

# 右美沙芬对甲基汞致大鼠神经损伤作用的影响

辛辛, 徐兆发\*, 邓小强, 田雅文, 胡月明, 李茵

(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 观察右美沙芬对甲基汞致神经损伤作用的影响。方法 实验用 Wistar大鼠 32只, 按体重随机分成 4组, 每组 8只。第 1组为对照组, 第 2、3组为不同剂量氯化甲基汞 (methylmercuric chloride MMC) 染毒组, 第 4组右美沙芬 (dextromethorphan DM) 干预组。实验开始时第 1、2、3组大鼠皮下注射 0.9%氯化钠溶液, 第 4组皮下注射 DM 13.5  $\mu\text{mol/kg}$  2 h后, 第 1组腹腔注射 0.9%氯化钠溶液, 第 2组腹腔注射 4  $\mu\text{mol/kg}$  MMC溶液, 第 3、4组腹腔注射 12  $\mu\text{mol/kg}$  MMC溶液, 注射容量均为 5 ml/kg 每周染毒 5 d 每天 1次, 共 4周 (20次), 但右美沙芬系隔日注射 1次, 每周 3次, 共 12次, 实验结束后 24 h测定大脑皮质谷氨酰胺合成酶 (GS) 和磷酸活化的谷氨酰胺酶 (PAG) 活力、丙二醛 (MDA) 含量以及超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力。结果 随着 MMC剂量的增加, 大鼠大脑皮质中 GS活力降低, PAG活力升高, MDA含量升高, SOD和 GSH-Px活力降低, 与 12  $\mu\text{mol/kg}$  MMC组相比, DM干预组大脑皮质中 GS活力升高, PAG活力降低, MDA含量降低, SOD和 GSH-Px活力升高。结论 甲基汞可以干扰大鼠大脑皮质内“谷氨酸-谷氨酰胺循环 (Glu-Gln cycle)”, 并可能引起氧化损伤; 右美沙芬对甲基汞的神经毒性及其氧化损伤作用具有一定的拮抗能力。

**关键词:** 甲基汞; 右美沙芬; 神经毒性; 氧化损伤

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)06-0410-03

Effect of dextromethorphan on the neurotoxicity of methylmercury in rats

XIN XIN, XU Zhao-fa\*, DENG Xiao-qiang, TIAN Ya-wen, HU Yue-ming, LI Yin

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

**Abstract:** Objective To explore the effect of dextromethorphan (DM) on the neurotoxicity induced by methylmercury. Methods Thirty-two Wistar rats were randomly divided into 4 groups, which were control group, low dose of methylmercuric chloride (MMC) group, high dose of MMC group and DM intervention group, 8 rats in each group. Rats in the former three groups were subcutaneously (sc) injected with 0.9% NaCl, rats in fourth group were sc injected with 13.5  $\mu\text{mol/kg}$  DM every other day for four weeks (12 times). Two hours later, the control rats were intraperitoneally (ip) injected with 0.9% NaCl, rats of second group were injected with 4  $\mu\text{mol/kg}$  MMC, rats of third and fourth group were injected with 12  $\mu\text{mol/kg}$  MMC five times a week for 4 weeks. Twenty-four hours after the last injection, rats were sacrificed, content of malondialdehyde (MDA) as well as the activities of glutamine synthetase (GS), phosphate activated glutaminase (PAG), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in cerebral cortex of rat were determined. Results Compared with control group, cerebral cortex contents of MDA and the activity of PAG in MMC treated group were increased, the activities of GS, SOD and GSH-Px in cerebral cortex of rat were decreased, while the contents of MDA and the activity of PAG in DM group were decreased, and the activities of GS, SOD and GSH-Px in the cortex of rat were increased compared with those of MMC treated group. Conclusions The results suggested that methylmercury might disturb the "Glutamate and Glutamine Cycle" in cerebral cortex and induce oxidative damage and dextromethorphan might have antagonistic ability on the neurotoxicity and oxidative damage of MMC in rats.

