

茶多酚对甲基汞致大鼠大脑皮质神经元氧化损伤的防护作用

刘巍, 徐兆发, 杨天瑶, 奉姝, 邓宇, 徐斌

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110122)

摘要: **目的** 探讨茶多酚 (tea polyphenols, TP) 对甲基汞 (methylmercury, MeHg) 所致大鼠大脑皮质神经元氧化损伤的防护作用及机制。**方法** 进行大鼠大脑皮质神经元原代培养, 细胞成熟后给予 0.01、0.1、1、2 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 分别处理 0.5、1、3、6、12 h, 通过测定培养液中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活力来进行 MeHg 细胞毒性分析; 根据测定结果选择最具代表性的 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 暴露 6 h 作为 MeHg 染毒组。应用同样方法进行 TP 预处理组选定, 向培养液中分别加入终浓度为 5、10、20 及 40 $\mu\text{mol/L}$ TP, 分别预处理 0.5、1、3 及 6 h 后, 再加入终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg, 继续培养 6 h 后测定培养液 LDH 漏出, 根据实验结果选定 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 3 h 作为 TP 预处理剂量及时间; 细胞经各剂量 TP 预处理后, 再暴露于 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 6 h, 测定神经元细胞凋亡率、非蛋白巯基 (non-protein sulfhydryl, NPSH) 含量、活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 水平及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 活力。**结果** 与对照组比较, 随着染 MeHg 剂量的升高, 培养液中 LDH 活力逐渐升高, 呈现剂量和时间依赖性的效应关系。TP 预处理后, LDH 活力逐渐降低, 在 10、20 $\mu\text{mol/L}$ TP 预处理组显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 导致神经元凋亡率显著升高, NPSH 含量显著降低, ROS 水平显著升高, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 活力显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), TP 预处理对上述指标的拮抗作用呈现剂量-效应关系, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** TP 对 MeHg 所致大鼠大脑皮质神经元氧化损伤具有一定的防护作用。

关键词: 甲基汞 (MeHg); 茶多酚 (TP); 神经元; 氧化损伤; 活性氧 (ROS)

中图分类号: 994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2016)06-0415-04 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2016.06.005

Protective effect of tea polyphenols against methylmercury-induced oxidative damage in rat cortical neurons

LIU Wei, XU Zhao-fa, YANG Tian-yao, FENG Shu, DENG Yu, XU Bin

(Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110122, China)

Abstract: **Objective** To explore the protective effect of tea polyphenols (TP) against methylmercury (MeHg)-induced neuronal oxidative damage in rat cortical neurons. **Methods** The primary cultured cortical neurons were exposed to 0.01, 0.1, 1, and 2 $\mu\text{mol/L}$ MeHg for 0.5, 1, 3, 6, and 12 h, respectively. According to the leakage situation of LDH in the medium to judge the cytotoxicity of MeHg, 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg for 6 h was intended as treatment group. Same method was used for TP pre-treatment and 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ TP pre-treated for 3 h were intended as TP pre-treatment groups for evaluation the protective effect of TP on neuronal apoptosis, NPSH content, ROS formation, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ activities. **Results** The results showed that comparing with control group, the LDH activities increased in a dose-and time-dependent manner in MeHg exposure groups, while the TP pre-treatment resulted in LDH activity dose-and time-dependently lower, especially in 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ TP pre-treatment for 3 h groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In addition, the obvious elevations of neuronal apoptosis rates, of ROS formation, as well as decrease in NPSH content, in activities of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ ($P < 0.01$) caused by 1 $\mu\text{mol/L}$ of MeHg could partially antagonize by TP pre-treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** It is suggested that TP has the ability to prevent the oxidative damage caused by MeHg in cortical neurons of rat.

Key words: methylmercury (MeHg); tea polyphenols (TP); neurons; oxidative damage; reactive oxygen species (ROS)

已有研究表明^[1], 甲基汞 (methylmercury, MeHg) 能够诱发产生自由基, 过量自由基会导致机体氧化损伤, 是外源化学物对机体细胞产生毒性的主要机制之一。活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 通常被认为是细胞氧化应激的正常产物之一, 但过量的 ROS 蓄积可以导致氧化损伤, 使胞内分子

如蛋白质、DNA 等发生病理损伤, 并激活某些基因导致细胞凋亡。茶多酚 (tea polyphenols, TP) 是从茶叶中提取的天然多酚类化合物, 具有抗衰老、抗肿瘤、抗辐射、抗炎等功能^[2]。本研究应用不同浓度的 MeHg 暴露及 TP 预处理神经元, 通过测定乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活力、细胞凋亡率、非蛋白巯基 (non-protein sulfhydryl, NPSH) 含量、ROS 水平、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 活力, 研究不同剂量 TP 预处理对 MeHg 所致神经元氧化损

