

· 实验研究 ·

乙体氯氰菊酯致小鼠脑组织 Glu-Gln 环路紊乱的实验研究

Effect of β -cypermethrin on glutamate-glutamine circulation of brain in mice赵越¹, 安丽¹, 刘儒曦², 陈丹³, 阚忠媛³, 任亚浩¹, 杨军¹ZHAO Yue¹, AN Li¹, LIU Ru-xi², CHEN Dan³, KAN Zhong-yuan³, REN Ya-hao¹, YANG Jun¹

(1. 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001; 2. 中国医科大学临床医学 89 期, 辽宁 沈阳 110001; 3. 辽宁省疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110005)

摘要: 将健康成年小鼠按体重随机分成 1 个对照组及 3 个染毒组, 每组 10 只, 雌雄各半。染毒组小鼠以灌胃方式分别给予 20、40、80 mg/kg 剂量的乙体氯氰菊酯。以食用色拉油稀释受试物质, 对照组给予等量色拉油。3 h 后处死小鼠, 采用分光光度法检测各组小鼠脑组织谷氨酰胺酶 (PAG) 和谷氨酰胺合成酶 (GS) 活性。结果 80 mg/kg 剂量组小鼠于染毒后 2 h 陆续出现明显的兴奋症状, 其中 2 只雌鼠出现濒死状态; 40 mg/kg 剂量组个别小鼠于染毒后 2 h 出现轻微兴奋症状; 20 mg/kg 剂量组小鼠在整个受试期间未见异常。各组小鼠脑组织 PAG 活性随染毒剂量的增加而递增, GS 活性随染毒剂量的增加而逐渐降低, 其中 80 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 PAG 活性明显高于对照组 ($P < 0.01$), 80、40 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 GS 活性明显低于对照组 (分别为 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$)。提示乙体氯氰菊酯使小鼠脑组织谷氨酰胺合成酶活性降低、谷氨酰胺酶活性升高。

关键词: 乙体氯氰菊酯; 谷氨酰胺合成酶; 谷氨酰胺酶; 谷氨酸 (Glu); 谷氨酰胺 (Gln)

中图分类号: R994.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2007)01-0044-02

拟除虫菊酯是人工合成的一类广谱、高效、低残留、选择性毒性杀虫剂^[1], 目前已有 1 000 多种。我国已有近 30 种在开发使用, 且常与有机磷农药混合使用, 广泛应用于农业、林业、仓储和卫生害虫等方面的防治。该类农药属于神经毒物, 神经毒作用机制一直是其毒性研究的热点。大量研究表明, 拟除虫菊酯可使突触间隙内谷氨酸 (Glutamate, Glu) 增多, 进而引发突触后神经元一系列的生化级联反应^[2]。

Glu 不能穿过血脑屏障, 脑内 Glu 只能通过其前体谷氨酰胺 (Glutamine, Gln) 或三羧酸循环中间产物合成, Glu-Gln 循环通路是脑内 Glu 代谢的主要途径^[3]。脑内 Glu 主要以重摄取方式清除。研究发现, 拟除虫菊酯可使突触间隙 Glu 清除减少^[4,5], 而 Glu 合成是否增多未见报道。PAG 和 GS 是 Glu-Gln 环路中合成和水解 Glu 的关键酶, 本研究拟通过乙体氯氰菊酯染毒小鼠脑组织 GS 与 PAG 活性的变化, 初步探讨该类农药致哺乳动物兴奋性神经毒作用机制。

1 材料与与方法

收稿日期: 2006-08-28

作者简介: 赵越 (1968-), 男, 主管技师, 研究方向: 食品毒

理。

1.1 受试物质

乙体氯氰菊酯, 又名高效氯氰菊酯, 白色粉末状, 纯度为 96%, 难溶于水。

1.2 主要试剂

ADP、 γ -谷氨酰异羟肟酸、谷氨酰胺脱氢酶、L-谷氨酰胺购于美国 Sigma 公司; 考马斯亮蓝、 NAD^+ 购于华美公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

