文章编号:1000-5404(2007)09-0831-03

论著

鱼藤酮对大鼠纹状体谷氨酸转运体及谷氨酰胺合成酶的影响

刘 辉,李云鹏,董兆君 (第三军医大学军事预防医学院防化医学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究鱼藤酮染毒大鼠纹状体谷氨酸转运体表达及谷氨酰胺合成酶活性的变化。**方法** 应用HPLC荧光法检测鱼藤酮染毒大鼠纹状体谷氨酸(glutamate, Glu)浓度,RT-PCR与Western blot技术观察谷氨酸转运体基因及蛋白表达的变化,采用谷氨酰胺合成酶检测试剂盒观察其活性。**结果** 1.2 mg/kg鱼藤酮染毒大鼠纹状体Glu浓度明显升高,谷氨酸/天冬氨酸转运体(glutamate/aspartate transporter, GLAST)基因和蛋白表达均显著降低,而谷氨酸转运体-1(glutamate transporter-1, GLT-1)蛋白表达升高,谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)活性明显增强。**结论** GLAST表达下调可能是鱼藤酮诱导脑内谷氨酸含量增加的主要原因之一,而GLT-1上调及GS活性增强可能为神经细胞自我保护机制,以限制谷氨酸的神经毒作用。

关键词:鱼藤酮;GLAST;GLT-1;GS
中图法分类号:R322.81; R329.26; R595.4 **文献标识码**:A

Toxic effects of Rotenone on glutamate transporter and glutamine synthetase in rat brain

LIU Hui, LI Yun-peng, DONG Zhao-jun (Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the toxic effects of Rotenone on glutamate transporter and glutamine synthetase in rat brain. **Methods** The glutamate levels in the striatum of SD rats were detected by high performance liquid chromatography (HPLC), the expression of glutamate tansporter mRNA and proteins were detected by RT-PCR and Western blotting and the activity of glutamine synthetase was determined by using GS detect kit. **Results** Rotenone was shown to increase the release of glutamate in rat striatum, the expression of glutamate/aspartate transporter (GLAST) mRNA and protein decreased significantly in 0.6 mg/kg and 1.2 mg/kg Rotenone intoxicated groups, but the expression of GLT-1 and the activity of GS enhanced obviously. **Conclusion** Down-regulation of GLAST may be responsible for increased Glu level in rat brain induced by Rotenone, but the increased expression of GLT-1 and GS activity may represent a protective mechanism of the brain cells by limiting the neurotoxicity of Glu.

Key words: Rotenone; GLAST; GLT-1; GS

鱼藤酮(Rotenone)是一种广泛应用于农业生产的生物农药,其杀伤作用与其抑制线粒体功能有关。近年来大量研究证实,长期接触该类化合物可导致纹状体、黑质多巴胺神经元损伤,动物产生类似帕金森病(Parkinson's disease,PD)的症状,但其具体作用机制尚不完全清楚[1]。新近的研究表明,中枢兴奋性氨基酸递质如谷氨酸释放过多,并通过其受体介导的兴奋性毒性在PD的发生和发展过程中发挥了重要作用[2]。脑内谷氨酸转运体包括EAAT1(GLAST)、EAAT2(GLT-1)、EAAT3、EAAT4和EAAT5 5种亚型,其中,分布在星型胶质细胞上的GLAST与GLT-1以及谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)对维持体内Glu代谢平衡起重要作用[3]。本研究通过建立鱼藤酮大鼠中毒模型,观察鱼藤酮对大鼠纹状体Glu代谢、谷氨酸转运体表达及GS活性的影响,以期为探讨神经退行性疾病的发病机制提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

鱼藤酮(Sigma公司); Tripure(Roche公司); GLAST抗体(博士德公司);GLT-1抗体(Santa Cruz公司);邻苯二甲醛色谱纯(南京德宝生化);谷氨酰胺合成酶试剂盒(南京建成生物)。半干电转印仪(Bio-Rad公司); PCR仪(Eppendorf公司);高效液相色谱(日本岛津)。

作者简介:刘 辉(1974-),男,吉林省通化市人,博士,讲师,主要从事环境毒物神经毒理机制方面的研究。电话:(023)68752356
通讯作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2006-08-28;修回日期:2006-12-13