收稿日期: 2016-03-21; 修回日期: 2016-10-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (项目编号: 81172631)

作者简介: 刘巍 (1986—), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 重金属毒理学。

通信作者: 徐兆发, 教授, 博士生导师, E-mail: zfxu@mail.cmu.edu.cn。

伤的保护作用,为深入研究 MeHg 致神经毒性的机制及其防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器及试剂

1.1.1 仪器 SW-CJ-1F 型超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司),HERA CELL 150 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司),2-16K 低温超速离心机(美国 Sigma 公司),电热恒温水浴箱(北京光明仪器厂),T5100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司),SMJ-168 解剖显微镜(厦门 Motic 公司),FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司),722 型分光光度计(上海精密仪器有限公司)。

1.1.2 试剂 甲基汞(纯度 $\geq 97.0\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer-Schafers 公司),TP(纯度 $\geq 95.0\%$,长沙蓝威生物科技有限公司),DMEM、Neurobasal-A、HBSS、B27、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),阿糖胞苷、多聚赖氨酸、DCFH-DA(美国 Sigma 公司),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 神经元培养

由中国医科大学实验动物中心提供的清洁级 Wistar 大鼠若干只,经中国医科大学伦理委员会批准,动物使用许可证号:SCXK(辽)2008—0005。雌雄合笼饲养,直至受孕分娩,产下新生鼠。按文献[3]的方法,取出生 24 h 之内的 Wistar 大鼠,去脑膜后切碎,加入 1 ml 含 0.125% 胰蛋白酶的 DMEM,于 37 °C 孵育 20 min,消化后用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止反应。用移液管轻轻吹打,将细胞悬液转移到 200 目筛网中过滤,滤液经 800 r/min 离心 5 min。弃上清,用含 10% 马血清的 DMEM 培养基稀释细胞悬液至 1×10^6 个/ml,接种于经多聚赖氨酸过夜处理的直径为 60 mm 的培养皿中,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h,弃掉 DMEM 培养基,更换为含 2% B27、1% 抗生素、0.25% 谷氨酰胺的 Neurobasal-A 无血清培养基继续培养 24 h,之后向培养皿中加入终浓度为 3.33 $\mu\text{mol/L}$ 的阿糖胞苷,以抑制非神经元的过度增长,使之纯化。24 h 后半量换液。之后每 3 d 换液一次,待细胞长满单层后,采用 NSE 免疫细胞化学法进行鉴定,免疫染色阳性细胞达 90% 后进行实验。

1.3 实验分组及处理

1.3.1 神经元染毒及预处理模型的建立 待神经元生长状态最佳时进行实验。向培养液中分别加入

0.01、0.1、1 及 2 $\mu\text{mol/L}$ MeHg,分别培养 0.5、1、3、6 及 12 h,测定培养液 LDH 漏出进行 MeHg 细胞毒性分析。根据实验结果选定 1 $\mu\text{mol/L}$ 暴露 6 h 作为 MeHg 处理剂量及时间进行后续指标测定。应用同样方法选定 TP 预处理组,向培养液中分别加入终浓度为 5、10、20 及 40 $\mu\text{mol/L}$ TP,分别预处理 0.5、1、3 及 6 h 后,再加入终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg,继续培养 6 h 后测定培养液 LDH 漏出。根据实验结果选定 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 3 h 作为 TP 预处理剂量及时间进行其余指标测定。

1.3.2 以培养液 LDH 漏出,确定其余指标测定分组 共分为 5 组,分别为对照组、1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 组、5 $\mu\text{mol/L}$ TP + 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 组、10 $\mu\text{mol/L}$ TP + 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 组、20 $\mu\text{mol/L}$ TP + 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 组。TP 预处理 3 h,染 MeHg 6 h 后进行实验分析。

1.4 测定指标

培养液中 LDH 活力参照文献[4]的方法测定,神经元细胞凋亡率应用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒测定,NPSH 含量应用 DTNB 比色法^[5]测定,单细胞悬液制备及 ROS 水平参照文献[6]的方法测定,Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活力参照 Carfagna 等^[7]报道的硫酸亚铁钼磷蓝定磷法测定。蛋白含量应用 Lowry 方法测定。

1.5 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 17.0 软件单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间差异的显著性检验,两组间比较用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量 MeHg 对神经元培养液 LDH 活力的影响