**Key words:** Methylmercury; Dextromethorphan; Neurotoxicity; Oxidative damage

甲基汞中毒是以神经系统为主的全身性损害<sup>[1]</sup>。MeHg在大脑的感觉区和运动区蓄积量较高, 尤其在大脑的后叶蓄积量最高<sup>[2]</sup>。右美沙芬 (dextromethorphan DM) 是一种 NMDA受体非竞争性拮抗剂, 对化学物质引起的神经毒性有一定的保护作用<sup>[3]</sup>。本

实验通过皮下注射 DM, 观察大鼠大脑皮质 GS、PAG活力, MDA含量, SOD和 GSH-Px活力的改变。进而探讨它对甲基汞致大鼠神经毒性和氧化损伤的影响, 为研究甲基汞神经毒性的机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组及染毒

清洁级 Wistar大鼠 32只 (由中国医科大学实验动物中心提供, 动物质量合格证号: SCXK (辽) 2003-2009), 体重 (180 $\pm$ 10) g, 雌雄各半。饲养环境温度

收稿日期: 2009-07-22 修回日期: 2009-09-18

作者简介: 辛辛 (1984-) 女, 硕士在读, 主要从事重金属毒理学研究。

\* 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: xzx@mail.cnmu.edu.cn

为 (23 ± 3) °C, 相对湿度 45% ~ 55%, 自由饮食。正式实验前饲养 7 d 然后按体重随机分成 4 组, 每组 8 只。第 1、2、3 组皮下注射 0.9% 氯化钠溶液, 第 4 组皮下注射 DM 13.5 μmol/kg 2 h 后, 第 1 组腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液, 第 2 组腹腔注射 4 μmol/kg MMC 溶液, 第 3、4 组腹腔注射 12 μmol/kg MMC 溶液, 注射容量均为 5 ml/kg。染毒每周 5 d 每天 1 次, 共 20 次, 皮下注射 DM 隔日 1 次, 共 12 次。

### 1.2 样品采集及处理

最后一次注射后 24 h 将大鼠用乙醚麻醉, 心脏放血后, 解剖取脑, 分离大脑皮质, 冰浴下切取大脑皮质, 制成相应的匀浆液, 测定大脑皮质 GS、PAG 活力, MDA 含量, SOD 和 GSH-Px 活力的改变。

### 1.3 测定指标及方法

GS 活力测定用 RENS 等<sup>[4]</sup>描述的 γ 谷氨酰转移酶的非生理学催化反应; PAG 活力测定用 CUR 等<sup>[5]</sup>的方法; 用硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法<sup>[6]</sup>测定 MDA 含量, 黄嘌呤氧化酶法测 SOD, DTNB 比色法<sup>[7]</sup>测定 GSH-Px 活力; 蛋白含量测定用 Folin-Lowry 法<sup>[8]</sup>。

### 1.4 统计学分析

用 SPSS1.5 软件进行数据处理, 实验所得数据以均数 ± 标准差表示, 采用单因素方差分析进行各指标组间差异的显著性检验, 两组间比较用 t 检验 (Student's Newman-Keuls SNK)。

## 2 结果

### 2.1 大鼠的一般状况

染毒 4 周后, 大鼠体重变化见表 1。

表 1 各组大鼠体重变化

组别	0周	1周	2周	3周	4周
对照组	189.4 ± 14.74	215.6 ± 29.39	266.0 ± 48.08	287.9 ± 55.30	304.6 ± 58.47
4 μmol/kg MMC	196.0 ± 13.71	205.0 ± 7.45	260.1 ± 42.15	264.9 ± 39.16	293.5 ± 55.24
12 μmol/kg MMC	181.4 ± 23.70	213.9 ± 21.55	226.3 ± 31.09*	241.8 ± 27.66*	225.1 ± 24.53**
12 μmol/kg MMC + DM	197.1 ± 15.63	221.5 ± 28.07	233.3 ± 20.12	253.6 ± 35.66	250.0 ± 46.55

与对照组比较, \* P < 0.05 \*\* P < 0.01

各组大鼠饮食和摄水量无明显差异, 单纯染 12 μmol/kg 甲基氯化汞组有少量掉毛的现象和出现稀样便, 有轻微中毒的表现, 大鼠无死亡, 其他各组体征变化不明显, 无中毒表现。体重随实验周数的增加而增加, 各组间染毒前及染毒第 1 周体重差异均无统计学意义, 从染毒第 2 周到第 4 周单纯染 12 μmol/kg 甲基氯化汞组体重增长速度明显减慢, 且该组体重与对照组相比有所降低, 差异有统计学意义 (分别为 P < 0.05 P < 0.05 和 P < 0.01)。

### 2.2 大脑皮质 GS 和 PAG 的活力 (表 2)

表 2 各组大鼠大脑皮质 GS 和 PAG 活力 (x̄ ± s, n = 8)

组别	GS	PAG
	[U/(min · g Pro)]	[μmol/(min · g Pro)]
对照组	35.26 ± 4.666	24.36 ± 3.408
4 μmol/kg MMC	31.65 ± 3.118	31.38 ± 1.906* ▲▲
12 μmol/kg MMC	30.82 ± 4.668*	40.51 ± 3.440**
12 μmol/kg MMC + DM	35.44 ± 3.605▲	35.45 ± 4.695* ▲