1.2 动物染毒模型

SD大鼠24只，雄性，体质量180～200 g，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。动物进入实验室检疫观察7 d后，分为正常对照、溶剂对照（二甲基亚砜）、0.6 mg/kg和1.2 mg/kg鱼藤酮中毒4个组，每组设6只动物，每日皮下注射鱼藤酮溶液，染毒时间为28 d。

1.3 HPLC荧光法检测纹状体Glu浓度

应用HPLC与荧光检测器联用的方法检测样品中Glu含量，具体操作参照文献[4]。染毒大鼠处死后取纹状体，以1∶9（质量体积分数）加入生理盐水，手动玻璃匀浆器冰浴匀浆，匀浆液在3 000 r/min低温离心15 min，取上清液0.5 ml，加1 mol/L $HClO_4$，10 000 r/min离心10 min，取0.5 ml上清液加入2 mol/L K_2CO_3 1 ml，10 000 r/min离心20 min，取上清液30 μl加入等体积邻苯二甲醛（OPA）衍生液，充分混匀，室温反应2 min进样。

1.4 RT-PCR检测GLAST和GLT-1 mRNA表达

实验大鼠活杀，取纹状体100 mg，按Tripure试剂说明书提取总RNA，PCR引物参照文献[5]设计，由上海英骏生物技术公司合成。设β-actin（211 bp）与GAPDH（542 bp）阳性产物为对照，GLAST和GLT-1扩增片段长度分别为572 bp和328 bp，GLAST：上游引物5′-GGGTTTTCATTGGAGGGTTGC-3′和下游引物5′-CCACGGGTTTCTCTGGTTCAT-3′；GLT-1：上游引物5′-GGGTCATCCTGGATGGAGGT-3′和下游引物5′-CGTGTCGTCATAAACGGACTG-3′。

采取GLAST与β-actin、GLT-1与GAPDH同管扩增的方法，PCR循环参数为：95 ℃预变性5 min后进入循环，95 ℃变性30 s，60 ℃复性30 s，72 ℃延伸45 s，循环30次，最后72 ℃额外延伸10 min。每一个样品采用3管平行扩增，并且重复1次。

1.5 Western blot检测GLAST和GLT-1蛋白表达

鱼藤酮染毒大鼠活杀取纹状体，置于预冷的组织蛋白提取液中匀浆，4 ℃、1 000 ×g离心15 min，弃沉淀，取上清液，再以4 ℃、17 600 ×g离心20 min，弃上清，沉淀以匀浆液稀释至适宜浓度，考马斯亮蓝试剂盒进行蛋白定量。经11% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后，采用半干电转移法转移蛋白至PVDF膜，PVDF膜用含5%脱脂奶粉的PBST封闭，4 ℃过夜，而后分别加入1∶400稀释的兔抗GLAST抗体和山羊GLT-1抗体，37 ℃孵育1 h，再分别与1∶1 500稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育3 h，同时加入1∶5 000稀释的内参照GAPDH，最后DAB溶液显色并用图像分析软件进行分析。

1.6 谷氨酰胺合成酶活性检测

实验操作参照谷氨酰胺合成酶（GS）试剂盒说明书。

1.7 统计学分析

实验数据用$x \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析和t检验。

2 结果

2.1 鱼藤酮对大鼠纹状体Glu浓度的影响

以浓度为0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 μmol/L谷氨酸标准品作标准曲线，正常对照组大鼠纹状体Glu浓度为（10.40 ± 1.16）μmol/g，0.6 mg/kg鱼藤酮染毒时纹状体Glu含量与对照组比较未见明显变化（$P > 0.05$），1.2 mg/kg鱼藤酮染毒组Glu浓度增加32.0%（$P < 0.01$）（表1）。

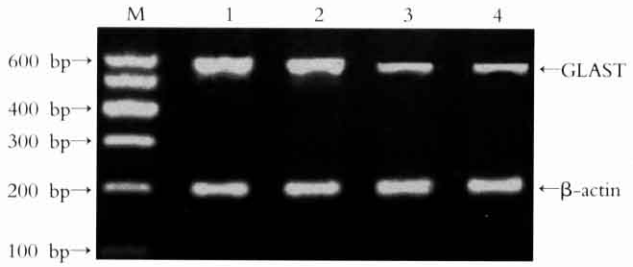
表1 鱼藤酮染毒大鼠纹状体Glu浓度及GS活性的变化（$n = 6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	Glu浓度（μmol/g）	GS活性（U/mg）
正常对照组	10.40 ± 1.16	164.27 ± 13.97
溶剂对照组	10.96 ± 1.32	167.72 ± 15.66
0.6 mg/kg鱼藤酮组	11.85 ± 1.18	181.94 ± 12.06[a]
1.2 mg/kg鱼藤酮组	13.73 ± 1.48[b]	189.98 ± 13.81[b]

