

氯丙烯对大鼠神经组织神经丝亚单位蛋白含量的影响

谢克勤*, 肖志锋, 李 岩, 赵 丽

(山东大学公共卫生学院毒理学研究所, 山东省毒理学省级重点实验室, 山东 济南 250012)

摘要: 目的 为了进一步探讨氯丙烯引起的周围神经病的发病机理。方法 用 Western 印迹方法测定了亚慢性中毒大鼠大脑、脊髓、坐骨神经组织低分子量神经丝(NF-L)、中分子量神经丝(NF-M)和高分子量神经丝(NF-H)3个亚单位相对含量的变化。结果

氯丙烯使脑组织沉淀和上清液中神经丝3个亚单位的相对含量明显降低;在脊髓组织沉淀和上清液中, NF-M 均降低。NF-H 在沉淀增加, 在上清液中降低。NF-L 在沉淀增加;在坐骨神经组织沉淀和上清液中, 氯丙烯使 NF-M 含量降低, 而使 NF-H 含量增加。NF-L 在沉淀中降低、在上清液中明显增加。结论 氯丙烯引起的中毒性周围神经病与神经丝亚单位紊乱有关。

关键词: 烯丙化合物; 氯丙烯; 神经微丝蛋白质类; 毒性

中图分类号: R994.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)05-0382-05

神经丝(neurofilament, NF)广泛分布于成熟神经元中,它是组成神经轴索的主要成分,一些轴索变性性神经病与 NF 变性有关。NF 是由高分子量 NF(high molecular weight neurofilament, NF-H)、中分子量 NF(middle molecular weight neurofilament, NF-M)和低分子量 NF(low molecular weight neurofilament, NF-L)3个亚单位蛋白组成,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)测定其分子量分别约为 200, 160 和 68 ku^[1]。

收稿日期: 2002-04-18 接受日期: 2002-07-26

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y97C13049)

作者简介: 谢克勤(1955-),男,山东省莒南人,教授,理学博士,研究方向神经毒理。

* 联系作者 Tel: (0531) 8382132,

E-mail: xie200@hotmail.com

氯丙烯(allyl chloride)可引起中毒性周围神经病,这种神经病的主要病理表现为周围神经有髓和无髓纤维内的微管和 NF 边缘不清楚,呈毛絮状,有的聚集融合,堆积在一起;有的走行紊乱,分布不匀,局部可出现空白区。线粒体有明显增多,少部分可见嵴脱落呈空泡变性^[2,3]。然而,氯丙烯如何导致 NF 的变化? 国内外报道不多^[4,5]。本文试图通过建立氯丙烯亚慢性大鼠中毒模型,观察氯丙烯对大鼠大脑、脊髓和坐骨神经 NF 3个亚单位相对含量的改变,进一步探讨氯丙烯引起的中毒性周围神经病的发病机理。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

氯丙烯,由中国医药(集团)上海化学试剂公司生产;电泳试剂由 Sigma 生产;鼠抗 NF 单克隆抗体 anti-68K (N5139), anti-160K (N5246), anti-200K (N5389)以及辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 均由 Sigma 生产;DAB 显色试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物处理

Wistar 大鼠,♂,30只,体重 180~220 g,由山东医科大学动物中心提供。饲养 7 d 后,随机分为对照组、低剂量组和高剂量组,每组 10 只。氯丙烯溶于花生油中,低剂量组和高剂量组分别 sc 氯丙烯 100 或 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹,对照组则给同体积花生油,连续 90 d。90 d 后,断头处死大鼠,迅速取出脑、脊髓和坐骨神经,液氮冷冻后, -70℃ 保存备用。

1.3 大脑、脊髓和坐骨神经组织匀浆制备

取大脑和脊髓约 0.5 g 组织,坐骨神经先在陶瓷研钵加液氮研成蛋白粉末,然后转入玻璃匀浆器中,加入 2 mL 预冷的匀浆缓冲液(mmol·L⁻¹: HEPES 10, pH 6.8, NaF 50, EGTA 1, EDTA 1)和 2 μL 1 mol·L⁻¹苯甲基磺酰氟(PMSF),在冰浴中 2000 r·min⁻¹上下匀浆 10 次,然后吸至 5 mL 离心管中。冰