超声波细胞粉碎机 (宁波, JY92-II 型)、恒温水浴箱 (山东, MYKC H. H-600S)、高速离心机 (美国, RC-5C)、分光光度计 (上海, 721 型)、紫外分光光度计 (英国, UV300)。

1.4 动物分组及处理

健康成年昆明种小鼠, 由中国医科大学实验动物部提供。按体重随机分成对照组及 3 个染毒组, 每组 10 只, 雌雄各半。染毒组小鼠分别以灌胃方式给予 20、40、80 mg/kg 剂量的乙体氯氰菊酯, 灌胃量为 0.1 ml/10 g。以食用色拉油稀释受试物质, 对照组给予等量色拉油。实验期间动物自由摄食饮水, 3 h 后处死小鼠, 取脑供试。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 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。

1.5.2 GS 及 PAG 活性 用预冷生理盐水将脑组织制成体积分数为 1% 的匀浆液, 超声波处理后参照文献 [6] 测定脑组织 GS 活性。用预冷 PBS 将脑组织制成体积分数为 5% 的匀浆液, 超声波处理后参照文献 [7] 测定脑组织 PAG 活性。考马斯亮蓝法^[8]测定蛋白含量, GS、PAG 活性检测结果分别以每分钟每毫克组织蛋白催化生成的 γ -谷氨酰异羟肟酸或谷氨酸的 mmol 数表示。

1.6 统计学处理

检测数据用 SPSS 12.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 症状观察

80 mg/kg 剂量组 10 只小鼠于染毒后 2 h 陆续出现兴奋、不安、痉挛、流涎、抓搔等中毒症状, 其中 2 只雌鼠出现濒死状态; 40 mg/kg 剂量组个别小鼠于染毒后 2 h 出现轻度兴奋症状。20 mg/kg 剂量组小鼠在整个受试期间未见异常。

2.2 PAG 及 GS 活性

各组小鼠脑组织 GS 活性随染毒剂量的增加而逐渐降低, 而

PAG 活性随染毒剂量的增加而逐渐升高。统计结果表明, 40、80 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 GS 活性明显低于对照组, 80 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 PAG 活性明显高于对照组。详见表 1。

表 1 小鼠脑组织 PAG 及 GS 活性测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 (mg/kg)	n	PAG	GS
0	10	14.8 ± 3.6	250.6 ± 28.6
20	10	16.1 ± 4.3	240.9 ± 23.7
40	10	18.2 ± 4.8	215.9 ± 17.4**
80	10	21.3 ± 7.0**	177.9 ± 33.5***

与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

拟除虫菊酯类杀虫剂具有兴奋性神经毒性。中毒时主要表现为中枢神经系统的强烈兴奋症状。普遍认为这是由于突触间隙 Glu 递质含量过高, 进而与突触后膜上的受体结合所致。

脑内 Glu 主要由 Glu-Gln 循环通路合成和清除。突触前膜释放的 Glu 进入突触间隙, 正常情况下只有 1/4 与突触后膜上的受体结合发挥生理作用, 而大部分被星形胶质细胞通过载体 GLT-1 摄取, 在胶质细胞内的 GS 催化下 Glu 转变生成 Gln, Gln 再从星形胶质细胞释放作为 Glu 的前体在神经元中积累, 经 PAG 水解成 Glu, 其中一部分 Glu 经谷氨酸脱羧酶催化生成 γ -氨基丁酸。未分解的 Glu 被转运到突触囊泡中, 参与新一轮的兴奋反应。

文献报道^[4,5], 拟除虫菊酯可抑制大鼠神经胶质细胞对 Glu 的摄取功能和 GS 活性而使突触间隙 Glu 清除减少。本研究发现, 80 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 PAG 活性明显升高, 因此, 该类药物也可能直接作用于 PAG, 使其活性升高, 水解产生过多的 Glu, 导致突触间隙内 Glu 过多。即拟除虫菊酯类杀虫剂致哺乳动物神经突触间隙内 Glu 递质含量增多可能是

