DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.018

偏二甲基肼急性中毒对大鼠脑组织γ-氨基丁酸和谷氨酸的影响

龙冬梅* 高 宁 曹 波 赵 青 胡 冉 (第三军医大学预防医学系环境卫生学教研室) 重庆, 630038

提 要 目的: 从神经递质方面研究偏二甲基肼(UDMH)经非暴露式气管染毒急性中毒的生化机理。方法: Wistar大鼠分为正常对照组和低、中、高3个剂量组(染毒剂量分别为80、160、240 mg/kg),分3个染毒时相点即30、60和90 min,测定大鼠脑中γ-氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(Glu)含量和谷氨酸脱羧酶(GAD)、γ-氨基丁酸转氨酶(GABA-T)活性。结果: (1)各剂量组GABA含量和GAD活性明显低于对照组($P < 0.01$),且存在一定的量效和时效关系。(2)高剂量组GABA-T活性低于对照组($P < 0.05$)。(3)中、高剂量组Glu含量明显高于对照组($P < 0.01$)。结论: UDMH引起中枢神经系统中毒症状主要是由于GAD活性降低引起GABA含量降低所致。可能还与Glu含量升高有关。

关键词 偏二甲基肼;神经递质;神经毒性
中图法分类号 R994.6

偏二甲基肼(1,1-dimethylhydrazine, UDMH)是我国火箭推进剂的主要成分之一,应用于许多领域。随着其越来越广泛的使用,可能引起环境污染。另外,在生产、研究、使用的过程中曾多次发生急性中毒事件。因此进一步研究其急性中毒机理具有极其重要的意义。50~60年代国内外学者对UDMH的急性中毒机理研究表明,该化合物是中枢神经系统兴奋剂,具有神经毒性。关于UDMH急性中毒致痉的生化机理还不十分清楚,有不同的见解[1]。因此,本实验从神经递质的角度探讨UDMH急性中毒的生化机理,为今后全面深入研究UDMH急性中毒机理及救治措施提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

UDMH为西昌卫星发射中心赠送,使用前溶解于无菌蒸馏水中。γ氨基丁酸(GABA)和谷氨酸(Glu)为美国Sigma公司产品。辅酶I(NAD)为中科院上海生化所产品。

氨基酸分析仪为美国Beckman公司6300黄金系列氨基酸分析仪。荧光分光光度计为日立F-3010型。

1.2 实验动物及分组

健康雄性Wistar大鼠60只,由本校动物实验中心提供,体重200~250 g,染毒前禁食12 h,实验动物随机分组,按染毒剂量分为低、中、高3个剂量组,分别为80、160、24 mg/kg体重,每组15只,每个剂量组按染毒时间分为30, 60, 90 min 3个时相,每时相5只动物,于染毒30、60、90 min后分别处死动物,迅速取脑组织备用。对照组注入无菌蒸馏水。染毒方法采用非暴露式气管插管法[2]。各组动物用乙醚麻醉。

1.3 检测指标

1.3.1 GABA和Glu 大鼠处死后迅速取脑,脑按纵切方向分为左、中、右3个部分。取中间部分脑组织作GABA和Glu含量分析。以10%磺基水杨酸作为匀浆介质,每100 mg脑组织加2 ml 10%磺基水杨酸。以上操作均在冰浴条件下进行。匀浆在4℃, 15000× g离心20 min,取上清液用氨基酸分析仪测GABA和Glu含量。