随着 MeHg 处理剂量(0~2 $\mu\text{mol/L}$)及时间(0.5~12 h)的增加,细胞培养液 LDH 活力不断升高,并呈现剂量和时间依赖性的效应关系。与对照组相比,MeHg 处理 0.5 h,2 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 组神经元培养液 LDH 活力明显升高($P < 0.05$);MeHg 处理 1 h,1、2 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 组细胞培养液 LDH 活力显著升高($P < 0.01$);MeHg 处理 3 h,0.1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 组细胞培养液 LDH 活力明显升高($P < 0.05$),1、2 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 组 LDH 活力显著升高($P < 0.01$);MeHg 处理 6 h 和 12 h,除 0.01 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 组外,各 MeHg 处理组细胞培养液 LDH 活力均显著升高($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各时间点不同剂量 MeHg 处理对神经元培养液 LDH 活力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

%对照

| 组别 | n | 0.5 h | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h |
|--------------------|----|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 对照组 | 10 | 100.00±14.37 | 100.00±14.75 | 100.00±13.67 | 100.00±13.20** | 100.00±20.65** |
| 0.01 μmol/L MeHg 组 | 10 | 106.82±15.53 | 110.95±22.62 | 123.01±34.74 | 125.92±26.53 | 127.57±42.93** |
| 0.1 μmol/L MeHg 组 | 10 | 118.50±19.17 | 121.90±19.13 | 143.55±29.29* | 199.43±36.81** | 239.41±36.92** |
| 1 μmol/L MeHg 组 | 10 | 123.37±21.13 | 169.08±21.01** | 247.08±36.75** | 401.51±70.52** | 468.49±58.19** |
| 2 μmol/L MeHg 组 | 10 | 143.81±21.55* | 192.67±29.66** | 272.55±40.34** | 478.09±43.77** | 516.35±69.88** |

注:与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01。

2.2 不同剂量 TP 预处理对神经元培养液 LDH 活力的影响

与 1 μmol/L MeHg 组相比, 给予 TP 预处理 1 h 后, 40 μmol/L TP 预处理组神经元培养液 LDH 活力有显著降低 (P<0.01); 给予 TP 预处理 3 h 后, 10 μmol/L TP 预处理组细胞培养液 LDH 活力明显下降

(P<0.05), 20、40 μmol/L TP 预处理组培养液 LDH 活力均显著降低 (P<0.01); 给予 TP 预处理 6 h 后, 10、20、40 μmol/L TP 预处理组细胞培养液 LDH 活力显著降低 (P<0.01)。在 TP 预处理 3 h 或 6 h 后, 20、40 μmol/L TP 预处理组之间的神经元培养液 LDH 活力未见明显差异。见表 2。

表 2 不同时间点各剂量 TP 预处理对神经元培养液 LDH 活力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

%对照

| 组别 | n | 0.5 h | 1 h | 3 h | 6 h |
|------------------------------|----|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 对照组 | 10 | 100.00±22.67 | 100.00±11.91 | 100.00±22.33 | 100.00±15.68 |
| 1 μmol/L MeHg 组 | 10 | 415.96±62.52** | 410.02±49.26** | 406.55±63.20** | 413.19±44.00** |
| 5 μmol/L TP+1 μmol/L MeHg 组 | 10 | 403.21±53.03 | 387.42±35.29 | 381.66±31.81 | 380.19±49.65 |
| 10 μmol/L TP+1 μmol/L MeHg 组 | 10 | 390.83±32.95 | 369.95±57.85 | 340.38±30.04# | 318.57±60.09### |
| 20 μmol/L TP+1 μmol/L MeHg 组 | 10 | 384.90±52.12 | 356.20±53.09 | 290.21±38.38## | 282.38±50.25### |
| 40 μmol/L TP+1 μmol/L MeHg 组 | 10 | 369.38±47.06 | 320.89±41.32### | 279.60±54.82### | 261.79±32.58### |

注:与对照组比较, **P<0.01; 与 1 μmol/L MeHg 组比较, #P<0.05, ###P<0.01。

2.3 各组神经元细胞凋亡率、NPSH 含量及 ROS 水平

与对照组相比, 1 μmol/L MeHg 组神经元凋亡率显著升高 (P<0.01), NPSH 含量显著降低 (P<0.01), ROS 水平显著升高 (P<0.01)。随着 TP 预处理剂量的增加, 神经元凋亡率逐渐降低, NPSH 含量逐渐升高, ROS 水平逐渐降低, 并呈现出剂量-效应关系, 与 1 μmol/L MeHg 组比较, 10 μmol/L TP 预处理组神经元凋亡率明显降低 (P<0.05), NPSH 含量明显升高 (P<0.05), ROS 水平明显降低 (P<0.05); 20 μmol/L TP 预处理组神经元凋亡率显著降低 (P<0.01), NPSH 含量显著升高 (P<0.01), ROS 水平显著降低 (P<0.01)。见表 3。

