DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.006
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)13-1131-03

论著

鱼藤酮对大鼠尾核及血浆中NOS活性和NO含量的影响

李云鹏[1],董兆君[1],杨 书[2] ([1]第三军医大学预防医学系军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]第三军医大学成都军医学院军事医学教研室,成都 610083)

提 要:目的 研究鱼藤酮慢性中毒大鼠尾核脑区及血浆的一氧化氮(NO)含量和一氧化氮合成酶(NOS)活性的变化规律。方法 Wistar大鼠每日皮下注射0.335、0.670、1.005 mg/kg鱼藤酮共90 d。于30、60、90 d处死动物,分离血浆和尾核脑组织,以生化方法测定NOS活性和NO含量。结果 在鱼藤酮中毒30、60、90 d 3个时相点,大鼠血浆和尾核脑组织中NOS活性和NO含量增加,增加程度因中毒剂量的提高而升高、随中毒时间的延长而升高。结论 长期接触鱼藤酮导致血浆和尾核脑组织NOS活性和NO含量升高。

关键词:鱼藤酮;一氧化氮;一氧化氮合成酶;尾核;血浆;大鼠
中图法分类号:R446.11;R446.14;R995 文献标识码:A

Effects of rotenone on NOS activity and NO concentration in caudatum and plasma in rats

LI Yun-peng, DONG Zhao-jun, YANG Shu (Department of Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the rotenone-induced changes of nitric oxide (NO) concentration and nitric oxide synthase (NOS) activity in rat caudate nuclei and blood plasma. **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. The NO concentration and the NOS activity in the caudate nuclei and blood plasma were determined by biochemical methods. **Results** At each time point of days 30, 60 and 90, rotenone induced significant increases in NO concentration and NOS activity in both the caudate nuclei and blood plasma in dose- and time-dependent manners. **Conclusion** Long-term exposure to rotenone leads to the increase of nitric oxide and nitric oxide synthase in brain tissues and blood plasma in rat.

Key words: rotenone; nitric oxide; nitric oxide synthase; caudatum; plasma

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(Rotenone)等均属此类。鱼藤酮是一种由醉鱼科植物毛鱼藤(Derris)的胶状液汁提取的化学物质,因其为自然存在物(Nature occurring substance),自20世纪40年代以来一直被视为最安全有效的杀虫剂而广泛应用于农业除害[1]。鱼藤酮脂溶性很强,对血脑屏障有较好的穿透能力。进入中枢的鱼藤酮很快与神经细胞结合,并选择性地抑制线粒体的电子传递链NADH脱氢酶活性[2],故而导致细胞对氧的利用障碍和能量产生不足。此作用与MPTP(N-methyl-4-phenyl-tetrahydropyridine)相似,后者也有线粒体NADH脱氢酶抑制作用,长期使用可引起帕金森病(Parkinson disease, PD)样症状。文献[3]报道,大剂量鱼藤酮静脉灌注,使大鼠纹状体多巴胺(Dopamine, DA)神经元数目减少,细胞内出现Lewy小体,其机制尚不清楚。本研究采用小剂量重复给药的方法,探讨长期接触鱼藤酮对大鼠外周血和尾核脑区内NOS活性和NO含量的影响,期望为阐明鱼藤酮的多巴胺神经毒性作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

NOS检测试剂盒和NO检测试剂盒购自南京建成生物公司。二甲亚砜、聚乙二醇和鱼藤酮为Sigma公司产品。其他试剂为国产分析纯。

1.2 鱼藤酮皮下中毒LD_{50}测定

体质量为200~220 g Wistar大鼠56只,雌雄各半,由第三军医大学实验动物中心提供。将动物随机分组,每组8只。按照等比法设立7个鱼藤酮剂量(mg/kg)组:8.45、6.50、5.00、

基金项目:重庆市科学研究基金课题(2000)
作者简介:李云鹏(1971-),男,陕西省安康市人,硕士研究生,助理实验师,主要从事神经毒理学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752285
收稿日期:2003-03-12;修回日期:2003-04-26

