DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.026
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

文章编号:1000-5404(2004)22-2045-03

论著

鱼藤酮长期作用对大鼠纹状体单胺递质、NO和NOS的影响

吴 强[1],李云鹏[1],杨和平[2],乐 卫东[3],董兆君[1] (第三军医大学:[1]预防医学院军事毒理学教研室,[2]西南医院呼吸内科,重庆 400038;[3]Department of Neurology, Baylor College of Medicine, TX77030, USA)

提 要:目的 观察鱼藤酮长期作用对大鼠纹状体单胺递质和NOS/NO系统的变化规律。方法 Wistar大鼠每日皮下注射鱼藤酮90 d,于第30、60、90天处死动物,分离大鼠纹状体,分别以HPLC法和生化法测定其多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NA)、3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)、5-羟色胺(5-HT)、一氧化氮(NO)含量和一氧化氮合酶(NOS)活性。结果 在鱼藤酮中毒各时相点,大鼠纹状体单胺递质均出现不同程度的变化,以DA、DOPAC、5-HT含量改变尤为明显;纹状体NO含量和NOS活性均明显升高,且中毒剂量越大、中毒时间越长NO、NOS升高越明显。结论 纹状体单胺递质代谢紊乱和NOS/NO系统改变在鱼藤酮长期作用引起的中枢DA神经损伤中起重要作用。

关键词:纹状体;单胺递质;一氧化氮;一氧化氮合酶
中图法分类号:R322.81;R34;R979.8 文献标识码:A

Effects of long-term rotenone intoxication on the monoamine neurotransmitters, NO, and NOS in rat striatum

WU Qiang[1], LI Yun-peng[1], YANG He-ping[2], LE Wei-dong[3], DONG Zhao-jun[1] ([1]Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, [2]Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [3]Department of Neurology, Baylor College of Medicine, TX77030, USA)

Abstract: Objective To observe the changes of monoamines, nitric oxide (NO), and nitric oxide synthase (NOS) in rat striatum induced by long-term rotenone intoxication. Methods Wistar rats were daily administrated with rotenone at the doses of 0.335, 0.670, and 1.005 mg/kg (sc). Animals were sacrificed on days 30, 60 and 90. High performance liquid chromatography (HPLC) and photoelectric colorimetry were used to determine the concentrations of noradrenaline (NA), dopamine (DA), dihydroxyphenylaceticacid (DOPAC), 5-hydroxytryptamine (5-HT), NOS, and NO in the striatum, respectively. Results At each time point, rotenone induced significant changes of monoamines at various levels, especially the contents of DA, DOPAC, and 5-HT in the rat striatum. NO concentration and NOS activity in rat striatum increased remarkably in dose- and time-dependent manners. Conclusion The metabolic disturbance of monoamine neurotransmitters and NOS/NO system in the rat striatum plays an important role in the central DA nerve injury induced by long-term rotenone intoxication.

Keywords: striatum; monoamine; nitric oxide; nitric oxide synthase

化学污染是目前人类生活环境污染的主要问题,而为数不少的化学污染物对线粒体功能有强烈的干扰作用,氰化物、鱼藤酮即属此类化合物。鱼藤酮是新型的线粒体抑制类农药,抑制体内线粒体呼吸链NADH脱氢酶是其主要杀虫机制,既往认为该类化合物对人类的健康无明显毒副作用。而新近研究结果显示,长期接触该类化合物可导致中枢多巴胺(dopamine, DA)神经元损伤,黑质纹状体DA神经元有明显的退行性变,神经细胞内出现路易小体,动物出现震颤、步态不稳等症状[1]。我室前期研究也发现[2],小剂量鱼藤酮长期中毒可导致大鼠的神经行为改变,且鱼藤酮在脑组织的分布呈现一定的蓄积作用。这些结果均提示,鱼藤酮对神经系统具有远期危害作用,但其损伤机制目前还不清楚。本研究通过观察鱼藤酮长期作用大鼠纹状体多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)等单胺神经递质、一氧化氮(nitric oxide, NO)含量和一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)活性的变化情况,拟进一步探讨鱼藤酮长期作用对多

作者简介:吴 强(1971—),男,四川省成都市人,硕士,讲师,主要从事神经毒理学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752356
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2004-07-10;修回日期:2004-09-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

