

- induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression [J]. *J Cell Physiol* 2007 211 (3): 585-589.
- [2] Xu Q, Norman J T, Shrivastav S et al. In vitro models of TGF-beta1-induced fibrosis suitable for high-throughput screening of anti-fibrotic agents [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007 293 (2): F631-640.
- [3] Chen Y, Chen J, Dong J et al. Antifibrotic effect of interferon gamma in silicosis model of rat [J]. *Toxicol Lett* 2005 155 (3): 353-360.
- [4] Daniel C, Wiede J, Krutzsch H C et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo

- [J]. *Kidney Int* 2004 65 (2): 459-468.
- [5] Xaubert A, Marin-Aguedas A, Larío S et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 168 (4): 431-435.
- [6] Bonnafant P, Maugeas P, Jask K et al. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chondrocyte fibrogenesis [J]. *J Immunol* 2005 175 (8): 5390-5395.
- [7] Xu Y D, Hua J, Mui A et al. Release of biologically active TGF-beta1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 285 (3): L527-539.

1, 2-二氯乙烷染毒对小鼠脑组织氨基酸类神经递质的影响

Effect of 1, 2-dichloroethane exposure on levels of amino acids neurotransmitters in brain of mice

齐莹, 石磊, 高岚岳, 王高阳, 李革新, 吕秀强, 金亚平*

QI Ying, SHI Lei, GAO Lan-yue, WANG Gao-yang, LI Ge-xin, LYU Xiu-qiang, JIN Ya-ping

(中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 探讨 1, 2-二氯乙烷 (1, 2-DCE) 对小鼠脑组织氨基酸类神经递质的影响, 为揭示 1, 2-DCE 的神经毒性损伤机制提供实验参考数据。将昆明种小鼠随机分为 4 组, 对照组和不同剂量 1, 2-DCE 染毒组 (0.25 mg/L, 0.50 mg/L, 1.00 mg/L), 每组 10 只小鼠。静式吸入染毒 14 d, 每天染毒 2 h。染毒结束后取大脑组织, 测定小鼠脑脏器系数; 高效液相色谱法 (HPLC) 检测脑组织中谷氨酸 (Glu)、天冬氨酸 (Asp)、甘氨酸 (Gly)、牛磺酸 (Tau) 及 γ -氨基丁酸 (GABA) 的含量。结果小鼠脑脏器系数随染毒剂量的增加呈下降趋势, 但各组间差异无统计学意义。各染毒组的 Asp、Glu 和 Tau 含量随染毒剂量的增加而升高, 且中、高剂量染毒组与对照组比较差异有统计学意义; 各染毒组的 Gly 含量随染毒剂量的增加也有升高的趋势, 但与对照组比较差异无统计学意义; 中剂量染毒组的 GABA 含量与对照组比较差异具有统计学意义, 但高剂量组与对照组比较未见明显差异。提示亚急性 1, 2-DCE 暴露可引起小鼠脑组织中氨基酸类神经递质含量的异常, 其可能是 1, 2-DCE 神经毒性损伤的主要机制之一。

关键词: 1, 2-二氯乙烷; 神经毒性; 氨基酸类神经递质

中图分类号: R99 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2010)06-0439-03

二氯乙烷 (dichloroethane, DCE) 系卤代烃类化合物, 为工业上常用的有机溶剂, 主要用于粘合剂、溶剂和氯代烃的生产^[1]。DCE 有 2 种异构体, 1, 2-DCE 为对称体, 1, 1-DCE 为非对称体。两者均为无色、易挥发、具有氯仿气味的油状液体, 工业上以 1, 2-DCE 为重要, 又称为氯化乙烯。1, 1-DCE 属低毒类, 只具有麻醉作用, 但 1, 2-DCE 属高毒类, 职业中

毒均为 1, 2-DCE 引起^[2]。1, 2-DCE 易经呼吸道、消化道和皮肤吸收并快速分布到全身, 特别是脂肪丰富的组织器官。

中枢神经系统对 1, 2-DCE 的作用非常敏感, 近十年来, 国内报道了多起严重的亚急性 1, 2-DCE 职业中毒事故, 以中毒性脑病为其主要临床表现^[3,4], 但其中毒机制还未明确^[2]。在中枢神经系统中, 化学性突触是信息传递的主要方式, 而氨基酸类神经递质是化学性突触进行信息传递的主要载体。氨基酸类神经递质分为两大类, 兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸, 分别对突触信息的传递起兴奋和抑制作用^[5]。其含量的变化对于突触信息的传递与调节具有重要的影响。本实验以亚急性 1, 2-DCE 中毒小鼠为研究对象, 通过测定小鼠脑组织中 5 种氨基酸类神经递质含量的变化, 探讨亚急性 1, 2-DCE 中毒的神经毒性损伤机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1, 2-DCE (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氨基酸标准品谷氨酸 (Glu) 和天冬氨酸 (Asp, BIO-BASIC 公司); 牛磺酸 (Tau) 和 γ -氨基丁酸 (GABA, 美国 Sigma 公司); 甘氨酸 (Gly, 上海精析化工科技有限公司)。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; C_{18} 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm \times 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 实验动物分组及处理

