

·专题交流·

# 地卓西平和牛磺酸对氯化锰致大鼠兴奋性毒性的影响

贾克, 徐兆发\*, 徐斌, 贺安宁, 李晶, 邓宇, 张芳林

(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:** 本研究拟通过观察谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酰胺酶(PAG)、琥珀酸脱氢酶(SDH)和 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性的改变, 探讨地卓西平(MK-801)和牛磺酸对锰致大鼠兴奋性毒性的影响。将大鼠按体重随机分成4组, 第1组为对照组, 皮下注射0.9%的氯化钠; 第2组为单纯染锰组, 皮下注射0.9%的氯化钠; 第3、4组为预处理干预组, 分别皮下注射0.3 μmol/kg的MK-801和1 mmol/kg的牛磺酸, 皮下注射2 h后, 第1组腹腔注射0.9%的氯化钠, 第2~4组腹腔注射200 μmol/kg的氯化锰, 染锰25 d, MK-801和牛磺酸隔日注射一次, 共预处理13次。最后一次染毒后24 h处死大鼠, 切取大脑皮质和纹状体。测定大脑皮质SDH、 $Na^+-K^+-ATPase$ 的活性; 测定脑纹状体GS、PAG的活性。结果显示单纯染锰组与对照组比较, 纹状体GS、脑皮质SDH和 $Na^+-K^+-ATPase$ 的活性明显降低( $P < 0.01$ ), 纹状体PAG的活性升高。MK-801预处理干预组与单纯染锰组比较, 纹状体GS和脑皮质 $Na^+-K^+-ATPase$ 的活性明显升高, 脑皮质SDH的活性升高, 纹状体PAG的活性降低; 牛磺酸预处理干预组纹状体GS和脑皮质SDH的活性明显升高, 脑皮质的 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性升高。提示MK-801和牛磺酸对锰所致兴奋性毒性均有不同程度变的拮抗作用。

**关键词:** 锰; 地卓西平(MK-801); 牛磺酸; 兴奋性毒性

**中图分类号:** O614.711 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2007)02-0100-03

## Effect of dizocilpine and taurine on the cerebral excitotoxicity of manganese chloride in rats

JIA Ke, XU Zhao-fa\*, XU Bin, HE An-ning, LI Jing, DENG Yu, ZHANG Fang-lin

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

**Abstract:** To determine whether dizocilpine (MK-801) or taurine can prevent the toxic effects of Mn on cerebrum, the Wistar rats were randomly divided into four groups by weight. The first group was control group which was given subcutaneous injection of 0.9% NaCl only; the second was Mn-exposed group injected with 200 μmol/kg of MnCl<sub>2</sub> subcutaneously; the third and fourth groups were intraperitoneally injected with 0.3 μmol/kg of MK-801 and 1 mmol/kg of taurine, respectively two hours after subcutaneous injection with 200 μmol/kg of MnCl<sub>2</sub> for 25 days. After the last administration, the rats were killed and the cerebral cortices and striatum were taken for detecting the activities of GS and PAG in striatum and the activities of SDH and  $Na^+-K^+-ATPase$  in pallium. The results showed that Mn-exposed group the activities of SDH and  $Na^+-K^+-ATPase$  in pallium and the activity of GS in striatum were decreased significantly compared with the controls, the activity of PAG in striatum was increased. In MK-801 treated group, the activities of SDH and  $Na^+-K^+-ATPase$  in pallium and the activity of GS in striatum showed increased significantly, the activity of PAG in striatum was decreased significantly, while in taurine administrated group, both the activity of GS in striatum and the activity of SDH and  $Na^+-K^+-ATPase$  in cerebral cortices were all increased compared with Mn treated group. It is suggested that MK-801 and taurine all have some protective effect on Mn-induced neurotoxicity.

**Key words:** Manganese; Dizocilpine (MK-801); Taurine; Excitotoxicity

锰(Manganese, Mn)是一种重要的环境污染物, 锰所致神经毒性的发生机制尚未完全阐明。有报道称锰的神经毒性可能是由于改变谷氨酸(glutamate, Glu)代谢所引起的间接兴奋性毒性过程<sup>[1]</sup>。细胞外的谷氨酸含量升高导致谷氨酸受体过度活化, 谷氨酸受体的过度活化, 尤其是NMDA受体的过度活化被认为是神经细胞退行性病变的一般机制<sup>[2]</sup>。地卓西