浴放置 30 min 后, 4℃ 28 000 × *g* 离心 30 min, 小心吸出上清, 放入 Eppendorf 管中, -70℃ 储存, 作为上清液样品备用。沉淀用 2 mL 匀浆缓冲液悬起, 储存在 -70℃, 作为沉淀样品备用。

1.4 蛋白含量测定

参照 Bradford 法^[6], 略加修改。以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作蛋白标准液后, 制作标准曲线。根据标准曲线计算组织样品中蛋白含量。

1.5 Western 印迹法

参照分子克隆操作指南^[7]。所有样品电泳均在 7.5% 的不连续聚丙烯酰胺凝胶系统中进行, 稳流 40 mA, 约 2 h。其中大脑沉淀上样量 100 μg, 脊髓沉淀上样量 50 μg, 坐骨神经沉淀上样量 25 μg, 上清液分别为 200, 100 和 40 μg。将电泳后组装好的转膜系统进入转膜盒中, 加入 1 L 转膜缓冲液, 打开循环水, 打开电源, 100 V 持续 3 h。小心取出硝酸纤维素膜, 放入含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭缓冲液中, 震荡 30 min。取出硝酸纤维素膜, 用含 0.1% Tween-20 的 PBS (PBST) 震荡洗涤, 3 min × 2 次, 然后加入 8 μL 一抗进入 10 mL 封闭缓冲液中 (1:1250), 充分混匀, 加入盛有硝酸纤维素膜塑料袋内, 封口, 4℃ 过夜。打开塑料袋, 取出硝酸纤维素膜, 放入塑料盒。用 PBST 震荡洗涤, 5 min × 3 次。加入 15 μL 二抗 (HRP 标记的抗兔 IgG) 与 10 mL 封闭缓冲液混合, 充分混匀, 加入盛有硝酸纤维素膜塑料袋内, 封口, 室温 2 h。取出硝酸纤维素膜放入, 用 PBST 50 mL 震荡洗涤, 5 min × 3 次。加入 DAB 显色液, 室温显色, 约 3 min, 至出现棕色蛋白带。

1.6 统计学分析

杂交带用 DUOSCANT 1200 扫描仪扫描, 用 IPP 分析软件分析杂交带总 IOD (integrated optical density, IOD) 值, IOD 值用 one-way ANOVA 进行分析。

2 结果

2.1 氯丙烯对大鼠的亚慢性毒性反应

氯丙烯 sc 前 2 周没有观察到大鼠外观明显改变, 约 2 周后, 高剂量组大鼠皮毛开始不光滑; 大约 4 周后, 低剂量和高剂量组大鼠皮毛均不光滑, 高剂量组大鼠肌肉松弛、活动减少、肌张力降低; 在 8 周后低剂量组和高剂量组大鼠均表现为不同程度的肌肉松弛、肌张力降低、四肢活动不灵便、运动困难, 并持续到实验结束。实验结果表明氯丙烯可以引起大

鼠周围神经损伤。

2.2 大脑组织中低、中、高分子量神经丝的改变

在大脑沉淀中, 氯丙烯中毒后 NF 三个亚单位趋于降低。NF-L 在低剂量组中降低 33%, 在高剂量组中降低 24%, 与对照组相比均存在明显差异 ($P < 0.01$); NF-M 在低剂量组中降低 32% ($P < 0.05$), 在高剂量组中降低 60% ($P < 0.01$); NF-H 在低剂量组中含量与对照组相比无明显差异, 在高剂量组降低 31% ($P < 0.01$)。在大脑上清液中, NF-H 的低剂量组和高剂量组明显降低, 分别降低 41% 和 56% ($P < 0.01$)。NF-L 和 NF-M 在上清液中未检出。结果见图 1 和 2。