表 3 各组神经元细胞凋亡率、NPSH 含量及 ROS 水平 ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 凋亡率 (%) | NPSH 含量 [μmol/(L·100 mg pro)] | ROS 水平 (平均荧光强度) |
|------------------------------|---|--------------|-------------------------------|-----------------|
| 对照组 | 6 | 7.25±2.43 | 2.72±0.33 | 103.78±18.73 |
| 1 μmol/L MeHg 组 | 6 | 39.41±5.37** | 1.52±0.28** | 341.70±37.66** |
| 5 μmol/L TP+1 μmol/L MeHg 组 | 6 | 35.08±4.76 | 1.77±0.35 | 324.62±48.25 |
| 10 μmol/L TP+1 μmol/L MeHg 组 | 6 | 31.65±4.21# | 1.89±0.25# | 282.75±29.27# |
| 20 μmol/L TP+1 μmol/L MeHg 组 | 6 | 29.42±5.15## | 2.16±0.37## | 212.88±44.60### |

注:与对照组比较, **P<0.01; 与 1 μmol/L MeHg 组比较, #P<0.05, ##P<0.01。

2.4 各组神经元 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活力

与对照组相比, 1 μmol/L MeHg 组神经元 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活力均显著降低 (P<

0.01)。随着 TP 预处理剂量的增加, 神经元 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活力逐渐升高, 并呈现出一定的剂量-效应关系, 与 1 μmol/L MeHg 组比较, 10、20 μmol/L TP 预处理组神经元 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活力明显升高 (P<0.05 或 P<0.01)。见表 4。

表 4 各组神经元 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 的活力 ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | Na ⁺ -K ⁺ -ATPase [μmol/(h·mg pro)] | Ca ²⁺ -ATPase [μmol/(h·mg pro)] |
|------------------------------|---|---|--|
| 对照组 | 6 | 7.45±0.92 | 2.96±0.62 |
| 1 μmol/L MeHg 组 | 6 | 4.03±0.88** | 1.71±0.38** |
| 5 μmol/L TP+1 μmol/L MeHg 组 | 6 | 4.22±0.59 | 1.79±0.44 |
| 10 μmol/L TP+1 μmol/L MeHg 组 | 6 | 5.39±0.66# | 2.36±0.59# |
| 20 μmol/L TP+1 μmol/L MeHg 组 | 6 | 5.92±1.25## | 2.62±0.41### |

注:与对照组比较, **P<0.01; 与 1 μmol/L MeHg 组比较, #P<0.05, ##P<0.01。

3 讨论

本研究结果表明, MeHg 具有抑制神经细胞生长和存活的毒性作用。随着 MeHg 处理剂量和时间的增加, 培养液 LDH 漏出逐渐增加, 并呈剂量和时间依赖性的效应关系。当 MeHg 处理 12 h 后, 0.1、1、2 μmol/L MeHg 组神经元 LDH 活力均显著升高, 在 1、2 μmol/L MeHg 组呈现过度损伤表现。提示 MeHg 可能损伤神经元的线粒体, 从而引发毒性作用, 而 1 μmol/L 可能是 MeHg 导致神经元毒性的敏感剂量,

因此,我们选择 1 $\mu\text{mol/L}$ 暴露 6 h 作为 MeHg 处理的剂量和时间,进行后续指标的测定分析,观察不同剂量 TP 预处理对此剂量下 MeHg 毒性作用的保护作用。

细胞凋亡是一系列基因调控、自发性的细胞程序性死亡,是机体的一种自我调节过程^[8]。本实验中,MeHg 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 作用 6 h 后,能够抑制体外培养的神经元的存活,可能是 MeHg 诱导神经细胞凋亡和诱发神经细胞坏死共同作用的结果。而随着 TP 预处理浓度的升高,神经元的凋亡程度减轻。MeHg 染毒后,神经元中 NPSH 的含量显著降低,ROS 的含量显著升高,说明 MeHg 能够产生大量的自由基,并且抑制富含巯基的抗氧化物质,导致神经元氧化损伤。以 TP 预处理后,NPSH 含量显著升高,ROS 含量显著下降,并呈现剂量-效应关系。这可能与 TP 强大的抗氧化功能相关。一方面 TP 直接清除 ROS,降低了 MeHg 所致的神经元氧化损伤;另一方面,ROS 的含量下降,能够引起一系列的变化,导致各种清除 ROS 的酶的活性抑制被解除,释放 NPSH 合成的前体物质,增加 NPSH 的含量,从而减弱神经元的氧化损伤^[9]。