平马来酸盐(dizocilpine maleate, MK-801), 是一种强有力的NMDA受体非竞争性拮抗剂。牛磺酸(taurine, Tau)是一种具有广泛生物学活性的β-丙氨酸, 在中枢神经系统含量丰富, 可作为一种抑制性神经性递质或调质<sup>[3]</sup>。本实验通过观察MK-801和Tau对锰引起的纹状体谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)、谷氨酰胺酶(phosphate activated glutaminase, PAG)活性和脑皮质中琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)及 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性改变的影响, 为深入探讨锰所致兴奋性毒性机制提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物分组及染毒

收稿日期: 2006-08-28

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究基金资助项目(项目编号: 2004C025)

作者简介: 贾克(1979-), 男, 硕士, 主要从事重金属毒理学研究。

\*. 通讯作者, 教授, 博士生导师。

由中国医科大学实验动物中心提供的实验用Wistar大鼠

24 只, 体重 (180±10) g, 雌雄各半。正式实验前饲养 7 d, 然后按体重随机分成 4 组, 每组 6 只。第 1 组为对照组, 皮下注射 0.9% 的氯化钠; 第 2 组为单纯染锰组, 皮下注射 0.9% 的氯化钠; 第 3、4 组为预处理干预组, 分别皮下注射 0.3 μmol/kg 的 MK-801 和 1 mmol/kg 的牛磺酸, 皮下注射 2 h 后, 第 1 组腹腔注射 0.9% 的氯化钠, 第 2~4 组腹腔注射 200 μmol/kg 的氯化锰 (MnCl<sub>2</sub>), 染锰 25 d MK-801 和牛磺酸隔日注射一次, 共预处理 13 次。

### 1.2 样品采集及处理

最后一次染毒后 24 h, 将大鼠用乙醚麻醉, 解剖切取脑纹状体和皮质。将纹状体和脑皮质均制成 5% 的匀浆, 测定纹状体 GS 和 PAG 的活性; 测定脑皮质 SDH 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 的活性。

### 1.3 测定指标及方法

采用改良的 Clark 技术梯度离心得线粒体悬液<sup>[4]</sup>; 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进行<sup>[5]</sup>; PAG 的活性按 Cuthoys 和 Lowry 的方法测定<sup>[6]</sup>; SDH 的活性测定依据在酚嗪二甲酯硫酸盐存在的情况下二氯酚吡啶被还原时对波长 600 nm 光密度降低的测量<sup>[7]</sup>; Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性用硫酸亚铁钼磷蓝定磷法测定<sup>[8]</sup>; 蛋白含量测定用 Lowry 法<sup>[9]</sup>。

### 1.4 统计分析

实验所得数据以平均值±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)。

## 2 结果

### 2.1 大鼠纹状体 GS 和 PAG 活性

从表 1 可见, 大鼠腹腔单纯染锰 25 d 后, 与对照组比较纹状体 GS 活性明显降低 (P<0.01); MK-801 和牛磺酸预处理干预组纹状体 GS 的活性明显高于单纯染锰组 (P<0.01)。与对照组比较纹状体 PAG 活性升高 (P<0.05); MK-801 预处理干预组与单纯染锰组比较, PAG 活性降低 (P<0.05)。

表 1 各组大鼠纹状体 GS 和 PAG 的活性 (x̄±s)

分组	GS (U/g pm)	PAG (μmol/min·g pm)
对照组	57.53±6.78	36.21±4.29
MnCl <sub>2</sub>	40.41±7.05**	45.25±5.45*
MK-801+MnCl <sub>2</sub>	56.70±9.56▲▲	38.80±4.79▲
Tau+MnCl <sub>2</sub>	60.18±8.72▲▲	39.82±4.93

与对照组比较 \*P<0.05 \*\*P<0.01; 与染锰组比较 ▲P<0.05, ▲▲P<0.01, 表 2 同。

### 2.2 大鼠脑皮质 SDH 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性 (表 2)

表 2 各组大鼠脑皮质 SDH 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 的活性 (x̄±s)

分组	SDH (U/mg pm)	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase (μmol/min·g pm)
对照组	41.80±3.84	7.57±0.72
MnCl <sub>2</sub>	27.43±8.84**	5.04±0.88**
MK-801+MnCl <sub>2</sub>	34.98±2.06*▲	8.44±2.09▲▲
Tau+MnCl <sub>2</sub>	39.00±7.46▲▲	6.91±1.49▲

从表 2 可见, 与对照组比较, 单纯染锰组脑皮质 SDH 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 的活性明显降低 (P<0.01); MK-801 和牛磺

酸预处理干预组与单纯染锰组比较, 脑皮质 SDH、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性均升高 (P<0.05, P<0.01)。

