

• 论 著 •

褪黑素对锰致小鼠运动障碍及纹状体损伤的影响

邓宇¹, 米超², 李乐慧¹, 徐冬辉³, 徐斌¹, 刘巍¹

(1. 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; 2. 沈阳市卫生监督所学校卫生监督科, 辽宁 沈阳 110024; 3. 中国医科大学附属第一医院临床药理教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 探讨褪黑素对锰致小鼠运动障碍及纹状体损伤的影响。方法 小鼠 84 只, 均分为 6 组, 分别为对照组及低、中、高 Mn 组, 褪黑素 (MT) 对照组和 MT + 高 Mn 组。第 5、6 组提前皮下注射给予 5 mg/kg MT, 2 h 后, 第 2~4 和 6 组分别腹腔注射给予 12.5、25、50 和 50 mg/kg MnCl₂, 连续 2 周。观察小鼠的自主活动情况, 检测纹状体 GSH-Px、SOD 和 γ -GCS 的活力、表达及蛋白水平。结果 随着锰浓度的升高, 自主活动和站立次数逐渐减少; 纹状体 γ -GCS、GSH-Px 和 SOD 活力、蛋白表达水平逐渐下降, 并呈剂量-效应关系。与高锰组比较, MT 干预组自主运动和站立次数增加明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); γ -GCS、GSH-Px 和 SOD 活力、阳性表达及蛋白水平均显著升高。结论 本实验结果提示过量锰暴露可导致运动障碍及纹状体氧化损伤, 褪黑素可能通过激活抗氧化酶 GSH-Px、SOD 和 γ -GCS 发挥对它的拮抗作用。

关键词: 锰 (Mn); 褪黑素 (MT); 纹状体; 运动障碍; 氧化损伤

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2013)06-0403-04

Effects of melatonin on manganese-induced dyskinesia and striatum injury in mice

DENG Yu*, MI Chao, LI Yue-hui, XU Dong-hui, XU Bin, LIU Wei

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

Abstract: Objective Study the effect of melatonin on manganese (Mn)-induced dyskinesia and striatum injury of mice.

Methods Eighty-four mice were randomly divided into six groups: they were the control group, low-dose Mn group, medium-dose Mn group, high-dose Mn group, MT control group, and MT + high Mn group. The mice in fifth and sixth groups were injected s. c with 5 mg/kg MT in advance, two hours later, all the mice except control and MT groups were injected i. p with 12.5, 25, 50, and 50 mg/kg MnCl₂, respectively everyday for two weeks. Observe the activity status of mice and detect the activity and expression levels of GSH-Px, SOD and γ -GCS in striatum. **Results** With the elevation of Mn exposure level, the frequency of activity and stand reduced, while the activity and expression of γ -GCS, GSH-Px and SOD in striatum were risen in a dose-dependent manner. Comparing with high-dose Mn group, autonomic activity and stand of mice in MT intervention group were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively), the activities and expression level of γ -GCS, GSH-Px, and SOD were also elevated obviously. **Conclusion** The results suggested that the excessive exposure of Mn might induce dyskinesia and oxidative damage of striatum, while melatonin could antagonize the effect by activating the antioxidant enzymes such as GSH-Px, SOD, and γ -GCS.

Key words: manganese (Mn); melatonin (MT); striatum; dyskinesia; oxidative damage

锰是人体内的一种必需微量元素, 由于环境因素或职业因素长期接触锰能够引起神经毒性^[1]。锰可以通过血脑屏障, 主要在纹状体和苍白球等基底神经节中蓄积^[2]。已有文献证实锰造成神经退行性病变的机制之一是氧化损伤, 即其可引起生物大分子损伤, 从而使神经细胞死亡^[3]。人体可通过酶类抗氧化防御系统发挥拮抗外源性重金属 (锰、镉、铅等)

所致的氧化损伤的作用, 其中谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 及 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS) 是体内三种重要的抗氧化酶。褪黑素 (melatonin, MT) 是由哺乳动物和人类的松果体产生的一种胺类激素。近年来研究发现, MT 可通过提高抗氧化防御酶的基因表达而发挥间接抗氧化作用^[4]。

