

## 2,5-己二酮对大鼠神经组织微管含量的影响

张天亮, 赵秀兰, 谢克勤\*, 朱振平

(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 初步探讨2,5-己二酮的神经毒性是否与微管含量有关。方法 Wistar 雄性大鼠, 2,5-己二酮 200 和 400 mg·kg<sup>-1</sup>, ip, 连续 8 周(每周 5 d), 取大脑、脊髓、坐骨神经组织匀浆, 制备各组织上清和沉淀, 采用 SDS-PAGE 和 Western 印迹方法检测  $\alpha$ -管蛋白、 $\beta$ -管蛋白的相对含量。结果 2,5-己二酮 200 和 400 mg·kg<sup>-1</sup>, ip, 后大脑沉淀和上清中的管蛋白含量相当于对照组的 87% ~ 114%, 没有显著性变化。脊髓沉淀中管蛋白的含量为对照组的 88% ~ 105%, 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组上清中  $\alpha$ -管蛋白、 $\beta$ -管蛋白的含量相当于对照组的 59% ( $P < 0.05$ ) 和 47% ( $P < 0.01$ ), 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组为 126% ( $P < 0.05$ ) 和 156% ( $P < 0.01$ ); 坐骨神经沉淀中的含量相当于对照组的 88% ~ 109%, 上清中的含量均明显降低 ( $P < 0.01$ ), 相当于对照组的 22% ~ 70%。结论 2,5-己二酮导致大鼠脊髓和坐骨神经中管蛋白含量的变化, 其含量改变与 2,5-己二酮的外周神经毒性有关。

**关键词:** 2,5-己二酮; 微管; 大脑; 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(2004)05-0385-05

正己烷作为溶剂广泛用于丙烯聚合溶剂、食用油脂抽提溶剂、橡胶和涂料的溶剂及颜料的稀释剂等。2,5-己二酮(2,5-hexanedione)是正己烷在体内的最终代谢产物, 是正己烷的毒物形式, 可引起以感觉运动型多发性周围神经病为主要临床特征的慢性中毒。

神经丝、微管(microtubule)、微丝是神经细胞中

主要的细胞骨架成分, 研究表明 2,5-己二酮导致大鼠大脑皮层、脑干、脊髓、外周神经中神经丝减少<sup>[1~3]</sup>。对于微管的报道较少, 研究表明 100 ~ 400 mg·kg<sup>-1</sup> 2,5-己二酮染毒大鼠导致中度神经行为异常时坐骨神经中  $\beta$ -管蛋白的含量未发生改变, 组织病理学方法显示 0.5% 2,5-己二酮经饮水染毒连续 8 周后, 大鼠脊髓锥体束中微管数量未见明显变化, 未见有关大脑微管的报道<sup>[1,4]</sup>。本研究利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和 Western 印迹的方法研究 2,5-己二酮中毒大鼠坐骨神经、脊髓和大脑等组织构成微管的  $\alpha$ -管蛋白( $\alpha$ -tubulin)、 $\beta$ -管蛋白( $\beta$ -tubulin)含量的改变, 以比较 2,5-己二酮对不同组织中微管的影响, 并初步探讨 2,5-己二酮外周神经病变的发生机制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

2,5-己二酮购自德国 Merck-Schuchardt 公司; 抗  $\alpha$ -管蛋白、 $\beta$ -管蛋白抗体(I 抗)购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(II 抗)购自 Santa-Cruz 公司。

#### 1.2 动物处理

雄性成年健康 Wistar 大鼠, 体重 190 ~ 230 g, 中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物繁育场提供。动物随机分为 3 组, 每组 10 只。2,5-己二酮设 200 和 400 mg·kg<sup>-1</sup> 组, 将 2,5-己二酮溶于生理盐水中, 经腹腔注射染毒, 每周染毒 5 d, 每日 1 次, 连续 8 周。同时设立生理盐水对照组。

#### 1.3 神经组织样品的制备

实验结束时断头处死大鼠, 在冷环境下迅速取出大脑、脊髓、坐骨神经并投入液氮中, 然后转入 -80℃ 保存备用。取适量组织加入相应体积的预冷匀浆缓冲液(mmol·L<sup>-1</sup>: HEPES 10, NaF 50, EGTA 1, EDTA 1, 左旋咪唑(levamisole) 2, PMSF 1, pH

收稿日期: 2004-03-19 接受日期: 2004-06-11

基金项目: 国家 973 计划资助项目(2002CB512907)