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与正常对照组比较

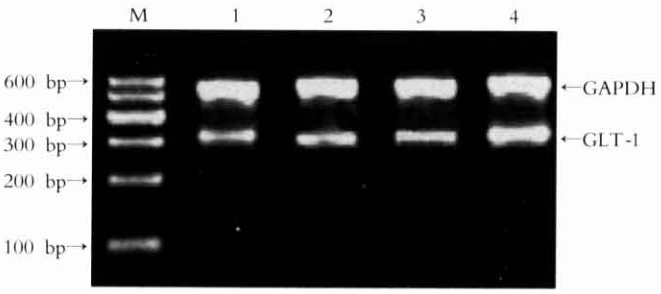
2.2 鱼藤酮对GLAST和GLT-1 mRNA表达的影响

与正常对照组相比，溶剂对照组GLAST和GLT-1表达未见明显改变（$P > 0.05$）；0.6 mg/kg和1.2 mg/kg鱼藤酮染毒大鼠GLAST mRNA表达分别降低18.6%（$P < 0.01$）和20.5%（$P < 0.01$）（图1）；而1.2 mg/kg鱼藤酮中毒组大鼠GLT-1表达却明显增强（图2）。



M：标准；1：正常对照组；2：溶剂对照组；3：0.6 mg/kg鱼藤酮组；4：1.2 mg/kg鱼藤酮组

图1 鱼藤酮对大鼠纹状体GLAST mRNA表达的影响



M：标准；1：正常对照组；2：溶剂对照组；3：0.6 mg/kg鱼藤酮组；4：1.2 mg/kg鱼藤酮组

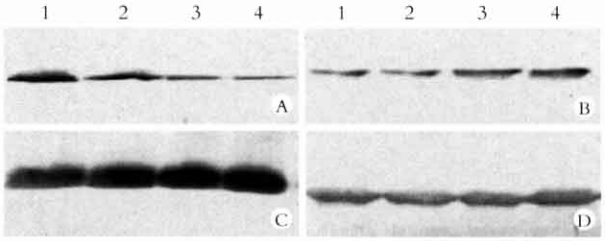
图2 鱼藤酮对大鼠纹状体GLT-1 mRNA表达的影响

2.3 鱼藤酮对GLAST和GLT-1蛋白表达的影响

与溶剂对照组比较，GLAST蛋白含量随鱼藤酮染毒剂量的增大而明显降低；而0.6 mg/kg和1.2 mg/kg鱼藤酮染毒组GLT-1蛋白含量分别增加12.6%（$P < 0.05$）和18.5%（$P < 0.01$）（图3）。

2.4 鱼藤酮对谷氨酰胺合成酶活性的影响

正常对照组大鼠GS活性约为（164.27 ± 13.97）U/mg，随鱼藤酮染毒浓度的增加GS活性明显升高，0.6 mg/kg和1.2 mg/kg鱼藤酮组GS活性分别为（181.94 ± 12.06）U/mg（$P < 0.05$）和（189.98 ± 13.81）U/mg（$P < 0.01$）（表1）。



A：GLAST；B：GLT-1；C、D：GAPDH；1：正常对照组；2：溶剂对照组；3：0.6 mg/kg 鱼藤酮组；4：1.2 mg/kg 鱼藤酮组

图 3　鱼藤酮对大鼠纹状体 GLAST 和 GLT-1 蛋白表达的影响

3　讨论

近年来研究表明，纹状体内 DA 的缺失并不是 PD 的唯一病理基础，脑内其他神经递质也可能参与 PD 的发病过程。其中，兴奋性氨基酸（如 Glu）与 PD 发生、发展的相关性已经成为研究热点之一[6]。