本研究通过对小鼠染锰及提前给予褪黑素预处理, 观察小鼠的自主活动状况, 检测 GSH-Px、SOD、 γ -GCS 活力、表达和蛋白水平, 研究锰是否引起小鼠自主活动障碍和纹状体氧化损伤, 探讨褪黑素对其是否具有拮抗作

收稿日期: 2013-07-03; 修回日期: 2013-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号 81302406); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题新教师类 (项目编号 201112104120017)

作者简介: 邓宇 (1981—), 女, 博士, 副教授, 主要从事重金属毒理学研究。

用,为锰中毒机制的研究及其防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要药物和试剂

氯化锰(分析纯)购自上海金山试剂厂,褪黑素(标准品)购自上海源叶生物科技有限公司,酚试剂购自 Sigma 公司,GSH-Px、SOD、 γ -GCS 活力检测试剂盒购自于南京建成生物工程研究所,兔抗 γ -GCS 抗体购自于美国 Santa Cruz 公司,兔抗 Gpx-1 和鼠抗 SOD2 抗体均购自于英国 Abcam 公司,Western blotting 相关试剂均购于上海碧云天生物技术研究所,SABC 和 DAB 试剂盒购自于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物分组及染毒

选择健康清洁级昆明小鼠 84 只,体重 (30 ± 2) g,雌雄各半,由中国医科大学实验动物部提供,实验动物许可证号 SYXK(辽)2008-0005。正式实验前适应性饲养 1 周。将实验动物按体重随机分成 6 组,每组 14 只。分别为对照组、低 Mn 组、中 Mn 组、高 Mn 组、MT 对照组和 MT + 高 Mn 组。第 1~4 组皮下注射(sc)给予 0.9% 氯化钠,第 5、6 组 sc 给予褪黑素 5 mg/kg; 2 h 后,第 1 和 5 组 ip 给予 0.9% 氯化钠,第 2~4 组腹腔注射(ip)给予 12.5、25、50 mg/kg $MnCl_2$ 、第 6 组 ip 给予 50 mg/kg $MnCl_2$ 。注射容量均为 5 ml/kg。每天干预及染毒各 1 次,持续 2 周。

1.3 样本采集及测定指标

最后一次染毒后 24 h,用 ZZ-6 小鼠自主活动测试仪检测小鼠的自主活动次数和站立次数。然后每组先取 10 只小鼠乙醚麻醉,心脏放血处死,迅速开颅取出完整大脑,冰浴下,切取纹状体。其中 6 只小鼠纹状体制成 10% 匀浆液用于严格参照试剂盒说明书检测 GSH-Px、SOD、 γ -GCS 活力。组织蛋白含量测定用 Folin-Lowry 法。另外 4 只小鼠脑组织提取蛋白后,用 Western blotting 法检测 GSH-Px、SOD、 γ -GCS 蛋白水平,计算目的蛋白灰度值与 β -actin 蛋白灰度值的比值,作为目的蛋白的相对表达率。另外,取 4 只小鼠麻醉后用 4% 多聚甲醛进行左心室灌流,取纹状体用 4% 多聚甲醛固定,用免疫组化法检测三者的蛋白表达,并分析三者的阳性面积比(%)和积分光密度(IOD)。

1.4 统计学分析

用 SPSS13.0 软件进行数据处理,实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间差异的显著性检验,再组间比较用 Q 检验(Students-Newman-Keuls, SNK),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠自主活动次数和站立次数

从表 1 中可看出,随着锰浓度的升高,小鼠的活动次数和站立次数逐渐减少,呈剂量-效应关系。与空白对照组相比,高 Mn 组中小鼠活动次数降低最为明显($P < 0.01$),中、高 Mn 组小鼠站立次数下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);与高 Mn 组比较,MT + 高 Mn 组小鼠的活动次数和站立次数显著增加至 1.64 和 1.80 倍($P < 0.01$)。

表 1 锰对小鼠自主活动和站立次数的影响及 MT 的干预作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	活动次数	站立次数
对照组	17.87 \pm 2.10	90.25 \pm 12.28
低 Mn 组	16.50 \pm 5.93	91.00 \pm 31.37
中 Mn 组	14.38 \pm 5.01	65.50 \pm 14.80*
高 Mn 组	9.63 \pm 2.33**	47.13 \pm 24.04**
MT 对照组	18.13 \pm 6.98	91.50 \pm 23.63
MT + 高 Mn 组	15.75 \pm 4.95#	84.75 \pm 13.78##

