

安艳, 银华, 王三祥, 等. 2009. 口服二苯胂酸在小鼠小脑蒲肯野细胞诱发氧化和氮化应激[J]. 环境科学学报, 29(7): 1496– 1501
An Y, Yin H, Wang S X, *et al.* 2009. Oral administration of diphenylarsinic acid induces oxidative and nitrosative stress in cerebellar Purkinje cells of mice[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 29(7): 1496– 1501

口服二苯胂酸在小鼠小脑蒲肯野细胞诱发氧化和氮化应激

安艳^{1*}, 银华², 王三祥³, 王正辉³, 张向东³, 李军³, 李贞⁴

- 1 苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院, 苏州 215123
- 2 苏州大学纺织与服装工程学院, 苏州 215021
- 3 山西省地方病防治研究所, 临汾 044100
- 4 山东省医学科学院放射医学研究所, 济南 250062

收稿日期: 2008-10-23 修回日期: 2009-02-14 录用日期: 2009-05-12

摘要: 为了研究口服化学战剂降解产物二苯胂酸(DPA)导致小鼠小脑功能异常与诱发小鼠小脑蒲肯野细胞氧化和氮化应激之间的关系, 利用硫代巴比妥酸反应物(TBARS)法和免疫组织化学方法检测脑组织丙二醛(MDA)和 3-硝基酪氨酸(3-NT)的变化情况. 同时, 通过在体外合成 3 价 DPA 的模型化合物二苯胂酸碘(DPI), 并用 Western-blot 检测 3-NT 的生成. 研究发现, 在小鼠一次口服 15mg kg⁻¹ DPA 以及连续 5d 口服 5 mg kg⁻¹ DPA 的情况下, 小脑组织 TBARS 上升, 蒲肯野细胞 MDA 和 3-NT 染色阳性. 体外实验检测到 DPI 和 NO 反应可以生成 3-NT. 这表明 DPA 会导致小鼠小脑功能异常, 这与其在体内代谢过程中产生的砷相关活性物质在小脑蒲肯野细胞诱发氧化和氮化应激密切相关.

关键词: 二苯胂酸; 3-硝基酪氨酸; 蒲肯野细胞; 小脑综合症; 氧化应激; 氮化应激

文章编号: 0253-2468(2009)07-1496-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Oral administration of diphenylarsinic acid induces oxidative and nitrosative stress in cerebellar Purkinje cells of mice

AN Yan^{1*}, YIN Hua², WANG Sanxiang³, WANG Zhenghui³, ZHANG Xiangdong³, LI Jun³, LI Zhen⁴

- 1 Department of Toxicology, School of Radiation Medicine & Public Health Medical College of Soochow University, Suzhou 215123
- 2 College of Textile and Clothing Engineering of Soochow University, Suzhou 215021
- 3 Shanxi Institute for Prevention and Treatment of Endemic Disease, Linfen 044100
- 4 Institute of Radiation Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062

Received 23 October 2008 received in revised form 14 February 2009 accepted 12 May 2009

Abstract The prominent cerebellar symptoms due to exposure to diphenylarsinic acid (DPA), a stable degradation product of chemical warfare agents were elucidated by investigating the DPA-induced oxidative and/or nitrosative stress in cerebellar Purkinje cells of mice. The values of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) were measured in the brain of mice after oral administration of DPA. Malondialdehyde (MDA)-adducts and 3-NT were detected in cerebellar sections by immunohistochemical analysis. Significantly positive staining with malondialdehyde (MDA) and 3-nitrotyrosine (3-NT) was observed in the cerebellar Purkinje cells by repeated administration (5 mg kg⁻¹ d⁻¹) with DPA for 5 weeks. A single administration of DPA (15 mg kg⁻¹) led to cerebellar symptoms from a behavioral pharmacology standpoint. The present results suggest the possibility that novel arsenic-associated active species may be a factor underlying the oxidative and nitrosative stress in Purkinje cells due to exposure to DPA, and that the damage may lead to the cerebellar symptoms.