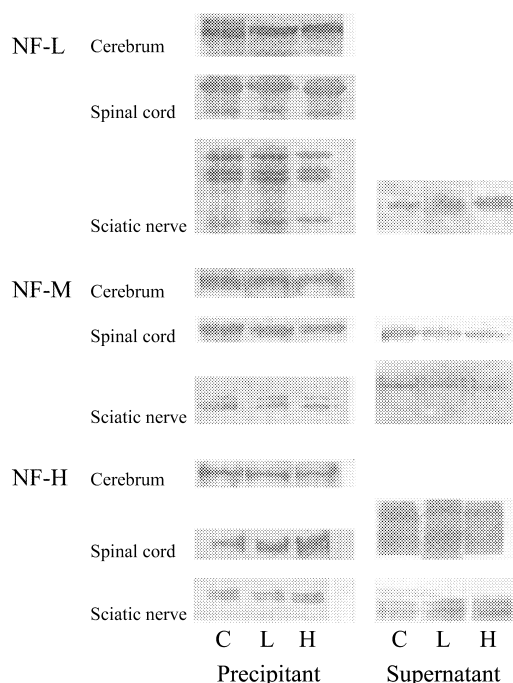


Fig 1. Changes of neurofilament (NF) subunits in rat nerve tissue analyzed by Western blot. C: Control; L, H: allyl chloride 100 and 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 90 d, respectively. NF-L, NF-M, NF-H: low, middle, high molecular weight neurofilament, respectively.

2.3 脊髓组织中低、中、高分子量神经丝的改变

在脊髓沉淀中, NF-L 在低剂量组与对照组相比无明显差异, 在高剂量组增加 18% ($P < 0.01$); NF-M 在低剂量组减少 20% ($P < 0.01$), 在高剂量组无明显改变; NF-H 在低剂量组增加 107%, 高剂量组增加 208%, 与对照组相比均存在明显差异 ($P < 0.01$)。

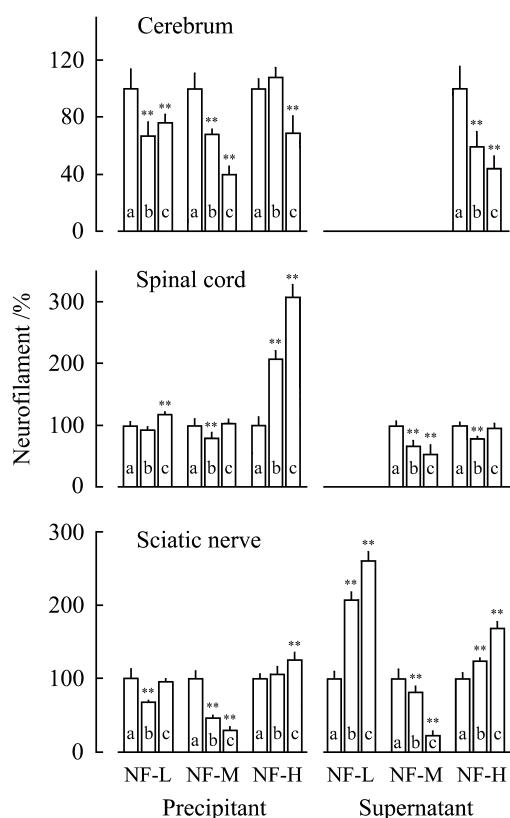


Fig 2. Changes in NF subunit proteins in rats induced by allyl chloride. a: control (taken as 100%), b: 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, c: 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$, compared with control.