1.3.2 GABA-T活力测定 大鼠处理同1.3.1,取左边部分脑组织匀浆测GABA-T活力。测定方法参照文献[3],酶活力表示用μmol/g(wet wt) tissue·h^{-1}。

1.3.3 GAD活力测定 以L-谷氨酸为底物,根据生成的GABA量反映GAD活力。大鼠处理同1.3.1,取右边部分经脑组织匀浆,用磷酸缓冲液(pH6.4)为介质制成10%匀浆。取脑匀浆1 ml, pH6.4谷氨酸0.2 ml(含L-谷氨酸3 mg),磷酸缓冲液0.6 ml,混匀,37℃温育液2 h,加入醋酸缓冲液(pH4.2)0.2 ml,沸水浴2~3 min,冷却,离心,测上清液中生成的GABA。GABA检测用氨基酸分析仪。酶活力表示:上清液中生成的GABA μmol/g(wet wt) tissue·h^{-1}。

1.4 统计处理

采用单因素方差分析及双因素方差分析对各实验结果进行分析,结果用$\bar{x} \pm s$表示。

2 结果

2.1 UDMH对大鼠脑组织GABA含量的影响

从表1结果可见,UDMH引起大鼠脑组织GABA含量明显降低,各剂量组与对照组比较差异非常显著($P < 0.01$)。染毒时间和剂量两因素的效应均很显著($P < 0.01$)。随染毒时间延长,染毒剂量增大,UDMH引起脑GABA含量降低越显著,呈现明显的量效和时效关系。

* 龙冬梅,女,26岁,实习研究员,硕士,现在成都军区后勤卫生防疫队

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

表 1　UDMH经气管染毒后对大鼠脑中 GABA含量的影响 [μg/g(wet wt)]

Tab 1　Effect of UDMH on the level of GABA in rat brain after intratracheal injection [μg/g(wet wt)]

Time (min)	Control	Administration dose(mg/kg)		
		80	160	240
30	381.41± 22.020	331.799± 7.597**	317.962± 11.743**	297.924± 10.446**#
60	382.200± 21.007	300.432± 14.247**	296.187± 12.779**	234.100± 12.655**##▲▲
90	381.09± 21.680	290.076± 41.355**	272.128± 25.934**	225.372± 17.031**##▲▲

n = 5, $\bar{x}\pm s$; ** : $P < 0.01$ *vs* control; # : $P < 0.05$, ## : $P < 0.01$ *vs* 80 mg/kg group at the same time, ▲: $P < 0.05$, ▲▲: $P < 0.01$ at the time *vs* 160 mg/kg group

2.2　UDMH对大鼠脑组织 Glu含量的影响

从表 2结果可见,UDMH可引起大鼠脑组织 Glu含量升高。低剂量组升高与对照组比较没有显著差异($P > 0.05$),高剂量组各时相和中剂量组染毒 60、90 min,引起脑组织 Glu明显升高,与对照组比较差异非常显著($P < 0.01$)。时间和剂量两因素的效应很显著($P < 0.01$),染毒 30 min,高剂量组与低、中剂量组比较升高非常显著($P < 0.01$),染毒 60, 90 min时,中高剂量组升高与低剂量组比较有非常显著的差异($P < 0.01$),中高剂量组之间无显著差异($P > 0.05$)。

表 2　UDMH经气管染毒后对大鼠脑中 Glu含量的影响 [μg/g (wet wt)]

Tab 2　Effect of UPMH on the level of Glu in rat brain after intratracheal injection [μg/g(wet wt)]

Time (min)	Control	Administration dose(mg/kg)		
		80	160	240
30	1425.494± 46.647	1457.887± 18.755	1466.778± 14.313	1553.167± 17.859**##
60	1421.694± 47.388	1460.87± 30.326	1662.949± 32.315**##	1669.187± 21.897**##
90	1419.128± 46.865	1483.35± 34.017	1490.479± 53.335**##	1663.313± 17.031**##

n = 5, $\bar{x}\pm s$** : $P < 0.01$ *vs* control group; ## : $P < 0.01$ *vs* 80 mg/kg group, at the same time

