

# 谷氨酸转运体在鱼藤酮神经毒性中的作用

刘辉, 尹芳秋, 燕颖军, 许崇亮, 贾庆军, 徐忠华

(白求恩医学院卫勤教研室, 河北 石家庄 050081)

**摘要:** 目的 观察谷氨酸转运体在鱼藤酮神经毒性中的作用。方法 建立星形胶质细胞与大鼠嗜铬细胞瘤 (PC12) 细胞共培养鱼藤酮染毒模型, 并用谷氨酸转运体-1 (GLT-1) 和谷氨酸/天冬氨酸转运体 (GLAST) 特异性抑制剂二氢卡因酸盐 (DHK)、L-反式吡咯烷-2, 4-二羧酸 (PDC) 预处理。高效液相色谱 (HPLC) 荧光法检测星形胶质细胞外谷氨酸 (Glu) 浓度, 同位素标记法检测 Glu 摄取能力。结果 DHK 预处理组星形胶质细胞 Glu 摄取能力与单纯鱼藤酮中毒组比较差异无统计学意义, 而 PDC 预处理组星形胶质细胞 Glu 摄取能力明显下降, 胞外 Glu 浓度升高, 与单纯鱼藤酮中毒组比较具有显著的统计学意义。结论 谷氨酸转运体 GLAST 可能在鱼藤酮诱导的兴奋性损伤机制中起主要作用。

**关键词:** 鱼藤酮; 谷氨酸转运体; 神经毒性

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)04-0248-03

## Role of glutamate transporters in neurotoxicity induced by rotenone

LIU Hui, YIN Fangqiu, YAN Yingjun, XU Chongliang, JIA Qingjun, XU Zhonghua

(Department of Health Service, Nongman Bethune Military Medical College, Shijiazhuang 050081, China)

**Abstract Objective** To explore the role of glutamate transporters in the neurotoxicity induced by rotenone. **Methods** Astrocytes isolated from newborn rats were cocultured with PC12 cells, then were divided into 6 groups: control group, rotenone treated group, DHK pretreated group (I and II), and PDC pretreated group (I and II). Extracellular glutamate concentrations were detected by high performance liquid chromatography (HPLC), and the uptake ability of glutamate was determined with isotope labeling method. **Results** It was showed that the glutamate uptake ability in astrocytes pretreated with PDC was significantly decreased compared with rotenone treated group, while those in astrocytes pretreated with DHK failed to show any significant change. **Conclusion** GLAST rather than GLT-1 may play a crucial role in excitotoxicity induced by rotenone.

**Key words:** rotenone; glutamate transporter; neurotoxicity

农药鱼藤酮能够选择性地作用于大脑黑质多巴胺神经元, 中毒后动物产生肌肉麻痹、僵硬、震颤、运动缓慢等类似帕金森病的症状<sup>[1]</sup>。新近研究发现, 鱼藤酮神经毒性的一个可能机制是改变大脑神经细胞中兴奋性神经递质如谷氨酸等的浓度<sup>[2]</sup>。脑内谷氨酸代谢主要依赖于分布在星形胶质细胞膜的谷氨酸转运体 GLAST 和 GLT-1<sup>[3]</sup>。本研究采用谷氨酸转运体特异性抑制剂 DHK 和 PDC, 分别调控 GLT-1 与 GLAST 的功能活性, 以期阐明两种谷氨酸转运体在鱼藤酮诱导的神经元变性损伤过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

鱼藤酮、DHK、PDC 购自 Sigma 公司, L-glutamic acid 标准品与 L-[<sup>3</sup>H]-glutamic acid 为 Sigma 公司产品, DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司, Millicell 插入

式培养皿 (Millicell culture cell insert) 为 Millipore 公司产品。

### 1.2 共培养细胞的建立和实验分组

取出生后 3 d SD 新生大鼠, 断头取中脑组织, 按照 McCarthy<sup>[4]</sup>所述方法分离和纯化星形胶质细胞, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, 经 3 次传代后免疫组化 GFAP 染色鉴定。将高分化的 PC12 细胞按  $1.0 \times 10^5$  个/ml 密度接种于 6 孔板中, 将星形胶质细胞按  $1.0 \times 10^5$  个/ml 密度接种于 Millicell 插入式培养皿 (PET 膜,  $3.0 \mu\text{m}/24 \text{ mm}$ ), 并与 PC12 细胞建立共培养体系, 以模拟脑内微环境。将共培养细胞随机分为 6 组: (1) 对照组, 正常孵育的共培养物; (2) 单纯染毒组, 终浓度为  $1.0 \mu\text{mol/L}$  鱼藤酮组; (3) DHK 预处理组 I,  $1.0 \mu\text{mol/L}$  鱼藤酮 +  $0.5 \text{ mmol/L}$  DHK; (4) DHK 预处理组 II,  $1.0 \mu\text{mol/L}$  鱼藤酮 +  $1.0 \text{ mmol/L}$  DHK; (5) PDC 预处理组 I,  $1.0 \mu\text{mol/L}$  鱼藤酮 +  $1.0 \text{ mmol/L}$  PDC; (6) PDC 预处理组 II,  $1.0 \mu\text{mol/L}$  鱼藤酮 +  $2.0 \text{ mmol/L}$  PDC。预处理组在染毒前加入药物孵育 30