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

3.85、2.98、2.30和1.77。大鼠皮下注射给药后观察48 h，记录动物存活率并计算 LD_{50} 值及其95%可信限。

1.3 NOS活性测定和NO含量测定

1.3.1 实验设计和动物分组 Wistar大鼠72只，体质量150～180 g，雌雄兼有，购自第三军医大学实验动物中心。将动物随机分为4组，分别为对照组Ⅰ和鱼藤酮Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ等3个剂量中毒组，见表1。对照组动物每日皮下注射对照溶液，组分为等体积的二甲亚砜∶聚乙二醇∶蒸馏水混合液。鱼藤酮中毒组动物每日皮下注射鱼藤酮溶液，剂量见表1。鱼藤酮以对照溶液稀释。以上各组大鼠均在末次给药后1 h迅速活杀取材。

表1 实验设计

Tab 1 Design of experiment

Group	30 days				60 days				90 days			
	n	Treatment	Parameters		n	Treatment	Parameters		n	Treatment	Parameters	
			Blood	Caudate			Blood	Caudate			Blood	Caudate
Ⅰ	6	Control Solution	NO NOS	NO NOS	6	Control Solution	NO NOS	NO NOS	6	Control Solution	NO NOS	NO NOS
Ⅱ	6	Rotenone 0.335 mg/kg	NO NOS	NO NOS	6	Rotenone 0.335 mg/kg	NO NOS	NO NOS	6	Rotenone 0.335 mg/kg	NO NOS	NO NOS
Ⅱ	6	Rotenone 0.670 mg/kg	NO NOS	NO NOS	6	Rotenone 0.670 mg/kg	NO NOS	NO NOS	6	Rotenone 0.670 mg/kg	NO NOS	NO NOS
Ⅳ	6	Rotenone 1.005 mg/kg	NO NOS	NO NOS	6	Rotenone 1.005 mg/kg	NO NOS	NO NOS	6	Rotenone 1.005 mg/kg	NO NOS	NO NOS

1.3.2 血浆NOS活性和NO含量测定 以颈椎脱臼法处死动物，迅速剪断颈动脉，采集血液入肝素抗凝管，3 000 r/min离心10 min。取200 μl血浆用于NOS活性测定，100 μl用于一氧化氮含量测定。测定方法按照试剂盒说明进行。

1.3.3 尾核脑组织NOS活性和NO含量测定 按照上述方法处死动物。将动物置冰盘上迅速开颅取脑，沿矢状逢将脑切分为左右两半，分离两侧尾状核。将尾核合并称重后，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NOS活性和NO含量测定。蛋白含量用Lowry法测定。

1.4 统计学处理

血浆和脑组织NOS活性分别以U/ml和U/mg表示，血浆和脑组织NO分别以μmol/L和μmol/g表示。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 鱼藤酮皮下中毒 LD_{50}

鱼藤酮中毒各剂量组的动物死亡情况见表2。根据动物死亡率计算得鱼藤酮急性皮下中毒 LD_{50} 值为3.601 mg/kg，LD_{50} 的95%可信限为2.771～4.678 mg/kg。

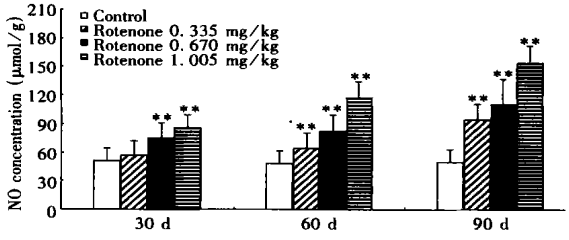
表2 鱼藤酮中毒大鼠死亡情况

Tab 2 Death rate of the rats administrated with rotenone

Rotenone doses(mg/kg)	Total	Survived	Dead	Death rate(%)
8.45	8	0	8	100
6.50	8	2	6	75
5.00	8	2	6	75
3.85	8	4	4	50
2.98	8	4	4	50
2.30	8	6	2	25
1.77	8	0	0	0

