1260
- 4 de Sousa BN and Horrocks LA. Development of rat spinal cord. I. Weight and length with a method for rapid removal. *Dev. Neurosci*, 1979, 2: 115-121
- 5 Genter MB, Amarnath V, Moody MA, et al. Parrole oxidation and protein cross-linking as necessary step in the development of γ -diketone neuropathy. *Chem Res Toxicol*, 1988, 1: 179-185
- 6 (美) 萨姆布鲁斯 J, 弗里奇 EF, 曼妮阿蒂斯 T. 分子克隆. 第二版. 科学出版社, 1995. 880-887
- 7 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Bio Chem*, 1951, 193: 265-275
- 8 Valentine WM, Graham DG, and Anthony DC. Covalent cross-linking of erythrocyte spectrin by carbon disulfide in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1993, 121: 71-77
- 9 夏元洵. 化学物质毒性全书. 上海: 上海科学技术出版社, 1990. 153-157
- 10 Korpela M. Inhibition of synaptosome membrane-bound integral enzyme by organic solvents. *Scand J Work Environ Health* 1989, 15: 64-68
- 11 Nagano M, Yamamoto H, Harada K. Comparative study of modification and degradation of neurofilament proteins in rats subchronically treated with Allyl alcohol, or 2, 5-Hexanedione. *Environmental Research*, 1993, 63: 229-240
- 12 Nagano M, He Y, Yamamoto H, et al. Cross-linking of ovalbumin or neurofilament protein by allyl chloride in vitro. *J Occup Health*, 1996, 38: 43-44

(收稿: 1998-02-20 修回: 1998-03-30)