由于其清除减少和合成增多共同作用的结果。本研究还发现, 40 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 GS 活性受到明显抑制, 而 PAG 活性未见明显升高, 因此, 该类药物也可能是首先抑制了 GS 活性, 阻止 Glu 合成 Gln, 使酶反应的产物——Gln 含量减少 (另有文献报道), 胶质细胞内的 Glu 堆积, 负反馈作用于载体, 使之对 Glu 的重摄取减少, 进而使突触间隙 Glu 不能被及时清除; 而 PAG 活性的升高可能是由于 Gln 含量的减少, 神经元中 PAG 堆积所致, 详细的毒作用机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Casida J E, Gammon D W, Glickman A H, et al. Mechanism of selective action of pyrethroid insecticides [J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1983, 23: 413.
- [2] 夏世钧, 吴中亮. 分子毒理学基础 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2001: 260-261.
- [3] 杨晓运, 李智, 秦绿叶, 等. 星形胶质细胞和神经元之间谷氨酸谷氨酰胺的代谢偶联 [J]. 生命科学进展, 2003, 34 (4): 350-352.
- [4] 吴建平, 夏若寒, 石年, 等. 拟除虫菊酯对大鼠突触体谷氨酸摄取功能的影响 [J]. 卫生研究, 1999, 28 (5): 261-262.
- [5] 安丽, 赵越, 杨军, 等. 乙体氟氰菊酯对大鼠海马谷氨酰胺合成酶活性的影响 [J]. 毒理学杂志, 2006, 20 (2): 105-106.
- [6] Renis M, Cardile V, Russo A, et al. Glutamine synthetase activity and HSP70 levels in cultured rat astrocytes: effect of 1-octadecyl-2-methylac-glycerol-3-phosphocholine [J]. Brain Res, 1998, 783 (1): 143-150.
- [7] Carthoys N P, Weiss R F. Regulation of renal ammoniogenesis—subcellular localization of rat kidney glutaminase isoenzymes [J]. J Biol Chem, 1974, 249 (10): 3261-3266.
- [8] 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.

二噁英对大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能的影响

Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachloro-p-dibenzodioxin on the secretion of ovarian granulose cell in rats

赵力军¹, 王静², 刘英华², 王晓军², 汤乃军¹

ZHAO Li-jun¹, WANG Jing², LIU Ying-hua², WANG Xiao-jun², TANG Nai-jun¹

(1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 天津市卫生防病中心, 天津 300011)

摘要: 分别以 4.00、0.40、0.04 ng/ml 浓度的 2, 3, 7, 8-四氯苯二噁英 (TCDD) 对体外培养的大鼠卵巢颗粒细胞进行 24 h 染毒, 测定细胞活性和细胞分泌产物 (雌二醇和孕酮) 含量。结果显示, 各染毒组与对照组比较, 雌二醇和孕酮水平均有所降低, 差别有统计学意义 ($P < 0.01$), 且有剂量-反应关系。提示 TCDD 抑制大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能。

关键词: 大鼠; 颗粒细胞; 雌二醇; 孕酮; 二噁英

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2007)01-0045-02

二噁英是一类有机氯化化合物的总称, 其中 2, 3, 7, 8-四氯苯二噁英 (TCDD) 毒性最大, 危害最严重。人类慢性低剂量接触二噁英后, 其后代 (雄性个体生殖器官萎缩、畸形、结构异常, 雄激素水平下降、精液减少、质量变性、性欲下降, 甚至出现雌性化行为) 雌性个体卵巢功能下降甚至消失, 子宫内膜异位, 生育能力下降, 流产、死胎或畸形; 婴儿发育迟缓、智力和行为功能缺陷及性别发育异常等^[1-3]。为进一步了解二噁英对卵巢的直接毒性作用, 探讨二噁英的毒作用机制, 我们采用体外培养大鼠卵巢颗粒细胞的方法, 观察二噁英对卵巢颗粒细胞分泌功能的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料

实验动物: 二级 Wistar 大鼠, 由军事医学科学院实验动

收稿日期: 2006-04-29; 修回日期: 2006-08-16

作者简介: 赵力军 (1955—), 男, 副教授, 从事劳动卫生与职业病学教学工作。