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与高 Mn 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

2.2 纹状体 γ -GCS、GSH-Px 和 SOD 活力

由表 2 中可看出,随着锰浓度的升高, γ -GCS、GSH-Px 和 SOD 活力逐渐降低,呈剂量-效应关系。与对照组比较,在中、高 Mn 组中, γ -GCS、GSH-Px 和 SOD 活力均降低,在 MT 对照组中上述 3 种酶的活力未见明显改变;与高 Mn 组比较,MT + 高 Mn 组的 γ -GCS、GSH-Px 和 SOD 活力分别升高了 2.45 倍、1.45 倍和 1.60 倍。

表 2 锰对纹状体 γ -GCS、GSH-Px 和 SOD 活力的影响及 MT 的干预作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) U/mg pro

组别	γ -GCS	GSH-Px	SOD
对照组	10.95 \pm 2.81	25.22 \pm 9.50	94.96 \pm 18.62
低 Mn 组	11.29 \pm 3.07	21.78 \pm 7.96	96.19 \pm 21.23
中 Mn 组	6.78 \pm 3.20*	12.09 \pm 5.24**	66.22 \pm 29.81*
高 Mn 组	4.07 \pm 1.95**	7.14 \pm 3.40**	56.34 \pm 15.68**
MT 对照组	11.69 \pm 3.66	27.18 \pm 9.32	97.92 \pm 24.00
MT + 高 Mn 组	9.98 \pm 4.28##	21.45 \pm 3.15##	90.10 \pm 15.41##

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与高 Mn 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

2.3 纹状体 γ -GCS、Gpx-1 和 SOD2 阳性表达

免疫组织化学法检测小鼠纹状体 γ -GCS、Gpx-1 和 SOD2 阳性表达见图 1(封三)。如图 1 和表 3 所示,随着染锰浓度的增高, γ -GCS、Gpx-1 和 SOD2 的阳性面积比(%)和 IOD 逐渐增加。与对照组相比,在中、高 Mn 组中, γ -GCS、Gpx-1 和 SOD2 的阳性面积比(%)和 IOD 均明显下降,而在 MT 对照组中三者的阳性面积比(%)和 IOD 未见明显变化。与高 Mn 组相比,在 MT + 高 Mn 组中 γ -GCS、Gpx-1 和 SOD2 的阳性面积比(%)和 IOD 明显增加。

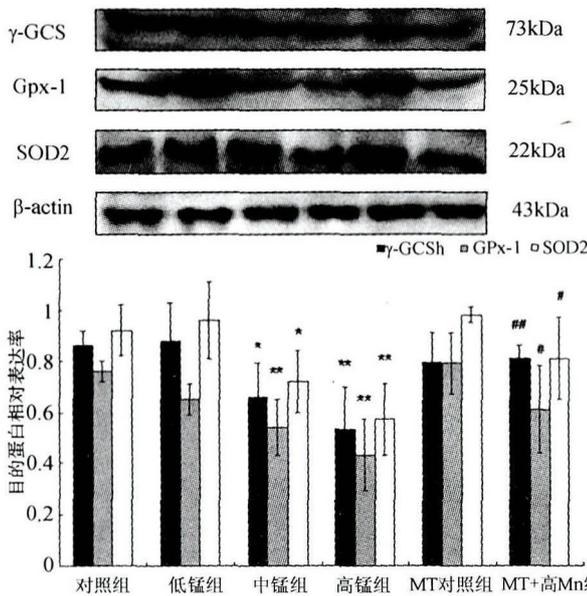
表 3 锰对 γ -GCSH、Gpx-1 和 SOD2 表达的影响及 MT 的干预作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	γ -GCSH		Gpx-1		SOD2	
	阳性面积比 (%)	积分光密度 (IOD)	阳性面积比 (%)	积分光密度 (IOD)	阳性面积比 (%)	积分光密度 (IOD)
对照组	0.72 ± 0.12	12.52 ± 2.12	0.66 ± 0.14	6.57 ± 2.12	1.39 ± 0.54	11.79 ± 2.12
低 Mn 组	0.76 ± 0.07	12.75 ± 3.39	0.54 ± 0.13	6.10 ± 1.63	1.62 ± 0.24	12.07 ± 1.77
中 Mn 组	0.54 ± 0.24*	9.20 ± 1.88*	0.28 ± 0.23**	3.72 ± 1.09*	0.89 ± 0.24*	8.97 ± 1.13*
高 Mn 组	0.34 ± 0.06**	6.02 ± 1.70**	0.15 ± 0.02**	2.14 ± 0.54**	0.59 ± 0.17**	7.38 ± 0.53**
MT 对照组	0.74 ± 0.09	12.73 ± 1.90	0.70 ± 0.14	6.80 ± 1.88	1.60 ± 0.07	11.92 ± 1.83
MT + 高 Mn 组	0.71 ± 0.01##	10.55 ± 1.39##	0.44 ± 0.11##	5.35 ± 1.41#	1.22 ± 0.41##	10.83 ± 1.93##