作者简介: 张天亮(1971-), 男, 在读博士生, 研究方向神经毒理学, 现工作单位为山东省疾病预防控制中心。

\* 联系作者 E-mail: xie200@hotmail.com Tel: (0531) 8382132

6.8),移入玻璃匀浆器,在冰浴中匀浆。取匀浆液  $28\ 000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  离心 30 min。取上清作为各组织上清样品,沉淀中加入适量匀浆液,混匀作为沉淀样品。Lowry 法进行蛋白定量<sup>[5]</sup>。

#### 1.4 SDS-PAGE 和 Western 印迹法<sup>[6,7]</sup>

分离胶和浓缩胶浓度分别为 7.5% 和 4%。40 mA 稳流电泳,100 V、3 h 转印至硝酸纤维素膜,脱脂奶粉  $4^{\circ}\text{C}$  封闭过夜。加入 I 抗,室温反应 3 h,漂洗后加入 II 抗,反应后漂洗,加入 3,3'-二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色液,室温显色至出现棕色条带。

#### 1.5 杂交带分析和数据处理

杂交带用 DUOSCAN T1200 扫描仪扫描,用 Image-Pro Plus 分析软件分析杂交带的 IOD (integrated optical density) 值,并用 STATA 6.0 统计软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 大鼠中毒后的表现

2,5-己二酮染毒后  $400\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组动物第 2 周起皮毛出现不光滑、色黄、稀疏等异常,活动减少,体重呈现负增长,后期腹部凹陷,身体呈现细条状,肌张力降低,行走步态异常(如后肢间距增大、脚掌呈外“八”字形等),以至不能完全支撑起身体,腹部几乎贴近地面或笼底,随着染毒时间的延长,上述症状逐渐加重,实验结束时全部出现后肢瘫痪。同时甩尾实验、热板仪实验和足趾压痛觉测定结果表明,染毒后动物热感觉敏感度降低,痛觉阈值提高,后肢撑力实验和倒挂网格实验结果表明运动功能降低,后肢张力呈减小趋势。 $200\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组动物中毒表现相对较轻,后期体重较对照组低,并表现出明显的神经行为异常,但后肢无瘫痪发生。

### 2.2 微管含量的变化

2,5-己二酮染毒后,大脑、脊髓、坐骨神经中  $\alpha$ -管蛋白、 $\beta$ -管蛋白的 Western 印迹结果及其含量变化分别见图 1。

#### 2.2.1 大脑中微管的变化

图 1A、B 结果表明 2,5-己二酮染毒后 200 和  $400\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组沉淀中  $\alpha$ -管蛋白的相对含量相当于对照组的 104% 和 106%,上清中的含量为 87% 和 114%。沉淀中  $\beta$ -管蛋白的相对含量在 200 和  $400\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组中分别为 91% 和 100% ( $P > 0.05$ ),而上

清中分别为 107% 和 101% ( $P > 0.05$ )。实验组中微管蛋白两个亚单位的含量无显著性变化。

#### 2.2.2 脊髓中微管的变化

图 1C、D 结果表明 2,5-己二酮染毒后 200 和  $400\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组沉淀中  $\alpha$ -管蛋白的含量相当于对照组的 88% 和 100%, $\beta$ -管蛋白分别为 97% 和 105%,均无显著变化。但上清中的含量呈现非剂量依赖性的变化, $\alpha$ -管蛋白在 200 和  $400\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组中分别相当于对照组的 59% ( $P < 0.01$ ) 和 126% ( $P < 0.05$ ),而  $\beta$ -管蛋白分别为 47% 和 165% ( $P < 0.01$ )。