2.3　UDMH对大鼠脑组织 GAD活力的影响

表 3结果显示 UDMH引起 GAD活力降低。除低剂量染毒 30 min外,其余各剂量组及染毒时间脑组织 GAD活力均明显降低,与对照组比较有非常显著的差异($P < 0.01$)。剂量和时间的效应非常显著($P < 0.01$)。同一剂量下,染毒时间延长,GAD持续降低,存在一定的时效关系;同一时间下,染毒剂量增大,GAD下降越显著,中、高剂量组与低剂量组比较有显著或非常显著的差异($P < 0.05$或 $P < 0.01$)。

表 3　UDMH经气管染毒后对大鼠脑中 GAD活力的影响 [μmol/g (wet wt)· h^{-1}]

Tab 3　Effect of UDMH on GAD activity in rat brain after intratracheal injection [μmol/g(wet wt)· h^{-1}]

Time (min)	Control	Administration Dose(mg/kg)		
		80	160	240
30	14.459± 0.573	12.224± 2.201	9.268± 1.057**#	8.662± 1.467**#
60	14.409± 0.660	10.380± 0.411**	8.030± 0.103**##	6.668±± 0.388**##▲▲
90	14.47± 0.625	7.835± 1.966**	5.783± 0.187**##	5.312± 0.530**##

n = 5, $\bar{x}\pm s$** : $P < 0.01$ *vs* control group; # : $P < 0.05$, ## : $P < 0.01$ *vs* 80 mg/kg group at the same time; ▲▲: $P < 0.01$ *vs* 160 mg/kg group at the same time

2.4　UDMH对大鼠脑组织 GABA-T活力的影响

从表 4结果可见,UDMH能引起脑 GABA-T降低,但只有高剂量 UDMH才引起 GABA-T活力明显降低,与对照组比较有显著差异($P < 0.05$)。同一时间的各剂量组之间 GABA-T活力无显著差异($P > 0.05$),同一剂量组各染毒时间也无显著差异($P > 0.05$)。

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

表 4 UDMH经气管染毒后对大鼠脑中 GABA-T活力的影响 [μ mol/g (wet. wt)· h⁻¹]

Tab 4 Effect of UDMH on GABA-T activity in rat brain after intratracheal injection [μ mol/g(wet·wt)· h⁻¹]

Time (min)	Control	Administration dose(mg/kg)		
		80	160	240
30	28.576± 2.604	26.183± 2.594	25.555± 0.925	23.701± 1.083*
60	28.574± 2.206	24.813± 3.089	25.199± 2.176	22.186± 1.788*
90	28.714± 1.984	23.822± 3.669	24.124± 2.042	22.333± 1.470*

$n = 5$, $\bar{x} \pm s$ * : $P < 0.05$ *vs* control group

3 讨论

机体受外界毒物的影响而产生神经系统的功能障碍,就是神经系统中毒,不同的毒物(素)引起神经系统中毒的机理各不相同。许多神经毒物进入体内后,可干扰神经递质的代谢转化,从而影响神经元之间的信息传递,导致神经系统中毒症状和体征。

GABA是目前公认的哺乳类中枢神经系统(CNS)一种重要的抑制性神经递质,广泛存在于哺乳动物脑组织,同时具有合成和降解的酶系统,作用于特异受体,产生抑制效应。GABA对脑的能量代谢有重要作用。脑中与 GABA含量密切相关的酶是 GAD和 GABA-T,这两种酶的活性改变可直接影响脑中 GABA含量。GAD是 GABA合成的限速酶,决定 GABA在哺乳动物神经系统的稳态水平,且与 GABA水平有较好的相关性。[4] GABA对神经元具有普遍的抑制性作用。大量资料表明,GABA含量降低是引起惊厥的原因这一,各类惊厥的发生几乎都与脑内 GABA含量减少有关。