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与高 Mn 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.4 纹状体 γ -GCSH、Gpx-1 和 SOD2 蛋白水平

Western blotting 检测小鼠纹状体 γ -GCSH、Gpx-1 和 SOD2 蛋白水平见图 2。如图所示, 检测到相应的目的蛋白条带, 将扫描条带进行灰度分析, 目的蛋白的相对水平以各组蛋白的灰度值与内参 β -actin 的灰度值比较表示。随着锰浓度的增加, γ -GCSH、Gpx-1 和 SOD2 蛋白水平逐渐降低。与对照组相比, 低、中 Mn 组 γ -GCSH、Gpx-1 和 SOD2 蛋白水平明显下降, 在 MT 对照组中三者的蛋白水平未见明显改变。与高 Mn 组相比, MT + 高 Mn 组 γ -GCSH、Gpx-1 和 SOD2 蛋白水平增加至 1.53、1.40 及 1.42 倍。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与高 Mn 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 2 锰对纹状体 γ -GCS、GSH-Px 和 SOD 蛋白的影响及 MT 的干预作用

3 讨论

自 19 世纪 30 年代首次发现锰污染可引起锥体外系神经系统疾病以来, 环境锰污染对人体健康的危害引起了广泛关注^[5]。本实验通过测定小鼠的自主活动次数和站立次数, 脑纹状体 GSH-Px、SOD 和 γ -GCS 的活力、表达及蛋白水平, 观察锰致小鼠运动

行为障碍和纹状体氧化损伤及干预物质褪黑素, 深入探讨锰致神经毒性的机制。

小鼠的自主活动次数和站立次数可反映小鼠的运动功能, 本实验运用 ZZ-6 小鼠自主活动测试仪检测发现, 随着锰浓度的增加, 小鼠的活动次数和站立次数均下降。此结果与 Matsuura 等^[6]的结果一致, 表明锰引起的小鼠运动功能明显减低可能是锰通过血脑屏障, 在纹状体中蓄积, 导致其内的神经元受损, 出现运动失调的症状。

有文献表明, 氧化损伤可能是锰小鼠运动行为障碍的机制之一^[7]。 γ -GCS、GSH-Px、SOD 是体内重要的酶类抗氧化系统: γ -GCS 是体内 GSH 合成的必要的催化酶; GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶; SOD 是生物体内重要的抗氧化酶。正常机体的自由基氧化作用与抗氧化防御作用处于动态平衡状态。从本实验测得的 γ -GCS、GSH-Px 和 SOD 活力、阳性面积比和 IOD、蛋白表达可以看出, 与对照组比较, 随着锰浓度的升高, GSH-Px、SOD 和 γ -GCS 的活力、表达及蛋白水平均明显下降, 其结果可能由于清除自由基的酶类系统的防御功能减退, 动态平衡失调^[8]。说明此实验中的染毒已使脑纹状体组织产生氧化损伤。

褪黑素是重要的抗氧化剂, 具有广泛的病理生理功能, 其作用主要表现能够直接清除氧自由基, 从而减轻对抗氧化酶的破坏作用。另外, 研究发现褪黑素具有脂溶性高、易于通过血脑屏障和细胞膜、毒性低等优点^[9]。本研究结果显示, 与高 Mn 组相比, 褪黑素可以增加小鼠的自主活动次数和站立次数, 使 γ -GCS、GSH-Px 和 SOD 活力、阳性面积比和积分光密度、蛋白表达均增加。本实验也支持了既往关于褪黑素具有可以抑制阿尔茨海默病、帕金森病、癫痫和中风等疾病的作用^[10]。上述结果说明褪黑素通过提高抗氧化酶的活性来发挥间接的抗氧化作用, 抑制锰诱导纹状体氧化损伤, 拮抗锰所致的小鼠运动障碍。