在脊髓上清液中, NF-M 在低剂量组降低 33%, 在高剂量组降低 46% ($P < 0.01$); NF-H 在低剂量组降低 21% ($P < 0.01$), 在高剂量组变化却不明显。NF-L 未检出。结果见图 1 和 2。

2.4 坐骨神经组织中低、中、高分子量神经丝的改变

在坐骨神经沉淀中, NF-L 在低剂量组降低 32% ($P < 0.01$), 在高剂量组降低不显著; NF-M 明显降低, 在低剂量组降低 53%, 在高剂量组降低 70%, 与对照组相比均存在明显差异 ($P < 0.01$); NF-H 在低剂量组无明显增加, 高剂量组增加 26% ($P < 0.05$)。

在坐骨神经上清液中, NF-L 明显增加, 在低剂量组中增加 109%, 高剂量组中增加 161%, 与对照组相比均存在明显差异 ($P < 0.01$); NF-M 明显降低, 在低剂量组中降低 18%, 高剂量组中降低 76%, 与对照组相比均存在明显差异 ($P < 0.01$); NF-H 明显增加, 在低剂量组中增加 24%, 在高剂量组中增加 69% ($P < 0.01$)。结果见图 1 和 2。

3 讨论

本文通过建立 Wistar 大鼠亚慢性中毒模型, 测定了氯丙烯中毒后大鼠大脑、脊髓和坐骨神经沉淀和上清液中 NF 3 个亚单位 NF-L, NF-M, NF-H 含量的变化, 结果显示, 氯丙烯引起大鼠大脑、脊髓和坐骨神经沉淀和上清液中的 NF 3 个亚单位不同程度的改变, 从而使 NF 3 亚单位之间的比例异常, 造成 NF 紊乱。NF 3 个亚单位的变化表明, 氯丙烯影响了 NF 的表达或代谢, 而 NF 的代谢紊乱可能是氯丙烯引起中毒性周围神经病的发病机理之一。

病理学研究结果表明, 氯丙烯中毒后, 电镜下观察可见, 坐骨神经内有髓纤维内的微管和 NF 形态改变。微管和 NF 边缘不清楚, 呈毛絮状, 有的聚集融合, 堆积在一起; 有的走行紊乱, 分布不均, 局部可出现空白区。线粒体有明显增多, 少部分可见嵴脱落呈空泡变性。髓鞘未见明显改变^[2,3]。

在本实验中, 可以观察到氯丙烯亚慢性中毒对大脑、脊髓和坐骨神经中的 NF 产生不同的影响。比较 3 种神经组织显示坐骨神经沉淀高剂量组降低 (70%) 比大脑 (60%) 和脊髓 (无明显改变) 明显。坐骨神经上清液高剂量组降低 (76%) 比脊髓 (46%) 明显。表明坐骨神经组织 NF-M 降低比大脑和脊髓明显。NF-H 则表现为大脑高剂量组沉淀和上清液分别降低了 31% 和 56%; 脊髓高剂量组沉淀增加了 208%, 上清液无明显改变; 而坐骨神经高剂量组则沉淀和上清液都增加了 26% 和 69%。表明 NF-H 在大脑呈降低趋势, 在脊髓和坐骨神经呈增加趋势。高剂量组的 NF-L 在大脑沉淀降低 (33%), 在脊髓增加 (18%), 坐骨神经无明显改变。但上清液中 NF-L 在坐骨神经增加 (261%)。表明 NF-L 在坐骨神经有增加趋势 (图 2)。坐骨神经组织 NF-M 降低和 NF-H, NF-L 增加趋势与作者以前在研究 PMSF 增强有机磷引起的迟发性神经病发现的坐骨神经 NF 的变化结果相似^[8]。也与氯丙烯中毒后坐骨神经病理所见的 NF 变性堆积的结果相一致^[2,3]。但与日本学者 Nagano 等^[4]报道的氯丙烯中毒组脊髓神经丝的 3 个亚单位与对照相比都明显减少的结果不完全相同。有人曾报道 2,5-己二酮中毒能使坐骨神经 NF 3 个亚单位明显减少^[9]。这可能与所用的提取 NF 的方法和抗体不同而导致结果不一致有关。