收稿日期: 2011-03-02 修回日期: 2011-06-02

作者简介: 刘辉 (1974—), 博士, 副教授, 主要从事环境毒物神经毒理机制研究。

min后,再加入 1.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮培养 24 h 用于实验。

### 1.3 HPLC 荧光法检测共培养细胞胞外 Gln 浓度

应用 HPLC 与荧光检测器联用检测样品中 Gln 含量,具体操作参考文献[5]。收集对照组与各实验组细胞培养液 100  $\mu\text{l}$  按 3:2 (V/V) 加 1 mol/L  $\text{HClO}_4$ , 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液按 4:3 (V/V) 加入 2 mol/L  $\text{KHCO}_3$  1 ml, 4℃, 10 000 r/min 离心 5 min 收集上清液; 取上清液 30  $\mu\text{l}$  加入等体积邻苯二甲醛衍生物,充分混匀,室温反应 2 min 进样。

### 1.4 同位素标记法检测星形胶质细胞 Gln 摄取能力

预处理组在染毒前加入药物孵育 30 min, 鱼藤酮染毒浓度为 1.0  $\mu\text{mol/L}$ , 培养 24 h 后倾去培养液, 用 D-Hanks 液漂洗 3 次。每孔加入含  $\text{L-}[^3\text{H}]\text{-glutamic acid}$  1  $\mu\text{Ci}$  的孵育液 1 ml, 37℃ 孵育 15 min 后, 用预冷的 0.9% NaCl 溶液终止反应并洗涤 3 次, 再用 1 mol/L  $\text{HClO}_4$  裂解细胞; 4℃, 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液置入闪烁瓶中, 加入适量闪烁液, 过夜, 次日于液闪记数仪上检测。

### 1.5 统计学分析

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 12.0 软件进行方差分析和  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 DHK 预处理对鱼藤酮染毒星形胶质细胞胞外 Gln 浓度的影响

与对照组比较, 1.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒组星形胶质细胞胞外 Gln 浓度明显升高 ( $P < 0.01$ ); 而与单纯鱼藤酮染毒组相比, 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L DHK 预处理组 Gln 浓度升高并不显著, 见表 1。

### 2.2 DHK 预处理对鱼藤酮染毒星形胶质细胞 Gln 摄取的影响

与对照组比较, 1.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒组星形胶质细胞 Gln 摄取能力明显降低 ( $P < 0.01$ ); 而与单纯鱼藤酮染毒组相比, 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L DHK 处理组 Gln 转运能力降低并不显著, 见表 1。

### 2.3 PDC 预处理对鱼藤酮染毒星形胶质细胞胞外 Gln 浓度的影响

与单纯鱼藤酮染毒组相比, 1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L PDC 预处理组 Gln 浓度均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

### 2.4 PDC 预处理对鱼藤酮染毒星形胶质细胞 Gln 摄取的影响

与单纯鱼藤酮染毒组相比, 1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L PDC 处理组 Gln 转运能力均显著降低 ( $P <$

0.01), 见表 1。

表 1 DHK 预处理组胞外 Gln 浓度和摄取功能的变化 ( $n=6$   $\bar{x} \pm s$ )

| 组别          | Gln 浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) | Gln 摄取 [ $\mu\text{mol}/(\text{ml} \cdot \text{min})$ ] |
|-------------|------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 对照组         | 22.35 $\pm$ 3.86             | 1.955 $\pm$ 0.324                                       |
| 单纯染毒组       | 27.80 $\pm$ 4.17             | 1.289 $\pm$ 0.218 *                                     |
| DHK 预处理组 I  | 28.78 $\pm$ 3.55             | 1.106 $\pm$ 0.252 *                                     |
| DHK 预处理组 II | 29.18 $\pm$ 4.01             | 1.078 $\pm$ 0.204 *                                     |
| PDC 预处理组 I  | 38.55 $\pm$ 6.81 * #         | 0.775 $\pm$ 0.098 * #                                   |
| PDC 预处理组 II | 39.40 $\pm$ 7.41 * #         | 0.658 $\pm$ 0.054 * #                                   |

