

氯丙烯处理后大鼠大脑、脊髓和坐骨神经 $G_{q/11}\alpha$ 蛋白含量的变化

李 岩, 谢克勤*, 赵 丽, 段化伟, 张忠彬

(山东大学公共卫生学院毒理学研究所, 山东 济南 250012)

摘要: 目的 探讨氯丙烯引起周围神经病的机制。方法 Wistar 雄性大鼠 sc 氯丙烯 3 个月后, 用 Western 印迹方法分析测定大鼠大脑、脊髓、坐骨神经组织匀浆沉淀中 $G_{q/11}\alpha$ 蛋白含量的变化。结果 在大脑沉淀中, $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 氯丙烯组使 $G_{q/11}\alpha$ 蛋白含量降低 20%, $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组降低 25% ($P < 0.01$); 在脊髓沉淀中, $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 氯丙烯组使 $G_{q/11}\alpha$ 蛋白含量降低 27%, $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组降低 63% ($P < 0.01$); 在坐骨神经沉淀中, 未检测到 $G_{q/11}\alpha$ 蛋白。结论 氯丙烯亚慢性中毒可导致大脑、脊髓神经细胞膜的 $G_{q/11}\alpha$ 蛋白相对含量减少, 下调 G_q -磷脂酶 C 信号传导通路。

关键词: 氯丙烯; G 蛋白类; 脑; 脊髓; 坐骨神经

中图分类号: R994.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)01-0061-04

氯丙烯 (allyl chloride) 又称烯丙基氯, 广泛应用于有机合成、医药、农药、合成树脂等工业中。已知氯丙烯可以引起中毒性周围神经病, 患者主要表现为对称性远端型运动及感觉障碍, 以及周围神经纤维的轴索变性^[1]。

G 蛋白即鸟嘌呤核苷酸结合蛋白, 是由 α, β, γ 3 种亚基组成的跨膜蛋白, 在膜上以三聚体形式存在, 不具活性。当外来化合物与受体结合后, 受体被激活, G 蛋白解聚, 形成有活性的 α -鸟苷三磷酸 (guanosine triphosphate, GTP) 而发挥作用。根据 α 亚基氨基酸序列的相似程度, 可将其分为 4 种类型: $G_i\alpha$,

$G_s\alpha$, $G_q\alpha$, $G_{12}\alpha$ 。 $G_{q/11}\alpha$ 是 $G_q\alpha$ 类中的一种, 主要调节磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 介导的信号传导通路, 引起下游 Ca^{2+} 、甘油二酯 (diacyl glycerol, DG), 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 等信号传递分子的变化。

已发现有多种外源性化合物能引起 G 蛋白含量或活性的改变, 如酒精^[2]、大麻素^[3]、可卡因、吗啡、铝、汞、敌草腈等都可通过 G 蛋白信号传导通路引起神经毒性。已知氯丙烯作用于机体可引起中毒性周围神经病, 但氯丙烯对 G 蛋白的影响目前尚未见报道。作者对氯丙烯中毒后大鼠大脑、脊髓和坐骨神经组织 G 蛋白含量变化进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

氯丙烯, 由中国医药 (集团) 上海化学试剂公司生产; 苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 由 Sigma 生产; 兔抗 $G_{q/11}\alpha$ 单克隆抗体 (anti- $G_{q/11}\alpha$ subunit) 由德国 Merck 公司生产, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 由北京中山公司进口分装。

1.2 动物处理

Wistar 大鼠, $\hat{\sigma}$, 30 只, 体重 180 ~ 220 g, 由山东医科大学实验动物中心提供。饲养 7 d 后, 随机分为 3 组, 每组 10 只。氯丙烯溶于花生油中, 处理组每天 sc 氯丙烯 ($75, 150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 90 d, 对照组每天 sc 相同体积花生油 90 d, 常规颗粒饲料喂养, 自由饮水, 室温 (20 ~ 24) °C, 湿度 40% ~ 60%, 每 2 周测一次体重。90 d 后, 断头处死大鼠, 在冷环境下迅速取出大脑、脊髓和坐骨神经, 迅速投入液氮中, -70 °C 保存备用。

1.3 大脑、脊髓和坐骨神经组织匀浆制备

坐骨神经组织先在陶瓷研钵加液氮研成蛋白粉末后, 其他组织称约 0.5 g, 转移入玻璃匀浆器中, 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