我们的实验结果显示,各剂量 UDMH均使脑组织中 GABA含量非常明显降低($P < 0.01$),使 GAD活力亦非常显著降低($P < 0.01$),且二者的变化呈良好的正相关($r = 0.8598$, $P < 0.01$),高剂量 UDMH也使 GABA-T显著降低($P < 0.05$)。这表明 UDMH能够影响抑制性神经递质 GABA的代谢转化,从而影响神经系统的正常功能导致神经系统中毒症状。从 GABA降低与 GAD活性降低呈良好正相关,我们推测 UDMH引起 GABA降低的主要原因是抑制了 GAD所致。据报道 UDMH能抑制 VB_6作为辅因子的酶反应,推测是由于 UDMH与 VB_6形成偏二甲基肼磷酸吡哆醛腙而使 VB_6含量降低,从而影响 GAD活性,引起 GABA含量下降[1]。VB_6是 GAD和 GABA-T的辅因子,VB_6含量的降低可能会影响这两个酶的活力。在染毒 30, 60 min时,动物并未发生痉挛,GABA和 GAD活力已明显降低,说明在发生惊厥前 GAD活性已受到抑制。染毒 90 min时,GABA含量降低非常显著,此时动物出现明显的中毒症状如痉挛等,揭示 UDMH引起 CNS中毒与 GABA含量降低有关。这与以前文献报道的结果一致[1]。至于 GABA含量的降低能否影响 GABA受体表达而导致 CNS中毒,有待于进一步研究证实。

Glu是哺乳动物 CNS内含量极高的氨基酸,是 CNS内起主要兴奋作用的氨基酸类神经递质。Glu具有神经毒性,其神经毒性机理还不完全清楚,但可能与神经元胞内 Ca^{2+} 浓度增高有关[5]。本实验结果显示,UDMH染毒后脑组织中 Glu含量升高超过正常水平,尤其中、高剂量组 UDMH引起脑 Glu含量升高非常显著($P < 0.01$)。这表明 Glu升高致 CNS兴奋性增强,引起 CNS中毒,揭示 UDMH引起的强直一阵挛性痉挛的原因可能还与脑中 Glu含量升高有关。

参考文献

1 Chevrrier J P. 1, 1-Dimethylhydrazine toxicity in animals. I. Acute intoxication. J Eur Toxicol, 1974, 7(4): 238

2 李寿祺.卫生毒理学基本原理和方法.成都:四川科学技术出版社, 1987. 364~365

3 de Boer T H, Bruinvels J. Assay and properties of 4-aminobutyric-2-oxoglutaric acid transaminase and succinic semialdehyde dehydrogenase in rat brain tissue. J Neurochem, 1977, 28: 471

4 韩济生.神经科学纲要.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993. 95~97

5 Rajdev S, Reynolds I. J. Glutamate-induced intracellular calcium changes and neurotoxicity in cortical neurons in vitro effect of chemical ischemia. Neurosci, 1994, 62(3): 667

(收稿: 1996-12-25;修回: 1997-04-23)

(编辑 冷怀明)

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

Acute toxic effects of 1, 1-dimethylhydrazine on GABA and Glu in the brain in rats

Long Dongmei, Gao Ning, Cao Bo, Zhao Qing, Hu Ran (Department of Environmental Hygiene, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To study the biochemical mechanism of the acute intoxication by 1, 1-dimethylhydrazine (UDMH) through intratracheal infection from the angle of neurotransmitter. Methods: Adult male Wistar rats were randomized into four groups: 1) Normal control group (NCG); 2) Low-dosage group (LDG, 80mg/kg); 3) Middle-dosage group (MDG, 160mg/kg); 4) High-dosage group (HDG, 240mg/kg). The contents of GABA and glu and the activities of GAD and GABA-T were determined at the 30th, 60th and 90th min after the infection. Results: 1) The content of GABA and activity of GAD were significantly lower in LDG, MDG and HDG than in the control ($P < 0.01$). These two indices were in dose-effect and time-effect manners. 2) The activity of GABA-T was significantly lower in HDG than in the control ($P < 0.05$). 3) The content of Glu was remarkably higher in MDG and HDG than in the control ($P < 0.01$). Conclusion: UDMH induces intoxication of the central nervous system through decreasing the activity of GAD to result in the decrease of the content of GABA. It also might be due to the increase Glu content in the brain.