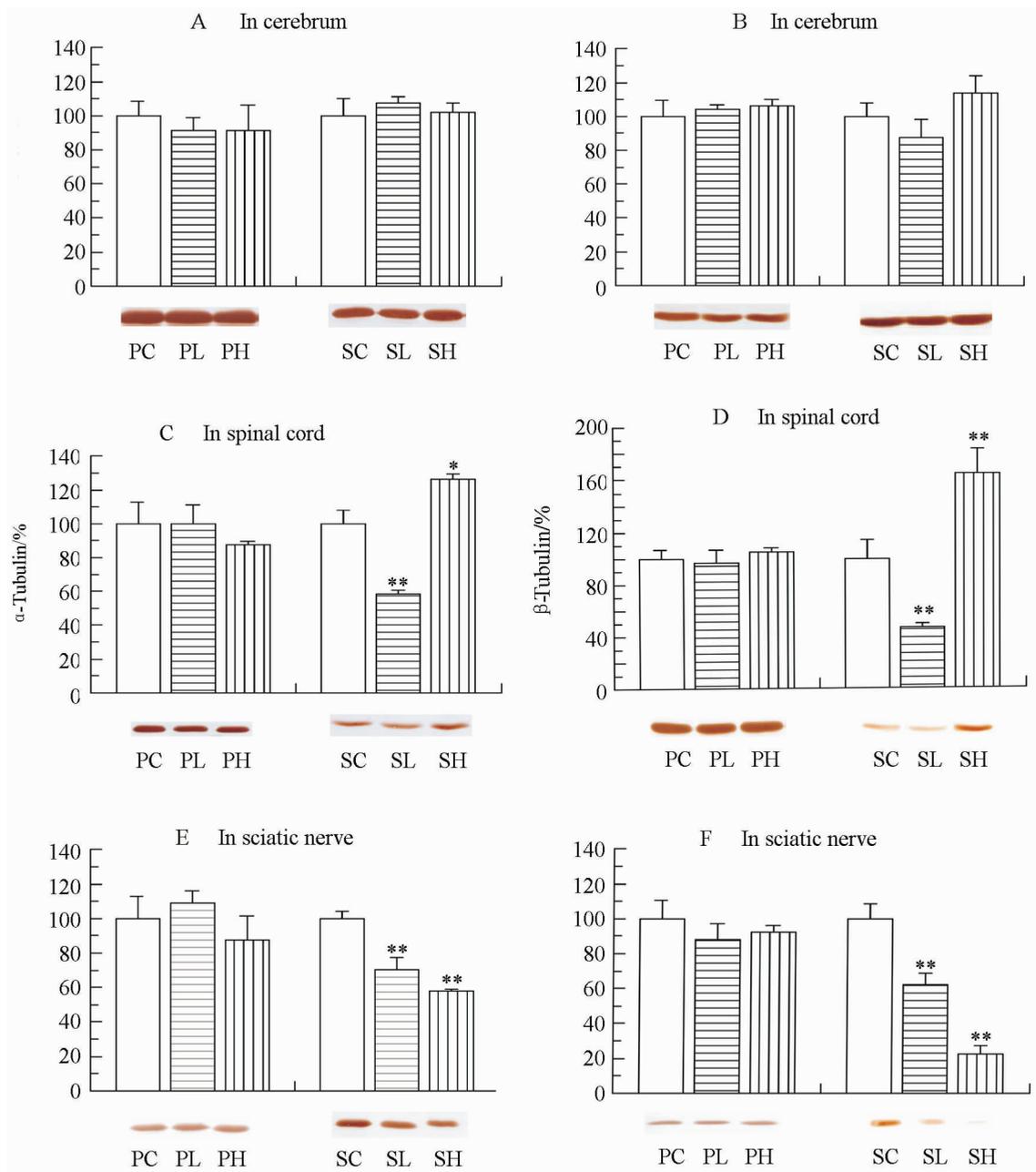
#### 2.2.3 坐骨神经中微管的变化

图 1E、F 结果表明 2,5-己二酮染毒后 200 和  $400\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组沉淀中  $\alpha$ -管蛋白的含量相当于对照组的 109% 和 88%, $\beta$ -管蛋白分别为 88% 和 92%,均无显著变化。但两个剂量组的上清中的含量均呈现明显的剂量依赖性降低, $\alpha$ -管蛋白分别下降至 70% 和 58% ( $P < 0.01$ ),而  $\beta$ -管蛋白降低为 62% 和 22% ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

微管是神经细胞内重要的骨架蛋白,在神经细胞和神经胶质细胞中十分丰富。微管由微管蛋白组成的原纤维纵向包围而成,而微管蛋白由  $\alpha$  和  $\beta$  管蛋白两个亚单位组成,其二聚体是构成微管的基本单位。微管与细胞的发生、细胞运动、维持细胞形态、轴浆转运等有关。

实验结果表明坐骨神经中管蛋白的含量呈现明显的剂量依赖性的减少,脊髓中的含量呈现非剂量依赖性的变化即低剂量组上清中的含量呈现降低趋势,而高剂量组呈现升高趋势,而大脑中未发生明显变化,说明 2,5-己二酮对不同组织中微管的影响是不同的。近来通过动物模型进行的形态学的进一步研究表明 2,5-己二酮导致的外周神经轴突萎缩是特异性、神经毒性相关的效应,可以介导或促进神经功能紊乱和行为异常。而轴突由特异性的轴突蛋白(如 piectin, BPAG1n/dystonin 家族等)交联神经丝、微管、微丝等构成的三维折叠序列维持<sup>[8,9]</sup>。因此可以认为管蛋白的变化参与了轴突的萎缩及 2,5-己二酮导致的外周神经病的发生。同时研究表明神经细胞内的微管与信息传递如蛋白激酶信号传导有关,信号分子直接与微管作用或通过蛋白质与微管作用,因此信号传导的改变亦可能是 2,5-己二酮的