对于上清液中 NF 的变化的意义, 尚未见有文献报道。是否可以推测这些是分子量小的游离的

NF 亚单位。它们依靠游离态变成聚合态,聚合态再变成游离态,保持代谢平衡。氯丙烯可能影响了这个平衡,从而引起上清液中的反应。对于没有检测到的 NF 亚单位,可能是其含量非常低的原因所致。氯丙烯引起的上清液中 NF 的变化为临床检测氯丙烯引起的中毒性周围神经病提供了一种可能的思路,至于氯丙烯引起的上清液中 NF 变化的临床意义尚待进一步研究。

对于 NF 3 亚单位含量的改变的原因,可能是多种因素的综合结果。氯丙烯可引起细胞内 Ca^{2+} 升高,继而激活钙蛋白酶,钙蛋白酶活性的增加可引起 NF 降解;同时 Ca^{2+} 升高又可引起多种蛋白激酶如蛋白激酶 C、钙调蛋白-激酶 II 等活性增加,使 NF 磷酸化,而 NF 磷酸化后对钙蛋白酶降解的敏感性降低。至少有这两种因素相互作用,进而引起 NF 3 个亚单位含量不同的改变。氯丙烯是否直接影响 NF 的转录和表达,需要进一步研究。至于氯丙烯引起大脑、脊髓和坐骨神经各组织内 NF 各亚单位出现不同的改变,可能与组织的特异性、NF 各亚单位的磷酸化程度不同以及 NF 各亚单位对钙蛋白酶降解的敏感性不同等原因有关,这些猜测尚待进一步证实。

4 参考文献:

- [1] Dau J, Wenthold RJ. Immunocytochemical localization of neurofilament subunits in the spiral ganglion of normal and neomycin-treated guinea pigs[J]. *Hear Res*, 1989, **42** (2-3):253-263.
- [2] Sun KR, Yu LH, Yang DC. Effect of allyl chloride on the ultrastructures of rat's peripheral nerve fibers[J]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis* (中华劳动卫生职业病杂志), 1986, **4**(3):174-179.
- [3] He F, Jacobs JM, Scaravilli F. The pathology of allyl chloride neurotoxicity in mice[J]. *Acta Neuropathol* (Berl), 1981, **55**(2):125-133.
- [4] Nagano M, Yamamoto H, Harada E, Miyamoto E, Futatsuka M. Comparative study of modification and degradation of neurofilament proteins in rats subchronically treated with allyl chloride, acrylamide, or 2,5-hexanedione[J]. *Environ Res*, 1993, **63**(2):229-240.
- [5] He Y, Nagano M, Yamamoto H, Miyamoto E, Futatsuka M. Modifications of neurofilament protein by possible metabolites of allyl chloride *in vitro*[J]. *Drug Chem Toxicol*, 1995, **18**(4):315-331.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248-254.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Translated by Jin DY, Lin MF. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆操作指南)[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1998. 888-897.
- [8] Xie K, Gupta RP, Abou-Donia MB. Alteration in cytoskeletal protein levels in sciatic nerve on post-treatment of diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-treated hen with phenylmethyl sulfonyl fluoride[J]. *Neurochem Res*, 2001, **26**(3):235-243.
- [9] Chiu FC, Opanashuk LA, He DK, Lehning EJ, LoPachin RM. γ -Diketone peripheral neuropathy. II. Neurofilament subunit content[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **165** (2):141-147.