## 3 讨论

谷氨酸是哺乳动物最主要的兴奋性神经递质, 在脑组织神经元退化性病变过程中发挥关键作用。作为神经递质的谷氨酸主要由“谷氨酸-谷氨酰胺循环”通路中的谷氨酰胺水解生成, 神经元通过“谷氨酸-谷氨酰胺循环”维持正常的生理活动, 当此循环被破坏时, 就会造成 Glu 代谢的紊乱, 谷氨酸在细胞外液过量积聚, 过度激活兴奋性氨基酸受体, 产生兴奋性毒性效应。有研究显示<sup>[10]</sup>, 使用 GS 竞争性抑制剂甲硫氨酸砷亚胺能引起星形胶质细胞内谷氨酸积聚和谷氨酰胺的减少, 引发兴奋性毒性作用。中枢的 Glu 主要来源于 Gln, PAG 能催化 Gln 水解为 Glu 和氨, 所以 PAG 也可作为 Glu 能神经元的特异性标识物<sup>[11]</sup>。本实验通过对大鼠单纯染锰 25 d 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, 这也可能是锰改变 Glu 代谢引起兴奋性毒性的原因之一。

有证据显示, 谷氨酸调节机制在锰诱导的神经毒性中起着至关重要的作用<sup>[12]</sup>。一般认为锰是通过引起线粒体功能障碍和自由基生成削弱能量代谢而产生毒性的。能量代谢障碍依次通过引起谷氨酸异常释放, 削弱谷氨酸的重摄取和升高谷氨酸受体突触后反应活性等多条路径改变兴奋性的传递<sup>[13,14]</sup>。琥珀酸脱氢酶是线粒体呼吸酶系的标志酶, 其活力大小直接反映线粒体的功能和细胞能量代谢状态。Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 的作用是保持了膜内高 K<sup>+</sup>和膜外高 Na<sup>+</sup>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, 从而维持神经细胞的兴奋性、传导性, 影响神经递质的释放。早期有文献报道, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性的降低通过引起谷氨酸的过量释放而导致细胞死亡<sup>[15,16]</sup>。因此, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性的降低必然影响突触的化学传递以及神经的传导功能。本实验发现大鼠染锰后脑皮质 SDH 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性明显下降, 可能影响谷氨酸代谢, 诱发兴奋性毒性。

地卓西马来酸盐属于抗惊厥药, 可作用于 NMDA 受体通道内部的苯环吡啶位点进行别构调节, 能有效阻滞谷氨酸与突触后膜受体结合, 阻断 NMDA 受体偶联的 Ca<sup>2+</sup>通道, 使 Ca<sup>2+</sup>内流减少, 从而使 NMDA 受体作用减弱。本次实验使用 MK-801 有效抑制了 GS、SDH 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性的下降以及 PAG 活性的增高, 这可能与阻止了 NMDA 受体活化有关。

在中枢神经系统, 牛磺酸与谷氨酸、γ-氨基丁酸 (γ-aminobutyric acid, GABA) 关系密切, Glu 及其激动剂可以刺激海马牛磺酸的释放, 牛磺酸和 GABA 同为抑制性神经递质, 牛磺酸还可作为神经调质, 调节大脑突触末端 GABA 释放以及 GABA 与其受体间的相互作用<sup>[17]</sup>。牛磺酸可以激活谷氨酰胺脱羧酶 (glutamate decarboxylase, GAD), 从而促进谷氨酸转化为 GABA, 降低谷氨酸含量, 进而对谷氨酸的兴奋性毒性损伤有明显的保护作用。本次实验使用牛磺酸有效抑制了 GS、SDH 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性的下降, 这可能与削弱了 NMDA 受体活化有关。虽然纹状体 PAG 活性略有升高, 但差异不显著, 说明牛

磺酸对锰引起的PAG活性减弱有一定的保护作用。

参考文献:

[1] Fitsarakis V A, Au C, Erikson K M, et al. The effects of manganese on glutamate, dopamine and gamma-aminobutyric acid regulation [ J ]. Neurochem Int, 2006, 48 (6-7): 426-433.

[2] Mattson M P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders [ J ]. Neuromolecular Med, 2003, 3 (2): 65-94.

[3] Miranda Contreras L, Benitez Diaz P R, Mendoza Briceno R V, et al. Levels of amino acid neurotransmitters during mouse cerebellar neurogenesis and in histotypic cerebellar cultures [ J ]. Dev Neurosci, 1999, 21 (2): 147-158.

[4] John B Clark. The metabolism of rat brain mitochondria [ J ]. J Biol Chem, 1970, 245: 4724-4731.

[5] Reni S M, Cardile V, Russo A, et al. Glutamine synthetase activity and HSP 70 levels in cultured rat astrocytes: effect of 1-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine [ J ]. Brain Res, 1998, 783: 143-150.

