

甲基苯丙胺致大鼠神经毒性及纹状体硝化作用的改变

王双双¹, 杨敏慧², 何琼¹, 谭晓辉¹, 王慧君¹

(南方医科大学 1. 法医系, 2. 病理系, 广东 广州 510515)

中国图书分类号: R-332; R 322.81; R 329.24; R 749.91; R 971.7; R 971.93; R 977.9

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2010)03-0317-04

摘要:目的 探讨甲基苯丙胺(methamphetamine, MA)所致的大鼠神经毒性及纹状体硝化作用的改变。方法 建立 MA 给药模型, 对照组给予等量生理盐水; 观察两组大鼠的行为学改变, 体温变化, 纹状体中 NO 含量, NOS 活性和蛋白质硝化水平的变化情况。结果 MA 组大鼠刻板行为评分和体温均高于对照组($P < 0.01$); 与对照组相比, MA 组大鼠纹状体 NO 含量及 NOS 活性增加($P < 0.01$); 纹状体蛋白硝化水平明显增加($P < 0.01$), 差异有显著性。结论 MA 可导致大鼠行为学改变和体温变化, 大鼠脑组织 NO 含量、NOS 活性及蛋白硝化水平的增高可能是 MA 中枢神经系统损伤的重要机制。

关键词:甲基苯丙胺; 神经毒性; 体温; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 硝化蛋白质

甲基苯丙胺(methamphetamine, MA)作为当今最泛滥的新型毒品, 可对心、肝、肺、肾等多个器官造成损伤。其中, 对中枢神经系统的影响尤为严重^[1], 主要表现为多巴胺等单胺类神经末梢的损伤。而蛋白质酪氨酸硝化所导致的蛋白质功能改变和 NO 增多所导致的毒性作用可能是其中重要的作用机制。本研究以 MA 中毒大鼠为研究对象, 观察 MA 大鼠的行为学、体温改变, 并选取多巴胺神经末梢最集中的纹状体区, 检测纹状体中 NO、NOS 和蛋白质硝化水平的变化, 探讨 MA 的神经毒性及可能机制, 为治疗和干预提供一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 Wistar δ 大鼠 20 只, 体质量 180 ~ 220 g (SPF 级, 购自南方医科大学实验动物中心)。

1.2 试剂和仪器 盐酸 MA (纯度 100%) 购自中国药品生物制品鉴定所 (批号: 171212-200603), 水合

氯醛购自中国医药上海化学试剂公司。NO 试剂盒和 NOS 测定试剂盒(分型)购自碧云天生物技术研究所, 兔多克隆抗 3-硝基酪氨酸抗体购自美国 Millipore 公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体及考马斯亮蓝 G-250 购自武汉博士德公司, 其它试剂均为国产分析纯。小动物电子体温计(DT-1TB)购自上海华展医用仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型及分组 将 20 只 Wistar 大鼠随机分为对照组和 MA 组, 每组 10 只, 单笼饲养, 整个实验过程自由饮水取食。盐酸 MA 溶于 0.9% 的生理盐水制成浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MA 生理盐水溶液; MA 组大鼠腹腔注射(ip) MA $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 2 次/日(8:00, 20:00), 共 4 日; 对照组腹腔注射等容量的生理盐水, 其余处理同 MA 组。

1.3.2 大鼠一般行为学变化 注射后 2 h 内, 每 10 min 观察动物活动情况 1 次, 记录相关变化的发生率, 并参照 Sams-Dodd^[2] 对大鼠刻板行为(stereotyped behavior)进行评分。

1.3.3 大鼠体温变化 每次药物注射 0.5 h 后, 小动物电子体温计通过肛测法记录两组大鼠的体温变化。

1.3.4 大鼠纹状体的提取及处理 末次注射后 24 h, 10% 水合氯醛腹腔麻醉($3 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$), 快速断头取脑, 冰上分离双侧纹状体, -80°C 冰箱保存。每组各取 10 只大脑半侧纹状体, 加 0.86% 的冷生理盐水分别制成 10% 的匀浆, 用于 NO、NOS 的测定; 每组另外 10 只脑半球纹状体, 液氮研磨后转入匀浆器, 按比例加入蛋白裂解液(含蛋白酶抑制剂)及 PMSF。处理后的匀浆离心(4°C , $20\,000 \times g$) 20 min, 取上清, 以牛血清白蛋白为标准蛋白, Bradford 法测定各组纹状体匀浆的蛋白浓度, -20°C 储存备用, 用于免疫印迹测定。

1.3.5 纹状体区 NO 测定 采用硝酸还原酶法, 实验步骤按试剂盒说明书操作。

1.3.6 纹状体区 NOS、iNOS、eNOS 活性的检测 采用化学比色法, 具体操作参照试剂盒说明书。

收稿日期: 2009-12-24, 修回日期: 2010-01-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No 30872918)

作者简介: 王双双(1982-), 女, 硕士生, E-mail: huaizhenwang@126.com;