Effect of allyl chloride on the content of neurofilament protein in rat

XIE Ke-Qin, XIAO Zhi-Feng, LI Yan, ZHAO Li

(Institute of Toxicology, School of Public Health, Shandong University; Toxicology Key Laboratory of Shandong, Jinan 250012, China)

Abstract: **AIM** In order to inquire the toxic mechanism of allyl chloride (AC). **METHODS** Thirty Wistar male rats were treated by sc AC 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (low dose group, LD) or 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (high dose group, HD) for 90 d and

the percent content changes in low molecular weight neurofilament (NF-L), middle molecular weight neurofilament (NF-M), and high molecular weight neurofilament (NF-H) in cerebrum, spinal cord and sciatic nerve were analyzed by Western

blot. **RESULTS** In cerebrum precipitant and supernatant, neurofilament three subunits were all decreased significantly in LD ($n = 10$, $P < 0.01$) and HD ($n = 10$, $P < 0.01$); in spinal cord precipitant and supernatant, NF-M decreased significantly ($n = 10$, $P < 0.01$); NF-H increased significantly in precipitant ($n = 10$, $P < 0.01$), but decreased in supernatant; NF-L increased in precipitant. In sciatic nerve, NF-M were reduced, however, NF-H enhanced. NF-L

decreased in precipitant, but increased in supernatant. **CONCLUSION** The results suggest that AC-induced peripheral neuropathy be related to NF subunit contents disturbed.

Key words: allyl compounds; allyl chloride; neurofilament proteins; toxicity

Foundation item: The project supported by Natural Science Foundation of Shandong Province(Y97C13049)

(本文编辑 乔虹)

第六届亚太地区动物、植物和微生物毒素会议简介

第6届亚太地区动物、植物和微生物毒素会议暨第11届澳大利亚热带医学年会于2002年7月8~12日在澳大利亚的凯恩斯隆重召开。约150位来自亚太地区和欧美各国的相关学者参加了会议。我国大陆的熊玉良教授夫妇,梁宋平教授以及吉永华研究员应邀参加了这次大会。

本次会议设立了以下几个方面的议题:旅游医学、蛋白组学、基因组学以及毒素的结构与功能、蛇毒素、热带疾病、临床毒理学、微生物与疟疾毒素、应用毒理学、节肢动物毒素、芋螺毒素以及海洋生物毒素。除大会专题报告外,会议还安排了两个半天的墙报形式展示与讨论。

此次会议涉及面广,学科交叉性突出。尤其几个带有战略指导性的报告,例如毒素蛋白组学和毒素基因组学,毒素的靶器官及其多样性等提示了今后该研究领域发展的侧重趋向。此外,毒素的临床应用及其生物杀虫剂的构建与开发利用等也是此次会议中令人振奋的热点话题。例如,继由美国 Elan Pharmaceuticals 公司研发出一个被命名为齐可替特(ziconotide)强镇痛药(属N-型钙通道阻断剂的omega-芋螺毒素)后,此次会议中澳大利亚学者再次通报了另一个由澳大利亚产业基金鼎力支持研发的用于治疗慢性神经病理性痛的新药ACV1。该药属alpha-芋螺毒素,具有烟碱型胆碱能受拮抗剂的功效。

纵观大会所做的93个专题报告和展示的76个墙报内容,各种现代生物技术平台已被广泛地应用在该领域的研究中,其中,克隆通道细胞株的运用以及毒素及其与受体相互结合的空间构象计算机模拟不失为此次会议较亮丽的风景线,提示着准确信息的获取及其处理需要借助更先进的技术平台支撑和知识更新。

为响应当前国际性的反恐斗争潮流,会议着意邀请一位澳大利亚官员介绍了世界各国生物和化学武器战略储备以及品种研发的概况,告戒正义力量要呼吁世界和平。

值得一提的是,这次会议特意安排两位学者分别介绍了3位已故澳大利亚杰出海洋生物和毒理学家的生平以及他们对该领域发展的卓越前导性学术贡献,倡导了无私奉献的科学精神,令每位与会者肃然起敬,倍感事业的神圣。这种优良的会风值得我们大家,尤其青年学者们借鉴和继承。

大会期间,召开了部分与会国际毒素学会会员的会务会议,大家一致鼓掌通过了决议:2005年在菲律宾的苏比克湾自由港(Subic Bay Freeport)与国际脑研究组织共同组办第7届亚太地区动物、植物和微生物毒素会议,并确定了毒素、离子通道和受体为下次会议的主题。

吉永华供稿