**Fig 1. Alternations of tubulin content in the pellet and supernatant of nerve tissues.** The control was presented with 100%, the one of the test group was described with the percentage of the control. Representative Western-blot immunoblots were also shown. PC, PL, PH meant the pellet of control group, 2,5-hexanedione 200 mg·kg<sup>-1</sup> group and 400 mg·kg<sup>-1</sup> group respectively and SC, SL, SH meant the supernatant correspondingly.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control.

毒作用机制之一。

实验结果表明 2,5-己二酮染毒后 α-管蛋白和 β-管蛋白在坐骨神经上清中的含量明显减少,虽然沉淀中未呈现明显变化,但可以认为 2,5-己二酮导致坐骨神经中管蛋白含量的下降,此结果和 Chiu 等<sup>[1]</sup>的报道不一致。Chiu 等利用 SDS-PAGE 和 Western

印迹方法的研究表明,2,5-己二酮经口染毒大鼠 (175, 250, 400 mg·kg<sup>-1</sup>)至中度神经行为指标异常即步态异常和轻度后肢张力减弱时坐骨神经和胫神经匀浆中 β-管蛋白的相对含量未受影响。研究结论不一致的原因推测可能与染毒剂量、时间及样品匀浆液的制备有关。另外,本研究将匀浆液分为上清

和沉淀分别进行检测,提高了实验的灵敏度。作者推测上清中可能含有可溶性蛋白质、未组装和解聚的骨架蛋白及亚细胞成分<sup>[10]</sup>。实验中观察到的骨架蛋白可能为未组装和解聚甚至降解的骨架蛋白。正常骨架蛋白存在由亚单位到骨架蛋白的聚合和解聚、降解的动态平衡过程。2,5-己二酮可能干扰了骨架蛋白的生物合成、聚合和解聚、降解等过程,从而引起上清液中的变化。2,5-己二酮引起的上清液中骨架蛋白的变化为正己烷慢性中毒性周围神经病的临床检测提供了一种可能的思路,亦是作者进一步的研究目标。

目前对于微管变化的机制研究较少。研究表明2,5-己二酮染毒导致近端坐骨神经中管蛋白的磷酸化升高,中度神经行为异常大鼠脊髓背根感觉中枢 $\beta$ -管蛋白的 mRNA 无明显变化<sup>[11,12]</sup>。体外实验表明,大鼠大脑管蛋白在2,5-己二酮的作用下,其聚合的动力学和聚合物的形态均发生了改变<sup>[13]</sup>。另外,与微管关系密切的还有微管相关蛋白、tau 蛋白等,尚需进一步研究。

#### 4 参考文献:

- [1] Chiu FC, Opanashuk LA, He DK, Lehning EJ, LoPachin RM.  $\gamma$ -diketone peripheral neuropathy. II. Neurofilament subunit content [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **165**(2):141-147.
- [2] Nagano M, Yamamoto H, Harada K, 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.
- [3] Karlsson JE, Rosengren LE, Haglid KG. Quantitative and qualitative alternations of neuronal and glial intermediate filaments in rat nervous system after exposure to 2,5-hexanedione [J]. *J Neurochem*, 1991, **57**(4):1437-1444.
- [4] Yagi Y. Effects of 2,5-hexanedione on rat spinal pyramidal tract [J]. *Sangyo Igaku*, 1994, **36**(3):173-180.
- [5] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265-275.
- [6] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, **227**(259):680-685.
- [7] 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.
- [8] Lehning EJ, Jortner BS, Fox JH, Arezzo JC, Kitano T, LoPachin RM.  $\gamma$ -diketone peripheral neuropathy. I. Quality morphometric analyses of axonal atrophy and swelling [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **165**(2):127-140.
- [9] Rao MV, Houseweart MK, Williamson TL, Crawford TO, Folmer J, Cleveland DW. Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit(NF-H) or its phosphorylation [J]. *J Cell Biol*, 1998, **143**(1):171-181.
- [10] 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 phenylethylsulfonyl fluoride [J]. *Neurochem Res*, 2001, **26**(3):235-243.
- [11] Opanashuk LA, He DK, Lehning EJ, LoPachin RM.  $\gamma$ -diketone peripheral neuropathy. III. Neurofilament gene expression [J]. *Neurotoxicology*, 2001, **22**(2):215-220.
- [12] Horan KL, Eichberg J, Berti-Mattera LN, LoPachin RM. Hexanedione effects on protein phosphorylation in rat peripheral nerve [J]. *Brain Res*, 1989, **491**(2):366-370.
- [13] Boekelheide K. 2,5-Hexanedione alters microtubule assembly. II. Enhanced polymerization of crosslinked tubulin [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1987, **88**(3):383-396.