Keywords diphenylarsinic acid; 3-nitrotyrosine; purkinje cells; cerebellar symptom; oxidative stress; nitrosative stress

1 引言 (Introduction)

二苯胂肿和二苯氯胂等二苯胂化合物作为化学战剂可以使士兵产生厌战情绪 (Pearson 2002). 二战后, 日本遗弃在中国的大量化学武器, 经过 50 多年的变迁, 有的已经泄漏, 对中国的人、畜和环境等构成了严重威胁. 21 世纪初期, 在日本国内茨城县等地发生了由于化学战剂二苯胂化合物降解产物二苯胂酸 (diphenylarsinic acid DPA) 污染地下水引起的人群中毒事件 (Ishizaki 2003). DPA 中毒的典型症状是小脑功能异常, 同时伴随血流量减少、运动不协调和复视等神经损害 (Ishii 2004). 但是, 到目前为止有关 DPA 致小脑功能异常毒作用机制尚不清楚.

无机砷作为确定的致人类皮肤癌、膀胱癌和肺癌的致癌物, 其作用机制至今亦尚不明确 (IARC, 2004). 但大量动物实验研究表明, 无机砷的主要甲基化代谢产物二甲基胂酸 (DMA) 通过在代谢过程中产生的活性代谢产物诱发氧化应激与致癌促进作用密切相关 (IARC, 2004). 近来研究报道, 巯基化合物可以加剧 DPA 的毒性 (Ochi 2004), 这说明 DPA 的毒性并非其本身引起, 而是与 DPA 被巯基化合物还原生成的 3 价 DPA 有关.

因此, 本文利用硫代巴比妥酸反应物 (TBARS) 法和免疫组织化学方法检测脑组织丙二醛 (MDA) 和 3-硝基酪氨酸 (3-NT) 的变化情况, 并通过在体外合成 3 价 DPA 的模型化合物二苯胂酸碘 (DPI), 用 Western-blot 检测 3-NT 的生成情况, 旨在探讨 DPA 导致小脑功能异常的毒作用机制.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 DPA 和二苯胂酸碘 (Diphenylarsinous iodide, DPI)

根据文献 (Takahashi 1952) 合成 DPA, DPI 由日本大学药学部赠送.

2.2 实验动物

5 周龄雄性 ICR 系小鼠, 体重约 25 g 购于日本 SLC 和三共实验室服务有限公司. SPF 条件下, 每笼饲养 2~3 只, 温度为 23℃, 湿度为 55%, 自动控制昼夜各为 12h, 自由饮水和摄食.

2.3 染毒

DPA 溶于 0.05 mol/L NaOH 并配成 1.8 g/L 的溶液, 然后用 0.05 mol/L HCl 调整 pH 至 8.0.

小鼠一次喂饲 2.5、5、10 和 15 mg/kg DPA, 或者连续喂饲 5 mg/kg DPA 35d

2.4 硫代巴比妥酸反应物 (TBARS) 法

小鼠一次喂饲 2.5、5、10 和 15 mg/kg DPA 24h 后处死, 冰上迅速取出大脑和小脑, 并与 1.15% KCl 制成体积比为 30% 的组织匀浆, 然后测量 TBARS (Ohkawa 1979)

2.5 免疫组化

10% 福尔马林固定的脑组织经常规脱水和石蜡包埋后, 进行超薄切片厚度 (4 μm), 并常规脱蜡, 苏木素-伊红 (HE) 染色后, 光镜观察. 免疫组化用生物素-酶标链霉亲和素 (SP) 法 (An, 2004), 一抗抗 MDA 和抗 3-NT 修饰蛋白单克隆抗体分别购于日本油脂株式会社和美国 Upstate 公司, 其它试剂均购于日本和光纯药工业株式会社.

2.6 酶活性测定

SOD 和 GSH-Px 分析试剂盒购买于日本株式会社同仁化学研究所. 大脑和小脑的组织匀浆于 4℃、12000 rpm 条件下离心 30 min, 上清分别用分光光度计于 450 nm 和 340 nm 处测量 SOD 和 GSH-Px 活性 (Paglia 1967).

2.7 电泳和 Western blot 检测 (李龙, 2006)

用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH = 6.8) 将小牛血清 (BSA) 制备成 50 mg/mL 溶液, 然后分 3 组并分别加入 10 μmol/L DPI, 100 μmol/L NO, DPI 和 NO 的混合液 (10 μmol/L DPI + 100 μmol/L NO). 3-NT-BSA 阳性标准是利用 5 mmol/L 过氧亚硝基阴离子中加入 0.1 mol/L 或 0.5 mol/L 磷酸缓冲液 (pH = 6.8) 制备.

2.8 统计学处理

数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析.