选用健康昆明种小鼠 40 只, 体重 (22.0 \pm 2.0) g, 由中国医科大学实验动物中心提供。适应性喂养 1 周后, 将小鼠随机分为 4 组, 分别是对照组及低、中和高剂量染毒组。每组各 10 只小鼠, 雌雄各半。以 1, 2-DCE 为染毒物。采用吸入染毒方式, 将小鼠置于静式染毒柜中, 以 0.25、0.50 和 1.00 mg/L 浓度, 每天染毒 2 h, 连续染毒 14 d。对照组小鼠除不加 1, 2-DCE 外, 其余处理同染毒组小鼠。染毒柜体积为 50 L,

收稿日期: 2010-06-11

作者简介: 齐莹 (1984-) 女, 硕士在读, 研究方向: 神经毒理。

* 通讯作者, E-mail: jinyi@mail.cmu.edu.cn

一次放入 10只小鼠。染毒过程中每日观察小鼠行为与体重的变化。染毒结束后, 将小鼠处死, 迅速取脑, 新鲜称重。

1.3 样品制备

分析天平称取 0.15g 脑组织, 按 1:9(W/V)加入预冷生理盐水, 在冰水浴条件下用电动匀浆机匀浆 20s, 超声 45s, 将脑组织匀浆, 以 3500 r/min 在 4℃离心 20min, 取上清 100μl, 用考马斯亮蓝法测蛋白含量, 另取上清 500μl, 以 10000 r/min 在 4℃再离心 20min, 取上清, 抽滤后用于氨基酸含量的测定。

1.4 考马斯亮蓝法测定脑组织蛋白含量

称取 50mg 小牛血清蛋白, 稀释成 0.5 mg/ml 的标准品, 分别取 20、40、60、80和 100μl 制成标准曲线。取 100μl 待测样品加入考马斯亮蓝 5 ml, 采用分光光度法, 在波长 595 nm 条件下, 测定待测样品中的蛋白含量。

1.5 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

标准液配制: 分别用 1 mol/L 氢氧化钠溶液配制 Glu、Asp、Gly、Tau 及 GABA 标准品 1 mmol/L 的储备液, 测定前用 1 mol/L 氢氧化钠稀释成 0.3、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、12.0 和 20.0 μmol/L 的标准系列。衍生试剂配制: 称取 20 mg 邻苯二甲醛, 0.5 ml β-巯基乙醇溶于 0.5 ml 甲醇中, 再加入 9.0 ml 0.4 mol/L 硼酸缓冲液 (PH=10.5), 超声溶解, 避光保存。

衍生化反应: 在室温下, 吸取氨基酸标准液或样品液 100 μl, 加入邻苯二甲醛衍生试剂 200 μl, 混匀静置 2 min 后, 进样 20 μl。

1.6 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm×5 μm), 柱温为 30℃。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, 23 min 结束洗脱。峰面积用外标法定量。荧光检测器, 激发波长 250 nm, 发射波长 410 nm。

1.7 统计分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 统计分析软件对数据进行多组间的单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 染毒后小鼠的行为观察与体重变化情况

染毒 3 d 后, 中、高剂量组部分小鼠出现兴奋表现, 染毒 7 d 后高剂量组的部分小鼠发生抽搐, 1 只小鼠出现惊厥并死亡, 对照组未见异常改变; 染毒过程中, 小鼠体重的变化情况如图 1 所示。各组小鼠的体重在实验期间呈缓慢上升趋势, 染毒组小鼠体重与对照组比较差异均未见统计学意义。