(下转第 408 页)

细胞凋亡成正相关,间接地反映了细胞的死亡情况。本实验结果显示,随着锰浓度的增加,LDH 释放量和细胞凋亡率增加,具有明显的剂量-效应关系。随着染毒剂量的增加表现出明显的毒性,这可能与锰的蓄积毒性有关。本实验所观察到锰对脑片神经细胞有损伤,这可能是锰诱导神经细胞凋亡和诱发神经细胞坏死共同作用的结果。

alpha-synuclein 是一种中枢神经系统突触前表达的可溶性蛋白,与帕金森病的发病有密切的关系。alpha-synuclein 在各种生理、环境因素的影响下异常表达和聚集,通过一系列的氧化应激等生化反应,产生对神经元的毒性作用。有文献报道^[9], alpha-synuclein 表达增加,可以引起黑质纹状体部位产生的活性氧和其他化学物质代谢障碍,引起脂质过氧化反应、DNA 损伤、线粒体呼吸链反应受阻,最终导致细胞死亡。alpha-synuclein 的表达增加与许多因素有关,如 pH 值、温度、鱼藤酮、百草枯及重金属离子铁、锌、铝等^[10]。本实验结果显示,锰处理脑片可以导致神经细胞中 alpha-synuclein 蛋白表达升高,这可能是锰导致神经细胞损伤发生的又一重要因素。

综上所述,一定浓度的 $MnCl_2$ 对脑片神经细胞的毒性作用可能与 alpha-synuclein 表达量增高密切相关。但 alpha-synuclein 蛋白在锰神经毒性中的具体作用机制尚需进一步的深入研究。

(上接第 405 页)

综上所述,本实验研究结果提示褪黑素可能是通过保护锰中毒小鼠脑纹状体内的抗氧化酶 GSH-Px、SOD 和 γ -GCS,发挥拮抗锰致小鼠运动障碍和纹状体氧化损伤的作用。

参考文献:

- [1] Bowman A B, Kwakye G F, Hernández E H, et al. Role of manganese in neurodegenerative diseases [J]. J Trace Elem Med Biol, 2011, 25 (4): 191-203.
- [2] Jan Kovic, Joseph M D. Searching for a relationship between manganese welding and Parkinson's disease [J]. Neurology, 2005, 64 (12): 2021-2028.
- [3] Milatovic D, Gupta R C, Yu Y, et al. Protective effects of antioxidants and anti-inflammatory agents against manganese-induced oxidative damage and neuronal injury [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 256 (3): 219-226.
- [4] Sokolovic D, Djordjevic B, Kocic G, et al. Melatonin protects rat thymus against oxidative stress caused by exposure to microwaves and