3 结果 (Results)

3.1 口服 DPA 后形态学的改变

小鼠染毒亚慢性剂量 (5 mg/kg d) 的 DPA 35d 和急性剂量 (15 mg/kg d) DPA 24h 后形态学的改变如图 1 所示. 研究发现, 小鼠口服 15 mg/kg d DPA 24h 后没有出现死亡现象. 光镜观察并与对照组比较发现, 小脑组织唯一的形态学改变是核固缩, 特别是蒲肯野细胞 (图 1); 5 mg/kg d DPA 连续 35d 染毒组观察到同样结果, 其他器官包括大脑等未见形态学异常改变.

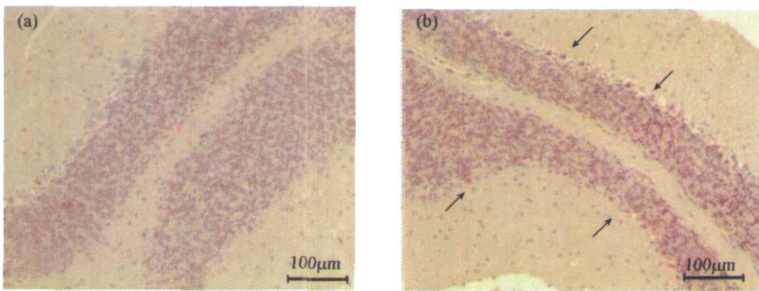


图 1 小鼠口服 DPA 24h后小脑 HE 染色 (a 对照; b 单次口服 15 mg kg⁻¹ DPA 24h后, 箭头为固缩蒲肯野细胞)

Fig 1 Hematoxylin-eosin staining of cerebellum in mice after DPA adm inistration (a control b 24h after single adm inistration of DPA (15 mg kg⁻¹). The arrows indicate pyknotic Purkinje cells)

3 2 TBARS 结果

分别口服 2 5 5 10 和 15 mg• kg⁻¹ DPA 24h 后, 小鼠小脑组织的 TBARS 升高 (湿重计), 显著高

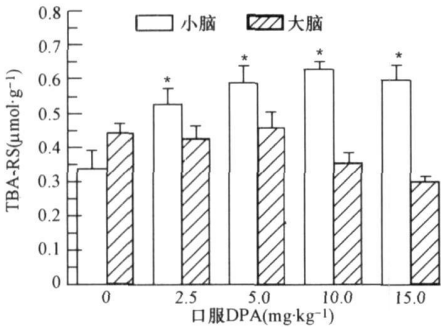


图 2 小鼠口服不同浓度 (2 5~ 15 mg kg⁻¹) DPA 24h后小脑组 织 TBARS(* p < 0 05 n = 6)

Fig 2 TBARS incerebellum ofm ice 24h after DPA adm inistration (* Significant d ifference (p < 0 05 n = 6) from control)

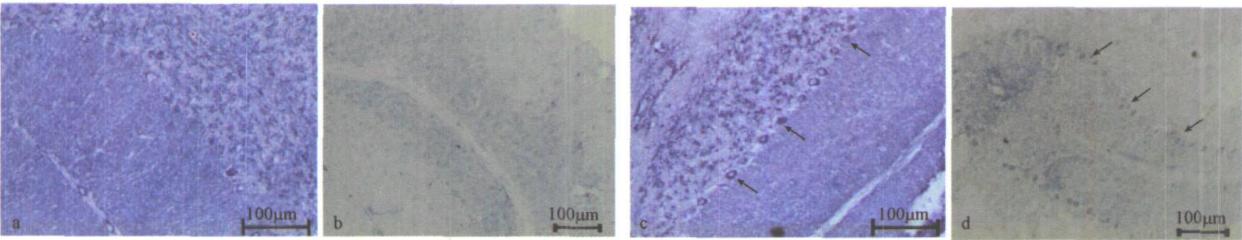


图 3 小鼠口服 5 mg kg⁻¹ DPA 35d后小脑组织 3-NT和 MDA 分布 (a 3-NT 染色对照组; b MDA 染色对照组; c DPA 染毒 35d组 3-NT 染色, 细胞呈蓝色阳性染色; d DPA 染毒 35d组 MDA 染色; 箭头所指为阳性染色蒲肯野细胞)

Fig 3 Distribution ofmodified protein-adducts in cerebellum ofm ice by repeated oral adm inistration of DPA (5 mg kg⁻¹ d⁻¹) for 35d (a control of 3-NT, b control ofMDA, c 3-NT m onoclonal antibody-treated cerebellar tissues by repeated oral adm inistration of DPA for 35d d MDA-adductm onoclonal antibody-treated cerebellar tissues by repeated oral adm inistration ofDPA for35d The arrows in (c) and (d) indicated positively-stained Purkinje cells)

3 4 抗氧化酶活性测量结果

与对照组相比, 小鼠口服 15 mg• kg⁻¹ DPA 24h

于对照组, 并且有随着剂量增加呈上升趋势 (图 2), 而大脑等其它器官组织的 TBARS 变化不明显.