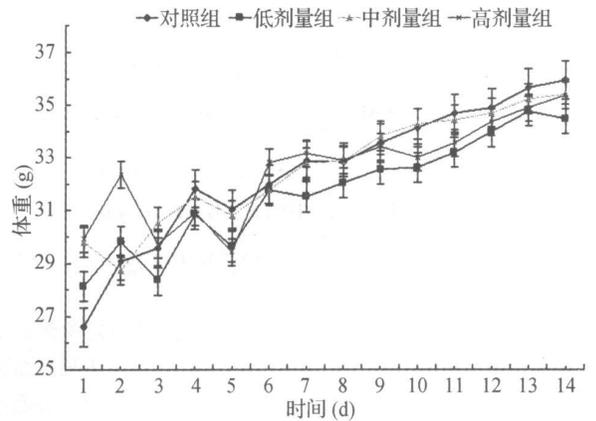


图 1 1, 2-DCE 染毒过程中小鼠体重的变化

2.2 色谱图

图 2 可见, 在本实验检测条件下, 5 种氨基酸类神经递质在 17 min 内均得以良好的分离。

2.3 1, 2-DCE 染毒后各组小鼠脑组织中氨基酸含量的变化

表 1 显示, 中、高剂量 1, 2-DCE 染毒组的 Asp、Glu 及 Tau 含量升高, 与对照组比较差异均有统计学意义; 中剂量 1, 2-DCE 染毒组的 GABA 含量与对照组比较显著升高, 但高剂量 1, 2-DCE 染毒组的 GABA 含量与对照组比较差异未见统计学意义。各染毒组小鼠的脑组织中 Gly 含量与对照组比较无明显差异。

表 1 各组小鼠脑组织中不同氨基酸含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

μmol/g Protein

组别	n	Asp	Glu	Gly	Tau	GABA
对照组	10	46.60±8.34	47.23±6.36	37.39±5.16	78.65±8.82	29.15±8.57
低剂量染毒组	10	47.95±5.94	46.21±8.32	32.04±8.32	78.67±8.65	24.39±8.89
中剂量染毒组	10	57.20±9.78*	55.39±9.78*	39.94±9.95	94.11±9.98**	39.05±9.43*
高剂量染毒组	9	60.03±5.46**	60.81±3.54**	39.65±5.06	99.98±9.94**	31.77±3.94

注: 与对照组比较, * P<0.05 ** P<0.01.

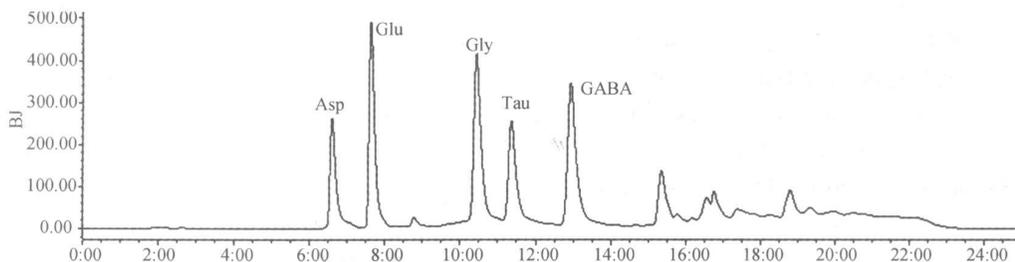


图 2 氨基酸分离色谱图

3 讨论

Glu、Asp、GABA、Gly和 Tau 是中枢神经系统中常见而重要的神经递质。这些神经递质代谢的异常可严重干扰中枢神经系统突触信息的传递,进而影响神经系统的功能。Gly和 Asp 是重要的兴奋性神经递质 (excitatory amino acids, EAAs),广泛存在于哺乳动物的中枢神经系统中,对脑神经元有普遍而强烈的兴奋作用。Gly 是脑内含量最高的氨基酸。近年来有报道,在脑外伤、中毒、缺血和缺氧情况下, Gly 从神经元大量释放,过度刺激突触后神经元受体,导致神经元的兴奋毒性,进而引起凋亡^[9]。本研究结果显示,脑组织中 Glu 和 Asp 的含量随染毒剂量的增加而升高,提示亚急性 1,2-DCE 中毒可导致脑组织内 EAAs 的大量增加,进而引起神经元的过度兴奋反应。这与本实验中高剂量 1,2-DCE 染毒小鼠出现的神经兴奋性症状相一致。

GABA 和 Tau 属于抑制性神经递质 (inhibitory amino acids, IAAs)。Tau 在脑组织中含量丰富、分布广泛。有报道提示, Tau 可以抵抗 Gly 导致的兴奋性毒作用,降低 Gly 所致的细胞凋亡及增强线粒体的功能^[7],并可通过 L-, P/Q-, N-型电控钙离子通道和 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体钙离子通道抑制 Gly 介导的 Ca²⁺流入^[8]。本实验中,中、高剂量组小鼠的脑组织中 Tau 含量随染毒剂量的增加而升高;中剂量组小鼠的 GABA 含量明显升高,但在高剂量组却未见明显升高,这可能是脑组织的一种应激保护机制。由于 EAAs 的非特异大量释放,使 GABA 等 IAAs 释放也增加,以防止 EAAs 对神经元的兴奋毒性。但当 EAAs 含量增加幅度过大时,可使神经元的调控功能发生障碍,引起神经元的过度兴奋,进而引起神经元的损伤和中枢神经系统功能的异常。Gly 是一种功能复杂的神经递质,它曾被认为是 IAAs,但现有研究结果显示, Gly 可与 NMDA 受体结合,起协同增强兴奋性突触传递的作用^[9]。本研究结果未见 1,2-DCE 染毒对 Gly 含量有明显的影响。