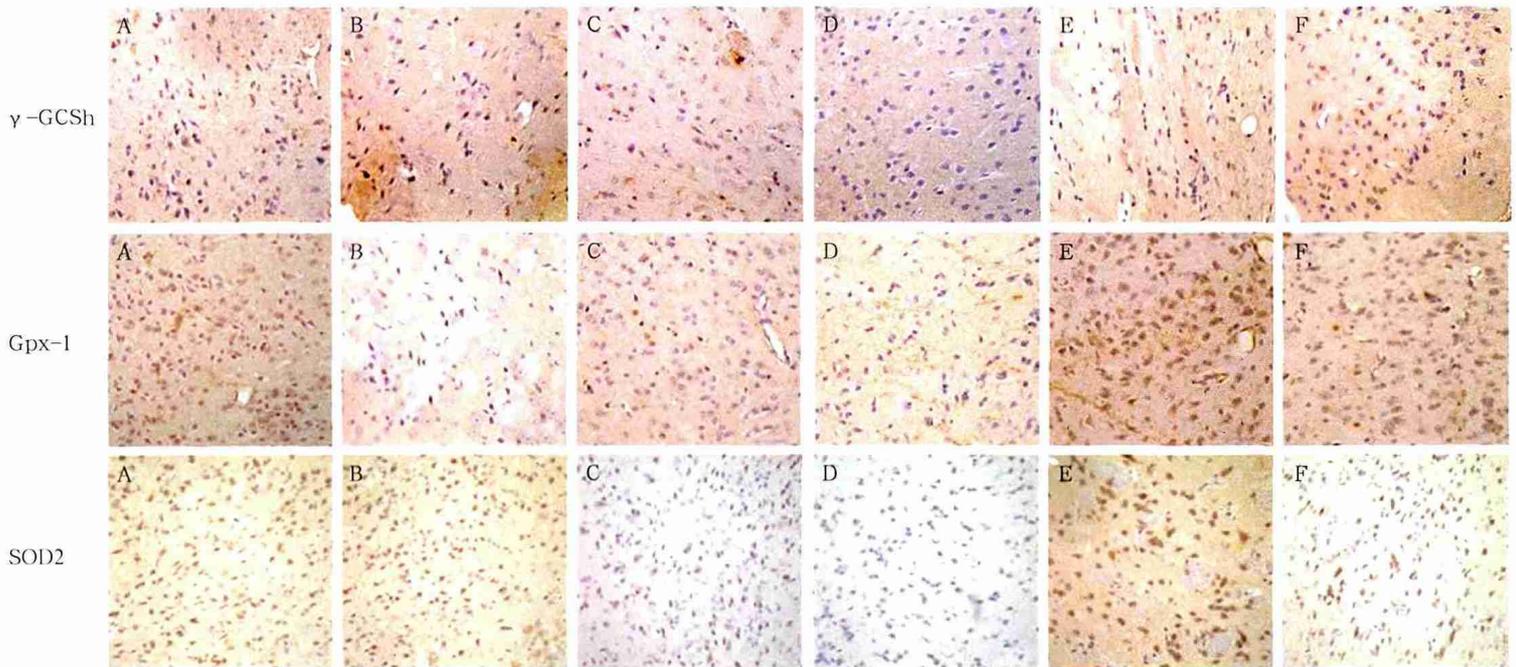
参考文献:

- [1] Martinez-Finley E J, Gavin C E, Aschner M, et al. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 1: 32.
- [2] Oaks A W, Frankfurt M, Finkelstein D I, et al. Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function [J]. PLoS One, 2013, 8 (4): e60378.
- [3] Qin L, Liu Y, Hong J S, et al. NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration [J]. Glia, 2013, 61 (6): 855-868.
- [4] 石娇,于维军,孙桂媛,等.新生大鼠大脑皮质、纹状体及中脑黑质器官型脑片培养 [J]. 解剖科学进展, 2006, 12 (1): 18-20.
- [5] 孙莉,程焱.右美沙芬对培养海马神经元缺氧损伤的保护作用及对 Bel-2 表达的研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2004, 6 (2): 123-125.
- [6] 徐斌,徐兆发,邓宇,等.锰对大鼠纹状体谷氨酸代谢的影响 [J]. 环境与职业医学, 2009, 26 (4): 378-380.
- [7] 李宏伟,周波,文敏,等. Paraquat 联合 Maneb 暴露对 C57BL/6 小鼠黑质酪氨酸羟化酶与 α -突触核蛋白的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2011, 15 (9): 1460-1462.
- [8] Bouchard M, Mergler D, Baldwin M, et al. Neuropsychiatric symptoms and past manganese exposure in a ferro-alloy plant [J]. Neurotoxicology, 2007, 28 (2): 290-297.
- [9] Surguchov A. Molecular and cellular biology of synucleins [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2008, 270: 225-317.
- [10] Santner A, Uversky V N. Metalloproteomics and metal toxicology of alpha-synuclein [J]. Metallomics, 2010, 2 (6): 378-392.