3 3 免疫组化结果

与对照组相比, 小鼠连续口服 5 mg• kg⁻¹ d⁻¹ DPA 35d后, 小脑蒲肯野细胞氮化和氧化应激生物标志物 3-NT 和 MDA 单克隆抗体染色阳性 (图 3), 细胞呈蓝色阳性染色. 3-NT 和 MDA 阳性细胞数明显高于对照组 (p < 0 05) (表 1).

试验组别	阳性染色细胞 /蒲肯野细胞	
	3-NT	MDA
对照组	125/161(77 6%)	61/161(37 9%)
DPA	172/175(98 3%)*	155/175(88 6%)*

注: * p < 0 05, 括号数据为阳性染色细胞百分数

后, GSH-Px 活性显著上升 (p < 0 01), 而 SOD 活性无明显变化 (表 2).

表 2 DPA 染毒小鼠小脑抗氧化酶活性变化

Table 2 The activities of ROS-eliminating enzymes in cerebellum of mice after the administration of DPA

组别	GSH-Px/(10^{-3} U·m g^{-1})	SOD/m g^{-1}
对照组	6.2±1.1	7.9±0.6
DPA	10.4±0.6*	8.8±0.2

注: * $p < 0.01$

3.5 电泳和 Western blot 结果

3 价 DPA 的模型化合物 DPI 与 NO 和 BSA 在磷酸缓冲液中反应 1h, 然后进行电泳和 WEST blot 分析(图 4)。由图 4 可知, 小牛血清中加入 DPI+NO 组与 3-NT 单克隆抗体反应, 同阳性对照 (ONOO⁻) 一样形成 3-NT 带。

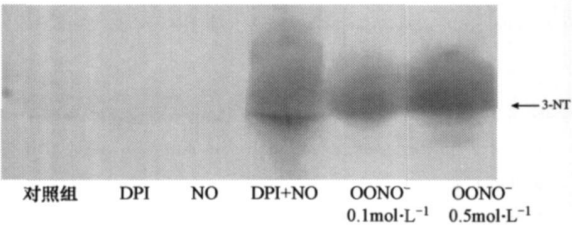


图 4 DPI 与 NO 在 BSA 中生成 3-NT

Fig 4 Determination of nitrating tyrosine residues in BSA reacted with DPI and nitric oxide

4 讨论 (Discussion)

小鼠染毒亚慢性剂量 (5 mg kg^{-1}) 和急性剂量 (15 mg kg^{-1}) DPA 的光镜观察与对照组比较发现, 小脑组织唯一的形态学改变是蒲肯野细胞核固缩(图 1b), 因此, DPA 导致的小脑损伤综合症很可能与蒲肯野细胞受损有关。

无机砷的毒性和致癌作用机制研究表明, 氧化应激在砷毒性作用过程中起着十分重要的作用。因此, 本研究也将注意力集中在 DPA 诱发氧化应激。口服不同 ($2.5, 5, 10$ 和 15 mg kg^{-1}) DPA 24h 后, TBARS 法测定小鼠小脑组织的脂质过氧化物显著高于对照组, 并且随着剂量加大而呈上升的趋势(图 2)。脑组织是脂质过氧化的靶器官, 而 DPA 具有亲脂性, 并且在富含巯基的脑组织中易于被还原为 3 价 DPA。另一方面, 平行纤维、神经胶质细胞和神经元细胞等脑皮质富含一氧化氮合酶 (nNOS) (Vincent 1992), NO 作为神经传递介质将神经信号由平行纤维传到蒲肯野细胞, 同时, 蒲肯野细胞周围聚集了大量 NO。小鼠小脑蒲肯野细胞氮化和氧化应激生物标志物 3-NT 和 MDA 阳性细胞数明显