王慧君(1956-), 女, 教授, 博士生导师, 通讯作者, Tel: 020-61648227, E-mail: hjwang@fimmu.com

Tab 1 Scores of stereotyped behavior of two groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Injection time							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	0.4 ± 0.51	0.9 ± 0.57	0.8 ± 0.63	1.1 ± 0.57	0.6 ± 0.70	0.8 ± 0.63	0.8 ± 0.63	0.7 ± 0.67
MA	3.8 ± 0.92**	3.4 ± 0.84**	3.9 ± 0.74**	4.3 ± 0.82**	3.7 ± 0.95**	4.1 ± 0.88**	3.5 ± 0.97**	3.6 ± 0.97**

** $P < 0.01$ vs control groupTab 2 Changes of body temperature of two groups ($\bar{x} \pm s, ^\circ\text{C}, n = 10$)

Group	Injection time							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	36.1 ± 0.52	35.9 ± 0.61	36.2 ± 0.36	36.4 ± 0.45	36.6 ± 0.53	36.5 ± 0.58	35.8 ± 0.73	36.1 ± 0.64
MA	38.4 ± 0.38**	37.9 ± 0.46**	38.2 ± 0.33**	38.6 ± 0.72**	38.5 ± 0.67**	38.3 ± 0.85**	38.0 ± 0.82**	37.7 ± 0.71**

** $P < 0.01$ vs control group

1.3.7 纹状体中硝基酪氨酸的测定 各组取相应体积的蛋白,与上样缓冲液混合,煮沸 10 min。按照每泳道 50 μg 蛋白量上样,12% SDS-PAGE。电泳完毕后用 70 V 恒压电转移 1 h 将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 封闭 1 h,以免多克隆 3-硝基酪氨酸抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗处理后,用电化学发光免疫法进行检测,结果用图像分析系统测定两组蛋白质条带灰度之和的比值。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 13.0 软件包进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 大鼠一般行为学变化 对照组注射生理盐水后,行为活动与正常大鼠无异,正常饮水进食;MA 组动物注射 MA 后约 10 min 时开始出现行为和活动异常,主要表现为不自主的扭头、摇头、点头、啮齿(磨牙)和自发转圈运动等刻板行为,个别动物出现自残行为。行为活动异常约持续至注射后 2 h,之后动物表现为蜷缩,活动减少和进食量明显减少。大鼠刻板行为评分,MA 组明显高于对照组(Tab 1)。

2.2 大鼠体温值的变化 每次注射后 0.5 h 肛测法检测大鼠体温值,MA 组大鼠体温值明显高于对照组($P < 0.01$),见 Tab 2。

2.3 大鼠纹状体区 NO 的含量及 iNOS、eNOS 活性的变化 与对照组相比较,MA 组大鼠纹状体 NO 含量明显升高($P < 0.01$);MA 组大鼠纹状体 iNOS 及 eNOS 活性均升高($P < 0.01$),见 Tab 3。

2.4 两组大鼠纹状体蛋白质硝化水平的变化 与对照组比较,MA 组大鼠纹状体内总体蛋白质硝化水平表达升高 127%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。在 24 ku ~ 85 ku 的蛋白质条带之间,蛋白

质硝化现象尤为明显,见 Fig 1。

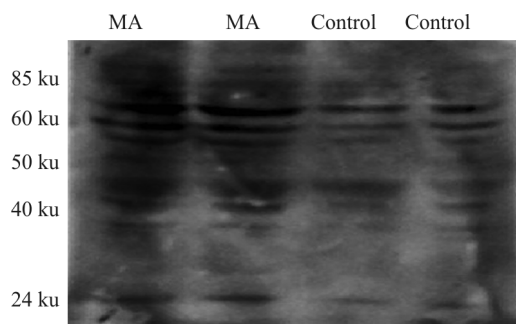


Fig 1 Western blot analysis of tyrosine nitration in normal and MA groups'rat striatum

Tab 3 The data of NO and activity of iNOS and eNOS in rat striatum ($\bar{x} \pm s$)

Group	NO	iNOS	eNOS
	$/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Pro}$	$/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Pro}$
Control	8.32 ± 0.43	0.20 ± 0.10	0.92 ± 0.08
MA	14.58 ± 0.64**	0.77 ± 0.08**	1.17 ± 0.11**

** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

甲基苯丙胺属于苯丙胺类兴奋剂,俗称“冰毒”。本研究中发现,注射 MA 后 10 min 动物出现运动增多、刻板运动、易激惹、自残等行为和精神改变,刻板运动评分明显高于对照组。这是因为 MA 具有拟交感效应,使动物出现运动增多、易激惹等交感神经兴奋症状,并极易通过血脑屏障直接作用于脑细胞,产生神经毒性损伤。本研究也发现,注射 MA 后 0.5 h,MA 组大鼠体温明显高于对照组,最高温度可达 40.2 $^\circ\text{C}$ 。研究表明,MA 可通过交感神经兴奋性增强及影响体温调节中枢等多种途径导致实验动物体温增高,同时,体温平衡失调也是 MA 神经