2.2 鱼藤酮中毒大鼠尾核NO含量变化

以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}）剂量鱼藤酮为大鼠每日皮下注射中毒，于30、60 d和90 d测得血浆NO含量，见图1。中毒30 d，除0.335 mg/kg剂量组与对照无显著差异外，其他各组大鼠尾核脑区NO浓度均比对照组显著升高（$P<0.01$）。中毒60 d和90 d各组均高于对照组。鱼藤酮中毒各时相点大鼠尾核脑区的NO水平，随中毒剂量的增加而升高。



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

图1 鱼藤酮中毒大鼠尾核一氧化氮含量的改变（$n=6$）

Fig 1 Effect of rotenone administration on NO concentration in caudate tissue in rats（$n=6$）

2.3 鱼藤酮中毒大鼠血浆一氧化氮含量变化

表3显示各时相点大鼠血浆一氧化氮含量变化。与对照组比较，第30天0.335、0.670、1.005 mg/kg组NO含量分别增加了15.58%、25.44%（$P<0.01$）和37.74%（$P<0.01$）。而第90天，各中毒组血浆NO含量分别增加了63.23%（$P<0.01$）、88.14%（$P<0.01$）和152.7%（$P<0.01$）。

表3 鱼藤酮对大鼠血浆NO含量的影响（C_{NO}/μmol·L^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Effect of rotenone on NO concentration in blood plasma in rats（C_{NO}/μmol·L^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

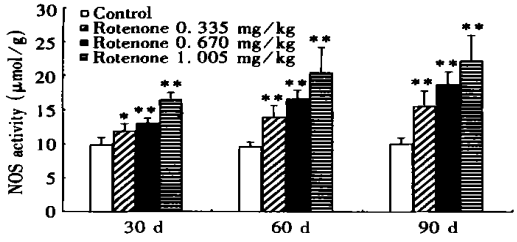
Group	n	Time of inject rotenone		
		Day 30	Day 60	Day 90
Control	6	47.95±8.51	44.28±9.90	45.12±5.90
Rotenone (mg/kg)				
0.335	6	55.42±9.65	67.39±8.65*	73.65±7.31**
0.670	6	60.15±7.60**	74.57±4.31**	84.89±9.08**
1.005	6	66.05±6.27**	92.51±7.16**	114.82±11.42**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

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

2.4　鱼藤酮中毒大鼠尾核脑组织 NOS 活性变化

鱼藤酮中毒 30 d, 各剂量组大鼠尾核脑组织 NOS 活性均明显升高, 中毒 60 d 和 90 d 亦然。各时相点的 NOS 活性均随鱼藤酮剂量的增加而增加。而同一剂量鱼藤酮中毒动物, 在各时相点的NOS 活性不同, 1.005 mg/kg 组, 在 30、60 d 和 90 d 的NOS 活性分别为(16.38±2.2)、(18.66±1.97)、(22.16±3.74)μmol/g, 有随中毒时间延长而增加的趋势, 见图 2。



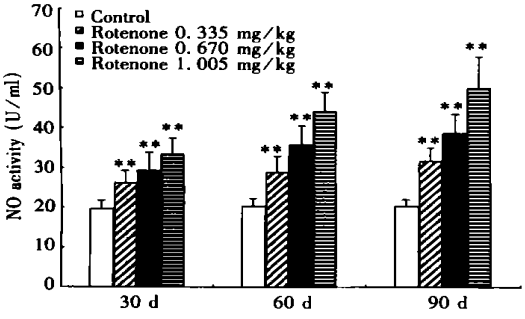
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

图 2　鱼藤酮中毒大鼠尾核一氧化氮合酶活性改变($n=6$)

Fig 2　Changes of NOS activity in caudate tissue in rats ($n=6$)