本实验发现,1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 组神经元 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力均显著降低。这可能由于 MeHg 产生自由基,抑制了线粒体呼吸链供能,从而导致 ATP 合成受阻;同时,MeHg 的亲巯基性与神经元细胞膜上的巯基蛋白结合使膜的流动性降低,通透性增强,造成生物膜 ATP 酶系普遍受到抑制^[10]。20 $\mu\text{mol/L}$ TP 预处理组神经元 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力均显著升高,可能是因 TP 清除自由基的作用降低了 MeHg 暴露所导致的神经元高水平的 ROS,拮抗神经元氧化损伤,而 ROS 水平的降低减弱了对细胞膜的损伤,同时减轻了对线粒体呼吸链合成 ATP 的抑制,使得 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$

的功能得到缓解。关于 TP 对 MeHg 所致神经毒性防护作用的具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Ceccatelli S, Dare E, Moors M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188 (2): 301-308.
- [2] Cavet M E, Harrington K L, Vollmer T R, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells [J]. *Mol Vis*, 2011 (17): 533-542.
- [3] 吴俊芳,刘恣.现代神经科学研究方法[M].北京:中国协和医科大学出版社,2006:11-12.
- [4] 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 Bcl-2 表达的研究[J].*中华老年心脑血管病杂志*,2004,6(2):123-125.
- [5] Ahamed M, Akhtar M J, Siddiqui M A, et al. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells [J]. *Toxicology*, 2011, 283 (2-3): 101-108.
- [6] Villalba M, Pereira R, Martinez-Serrano A, et al. Altered cell calcium regulation in synaptosomes and brain cells of the 30-month-old rat: prominent effects in hippocampus [J]. *Neurobiol Aging*, 1995, 16 (5): 809-816.
- [7] Carfagna M A, Ponsler G D, Muhoherac B B. Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals [J]. *Chem Biol Interact*, 1996, 100 (1): 53-65.
- [8] Kaur P, Aschner M, Syversen T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes [J]. *Neurotoxicology*, 2006, 27 (4): 492-500.
- [9] Jin X, Chan H M, Lok E, et al. Dietary fats modulate methylmercury-mediated systemic oxidative stress and oxidative DNA damage in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46 (5): 1706-1720.
- [10] Unichenko P, Myakhar O, Kirischuk S. Intracellular Na^+ concentration influences short-term plasticity of glutamate transporter-mediated currents in neocortical astrocytes [J]. *Glia*, 2012, 60 (4): 605-614.

(上接第 410 页)

参考文献:

- [1] Roth J A, Li Z, Sridhar S, et al. The effect of manganese on dopamine toxicity and dopamine transporter (DAT) in control and DAT transfected HEK cells [J]. *Neurotoxicology*, 2013, 35 (3): 121-128.
- [2] Lin T Y, Huang W J, Wu C C, et al. Acacetin inhibits glutamate release and prevents kainic acid-induced neurotoxicity in rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (2): e88644.
- [3] 徐斌,徐兆发,邓宇,等.锰对神经元细胞内钙稳态影响的研究[J].*中国工业医学杂志*,2010,23(2):83-85.
- [4] Xu B, Liu W, Deng Y, et al. Inhibition of calpain prevents manganese-induced cell injury and alpha-synuclein oligomerization in organotypic brain slice cultures [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (3): e0119205.
- [5] 王璨,徐斌,邓宇,等.锰对神经元细胞内 SNARE 复合物蛋白及突触囊泡的影响[J].*中国工业医学杂志*,2015,28(3):163-166.
- [6] Amaral E, Guatimosim S, Guatimosim C. Using the fluorescent styryl dye FM1-43 to visualize synaptic vesicles exocytosis and endocytosis in motor nerve terminals [J]. *Methods Mol Biol*, 2011 (689): 137-148.
- [7] Grumelli C, Berghuis P, Pozzi D, et al. Calpain activity contributes to the control of SNAP-25 levels in neurons [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2008, 39 (3): 314-323.
- [8] 魏晓珉,闫凤凤,鄂蒙,等.钙蛋白酶抑制剂对丙烯酰胺中毒大鼠神经毒性的拮抗作用[J].*环境与健康杂志*,2014,31(12):1045-1047.