巴胺神经元神经递质的影响特点，以期为阐明鱼藤酮对多巴胺神经的损伤机制及其防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品和仪器

鱼藤酮(rotenone)，去甲肾上腺素(NA)，多巴胺(DA)，3，4-二羟基苯乙酸(DOPAC)，5-羟色胺(5-HT)，均购自 Sigma 公司，其它试剂为国产分析纯。鱼藤酮以二甲基亚砜溶解后加入等量 10%聚乙二醇，NOS 和 NO 检测试剂盒购自南京建成生物公司。高效液相色谱仪为 Waters 公司产品，连接 C18 柱和紫外检测器或电化学检测器(ESA Coulochem Ⅱ)。

1.2 动物分组

Wistar 大鼠 72 只，体质量 150～180 g，由第三军医大学实验动物中心提供，进入实验室检疫观察 7 d 后用于实验。动物饲养室温度控制在(23±3)℃，光/暗周期为 14/10 h。实验动物随机分为溶剂对照组和鱼藤酮中毒Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组 4 个实验组每组 6 只，每组设 30、60、90 d 3 个时相点。鱼藤酮中毒各组大鼠每日皮下注射鱼藤酮 0.335 mg/kg(0.093 LD_{50})、0.670 mg/kg(0.186 LD_{50})和 1.005 mg/kg(0.279 LD_{50})，对照组注射等体积的溶剂(二甲基亚砜)，以上各组动物在末次给药后 1 h 处死取材。

1.3 实验方法和技术

1.3.1 纹状体单胺类递质含量测定 参照文献[3]的方法进行。大鼠断头处死，在冰盘上迅速分离纹状体。加 0.1 mol/L 高氯酸制成匀浆(1 mg 组织加 20 μl 高氯酸水溶液)，以 18 000 r/min，4 ℃离心 20 min，取上清液 20 μl 进行色谱分析。实验条件如下，材料：Hypersil C18；流速：0.9 ml/min；流动相：0.05 mol/L KH_2PO_4，pH 3.0；压力：10.0 Mpa；柱长：250 mm；直径：4.6 mm；进样量：20 μl。

1.3.2 NO 含量和 NOS 活性测定 按上述方法分离脑组织，以冰冷的生理盐水制备组织匀浆。将匀浆分成 2 份，分别用于 NO 含量和 NOS 活性测定。测定方法按照试剂盒说明进行，Lowry 法蛋白定量。

1.4 统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件行析因单因素方差分析。

2 结果

2.1 鱼藤酮长期作用对大鼠纹状体单胺递质含量的影响

HPLC 检测结果显示，鱼藤酮中毒后大鼠纹状体单胺递质均出现不同程度的变化，以 DA、DOPAC 和 5-HT 含量变化更为显著，鱼藤酮中毒各组 NA 含量均有不同程度的降低，但仅中剂量和高剂量组中毒 30 d 与溶剂对照相比有显著性差异，而溶剂对照各组单胺含量均无明显变化；与对照组相比，鱼藤酮中毒各实验组 DA 和 DOPAC 含量均出现了显著性下降($P<0.01$)，中毒 30 d 各剂量组 DA 和 DOPAC 含量分别为对照组的 62.94%、41.35%、33.82%和 45.24%、42.17%、39.63%，至中毒 90 d 二者含量分别为对照组的 42.75%、35.87%、17.72%和 46.91%、32.47%、34.10%；鱼藤酮中毒各实验组 5-HT 也出现不同程度的降低，且中剂量和高剂量组 5-HT 含量与对照相比有非常显著差异($P<0.01$)，至中毒 90 d，各剂量组 5-HT 含量分别为对照组的 64.33%、73.94%和 79.89%(表 1)。

表 1 鱼藤酮长期作用对大鼠纹状体单胺递质含量的影响($n=6$，$\bar{x}\pm s$，pg/mg)

Fig 1 Effects of long-term rotenone intoxication on the contents of monoamines of rat striatum ($n=6$, $\bar{x}\pm s$, pg/mg)