收稿日期: 2002-04-22 接受日期: 2002-10-22

基金项目: 教育部优秀中青年骨干教师基金项目 [2000(65)]

作者简介: 李 岩 (1976-), 女, 山东省烟台人, 医学硕士, 研究方向神经毒理; 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

PMSF, 在冰浴中 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 匀浆 10 次, 然后吸至 5 mL 离心管中。冰浴放置 30 min 后, 4°C $28\,000 \times g$ 离心 30 min, 小心吸出上清, 沉淀用 2 mL 匀浆缓冲液悬起, 储存在 -70°C , 作为沉淀样品备用。

1.4 蛋白含量测定

按 Bradford^[4] 法进行。

1.5 Western 印迹法

电泳参照 Laemmli^[5] 方法, 所有样品电泳均在 10% 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 $60 \mu\text{g}$, 脊髓沉淀上样量 $40 \mu\text{g}$, 坐骨神经沉淀上样量 $25 \mu\text{g}$, 转膜杂交参照 Towbin 等^[6] 方法, 将电泳后组装好的转膜系统进入转膜盒中, 加 1 L 转膜缓冲液, 打开循环水, 打开电源, 100 V 持续 3 h。取出硝酸纤维素膜, 放入含 5% 脱脂奶粉的封闭缓冲液中, 震荡 30 min。取出硝酸纤维素膜, 用含 1% Tween-20 的 PBS (PBST) 震荡洗涤, $3 \text{ min} \times 2$ 次, 然后加 $8 \mu\text{L}$ 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°C 过夜。打开塑料袋, 取出硝酸纤维素膜, 用 PBST 震荡洗涤, $5 \text{ min} \times 3$ 次。加 $15 \mu\text{L}$ 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, 用 PBST 50 mL 震荡洗涤, $5 \text{ min} \times 3$ 次。加入二氨基联苯胺 (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 DUOSCAN1200 扫描仪扫描, 用 IPP 分析软件分析杂交带总光密度 (IOD) 值, IOD 值结果用 one-way ANOVA 进行分析。

2 结果

2.1 氯丙烯对大鼠毒性的表现

氯丙烯皮下注射, 前 2 周没有观察到大鼠外观明显改变, 约 2 周后, $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯丙烯组大鼠皮毛开始不光滑; 约 4 周后, 75 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠皮毛均不光滑, $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠肌肉松弛、活动减少、肌张力降低; 8 周后 75 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 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。

2.2 大鼠大脑沉淀内的 $G_{q/11}\alpha$ 的改变

图 1 结果表明, 在大脑沉淀中, 氯丙烯中毒后

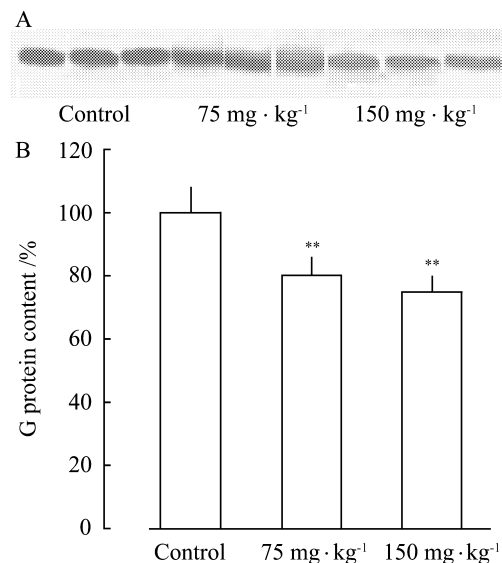


Fig 1. Changes in $G_{q/11}\alpha$ protein in cerebrum precipitant in rats induced by allyl chloride. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$, compared with control.