毒性的重要机制之一^[3],机体高温可激活细胞凋亡相关通路,并加重其他毒性机制对脑组织的损伤作用^[4,5]。

氧化应激是 MA 神经毒性的重要机制之一^[6]。本次研究发现,末次注射 MA 后 24 h,大鼠纹状体内各型 NOS 活性及 NO 含量均有明显提高。MA 可通过提高组织 NOS 活性而产生过量 NO。NO 和 NOS 均可与氧分子或活性氧(reactive oxygen species, ROS)反应生成过量活性氮(reactive nitrogen species, RNS),引起氧化应激损伤。此外,机体高温可通过加速脑组织内 RNS 和 ROS 等的生成而加重氧化应激损伤作用。机体高温时对脑内相关酶类活性的影响也可能加重了氧化应激作用。上述几个机制共同作用可致机体生成大量的 ROS 和 RNS,导致氧化应激损伤,还有可能引起蛋白质的硝基化、亚硝酰化,从而产生一系列病理学效应。

蛋白质酪氨酸硝化一般是指蛋白质中酪氨酸残基被硝化成 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT),作为一种蛋白质翻译后修饰,可直接导致关键蛋白质的损伤,进而引起细胞相关功能丧失甚至细胞死亡。关键蛋白质的硝化可抑制免疫应答,影响酶的催化活性,阻止或激活可能涉及的信号转导过程,干扰线粒体能量代谢,破坏细胞骨架,抑制抗氧化及解毒功能等。研究显示^[7,8],在病理条件下,超氧化物歧化酶、酪氨酸羟化酶、肌动蛋白等关键酶和与功能性结构蛋白都是极易被硝化的靶蛋白质。而这些关键蛋白质的硝化是多种神经退行性疾病(如肌萎缩性侧索硬化、帕金森病、阿尔采末病等)病理过程的重要环节^[9]。在本次研究中发现 MA 组大鼠纹状体蛋白质酪氨酸硝化水平较对照组增高,提示因此而导致的蛋白功能受损可能是 MA 神经毒性的重要环节之一。有研究发现^[10]蛋白质硝化水平的增高与 ROS、RNS 的增多密切相关。机体内蛋白质酪氨酸硝化主要有两种途径:一种是 RNS 如 ONOO⁻等介导的;另一种是含卟啉过氧化物酶催化亚硝酸盐氧化途径。本次研究中发现的 NO 含量的增加及 NOS 活性的提高可能介导了相关蛋白质的硝化过程,而机体高温则可能在一定程度上提高了蛋白质的硝化水平。同时,大鼠的精神行为学改变和体温失衡也可能是脑内某些蛋白质酪氨酸硝化后功能受损的一个直接表现。本研究中还发现酪氨酸硝化程度增强的

蛋白质主要分布于 24 ku ~ 85 ku 之间,这一范围包括了机体大量的重要功能蛋白,提示这些蛋白质的功能受损可能在 MA 的神经毒性机制中占据了重要位置,而分析鉴定这些蛋白质也是下一步实验需要解决的问题。

参考文献:

- [1] Li X, Wang H, Qiu P, Luo H. Proteomic profiling of proteins associated with methamphetamine-induced neurotoxicity in different regions of rat brain[J]. *Neurochem Int*, 2008, **52**(1-2):256-64.
- [2] Sams-Dodd F. Phencyclidine-induces stereotyped behavior and social isolation in rat; a possible animal model of schizophrenia[J]. *Behav Pharmacol*, 1996, **7**(1):3-23.
- [3] Cadet J L, Jayanthi S, Deng X. Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis[J]. *FASEB J*, 2003, **17**(13):1775-88.
- [4] Mori T, Ito S, Namiki M, et al. Involvement of free radicals followed by the activation of phospholipase A2 in the mechanism that underlies the combined effects of methamphetamine and morphine on subacute toxicity or lethality in mice: Comparison of the therapeutic potential of fullerene, mepacrine, and cooling[J]. *Toxicology*, 2007, **236**(3):149-57.
- [5] Namiki M, Mori T, Sawaguchi T, et al. Underlying mechanism of combined effect of methamphetamine and morphine on lethality in mice and therapeutic potential of cooling[J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, **99**(2):168-76.
- [6] 宋健文,刘增甲,谭晓辉,王慧君. N-乙酰半胱氨酸减轻大鼠纹状体甲基苯丙胺神经毒性[J]. *中国药理学通报*, 2009, **25**(6):765-9.
- [6] Song J W, Liu Z J, Tan X H, Wang H J. N-Acetylcysteine attenuates methamphetamine induced neurotoxicity in rat striatum[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2009, **25**(6):765-9.
- [7] Greenacre S A, Ischiropoulos H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction[J]. *Free Radic Res*, 2001, **34**(6):541-81.
- [8] Gow A J, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation[J]. *FEBS Lett*, 1996, **385**(1-2):63-6.
- [9] Castegna A, Thongboonkerd V, Klein J B, et al. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain[J]. *J Neurochem*, 2003, **85**(6):1394-401.
- [10] 刘金凤,王京兰,钱小红,蔡耘. 翻译后修饰蛋白质组学研究的技术策略[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, **23**(2):93-100.
- [10] Liu J F, Wang J L, Qian X H, Cai Y. Technique strategies of modification-specific proteomics study[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2007, **23**(2):93-100.