Dose (mg/kg)	Time		
	30 d	60 d	90 d
NA			
Control	534.69±43.32	551.58±31.86	547.84±41.23
0.335	406.71±39.77	407.86±28.28	422.69±33.38
0.670	340.13±25.72 *	406.93±33.00	410.68±31.47
1.005	329.02±10.05 **	410.84±16.16	390.94±25.71
DA			
Control	6239.27±173.71	6649.20±79.25	6344.60±200.62
0.335	3927.49±43.85 **	3285.63±350.96 **	2712.64±91.00 **
0.670	2579.69±33.44 **	2403.04±14.13 **	2275.87±60.94 **
1.005	2110.08±113.17 **	1535.06±244.73 **	1124.67±120.18 **
DOPAC			
Control	1867.32±193.80	1756.89±83.08	1868.19±146.66
0.335	844.71±92.04 **	812.93±71.87 **	876.36±26.21 **
0.670	787.45±86.33 **	748.48±17.24 **	606.60±48.29 **
1.005	740.09±73.67 **	589.64±91.40 **	637.01±51.08 **
5-HT			
Control	432.35±13.06	419.34±17.82	421.80±23.21
0.335	425.29±24.49	393.36±14.16	271.35±18.96 **
0.670	367.74±22.99 **	342.93±36.54 *	311.87±21.46 **
1.005	238.12±19.42 **	343.96±34.56 *	336.99±13.55 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

2.2 鱼藤酮长期作用对大鼠纹状体 NO 含量的影响

检测结果显示，鱼藤酮中毒各实验组大鼠纹状体脑组织 NO 水平，除低剂量 30 d 中毒组与对照无显著差异外，其它各组纹状体 NO 与对照组相比均出现显著性升高($P<0.01$)，且中毒剂量越大、中毒时间越长 NO 水平升高越明显。鱼藤酮 1.005 mg/kg 中毒组在染毒后 30、60 和 90 d 的 NO 含量分别为(86.27±12.79)、(116.83±17.96)和(154.05±17.84) μmol/g，是溶剂对照组的 167.84%、241.53%和 306.20%(表 2)。

表 2 鱼藤酮长期作用对大鼠纹状体 NO 含量的影响($n=6$，$\bar{x}\pm s$，μmol/g)

Fig 2 Effects of long-term rotenone intoxication on the contents of NO in rat striatum ($n=6$, $\bar{x}\pm s$, μmol/g)

Dose (mg/kg)	Time		
	30 d	60 d	90 d
Control	51.04±15.74	48.37±12.85	50.31±13.06
0.335	57.03±15.3	64.73±15.28 **	96.64±16.45 **
0.670	74.57±16.66 **	82.15±17.37 **	110.86±25.91 **
1.005	86.27±12.79 **	116.83±17.96 **	154.05±17.84 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　鱼藤酮长期作用对大鼠纹状体 NOS 活性的影响

纹状体NOS 检测结果显示, 鱼藤酮中毒各实验组大鼠纹状体脑组织 NOS 活性均明显增加, 且中毒剂量越大、中毒时间越长NOS 活性增加越明显。鱼藤酮 1.005 mg/kg 中毒组在染毒后 30、60 和 90 d 的 NOS 活性分别为: (16.38±2.2)、(18.66±1.97) 和(22.16±3.74) μmol/g, 是溶剂对照组的 166.29%、196.01% 和 223.61% (表 3)。

表 3　鱼藤酮长期作用对大鼠纹状体 NOS 活性的影响 (n=6, $\bar{x}\pm s$, μmol/g)

Fig 3　Effects of long-term rotenone intoxication on the activity of NOS in rat striatum (n=6, $\bar{x}\pm s$, μmol/g)

Dose (mg/kg)	Time		
	30 d	60 d	90 d
Control	9.85±1.04	9.52±0.75	9.91±0.93
0.335	11.88±1.01 *	13.83±1.77 **	15.52±2.20 **
0.670	12.89±0.84 **	16.58±1.31 **	20.48±3.77 **
1.005	16.38±1.16 **	18.66±1.97 **	22.16±3.74 **

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$, *vs* control

3　讨论

人类生活环境中存在为数众多的化学污染物, 不少具有线粒体功能干扰作用, 如氢氰酸、氰化钠、鱼藤酮等均属此类。帕金森症(parkinsons disease, PD)是以中脑 DA 神经元进行性退变为主要病理特征的老年性疾病, 大多数散在患者的病因迄今尚不明了, 环境因素一直是人们关注的焦点[4]。鱼藤酮脂溶性很强, 对血脑屏障有较好的穿透能力, 易于透过生物膜, 进入中枢后迅速与 DA 神经元结合, 并特异性地抑制线粒体复合物Ⅰ并使之失活, 从而导致 DA 神经元对氧的利用障碍, 致使能量产生不足, 从而导致神经元受损。