Key words 1, 1-dimethylhydrazine (UDMH); neurotransmitter; neurotoxicity; rat

人 C5aR在大肠杆菌中的功能性表达及 C5a对中性粒细胞及肾小球内皮细胞粘附的影响

Functional expression of human C5a receptor in *Escherichia coli* and the effect of C5a on the properties of adhesion between granulocytes and glomerulus vascular endothelial cells

齐 洁* 朱锡华 (第三军医大学基础医学部免疫学教研室) 重庆, 630038

C5aR具有广泛的分布,除髓样细胞外,还分布于多种脏器的实质细胞. C5aR介导了众多的生物学效应,参与了许多疾病的发生、发展,并在多种病变中起重要作用. 然而 C5a-C5aR系统目前还有许多未知的领域,亟待去深入开拓.

为了获得高质量充足的 C5aR材料来源,满足多方研究的需要,我们用大肠杆菌高密度生长的优势及融合蛋白易纯化的特点,构建了人 C5aR和细菌麦芽糖结合蛋白(MBP)基因融合的表达质粒 C5aR-pmal-p2 通过 PCR调整了 C5aR cDNA阅读框架,改变了原有 cDNA两端的酶切位点,缺失了起始密码并增加了一个细菌偏性的终止子. DNA测序表明 C5aR cDNA与表达载体中的 MBP开放阅读框架一致. 将重组质粒转入 DH5α 菌中,首次在细菌内膜上表达出了具有配体结合活性的 C5aR. Western-Bolt和 IGSS检测表明表达的 C5aR具抗体结合活性并且定位表达于细菌内膜. 表达量占整个细菌蛋白总量的 3.2%. 受体的放射性配体结合实验(RBA)证实 ^{125}I-C5a与完整表达菌的结合可达饱和,每个细菌上 C5aR的含量不低于60个放射性配体结合位点,与 C5a的亲和力接近体内正常细胞的测定值, kd= 3.62nM. 提示细菌内膜上的 C5aR正确折叠,保持了良好的构象.

本研究应用 IGSS技术发现肾小球内皮细胞(GVEC)上分布有 C5aR. 为揭示 GVEC上 C5aR介导的生物学效应,本研究还探讨了 C5a-C5aR对 Paw-GVEC粘附的影响. 用微管吸吮技术率先从生物力学角度直接定量地证实了 C5a对 Paw-GVEC粘附特性的影响,经 2000 ng/ml C5a刺激,粘附力(Fa)达到 0.014 dyn,相对粘附应力(S1)达到 1720 dyn/cm2,与对照组均有非常显著性差异($P < 0.01$). S1结果提示 C5a浓度在 2000ng/ml以下时,参与粘附的分子相对恒定,而当 C5a刺激浓度达 2000ng/ml时, S1显著增加,细胞间粘附的分子机理可能发生变化. PMN的髓过氧化酶(MPO)检测结果表明, PMN与 GVEC粘附的发生依赖于 C5a刺激的剂量. 本研究从不同角度阐明了 C5a对 PMN-GVEC粘附的影响,为深入探讨 C5a和 C5aR在炎症性病变中的重要作用打了下基础,同时为深入研究 C5a和 C5aR提供了有用的实验工具和材料来源,也为其它膜蛋白的表达及探讨外源性膜蛋白在 *E. coli* 蛋白中正确折叠和嵌入细胞膜的机理提供了参考.

关键词 C5a受体; C5a;大肠杆菌表达;融合蛋白;肾小球内皮细胞;中性粒细胞;粘附;微管吸吮

中图法分类号 R392.11

(收稿: 1997-06-20;修回: 1997-07-11)

(编辑 张大春)

* 齐 洁,女,33岁,讲师,博士研究生

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