## Alterations of microtubule content in cerebrum, spinal cord and sciatic nerve of 2,5-hexanedione intoxicated rats

ZHANG Tian-Liang, ZHAO Xiu-Lan, XIE Ke-Qin\*, ZHU Zhen-Ping

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

**Abstract:** AIM To investigate whether the alterations of microtubule content are responsible for

the neurotoxicity of 2, 5-hexanedione. **METHODS** 2, 5-hexanedione was administered by intraperitoneal injection to Wistar rats with daily dose of 200 and 400 mg · kg<sup>-1</sup> for continuous 8 weeks (five times every week). Cerebrum, spinal cord and sciatic nerve were excised and homogenized, then centrifuged to prepare the supernatant and pellet sample. The relative levels of  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -tubulin were determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western-blot. **RESULTS** The contents of  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -tubulin in the cerebrum were not obviously affected with the relative contents from 87% - 114% of the control. For the spinal cord, they kept unaffected in the pellet, but dropped to 59% and 47% on the supernatant of 200 mg · kg<sup>-1</sup> group, while they increased to 126% and

156% of the control in 400 mg · kg<sup>-1</sup> group. In addition, 2, 5-hexanedione intoxication dose-dependently reduced the tubulin content to 22% - 70% of the control in the supernatant of the sciatic nerve, while they kept unaffected in the pellet. **CONCLUSION** 2, 5-hexanedione intoxication results in alternations of microtubule content, and the alternations might be related to its peripheral neurotoxicity.

**Key words:** 2, 5-hexanedione; microtubules; cerebrum; spinal cord; sciatic nerve

**Foundation item:** The project supported by National 973 Project of Ministry of Science and Technology (2002CB512907)

\* Corresponding author.

(本文编辑 石涛)

## 《中南药学》杂志征订启事

《中南药学》杂志是由湖南省药学会主办, 国内外公开发行的药学综合性学术期刊。国际刊号: ISSN1672-2981; 国内刊号: CN43-1408/R。

本刊内容涵盖药剂、药理、药物分析、药物化学、生化药物、中药及天然药物、医院药学、药学教育等。主要栏目有综述、专家论坛、专题讲座、研究论文、中药与天然药物、新药之窗、药物与临床、合理用药与临床药学和药物不良反应、临床用药问题解答、研究生论文、学术争鸣、药物信息动态、药事管理和药界精英等。

本刊为双月刊, 大 16 开本, 64 页码, 印刷装帧精美, 逢双月 20 日出版, 定价 10.00 元/册。如需订阅, 可到当地邮局(邮发代号为 42-290)或直接汇款至杂志社订购, 全年订价 60 元。

地址: 长沙市人民中路 86 号中南大学湘雅二医院内《中南药学》杂志社  
邮编: 410011 电话: 0731-4895602 传真: 0731-2258487

## 《中南药学》杂志征稿启事

《中南药学》是湖南省药学会主办, 国内外公开发行的医药专业性学术期刊。本刊为双月刊, 大 16 开本, 64 页码, 主要栏目有综述、专家论坛、专题讲座、研究论文、中药与天然药物、新药之窗、药物与临床、合理用药与临床药学和药物不良反应、临床用药问题解答、研究生论文、学术争鸣、药物信息动态、药事管理, 欢迎投稿。

本刊暂不收取稿件处理费和版面费, 也不付稿费。对于国家自然科学基金、国家攻关项目论文给予 2000 ~ 5000 元”篇的奖励, 对于部、省厅级课题论文给予 500 ~ 1000 元/篇的奖励。

地址: 长沙市人民中路 86 号中南大学湘雅二医院内 《中南药学》杂志社  
邮编: 410011 电话: 0731-2258487, 0731-4895602  
传真: 0731-2258487 E-mail: hnyxh@public.cs.hn.cn 或 znyx@sina.com.cn