与对照组比较, \* P < 0.05 \*\* P < 0.01; 与 12 μmol/kg MMC 组比较, ▲ P < 0.05 ▲▲ P < 0.01; 表 3 同。

从表 2 可见, 4 μmol/kg MMC 组大鼠 GS 的活力略有下降, 但差异没有统计学意义; 12 μmol/kg MMC 组大鼠 GS 的活力明显低于对照组, 且差异有统计学意义 (P < 0.05); 4、12 μmol/kg MMC 组大鼠 PAG 的活力明显高于对照组, 且差异有统计学意义 (P < 0.01); DM 干预组与 12 μmol/kg MMC 组比

较, GS、PAG 活力明显升高和降低 (P < 0.05)。

### 2.3 大脑皮质 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力

从表 3 可见, 4、12 μmol/kg MMC 组大鼠 MDA 的含量与对照组相比升高明显, 差异有统计学意义 (P < 0.01); 4、12 μmol/kg MMC 组大鼠 SOD 和 GSH-Px 的活力与对照组相比有所下降, 且差异有统计学意义 (P < 0.05 和 P < 0.01); DM 干预组与 12 μmol/kg MMC 组比较, MDA 的含量降低 (P < 0.01), SOD 和 GSH-Px 的活力升高, 差异有统计学意义 (P < 0.05 P < 0.01)。

表 3 各组大鼠大脑皮质 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力 (x̄ ± s, n = 8)

组别	MDA	SOD	GSH-Px
	(nmol/ml)	(U/ml)	(U/mg Pro)
对照组	2.268 ± 0.314	122.3 ± 30.4	17.86 ± 2.23
4 μmol/kg MMC	2.811 ± 0.276**	100.9 ± 11.6*	14.69 ± 3.48*
12 μmol/kg MMC	3.088 ± 0.353**	86.77 ± 14.4**	13.11 ± 2.24**
12 μmol/kg MMC + DM	2.346 ± 0.225▲▲	105.2 ± 13.2**▲	16.69 ± 2.93▲▲

## 3 讨论

有报道称, 甲基汞的神经毒性可能与谷氨酸代谢<sup>[9]</sup>以及氧化损伤<sup>[10]</sup>有关。DM 是一种 NMDA 受体非竞争性拮抗剂, 具有脂溶性, 较易通过血脑屏障<sup>[11]</sup>。

谷氨酸是非必需氨基酸, 不能通过血脑屏障, 因而需在脑内由葡萄糖和其他一些前体合成, Glu 合成

后储存于突触囊泡内。囊泡释放的  $Glu$ 自由弥散跨过狭窄的突触间隙,与相邻细胞突触后膜表面的相应受体互相作用,在激活受体的同时向周围弥散,大部分被毗邻的胶质细胞摄取,其余部分被突触前神经末梢摄取,迅速终止其作用,通过这种机制  $Glu$ 被灭活<sup>[12]</sup>。被摄回的  $Glu$ 在 GS作用下转变成  $Gln$   $Gln$ 能再循环至  $Glu$ 能神经元末端,由 PAG作用转变成  $Gln$ 形成所谓的“谷氨酸-谷氨酰胺循环 ( $Glu-Gln$  cycle)”。当此循环被破坏时就会造成  $Glu$ 代谢的紊乱,使脑内兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸失衡,因此,GS和 PAG是  $Glu$ 能神经元的特异性标记物<sup>[13]</sup>。本实验通过对大鼠染 MMC4周发现,大脑皮质 GS活力明显下降,而 PAG活力升高,表明 MMC可扰乱“ $Glu-Gln$  cycle”通路,这可能是 MMC改变  $Glu$ 代谢引起兴奋性神经毒性的原因之一。与此同时通过本实验发现大脑皮质 MDA含量升高, SOD和 GSH-Px活力降低,说明 MMC对大脑的氧化损伤也是明显的,提示 MMC引起的兴奋性神经毒性和氧化损伤可能存在着密不可分的关系。