$G_{q/11}\alpha$ 亚单位相对含量降低。在 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组中降低 20%, 在 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组中降低 25%, 与对照组相比均存在显著性差异。

2.3 大鼠脊髓沉淀内 $G_{q/11}\alpha$ 的改变

图 2 结果表明脊髓沉淀中, $G_{q/11}\alpha$ 亚单位相对

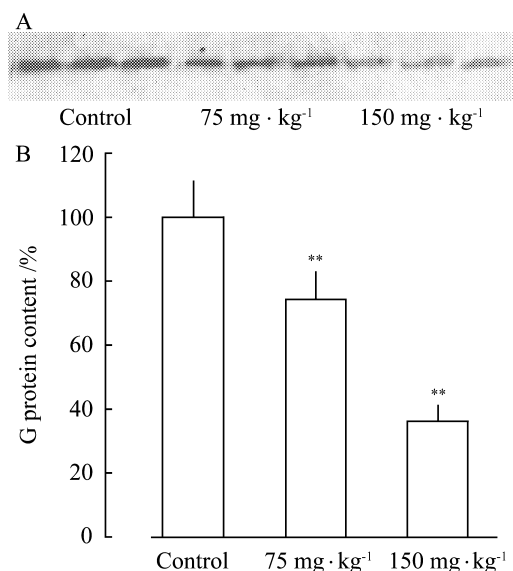


Fig 2. Changes in $G_{q/11}\alpha$ protein in spinal cord precipitant in rats induced by allyl chloride. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$, compared with control.

含量降低。在 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组中降低 27%, 在 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组中降低 63%, 与对照组相比均存在明显差异。

2.4 大鼠坐骨神经沉淀内 $G_{q/11}\alpha$ 亚单位的改变

在本次实验中, 坐骨神经沉淀上样量为 $25 \mu\text{g}$ 时, 对照组和处理组均未能检测到 $G_{q/11}\alpha$ 的表达。

3 讨论

G 蛋白由 α, β, γ 3 个亚基组成, 其中 α 亚基是功能亚基, 根据 α 亚基氨基酸序列的相似性, 可将已知的约 20 种 G 蛋白可分为 4 类: G_s, G_i, G_q 和 G_{12} 。 $G_s\alpha$ 主要功能是刺激腺苷酸环化酶 (AC) 和二氢吡啶敏感的 Ca^{2+} 通道, 并抑制心脏的 Na^+ 通道。 $G_i\alpha$ 主要抑制 AC 和电压依赖性 Ca^{2+} 通道, 激活不同形式的 K^+ 通道, 并激活磷酸肌醇特异的 PLC- β 和磷酸肌醇-3 激酶; $G_{12}\alpha$ 类可与特异的鸟苷酸交换因子反应, 调节 Na^+/K^+ 交换、立早基因表达和细胞的形态。 $G_q\alpha$ 类广泛存在于不同组织中, 其中 $G_{q/11}\alpha$ 蛋白分子量为 42 ku, 主要功能为调节激动剂对 PLC- $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ 介导的膜磷酸肌醇水解的刺激作用。多种外来化合物与相应受体结合后, 作用于 $G_{q/11}\alpha$, 激活 PLC, 在活化 PLC 催化下, 磷脂酰肌醇-4, 5-双磷酸 (PIP_2) 水解生成三磷酸肌醇 (IP_3) 和 DG, 这两者均为重要的第二信使, 分别通过两条独立而又相互协调的途径参与信号传导。有研究证明活化的 PLC 和 PKC 可与细胞骨架的不同成分相结合, 对维持细胞骨架的正常结构和功能具有重要意义^[7,8,9]。

氯丙烯可导致中毒患者周围神经病。研究证实它所引起的周围神经病的主要病理改变为神经纤维的轴索变性^[1]。电镜下观察染毒大鼠的坐骨神经可见有髓纤维内的微管和神经丝形态改变^[10,11]。在培养的鸡胚神经细胞, 随氯丙烯染毒浓度增加, 细胞内 Ca^{2+} 和 cAMP 的含量升高, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依赖性蛋白激酶 II 活性明显增加^[12], 同时可见细胞骨架蛋白的破坏和合成受抑^[9]。在大脑沉淀中, 氯丙烯中毒后神经丝 3 个亚单位低分子量神经丝 (low molecular weight neurofilament, NF-L)、中分子量神经丝 (middle molecular weight neurofilament, NF-M)、高分子量神经丝 (high molecular weight neurofilament, NF-H) 趋于降低; 在脊髓沉淀中, NF-L 和 NF-M 无明显差异; NF-H 明显增加, $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组增加 107%, $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组增加 208% (待发表)。