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$ ; 与单纯染毒组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

新近的研究表明, 中枢兴奋性氨基酸递质如 Gln 释放过多, 并通过其受体介导的兴奋性毒性在帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的发生和发展过程中发挥了重要作用<sup>[6]</sup>。鱼藤酮是从豆属植物毛鱼藤中提取的一种天然杀虫剂, 是细胞线粒体复合酶 I 高亲和力的抑制剂。既往研究表明, 鱼藤酮通过破坏脑内 Gln 的正常代谢, 引起组织间隙 Gln 含量显著升高, 从而诱导神经元兴奋性损伤<sup>[7]</sup>。

由谷氨酸转运体 GLAST、GLT-1 构成的星形胶质细胞 Gln 转运系统, 能够摄取细胞外绝大部分 Gln, 从而保护神经元免受兴奋性损伤。前期研究发现, 鱼藤酮对星形胶质细胞谷氨酸转运体的表达产生明显影响, 导致 Gln 转运功能的降低, 但 GLAST、GLT-1 在此过程中的具体作用还不清楚<sup>[8]</sup>。因此, 我们采用 GLAST、GLT-1 特异性抑制剂 PDC、DHK 进行干预实验。同位素标记实验显示, DHK 预处理组星形胶质细胞 Gln 转运能力下降, 但与单纯鱼藤酮染毒组比较差异无统计学意义。提示 GLT-1 于此浓度鱼藤酮染毒条件下, 在星形胶质细胞谷氨酸转运功能降低过程中, 并非占据主导地位; 而 PDC 预处理组星形胶质细胞 Gln 转运能力下降, 胞外 Gln 明显升高, 与单纯鱼藤酮染毒组比较差异有显著的统计学意义。提示与 GLT-1 相比, 在此浓度鱼藤酮染毒条件下, GLAST 的下调可能是星形胶质细胞谷氨酸转运功能降低的主要因素。

目前, 谷氨酸转运体已成为治疗帕金森病等神经退行性疾病的新靶点。其失表达、停止转运或逆向释放谷氨酸时, 均可引起突触间隙或胞外谷氨酸大量聚集, 从而造成神经毒效应。因此, 有效地调控谷氨酸转运体的表达及功能活性, 为开发新型神经退行性疾病治疗药物提供了新的思路。

(下转第 255 页)

表 2 各实验组豚鼠脏器指数的影响

%

| 组别      | 动物数 | 体重 (g) | 心指数       | 肝指数       | 脾指数       | 肺指数       | 肾指数       | 脑指数       |
|---------|-----|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| DCAC实验组 | 18  | 316±35 | 0.36±0.04 | 2.95±0.23 | 0.17±0.04 | 0.86±0.16 | 0.95±0.07 | 1.06±0.12 |
| 阳性对照组   | 10  | 307±54 | 0.37±0.06 | 2.95±0.14 | 0.13±0.01 | 0.90±0.16 | 0.97±0.06 | 1.12±0.15 |
| 阴性对照组   | 10  | 319±48 | 0.38±0.04 | 2.88±0.22 | 0.15±0.03 | 0.83±0.16 | 0.92±0.08 | 1.07±0.12 |

## 2.5 皮肤病理组织学检查

阳性对照组角质层、粒细胞层中炎症细胞浸润, 粒细胞轻度肿胀, 基底层细胞未见异常, 真皮层也有散在炎症细胞浸润, 毛细血管扩张, 水肿。DCAC 实验组、阴性对照组角质层角化完全, 棘层无增厚, 真皮内未见毛细管扩张、水肿和炎症细胞浸润。

## 3 讨论

小分子化学物诱导的变应性接触性皮炎被认为是一种由 T 淋巴细胞介导的迟发型超敏反应, 是以细胞免疫为主的过程<sup>[5-9]</sup>。Boerrigter G H 等和 Scheper R J 等分别在 DNCB 致敏的豚鼠体内检测到了半抗原特异性抗体和特异性 T 淋巴细胞, 证明了 T、B 淋巴细胞同时参与了机体的过敏反应<sup>[7-8]</sup>。TCE 在体内的代谢过程非常复杂, 中间活性代谢产物较多, 目前尚不清楚哪一种代谢产物作为半抗原引发了机体的变应反应。通过本研究发现 DCAC 可能在 TCE 诱发变应性皮炎过程中, 没有发挥中间活性代谢产物作用。而李来玉等<sup>[9]</sup>用该方法评价三氯乙烯对豚鼠的致敏率为 71.14%, 属于强致敏物, 皮肤病理组织学检查也发现了表皮棘细胞层增厚, 真皮内毛细血管扩张、水肿, 以及单核细胞浸润, TCE 代谢产物三氯乙酸致敏率为 58.13%, 为中度致敏物, 而三氯乙醇及水合三氯乙醛的致敏率为 0。本次研究 DCAC 实验的致敏率为 0。结果暂不支持 DCAC 在 TCE 诱发变应性皮炎中的作用。