有研究表明,兴奋毒性常以急性细胞肿胀或者延迟性细胞溃变的方式发生发展<sup>[14]</sup>。迟发性神经毒性是  $Ca^{2+}$ 依赖性的,根据神经元种类不同,胞内  $Ca^{2+}$ 增加主要由 NMDA受体门控  $Ca^{2+}$ 通道和电压依赖性  $Ca^{2+}$ 通道激活所引起。胞内  $Ca^{2+}$ 增加可引起一系列的胞膜、胞质和胞核损伤事件而产生神经毒性。 $Ca^{2+}$ 在缺血性神经损害中起着重要的作用,钙超载是神经细胞死亡的“最后共同通路”<sup>[15]</sup>。有实验表明,在缺血等脑损伤中  $Ca^{2+}$ 增加可导致 MDA含量上升而 SOD活力降低<sup>[16,17]</sup>。脑组织中 DM可通过与 NMDA受体的拮抗剂位点结合,阻断  $Glu$ 过量对 NMDA受体的活化,抑制了钙离子内流,减轻由此引起的神经细胞毒性<sup>[18]</sup>。而通过本实验发现,DM干预组与 MMC组相比 GS活力明显升高, PAG活力下降, MDA含量降低, SOD和 GSH-Px活力升高,可明显拮抗 MMC神经毒性和氧化损伤,这可能主要是 DM通过与 NMDA受体的拮抗剂位点结合,阻断了 MMC致  $Glu$ 过量对 NMDA受体的活化,减轻由此引起的神经细胞毒性。而这种对神经毒性的抑制,很可能与减少了钙离子内流有关,而钙超载得到部分缓解后,可减轻氧化损伤。综上所述,亚急性染 MMC干扰“谷氨酸-谷氨酰胺循环”,同时导致氧化损伤。DM则可拮抗甲基汞致大鼠神经毒性和氧化损伤作用。但甲基汞致大鼠神经毒性和氧化损伤之间关系的机制比较复杂,可能涉及到许多环节,其具体机制还有待于

深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 张卫清, 王旭, 吕强, 等. 慢性汞中毒的神经系统损害特点 [J]. 空军总医院学报, 2006, 4: 199-200
- [2] 江景观, 纪云晶, 常元勋. 环境化学毒物防治手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 69-72
- [3] Eun Joo Shin, Seung Yeol Nahh, Jong Seok Chae, et al. Dexamethasone attenuates trimethyltin-induced neurotoxicity via  $\sigma_1$  receptor activation in rats [J]. Neurochemistry International 2007, 50 (6): 791-799.
- [4] Remis M, Cardile V, Russo A, et al. Glutamine synthetase activity and HSP70 levels in cultured rat astrocytes: effect of L-ocetadecyl-2-methyl-L-malglycero-3-phosphocholine [J]. Brain Res 1998, 783: 143-150.
- [5] Curthoys N P, Lowry O. The distribution of glutamine synthetase in various structures of the nephron in normal, acidotic and alkalotic rat kidney [J]. J Biol Chem 1973, 248: 162-168.
- [6] 万伯健. 卫生毒理学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1991: 216-217.
- [7] 夏奕明. 改良红细胞还原型谷胱甘肽氧化酶活力的测定方法. J DINB直接法 [J]. 卫生研究, 1987, 16 (4): 29.
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent [J]. J Biol Chem 1951, 193 (1): 265-275.
- [9] Porciuncula LQ, Rocha JB, Tavares R G, et al. Methylmercury inhibits glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain [J]. Developmental Neuroscience 2003, 14 (4): 577-580.
- [10] Gourin Shanker, Michael Aschner. Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: Evidence for methylmercury targeted disruption of astrocyte transport [J]. Journal of Neuroscience Research 2001, 66 (5): 998-1002.
- [11] David M Thomas, Donald M Kuhnz. MK-801 and dexamethasone block microglial activation and protect against methamphetamine induced neurotoxicity [J]. Brain Res 2005, 1050 (1/2): 190-198.
- [12] 邵福源, 王宇. 分子神经药理学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 179-199.
- [13] Burbaeva G Sh, Boksha IS, Tereshkina EB, et al. Glutamate transporter enzymes in prefrontal cortex of Alzheimer's disease patients [J]. Neurochem Res 2005, 30 (11): 1443-1451.
- [14] Choi D. Excitotoxic cell death [J]. Neurobiol 1992, 23: 1261-1276.
- [15] 张爱林, 孙建宁. 复方银杏滴丸抑制神经细胞内钙超载的作用及机制分析 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40 (17): 1305-1308.
- [16] 唐小卿, 朱炳阳. 光化学诱导脑缺血损害区 NO和  $Ca^{2+}$ 的变化及绞股蓝总皂甙的保护作用 [J]. 华南大学学报, 2001, 29 (2): 113-115.
- [17] 徐群清, 梁峰. 砷、铝联合中毒对小鼠脑细胞  $Ca^{2+}$ 浓度的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29 (9): 1084-1085.
- [18] 徐斌, 徐兆发, 贾克, 等. L-谷氨酸和右美沙芬对锰致大鼠兴奋性神经毒性的影响 [J]. 中国职业医学, 2007, 34: 367-369.