本实验结果显示氯丙烯亚慢性中毒可引起大鼠脑和脊髓 $G_{q/11}\alpha$ 含量的显著性降低, 这与 Lajat 等^[12] 研究发现长期应用激动剂可引起 G_q 持续的激活进而导致 G_q 蛋白含量下降的结果一致。本次实验检测到的 G_q 的降低, 可能是由于氯丙烯作为一个慢性刺激剂使 G_q 蛋白长期持续激活, 反馈抑制 G_q 有关的基因表达或抑制 G_q 蛋白转录, 下调 $G_{q/11}\alpha$, 使 $G_{q/11}\alpha$ 含量减少。而在坐骨神经中未检测到 $G_{q/11}\alpha$, 可能是其含量较少, 上样量不足所致。至于大脑和脊髓中 $G_{q/11}\alpha$ 表达下调与坐骨神经经下改变的病理之间的关系目前还不是很明确, 需要进一步探讨。

4 参考文献:

- [1] He F, Jacobs JM, Scaravilli F. The pathology of allyl chloride neurotoxicity in mice [J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1981, **55**(2):125-133.
- [2] Dar MS. Involvement of kappa-opioids in the mouse cerebellar adenosinergic modulation of ethanol-induced motor incoordination [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998, **22**(2):444-454.
- [3] Kaminski NE. Inhibition of the cAMP signaling cascade via cannabinoid receptors: a putative mechanism of immune modulation by cannabinoid compounds [J]. *Toxicol Lett*, 1998, **102-103**:59-63.
- [4] 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.
- [5] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, **227**(259):680-685.
- [6] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**(9):4350-4354.
- [7] Raynaud FI, Orr RM, Goddard PM, Lacey HA, Lancashire H, Judson IR, et al. Pharmacokinetics of G3139, a phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense to bcl-2, after intravenous administration or continuous subcutaneous infusion to mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, **281**(1):420-427.
- [8] Xie K, Gao S, Zhang L. The effect of allyl chloride on Ca^{2+} , Ca^{2+} -free CaM, cAMP and $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -PK II activities in nerve cells [J]. *J Occup Health*, 1998, **40**:50-54.
- [9] Xie K, Sun K, Gao S, Zhang L, Zhang M. Mechanism of

- allyl chloride-induced cytoskeletal injury to nerve cells[J]. *Chin Med J(Engl)*, 1998, **111**(6):556–559.
- [10] Sun KR, Yu LH, Yang DC. The research of the effect of allyl chloride on the ultrastructure of peripheral nerve in rat [J]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis* (中华劳动卫生职业病杂志). 1986, **4**(3):174–179.
- [11] Sun KR, Jiang HM, Cui X, Zhang XL, Han GA, Yu LH. Effects of allyl chloride on the nerve fibre microtubules, neurofilaments and Ca^{2+} , Mg^{2+} contents in rats[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志). 1989, **3**(4):293–296.
- [12] Lajat S, Tanfin Z, Guillon G, Harbon S. Modulation of phospholipase C pathway and level of Gq alpha/G11 alpha in rat myometrium during gestation [J]. *Am J Physiol*, 1996, **271**(3 Pt 1):C895–C904.

Change in $\text{G}_{q/11}\alpha$ protein content in rat cerebrum, spinal cord and sciatic nerve after treated with allyl chloride

LI Yan, XIE Ke-Qin, ZHAO Li, DUAN Hua-Wei, ZHANG Zhong-Bin

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

Abstract: **AIM** In order to acquire the mechanism of allyl chloride (AC) induced toxic peripheral neuropathy in human. **METHODS** Thirty Wistar male rats were treated by sc AC 75 or 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for 90 d and the contents of $\text{G}_{q/11}\alpha$ protein in cerebrum, spinal cord and sciatic nerve were analyzed with Western blot. **RESULTS** $\text{G}_{q/11}\alpha$ protein contents decreased significantly in cerebrum precipitant by 20% in 75 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group and 25% in 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group ($P < 0.01$); and also decreased significantly in spinal cord precipitant by 27% in 75 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group, and 63% in 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group ($P < 0.01$);

while $\text{G}_{q/11}\alpha$ protein was not detected in sciatic nerve precipitant. **CONCLUSION** AC can decrease the contents of $\text{G}_{q/11}\alpha$ protein in rat cerebrum and spinal cord, suggesting down-regulating G protein-phospholipase C signal transmit pathway.

Key words: allyl chloride; G-proteins; brain; spinal cord; sciatic nerve

Foundation item: The project supported by Excellent Teacher Foundation of Ministry of Education [2000(65)]

(本文编辑 石 涛)