2.5　鱼藤酮中毒大鼠血浆一氧化氮合酶活性变化

图 3 所示为大鼠血浆 NOS 活性的变化。在 60 d 时相点, 对照组大鼠血浆 NOS 活性为(20.36±1.88) U/ml, 0.335、0.670 和 1.005 mg/kg 鱼藤酮中毒组大鼠血浆 NOS 活性分别为(28.81±4.47)、(35.63±4.85)和(44.19±4.92) U/ml, 与对照组比较相差非常显著($P<0.01$)。30 d 和 90 d 的NOS 活性变化趋势与 60 d 相似。



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

图 3　鱼藤酮中毒大鼠血浆 NOS 活性改变($n=6$)

Fig 3　The change of NOS activity in rat plasma ($n=6$)

3　讨论

PD 是以中脑多巴胺(Dopamine, 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]。文献[3]报道, 大鼠持续灌注鱼藤酮, 可使黑质 DA 神经元内出现 Lewy 小体, 但小剂量长期暴露鱼藤酮对中枢 DA 神经结构和功能的作用, 国内外未见报道。文献指出, NO 含量的变化与神经元损伤有密切的关系, 鱼藤酮对中枢 DA 神经损伤是否与 NO 含量变化有关也不清楚。本研究采用小剂量鱼藤酮持续暴露模型, 研究鱼藤酮对中枢 NO 含量的影响。实验结果证实, 大鼠皮下注射中毒的 LD_{50} 为 3.601 mg/kg, LD_{50} 的 95% 可信限为 2.771～4.678 mg/kg。Betarbet 等[3] 为大鼠持续灌注鱼藤酮, 其最大剂量高达 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}, 实际接触量为 LD_{50} 的 3.943 倍, 如此大剂量的持续暴露, 在人类生活中很少发生。

本实验中所用鱼藤酮剂量仅有 0.093～0.279 LD_{50}, 旨在探讨小剂量鱼藤酮长期暴露对 NO 和 NOS 的影响。结果证实, 小剂量鱼藤酮长期暴露, 使血液及脑组织一氧化氮合成酶活性和一氧化氮含量明显升高。第 60 天对照组大鼠 NO 含量为(48.37±7.85) μmol/g, 0.335、0.670 和 1.005 mg/kg 鱼藤酮中毒组的 NO 含量分别比对照组增加了 33.8%、71.08% 和 141.5%。第 30 天和第 90 天的情况亦然。说明小剂量鱼藤酮持续暴露, 可使血浆和脑组织中 NO 含量明显升高, 同时 NOS 活性也显著加强。

鱼藤酮对 NOS 活性和 NO 含量的影响具有明显的剂量和时间依赖趋势。由图 1～3 和表 3 数据可以看出, 同一时相点大鼠血浆和尾核脑组织 NOS 活性和 NO 含量随鱼藤酮中毒剂量的增加而增加。而在同一鱼藤酮剂量中毒动物, 血浆和尾核 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使用时间有一定的依赖关系, 其性质尚待研究分析。

我们的研究[5] 业已证实, 小剂量鱼藤酮注射 20 d 和 40 d, 大鼠纹状体内 DA 及其代谢产物 DOPAC 含量均明显下降, 阿扑吗啡诱导的小鼠定型行为显著降低, 提示小剂量鱼藤酮可损伤中枢 DA 神经功能。一氧化氮具有"双面刀"效应, 在神经退变(Neurodegeneration)的发生发展过程中起重要作用[6]。综合分析上述结果认为, 过量的一氧化氮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] Helmuth L. Neuroscience. Pesticide causes Parkinson's in rats[J]. Science, 2000, 290(5 494): 1068

[2] Ernster L, Dallner G. Azzone G F. Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer[J]. J Biol Chem, 1963, 238(3): 1124－1131.

[3] 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

[4] Tanner C M, Goldman S M. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. Neurol Clin, 1996, 14(2): 317－335.

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

[6] 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.

(编辑　汪勤俭)

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