[6] Cunthoys N P, Lowry O. The distribution of glutaminase isoenzymes in various structures of the nephron in normal, acidotic and alkalotic rat kidney [ J ]. J Biol Chem, 1973, 248: 162-168.

[7] 钱涛, 高维娟, 丛斌, 等. 益肾降浊汤对小鼠脑缺血再灌后线粒体功能的改善作用 [ J ]. 山东医药, 2005, 10: 16-18.

[8] 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, 8: 972-974.

[9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the Folin phenol reagent [ J ]. J Biol Chem, 1951, 193: 265.

[10] 刘宝军, 刘锋, 高云, 等. 慢性癫痫大鼠海马谷氨酰胺合成酶的改变及丹参对其的影响 [ J ]. 河北医科大学学报, 2005, 26 (2): 131-132.

[11] Kaneko T, Itoh K, Shigemoto R, et al. Glutaminase-like immunoreactivity in the lower brainstem and cerebellum of the adult rat [ J ]. Neuro Science, 1989, 32 (1): 79-98.

[12] Verity M A. Manganese neurotoxicity: A mechanistic hypothesis [ J ]. Neurotoxicology, 1999, 20: 489-498.

[13] Lee J M, Zipfel G J, Choi D W. The changing landscape of ischemic brain injury mechanism [ J ]. Nature, 1999, 399 (suppl): A7-A14.

[14] Beal M F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness [ J ]. Ann Neuro, 1992, 31: 119-130.

[15] Henneberry R L, Novelli A, Cox J A, et al. Neurotoxicity at the N-methyl-aspartate-receptor in energy-compromised neurons. A hypothesis for cell death in aging and disease [ J ]. Ann N Y Acad Sci, 1989, 568: 225-233.

[16] Lees G J. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorder [ J ]. Neuroscience, 1993, 54: 287.

[17] Ye G, Tes A C, Yung W. Taurine inhibits rat substantia nigra pars reticulata neurons by activation of GABA and glycine-linked chloride conductance [ J ]. Brain Res, 1997, 749 (1): 175-179.

## 慢性湿疹 589 例斑贴试验结果分析

赵丽萍, 王丽莉, 洪玉晓, 王志敏, 陈洪铎, 高兴华\*

(中国医科大学附属第一医院皮肤科, 辽宁 沈阳 110001)

**摘要:** 为了解我国北方地区慢性湿疹患者斑贴试验结果及临床意义, 回顾性分析了本地区近 20 年来积累的 589 例慢性湿疹患者斑贴试验结果, 分析接触性变应原在不同性别、年龄、季节及年代的分布特征。结果斑贴试验阳性者 269 例, 占 45.7%。阳性率居前 9 位的接触性变应原分别为: 20% 松香 5.9% (35 例)、1% 甲醛 5.3% (31 例)、1% 次乙基二胺 4.2% (25 例)、30% 羊毛醇 4.1% (24 例)、5% 苯唑卡因 3.6% (21 例)、8% 芳香混合物 3.2% (19 例)、5% 硫酸镍 2.7% (16 例)、0.5% 对苯二胺 2.7% (16 例)、3% 卡巴混合物 2.5% (15 例)。接触变应原分布与性别、年龄、季节、发病年代等因素无关。说明慢性湿疹病人接触性变应原斑贴阳性率较高, 外源性接触性变应原可能是慢性湿疹的重要致病因素。

**关键词:** 慢性湿疹; 斑贴试验; 变应原

中图分类号: R758.23 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)02-0102-03

### Evaluation of the results and clinical significance of patch testing in 589 out-patients with chronic eczema

ZHAO Li-ping, WANG Li-li, HONG Yu-xiao, WANG Zhi-min, CHEN Hong-duo, GAO Xing-hua\*

(Department of Dermatology, No 1 Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract:** To evaluate the results and clinical significance of patch testing in chronic eczema, 589 out-patients with chronic eczema were patch tested during the last 20 years. It was found that 45.7% (269/589) patients with chronic eczema had positive reactions to the 20 allergens tested. Among them, positive rates were 20% colophony 5.9% (35/589), 1% formaldehyde 5.3% (31/589), 1% ethenyldiamine 4.2% (25/589), 30% lanonol 4.1% (24/589), 5% benzocain 3.6% (21/589), 8% fragrance mix

收稿日期: 2006-10-13; 修回日期: 2007-01-04

基金项目: 部分工作受教育部新世纪优秀人才支持计划资助 (NCEP-04-0287)

作者简介: 赵丽萍 (1971-), 女, 博士研究生, 现工作单位: 沈阳军区总医院皮肤科。

\*: 通讯作者。