有关 1,2-DCE 染毒对脑组织内神经递质含量影响的研究报道较少,仅见一篇研究急性 1,2-DCE 染毒对大鼠脑组织内 4 种氨基酸类神经递质影响的报道,其结果显示,染毒组大鼠的脑组织中 Asp、Glu 和 Gly 含量均显著升高,但各染毒组的 GABA 含量与对照组比较无显著性差异^[10]。提示 EAAs 在 1,2-DCE 急性中毒性脑病的发病过程中具有重要作用,这与本实验的研究结果基本一致。

参考文献:

[1] 夏元洵. 化学物质毒性全书 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 307.
 [2] 李来玉, 陈秉炯, 黄建勋. 1,2-二氯乙烷职业中毒近十年的研究概况 [J]. 中国职业医学, 1999, 26 (6): 44.
 [3] 赵凤玲, 李洁雅, 王小丽, 等. 亚急性重度 1,2-二氯乙烷中毒救治体会 [J]. 中国职业医学, 2007, 34 (5): 403.
 [4] 郑刚, 吴文军, 郑红, 等. 1,2-二氯乙烷中毒 35 例临床分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2009, 22 (3): 192.
 [5] 张祥, 乔健. 脑脊液中氨基酸分析与中枢神经系统疾病关系 [J]. 国外医学·临床生物化学与检验学分册, 2002, 3 (6): 357-358, 361.
 [6] Banq D, Nicotera P. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia [J]. Stroke, 2007, 38: 674-676.
 [7] Hrisi A, El-Trenkner E. Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism [J]. J Neurosci, 1999, 19 (21): 9459-9468.
 [8] Wu H, Jin Y, Wei J, et al. Mode of action of taurine as a neuroprotector [J]. Brain Res, 2005, 1038: 123-131.
 [9] Kotak V C, Sames D H. Developmental influence of glycinergic transmission: Regulation of NMDA receptor-mediated EPSP [J]. J Neurosci, 1996, 16: 1836-1843.
 [10] 郭晓丽, 牛侨. 兴奋性氨基酸与 1,2-二氯乙烷急性中毒性脑病关系的探讨 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21 (2): 83-85.

(上接第 422 页)

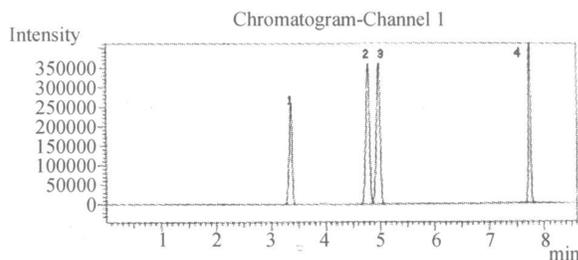
表 3 二异丁基甲酮的稳定时间实验

时间	峰面积 (μV·S)	损失率 (%)
当时	407 573	0
第 1 小时	399 534	-1.97
第 3 小时	389 484	-4.44
第 5 小时	378 252	-7.19
第 7 小时	353 675	-13.22

2.5 干扰实验

本法将可能同时与二异丁基甲酮存在的环己酮、甲基环己酮、异佛尔酮进行分离实验,结果见图 1。由图 1 可见分离效果很好,互不干扰。

以上结果表明,应用注射器采集空气邻二异丁基甲酮,直接进样气相色谱,氢火焰离子化检测器测定,效果良好,各指标均达到相关标准的要求,适用于工作场所中二异丁基甲酮的空气监测。



1-二异丁基甲酮, 2-环己酮, 3-甲基环己酮, 4-异佛尔酮
图 1 二异丁基甲酮共存物分离图

参考文献:

[1] 夏元洵. 化学物质毒性全书 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1991: 314-315.
 [2] GBZ2-2002 工作场所所有害因素职业接触限值 [S].
 [3] NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM) [Z]. Fourth Edition. KETONES: METHOD 1300. Issue 2, dated 15 August 1994.
 [4] GBZ/T210.4-2008 职业卫生标准制定指南第四部分 工作场所空气中化学物质测定方法 [S].