高于对照组(表 1)。这些都表明暴露于 DPA 后引起的小脑功能异常与氧化应激有着十分密切的关系。

诱发氧化应激的原因之一是活性氧 (ROS) 的参与, 口服 DPA 后体内消除 ROS 的抗氧化酶 GSH-Px 活性显著上升 ($p < 0.01$), 而 SOD 活性无明显变化(表 2), 表明小脑组织中 TBARS 升高可能与脂质过氧化有关, 而非过氧化氢。

一般认为, 氮化应激生物标志物 3-NT 的形成与 NO 和 O_2^- 反应形成过氧亚硝基阴离子 ($ONOO^-$) 密切相关 (Kobzik, 1996)。最近, Ochi 等 (2004) 报道指出, DPA 与 GSH 反应生成的化学物质具有更强的细胞毒性和遗传毒性, 虽然具体物质尚未确认, 但很有可能是 DPA 被还原形成的 3 价 DPA。在 DPA 与巯基化合物反应产生 3 价 DPA 时, 可能有 1 个电子与 O_2^- 反应产生 O_2 。然而, 通过细胞色素 C 方法, 体外检测了 3 价 DPA 的模型化合物 DPI 在有氧条件下没有 O_2^- 生成。因此, 小鼠口服 DPA 后在小脑蒲肯野细胞生成的 3-NT 很有可能不依赖于 $ONOO^-$, 而是通过新的机制形成。3 价 DPA 和 NO 在有氧的条件下, 可能通过形成化学活性类似于 $ONOO^-$ 的活性物质而生成 3-NT(图 5)。如图 5 所示, 3 价 DPA 与氧分子在 NO 存在条件下可能生成 $ONOO^-$ 的衍生物砷相关的活性物质 I (active species (I)), 然后与酪氨酸反应最终形成 3-NT。由于到目前为止 $ONOO^-$ 是可能形成 3-NT 的唯一物质 (Eiserich, 1998), 那么图 5 中的砷相关活性物质 I 非常值得关注。并且, 口服 DPA 在小鼠小脑诱发氧化应激很有可能是由于砷相关活性物质 I。

NO 是小脑中重要的细胞间和细胞内神经调节和血液循环调节的分子信使 (Moncada, 1991), 大量关于小脑功能的研究表明, NO 从平行纤维突出向蒲肯野细胞弥散对于行为认知非常重要 (Lev-Ram, 2002)。大鼠和灵长类大脑富含 nNOS (Bredt, 1990), 小鼠小脑皮质同样有大量 nNOS (Gott, 2005)。NO 的合成涉及神经活动的传递机制和提高小脑血流速度 (Akgren, 1994), 在衰老大鼠小脑的蒲肯野细胞同样有 3-NT 形成 (Chung, 2002), 由此可见, 由于年龄导致的认知平衡和行为技能的丢失与小脑的氧化应激有关 (Forster, 1996)。因此, 可以推测伴随小脑血量减少的小脑功能异常可能与 NO 减少有关。本实验研究结果表明, 口服 DPA 导致小脑功能异常与砷相关活性物质 I 在蒲肯野细胞诱发氧化和氮化应激有关, 同时, 与砷相关活性物质 I 生成而导

致的 NO 减少也有关。

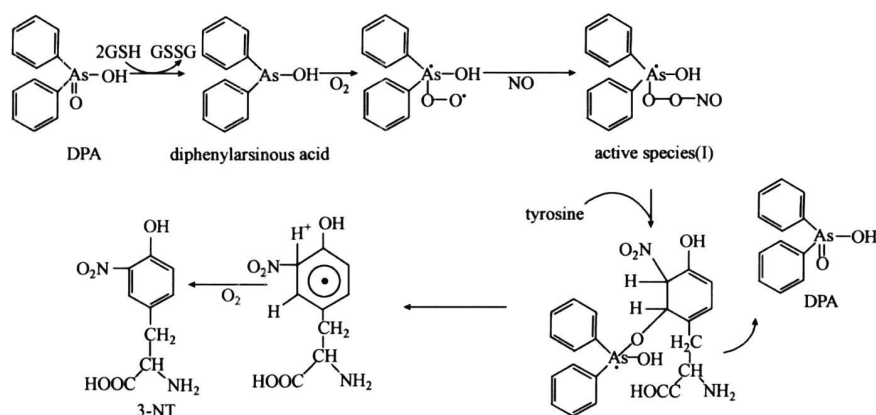


图 5 3价 DPA 和 NO 在有氧条件下与酪氨酸反应生成 3-NT 的可能机制

Fig 5 Possible production mechanisms of 3-NT produced by reaction of tyrosine with diphenylarsinous acid and NO in the presence of molecular oxygen