神经行为的变化是以神经递质的变化为基础, 中枢多巴胺神经递质很多, DA、5-HT 属于单胺类神经递质, DOPAC 是 DA 在脑内经过单胺氧化酶氧化脱氨形成的。文献[5]报道, 小鼠急性和亚急性鱼藤酮皮下中毒不影响纹状体 DA 含量; He 等[6]采用 SD 大鼠以鱼藤酮 2 mg/kg 的剂量, 每天分别于 7:00、13:00 和20:00 时分 3 次腹腔注射鱼藤酮 40 d, 发现鱼藤酮中毒大鼠 DA 含量明显减少, 但DOPAC、HVA、5-HT 及 NA 含量无显著性改变。本研究显示, 鱼藤酮长期作用对大鼠纹状体单胺递质有广泛的影响, 表现为含量降低, 以 DA、DOPAC 和 5-HT 变化较为显著, 且与中毒剂量和中毒时间有一定的依赖关系, 可见鱼藤酮长期中毒对中枢单胺神经递质的影响主要表现为 DA 及其代谢产物的改变, 这种影响包括 DA 的合成与代谢。实验结果与上述文献报道不完全一致, 我们分析这可能与实验中动物的种属、年龄、给药途径不同及所采用的检测方法的差异有一定关系。

NO 作为一种新型的神经递质, 可通过对多种酶和受体的化学修饰而发挥许多重要的生理和病理效应。NO 的这种"双面刀"效应, 同样在神经退变(Neurodegeneration)的发生发展过程中起重要作用[7]。那么在鱼藤酮中毒中枢 DA 神经损伤中 NO 含量变化如何? 担任怎样的角色? 目前并不十分清楚? 我们利用鱼藤酮长期作用大鼠模型探讨了慢性鱼藤酮中毒纹状体 NOS/NO 系统的变化特点, 由表 2 和表 3 列出的数据可以看出: 鱼藤酮长期作用对纹状体 NOS 和 NO 水平有广泛的影响, 且同一时相点大鼠纹状体 NO 含量和 NOS 活性随鱼藤酮中毒剂量的增加而增加; 对于同一中毒剂量的动物, 纹状体 NOS 和 NO 水平随中毒时间的延长而升高? 说明 NOS/NO 系统的变化与鱼藤酮的剂量和接触时间有一定的依赖关系, 其性质尚待进一步研究分析? 此外, 我们利用细胞模型研究中发现[8], NOS 特异性拮抗剂——L-NAME, 可显著改善鱼藤酮对 PC12 细胞的毒性作用, 结合此次研究结果, 推测 NOS/NO 系统在鱼藤酮的毒性作用中发挥了重要角色。

综合分析上述结果认为, 鱼藤酮长期作用可引起纹状体 DA 的代谢紊乱, NOS/NO 系统在鱼藤酮引起的中枢 DA 神经损伤中起重要作用。

参考文献:

[1] 董兆君. 鱼藤酮的多巴胺神经元毒性与帕金森氏病[J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 2001, 28(5): 357－360.

[2] 李云鹏, 董兆君, 王仕丽, 等. 重复注射鱼藤酮对中枢多巴胺神经元的毒性作用[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(13): 1123－1126.

[3] 叶淮泠. 用高效液相电化学检测法快速、灵敏分析生物样本中的单胺类递质及其代谢产物[J]. 生理学报, 1987, 39(4): 412－419.

[4] Betarbet R, Sherer T B, Mackenzie G, *et al*. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease [J]. Nat Neurosci, 2000, 3(12): 1301－1306.

[5] Thiffault C, Langston J W, Di Monte D A. Increased striatal dopamine turnover following acute administration of rotenone to mice [J]. Brain Res, 2000, 885(2): 283－288.

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

[7] Calabrese V, Bates T E, Stella A M. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance [J]. Neurochem Res, 2000, 25(9-10): 1315－1341.

[8] 李云鹏, 董兆君, 曾　惠, 等. 一氧化氮在鱼藤酮诱导的 PC12 细胞凋亡中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(9): 759－762.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net