本次研究还发现 DCAC 实验组与其他两个组别 ALT、AST 检测值差异无统计学意义, 没有发现 DCAC 对豚鼠产生肝损伤作用。有研究<sup>[10]</sup>证明了 TCE 氧化通路的代谢产物是产生细胞毒性和肝损伤的主要物质, DCAC 也是三氯乙烯经细胞色素 P450

途径中间的活性代谢产物, 但本研究认为 DCAC 可能不是 TCE 产生细胞毒性和肝损伤的中间代谢产物。

本研究缺乏 TCE 对照组对比资料, 无法进一步深入分析。在未来的研究中, 应同时设立 TCE 以及其他代谢产物作为对照, 以进一步阐明 DCAC 以及其他代谢产物在 TCE 致敏以及造成肝损害过程中的作用。

## 参考文献:

- [1] 黄永顺, 黄汉林. 职业性三氯乙烯药疹样皮炎免疫损伤研究进展 [J]. 中国职业医学, 2010, 37 (2): 157-159
- [2] 李来玉, 陈秉炯, 黄先青, 等. 广东省职业性三氯乙烯皮肤损害的发病情况及分析 [J]. 中国工业医学杂志, 1998, 11 (6): 349-351
- [3] Park B K, Naibit D J, Gordon S F, et al. Metabolic activation in drug allergies [J]. Toxicology, 2001, 158 (1-2): 11-23.
- [4] Khan M F, Kaphalia B S, Ansari G A. Tin endependent autoimmune response of dichloroacetyl chloride in female MRL +/+ mice [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1997, 19 (2): 265-277
- [5] Enk A H, Katz S J. Contact sensitivity as a model for T cell activation in skin [J]. J Invest Dermatol, 1995, 105 (Suppl): 80-83
- [6] Cavani A, Hackett C J, Wilson K J, et al. Characterization of epitopes recognized by hapten specific CD4+ T cells [J]. J Immunol, 1995, 154 (3): 1232-1238
- [7] Boerrigter G H, Brill H, Scheper R J. Hapten specific antibodies in allergic contact dermatitis in the guinea pig [J]. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1988, 85 (4): 385-391.
- [8] Scheper R J, von Blombert M, Boerrigter G H, et al. Induction of immunological memory in the skin: role of local T cell retention [J]. Clin Exp Immunol, 1983, 51 (1): 141-148.
- [9] 李来玉, 唐小江, 黄建勋, 等. 三氯乙烯及其代谢产物的豚鼠皮肤致敏试验 [J]. 中国职业医学, 2000, 27 (5): 6-8.
- [10] 戴宇飞, 李海山, 孙耀峰, 等. 代谢活化在三氯乙烯对小鼠致敏及肝毒性中的作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2005, 19 (5): 378-382.

(上接第 249 页)

## 参考文献:

- [1] Huang J, Liu H, Gu W, et al. A delivery strategy for rotenone microspheres in an animal model of Parkinson's disease [J]. Biomaterials, 2006, 27 (6): 937-946.
- [2] Lapointe N, St-Hilaire M, Martineau M G, et al. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity [J]. FASEB J, 2004, 18 (6): 717-719.
- [3] Jeffrey D R, Margaret D H, Carlos A P. Knockout of glutamate transporters reveals a major role of astroglia transport in excitotoxicity and clearance of glutamate [J]. Neuron, 1996, 16 (3): 675-686.
- [4] McCarthy K D, DeVellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue [J]. J Cell Biol, 1980, 85 (3): 890-902.
- [5] 吴强恩, 郑力行, 谢芳, 等. 反相高效液相色谱荧光法测定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.
- [6] Ossowska K, Konieczny J, Wardas J, et al. An influence of ligands of metabotropic glutamate receptor subtypes on Parkinsonian-like symptoms and the striatopallidal pathway in rats [J]. Amino Acids, 2007, 32 (2): 179-188.
- [7] 刘辉, 郭魁亮, 吴强, 等. 鱼藤酮对大鼠纹状体谷氨酸-谷氨酰胺环路的影响 [J]. 环境与职业医学杂志, 2009, 26 (2): 159-161.
- [8] 刘辉, 李云鹏, 董兆君, 等. 鱼藤酮对大鼠纹状体谷氨酰胺转运体及谷氨酰胺合成酶的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29 (9): 831-833.