5 结论 (Conclusions)

1) 口服 DPA 导致小脑功能异常与 DPA 代谢过程中在蒲肯野细胞诱发氧化和氮化应激密切相关。

2) DPA 代谢过程中生成的砷相关活性物质 I 诱发氧化、氮化应激值得重视。

3) 口服 DPA 导致小脑功能异常与砷相关活性物质 I 生成而导致的 NO 减少有关。

致谢: 衷心感谢日本大学药学部山中健三教授在实验中给予的大力支持与帮助。

参考文献 (References):

- Akglren N, Fabricius M, Lauritzen M. 1994 Importance of Nitric Oxide for Local Increases of Blood Flow in Rat Cerebellar Cortex During Electrical Stimulation [M]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91: 5903—5907
- An Y, Gao Z L, Wang Z W, *et al*. 2004 Immunohistochemical analysis of oxidative DNA damage in arsenic-related human skin samples from arsenic-contaminated area of China [J]. Cancer Letters 214 (1): 11—18
- Bredt D S, Hwang P M, Snyder S H. 1990 Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide [J]. Nature 347: 768—770
- Chung Y H, Shin C M, Joo K M, *et al*. 2002 Immunohistochemical study on the distribution of nitrotyrosine and neuronal nitric oxide synthase in aged rat cerebellum [J]. Brain Research 951: 316—321
- Eiserich J P, Hristova M, Cross C E, *et al*. 1998 Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils [J]. Nature 391: 393—397

Forster M J, Dubey A, Dawson K M, *et al*. 1996 Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 4765—4769

Gotti S, Sica M, Vignelli P, Panzica C, *et al*. 2005 Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain [J]. Microscopy Research and Technique 68: 13—35

International Agency for Research on Cancer (IARC). 2004 Some drinking water disinfectants and contaminants including arsenic IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans [R]. Lyon: IARC, : 41—267

Ishii K, Tanaoka T, Otsuka F, *et al*. 2004 Diphenylarsinic acid poisoning from chemical weapons in Kamisu, Japan [J]. Annals of Neurology 56: 741—745

Ishizaki M, Yanaoka T, Nakamura M, *et al*. 2003 Detection of phenylated arsenic compounds from the well water [A]. Proceedings of the 11th Annual Meeting of Arsenic Research in Japan [C]. Sapporo 43—44

Kobzik L, Schmidt H H H W. 1996 Immunohistochemistry of nitric oxide synthase and nitric oxide-related products // Feelisch M., Stanley J S (Eds.), Methods in Nitric Oxide Research [M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd 229—236

Lev-Ram V, Wong S T, Storm D R, *et al*. 2002 A new form of cerebellar long-term potentiation is postsynaptic and depends on nitric oxide but not cAMP [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 8389—8393

李龙, 陈家堃. 2006 现代毒理学实验技术原理与方法——现代毒理学丛书 [M]. 北京: 化学工业出版社, 110—136

Li L, Chen J K. 2006 The Experimental Technologies of Modern Toxicology: Principles and Methods [M]. Beijing: Chemical Industry Press 110—136 (in Chinese)

Moncada S, Higgs E A. 1991. Endogenous nitric oxide physiology

pathology and clinical relevance[J]. European Journal of Clinical Investigation 21: 361—374

Ochi T, Suzuki T, Isono H, *et al* 2004 In vitro cytotoxic and genotoxic effects of diphenylarsinic acid—a degradation product of chemical warfare agents[J]. Toxicology and Applied Pharmacology 200: 64—72

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K 1979 Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobabutaric acid reaction[J]. Analytical Biochemistry, 95 351—358

Paglia D E, Valentine W N 1967 Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase[J]. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 70 158—169

Pearson G S, Magee R S 2002 Critical evaluation of proven chemical weapon destruction technologies[J]. Pure and Applied Chemistry, 74 187—316

Takahashi K 1952 Arsenical chemotherapeutic drugs. V II Synthesis of diarylarsinic acids with arylchloroarsines[J]. Yakugaku Zasshi 72 533—537(in Japanese)

Vincent S R, Kinura H 1992 Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain[J]. Neuroscience, 46 755—784