- modulates proliferation/apoptosis of thymocytes [J]. Gen Physiol Biophys, 2013, 32 (1): 79-90.
- [5] Furbee B. Welding and Parkinsonism [J]. Neurol Clin, 2011, 29 (3): 623-640.
- [6] Matsuura K, Kabuto H, Makino H, et al. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion [J]. J Neurosci Methods, 1997, 73 (1): 45-58.
- [7] HaMai D, Bondy S C. Oxidative basis of manganese neurotoxicity [J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1012: 129-141.
- [8] Burrow H, Kanwar R K, Mahidhara G, et al. Effect of selenium-saturated bovine lactoferrin (Se-bLF) on antioxidant enzyme activities in human gut epithelial cells under oxidative stress [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011, 11 (8): 762-771.
- [9] Reiter R J, Tan D X, Gitto E, et al. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage [J]. Pol J Pharmacol, 2004, 56 (2): 159-170.
- [10] Srinivasan V. Melatonin oxidative stress and neurodegenerative diseases [J]. Indian J Exp Biol, 2002, 40 (6): 668-679.

褪黑素对锰致小鼠运动障碍及纹状体损伤的影响

(正文见403~405页)



注：A—对照组，B—低Mn组，C—中Mn组，D—高Mn组，E—MT对照组，F—MT+高Mn组

图1 锰对纹状体 γ -GCSH、Gpx-1和SOD2表达的影响及MT的干预作用（免疫组化染色， $\times 400$ ）

锰对大鼠脑片的损伤及对细胞 α -突触核蛋白表达的影响

(正文见406~408页)

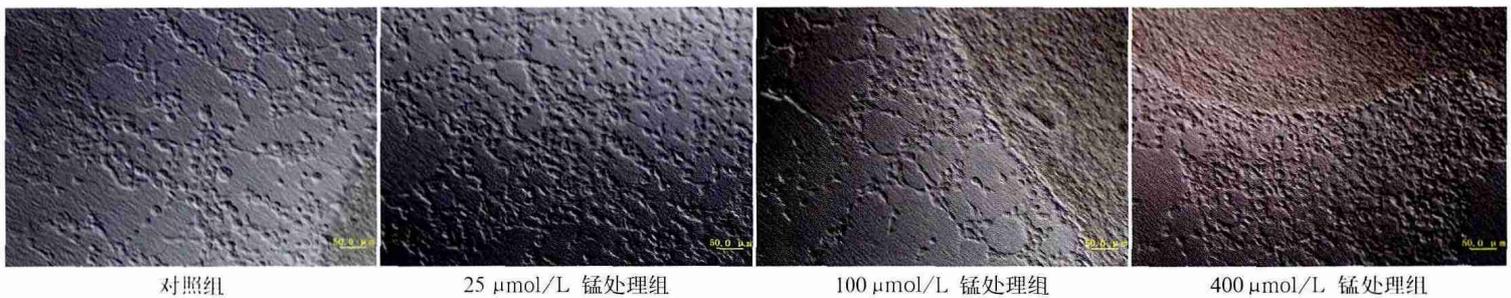


图1 锰对脑片神经细胞的影响 ($\times 200$)

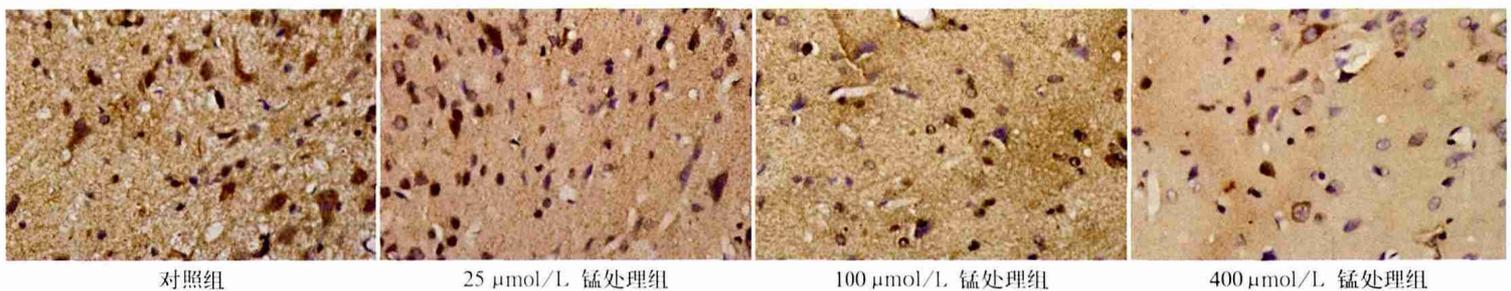


图2 不同浓度锰对TH阳性神经细胞的影响（免疫组化染色， $\times 400$ ）