本实验结果显示，1.2 mg/kg 鱼藤酮染毒大鼠纹状体内 Glu 含量显著高于正常对照组（$P < 0.01$），组织间隙内 Glu 大量蓄积可能是导致神经元损伤的重要因素之一。而分布于神经细胞上的高亲和力谷氨酸转运体对 Glu 的再摄取是 Glu 递质灭活的主要途径，再摄取功能障碍无疑能加重 Glu 及其受体介导的兴奋性神经毒作用，导致神经退行性病变的发生与发展[7]。Rothstein 等[8]研究证实，分布在星型胶质细胞膜上的 GLAST 和 GLT-1 是脑内最重要的兴奋性氨基酸转运体，大部分胞外 Glu 通过两者的摄取作用进入胞内。Di-Monte 等[9]研究报道，线粒体抑制物 MPTP 导致细胞能量代谢障碍，从而损伤星型胶质细胞清除 Glu 的功能，张芸和孟长虹等[2,10]通过同位素实验发现，与鱼藤酮相类似的化合物 6-OHDA，能显著抑制纹状体突触小体和原代星型胶质细胞摄取 Glu 的能力。但该类化合物对 GLAST 和 GLT-1 等谷氨酸转运体基因和蛋白表达的影响，国内外少见报道。本研究显示：鱼藤酮可诱导大鼠纹状体 GLAST mRNA 表达下调，蛋白含量显著降低，其原因可能是鱼藤酮引发的神经细胞能量代谢障碍，导致胞膜上转运蛋白合成能力下降。由此我们推测，鱼藤酮所致 GLAST 表达下调可能是组织间隙 Glu 含量增加的主要原因之一。而分布在星型胶质细胞另一种谷氨酸转运体 GLT-1 基因及蛋白表达均明显增强，提示谷氨酸转运体各亚型的功能可能受不同机制调控，其具体调控机制有待深入研究。摄取进入星型胶质细胞内的 Glu 被 GS 迅速代谢为没有毒性的谷氨酰胺（Gln），并且释放进入细胞间隙，被神经元胞膜上的特异性转运体摄取，因此，GS 在 Glu 代谢中同样发挥重要作用。我们观察到 0.6 mg/kg 和 1.2 mg/kg 鱼藤酮中毒组大鼠 GS 活性均显著升高，此变化有助于加快突触间隙 Glu 降解为 Gln，可能是星型胶质细胞为保护神经元作出的反应。

综上所述，鱼藤酮通过影响谷氨酸转运体的表达及 GS 活性，增加脑内 Glu 释放，可能是其发挥神经毒性的重要机制之一。其结果提示：探索线粒体抑制类农药中毒条件下如何保护受损的星型胶质细胞（如加入外源性神经保护因子、BDNF 等），进而持续提高谷氨酸转运体及 GS 的表达和活性，对于保护中枢神经元可能具有重要意义。

参考文献：

[1] He Y, Imam S Z, Dong Z, *et al*. Role of nitric oxide in rotenone-induced nigro-striatal injury [J]. J Neurochem, 2003, 86(6): 1338 - 1345.

[2] 张　芸，丁建花，胡　刚. mGluRs 拮抗剂 SIB-1893 逆转 6-OHDA 抑制星形胶质细胞摄取谷氨酸的作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(1): 25 - 28.

[3] Camacho A, Massieu L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death[J]. Arch Med Res, 2006, 37(1): 11 - 18.

[4] 吴强恩，郑力行，谢　芳，等. 反相高效液相色谱荧光法测定大鼠脑组织中氨基酸类神经递质[J]. 复旦学报：医学版, 2005, 32(3): 355 - 358.

[5] Rauen Tm Wiessner M. Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST1 and GS [J]. Neurochem Int, 2000, 37(2 - 3): 179 - 189.

[6] Dervan A G, Meshul C K, Beales M, *et al*. Astroglial plasticity and glutamate function in a chronic mouse model of Parkinson's disease [J]. Exp Neurol, 2004, 190(1): 145 - 156.

[7] Otis T S, Brasnjo G, Dzubay J A, *et al*. Interactions between glutamate transporters and metabotropic glutamate receptors at excitatory synapses in the cerebellar cortex[J]. Neurochem Int, 2004, 45(4): 537 - 544.

[8] Rothstein J D, Dykes-Hoberg M, Pardo C A, *et al*. Knockout of glutamate transporters reveals a major role of astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate[J]. Neuron, 1996, 16(3): 675 - 686.

[9] Di-Monte D A, Tokar I, Langston J W. Impaired glutamate clearance as a consequence of energy failure caused by MPP(+) in astrocytic cultures[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1999, 158(3): 296 - 302.

[10] 孟长虹，丁建花，何海蓉，等. 6-羟基多巴的细胞毒作用与谷氨酸转运的关系[J]. 药学学报, 2003, 38(12): 885 - 888.

（编辑　陈聪连）